

# 一商品猪 SLA-I 分子复合体的体外构建

高凤山<sup>1,2</sup>, 李新生<sup>2</sup>, 李云岗<sup>2</sup>, 郝惠芳<sup>2</sup>, 方勤美<sup>2</sup>, 夏春<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>大连大学生物工程学院, 辽宁大连 116622; <sup>2</sup> 中国农业大学动物医学院/农业部预防兽医学重点实验室, 北京 100193)

**摘要:** 【目的】研究中国北方杂交商品猪 SLA-I 类分子结构特点, 并为进一步的多肽结合等功能研究奠定基础, 需要在体外构建正确折叠的 SLA-I 类分子复合体。【方法】以长白-达兰商品猪为研究材料, 克隆 *SLA-2* 和  $\beta_2m$ , 然后采用剪接重叠延伸 PCR (splicing overlap extension PCR, SOE PCR) 法, 将 *SLA-2* 的胞外区和  $\beta_2m$  的成熟肽部分通过一富含甘氨酸/丝氨酸的 Linker ( $G_4S$ )<sub>3</sub> 连接, 形成 *SLA-2-Linker- $\beta_2m$*  全长, 并插入原核表达质粒 pMAL-p2X, 转化 *E. coli* TB1, IPTG 诱导表达。表达得到的融合蛋白分别经过 Western-blot、纯化及 Factor Xa 切割, 分离纯化单体蛋白。圆二色谱 (circular dichroism spectrum, CD) 测定蛋白的二级结构。【结果】SDS-PAGE 和 Western-blot 均证实融合蛋白 MBP-SLA-I 大小为 84.1 kD, SLA-I 单体蛋白大小为 41.6 kD。圆二色谱分析单体蛋白和融合蛋白二级结构元件  $\alpha$ -螺旋、 $\beta$ -折叠、转角和随机卷曲的符合率分别达到了 100%、90.6%、88.5% 和 96.9%。【结论】结果表明重构的 SLA-I 复合体具有正确的二级结构, 可以用于体外多肽结合等研究。

**关键词:** 复合体; 圆二色谱; SLA-I

## Construction of the SLA-I Protein Complex from an Outbred Pig

GAO Feng-shan<sup>1,2</sup>, LI Xin-sheng<sup>2</sup>, LI Yun-gang<sup>2</sup>, HAO Hui-fang<sup>2</sup>, FANG Qin-mei<sup>2</sup>, XIA Chun<sup>2</sup>

(<sup>1</sup> Bioengineering College of Dalian University, Dalian 116622, Liaoning; <sup>2</sup> College of Veterinary Medicine, China Agricultural University/Key Laboratory for Preventive Veterinary Medicine, Ministry of Agriculture, Beijing 100193)

**Abstract:** 【Objective】To investigate the structure of swine leukocyte antigen class I (SLA-I) molecules from outbred pigs in north of China and lay a basis for studying their function such as peptide-binding, the correctly refolded SLA-I need to be reconstructed *in vitro*. 【Method】Firstly, *SLA-2* genes from an outbred pig were cloned. Then the extracellular part of *SLA-2* was linked to the mature peptide of  $\beta_2m$  gene via ( $G_4S$ )<sub>3</sub>, a linker encoding a 15-amino acid glycine-rich sequence, using splicing overlap extension-PCR (SOE-PCR). The reconstructed gene *SLA-2-linker- $\beta_2m$*  (SLA-I) was inserted into pMAL-p2X and expressed in *E. coli* TB1 system. The fusion protein was processed followed by Western-blot, purifying and cleaving by Factor Xa and then to separate the monomer protein from MBP. The secondary structure of the monomer and fusion protein was determined by circular dichroism (CD) spectrum. 【Result】The results of SDS-PAGE and western-blot all proved that the MBP-SLA-I was 84.1 kD, and the monomer protein SLA-I was 41.6 kD. The  $\alpha$ -helix,  $\beta$ -sheet, turn, and random coil of the fusion protein and the monomer protein shared high homology ratio at 100%, 90.6%, 88.5% and 96.9%, respectively, detected by CD estimation. 【Conclusion】The results indicated that the complex protein SLA-I had correct secondary structure and could be used to have further research, such as peptide binding *in vitro*.

