

DOI: 10.13376/j.cblls/2015032

文章编号: 1004-0374(2015)02-0228-06

· 技术与应用 ·

MHC I类分子四聚体技术的应用研究进展

董宋鹏¹, 李子彬², 杨 杰¹, 高凤山^{1*}

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

摘 要: 主要组织相容性复合体 (major histocompatibility complex, MHC) I 类分子四聚体 (tetramer) 技术可直接对抗原特异性细胞毒性 T 淋巴细胞 (cytotoxic T lymphocytes, CTL) 进行标记, 以检测能够识别特定抗原肽-MHC I 的 CTL, 用于临床检测、疾病诊断及相关科学研究。综述了 MHC I 四聚体技术应用的最新研究进展, 为开展四聚体的相关研究提供新的参考。

关键词: MHC I; 四聚体; 抗原肽; 细胞毒性 T 淋巴细胞

中图分类号: R392.11 **文献标志码:** A

Progress on the application of the MHC I tetramer technology

DONG Song-Peng¹, LI Zi-Bin², YANG Jie¹, GAO Feng-Shan^{1*}

(1 College of Life Science and Technology, Dalian University, Dalian 116622, China;

2 School of Life Sciences, Jilin University, Changchun 130118, China)

Abstract: The tetramer technology in major histocompatibility complex class I (MHC I) can be used to label the antigen-specific cytotoxic T lymphocytes (CTLs) directly so as to detect the CTLs, which can recognize the specific antigenic peptide-MHC I. The MHC I tetramer technology can be applied in clinical test, disease diagnosis and scientific research. In this article, the novel progress on the application of the MHC I tetramer technology is reviewed fully to provide a new reference to research in tetramer.

Key words: MHC I; tetramer; antigenic peptide; cytotoxic T lymphocytes

抗原特异性的 CD8⁺ T 淋巴细胞, 亦即特异性 CTLs 在免疫应答中发挥着重要作用, 对其进行定量分析可为阐明抗病毒感染、肿瘤及自身免疫提供帮助。在细胞免疫应答中, 抗原特异性 CTLs 并不直接与抗原分子或抗原肽结合, 而是一分子的抗原特异性 T 细胞受体 (T cell receptor, TCR)、一分子的 MHC I 分子及对应的特异性抗原肽形成三元复合物, 之后才可形成有效的免疫应答。因此, 通过 TCR 与 MHC I-抗原肽特异性结合来定量分析检测特异性 CTLs 成为新的趋势。为了更充分了解细胞免疫应答产生的机制, 需要一种高通量的识别 T 细胞表位的方法。结合高通量的细胞计数法, 大量使用肽-MHC I-四聚体染色技术能够更方便地研究免疫应答中被激活的 CTLs 的识别作用^[1]。

1 MHC I四聚体技术的产生

分析抗原特异性 T 细胞的方法有多种。一般

而言, 传统的方法主要包括有限稀释法 (limiting dilution assays, LDA)、⁵¹Cr 释放法、酶联免疫斑点法 (ELISPOT) 等等。有限稀释法, 简而言之通过延长细胞培养的时间以增加抗原特异性 T 细胞群体的数量, 之后, 利用细胞毒试验检测其抗原特异性。该方法缺陷在于过于依赖体外的增殖, 只能检测到一部分 CTL 前体 (CTLp), 甚至出现假阳性结果。⁵¹Cr 释放分析法和 LDA 法相似, 是通过间接检测抗原特异性 CTLs 的方法, 并且都要求有大量的特异性 CTLs 作为效应细胞, 因此, 需要首先在体外进行细胞培养、扩增。这两种方法周期长、敏感性低、费时费力, 难以广泛应用^[2]。相比之下, ELISPOT

收稿日期: 2014-08-25; 修回日期: 2014-09-26

基金项目: 国家自然科学基金项目(31172304)

