

植排斥中的作用,综述了目前针对 Gal 表位遗传修饰在异种移植中的研究进展,并分析了这一策略存在的问题及其可能的解决途径。

参 考 文 献

- [1] Tearle RG. , et al. , 1996, *Transplantation* , **61**: 13 - 19.
 [2] Joziassse DH. , et al. , 1999, *Biochem. Biophys. Acta* , **1455**: 403 - 418.
 [3] Platt JL. , et al. , 1999, *Transplant. Proc.* , **31**: 1488 - 1490.
 [4] Pearse MJ. , et al. , 1998, *Transplantation* , **66**: 748 - 754.
 [5] VanDern BJ. , et al. , 1997, *Transplantation* , **64**: 882 - 888.
 [6] Galili U. , et al. , 1984, *J. Exp. Med.* , **160**: 1519 - 1531.
 [7] Galili U. , et al. , 1999, *Transplant. Proc.* , **31**: 940 - 941.
 [8] Vaughan HA. , et al. , 1994, *Transplantation* ; **58**: 879 - 882.
 [9] Bracy JL. , et al. , 1998, *Science* , **281**: 1845 - 1847.
 [10] Cowan PJ. , et al. , 1998, *Transplantation* , **65**: 1599 - 1604.
 [11] Rosengard AM. , et al. , 1995, *Transplantation* , **59**: 1325 - 1333.
 [12] Vanhove B. , et al. , 1997, *Biochem. Biophys. Acta* , **1356**: 1 - 11.
 [13] Sharma A. , et al. , 1996, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* , **93**: 7190 - 7195.
 [14] Osman N. , et al. , 1997, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* , **94**: 14677 - 14682.
 [15] Ma YH. , et al. , 2001, *Acta Pharmacol. Sin.* , **22**: 231 - 238.
 [16] Sepp A. , et al. , 1997, *J. Biol. Chem.* **272**: 23104 - 23110.
 [17] Galili U. , et al. , 1997, *Xenotransplantation* , **4**: 127 - 131.
 [18] Rother RP. , et al. , 1996, *Cell* , **86**: 185 - 188.
 [19] Patience C. , et al. , 1997, *Nat. Med.* , **3**: 282 - 286.

T 细胞表位的确定

周 洪

(上海第二医科大学 上海市免疫研究所 上海 200025)

表位(epitope)又称抗原决定簇,是指免疫应答中被特异的效应分子或 T、B 淋巴细胞识别的抗原分子上的特定结构位点。根据识别主体的不同,表位可以分为 B 细胞表位和 T 细胞表位两种。B 细胞表位指免疫球蛋白识别的特定部位;由于抗体所结合的常常是一段具有空间构象的蛋白质结构,B 细胞表位具有一定的空间结构依赖,因此常被称为构象表位(conformation epitope)。T 细胞表位则是指在特异性免疫应答中,抗原经抗原递呈细胞处理后,由 MHC 分子向 T 细胞表面抗原受体(TCR)递呈的线性肽段。T 淋巴细胞识别抗原递呈细胞递呈的抗原肽分子后,在特异性免疫应答的启动和调节中发挥重要的作用。在传染性疾病、自身免疫性疾病、过敏性疾病和肿瘤的免疫治疗中,准确定位抗原肽序列中的 T 细胞表位,将其进行修饰后用于调节人体免疫应答,能够对疾病进行有效的特异性治疗。因此,了解 T 淋巴细胞在免疫应答过程中对抗原特定表位的识别就显得非常必要,本文将就此做一综述。

一、CD4⁺T 细胞表位和 CD8⁺T 细胞表位

T 细胞对抗原的识别主要由 TCR 和 MHC-肽

之间的相互作用来完成^[1], TCR 所识别的是抗原递呈细胞表面的 MHC 分子及其递呈的线状短肽组成的复合物。其中 MHC 分子可以为 MHC I 类或 MHC II 类分子,虽然它们在结构上有诸多类似之处,但在免疫识别过程中所起的作用却是不同的^[2]: MHC I 类分子主要提呈衍生于抗原提呈细胞内部的抗原肽,这些 I 类分子和抗原肽的复合物主要提呈给细胞毒性 T 细胞,在细胞表面的 CD8⁺分子的协同之下被识别;而 MHC II 类分子主要递呈从胞外环境中摄取的抗原,在 CD4⁺分子的协同之下被 Th 识别。因而 Tc 作为杀伤细胞主要识别 I 类分子和抗原肽的复合物,而 Th 则识别 II 类分子和抗原肽的复合物,主要辅助体液免疫应答、Th1 介导的细胞免疫应答和其他效应细胞的作用的发挥。