**Key words:** complex; circular dichroism spectrum; SLA-I

## 0 引言

【研究意义】主要组织相容性复合体 (major histocompatibility complex, MHC) 是指连锁于某一染

色体、编码与免疫应答直接相关的一类细胞膜糖蛋白基因群, 该基因群决定了脊椎动物种群和个体间的免疫应答及差异, 并与病毒、细菌等引起的疾病的抗性有关<sup>[1]</sup>。MHC 分为 MHC I、II 和 III 类<sup>[2]</sup>。其中, 主

收稿日期: 2008-04-28; 接受日期: 2008-12-24

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30371098)、辽宁省博士启动基金项目 (20081078)

作者简介: 高凤山 (1971-), 男, 河北怀安人, 博士, 研究方向为分子免疫学和分子病毒学。Tel: 0411-87402718-612; E-mail: gfs0626@126.com

要组织相容性复合体 I 类分子由重链 (MHC-I) 和轻链 ( $\beta_2m$ ) 构成一个复合体而结合病毒的 T 细胞表位, 引起细胞免疫<sup>[3-4]</sup>。模拟体内 MHC-I 类分子的作用方式, 在体外开展动物 MHC-I 类分子复合体构建、结构和功能研究, 是目前 MHC-I 类分子研究的一个方向。

【前人研究进展】White 等于 1999 年构建了由小鼠 MHC-I 类分子的 H-Dd 重链、含有多肽的 linker 和  $\beta_2m$  构成的复合体, 并证明共价连接的多肽能够和抗原结合槽结合<sup>[5]</sup>。Denberg 等的研究则更进一步, 他们把人 HLA-A2 重链和  $\beta_2m$  通过含有 15 个氨基酸的柔性接头 linker 连接, 形成一个单链分子复合体, 从而保留了未结合状态的抗原结合槽, 可以用来结合和筛选未知抗原多肽<sup>[6]</sup>。关于复合体的体外构建早期多集中于人和小鼠。猪的 MHC 称为猪的白细胞抗原 (swine leukocyte antigen), 简称为 SLA。SLA-I 类基因具有 3 个功能性基因, 分别为 *SLA-1*、*SLA-2* 和 *SLA-3*。其中, *SLA-2* 在信号肽的起始部位多 3 个氨基酸, 而与 *SLA-1* 和 *SLA-3* 相区别<sup>[7]</sup>。2002 年, Oleksiewicz 等将猪的 *SLA-1*、 $\beta_2m$  及猪瘟病毒 (classical swine fever virus, CSFV) 的一段已知多肽连接在一起形成复合体, 在 PET 22b<sup>+</sup>载体上表达并且形成正确的折叠<sup>[8]</sup>。最近, 高山等报道了中国南方近交系巴马小型猪的 SLA-I 的单链分子复合体的构建, 并证明体外构建的复合体可以用来结合和筛选病毒未知抗原表位肽<sup>[9]</sup>。由于 SLA-I 类分子对结合的抗原表位具有严格的宿主限制性<sup>[10]</sup>, 是否在不同品系猪之间存在复合体分子结构的差异, 是一个值得探讨的问题。为此, 有必要研究杂交商品系猪的复合体结构和功能, 为今后研究通过复合体筛选针对杂交商品猪的病毒表位研究奠定基础。

【本研究切入点】本研究针对中国北方地区一主要杂交品系长白-达兰猪, 在体外构建了由 *SLA-2* 胞外区、linker 及  $\beta_2m$  组成的 SLA-I 单链分子复合体, 将进一步丰富体外构建 MHC-I 复合体研究的材料, 并为今后研究商品猪重要病原抗原表位奠定基础。【拟解决的关键问题】利用 SOE PCR 技术构建 *SLA-2* 胞外区和  $\beta_2m$  成熟肽的复合体基因链, 实现复合体基因链的可溶性表达, 分离和纯化蛋白, 并利用圆二色谱技术测定其二级结构。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试剂、仪器及软件

AMV 反转录酶, Ex Taq PCR 试剂盒, IPTG 和 X-gal, T<sub>4</sub> DNA 连接酶, *EcoR* I 限制性内切酶均为

TaKaRa 公司产品 (宝生物工程大连有限公司); Trizol 试剂为 Invitrogen 公司产品; 玻璃奶回收试剂盒为博大泰克公司产品; pGEM-T easy 载体为 Promega 公司产品。p2X 载体, TB1 *E. coli*, Factor Xa 因子及淀粉树酯纯化柱均为 New England BioLabs (NEB) 公司产品。DEAE 葡聚糖凝胶为欣经科公司产品。PCR 扩增仪为 Hybaid 公司产品; 电泳系统为 Bio-RAD 公司产品。

长白-达兰商品猪脾脏 (北京某养殖场)。pGEM T-easy/ $\beta_2m$ 01 质粒 (长白-达兰猪) 由农业部预防兽医学重点实验室保存。

### 1.2 *SLA-2* 基因的扩增、克隆和序列分析

参照文献[11]的方法利用 Trizol 试剂盒从长白-达兰商品猪脾脏提取总 RNA, 以总 RNA 为模板, 以 OligodT-15 (生工合成) 为反转录引物, 采用 AMV 反转录酶合成 First-strand cDNA (fcDNA)。

