



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102875666 A

(43) 申请公布日 2013. 01. 16

(21) 申请号 201210326454. 9

(22) 申请日 2012. 09. 05

(71) 申请人 南方医科大学

地址 510515 广东省广州市白云区沙太南路  
1023 号

(72) 发明人 马骊 姜振民 罗微 温茜

(74) 专利代理机构 广州嘉权专利商标事务所有  
限公司 44205

代理人 张海文

(51) Int. Cl.

*C07K 14/725* (2006. 01)

*C12N 15/12* (2006. 01)

*C12N 15/867* (2006. 01)

*C12N 5/10* (2006. 01)

*A61K 38/17* (2006. 01)

*A61K 48/00* (2006. 01)

*A61P 31/06* (2006. 01)

权利要求书 1 页 说明书 12 页

序列表 11 页 附图 5 页

(54) 发明名称

一种结核抗原特异性 TCR、其重组逆转录病毒载体与应用

(57) 摘要

本发明公开了一种结核抗原特异性 TCR、其重组逆转录病毒载体与应用。本发明成功筛选出筛选出结核 38kDa 抗原特异的 TCR, 利用逆转录病毒载体将其转染到 iNKT 细胞中, 获得表达结核特异 TCR 的 iNKT 细胞, 该 iNKT 细胞可成功表达外源性 TCR 基因, 特异性识别结核 38kDa 抗原并介导 IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$  细胞因子分泌和细胞毒活性, 具有结核病基因治疗的应用价值, 可为结核病的过继细胞免疫治疗开辟新径。

1. 一种结核抗原特异性 T 细胞受体 (TCR), 包括  $\alpha$  链和  $\beta$  链, 其中,  $\alpha$  链的 CDR3 区含有 SEQ ID NO: 3 所述的序列;  $\beta$  链的 CDR3 区含有 SEQ ID NO: 4 所示的序列。
2. 根据权利要求 1 所述的结核抗原特异性 TCR, 其特征在于,  $\alpha$  链是由 SEQ ID NO: 8 所示的氨基酸序列经取代、缺失和 / 或增加一个或多个氨基酸和 / 或经末端修饰后所得到的能特异与外源性  $\beta$  链装配成 TCR 蛋白分子的氨基酸序列;  $\beta$  链是由 SEQ ID NO: 6 所示的氨基酸序列经取代、缺失和 / 或增加一个或多个氨基酸和 / 或经末端修饰后所得到的能特异与外源性  $\alpha$  链装配成 TCR 蛋白分子的氨基酸序列。
3. 根据权利要求 2 所述的结核抗原特异性 TCR, 其特征在于, 所述  $\alpha$  链的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 12 所示,  $\beta$  链的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 10 所示。
4. 编码权利要求 1~3 任一项所述 TCR 的基因。
5. 一种结核抗原特异性 TCR 的融合基因, 其序列如 SEQ ID NO: 13 所示。
6. 一种重组逆转录病毒载体, 含有权利要求 4 或 5 所述的基因。
7. 根据权利要求 6 所述的重组逆转录病毒载体, 其特征在于, 出发载体包括 pMX-IRES-GFP、pMCs-IRES-GFP 或 pMYx-IRES-GFP。
8. 权利要求 6 或 7 所述的重组逆转录病毒载体经包装后得到的逆转录病毒。
9. 权利要求 8 所述的逆转录病毒转染的 iNKT 细胞。
10. 权利要求 1~3 任一项所述的结核抗原特异性 TCR、权利要求 4 或 5 所述的基因, 权利要求 6 或 7 所述的重组逆转录病毒载体、权利要求 8 所述的逆转录病毒、权利要求 9 所述的逆转录病毒转染的 iNKT 细胞在制备抗结核病药物中的应用。

## 一种结核抗原特异性 TCR、其重组逆转录病毒载体与应用

### 技术领域

[0001] 本发明属于生物工程领域,具体涉及一种结核抗原特异性 T 细胞受体(TCR),以及利用该 TCR 制备得到的一种用于结核基因治疗的逆转录病毒载体,逆转录病毒载体转染得到的 iNKT 细胞及其在制备抗结核病药物中的应用。

