

分类号: Q956
学 号: 20202006045

密 级: 公开
单位代码: 10759

石河子大学

硕士学位论文



小鼠骨髓源性树突状细胞体外提呈布鲁氏菌免疫多肽组的筛选鉴定及方法优化

| | |
|-----------|------------|
| 学 位 申 请 人 | 李婷婷 |
| 指 导 教 师 | 高剑峰 教授 |
| 申请学位门类级别 | 理学硕士 |
| 专 业 名 称 | 生物学 |
| 研 究 领 域 | 生物化学与分子生物学 |
| 所 在 学 院 | 生命科学学院 |

中国·新疆·石河子

2023年10月

分类号: Q956
学号: 20202006045

密级: 公开
单位代码: 10759

石河子大学

硕士学位论文



小鼠骨髓源性树突状细胞体外提呈布鲁氏菌免疫多肽组的筛选鉴定及方法优化

| | |
|----------|------------|
| 学位申请人 | 李婷婷 |
| 指导教师 | 高剑峰 教授 |
| 申请学位门类级别 | 理学硕士 |
| 专业名称 | 生物学 |
| 研究领域 | 生物化学与分子生物学 |
| 所在学院 | 生命科学学院 |

中国·新疆·石河子

2023年10月

**Screening identification and method optimisation of mouse bone
marrow-derived dendritic cells for in vitro presentation of *Brucella*
abortus immunopeptidome**

A Dissertation Submitted to

Shihezi University

In Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of

Master of Natural Science

By

Li Ting-ting

(Biochemistry and Molecular Biology)

Dissertation Supervisor: Prof. Gao Jian-feng

October, 2023

石河子大学学位论文独创性声明及使用授权声明

学位论文独创性声明

本人所呈交的学位论文是在我导师的指导下进行的研究工作及取得的研究成果。据我所知，除文中已经注明引用的内容外，本论文不包含其他个人已经发表或撰写过的研究成果。对本文的研究做出重要贡献的个人和集体，均已在文中作了明确的说明并表示谢意。

研究生签名：李婷婷

时间：2023年10月30日

使用授权声明

本人完全了解石河子大学有关保留、使用学位论文的规定，学校有权保留学位论文并向国家主管部门或指定机构送交论文的电子版和纸质版。有权将学位论文在学校图书馆保存并允许被查阅。有权自行或许可他人将学位论文编入有关数据库提供检索服务。有权将学位论文的标题和摘要汇编出版。保密的学位论文在解密后适用本规定。

研究生签名：李婷婷

时间：2023年10月30日

导师签名：高剑峰

时间：2023年10月30日

摘要

目的: 通过体外诱导小鼠骨髓源性树突状细胞 (BMDC) 并用布鲁氏菌侵染, 获得其胞膜上 MHC 结合免疫多肽组, 此类研究尚少见报道。本研究拟利用布鲁氏菌 M5^{stp} 侵染小鼠 BMDC, 探索侵染后细胞的处理方法, 以降低胞内菌对后续试验的影响, 从而获得相对较纯的多肽样品。利用免疫共沉淀和液相色谱串联质谱联用建立小鼠 BMDC 表面 MHC 提呈的免疫多肽分离纯化技术, 从而分离、筛选并获得胞膜上与 MHC II 结合的 M5^{stp} 免疫多肽组, 为新一代细菌分子疫苗的设计与实现以及免疫多肽组在免疫信号传递过程中的作用研究奠定基础。

