

DOI: 10.13376/j.cblls/2014157

文章编号: 1004-0374(2014)10-1096-06

· 技术与应用 ·

## MHC II类四聚体技术研究进展

李子彬<sup>1</sup>, 董宋鹏<sup>2</sup>, 杨杰<sup>2</sup>, 高凤山<sup>2\*</sup>, 胡薇<sup>1\*</sup>

(1 吉林农业大学生命科学学院, 长春 130118; 2 大连大学生命科学与技术学院, 大连 116622)

**摘要:** 主要组织相容性复合体 (major histocompatibility complex, MHC) 在免疫应答的启动和免疫调控中发挥重要作用。MHC II类四聚体技术是检测 CD4<sup>+</sup>T 细胞的直接有效的特异方法, 目前已成为研究 T 细胞免疫应答的重要技术之一。就 MHC II类四聚体技术的基本原理及制备, 以及在病毒、免疫监控、自身免疫性疾病、肿瘤治疗等研究领域的应用作综述。

**关键词:** 主要组织相容性复合体; II类分子; 免疫; 四聚体

**中图分类号:** Q352; R372 **文献标志码:** A

### Progress on the MHC II tetramer technology

LI Zi-Bin<sup>1</sup>, DONG Song-Peng<sup>2</sup>, YANG Jie<sup>2</sup>, GAO Feng-Shan<sup>2\*</sup>, HU Wei<sup>1\*</sup>

(1 School of Life Sciences, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China;

2 College of Life Science and Technology, Dalian University, Dalian 116622, China)

**Abstract:** MHC genes play important roles in activation and regulation of immune response. MHC II tetramer technology has been developed to directly visualize antigen-specific CD4<sup>+</sup>T cells efficiently *ex vivo*, therefore, it becomes one of the main ways to study T-cell immune responses. The purpose of this review is to describe the principles of MHC-peptide tetramer technology and its construction, then to focus on the use of tetramer technology to study virus infection, anti-tumor actions and autoimmune disease.

**Key words:** major histocompatibility complex; class II; immunue; tetramer

CD4<sup>+</sup>T细胞通过与主要组织相容性复合体 (major histocompatibility complex, MHC) II类分子递呈的多肽抗原反应被激活。一旦激活, 即可分泌细胞因子, 调节或者协助细胞免疫及体液免疫反应, 在免疫应答过程中起着关键性的作用; 但抗原特异性的CD4<sup>+</sup>T细胞在外周血中含量极少, 传统的研究手段, 如酶联免疫斑点法 (ELISPOT) 和有限稀释法 (LDA), 对其灵敏度较低。1996年, Altman等<sup>[1]</sup>建立了MHC-肽四聚体技术, 即 Tetramer 技术, 为解决特异性 T 细胞的定量检测提供了新的手段, 近年来得到了广泛的应用。

### 1 MHC II类四聚体技术

#### 1.1 分子结构基础及基本原理

免疫识别是机体免疫系统产生特异性免疫的基础, 通过对外来抗原的特异性识别, 机体产生相应

的免疫应答, 最终由效应细胞或具有一定生物活性的效应分子清除病原类物质。MHC分子参与抗原的加工、处理和提呈, 形成MHC-肽复合物 (pMHC), 是细胞免疫应答的基础。Tetramer技术就是基于 T 细胞上的表位特异性受体 (T cell antigen receptor, TCR), 通过识别抗原提呈细胞 (antigen presenting cell, APC)/靶细胞表面 pMHC 分子, 形成“TCR-pMHC”三元体或称三分子复合结构, 从而激活 T 细胞。

20世纪60年代, *Ir* 基因被发现; 70年代, 人们发现细胞毒性 T 淋巴细胞 (cytotoxic T lymphocyte, CTL) 与靶细胞间相互作用的 MHC 限制性; 80年代,

收稿日期: 2014-03-27; 修回日期: 2014-06-14

基金项目: 国家自然科学基金项目(31172304)

\*通信作者: E-mail: huwei9002@126.com (胡薇);