参照 Gao 等<sup>[9]</sup>的方法 RT-PCR 扩增上述品系猪的 *SLA-2* 基因, PCR 产物 (*SLA-2-02*) 经 1.0% 琼脂糖电泳, 玻璃奶回收试剂盒回收大约 1 100 bp 左右的片段, 再与 pGEM-T easy 载体连接, 转化 JM109 感受态细胞, 筛选阳性重组质粒, 经 *EcoR* I 酶切及 PCR 鉴定后送三博公司 (Sanbo) 测序。

测定的序列经 GENETYXversion 9.0 (Software Development Co., Ltd, Tokyo, Japan) 分析。

### 1.3 *SLA-1* 复合体的构建

参照 Yang 等的研究方法<sup>[12]</sup>, 采用剪接重叠延伸 PCR (splicing overlap extension PCR, SOE PCR), 将 *SLA-2* 的胞外区和  $\beta_2m$  的成熟肽区连接, 中间加一富含甘氨酸和丝氨酸的 Linker[(G4S)<sub>3</sub>], 引物设计见表 1。分别以 *SLA-2*/pGEM T easy 质粒为模版, 采用引物 P1/P2 扩增 *SLA-2-Linker* 部分 (94°C 1 min, 65°C 1 min, 72°C 1 min, 30 cycles, 72°C 5 min); 以  $\beta_2m$ /pGEM T easy 为模版, 采用引物 P3/P4 扩增 Linker- $\beta_2m$  部分 (94°C 1 min, 65°C 1 min, 72°C 1 min, 30 cycles, 72°C 5 min); 扩增片段经纯化后, 以 1:1 的比例加入到 PCR 体系中, 然后以引物 P1/P4 进行扩增, 程序同前。纯化扩增得到的复合体全长基因 *SLA-2-(G4S)<sub>3</sub>- $\beta_2m$* , 再经 *EcoR* I 和 *Hind* III 酶切、回收后, 与 pMAL-p2X 载体连接, 并转化 TB1 感受态细胞<sup>[13]</sup>。复合体的构建设计见图 3。

### 1.4 表达产物的 SDS-PAGE、Western-blot、切割及纯化

挑取转化后的重组质粒的单个菌落, 加入 100 ml

表 1 SOE PCR 扩增复合体基因链的引物设计

Table 1 The primers for amplification of the complex genes by SOE PCR

引物 Primers	引物序列 (5'-3') Sequences of primers	位置 Sites
P1	TCAGAATTCGGTCCCCACTCCCTGAGGTATTTC <i>EcoR</i> I	SLA-2 胞外区 1-24 1-24 site in extracellular domain of SLA-2
P2	ACCGCCAGAGCCACCTCCGCCTGAACCGCTCCACC CCATCTCAGGGTGAGTGGCTCC	Linker-1-36; SLA-2 胞外区 801-822 Linker-1-36; 801-822 site in extracellular domain of SLA-2
P3	GGTTCAGGCGGAGGTGGCTCTGGCGGTGGCGGATCG GTCGCGCTCCCGAAGGTTTC	Linker-10-45; $\beta_2m$ 成熟肽区 1-22 Linker-10-45; 1-22 site in mature peptide of $\beta_2m$
P4	AGTAAGCTTTTAGTGGTCTCGATCCCACTTAAC <i>Hind</i> III	$\beta_2m$ 成熟肽区 273-297 273-297 site in mature peptide of $\beta_2m$

引物 P2 和 P3 横线部分代表 Linker (G4S) 3 序列

The parts with underline in P2 and P3 indicate the linker (G4S)3

LB 培养基, 37°C, 180 T/min 摇菌直至 OD<sub>600</sub> 达到 0.4~0.6, 按照终浓度为 0.3 mmol·L<sup>-1</sup> 加入 IPTG (Sigma), 继续培养 6 h 后, SDS-PAGE 检测表达产物。表达的蛋白条带转印到 PVDF 膜上, 100 V, 1 h。转印膜在含有 5%BSA 的 PBS 中封闭 1 h, 然后加入 1:3 000 稀释的鼠抗 MBP, 作用 1 h, 然后用 PBS 洗 3 次, 每次 10 min, 再加入 1:500 稀释的辣根过氧化物酶 (horseradish peroxidase, HRP) 标记的羊抗鼠二抗 (goat anti-rabbit immunoglobulin IgG antibody), 继续作用 1 h, 然后用 PBS 洗 2 次, 每次 10 min, 最后加入四氯乙萘酚 (4-Chloro-1-Naphthol/Hydrogen Peroxide) 进行底物显色。