方法: (1) 应用 GM-CSF 联合 IL-4, 体外诱导培养小鼠 BMDC。通过改变培养过程中补加细胞因子的时间和种类, 确定体外诱导培养 BMDC 的最优条件, 提高细胞获得率。使用细菌脂多糖刺激培养第 7 天处于未成熟状态的 BMDC 使其成熟, 扫描电子显微镜 (SEM) 观察细胞表面形态, 透射电子显微镜 (TEM) 观察细胞超微结构。(2) 将布鲁氏菌 M5^{stp} 菌液按照细菌数与细胞数 100:1 的比例加入到 BMDC 细胞悬液中侵染 24 h; 通过 SEM、TEM 观察侵染前后细胞形态变化。(3) 改进 Mem-PERTM Plus 试剂盒操作步骤, 提取 M5^{stp} 侵染过的 BMDC 表面免疫多肽及其他膜蛋白组分; 在 M5^{stp} 侵染过的细胞悬液中加入低渗缓冲液 (1 mmol/L NaHCO₃、0.2 mmol/L EDTA、蛋白酶抑制剂混合物), 缓冲液: 细胞悬液 1:20, 4°C 过夜处理, 然后在不同转速下离心去除溶液中的菌并计算除菌率, 通过倒置显微镜观察不同离心力下细胞膜碎片悬浮液。BCA 法检测两种方法获得的样品蛋白浓度。(4) 利用免疫共沉淀试验分离纯化 MHC II-免疫多肽, Western-Blot 验证 MHC II 的富集情况。通过液相色谱串联质谱及质谱分析技术筛选并鉴定与 MHC II 结合的免疫多肽。利用 R 语言编程并对筛选出的多肽对应的蛋白质处理和分析进行 GO 注释。

结果: (1) 体外诱导培养 BMDC 的最优条件为: 小鼠骨髓细胞在培养第 2.5 天补加 GM-CSF (20 ng/mL) 和 IL-4 (10 ng/mL); 培养第 3 天用 RPMI 1640 完全培养液进行 1/2 换液; 培养第 6 天进行 1/3 换液; 培养第 7 天收集细胞。通过 SEM 和 TEM 观察发现脂多糖刺激后其细胞形态、大小和细胞内部结构均发生变化, 符合成熟 BMDC 的特征。(2) SEM 观察发现 M5^{stp} 侵染细胞后, 细胞形态发生明显变化; TEM 观察发现与未被侵染的细胞对比, M5^{stp} 侵染后细胞内部出现了许多有膜包裹的小泡。(3) 利用 Mem-PERTM Plus 试剂盒提取 2.5×10⁷ 个细胞的膜蛋白, 获得的蛋白溶液浓度为 1.49 mg/mL; 利用低渗溶胀法去除胞内菌 (5×10⁷ 个细胞), 3000 rpm 离心 10 min 的条件下, 可以达到较高的除菌率 (91.01%), 同时细胞膜损耗较小, 获得的细胞膜碎片悬液蛋白浓度为 1.75 mg/mL。(4) 经免疫共沉淀和质谱分析, 与布鲁氏菌全基因组比对, 试剂盒法获得的蛋白样品共筛选出 7 个与 MHC II 结合的免疫多肽序列, 分别属于 7 种蛋白质; 低渗溶胀法获得的蛋白样品共筛选出 289 个与 MHC II 结合的免疫多肽序列, 分别属于 183 种蛋白质。

结论: 本研究优化了小鼠 BMDC 的体外诱导培养条件, 在提高了小鼠 BMDC 获得率的基础上, 成功建立了小鼠 BMDC 表面提呈的免疫多肽分离纯化技术, 并对该技术进行了优化。首次通过试剂盒法

和低渗溶胀法处理M5^{gfp}侵染后的BMDC，有效降低了胞内菌对后续试验的影响。并建议将低渗溶胀法处理M5^{gfp}侵染后的BMDC作为优选方法。将处理后的蛋白样品利用免疫共沉淀和质谱分析技术，筛选并获得了布鲁氏菌免疫多肽组，对这些多肽对应的蛋白质进行功能鉴定分析表明，这些蛋白质包括布鲁氏菌外膜蛋白和外膜蛋白组装过程中需要的相关酶类，在免疫信号传递过程中细胞内一系列生化反应所需的酶类，以及蛋白质折叠、翻译、蛋白质转运等生物过程有关的功能蛋白等，大部分存在于细胞膜上。该研究提示，抗原递呈细胞在提呈布鲁氏菌抗原肽的过程中，绝不是只提呈一个或者少数几个表面蛋白所产生的抗原肽，而是提呈了一个多肽组，本研究的结论与人们在新冠病毒抗原肽提呈特征研究上的结论一致。本研究为免疫多肽组的筛选鉴定提供了新思路，为布鲁氏菌新型亚单位疫苗的研制奠定基础。