E-mail: gfsh0626@126.com (高凤山); Tel: 0411-87402337

研究者阐明了 MHC 分子结构。迄今, 通过高分辨率的晶体结构解析, 人们已经对 MHC 分子与肽复合物、TCR 片段, 以及“TCR-pMHC”三元体的空间结构规律有了清楚的认识。研究表明, MHC II 类分子是由  $\alpha$  链和  $\beta$  链组成的异源二聚体, 两条多肽链的基本结构相似, N 端在胞外, C 端在胞内, 胞外部分占整条链的 2/3。 $\alpha$  链和  $\beta$  链胞外部位均可再分为 2 个各含 90 个氨基酸残基的结构域, 称为  $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 、 $\beta 1$ 、 $\beta 2$ , 分别由 MHC-II 类基因外显子 2 和 3 编码, 其中  $\alpha 1$  和  $\beta 1$  构成肽结合槽, 并且 II 类分子多态性残基主要集中于  $\alpha 1$  和  $\beta 1$ 。如同 I 类分子, MHC II 类基因的多态性决定其肽结合槽的生化特点, 也决定 MHC II 类分子与抗原肽结合以及被 T 细胞识别的选择性和亲和性。 $\alpha 2$  和  $\beta 2$  属 Ig 基因超家族, 在抗原提呈过程中, 辅助性 T 细胞(helper T cell, Th) 表面 CD4 分子与 MHC II 类分子结合的部位即位于该免疫球蛋白(immunoglobulin, Ig) 样非多态区域的  $\beta 2$  结构域。而跨膜区含 25 个氨基酸残基, 所形成的二肽链盘绕成螺旋样, 借助一个很短的疏水区与胞外部分相连, 并将整条多肽链固定于胞膜。II 类分子的 C 端游离于胞质中, 含 10~15 个氨基酸残基, 而胞内区主要参与跨膜信号传递。

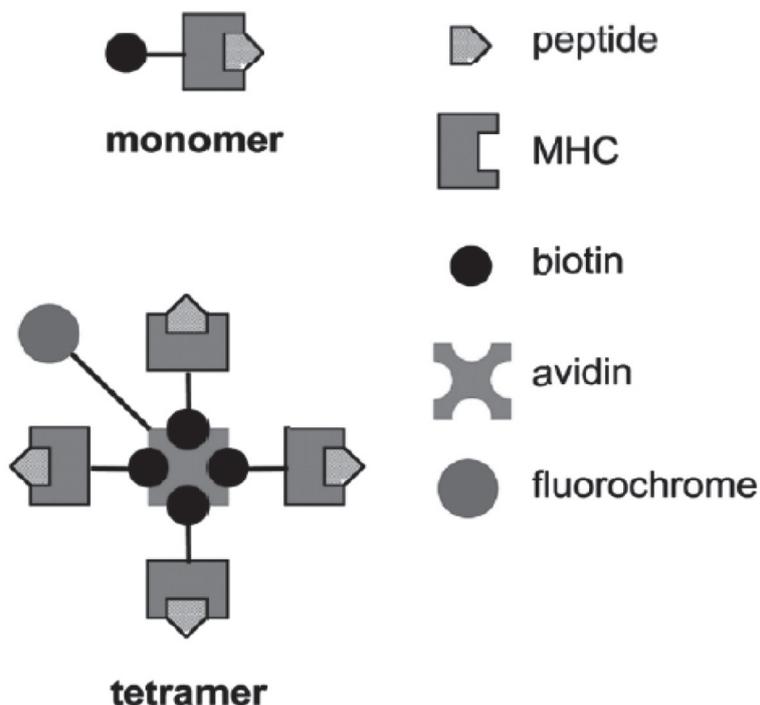
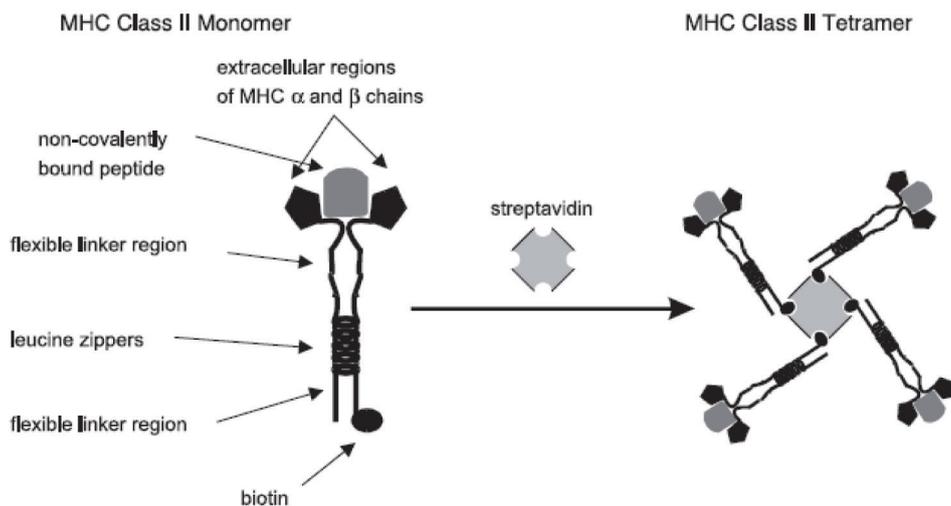
目前研究表明, 在抗原肽结合槽的两端常存在一些保守的氨基酸残基, 可与抗原肽的 N 端和 C 端形成稳定的氢键网络(hydrogen bonds net, HDN), 并且与 MHC 结合为复合物的抗原肽往往携带 2 个或 2 个以上专与 MHC 分子肽结合槽相结合的氨基酸残基, 称为锚定位点, 这些相应的氨基酸又称为锚定残基<sup>[2]</sup>。MHC 分子的肽结合槽中容纳锚定残基的位置形成口袋, 又称锚定位。不同 MHC 分子其氨基酸结构的差异主要体现在口袋大小、形状和电荷各异, 并因此决定特定 MHC 分子所能结合的抗原肽。抗原肽与 MHC 分子的结合具有相对选择性。与特定 MHC 分子结合的抗原肽, 其锚定残基的组成称为序列基序。与 MHC I 类分子相比, II 类分子的肽结合槽两端较开放, 可容纳含 13~25 个氨基酸残基(或更长)的肽段, 但结合后通常被酶解为含 13~17 个氨基酸残基的肽段。由于 II 类分子肽结合槽具有较大兼容性, 因此分析其所结合的抗原肽锚定残基较为困难。T 细胞识别抗原的信号主要依赖 TCR 识别特异性 pMHC 而启动, TCR 和 CD3 均为成熟 T 细胞的特征性表面标志。参与免疫应答的多数 T 细胞表面表达 TCR $\alpha\beta$ , 其中与 CD3 分子呈非共价键结合, 构成完整的 TCR-CD3 复合物,