CD4⁺T 细胞和 CD8⁺T 细胞在功能上存在着差异,它们所识别的表位在结构特性上也有所不同^[2]。MHC I 类分子向 CD8⁺细胞所递呈的抗原肽存在于 $\alpha 1$ 和 $\alpha 2$ 结构域所形成的沟槽里面,通常为 8-10 肽,最常见为 9 肽(与 MHC 分子结合最为稳定)其抗原结合槽的两端呈封闭状态,N 端和 C 端分别与抗原肽的锚着位点相结合;而 MHC II 类分子抗原结合槽的两端呈开放形式,与 MHC II 类

分子相结合的肽段的长度变化也较大,为14-20氨基酸,其锚着残基的位置也不如MHC I类分子稳定。对抗原肽结合槽内的小肽分子进行酸洗脱,纯化后经Edman降解测序,发现对于某一特定的MHC类型,各种被洗脱下来的小肽某些位置上的氨基酸残基具有相类似的特性,通常认为这些氨基酸序列是与抗原肽结合槽相结合的锚着残基。而这些锚着残基的存在对于抗原肽与相应的MHC分子的结合是极为必要的,也使得对已知序列蛋白上的表位进行预测成为可能。Kirsten^[3]等在工作中发现:H-2K^d分子所结合的小肽分子的第二位氨基酸一般为酪氨酸,而第九位一般为亮氨酸或者异亮氨酸。而MHC II类分子所递呈的肽段中锚着位点并不像I类分子那么明晰,但也具有一些共性。其中N端第一位置一般为芳香族氨基酸,而第四位一般为疏水氨基酸,至于第六位的氨基酸DRB*0401选择富含羟基的苏氨酸和丝氨酸,而DRB*1101则倾向于带正电荷的精氨酸和赖氨酸^[4]。

近来,人们发现一些非锚基位点的氨基酸的替代能阻断T细胞对特定抗原的增殖反应,这主要是由于突变体与TCR的结合对T细胞的活化和细胞因子的释放不能提供足够强的、有效的信号支持。这些突变体的应用在自身免疫性疾病以及移植排斥的免疫干预和治疗中有着美好的前景^[5,6]。

二、T细胞表位定位研究的方法

T细胞表位定位(T epitope mapping)是确定抗原分子被T细胞特异识别的短肽序列。该序列使T细胞增殖进而发挥免疫调节或效应作用。由于MHC I类抗原表位和MHC II类抗原表位在各方面性质的诸多不同,对这两种表位进行定位所采取的策略也应该是不同的。

(一) CD4⁺T细胞表位的确定

CD4表位是指在抗原递呈细胞(APC)与CD4⁺T细胞相互作用的过程中,由APC表达的MHC II类分子递呈给CD4⁺T细胞TCR识别的小肽序列,在此过程中由于APC摄取的抗原来源于细胞外,所以传统的CD4⁺T细胞表位一般是针对可溶性抗原而言。

1. 表位的初步定位 对已知序列蛋白的表位分析最终必须通过对肽段的筛选来完成,在抗原分子量较大的情况之下,可先将片段化的抗原肽用于筛选,对抗原表位进行初步的定位。抗原片段化的方法一般有酶解、溴化氰降解以及重组克隆表达

等方法,其中酶解方法以及以特定的化学物质(如溴化氰)获取蛋白质分子的降解片段也常常用于对抗体识别的抗原表位的定位,而在T细胞表位的筛选中较少被使用。利用重组的方式人工表达多肽常常用于对T细胞表位的初步筛选,在表达后目的抗原肽的纯化是进一步表位筛选工作成功的关键,一些融合表达系统常用于抗原片段的表达,抗原蛋白的融合表达可以提高目的抗原肽的稳定性,也给抗原肽的进一步纯化提供了便利。