### 背景技术

[0002] 结核是全球范围内感染率最高的传染病,病死率仅次于艾滋病。近年来,随着人口流动的增加、HIV 与结核菌伴发感染、以及耐药和多重耐药菌株的流行,使全球结核病死灰复燃,呈现卷土重来之势。据 WHO 统计报告,全世界有 1/3 人口受到结核菌感染,结核病患者达 2000 万,每年新发病人数 800-1000 万、因结核病死亡人数 300 万。我国是世界上 22 个结核病高负担国家之一,结核病患者人数高居全球第二,目前结核菌感染人数已超过 6 亿,结核病患者达 600 万之多,每年新发病人数 150 万、因结核病死亡人数 25 万,全国肺结核报告发病人数和死亡人数一直高居各种传染病之首。

[0003] 目前结核病治疗仍以化疗为主,但存在疗程长、毒副作用大等缺点,降低了病人服药遵从性,病人不规则服药、自行停药、选择性服药等都可能提高结核杆菌耐药的机率,耐药菌的产生是导致结核难治的根本原因,单一调整化疗方案效果有限;而且化疗无法解决因机体免疫力低下或缺陷引起的内源性复燃和外源性再感染。因此,开创新的有效的治疗方法已成为当务之急!

结核杆菌属于胞内寄生菌,机体内结核杆菌的清除需要固有免疫和适应性免疫共同作用。iNKT 细胞是 T 细胞的亚群之一,是天然免疫应答和适应性免疫应答的桥梁,在结核感染的早期免疫反应中起重要作用。iNKT 细胞能通过分泌细胞因子 IFN- $\gamma$  调节巨噬细胞发挥抗结核作用,也能通过分泌 TNF- $\alpha$  和 GrB 发挥细胞毒作用。iNKT 细胞还参与肉芽肿的形成,抑制结核杆菌的扩散。然而,在结核小鼠模型中研究证实 iNKT 细胞的增殖能力减弱、免疫活性下降。在活动性肺结核患者体内也发现 iNKT 细胞数量下降、功能被抑制。因此,在结核感染早期改善 iNKT 细胞的功能,通过调节天然免疫和适应性免疫应答,有利于控制结核感染,可能成为一种有前景的替代免疫治疗策略。

[0004] 目前利用 iNKT 细胞进行结核免疫治疗的研究已经开展。将 iNKT 细胞过继免疫输注到结核小鼠中,发现小鼠肺组织内结核杆菌数量显著减少、肺部损伤明显减轻。向结核小鼠模型中注射 iNKT 细胞的激活剂 KRN7000 发现结核小鼠肺部 IFN- $\gamma$  分泌增多、小鼠存活时间显著延长。然而,结核患者体内起源的 iNKT 细胞功能受损,体外扩增困难,限制了其在过继细胞免疫治疗领域的临床应用。

[0005] T 细胞抗原受体(T cell receptor, TCR)是所有 T 细胞表面的特征性标志,在 T 细胞抗原识别中起关键作用。TCR 是由  $\alpha$ 、 $\beta$  两条肽链构成的异二聚体,每条肽链又可分为可变区(V 区),恒定区(C 区),跨膜区和胞质区等几部分;其胞质区很短,信号传递主要通过与其以非共价键结合的 CD3 分子进行。TCR 分子属于免疫球蛋白超家族,其抗原特异性存在于 V 区;V 区(V $\alpha$ 、V $\beta$ )又各有三个高变区 CDR1、CDR2、CDR3,其中以 CDR3 变异最大,直

接决定了 TCR 的抗原结合特异性。在 TCR 识别 MHC- 抗原肽复合体时,CDR1、CDR2 识别和结合 MHC 分子抗原结合槽的侧壁,而 CDR3 直接与抗原肽相结合。