关键词：布鲁氏菌；树突状细胞；免疫共沉淀；质谱分析；免疫多肽组

Abstract

Object: The in vitro induction of mouse bone marrow-derived dendritic cells (BMDC) and their infestation with *Brucella abortus* to obtain their cytosolic MHC-immunopeptidome has been rarely reported. In this study, we propose to use *B. abortus* M5^{+gfp} to infest BMDC in mice and explore the treatment of cells after infestation to reduce the effect of intracellular bacteria on subsequent experiments, so as to obtain relatively pure polypeptide samples. The technique of isolation and purification of immunopeptides presented on the surface of mouse BMDC was established using Co-immunoprecipitation and liquid chromatography tandem mass spectrometry, so as to isolate, screen and obtain the M5^{+gfp} immunopeptidome bound to MHC II on the cytosolic membrane, and lay the foundation for the design and implementation of next generation bacterial molecular vaccines and the role of the immune peptidome in the immune signalling process.

Methods: (1) In vitro induction of BMDC using GM-CSF in combination with IL-4. The optimal conditions for in vitro induction of BMDC were determined by varying the timing and type of cytokine supplementation during the culture process to improve the cell acquisition rate. Bacterial lipopolysaccharide was used to stimulate the immature BMDC on day 7 of culture to mature, and the surface morphology of the cells was observed by scanning electron microscopy (SEM) and the ultrastructure of the cells was observed by transmission electron microscopy (TEM). (2) The *B. abortus* M5^{+gfp} bacterial solution was added to the BMDC cell suspension at a ratio of 100:1 bacterial count to cell count for 24 h; changes in cell morphology were observed by SEM and TEM before and after the infestation. (3) Modified Mem-PERTM Plus kit procedure for extracting immunopeptide and other membrane protein fractions from M5^{+gfp}-infected BMDC surface. Hypotonic buffer (1 mmol/L NaHCO₃, 0.2 mmol/L EDTA, protease inhibitor mixture) was added to the M5^{+gfp} infested cell suspension, buffer: cell suspension 1:20, treated overnight at 4°C, and then centrifuged at different rotational speeds to remove bacteria from the solution and calculate the rate of removal. The protein concentration of the samples obtained by the two methods was measured by BCA. (4) MHC II-immunopeptides were isolated and purified using an Co-immunoprecipitation assay and the enrichment of MHC II molecules was verified by Western-Blot. Immunopeptides bound to MHC II molecules were screened and identified by liquid chromatography tandem mass spectrometry and mass spectrometry. GO annotation was performed using R language programming and protein processing and analysis corresponding to the screened peptides.

Results: (1) The optimal conditions for in vitro induction of BMDC culture were: mouse bone marrow cells were supplemented with GM-CSF (20 ng/mL) and IL-4 (10 ng/mL) on day 2 and 5 of culture; 1/2 change with RPMI 1640 complete culture medium on day 3 of culture; 1/3 change on day 6 of culture; and cells were collected on day 7 of culture. Observations by SEM and TEM revealed changes in their cell morphology, size

and internal cell structure after lipopolysaccharide stimulation, consistent with the characteristics of mature BMDC. (2) SEM showed that the morphology of M5^{+gfp}-infected cells changed significantly, and TEM showed that there were many small vesicles with membranes inside the M5^{+gfp}-infected cells compared to non-infested cells. (3) Membrane proteins from 2.5×10⁷ cells were extracted using the Mem-PERTM Plus kit, and the concentration of the protein solution obtained was 1.49 mg/mL; the intracellular bacteria (5×10⁷ cells) were removed using the hypotonic swelling method, and a high removal rate (91.01%) could be achieved under the condition of centrifugation at 3000 rpm for 10min, while the cell membrane loss was small. The protein concentration of the obtained cell membrane fragment suspension was 1.75 mg/mL. (4) After Co-immunoprecipitation and mass spectrometry analysis, and comparison with the whole genome of *B. abortus*, the protein samples obtained by the kit method screened a total of 7 immunopeptide sequences bound to MHC II molecules, belonging to 7 proteins respectively; the protein samples obtained by the hypotonic swelling method screened a total of 289 protein sequences bound to MHC II molecules. A total of 289 immunopeptide sequences bound to MHC II molecules belonging to 183 proteins were screened from protein samples obtained by hypotonic swelling.