*通信作者: E-mail: gfsh0626@126.com; Tel: 0411-87402337

则不需要依赖体外增殖, 直接检测细胞因子产物来评价 T 细胞, 并且敏感度远高于 LDA 法, 但该方法依赖一定时间的肽诱导, 在检测的过程中还容易杀死被测细胞^[3]。另外, 细胞因子在各种细胞中的产生并不均一, 甚至有的细胞不产生, 因此, 往往会低估了抗原特异性 CTL 的总量。

因此, 有研究者设想能否通过 TCR 与 MHC I-肽的相互作用来检测抗原特异性的 CTLs^[4]。自 20 世纪 80 年代起, 陆续有学者使用可溶性 MHC I 类分子来研究 T 淋巴细胞反应, 但结果并不理想。究其原因, 单价的 MHC-肽分子与 TCR 的亲合力极低 ($\sim 10^{-5}$ $\mu\text{mol/L}$), 且解离快, 形成的复合物半衰期不足 1 min^[5]。因此, 1996 年, Altman 等^[6]基于这些特点提出了可溶性 MHC I-肽四聚体 (MHC I-peptide tetramer) 技术, 由于该技术的特异性和高效性, 目前已被广泛应用于抗原特异性 CTL 的定性和定量分析, 成为研究细胞免疫的强有力工具。

Altman 等^[6]首先在体外将 15 个氨基酸残基的生物素酶底物肽 (Bio A substrate peptide, BSP) 加在 HLA-A2 (MHC I 类分子) 重链的 C 端形成融合蛋白, 在体外按一定比例与 β_2 微球蛋白 ($\beta_2\text{m}$) 及特异的抗原肽共孵育, 使其折叠成正确的构象, 成为 pMHC 复合物。将生物素标记在底物肽的赖氨酸残基上, 使用荧光色素标记链亲和素, 而一个标记荧光素的链亲和素可结合四个生物素标记的 pMHC 复合物, 因此结合形成四聚体, 如图 1 所示。MHC I-抗原肽四聚体与抗原特异性 CTLs

上的 TCR 结合后, 即可以通过流式细胞仪定量检出体内抗原特异性 CTLs, 并能将其分选出以供体外培养扩增和功能分析之用。MHC I 四聚体的出现大大提高了 MHC I 与 TCR 之间的亲和力, 并提高检测效率。MHC I 四聚体技术逐渐在各种领域实现了应用。

2 MHC I四聚体技术的应用

2.1 MHC I四聚体技术在肿瘤免疫与治疗中的应用

MHC I-肽-四聚体技术广泛应用于抗原特异性 CTLs 在癌症及其他免疫疗法方面的研究, 尤其在黑色素瘤及慢性髓性白血病方面^[8-13]。这使得研究者在诱导 T 细胞及临床应用之间找到了联系。分析 T 细胞的特异性及表型将有助于人们在治疗中识别免疫的相关性。

受 MHC I 四聚体技术的启发, 研究者发现一种新的抗肿瘤方法: 将抗肿瘤特异性单克隆抗体生物素化, 与生物素化 MHC I-肽单体及亲和素混合, 形成亲和素-生物素复合物, 一个位点连接抗体, 另外三个位点连接生物素化 MHC I-肽单体^[14]。还有直接用化学法连接亲和素及单克隆抗体, 然后与生物素化的 MHC I-肽单体混合, 形成抗体-MHC I-肽四聚体复合物。这两种复合物都能连结到肿瘤细胞表面, 通过四聚体特异 CTL 而使其溶解^[15]。

Jemon 等^[16]在小鼠体内进行试验, 将一般的 T 细胞辅助细胞表位 PADRE 与来自 HPV16 E6 的 MHC I 限制性多肽 (aa 48-57) 结合, 检测了抗 TC-1 HPV16 E6 和 E7 肿瘤的免疫疗效。结果显示, 小鼠的肿瘤负担减少了 50%, 并且存活时间的中值数是对照组的两倍。