2. 表位筛选中候选肽段的合成 在目的抗原序列已知的条件下,对重组肽段或水解肽初步筛选后,表位的精确定位要通过合成肽段的筛选来进行,已见报道的肽库合成方法主要有Multipin, SPOT, T-bag, Filter, ABACUS和VLSIPS等多种。其中常见的化学合成肽库主要有Multipin^[7]和SPOT^[8]两种。Multipin法是一种能够同时合成多个肽段的方法,在针(pin)上合成用于作筛选的多个肽段,而后在中性的环境中将其水解下来,此法可以同时获得多种纯度较高的肽段,代价也较为低廉,适用于一些需要同时合成大量肽段的工作(例如T细胞表位和激素拮抗剂的筛选)。而SPOT法主要是将蛋白质固相合成于硝酸纤维素膜上,主要见于抗体表位的筛选工作,以磷酸盐缓冲液将其从硝酸纤维素膜上洗脱以后,也可用于T表位的筛选。

3. 表位筛选中效应细胞的选择 在表位研究工作中,无论是重组表达的肽段还是人工合成的肽库都需要使用效应细胞来进行筛选,以从功能上确定表位的存在,因此效应细胞的选择也是表位定位过程中的关键因素。表位筛选中常用的效应细胞有两类:外周血单个核细胞(PBMC)和抗原特异性较强的T细胞系。外周血单个核细胞中包括大量的辅助T细胞和杀伤性T细胞,可以作为筛选细胞;同时也含有表达MHC II类抗原的单核细胞或树突状细胞,可以作为良好的抗原递呈细胞来源,可作为一般性的筛选效应细胞^[9]。但是其用于T细胞表位确定也存在一些缺陷:在PBMC之中,针对某一个表位的辅助性T细胞只占整个Th细胞亚群的极小一部分,而PBMC是一个自身增殖的细胞群体,其中的非特异增殖较常见,使得PBMC对于特定表位的增殖常常处于大量非特异增殖的背景下;对于低频率抗原而言,在未致敏的个体中,整个PBMC群体中特异性增殖所占的比例是很低的,这就给Th细胞针对某单一表位的增殖提供了较高的信噪比,使得结果不能有效地显示。此时通过增

加试验复孔以及对统计方法进行一些优化,能够较明晰地反映结果。

用建立的抗原特异的短期细胞系(short term cell line)和克隆化 T 细胞对合成的抗原肽进行筛选在抗原表位定位工作中的应用日趋普遍,其原理是通过在体外以抗原对已致敏或未致敏个体的 PBMC 中的 T 淋巴细胞进行反复刺激,使得对目的抗原特异的 T 细胞得以扩增,再通过有限稀释将特异的 T 细胞进一步克隆化,获得单一背景中纯度较高的 T 细胞系,用于对抗原肽的筛选^[10]。

例如 Kawamoto^[11]等对尘螨变应原 Mag3 上的 T 细胞表位进行了分析定位,首先,在确定 Mag3 抗原存在 T 细胞表位的前提下,他们构建了去除 C 端部分序列的两个 Mag3 突变体(对应序列 1-190、1-113);进一步的工作证实两个去除 C 端的突变体依然保留同等程度的刺激 T 细胞增殖的能力,因而将 T 细胞表位初步定位在 N 端第 1-113 氨基酸序列中。为了精确定位 Mag3 的 T 细胞表位,他们合成了覆盖 Mag3 序列 1-113 的 21 条序列部分重叠的肽段,并用建立的抗原特异的短期 T 细胞系进行筛选,结果发现 p56-70 和 p61-75 对 T 细胞具有很强的刺激增殖作用,从而将变应原 Mag3 的 T 细胞表位定位在 56-75 氨基酸位置。