Conclusion: In this experiment, the in vitro induction culture conditions of mouse BMDC were optimized, and the technique for the isolation and purification of MHC-immunopeptides extracted from the surface of mouse BMDC was successfully established on the basis of the improved acquisition rate of mouse BMDC. For the first time, the BMDC after M5^{+gfp} infestation were treated by the kit method and the hypotonic swelling method, which effectively reduced the influence of intracellular bacteria on subsequent experiments. The hypotonic lysis method is also recommended as the preferred method for treating BMDC after M5^{+gfp} infestation. The processed protein samples were screened and the *B. abortus* immunopeptidome was obtained using immunoprecipitation and mass spectrometry techniques. The functional identification of the proteins corresponding to these peptides showed that these proteins include *B. abortus* outer membrane proteins and related enzymes required in the assembly process of outer membrane proteins, enzymes required for a series of intracellular biochemical reactions during immune signalling, and functional proteins related to protein folding, translation, protein translocation and other biological processes, most of which are found on the cell membrane. The majority of these proteins are found in the cell membrane, including functional proteins involved in biological processes such as translation and protein translocation. This study suggests that the antigen-presenting cells do not present only one or a few surface proteins in the process of presenting *B. abortus* antigenic peptides, but rather present a polypeptide group, and the findings of this study are consistent with the findings of studies on the characterisation of antigenic peptide presentation in NCCV. The present study provides a new idea for the screening and identification of immune peptidomes, and lays the foundation for the development of a new subunit vaccine for *B. abortus*.

Key words: *Brucella abortus*; Dendritic cells; Co-IP; Mass spectrometry; Immunopeptidome

目录

| | |
|------------------------------------|------------|
| 摘要..... | I |
| Abstract | III |
| 目录..... | V |
| 部分缩写的中英文对照..... | IX |
| 第 1 章 文献综述..... | 1 |
| 1.1 免疫多肽组及其研究进展..... | 1 |
| 1.1.1 免疫多肽组的作用..... | 1 |
| 1.1.2 免疫多肽组的研究进展..... | 2 |
| 1.1.3 布鲁氏菌免疫多肽组的研究意义及进展..... | 2 |
| 1.2 MHC-免疫多肽复合物..... | 3 |
| 1.3 树突状细胞的特点及功能..... | 4 |
| 1.4 布鲁氏菌抗原及其研究进展..... | 5 |
| 1.4.1 布鲁氏菌主要毒力因子..... | 5 |
| 1.4.2 布鲁氏菌在宿主细胞内的生存能力..... | 7 |
| 1.4.3 布鲁氏菌抗原表位..... | 9 |
| 1.5 MHC-免疫多肽组分离纯化及组分鉴定技术..... | 9 |
| 1.5.1 免疫共沉淀技术..... | 9 |
| 1.5.2 液相色谱-串联质谱联用技术..... | 10 |
| 1.6 研究内容及意义..... | 11 |
| 1.6.1 研究内容..... | 11 |
| 1.6.2 技术路线..... | 12 |
| 1.6.3 研究意义..... | 12 |
| 第 2 章 小鼠骨髓源性树突状细胞培养条件的优化及形态鉴定..... | 13 |
| 2.1 引言..... | 13 |
| 2.2 试验材料与试剂..... | 13 |
| 2.2.1 试验材料..... | 13 |
| 2.2.2 试剂与仪器..... | 14 |
| 2.2.3 主要试剂的配制..... | 15 |
| 2.3 试验方法..... | 15 |
| 2.3.1 小鼠骨髓细胞的获得..... | 15 |
| 2.3.2 补加不同细胞因子对 BMDC 数量的影响..... | 16 |