2.2 MHC I四聚体技术在自身免疫疾病治疗与预防中的应用

糖尿病一直是困扰人类健康的一大顽疾, 尤其在老年人中发病率较高。即便在科技发达的今天, 糖尿病的发病率也只增不减。越来越多的证据表明, 自体反应抗原特异性 CTLs 是动物或人体的 1 型糖尿病发病过程中的重要因素^[17]。因此, 今后需要对自体反应 CTLs 特异性及其反应投入更多的精力。使用蛋白质或多肽验证 T 细胞免疫耐受作用费时费力, 该方法的一个缺陷是剩余的自体反应 T 细胞有可能会激活或激化疾病。Zwicker 等^[18]使用一种新的方法——耦合毒物 MHC I 四聚体法, 可用于除去自体反应的 T 细胞, 其原理是利用结合在 MHC I 四聚体上的皂草素除去体内外对 IGRP (葡萄糖 -6-

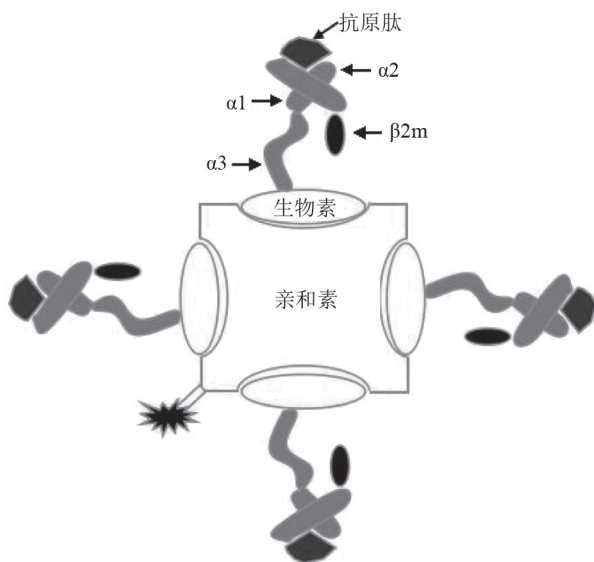


图1 MHC I四聚体结构示意图(参考[7]修改)

磷酸催化亚基相关蛋白)反应的 T 细胞。对 IGRP 细胞内的 TCR β 链进行序列分析发现,随着非肥胖糖尿病 (non-obese diabetes, NOD) 小鼠年龄的增长,胰腺内的呈四聚体阳性反应的 T 细胞明显减少,尤其在毒性四聚体 NOD 小鼠体内发生了改变。胰腺中持续的 MHC I 四聚体阳性 T 细胞几乎被完全消除掉,并且胰腺中意外丢失四聚体阳性 T 细胞会持续很久。最终,经过八周的对 IGRP⁺CTLs 细胞的消除实验的观察,发现利用 MHC I 四聚体技术显著地延迟了 NOD 小鼠糖尿病的发生。

2.3 MHC I四聚体技术在病毒免疫疫苗研究中的应用

许多高效的疫苗依赖于中和抗体。测量血清中抗体的含量是一种简单有效的分析抗原效率的方法。然而,即使在流感病毒免疫刺激之后进行检测,血清中的抗体水平依旧难以检测。此外,一种疫苗能够引起效应 CTLs 的免疫应答同样需要被检测到^[19]。MHC I-肽四聚体技术提供了一种理想的表征 T 细胞对疫苗免疫应答的方法,并且该方法已在多种病毒疫苗的免疫应答中得到了应用,包括流感^[20]、黄热病^[21]、肺结核^[22]、HIV/SIV^[23-24] 以及一些癌症疫苗研究的尝试之中。通过该方法检测 T 细胞对大量表位的特异性,对于了解如何控制快速变异的病毒,如 HIV 将有重要的意义。