[0006] 根据 TCR V $\alpha$ 、V $\beta$  基因的同源性,可将 80 多个 TCR V $\alpha$  基因分为 32 个家族、60 多个 TCR V $\beta$  基因分为 24 个家族。利用每个 T 细胞克隆均有其独特 CDR3 序列的特点,采用 CDR3 谱型分析技术,可测定各 TCR 家族各 CDR3 出现的频率,由此反映 T 细胞的克隆性。未接受抗原刺激的 T 细胞中,针对各种抗原的 T 细胞克隆分布均匀,表现为多家族和多克隆性,具体地,表现为各家族均出现呈高斯分布的约 8 个 CDR3 峰;抗原刺激则引起识别该抗原的某一个或几个特异 TCR 家族 T 细胞反应性增生,表现为该家族 CDR3 成员出现少于 4 个峰的寡克隆或单克隆分布,其中具有单克隆 CDR3 分布(表现为单峰)的 TCR 家族即是抗原特异单克隆增生的 TCR 家族。对该家族 PCR 产物进行测序,可获得抗原特异 TCR CDR3 序列。

## 发明内容

[0007] 本发明的目的在于:筛选出结核 38kDa 抗原特异的 TCR,利用逆转录病毒载体将其转染到 iNKT 细胞中,获得表达结核特异 TCR 的 iNKT 细胞,以及该经过 TCR 基因修饰的 iNKT 细胞在制备抗结核病药物中的应用。

[0008] 本发明所采用的技术方案是:

一种结核抗原特异性 T 细胞受体(TCR),包括  $\alpha$  链和  $\beta$  链,其中, $\alpha$  链的 CDR3 区含有 SEQ ID NO: 3 所述的序列; $\beta$  链的 CDR3 区含有 SEQ ID NO: 4 所示的序列。

[0009] 优选的,上述结核抗原特异性 TCR 的  $\alpha$  链是由 SEQ ID NO: 8 所示的氨基酸序列经取代、缺失和 / 或增加一个或多个氨基酸和 / 或经末端修饰后所得到的能特异与外源性  $\beta$  链装配成 TCR 蛋白分子的氨基酸序列; $\beta$  链是由 SEQ ID NO: 6 所示的氨基酸序列经取代、缺失和 / 或增加一个或多个氨基酸和 / 或经末端修饰后所得到的能特异与外源性  $\alpha$  链装配成 TCR 蛋白分子的氨基酸序列。

[0010] 优选的,上述结核抗原特异性 TCR 的  $\alpha$  链的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 12 所示, $\beta$  链的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 10 所示。

[0011] 编码上述 TCR 的基因。

[0012] 一种结核抗原特异性 TCR 的融合基因,其序列如 SEQ ID NO: 13 所示。

[0013] 一种重组逆转录病毒载体,含有编码 SEQ ID NO: 10 和 SEQ ID NO: 12 所示氨基酸序列的基因。

[0014] 一种重组逆转录病毒载体,含有 SEQ ID NO: 13 所示的基因。

[0015] 优选的,上述重组逆转录病毒载体的出发载体为 pMX-IRES-GFP、pMCs-IRES-GFP 或 pMYx-IRES-GFP。

[0016] 上述重组逆转录病毒载体经包装后得到的逆转录病毒。

[0017] 上述逆转录病毒转染的 iNKT 细胞。

[0018] 结核抗原特异性 TCR、其编码基因,含有该基因的重组逆转录病毒载体、逆转录病毒、所述的逆转录病毒转染的 iNKT 细胞在制备抗结核病药物中的应用。

[0019] 实现上述技术方案的具体步骤流程如下:

1、筛选出结核抗原特异的 TCR

① 淋巴细胞分离液分离健康志愿者外周血单个核细胞(PBMC);

- ② 贴壁法获取树突状细胞(dendritic cells, DC), IL-4 和 GM-CSF 诱导 DC 成熟;
- ③ 磁珠分选出 CD8<sup>+</sup> T 细胞;
- ④ 38kDa 抗原负载 DCs 对 CD8<sup>+</sup> T 细胞进行三轮刺激, 诱导抗原特异 CD8<sup>+</sup> T 细胞发生克隆扩增;
- ⑤ 提取 CD8<sup>+</sup> T 细胞 mRNA, 逆转录为 cDNA;
- ⑥ 利用基因扫描(GeneScan)监测刺激前后 CDR3 谱型变化, 找出刺激后单克隆扩增的抗原特异的 CD8<sup>+</sup> T 细胞 TCR 基因家族。