| | | |
|-------|--|----|
| 2.3.3 | 不同时间补加细胞因子对 BMDC 数量的影响 | 16 |
| 2.3.4 | SEM 观察细胞表面形态 | 17 |
| 2.3.5 | TEM 观察细胞超微结构 | 17 |
| 2.3.6 | 数据统计分析 | 18 |
| 2.4 | 试验结果 | 18 |
| 2.4.1 | 补加不同细胞因子对 BMDC 数量的影响 | 18 |
| 2.4.2 | 不同时间补加细胞因子对 BMDC 数量的影响 | 19 |
| 2.4.3 | SEM 观察细胞表面形态 | 20 |
| 2.4.4 | TEM 观察细胞超微结构 | 20 |
| 2.5 | 讨论 | 21 |
| 2.6 | 本章小结 | 22 |
| 第 3 章 | 布鲁氏菌 M5 ⁺ gfp 感染小鼠 BMDC | 23 |
| 3.1 | 引言 | 23 |
| 3.2 | 试验材料与试剂 | 23 |
| 3.2.1 | 试验材料 | 23 |
| 3.2.2 | 试剂与仪器 | 24 |
| 3.2.3 | 主要试剂配制 | 25 |
| 3.3 | 试验方法 | 25 |
| 3.3.1 | 布鲁氏菌 M5 ⁺ gfp 感染 BMDC | 25 |
| 3.3.2 | 激光共聚焦观察感染后细胞内荧光 | 26 |
| 3.3.3 | SEM 观察感染前后细胞表面形态 | 26 |
| 3.3.4 | TEM 观察感染前后细胞超微结构 | 26 |
| 3.4 | 试验结果 | 27 |
| 3.4.1 | 倒置显微镜观察小鼠 BMDC 形态 | 27 |
| 3.4.2 | 激光共聚焦观察感染后细胞内荧光 | 28 |
| 3.4.3 | SEM 观察感染前后细胞表面形态 | 28 |
| 3.4.4 | TEM 观察感染前后细胞超微结构 | 29 |
| 3.5 | 讨论 | 30 |
| 3.6 | 本章小结 | 31 |
| 第 4 章 | 布鲁氏菌 M5 ⁺ gfpMHC-免疫多肽复合物的获得 | 32 |
| 4.1 | 引言 | 32 |
| 4.2 | 试验材料与试剂 | 32 |
| 4.2.1 | 试剂与仪器 | 32 |
| 4.2.2 | 主要试剂配制 | 34 |

| | |
|--|----|
| 4.3 试验方法..... | 34 |
| 4.3.1 Mem-PER™ Plus 试剂盒提取膜蛋白..... | 34 |
| 4.3.2 低渗溶胀法去除 BMDC 内的布鲁氏菌..... | 34 |
| 4.3.3 BCA 法测定蛋白样品浓度..... | 35 |
| 4.3.4 数据统计分析..... | 36 |
| 4.4 试验结果..... | 36 |
| 4.4.1 Mem-PER™ Plus 试剂盒提取的膜蛋白浓度..... | 36 |
| 4.4.2 低渗溶胀法去除 BMDC 内的布鲁氏菌..... | 37 |
| 4.5 讨论..... | 39 |
| 4.6 本章小结..... | 40 |
| 第 5 章 布鲁氏菌 M5 ^{+gfp} 侵染 BMDC 后免疫多肽的筛选及鉴定..... | 41 |
| 5.1 引言..... | 41 |
| 5.2 试验材料与试剂..... | 41 |
| 5.2.1 主要试剂..... | 41 |
| 5.2.2 主要仪器..... | 42 |
| 5.3 试验方法..... | 43 |
| 5.3.1 样品处理..... | 43 |
| 5.3.2 生物信息学数据分析..... | 43 |
| 5.3.3 数据分析..... | 43 |
| 5.4 试验结果..... | 44 |
| 5.4.1 Western-Blot 检测验证 MHC II 蛋白富集..... | 44 |
| 5.4.2 MHC II 结合免疫多肽的分离纯化及鉴定..... | 45 |
| 5.4.3 MHC II 结合免疫多肽对应蛋白质的 GO 分析..... | 46 |
| 5.5 讨论..... | 48 |
| 5.6 本章小结..... | 51 |
| 第 6 章 结论与展望..... | 52 |
| 6.1 结论..... | 52 |
| 6.1.1 小鼠 BMDC 培养的优化..... | 52 |
| 6.1.2 布鲁氏菌 M5 ^{+gfp} 侵染前后 BMDC 的形态变化..... | 52 |
| 6.1.3 布鲁氏菌 M5 ^{+gfp} MHC-免疫多肽复合物的获得..... | 52 |
| 6.1.4 布鲁氏菌 M5 ^{+gfp} 侵染 BMDC 后免疫多肽的筛选及鉴定..... | 53 |
| 6.2 创新点..... | 53 |
| 6.3 展望..... | 54 |
| 参考文献..... | 55 |