2.4 MHC I四聚体技术的临床应用

MHC I-肽-四聚体技术同样在临床方面得到了部分应用。Cobbold 等^[25]结合磁珠法使用 HLA I 四聚体染色技术,从干细胞移植患者血液中纯化得到了巨噬细胞病毒 (CMV) 特异性 CTLs,并在组织移植患者过继移植治疗中得到应用。在该病例中, T 细胞在经四聚体介导的富集后依旧保持着增殖活性;然而,对于这些被选中的细胞,使用可逆的四聚体染色可能会对其功能有更好的改善^[26]。此外,一些研究人员还开发出了四聚体的变体,该变体可携带放射性元素或偶合毒素,并对小鼠进行注射以便调节或耗尽特异性 T 细胞^[27-28]。

Schwenk 等^[29]通过流式细胞术分析结合疟原虫抗原肽的 MHC I 四聚体发现,呈免疫阳性的抗原特异性 CTLs 刺激加强了早期 CD38 及 HLA-DR^{hi} (高表达量的 HLA-DR)。从 3 名四聚体染色阳性的患者中发现,前期活化的阳性细胞表型包括了所有四聚体染色阳性、疟疾抗原表位特异性的 CTLs,这表明在不确定表位特异性的情况下,早期的表型活化可以识别所有的疟疾疫苗诱导的抗原特异

性 CTLs。

肾脏移植后的病毒感染一直亟待解决,通过病毒抗原特异性 T 细胞应答被认为可以识别感染病毒的抗原表位,从而可以做出早期诊断。因此, Mees 等^[30]通过四聚体技术定量检测病毒特异性 CTLs,用于研究其在肾脏移植手术中的反应及感染状况。研究人员通过对 36 种病毒抗原表位特异性的 T 细胞及 5 种 HLA I 进行构建,结果发现有 3 位患者 CMV 感染,3/4 的患者出现过 CMV 二次感染,大多数 CMV 四聚体阳性的患者同时显现巴尔病毒 V (EB) 四聚体显型。

2.5 MHC I四聚体技术在其他领域的应用

2.5.1 通过MHC I四聚体技术对细胞组分分析

通过四聚体磁珠富集法, Pauken 等^[31]直接比较了对 I-A^b 细胞呈现出的各种各样的抗原肽特异性的 CTLs 的频率。他们发现该频率介于 1:50 000 至 1:500 000,且取决于表位。个体之间频率的差异已经研究清楚,并且扩展至小鼠和人的外周血的抗原特异性 CTLs。部分学者通过四聚体磁珠富集法研究了初始 (naive) 及成熟 (mature) T 细胞与各种抗原之间的免疫应答,结果显示在一些疾病的特异性抗原表位刺激的免疫应答中,初始 T 细胞起主要作用,这些疾病包括小鼠的水泡型口腔感染、淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒感染以及人类的丙型肝炎病毒感染等。研究发现,通过肽-MHC 四聚体检测得到的初始 T 细胞频率影响肿瘤特异性 T 细胞应答。因此,通过富集得到的 MHC I 四聚体染色敏感度促进了对初始 T 细胞功能的研究。

2.5.2 通过MHC I四聚体技术进行表位制图

通过结合大量细胞计数法与抗原肽四聚体染色法, Newell 等^[32]发明了一种可以快速并同步对多种抗原特异性的 CTLs 进行识别的方法。他们在单个血液样本中测试 109 种不同抗原特异性的 MHC I 四聚体,并对其中的 2 种进行标记以便研究其表型及功能。在 77 种候选轮状病毒表位中,研究者发现了 6 种受 HLA-A*0201 (人类白细胞抗原) 限制的表位特异性的 CTLs。研究发现,VP3 重组蛋白表位特异性的 T 细胞表型更加明显,并且在肠上皮细胞中频率较高。以上的研究结果使得对抗原表位及特异性 T 细胞的预测成为可能。