一般说来,表位定位的基本技术路线见图 1。

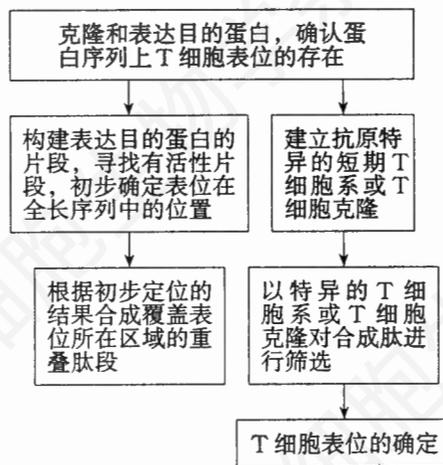


图 1 表位定位的技术路线

(二) CD8⁺ T 细胞表位

CD8⁺ CTL 细胞能杀伤表达特异抗原分子的靶细胞,在抗病毒感染、移植受体对移植物的急性排斥反应和抗肿瘤的免疫治疗中发挥重要作用。正常状态下 CTL 以前体形式存在,识别靶细胞上 MCH I 类分子所递呈的抗原肽后,在 APC 提供的辅助信号和 Th 分泌的细胞因子的协同下活化,并

分化成为成熟的 CTL,发挥对靶细胞的杀伤作用。而 CD8 表位(CTL 表位)是指 CD8⁺ T 细胞与 APC 相互作用时,T 细胞识别的 MHC I 类分子所递呈的小肽序列。由于 CD8⁺ 细胞识别的是由抗原递呈细胞递呈的胞内抗原肽,如某些病毒表达的内源性蛋白,表位筛选的工作则变得比较繁复,胞外来源的可溶性蛋白不能直接用于表位的筛选。抗原肽的表达要借助基因转染^[12,13]或其他的途径^[14](如改变渗透压)导入抗原递呈细胞后,经由胞内途径的抗原递呈过程后,才能用 CD8⁺ 细胞进行进一步的筛选。

常用的 CTL 表位的筛选方法有以下两种:

1. 将已知的抗原与大量 MHC I 类分子表达的细胞共育,之后将细胞破碎,以亲和层析的方法获得结合有抗原肽的 MHC 分子,在反向 HPLC 纯化后,再在弱酸环境下将抗原肽分子从 MCH 分子中洗脱下来,通过对每一组份进行测序分析而获得 MHC 分子抗原结合槽中结合的抗原肽分子的结构信息^[15]。

2. 另外一种较为简便的方法是建立在已知抗原肽分子序列和 MHC 分子的前提下,通过对抗原序列与已知 MHC 分子结合基序的比较,预测蛋白质分子全长序列上可能存在的 T 细胞表位,在通过化学方法合成短肽,对这些可能存在的表位序列进行细胞功能和 MHC 分子结合能力的测试,这是一种较为简便易行的方法,但前提是抗原序列和 MHC 分子的结合基序必须已知。^[16]

三、表位预测

在工作中,对抗原表位的筛选常常包含着较大的工作量,而对已知序列的蛋白的表位预测常常可以缩小筛选的范围,从而有助于减轻工作负荷。早期对表位的认识并不很清楚,基本建立在对蛋白质结构研究的基础之上,人们只是单独地从寻求蛋白质分子的一级结构和二级结构的共性出发^[17],而很少考虑到 MHC 遗传背景;所以预测的准确率一般较低。现在对已知序列抗原表位的预测常常是建立于 MHC 的肽结合基序列研究的基础上,根据已知 MHC 遗传背景结合基序的共性设计有关算法(algorithm),从而推测序列中可能存在的表位序列。Claudia 等曾经用 TEPITOPE 算法成功地预测了 Lol p5a 序列上的四个 T 细胞表位^[18],并用 T 细胞克隆进行了进一步的验证。

随着人们对表位的进一步认识和新的预测算法的不断出现,表位预测开始变得简单易行。对于表

位分析的网站在线服务和简单的分析软件都已经见到,而准确性也不断得到提高,但无论如何,在对表位进行预测后,人工合成肽用于对预测结果的功能性证实才是验证表位可靠性的唯一标准。

摘要

确定抗原分子被 T 细胞所识别抗原分子上的短肽序列,对 T 细胞表位进行定位对于特异性免疫应答的调节有重要意义。由于 CD4⁺ T 细胞表位和 CD8⁺ T 细胞表位在各方面性质的诸多不同,对这两种表位进行定位所采取的策略也应该是不同的。运用所选择的效应细胞对合成肽库的筛选是对 CD4⁺ T 细胞表位进行定位的有效策略,而对于 CD8⁺ T 细胞表位定位,需要通过一些特殊的手法将抗原肽导入细胞后进一步运用效应细胞进行筛选。

参考文献

[1] Barber LD, et al., 1993, *Annu Rev Cell Biol* 9:163-227.