| | |
|-----------|----|
| 附录..... | 67 |
| 致谢..... | 93 |
| 作者简介..... | 94 |

部分缩写的中英文对照

| 英文缩写 | 英文全称 | 中文全称 |
|-------------|---|---------------------|
| DCs | Dendritic cells | 树突状细胞 |
| BMDC | Bone marrow-derived dendritic cells | 骨髓源性树突状细胞 |
| C β G | Cyclic β -1,2-glucan | 环状 β -1,2-葡聚糖 |
| LPS | Lipopolysaccharide | 脂多糖 |
| APC | Antigen presenting cell | 抗原递呈细胞 |
| TCR | T cell receptor | T 细胞受体 |
| CTL | Cytotoxic T lymphocytes | 细胞毒性 T 淋巴细胞 |
| MHC | Major histocompatibility complexes | 主要组织相容性复合体 |
| M5 | <i>Brucella melitensis</i> M5 | 布鲁氏菌疫苗株 M5 |
| Co-IP | Co-immunoprecipitation | 免疫共沉淀 |
| IP | Immunoprecipitation | 免疫沉淀 |
| β 2m | β 2 microglobulin | β 2 微球蛋白 |
| PBG | Peptide binding groove | 肽结合沟 |
| BCVs | Brucella-containing vacuoles | 布氏小体 |
| T4SS | Type IV secretion systems | T4SS 分泌系统 |
| Omps | Outer membrane proteins | 外膜蛋白 |
| SOD | Superoxidedismutase | 超氧化物歧化酶 |
| ROI | Reactive oxygen intermediate | 活性氧中间体 |
| PBS | Phosphate buffered solution | 磷酸盐缓冲液 |
| IL | Interleukin | 白细胞介素 |
| GM-CSF | Recombinant mouse granulocyte stimulating factor macrophage | 重组小鼠粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子 |
| IL-4 | Recombinant mouse interleukin-4 | 重组小鼠白介素 4 |
| rpm | Revolutions per minute | 每分钟转数 |
| h | Hour | 小时 |
| min | Minute | 分钟 |
| PAMPs | Pathogen-associated molecular patterns | 病原体相关分子模式 |
| SEM | Scanning Electron Microscope | 扫描电子显微镜 |
| TEM | Transmission Electron Microscope | 透射电子显微镜 |

第 1 章 文献综述

1.1 免疫多肽组及其研究进展

1.1.1 免疫多肽组的作用

肽类物质是由许多肽键连接的高度保守的生物活性分子，不同的肽类具有不同的理化性质和生物学活性，这些特点在多肽和蛋白质中表现得更为突出。因此，研究多肽的生物活性及其作用机理，成为生物学研究中的一个重要领域^[1]。多肽一般为疏水性小分子多肽，这些小肽通过与受体结合而被识别。由于肽没有复杂的二级结构和折叠方式，因此与其他蛋白质相比它在鉴定免疫识别方面具有更大的优势^[2]。肽段在细胞膜上与受体结合并通过肽链传递信号^[3]。

免疫多肽在机体免疫信号传递过程中起着举足轻重的作用。免疫多肽系指具有免疫原性的多肽或抗原衍生肽，分为内源性（癌细胞）或者外源性（病原菌）免疫多肽，两者在细胞内加工的部位、所结合的主要组织相容性复合体（Major histocompatibility complex, MHC）蛋白种类以及与 MHC 蛋白发生结合的区域都是截然不同的。加工过程中涉及的酶、细胞内转运过程中所需要的信号和伴随蛋白等也是不同的。它与 MHC 分子组装在一起，并呈递在抗原递呈细胞（Antigen presenting cell, APC）的表面，用于 T 细胞识别，T 细胞使用 T 细胞受体（T cell receptor, TCR）与这些 MHC-免疫多肽结合。因为 T 细胞表位决定了 T 细胞免疫反应的特异性，所以免疫多肽的筛选和鉴定是开发基于抗原肽的疫苗和免疫疗法的重要步骤^[4]。