2.5.3 MHC I四聚体技术应用的最新研究

最新研究表明, MHC I 四聚体技术可应用于基因转座子与荧光素酶共作用的研究。经长期试验观察后, Podetz-Pedersen 等^[33]发现了睡美人 (sleeping

beauty, SB) 基因转座子具有调节新的基因序列的整合并导致基因长时间表达的功能。还发现将具有高度活性的转座酶 SB100X 与荧光素酶转座子 pT2/CaL 共同作用, 会导致荧光素长时间表达。然而, 经 4 周观察试验后, 发现该荧光素基因表达产物在实验小鼠体内逐个消失, 而这种现象在免疫缺陷小鼠体内却没有发生。他们推测表达的荧光素蛋白在体内发生了免疫反应, 后通过制备 MHC I 荧光素抗原肽四聚体以诱导淋巴细胞内细胞因子大量分泌, 证实了经转座作用产生的荧光素在小鼠体内产生了特异性的抗原肽免疫应答。

MHC I 四聚体技术还可应用于检测发现新的功能肽, 以及肽与 MHC I 基因座之间的关系。Newell 等^[32]和 Akram 等^[34]通过 MHC I 四聚体检测技术首次发现, 内质网相关氨肽酶 1 (ERAP1) 在调节抗原肽分子与 MHC I 分子结合中起到了重要作用。研究发现, 在缺乏 ERAP 的情况下, 在流感病毒 A 感染的 HLA-B27/ERAP^{-/-} 小鼠体内, 对 B27/NP383-391 抗原肽的 CTL 免疫应答水平出现了明显的下降; 通过使用四聚体染色, B27/ERAP^{-/-} 转基因小鼠体内分泌 TCR V β 8.1 的初始抗原特异性 CTLs 数量明显低于 B27/ERAP^{+/+} 小鼠。而同样的实验在 HLA-B7 基因座未引起类似的反应现象。由此不仅证明 ERAP 能够调节抗原肽与 HLA-B27 的结合, 而且证明 ERAP 与 HLA-B27 功能相关。

MHC I 四聚体技术还可应用于抑制移植排斥反应。在心脏移植小鼠模型中, 阻止 T 细胞与 CD40Ig 刺激将导致无数的移植组织存活, 而这又是 CD8⁺CD45RC^{lo} 调节 T cells (CD8⁺CD40Ig Tregs) 与树突状细胞共作用的结果。TCR-MHC-肽在调节 Treg 活性方面依旧存在争论。Picarda 等^[35]制备了标记四聚体的抗原肽 (MHC-I RT1.Aa/Du51) 来定位和定量小鼠心脏及脾脏移植手术后的 Du51 肽特异性 T 细胞的表达。该 Du51 肽能够引起 TCR 倾向性的 CD8⁺CD40Ig Tregs 群识别, 并激活 CD8⁺CD40Ig Tregs 群, 从而抑制抗宿主的移植反应。随后的 MHC I 四聚体检测实验证实, 该 Du51 肽的确能够使组织移植接受者组织存活。

3 MHC I四聚体技术的改进

由于每一种 MHC I 四聚体都需要独立地制造与纯化, 因此, 一段时间来四聚体技术的进步遇到了瓶颈。对于 MHC I 四聚体以及部分 MHC II 四聚体, 可变的多肽彻底解决了这个问题。Grotenbreg

等^[36]引入了紫外敏感型多肽用于 MHC I-肽-四聚体的传代, 即特异性多肽带一个紫外敏感标签。经过紫外照射可诱导多肽断裂为二, 从而使多肽片段从 MHC I 分子上分离并结合到各自的区域。因此, 某种确定的 UV 光敏感的多肽 MHC I 分子可以通过标准方法制造, 刺激后分裂成若干多肽, 可用于进一步制备出不同的 MHC-肽-四聚体。

通过改变 MHC I 锚定残基以优化 T 细胞抗原是一种改善多肽疫苗的常见方法。但人们有一些疑问, 这种改变是如何影响 TCR 与肽-MHC I 的结合及 T 细胞识别的。Cole 等^[37]使用表面等离子体共振以及细胞表面肽-MHC I 四聚体结合来表征前体肽锚定残基, 可以很大程度上不可逆转地影响 TCR 与肽-MHC I 的结合。他们还同时发现, TCR 辨别正常多肽和锚定位点改变的不规则多肽的能力能够区别 T 细胞对两种抗原所显示出的偏好。因此, 改进的多肽也许会使 T 细胞对已结合的抗原呈现出较好的识别, 并对后续的临床应用提供保障。