共同执行对 APC 表面 pMHC 分子复合物的识别和信号传递, 同时, 此过程也需要 T 细胞表面 CD4 或 CD8(共受体)参与。CD4 或 CD8 可分别与 APC(或靶细胞)表面 MHC II 或 MHC I 类分子结合, 从而增强 TCR 与特异性 pMHC 的亲和力, 使 T 细胞对抗原刺激的敏感性明显增强。但已发现, MHC II 类分子与抗原肽结合的特点与 MHC I 类分子基本相似<sup>[3]</sup>。综上, 四聚体技术就是基于这样的分子结构基础而形成的。

## 1.2 MHC II类四聚体的制备及改进

在早期已有许多学者对 MHC I 类分子体外结合多肽展开研究, 但并没有取得较为理想的效果, 原因之一是单个 MHC-肽复合物与 TCR 结合的亲和力很低, 并且解离速度快。而 Altman 等<sup>[1]</sup>在研究中发现 4 分子的 pMHC 与 TCR 结合具有较强的亲和力和生物学效果。根据生物素与亲和素 4:1 的特异性结合关系, 利用生物素-蛋白连接酶(biotin-protein ligase A, BirA) 能识别蛋白质的特异序列<sup>[4]</sup>, 在 MHC 分子的重链 C 端上加入 1 个生物素的 BirA 底物肽序列, BirA 酶可将生物素结合到 pMHC 上, 进而 4 个生物素化的 pMHC 单体与 1 个亲和素标记的链霉素形成四聚体复合物(图 1), 从而提高 pMHC 与 TCR 的总体亲和力, 并可通过灵敏度较高的流式细胞仪(FACS) 对抗原特异性 T 淋巴细胞进行快速的检测和分离。