在 2016 年，Mommen G P 等人^[5]从人骨髓单核细胞白血病细胞系中鉴定出近 14,000 个可以结合于三个人类 MHC 即人类白细胞抗原（Human leukocyte antigen, HLA）HLA-DR 同种异型蛋白分子上的抗原肽，这是目前鉴定出抗原肽最多的一个报道，其他关于与 MHC I/II 结合的抗原肽的分离鉴定报道分别出现在人、绵羊、鼠等研究对象中^[6, 7]。Weingarten-Gabbay S 等人^[8]研究发现 HLA-1 抗原肽不仅来源于常规意义的新冠抗原基因开放阅读框（Open Reading Frame, ORF），也来源于当前新冠疫苗未捕获的刺突和核衣壳的框架外 ORF。在人源化小鼠模型和 COVID-19 患者中，来自阅读框架外 ORF 的一些肽引发的 T 细胞反应超过了对常规抗原肽的反应，包括迄今为止报道的一些最强的表位。Chavda V P 等人^[9]在众多关于新冠抗原肽组研究的基础上，提出了新冠免疫多肽组学的概念。如上所述的许多研究表明，APC 所递呈的多肽绝不是来源于少数几个抗原蛋白，而是一系列内源性或者外源性的抗原蛋白质^[10]，从而形成了一个免疫多肽组。虽然

这个免疫多肽组如何全息性地表征病原体的抗原特征和致病特性，并专一性实现机体的免疫应答，目前还尚未可知。毋庸讳言，免疫多肽组的组学特征，即免疫多肽的组成成分、丰度以及免疫多肽与抗原蛋白的对应关系对机体免疫的专一性和高效性起重要作用。

1.1.2 免疫多肽组的研究进展

目前，通过组学技术，人们对哺乳动物 MHC 基因组成、结构及其多态性有了比较全面的认识，也对两类 MHC 蛋白的结构与功能有了更加深入的了解。与此同时，由于不断发展的质谱技术使我们能够更加详细地分析免疫多肽组，也就是在 APC 中病原体抗原逐步降解而形成的并与 MHC 蛋白相结合的一系列多肽，Stern L J 和 Santambrogio L 对二十多年来百余篇这方面的研究报道进行了比较全面而详细的总结^[11]。其中相关研究技术与成果的早期报道被连续发表在九十年代初的《Nature》和《Science》等杂志上，所有这些实验研究基本上都是以小鼠或人的脾脏或胸腺组织为实验材料，采用 HPLC-MS 或 HPCE-MS 技术分析淋巴细胞或 DC 中的 MHC I 和 II 免疫多肽组，其中包含的多肽数量 200-8000 不等，长度在 11-25aa 之间。为了证明这些多肽组的来源构成，有人通过 HLA-DR1 转基因小鼠体内实验，获得了 3000 个 MHC II 分子提呈的多肽分子，其中约 10% 是来自于相应的外源抗原蛋白，其余的则来自于胞外组织的重构、细胞的凋亡、细胞膜的编辑和补体或凝集因子的蛋白酶级联降解。由此可见，Stern L J 等人将此多肽组称为 MHC II immunopeptidome 也是非常准确的。

Stern L J 和 Santambrogio L 把 MHC II 免疫多肽组研究分为三类：一是内源和外源性抗原递呈相关的，二是来自淋巴细胞抗原递呈相关的，三是自噬过程相关的。在他们的综述文章里，基于 MHC II 免疫多肽组的研究，对抗原进行处理形成抗原肽的内体和非内体依赖途径、依赖和不依赖 DM 的抗原肽装载到 MHC 分子上的机制也进行了总结。也就是说，MHC II 免疫多肽组的研究不仅能够解释 MHC II 结合多肽的性质和种类，而且还能够说明这些抗原肽产生的机制及其与 MHC II 蛋白特异性结合的特点。不仅如此，他们在综述的结束语中写道“Continuing work is needed to elucidate how the MHC II peptidomes changes during inflammatory conditions.”。显而易见，MHC II 免疫多肽组的变化与感染免疫过程的关系已经引起从事相关研究学者的广泛注意。

1.1.3 布鲁氏菌免疫多肽组的研究意义及进展

布鲁氏菌病（简称“布病”）是最常见的细菌性人畜共患传染病，不仅会对人类健康造成巨大伤害，还会严重阻碍畜牧业的发展^[12]。新疆作为我国畜牧业大区，牲畜最高饲养量约 8500 万头（只）^[13]，但新疆畜牧业多年来一直受到布病的威胁和侵害，其发病率远大于中国平均水平。有研究数据表明，全球每年新增约 50 万布病病例，中国全