表达产物的纯化参照 NEB<sup>[13]</sup> 方法。菌体经 5 000×g 离心 20 min 去沉淀, 上清加入过柱 buffer (20 mmol·L<sup>-1</sup> Tris-HCl, 200 mmol·L<sup>-1</sup> NaCl, 1 mmol·L<sup>-1</sup> EDTA), 混悬, 然后 -80°C 冻存 12 h。冻存物融化后, 在超声仪上超声裂解, 然后 9 000×g 离心 20 min, 取上清, 经淀粉树酯柱 (amylose affinity resin column) 纯化, SDS-PAGE 分析纯化效果。取纯化蛋白 1 mg, 在含有 20 U 的 Factor Xa 因子的 1 ml 缓冲液体系中, 4°C 切割 48 h, 然后先后过 DEAE-葡聚糖凝胶层析柱和淀粉树酯柱分离纯化目的蛋白, SDS-PAGE 鉴定蛋白纯度。

### 1.5 融合蛋白的二级结构测定

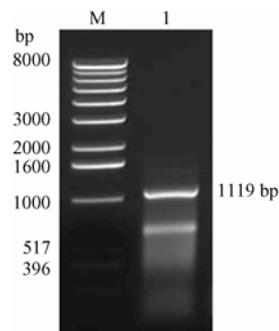
纯化蛋白经 Bradford 法 (1976) 测定其浓度, 并稀释至 0.4 mg·ml<sup>-1</sup>。取样品 600  $\mu$ l, 应用 Jasco J715 光谱仪在 25°C 条件下对融合蛋白 MBP-SLA-I, SLA-I 和 MBP 蛋白进行二级结构测定, 光谱值范围为 190~250 nm, 读数 4 次。圆二色谱 (CD) 分析, 取信号平均值并基线校正, 将所测定的 CD 值转换成摩尔椭圆度 (molar ellipticity)  $[\theta]$  (deg×cm<sup>2</sup>×dmol<sup>-1</sup>); 用计

算机专用软件 (J-715 for Windows Secondary Structure Estimator, Version 1.10) 分析各蛋白二级结构的组成。

## 2 结果与分析

### 2.1 SLA-2-02 基因的 RT-PCR 及克隆测序

SLA-2-02 经过 RT-PCR, 在 1.0% 的琼脂糖凝胶上电泳, 在  $\alpha$  成像仪上分别显示约 1 100 bp 的条带, 与理论计算值大小一致, 图 1。SLA-2 的克隆产物经测序, 分析比较, SLA-2-02 共 1 119 bp, 3-1097 位为 ORF 区, 共编码 364 个氨基酸, 含有两套链内二硫键, 分别第 125, 188, 227 和 283 位置出现半胱氨酸残基, 基因序列登录入 DDBJ/EMBL/GenBank (AB205147)。



M: 1 kb DNA ladder (8 000, 7 000, 6 000, 5 000, 4 000, 3 000, 2 000, 1 600, 1 000, 517, 396 and 230 bp); 1: SLA-2-02 基因  
M: 1 kb DNA ladder marker (8 000, 7 000, 6 000, 5 000, 4 000, 3 000, 2 000, 1 600, 1 000, 517, 396 and 230 bp); 1: SLA-2-02

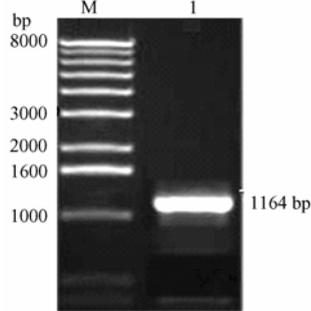
图 1 RT-PCR 扩增 SLA-2 基因

Fig. 1 Amplification of SLA-2 by RT-PCR

### 2.2 pMAL-p2X 融合表达载体的构建

经过 SOE PCR 得到了 1 条大约 1 100 bp 的条带,

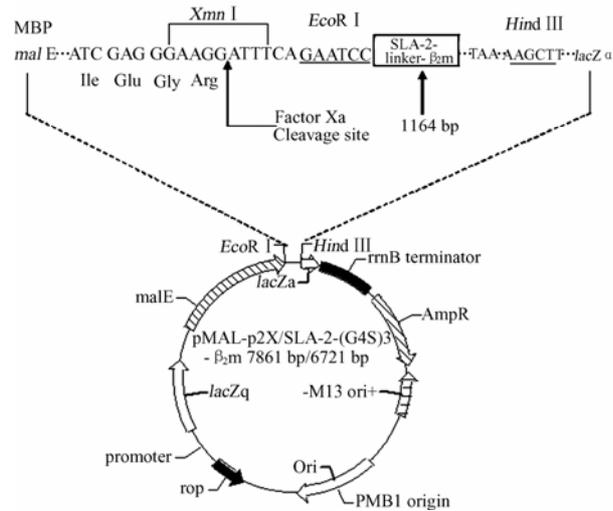
与复合体基因片段 *SLA-Linker-β<sub>2</sub>m* 理论设计值 1 164 bp 相符 (图 2)。*SLA-Linker-β<sub>2</sub>m* 经过 *EcoR* I 和 *Hind* III 双酶切后, 插入到 p2X 载体, 整个载体的构建示意图见图 3。