#### [0020] 2、构建重组逆转录病毒载体

① 根据 GeneBank 报道的人  $\alpha$ 、 $\beta$  基因家族可变区(variable region, V)和恒定区(constant region, C)基因序列, 设计  $\alpha$ 、 $\beta$  链基因全长序列引物, 扩增特异性 TCR  $\alpha$ 、 $\beta$  全长基因;

② 采用本实验室已经构建好的最小鼠源化 C 区(minimum murinized C region, 简称为 mC。包括 mC $\alpha$  和 mC $\beta$ , 其中共 9 个氨基酸被鼠 C 区相应位点的氨基酸替换)分别替换  $\alpha$ 、 $\beta$  全长基因 C 区(参照文献:Luo W. et al. Development of genetically engineered CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T-cells expressing TCRs specific for a 38 kDa M. tuberculosis antigen. J Mol Med. 2011, 89(9):903-13)。鼠源化突变的目的在于减少内外源性 TCR  $\alpha$ 、 $\beta$  链的错配, 因为 iNKT 细胞存在内源性 TCR  $\alpha$ 、 $\beta$  基因的表达, 通过突变可以促使外源性  $\alpha$  与  $\beta$  基因表达的蛋白正确装配成 TCR 蛋白分子并稳定表达在 iNKT 细胞表面, 并利于其竞争结合 iNKT 细胞表面的 CD3 分子, 增强信号传导功能, 提高修饰后 iNKT 细胞的抗结核活性。当然, 此处还可以采取其他策略来减少内外源性 TCR  $\alpha$ 、 $\beta$  链的错配, 如: 以 CD3  $\zeta$  链替换  $\alpha$ 、 $\beta$  全长基因部分 C 区(Sebestyen, Z. et al. (2008) Human TCR that incorporate CD3{zeta} induce highly preferred pairing between TCR{alpha} and {beta} chains following gene transfer. J. Immunol. 180, 7736 - 7746); 在外源性  $\alpha$ 、 $\beta$  基因 C 区引入二硫键(Boulter, J.M. et al. (2003) Stable, soluble T-cell receptor molecules for crystallization and therapeutics. Protein Eng. 16, 707 - 711); 突变外源性  $\alpha$ 、 $\beta$  基因 C 区关键氨基酸以改变  $\alpha$ 、 $\beta$  链之间的静电荷(Voss, R.H. et al. (2008) Molecular design of the Cab interface favors specific pairing of introduced TCRab in human T cells. J. Immunol. 180, 391 - 401); 将外源性  $\alpha$ 、 $\beta$  基因 V 区合并为一条单链 TCR 并与 CD3  $\zeta$  链融合(Willemsen, R.A. et al. (2000) Grafting primary human T lymphocytes with cancer-specific chimeric single chain and two chain TCR. Gene Ther. 7, 1369 - 1377); 利用 2A 连接外源性  $\alpha$ 、 $\beta$  基因实现平衡表达(Leisegang M, Engels B, Meyerhuber P, Kieback E, Sommermeyer D, Xue SA, Reuss S, Stauss H, Uckert W. Enhanced functionality of T cell receptor-redirectioned T cells is defined by the transgene cassette. J Mol Med. 2008, 86:573-583。)等。

[0021] ③ 利用重组 PCR 技术, 将已经最小突变 TCR  $\alpha$ 、 $\beta$  基因通过自剪切多肽 2A 连接, 并克隆至 pGEM-T 载体测序鉴定。

[0022] ④ 将测序正确的  $\alpha$ 、 $\beta$  全长基因插入逆转录病毒载体 pMX-IRES-GFP, 酶切鉴定;

⑤ 采用磷酸钙转染法, 包装逆转录病毒, 低温差速离心法浓缩病毒;