目前, 四聚体技术的应用更多地集中于人或小鼠, 而对于与人类关系密切的动物, 如猪 MHC I 四聚体的研究报道很少。2012 年, 张香春等^[38]和 2014 年, 刘筏等^[39]开展了猪 MHC I 类分子, 亦称为猪白细胞抗原 (swine leukocyte antigen, SLA) I 类分子四聚体的研究, 构建了荷包猪及烟台黑猪两个不同品系猪 SLA-2 四聚体前体链, 将用于与猪源病毒 CTL 表位多肽及 TCR 的结合研究。在多肽的设计上, 采用了体外结合实验筛选多个品系猪 SLA I 类分子共结合多肽表位^[40-41]的新方法, 今后可用于不同品系猪病毒病的检测及诊断。

4 问题与展望

MHC I 类分子四聚体技术的高通量及多通路分析的发展, 使得研究人员能够有效地将 MHC I 类分子四聚体技术应用于各自领域的问题中。过去由于频率过低而无法得到的生物学上重要的 T 细胞现在通过四聚体技术的富集已经可以进行研究了。同时, 多通路定量 PCR 技术的发展为体外研究四聚体技术提供了更好的技术支持。

MHC I 类分子四聚体技术是目前检测抗原特异性 CTLs 的金标准。MHC I-肽-四聚体技术可以同时直接对特异性 CTL 进行定量、定性分析, 该方法灵敏度高、特异性强、无需体外扩增及对细胞无损伤, 但该技术的应用上依旧存在一些困难, 如合成及稳定 MHC I 类分子的技术困难, 以

及 Tetramer 常规制备过程中存在复性率低、步骤繁琐等缺点,而且,每次反应只能分析单一的抗原表位特异性 T 细胞。

尽管 MHC I-肽-四聚体技术至今只有 20 年的研究历史,而许多重要的研究发现也仅仅是近几年才有所发展,但其前景仍然令研究者在各自的研究领域中充满期待,尤其是目前的研究更多地集中于人或模式动物的 MHC I 四聚体。然而,对其他动物 MHC 四聚体的研究还没有广泛开展起来。大连大学生命科学与技术学院分子免疫学课题组今后将致力于动物 MHC I 类分子四聚体的研究,争取利用四聚体技术更好地筛选猪源病毒多肽表位,并希望在猪源病毒病的分子检测方面取得突破。

[参 考 文 献]