M: 1 kb DNA ladder (8 000、7 000、6 000、5 000、4 000、3 000、2 000、1 600、1 000、517、396 和 230 bp) ; 1: *SLA-2-linker-β<sub>2</sub>m*

图 2 SOE PCR 扩增 *SLA-2-Linker-β<sub>2</sub>m*

Fig. 2 Amplification of *SLA-2-Linker-β<sub>2</sub>m* by SOE PCR



左箭头指靠近 *EcoR* I 的 Factor Xa 切割位点, 右箭头指示插入片段及其长度  
The left arrow indicates the factor Xa cleavage site and the right arrow indicates the inserted fragment with its length

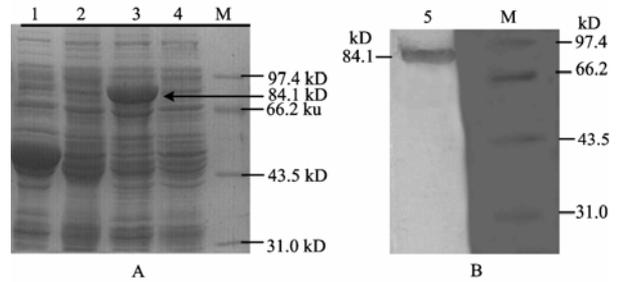
图 3 pMAL-p2x/SLA-I 表达载体的构建

Fig. 3 Construction of pMAL-p2x/SLA-I

2.3 融合蛋白表达、SDS-PAGE 及 Western Blot 鉴定

MBP-SLA-I/p2X 重组子经过诱导, 其菌体蛋白在 SDS-PAGE 上电泳显示 1 条大约 80 kD 的条带, 与计算值 84.1 kD 一致 (图 4-A)。Western Blot 结果显示,

抗体杂交条带大小为 80 kD 左右, 与表达条带大小一致 (图 4-B)。



A: SDS-PAGE 分析 MBP-SLA-I 的诱导表达; B: MBP-SLA-I 的 Western blot; M: 低分子量蛋白 Marker; 1: p2X 诱导表达 MBP; 2: TB1 全菌对照; 3: MBP-SLA-I 诱导表达菌; 4: MBP-SLA-I 未诱导表达菌; 5: Western blot 杂交带

A: SDS-PAGE analysis of MBP-SLA-I; B: Western-blot analysis of MBP-SLA-I protein; M: Molecular weight standards (97.4, 66.2, 43.5, 31.0, 21, 14kD); 1: Control of pMAL-p2X expressing MBP; 2: TB1 *E. coli* control; 3: Expression of MBP-SLA-I protein after inducing in TB1 *E. coli*; 4: Expression of MBP-SLA-I protein uninduced in TB1 *E. coli*; 5: MBP-SLA-I protein visualized by Western-blot

图 4 MBP-SLA-I 的 SDS-PAGE 及 Western Blot

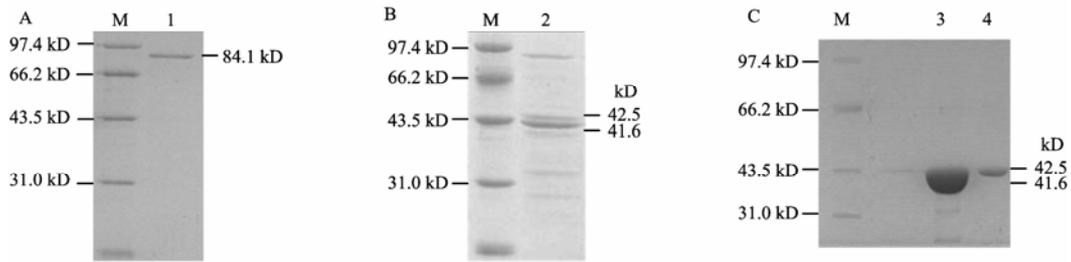
Fig. 4 SDS-PAGE and Western Blot analysis of MBP-SLA-I protein

2.4 融合蛋白的纯化、切割和分离

菌体蛋白经过淀粉树脂柱和 DEAE-葡聚糖凝胶层析柱纯化, 得到了纯化蛋白, 纯度经过薄层扫描, 显示纯度大约为 90% (图 5-A)。Factor Xa 因子切割后, 在蛋白 Marker 的 43.5 kD 下方显示了两条距离非常接近的单带, 按照其理论计算值进行推算, 上边较弱的单带为 MBP, 42.5 kD, 而下边较浓的单带为单体蛋白, 41.6 kD (图 5-B)。MBP 与单体蛋白的混合物经过 DEAE-葡聚糖凝胶层析柱纯化, 淀粉树脂柱分离后, 得到分离的单体蛋白和 MBP (图 5-C)。