⑥ 重组逆转录病毒转染 NIH-3T3 细胞, 利用流式细胞术测定病毒感染 NIH3T3 细胞 GFP

的表达量,计算重组逆转录病毒滴度。计算公式:病毒感染滴度(IU/ml)=NIH3T3 细胞总数 × GFP 阳性率 / 病毒浓缩液量(ml)。

### [0023] 3、鉴定重组逆转录病毒转染的 iNKT 细胞的抗结核活性

① 采用 Ficol1 密度梯度离心法,分离健康志愿者外周血 PBMC, IL-2 和 KRN7000 扩增 iNKT 细胞;

② 磁珠分选 iNKT 细胞;

③ 逆转录病毒空载体 pMX-IRES-GFP 转染 iNKT 细胞,流式细胞术检测转染效率,确定最佳感染复数(multiplicity of infection, MOI);

④ 以最佳 MOI 将重组逆转录病毒 pMX-β-2A-α-IRES-GFP 转染 iNKT 细胞;

⑤ 利用 APC 荧光标记的小鼠抗人 TCR 单抗,流式细胞术检测结核抗原特异 TCR 阳性细胞百分比;

⑥ 以 APC 荧光标记的小鼠抗人 TCR 单抗进行免疫荧光染色,同时以 PI 荧光染料染细胞核,激光共聚焦显微镜下观察 iNKT 细胞表面结核特异 TCR 的表达;

⑦ 按不同效靶比(effector:target,E:T),将 TCR 基因修饰 iNKT 细胞与负载 38kDa 的 DC 混合培养,以未转染和空载体转染的 iNKT 细胞为阴性对照,以鸡卵白蛋白(ovalbumin, OVA)和 ESAT-6 (early secreted antigenic target,6kDa)为非特异性抗原对照;

⑧ 酶联免疫吸附分析法(ELISA)检测不同时间点 iNKT 细胞培养上清中 IFN-γ、TNF-α、GrB 的分泌水平;

⑨ 利用时间分辨荧光免疫分析(TRFIA)技术,检测 TCR 基因修饰 iNKT 细胞对负载 38kDa 抗原 DC 的杀伤活性。

[0024] 其中,iNKT 细胞是人体内的一种细胞亚群,可由人外周血中分离获得,并进行体外扩增培养,分离和培养的实验设备要求低,技术成熟。

[0025] 逆转录病毒载体是由某种逆转录病毒序列构建的基因运载工具,能够携带外源基因或 DNA 进入宿主细胞,并整合到染色体基因组上,目前已成为商业化产品,容易购买和获得。

[0026] 重组逆转录病毒载体的构建方法为本领域常用的分子克隆技术,重组逆转录病毒转染方法是目前常用的生物技术手段,除本发明中使用的磷酸钙法外,还可以使用其它化学转染法,包括:DEAE-葡聚糖法、人工脂质体法;以及物理方法,包括:显微注射、电穿孔、基因枪等。

[0027] 本发明的有益效果在于:

本发明成功筛选出结核 38kDa 抗原特异的 TCR,携带该结核抗原特异 TCR 基因的逆转录病毒转染的 iNKT 细胞可成功表达外源性 TCR 基因,特异性识别结核 38kDa 抗原并介导 IFN-γ、TNF-α 细胞因子分泌和细胞毒活性,具有结核病基因治疗的应用价值,可为结核病的过继细胞免疫治疗开辟新径。

### 附图说明

[0028] 图 1 结核 38kDa 抗原刺激前后 CD8<sup>+</sup> T 细胞 TCR α 和 β 链 CDR3 谱型分析;

图 2 重组逆转录病毒载体 pMX-hV β 5mC β -2A-hV α 9mC α -IRES-GFP 构建示意图;

图 3 pMX-hV β 5mC β -2A -hV α 9mC α -IRES-GFP 的酶切鉴定(M. DL15000 marker ;1.

pMX-hV $\beta$  5mC $\beta$ -2A-hV $\alpha$  9mC $\alpha$ -IRES-GFP; 2. pMX-hV $\beta$  5mC $\beta$ -2A-hV $\alpha$  9mC $\alpha$ -IRES-GFP 的 HindIII 酶切产物; 3. pMX-hV $\beta$  5mC $\beta$ -2A-hV $\alpha$  9mC $\alpha$ -IRES-GFP 的 EcoRI+XhoI 双酶切产物; 4. pMX-hV $\beta$  5mC $\beta$ -2A-hV $\alpha$  9mC $\alpha$ -IRES-GFP 的 XhoI+HindIII 双酶切产物);