与 MHC I 类分子相比, MHC II 类分子内部结构具有不稳定性。原核表达  $\alpha$ 、 $\beta$  链后, 再和特异性抗原肽体外折叠, II 类分子往往不能很好地锚合抗原肽, 并且利用原核表达体系从大肠杆菌中获得重组的 MHC II 蛋白, 往往得不到相对较高的产率并且结构也不稳定<sup>[6-7]</sup>。Novak 等<sup>[8]</sup>采用 Schneider22 细胞(S22 细胞) 融合表达 HLA-DRA1 30101/DRB 30401 分子胞外区, 其中  $\beta$  链跨膜区及胞内区位置被末端带有 BirA 酶底物肽(BSP) 的亮氨酸拉链(leucine zipper motif) 替代, 形成 HLA-DR4 融合蛋白, 生物素化后与特异性肽段培育形成 HLA-DR4/肽复合物, 并成功制备出了 HLA2DR4/肽四聚体(图 2<sup>[9]</sup>)。Ayyoub 等<sup>[10]</sup>在抗原肽上加上了一个 His 标签, 采用亲和层析的方式使抗原肽与 MHC II 分子形成稳定的 pMHC 单体, 从而解决了抗原肽与 II 分子不能很好结合的问题。Fourneau 等<sup>[11]</sup>设计了一种昆虫/杆状病毒的表达体系, 使目的蛋白的表达量从原来的 0.1~27 mg/L 上升到 50~70 mg/L, 大大提高了重组蛋白的产率。MHC II 类四聚体制备需要

图1 MHC-肽四聚体的结构<sup>[5]</sup>图2 MHC II-肽四聚体的结构图<sup>[9]</sup>

BirA 酶的催化才能实现, 而且体外生物素化需要相对较多的重组蛋白。另外, 由于 MHC II 类分子结构上的特点, 其生物素化效率较低。Yang 等<sup>[12]</sup> 制备了 HLA-DR2 (一种人类白细胞抗原; human leukocyte antigen, HLA) 的四聚体, 同时构建了 BirA 酶的表达载体, 然后与 HLA-DR2 表达载体共转染至昆虫表达系统, 通过添加外源性生物素, 使目的蛋白在体内生物素化, 解决了上述问题。

## 2 MHC II类四聚体技术的应用

### 2.1 在传染性病原体研究中的应用

伊波拉病毒 (Epstein-Barr virus, EBV) 又译作埃博拉病毒, 是一种能引起人类和灵长类动物产生埃博拉出血热的烈性传染病病毒, 具有很高的死亡率。与病毒特异性的 CD8<sup>+</sup>T 细胞相比, 病毒特异性 CD4<sup>+</sup>T 细胞在协助和调控病毒感染宿主免疫应答方面起着至关重要的作用, 但对其的研究仍然停留在

单细胞水平<sup>[13]</sup>。Long等<sup>[14]</sup>利用9种不同的EBV抗原肽(EBNA1~9)分别制备成来自于4种不同等位基因的MHC II四聚体,用以检测EBV以及由EBV引起的病毒特异性CD4<sup>+</sup>T细胞。实验结果表明,虽然不能像检测特异性CD8<sup>+</sup>T细胞那样检测到很高的细胞频率,但利用MHC II四聚体技术仍然可以在EBV患者的血液中检测到相对较高频率的5种EBNA的特异性CD4<sup>+</sup>T细胞。该研究为阐明EBV病毒的致病机制以及未来研制疫苗奠定了基础。

结核病是由结核杆菌感染引起的慢性传染病。结核菌可能侵入人体全身各种器官,但主要侵犯肺脏,称为肺结核病。黎意芬等<sup>[15]</sup>和黄利荣等<sup>[16]</sup>采用已有的果蝇恒定细胞株,分别表达、纯化获得2种生物素化多肽/HLA-DR8复合物单体,进而制备成相应四聚体,分别用2种四聚体与抗人CD4与FITC (fluorescein isothiocyanate, 异硫氰酸荧光素)共染色<sup>[17]</sup>,流式细胞分析检测治疗前以及规律抗结核治疗15、30、45、60、90、120、150、180 d肺结核患者外周血四聚体阳性(多肽特异性)CD4<sup>+</sup>T细胞及总CD4<sup>+</sup>T细胞。结果显示多数病例的外周血总CD4<sup>+</sup>T细胞在治疗前略低于正常水平。治疗前以及规律抗结核治疗15、30、45、60 d内,肺结核患者组外周血可检出高水平的四聚体阳性CD4<sup>+</sup>T细胞;肺结核患者外周血四聚体阳性CD4<sup>+</sup>T细胞在治疗前即有较高水平,治疗15~60 d后达到最高,一些患者中间出现波动,随后开始逐渐降至正常水平。综上,多肽/HLA-DR四聚体可以用于监测治疗前后结核患者外周血多肽特异性CD4<sup>+</sup>T细胞的变化,配合总CD4<sup>+</sup>T细胞的检测,对于治疗期结核患者疾病发展和恢复的监测具有指导意义。邓向斌等<sup>[18]</sup>在前期研究中筛选出了3种结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*, MTB)蛋白,其中包括来源于青色荧光蛋白(cyan fluorescent protein, CFP)的C5多肽,并构建了2种抗C5/HLA-DRB1四聚体,利用四聚体技术检测肺结核患者外周血及病变组织C5特异性CD4<sup>+</sup>T细胞。实验证明,四聚体技术可用于结核特异性T细胞的检测,为结核特异性T细胞的进一步研究以及结核病的诊断提供了新的思路。