- [1] Newell EW. Higher throughput methods of identifying T cell epitopes for studying outcomes of altered antigen processing and presentation. *Front Immunol*, 2013, 4: 430
- [2] 乔苗. 一种新的CTLs检测方法——可溶性MHC-肽四聚体方法. *国外医学免疫学分册*, 2001, 24(2): 102-5
- [3] Mahdavi M, Ebtakar M, Khorram Khorshid HR, et al. ELISPOT analysis of a new CTL based DNA vaccine for HIV-1 using GM-CSF in DNA prime/peptide boost strategy: GM-CSF induced long-lived memory responses. *Immunol Lett*, 2011, 140(1-2): 14-20
- [4] Al-Ramadi BK, Jelonek MT, Boyd LF, et al. Lack of strict correlation of functional sensitization with the apparent affinity of MHC/peptide complexes for the TCR. *J Immunol*, 1995, 155(2): 662-73
- [5] 李慧忠. 可溶性MHC-肽四聚体技术及其应用进展. *现代免疫学*, 2001, 27(1): 85-8
- [6] Altman JD, Moss PA, Goulder PJ, et al. Phenotypic analysis of antigen-specific T lymphocytes. *Science*, 1996, 274(5284): 94-6
- [7] Hugues S, Malherbe L, Filippi C, et al. Generation and use of alternative multimers of peptide/MHC complexes. *J Immunol Methods*, 2002, 268(1): 83-92
- [8] Valmori D, Dutoit V, Lienard D, et al. Tetramer-guided analysis of TCR β -chain usage reveals a large repertoire of melan-A-specific CD8⁺ T cells in melanoma patients. *J Immunol*, 2000, 165(1): 533-8
- [9] Ishii-Osai Y, Yamashita T, Tamura Y, et al. N-propionyl-4-S-cysteaminylphenol induces apoptosis in B16F1 cells and mediates tumor-specific T-cell immune responses in a mouse melanoma model. *J Dermatol Sci*, 2012, 67(1): 51-60
- [10] Rezvani K, Grube M, Brenchley JM, et al. Functional leukemia-associated antigen-specific memory CD8⁺ T cells exist in healthy individuals and in patients with chronic myelogenous leukemia before and after stem cell transplantation. *Blood*, 2003, 102(8): 2892-900
- [11] Callahan MK, Wolchok JD, Allison JP. Anti-CTLA-4 antibody therapy: immune monitoring during clinical development of a novel immunotherapy. *Semin Oncol*, 2010, 37(5): 473-84
- [12] Hoos A, Ibrahim R, Korman A, et al. Development of ipilimumab: contribution to a new paradigm for cancer immunotherapy. *Semin Oncol*, 2010, 37(5): 533-46
- [13] Rosenberg SA, Dudley ME. Adoptive cell therapy for the treatment of patients with metastatic melanoma. *Curr Opin Immunol*, 2009, 21(2): 233-40
- [14] Yuan J, Ginsberg B, Page D, et al. CTLA-4 blockade increases antigen-specific CD8⁺ T cells in prevaccinated patients with melanoma: three cases. *Cancer Immunol Immunother*, 2011, 60(8): 1137-46
- [15] Xu XN, Screaton GR. MHC/peptide tetramer-based studies of T cell function. *J Immunol Methods*, 2002, 268(1): 21-8
- [16] Jemon K, Young V, Wilson M, et al. An enhanced heterologous virus-like particle for human papillomavirus type 16 tumour immunotherapy. *PLoS One*, 2013, 8(6): e66866
- [17] Jiang, H, Canfield SM, Gallagher MP, et al. HLA-E-restricted regulatory CD8⁺T cells are involved in development and control of human autoimmune type 1 diabetes. *J Clin Invest*, 2010, 120(10): 3641-50
- [18] Zwicker K, Chatten C, Gratton K, et al. Spontaneous autoimmunity sufficiently potent to induce diabetes mellitus is insufficient to protect against insulinoma. *J Immunol*, 2009, 183(3): 1705-14
- [19] Appay V, Douek DC, Price DA. CD8⁺ T cell efficacy in vaccination and disease. *Nat Med*, 2008, 14(6): 623-8
- [20] Mok CK, Chen GW, Shih KC, et al. Evolutionarily conserved residues at an oligomerization interface of the influenza A virus neuraminidase are essential for viral survival. *Virology*, 2013, 447(1-2): 32-44
- [21] Jame EA, LaFond RE, Gates TJ, et al. Yellow fever vaccination elicits broad functional CD4⁺ T cell responses that recognize structural and nonstructural proteins. *J Virol*, 2013, 87(23): 12794-804
- [22] Zhang H, Tian Y, Liu Z, et al. Characterization of amino acid residues essential for tetramer formation and DNA-binding activity of ssDNA-binding protein of *Mycobacterium tuberculosis*. *Biochemistry: Mosc*, 2011, 76(6): 658-65
- [23] Singh P, Yadav GP, Gupta S, et al. A novel dimer-tetramer transition captured by the crystal structure of the HIV-1 Nef. *PLoS One*, 2011, 6(11): e26629
- [24] Hong JJ, Reynolds MR, Mattila TL, et al. Localized populations of CD8 MHC class I tetramer SIV-specific T cells in lymphoid follicles and genital epithelium. *PLoS One*, 2009, 4(1): e4131
- [25] Cobbold M, Khan N, Pourgheysari B, et al. Adoptive transfer of cytomegalovirus-specific CTL to stem cell transplant patients after selection by HLA-peptide tetramers. *J Exp Med*, 2005, 202(3): 379-86
- [26] Knabel M, Franz TJ, Schiemann M, et al. Reversible MHC multimer staining for functional isolation of T-cell