2.5 单体蛋白二级结构测定和分析

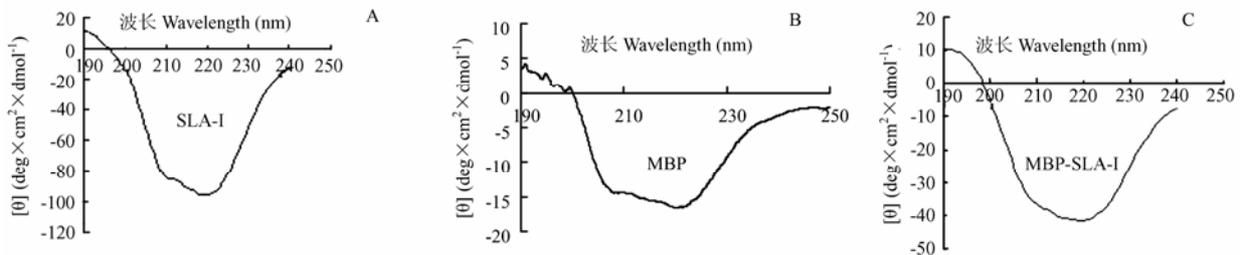
对纯化的单体蛋白 SLA-I、MBP 和融合蛋白 MBP-SLA-I 进行圆二色谱测定, 结果在 208 和 222 nm 附近均为最小值, 呈典型的 α 螺旋结构 (图 6-A, B, C) 应用 CONTIN 程序及 Yang-Chen 氏公式<sup>[14]</sup>计算结果见表 2, 切割后的单体蛋白 SLA-I, 由各二级结构元件 α 螺旋、β 折叠、转角、随机卷曲的含量计算出的氨基酸数目分别为 76、145、69 和 97。融合蛋白 MBP-SLA-I 除去 MBP 蛋白相应二级结构成分的含量, 计算的得到的 α 螺旋、β 折叠、转角、随机卷曲分别占 76、139、78、94 个氨基酸。



A: MBP-SLA-I 的纯化; B: Factor Xa 因子切割 MBP-SLA-I; C: MBP 与 SLA-I 的分离纯化; M: 低分子量蛋白 Marker (97.4, 66.2, 43.5, 31.0, 21, 14 kD); 1: 经淀粉树酯柱纯化后的融合蛋白; 2: 切割后的混合条带, MBP (42.5 kD) 和单体蛋白 SLA-I (41.6 kD); 3: 分离后的 SLA-I 蛋白; 4: 分离后的 MBP 蛋白  
 A: Purification of MBP-SLA-I protein; B: Factor Xa cleavage of MBP-SLA-I protein; C: Purification and separation of MBP and SLA-I protein by DEAE-Sepharose ion exchange chromatography and amylose affinity chromatograph column; M: Molecular weight standards (97.4, 66.2, 43.5, 31.0, 21, 14 kD); 1: The purified MBP- SLA-I protein; 2: Factor Xa cleaving MBP-SLA-I protein; 3: The purified SLA-I; 4: The purified MBP

图 5 融合蛋白 MBP-SLA-I 的纯化、切割和分离

Fig. 5 Purification and Factor Xa cleavage of MBP-SLA-I protein



A: SLA-I 蛋白; B: MBP 蛋白; C: MBP-SLA-I 蛋白.  $\theta$  表示摩尔椭圆度, 单位为度·厘米<sup>2</sup>/分摩尔; Wavelength 代表波长, 单位为纳米  
 A: Far UV CD spectrum of the SLA-I protein; B: Far UV CD spectrum of the MBP; C: Far UV CD spectrum of MBP-SLA-I.  $\theta$  indicates molar ellipticity, and its unit of measure is denoted by deg·cm<sup>2</sup>·dmol<sup>-1</sup>; Wavelength indicates wavelength, and its unit of measure is denoted by nm

图 6 圆二色谱测定蛋白的二级结构

Fig. 6 Far UV CD spectrum of proteins

表 2 SLA-I 二级结构测定

Table 2 CD detection and calculation of the secondary structure elements of SLA-I

二级结构元件 Secondary structure elements	单体蛋白 SLA-I 的 CD 值 (387aa)		标签蛋白 MBP 的 CD 值 (392aa)		单体蛋白 SLA-I 的 CD 计算值	融合蛋白 MBP- SLA-I 的 CD 值(779aa)	
	CD of the monomer protein of SLA-I (387aa)		CD of the target protein of MBP (392aa)		Calculated CD of the monomer protein of SLA-I	CD of the fusion protein of MBP-SLA-I (779aa)	
	百分率 Percentage (%)	氨基酸数 aa	百分率 percentage(%)	氨基酸数 aa		氨基酸数 aa	百分率 Percentage (%)
$\alpha$ 螺旋 $\alpha$ -Helix	19.6	76	18.9	74	76	19.3	150
$\beta$ 折叠 $\beta$ -sheet	37.5	145	19.1	75	139	27.5	214
转角 Turn	17.8	69	23.5	92	78	21.8	170
随机卷曲 Random coil	25.1	97	38.5	151	94	31.4	245