## 2.2 在自身免疫性疾病研究中的应用

原发性胆汁性肝硬化(primary biliary cirrhosis, PBC)是一种病因不明、以肝小叶间中小胆管进行性非化脓性炎症损伤为特征的慢性胆汁淤积性肝病。血清抗线粒体抗体(anti-mitochondria antibody, AMA)是诊断PBC的特异性指标。PBC的发病机制

与自身免疫有关,但免疫抑制剂的疗效仍未被证实,且药物相关不良反应使其临床应用受到限制<sup>[19-20]</sup>。目前胆管特异性损伤的病理机制尚不清楚,但大量研究提示,T细胞介导的免疫反应是胆管上皮细胞损伤的重要机制。近年来随着科学研究的不断发展,在分子水平上对致病性T细胞表位与其限制性的HLA类分子进行了研究,并已经在其主要的自身抗原-丙酮酸脱氢酶复合物上鉴定出了一些T细胞识别表位。这对于正确认识抗原特异性T淋巴细胞在PBC中的作用和探索新的治疗方法或新药物的研制有着重要的意义。刘海英等<sup>[21]</sup>利用四聚体技术定量检测PBC患者体内CD4<sup>+</sup>T淋巴细胞含量,结果显示肝脏中CD4<sup>+</sup>T细胞的含量是血液循环中的10倍,甚至上百倍。从理论上说,对肝组织病灶区中的抗原特异性T细胞进行定量分析以及原位示踪染色将有助于了解PBC发病机制提供更多、更重要的信息,故有待于进一步深入研究。总之,该研究加深了人们对PBC中抗原特异性T细胞的认知,为研究PBC致病机制奠定了基础。

类风湿关节炎(rheumatoid arthritis, RA)是一种以慢性侵蚀性关节炎为特征的全身性自身免疫病。类风湿关节炎的病变特点为滑膜炎,以及由此造成的关节软骨和骨质破坏,最终导致关节畸形。抗环瓜氨酸肽(cyclic citrullinated peptide, CCP)抗体是环状聚丝蛋白的多肽片段,是以IgG型为主的抗体,对RA具有很好的敏感性和特异性,且抗CCP抗体阳性的RA患者骨破坏较抗CCP抗体阴性者严重。房国祥等<sup>[22]</sup>成功建立了MHC II类四聚体流式细胞术快速检测外周血细胞中低频数的CCP反应性T细胞的方法。该方法可以与抗CCP抗体及ELISPOT技术联合应用,从而进一步提高诊断类风湿性关节炎的敏感性,并为类风湿性关节炎的临床研究提供了一整套的动态评价指标。该技术还避免了以往采用体外培养技术存在的诸多外界条件影响因素,更真实地反映了体内CCP反应性细胞的实际情况。该研究有潜在的应用前景,将促使对类风湿性关节炎等自身免疫性疾病的发病机制、早期诊断和免疫治疗的机制研究等方面的不断深入,进而推动类风湿性关节炎免疫治疗的发展。

调节性T细胞(regulatory T cells, Treg)是一类可以调节其他多种免疫细胞功能的T细胞亚型,其正常生理功能对体内免疫稳态维持必不可少。调节性T细胞功能失调与人类多种重大疾病,如自身免疫性疾病、过敏性疾病、恶性肿瘤、移植排斥等的