- [2] Engelhard VH, 1994, *Annu Rev Immunol* 12:181-207.
 [3] Kirsten F, et al., 1991, *Nature* 353:290-296.
 [4] Juergen H, et al., 1993, *Cell* 74:197-203.
 [5] De Magistris MT, et al., 1992, *Cell* 68:625-634.
 [6] Anat FE, et al., 2001, *FASEB J* 15:187-194.
 [7] Maej NJ, et al., 1990, *J Immunol Methods* 134:23-31.
 [8] Adler S, et al., 1994, *FEBS Lett* 352:167-170.
 [9] Reece JR, et al., 1994, *J Immunol Methods* 172:241-254.
 [10] Taylor PM, et al., 1987, *In vitro culture of T cell lines and clones*. In Klaus GGB, ed *Lymphocytes* IRL press Oxford pp 133-147.
 [11] Seiji K, et al., 2000, *Immunol Lett* 72:53-60.
 [12] Moore MW, et al., 1988, *Cell* 54:777-785.
 [13] Rebecca LW et al., *J Immunol Method* 234:137-147.
 [14] Darji A et al., 1995, *Eur J Immunol* 25:2967-2971.
 [15] Alexander YR, et al., 1991, *Nature* 353:622-627.
 [16] Mattheakis JC, et al., 1994, *Proc Natl Acad Sci USA* 91:9022-9026.
 [17] Hanah M, et al., 1987, *J Immunol* 138:2213-2229.
 [18] Claudia DL, et al., 1999, *J Immunol* 163:1725-1729.

B 染色体分子生物学研究进展

祁仲夏 宋文芹 李秀兰 陈瑞阳

(南开大学生命科学学院 天津 300071)

B 染色体是独立存在于物种染色体组之外的一种特殊染色体,又被称为超数染色体(supernumerary chromosome)、附加染色体(accessory chromosome)或额外染色体(extra chromosome)^[1]。迄今已在 1000 多种植物和 300 多种动物中发现了 B 染色体。一般认为 B 染色体具有以下特征^[2]:1. 与常染色体(A 染色体)形态不同,在绝大多数含 B 染色体的物种中,B 染色体小于 A 染色体,其组成绝大部分为异染色质;2. B 染色体遗传不遵循孟德尔遗传法则,B 染色体在减数分裂时不分离,具有一定的积累和消减机制,例如在被检测的 1306 个玉米花粉粒中,B 染色体着丝粒不分离的频率约为 56.6%,不分离主要发生在减数第二次分裂,在减数第一次分裂中也偶有发生^[4];3. B 染色体有时在有丝分裂后期不分离,在含 B 染色体的物种个体中,不同的体细胞所含有的 B 染色体数目会有差异;4. B 染色体遗传活力是惰性的,其上不携带与主要性状相关的基因;5. B 染色体的存在对物种的影响通常表现为中性,在个别物种中会在适应性及生长等方面产生影响,这种影响会随物种个体携带 B 染色体数目的增加而

上升,例如在玉米中含 B 染色体的花粉会优先与卵细胞受精^[4];Polwman 对生长在河岸边的细香葱(*Allium schoenoprasum*)进行研究,发现在干旱情况下物种个体所含 B 染色体的频率与该物种种子的发芽率呈正相关,能增强种子萌发时抗干旱的能力^[5]。

众所周知,DNA 分子自身结构特点及其表达产物对染色体及其行为会产生决定性的影响,B 染色体也不例外,现代分子生物学的发展使了解 B 染色体的 DNA 结构特征成为可能。目前应用于 B 染色体研究的分子生物学技术手段主要包括:Southern 杂交、荧光原位杂交、减法杂交和染色体显微分离扩增技术。由于实验材料的限制,有关 B 染色体分子生物学的研究主要以禾本科的黑麦(*Secale cereale*)、玉米(*Zea mays*),菊科短毛菊属的(*Brachycome dichromosomatica*),两栖类的蛙类(*Leopelma hochstetter*),昆虫中的果蝇(*Drosophila subsilvestris*)及寄生黄蜂(*Nasonia vitripennis*)的研究最为深入。综合近年有关 B 染色体分子生物学研究报道可以发现,B 染色体 DNA 在组成上既与 A 染