单体蛋白 CD 计算值=融合蛋白 CD 测定值-标签蛋白 CD 测定值

The calculated amino acids number of the secondary structure elements of the protein SLA-I equal to the corresponding values of the protein MBP-SLA-I minus the corresponding values of the protein MBP

### 3 讨论

本试验采用的长白-达兰商品猪是中国地方杂交品种,广泛分布于中国的北方地区。以此动物为研究模型,构建针对中国北方地区主要杂交品系猪的蛋白复合体,进行结构和功能的研究。

SOE PCR 可以把两个相关的基因通过一个富含甘氨酸/丝氨酸的 Linker(G4S)<sub>3</sub> 连接在一起,从而可以非常方便地研究两个相关基因之间的作用和功能。该 Linker 中,甘氨酸是最简单的氨基酸,由于甘氨酸缺少侧链(只有一个 H),因此  $\beta$  转角中能很好调整其它残基的空间,不易产生碰撞,可用于调节  $\beta$  片层的扭曲和曲度,基本上不影响  $\beta$  折叠的结构;丝氨酸则常出现在转角或无序结构。二者组成的接头仅有 3.5 nm 的跨度,不会在折叠过程中形成二级结构,从而不会影响表达蛋白的正确折叠及蛋白功能的发挥<sup>[5]</sup>。本试验通过 Linker(G4S)<sub>3</sub> 将  $\beta_2m$  成熟肽和 SLA-2 胞外区片段连接,然后采用 SOE PCR 扩增得到全长,这样通过人工的方法将 SLA-I 重链和  $\beta_2m$  轻链连接形成一个复合体基因,中间的 Linker(G4S)<sub>3</sub>,便于 SLA-I 和  $\beta_2m$  蛋白之间形成正确的折叠,从而不影响其天然蛋白的结构。

pMAL-p2X 系统含有 Ptac 强启动子,表达编码 MBP 的 *malE* 基因。外源基因插入到 *malE* 的下游,和 MBP 以融合蛋白的形式表达。在 MBP 前的信号肽介导融合蛋白到细胞周质中表达,这样便于形成二硫键和蛋白的正确折叠,特别适用于分泌性蛋白如 MHC 的表达,而且融合蛋白以可溶性的形式存在,与其它带有 His<sub>6</sub> 或 GST 标签的表达系相比,pMAL 系统更易于实现外源蛋白的可溶性表达<sup>[15]</sup>。融合蛋白可经过具有 MBP 亲和性的淀粉树脂柱纯化,操作方便。在 *malE* 和多克隆位点之间,有一个被蛋白酶 Factor Xa 因子识别的氨基酸序列 (Ile-Glu-Gly-Arg),可以把 MBP 和单体蛋白切割分离。本试验中,融合蛋白 MBP-SLA-I 以可溶性形式表达,大小为 84.1 kD,与理论值相符,Western-blot 显示杂交带大小与表达带大小一致。融合蛋白经过纯化,Factor Xa 因子切割,再分离纯化,得到了单体蛋白 SLA-I,SDS-PAGE 证明,该单体蛋白仍然具有良好的可溶性,便于进行今后的构象和功能分析。

圆二色谱 (circular dichroism spectrum) 是一种利用不对称性分子在圆偏振光下具有不同的吸收、产生椭圆偏振光的光学效应来分析溶液中蛋白二级结构的

技术。通过定量蛋白质中不同二级结构的摩尔椭圆度来计算  $\alpha$  螺旋、 $\beta$  折叠、转角和随机卷曲的含量。此前,笔者克隆和表达了巴马小型猪的 SLA-2 和  $\beta_2m$  基因,并构建了 SLA-I 分子复合体,二级结构测定,巴马小型猪 SLA-I 分子二级结构成分的数据分别为: $\alpha$  螺旋 78、 $\beta$  折叠 149、转角 67 和随机卷曲 95,与本试验所构建的长白-达兰猪的 SLA-I 复合体相应的数据的一致率分别为 97.4%、97.3%、97.1%和 97.9%。比较长白-达兰猪 SLA-2 (AB205147) 和巴马小型猪的 SLA-2 (AB231907) 的核苷酸和氨基酸的同源性分别为 94.9%和 91.2%。由数据可知,在等位基因 SLA-2 内,其核苷酸的同源性要大于氨基酸的同源性,而二级结构的同源性要大于核苷酸的同源性。据此推测,在不同品系猪内,SLA-I 分子具有高度保守的二级结构。