发生、发展及治疗都密切相关<sup>[23]</sup>。调节性 T 细胞可分为多种亚型, 其中最重要也是目前研究最多的为表达叉头状家族转录因子 Foxp3 的天然型 Foxp3<sup>+</sup>Treg (natural Treg, nTreg) 和诱导型 Foxp3<sup>+</sup>Treg (induced Treg, iTreg)。两者在调节免疫反应中起着关键性的作用, 尤其是在预防自身免疫疾病和移植排斥方面。众所周知, 在致病性免疫应答如自身免疫致病性免疫应答和炎症反应等方面, 抗原特异性 Treg 比多克隆 Treg 有更好的调节和抑制作用。然而, 由于难以鉴定和分离足够数量的抗原特异性的 Treg, 因而限制了对于 Treg 调控机制以及在免疫性疾病治疗方面的研究, 而 MHC II 四聚体技术很好地解决了这一问题。Chen 和 Liu<sup>[24]</sup> 利用 MHC II 四聚体, 从非肥胖型抗糖尿病 (diabetes-resistant nonobese resistant, NOR) 小鼠中分离得到了大量的具有特异性的自身抗原谷氨酸脱羧酶 P286-300 肽的 CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>T 细胞群 (即 NR286 T 细胞)。这些 Foxp3<sup>+</sup>NR286 T 细胞具有抑制体外 T 细胞增殖的作用, 并且在体外对其机理的研究表明其调节功能不仅依赖 IFN- $\gamma$  和一氧化氮 (NO), 还需要与靶细胞相接触。该研究为阐明 Treg 调节机制以及 1 型糖尿病的治疗提供了新的思路。

### 2.3 在肿瘤治疗研究中的应用

癌 / 睾丸 (cancer testis, CT) 抗原是一类在多种肿瘤组织中表达, 而在睾丸以外的其他正常组织中几乎不表达的抗原。而 NY-ESO-1 (ESO) 是 CT 抗原特异性家族中的典型代表, 是迄今发现的最具免疫原性的肿瘤抗原之一, 并被认为是对于抗肿瘤疫苗的制备具有重要意义的模型抗原, 在抗原特异性肿瘤免疫治疗中具有广泛的应用前景。NY-ESO-1 抗原能与 HLA 分子结合并被 T 细胞受体识别, 而 ESO<sub>119-143</sub> 是能与 HLA-DR1 结合的抗原表位区域, 且重组的 ESO 表位疫苗已被成功制备<sup>[25]</sup>。Ayyoub 等<sup>[26]</sup> 利用 HLA-DRB1<sup>\*</sup>-0101 四聚体技术对肿瘤特异性抗原 ESO<sub>119-143</sub> 免疫显性区域的表位疫苗进行了评价。首先他们将 ESO<sub>119-143</sub> 抗原肽与 DRB1<sup>\*</sup>0101 用传承的方法制备成四聚体, 给患者接种 ESO<sub>119-143</sub> 疫苗后用四聚体去跟踪在该抗原肽刺激下所产生的特异的 ESO<sub>119-143</sub>CD4<sup>+</sup>T 细胞, 并根据细胞的分类和功能特征对显性的 DR1/ESO<sub>119-143</sub> 四聚体细胞进行分离, 对这一诱导 CD4<sup>+</sup>DR1/ESO<sub>119-143</sub> 四聚体显性 T 淋巴细胞的疫苗及其特异性进行评价, 为疫苗监控提供了新的方法上的启示。

肿瘤过继性免疫细胞治疗 (adoptive cell therapy,

ACT) 是指通过输注自身或同种异体肿瘤杀伤细胞来治疗肿瘤的生物治疗方法, 它不仅可纠正细胞免疫功能低下, 促进宿主抗肿瘤免疫功能, 并且可直接发挥抗肿瘤作用。辅助性 T 细胞 (Th) 在免疫反应中扮演中间过程的角色: 它可以增生扩散来激活其他类型的产生直接免疫反应的免疫细胞, 而且可以分泌细胞因子调控肿瘤免疫, 并具有免疫记忆和直接杀伤肿瘤细胞的作用。随着一系列被 Th 细胞识别的肿瘤抗原被鉴定出来, 人们对于 Th 细胞在抗肿瘤免疫反应中的作用有了进一步的认识。如果能在体外产生肿瘤抗原特异性 CD4<sup>+</sup>Th 细胞系, 对肿瘤过继性免疫细胞治疗是非常有意义的, 但一直缺乏合适的分离与检测的工具。Poli 等<sup>[27]</sup> 将 NY-ESO-1 (ESO) 中的免疫显性抗原肽制备成 MHC II-肽四聚体, 利用四聚体技术有效地分离和检测特异性的 CD4<sup>+</sup>Th 细胞, 成功建立了体外生成 ESO-特异性 Th 细胞系的平台。他们首先从 DR52b<sup>+</sup> 健康的捐赠者中分离得到 CD4<sup>+</sup>T 细胞亚群, 在体外用抗原肽、同源 APC、IL-2 (白细胞介素 2, interleukin-2) 对 CD4<sup>+</sup>T 细胞亚群进行培养、刺激和分类, 用负载有该抗原肽的 MHC II-肽四聚体对 ESO-特异性细胞进行检测以及分类收集, 然后用菜豆凝集素 (phaseolus vulgaris agglutinin, PHA)、APC 和 IL-2 等对收集得到的细胞进行体外培养, 最终得到 ESO-特异性的 Th 细胞系。该研究进一步推动了肿瘤过继性免疫细胞治疗的发展, 并具有潜在的应用前景。