国范围内在 2015 年左右发病达到高峰^[14]，2015 年新疆累计报告发病 8997 例、发病率 39.74/10 万，位居全国第一，全疆 94 个县（市、区）有报告病例，覆盖率达 97.92%^[15]。到目前为止，布病依然是严重危害新疆牧区和农区农村和部分城市人类健康和畜牧业发展的重要人兽共患病。因此，研究布病的有效防治对于国民健康和新疆畜牧业的长远发展具有深远的意义。

目前对于布病的防治主要依靠接种疫苗，尽管近年来出现了很多新型布病疫苗，但由于其致病机制的复杂性，疫苗仍然存在干扰诊断、不能用于人类等缺点^[16]。因此，布鲁氏菌免疫多肽组的研究有利于我们更加清楚地了解它的致病机制，对于布病的防治具有重大意义，同时也为进一步探究 MHC I/II 结合的免疫多肽组的作用及其机制奠定基础。随着科学技术的不断进步，人们对 APC 表面的抗原提呈以及 MHC-抗原肽复合物的研究有了更加深入的了解^[17]，关于免疫多肽与 MHC 分子的识别结合及其筛选也成为了免疫学研究的热点之一。有研究表明^[18]，利用免疫磁珠沉淀法结合液相色谱联合质谱技术可以筛选出肿瘤细胞独有的 HLA-I 分子结合的新抗原肽。Pei M 等人^[19]通过蛋白质组和肽组分析在小鼠血液中鉴定出 35 种布鲁氏菌抗原肽，其中大多数肽具有高度保守性，突出了它们作为疫苗开发抗原表位的潜力。说明布鲁氏菌抗原肽组的研究已经开始引起关注。关于布鲁氏菌免疫多肽组的筛选及鉴定，目前未见相关报道。

1.2 MHC-免疫多肽复合物

T 细胞的激活是由 TCR 与其表位的相互作用触发的，表位是由 MHC 在 APC 表面呈递的肽。随着细胞介导的适应性免疫的开始，来自外来病原体的蛋白质片段被 MHC 使用其 $\alpha 1$ 和 $\alpha 2$ 螺旋之间的肽结合沟捕获^[20]。这些 MHC-免疫多肽复合物在 APC 表面表达，然后通过血管迁移到淋巴结，在那里它们遇到初始型 T 细胞从而使机体免疫反应激活^[21]。细胞毒性 T 淋巴细胞（Cytotoxic T lymphocytes, CTL）以及它的免疫反应在各种有颌脊椎动物属中很常见^[22]。常见的 CTL 包括 $CD8^+$ T 细胞，它仅识别 MHC I 类分子^[23]。MHC I 基因编码的 MHC I 类分子主要递呈来自细胞内病毒、寄生虫和肿瘤的抗原^[24]。如图 1-1 所示，MHC I 分子的结构研究表明，该复合体一般由 MHC I 重链、轻链 $\beta 2$ 微球蛋白（Light chain $\beta 2$ microglobulin, $\beta 2m$ ）和特异性结合肽（一般为 9-11 肽）组成^[25]。MHC I 在其细胞外区域包含 $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 和 $\alpha 3$ 结构域，其中 $\alpha 1$ 和 $\alpha 2$ 结构域形成 MHC I 肽结合沟（Peptide binding groove, PBG）^[26, 27]。免疫多肽-MHC I- $\beta 2m$ 复合物与 TCR 之间的相互作用形成抗原特异性 $CD8^+$ T 细胞激活的第一个信号^[28]。MHC II 类分子的生理功能是将外源性抗原呈递给 TCR 以供 $CD4^+$ T 细胞识别、诱导细胞因子分泌以产生抗体和免疫系统调节^[29, 30]。人类和小鼠中经典 MHC II 分子的结构已得到很好的表征^[31, 32]。MHC II 复合物由一条 α 链和一条 β 链形成。每个链（ α 和 β ）由两个域组成， $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 和 $\beta 1$ 、 $\beta 2$ ^[33]，