

液质联用分析肝癌细胞 HLA I 类分子递呈的抗原肽

隋延仿¹, 郭爱林¹, 叶菁¹, 曲萍¹, 张敏², 卢兴森² (¹ 第四军医大学病理教研室, 陕西 西安 710033, ² 西安近代化学研究所)

关键词: 高效液相色谱; 质谱; 肝细胞癌; HLA; 抗原肽
中图分类号: R730.3 文献标识码: A

0 引言 HLA-抗原肽是抗原经过抗原递呈细胞(APC)加工后, 由HLA分子递呈给T细胞抗原受体(TCR)的短肽。寻找能够为T细胞所识别的HLA结合肽对于肿瘤免疫学研究及肿瘤有效防治具有重要的理论意义和应用价值, 许多国家都在致力于这一领域的研究。细胞HLA-抗原肽含量很少, 分子量很小, 难于纯化和测序, 是免疫学研究的一个难点。我们应用肝癌细胞膜酸洗技术及高效液相色谱与质谱联用技术首次分析和鉴定了一条为HLA-A2递呈的肝癌抗原肽。

1 材料和方法

1.1 材料 以人肝癌细胞株HHCC(A2,B7)经 γ IFN诱导HLA I类分子表达。以细胞膜酸洗技术收集 1×10^{10} 细胞洗脱液。T2细胞为抗原加工缺陷细胞。

1.2 方法 酸洗液经脱盐、粗分离和浓缩, 过SephadexG25(15 mm \times 500 mm)凝胶柱。紫外分光光度计测得样品蛋白质浓度为 $2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。制备反应性细胞毒T淋巴细胞; 将粗提物与T2细胞混合, 2 h后取 1×10^5 T2细胞与

收稿日期: 2000-01-26; 修回日期: 2000-01-31
基金项目: 国家自然科学基金重点项目资助(39830420)
作者简介: 隋延仿(1934-), 男(汉族), 山东省青岛市人。教授, 博士生导师。陕西省抗癌协会副理事长。Tel (029) 3374597

$\times 10^6$ 淋巴细胞混合, ^{51}Cr 释放实验检测杀伤活性。反相-高效液相色谱质谱联用(RP-HPLC-MS)分析酸洗液成分。采用BLASTP软件, 于互连网上对NR数据库进行检索, 寻找同源氨基酸序列, 同时在MEDLINE中检索所有已知HLA-I类分子结合肽序列, 分析所得序列是否已知序列。

2 结果 酸洗液经过SephadexG25凝胶柱得到 M_r 5000以内的多肽, 最终获得6 mg粗提物。杀伤实验结果显示粗提物中含有T细胞识别的肝癌抗原肽。所得粗提物经过反相高效液相色谱柱分离, 得到40个吸收峰。粗提物经过RP-HPLC之后, 进入质谱仪, 得到相应的质谱色谱图(TIC图)。每一个高效液相色谱图吸收峰都对应一个质谱峰。由于质谱仪每秒扫描一次, 所以每一个质谱峰都包含有多幅质谱CAD图。通过对CAD图的解析, 便可推测出相应多肽的序列, 现已获得10余条多肽信息, 其中SXXVHXNEV, X=I或L, 经过氨基酸同源性分析证明其为SLIVHLNEV, 是肝细胞生长因子受体前体(met原癌基因), 第1075-1083肽段, 第1080位点发生突变, 由F变为L, 由HLA-A2分子递呈, 可能是一条有重要意义的T细胞所识别的肝癌抗原肽。

3 讨论 既往进行HLA-I类分子结合肽一级结构分析主要通过反相高效液相色谱纯化, 得到纯度 $> 90\%$ 的多肽样品后, 应用Edman降解法进行多肽测序, 所需样品为nmol级, 技术难度大, 国内尚未见分析出结合肽一级结构的报道。HLA-I类分子结合肽为8-12肽, 正好在质谱测序范围内, 因此高效液相色谱质谱联用是研究HLA结合肽的最佳手段。液质联用不仅可以推测出结合肽的一级结构, 所需样品量少, 仅为pmol级, 而且可以对多肽混合物各组份直接进行一级结构测定, 使检测步骤大大简化。我们在对肝癌细胞系的HLA结合肽研究中, 已经分析出结合肽SLIVHLNEV, 其一基因突变抗原肽, 由HLA-A2分子递呈。经过文献检索, 尚未见有相同的报道。通过肿瘤细胞膜酸洗脱-液质联用分析技术, 可望获得更多肿瘤抗原肽, 使肿瘤免疫学研究进入一个新的阶段。

编辑 许昌泰

责任编辑 潘伯荣 责任编辑 许昌泰 英文编委 葛广纯
责任校对 许昌泰 袁天峰 蒋慧君 齐久林