### 3 展望

MHC II 类四聚体技术利用其自身的放大作用, 对特异性 T 细胞进行定性、定量分析, 具有灵敏度高、特异性强、无需体外扩增及对细胞无损伤等优点, 但该技术也存在缺陷, 如表达系统效率低、折叠困难、不稳定、易于解聚等, 最主要的问题是抗原表位的选择。由于每次反应只能分析单一的抗原表位, 而 MHC II 类分子结合的各种抗原表位能否与特异性的 T 细胞发生反应, 却随着基因背景及时间的变化而变化, 因此选择正确的抗原表位就显得非常重要。抗原表位的筛选可以通过 ELISPOT 来进行, 但对整个肽库进行搜索并不容易。当然, 生物信息学的方法对抗原表位预测和筛选有很大的帮助<sup>[28]</sup>。同时, 有研究结果表明, 并非所有经过 MHC II 四聚体鉴定的阳性细胞都有确切的功能, 其中很多是不表现功能的惰性细胞。另外, 要注意实验操作中应尽量在低温条件下保存样品等, 这些

问题都会影响检测结果。目前该技术作为一种重要工具广泛地应用于病毒感染、自身免疫性疾病、器官移植排异的机制、疫苗筛选评价及新型治疗方法的研究中, 并已经有商品化的试剂出现, 其应用价值越来越被大家所认可。相信随着对该技术的不断完善, 未来会应用到更多领域的研究中。