本试验通过 CD 测定融合蛋白 MBP-SLA-I、单体蛋白 SLA-I 以及 MBP 的二级结构,单体蛋白 SLA-I 的测定值与融合蛋白 MBP-SLA-I 去除 MBP 后的计算值, $\alpha$  螺旋、 $\beta$  折叠、 $\beta$  转角和随机卷曲均显示高度的符合率,分别达到了 100% (76/76), 90.6% (135/145), 88.5% (69/78), 96.9% (94/97), 各蛋白 CD 图谱也显示存在典型的  $\alpha$  螺旋结构,说明各蛋白构象良好,可以用以进一步的多肽结合以及晶体结构分析等功能研究。

### 4 结论

4.1 不同品系猪的 SLA-I 复合体蛋白的二级结构高度保守,说明其相关数据可以互相参考;

4.2 经 pMAL-p2X 系统表达的 SLA-I 复合体具有正确的二级结构,蛋白构象良好,可以用于进一步的功能研究。

### References

- [1] Collins R W. Human MHC class I chain related (MIC) genes: their biological function and relevance to disease and transplantation. *European Journal of Immunogenet*, 2004, 31(3): 105-114.
- [2] Hauptmann G, Bahram S. Genetics of the central MHC. *Current Opinion Immunology*, 2004, 16(5): 668-672.
- [3] Gleimer M, Parham P. Stress management: MHC class I and class I-like molecules as reporters of cellular stress. *Immunity*, 2003, 19(4): 469-477.
- [4] Schutze-Redelmeier M P, Gournier H, Garcia-Pons F, Moussa M, Joliot A H, Volovitch M, Prochiantz A, Lemonnier F A. Introduction

- of exogenous antigens into the MHC class I processing and presentation pathway by *Drosophila antennapedia* homeodomain primes cytotoxic T cells *in vivo*. *Journal of Immunology*, 1996, 157(2): 650-655.
- [5] White J, Crawford F, Fremont D, Marrack P, Kappler J. Soluble class I MHC with beta2-microglobulin covalently linked peptides: specific binding to a T cell hybridoma. *Journal of Immunology*, 1999, 162(5): 2671-2676.
- [6] Denker G, Cohen C J, Segal D, Kirkin A F, Reiter Y. Recombinant human single-chain MHC-peptide complexes made from *E. coli* by *in vitro* refolding: functional single-chain MHC-peptide complexes and tetramers with tumor associated antigens. *European Journal of Immunogenet*, 2000, 30(12): 3522-3532.
- [7] Chardon P, Renard C, Vaiman M. The major histocompatibility complex in swine. *Immunology Review*, 1999, 167: 179-192.
- [8] Oleksiewicz M B, Kristensen B, Ladekjaer-Mikkelsen A S, Nielsen J. Development of a rapid *in vitro* protein refolding assay which discriminates between peptide-bound and peptide-free forms of recombinant porcine major histocompatibility class I complex (SLA-I). *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 2002, 86(1/2): 55-77.
- [9] Gao F S, Fang Q M, Li Y G, Li X S, Hao H F, Xia C. Reconstruction of a swine SLA-I protein complex and determination of binding nonameric peptides derived from the foot-and-mouth disease virus. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 2006, 113(3/4): 328-338.
- [10] Al-Attayah R, Shaban F A, Wiker H G, Oftung F, Mustafa AS. Synthetic peptides identify promiscuous human Th1 cell epitopes of the secreted mycobacterial antigen MPB70. *Infect Immunology*, 2003, 71(4): 1953-1960.
- [11] Yan R Q, Li X S, Yang T Y, Xia C. Characterization of BF2 and beta(2)m in three Chinese chicken lines. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 2005, 108(3/4): 417-425.
- [12] Yang D F, Zhu H F, Wang Z H, Shen G X, Tian D Y. Construction of single chain Fv antibody against transferrin receptor and its protein fusion with alkaline phosphatase. *World Journal of Gastroenterology*, 2005, 11(21): 3300-3303.
- [13] NEB. pMAL™ Protein Fusion and Purification System Instruction Manual, Version 5. 01, 1-33. 1991-2001.
- [14] Li X S, Fang Q M, Yan R Q, Gao F S, Hao H F, Jia Z H, Lin C Y, Xia C. Extensive analysis of different allelic structures of the chicken BF2 and beta2m proteins. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 2006, 113(1/2): 215-223.
- [15] Kapust R B, Waugh D S. *Escherichia coli* maltose-binding protein is uncommonly effective at promoting the solubility of polypeptides to which it is fused. *Protein Science*, 1999, 8(8): 1668-1674.

(责任编辑 林鉴非)