- populations and effective adoptive transfer. *Nat Med*, 2002, 8(6): 631-7
- [27] Penaloza-MacMaster P, Masopust D, Ahmed R. T-cell reconstitution without T-cell immunopathology in two models of T-cell-mediated tissue destruction. *Immunology*, 2009, 128(2): 164-71
- [28] Hess PR, Barnes C, Woolard MD, et al. Selective deletion of antigen-specific CD8⁺ T cells by MHC class I tetramers coupled to the type I ribosome-inactivating protein saporin. *Blood*, 2007, 109(8): 3300-7
- [29] Schwenk R, Banania G, Epstein J, et al. *Ex vivo* tetramer staining and cell surface phenotyping for early activation markers CD38 and HLA-DR to enumerate and characterize malaria antigen-specific CD8⁺ T-cells induced in human volunteers immunized with a *Plasmodium falciparum* adenovirus-vectored malaria vaccine expressing AMA1. *Malar J*, 2013, 12: 376
- [30] Mees ST, Kebschull L, Mardin WA, et al. Detection of different virus-specific CD8⁺ T cells after kidney transplantation. *Surg Infect: Larchmt*, 2014, 15(3): 274-82
- [31] Pauken KE, Linehan JL, Spanier JA, et al. Cutting edge: type 1 diabetes occurs despite robust anergy among endogenous insulin-specific CD4 T cells in NOD mice. *J Immunol*, 2013, 191(10): 4913-7
- [32] Newell EW, Sigal N, Nair N, et al. Combinatorial tetramer staining and mass cytometry analysis facilitate T-cell epitope mapping and characterization. *Nat Biotechnol*, 2013, 31(7): 623-9
- [33] Podetz-Pedersen KM, Vezys V, Somia NV, et al. Cellular immune response against firefly luciferase after sleeping beauty-mediated gene transfer *in vivo*. *Hum Gene Ther*, 2014, 25(11): 955-65
- [34] Akram A, Lin A, Gracey E, et al. HLA-B27, but not HLA-B7, immunodominance to influenza is ERAP dependent. *J Immunol*, 2014, 192(12): 5520-8
- [35] Picarda E, Bezie S, Venturi V, et al. MHC-derived allopeptide activates TCR-biased CD8⁺ Tregs and suppresses organ rejection. *J Clin Invest*, 2014, 124(6): 2497-512
- [36] Grotenbreg GM, Roan NR, Guillen E, et al. Discovery of CD8⁺ T cell epitopes in *Chlamydia trachomatis* infection through use of caged class I MHC tetramers. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(10): 3831-6
- [37] Cole DK, Edwards ES, Wynn KK, et al. Modification of MHC anchor residues generates heteroclitic peptides that alter TCR binding and T cell recognition. *J Immunol*, 2010, 185(4): 2600-10
- [38] 张香春, 冯磊, 高凤山, 等. 荷包猪SLA重链基因偶合底物肽及表达研究. *生物技术*, 2012, 22(5): 17-20
- [39] 刘筱, 杨金刚, 高凤山, 等. 烟台黑猪SLA-I重链基因末端生物素修饰及表达研究. *生物技术通报*, 2014, 26(1): 191-5
- [40] Gao FS, Bai J, Zhang Q, et al. Construction of multiple recombinant SLA-I proteins by linking heavy chains and light chains *in vitro* and analyzing their secondary and 3-dimensional structures. *Gene*, 2012, 502(2): 147-53
- [41] Gao FS, Fang QM, Li YG, et al. Reconstruction of a swine SLA-I protein complex and determination of binding nonameric peptides derived from the foot-and-mouth disease virus. *Vet Immunol Immunopathol*, 2006, 113(3-4): 328-38