### 参 考 文 献

- [1] Altman JD, Moss PA, Goulder PJ, et al. Phenotypic analysis of antigen-specific T lymphocytes. *Science*, 1996, 274(5284): 94-6
- [2] Tollefsen S, Hotta K, Chen X, et al. Structural and functional studies of trans-encoded HLA-DQ2.3 (DQA1\*03:01/DQB1\*02:01) protein molecule. *J Biol Chem*, 2012, 287(17): 13611-9
- [3] Painter CA, Stern LJ. Conformational variation in structures of classical and non-classical MHCII proteins and functional implications. *Immunol Rev*, 2012, 250(1): 144-57
- [4] 李青, 吴雄文, 熊敏, 等. BirA酶基因表达载体的构建、原核表达及表达产物的活性鉴定. *细胞与分子免疫学杂志*, 2005, 21(5): 557-60
- [5] Klenerman P, Cerundolo V, Dumber PR. Tracking T cells with tetramers. *New tales from new tool. Nat Rev Immunol*, 2002, 2(4): 263-72
- [6] Guillaume P, Dojcinovic D, Luescher IF. Soluble MHC-peptide complexes: tools for the monitoring of T cell responses in clinical trials and basic research. *Cancer Immunity*, 2009, 9: 7
- [7] Nepom GT. MHC class II tetramers. *J Immunol*, 2012, 188(6): 2477-82
- [8] Novak EJ, Liu AW, Nepom GT, et al. MHC class II tetramers identify peptide-specific human CD4<sup>+</sup>T cells proliferating in response to influenza A antigen. *J Clin Invest*, 1999, 104: 63-7
- [9] Mallone R, Nepom GT. MHC Class II tetramers and the pursuit of antigen-specific T cells: define, deviate, delete. *Clin Immunol*, 2004, 110(3): 232-42
- [10] Ayyoub M, Dojcinovic D, Pignon P, et al. Monitoring of NY-ESO-1 specific CD4<sup>+</sup>T cells using molecularly defined MHC class II/His-tag-peptide tetramers. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107(16): 7437-42
- [11] Fourneau JM, Cohen H, van Endert PM. A chaperone-assisted high yield system for the production of HLA-DR4 tetramers in insect cells. *J Immunol Methods*, 2004, 285(2): 253-64
- [12] Yang J, Jaramillo A, Shi R, et al. *In vivo* biotinylation of the major histocompatibility complex(MHC) class II/peptide complex by coexpression of BirA enzyme for the generation of MHC class II/ tetramers. *Hum Immunol*, 2004, 65(7): 692-9
- [13] Lubaki NM, Ilinykh P, Pietzsch C, et al. The lack of maturation of Ebola virus-infected dendritic cell results from the cooperative effect of at least two viral domains. *J Virol*, 2013, 87(13): 7471-85
- [14] Long HM, Chagoury OL, Leese AM, et al. MHC II tetramers visualize human CD4<sup>+</sup>T cell responses to Epstein-Barr virus infection and demonstrate atypical kinetics of the nuclear antigen EBNA1 response. *J Exp Med*, 2013, 210(5): 933-49
- [15] 黎意芬, 黄利荣, 刘国标, 等. 应用E7多肽/HLA-DR8四聚体监测治疗前后肺结核患者外周血多肽特异性CD4<sup>+</sup>T细胞的变化. *中国防痨志*, 2011, 7: 400-6
- [16] 黄利荣, 李研, 方毅敏, 等. E7多肽/HLA-DRB1\*0404与E7多肽/HLA-DRB1\*1602四聚体对肺结核患者外周血多肽特异性CD4<sup>+</sup>T细胞治疗前后的变化的监测[C]//中华医学会结核病学分会. 中华医学会结核病学分会2011年学术会议论文汇编, 2011: 5
- [17] Vollers SS, Stern LJ. Class II major histocompatibility complex tetramer staining: progress, problems, and prospects. *Immunology*, 2008, 123(3): 305-13
- [18] 邓向斌, 黄利荣, 谢丹, 等. 应用四聚体技术检测肺结核患者外周血及病变组织C5特异性CD4<sup>+</sup>T细胞. *实用医学杂志*, 2012, 13: 2181-4
- [19] Fridkis-Hareli M. Design of peptide immunotherapies for MHC Class-II-associated autoimmune disorders. *Clin Dev Immunol*, 2013: 826191
- [20] Tsai S, Santamaria P. MHC class II polymorphisms, autoreactive T-cells, and autoimmunity. *Front Immunol*, 2013, 4: 321
- [21] 刘海英, 张建, 邓安梅, 等. 四聚体技术检测原发性胆汁性肝硬化患者血循环中抗原特异性T细胞. *细胞与分子免疫学杂志*, 2006, 22(1): 79-81
- [22] 房国祥, 虞伟, 李晓军, 等. RA患者CCP抗原自身反应性T细胞的ELISpot检测与应用研究[C]//中华医学会检验分会临床免疫学组、中国免疫学会临床免疫分会. 全国临床免疫检验研讨会暨第六届全国临床免疫学术会议论文汇编, 2009: 8
- [23] Swain SL, McKinstry KK, Strutt TM. Expanding roles for CD4<sup>+</sup>T cells in immunity to viruses. *Nat Rev Immunol*, 2012, 12(2): 136-48
- [24] Chen C, Liu CP. Regulatory function of a novel population of mouse autoantigen specific foxp32 regulatory T cells depends on IFN- $\gamma$ , IL-6, and contact with target cells. *PLoS One*, 2009, 4(11): e7863
- [25] Bioley G, Dousset C, Yeh A, et al. Vaccination with recombinant NY-ESO-1 protein elicits immunodominant HLA-DR52b-restricted CD4<sup>+</sup>T cell responses with a conserved T cell receptor repertoire. *Clin Cancer Res*, 2009, 15: 4467-74
- [26] Ayyoub M, Pignon P, Dojcinovic D, et al. Assessment of vaccine-induced CD4<sup>+</sup>T cell responses to the 119-143 immunodominant region of the tumor-specific antigen NY-ESO-1 using DRB1\*0101 tetramers. *Clin Cancer Res*, 2010, 16(18): 4607-15
- [27] Poli C, Raffin C, Dojcinovic D, et al. MHC class II/ESO tetramer-based generation of *in vitro* primed anti-tumor T-helper lines for adoptive cell therapy of cancer. *Haematologica*, 2013, 98(2): 316-22
- [28] Burgara-Estrella A, Diaz I, Rodriguez-Gomez IM, et al. Predicted peptides from non-structural proteins of porcine reproductive and respiratory syndrome virus are able to induce IFN- $\gamma$  and IL-10. *Viruses*, 2013, 5(2): 663-77