图 4 荧光显微镜观察重组病毒转染后 NIH3T3 细胞 GFP 的表达 ( $\times 20$ ) (a. 荧光; b. 明场; c. 叠加图)

图 5 流式细胞术检测重组病毒转染后 NIH3T3 细胞的 GFP 表达阳性率 (a. 未转染; b. pMX-IRES-GFP; c. pMX-hV $\beta$  5mC $\beta$ -2A-hV $\alpha$  9mC $\alpha$ -IRES-GFP)

图 6 流式细胞术检测 iNKT 细胞 (左图: 同型对照抗体 IgG1-PE 标记; 右图: 抗人 V $\alpha$  24-PE 抗体标记);

图 7 流式细胞术检测重组病毒转染后 iNKT 细胞 GFP 的表达;

图 8 激光共聚焦显微镜下观察 iNKT 细胞表面结核特异 TCR 的表达 (左图: 同型对照抗体 IgG1-APC 标记; 右图: 抗人 TCR-V $\beta$  5-APC 单抗标记)。

[0029] 图 9 流式细胞术检测表达结核抗原特异 TCR 的阳性细胞率 (左图: 同型对照抗体 IgG1-APC 标记; 右图: 抗人 TCR-V $\beta$  5-APC 抗体标记);

图 10 ELISA 检测不同效靶比与时间点 iNKT 细胞 IFN- $\gamma$  的分泌水平;

图 11 ELISA 检测不同效靶比与时间点 iNKT 细胞 TNF- $\alpha$  的分泌水平;

图 12 ELISA 检测不同效靶比与时间点 iNKT 细胞 GrB 的分泌水平;

图 13 TRFIA 检测不同效靶比时 iNKT 细胞的杀伤活性。

## 具体实施方式

[0030] 下面结合实施例对本发明作进一步的说明,但并不局限于此。

[0031] 以下实施例中未注明具体条件的实验方法,按照常规条件操作,例如 Sambrook 等编著的《分子克隆实验指南》(第三版)(Sambrook J, Russell DW, Janssen K, Argentine J. 黄培堂等译,2002,北京:科学出版社)中所述的条件,或按照制造厂商所建议的条件。

[0032] 以下实施例中,所有计量资料结果用  $\pm s$  表示,采用单因素方差分析(One-Way ANOVA)比较各组间细胞因子 IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$  分泌水平的差异,方差不齐时用 Welch 校正,采用 LSD 法进行各组间两两比较,方差不齐时采用 Dunnett's T3 法校正。检验水准  $\alpha = 0.05$ , 双侧检验。采用 SPSS17.0 for windows 统计软件包进行数据分析。

## 实施例

[0033] 1. 筛选出结核 38kDa 抗原特异的 TCR

### 1.1 密度梯度离心法分离纯化 PBMC

(1) 在 15ml 刻度无菌离心管加入适量 Ficol1 淋巴细胞分离液;

(2) 取肝素抗凝的外周静脉血与等量 RPMI 1640 液充分混匀稀释,用巴斯德滴管吸取 2 倍体积的抗凝血沿管壁缓慢叠加于淋巴细胞分离液上,注意保持界面完整。18~20 $^{\circ}$  C, 1800~2000rpm/min 水平离心 20~30min;

(3) 离心后管内液体分为四层,上层为血浆和稀释液,管底主要为红细胞和粒细胞层。中层为淋巴细胞分离液,在上、中层界面处有一以单个核细胞为主的灰白色云雾层;

(4) 用吸管插到淋巴细胞分离液界面上的灰白色细胞层,吸取单个核细胞,置于另一

离心管内,加入 5 倍以上体积的 RPMI 1640 液,18~20° C,1500rpm/min 离心 10min,洗涤细胞两次去除大部分混杂的血小板后为 PBMC;

(5) 细胞计数及细胞活力检测:PBMC 悬液与 1/10 体积的 0.4% 台盼蓝染液混合,于血球计数板上计数板上角上四个大方格总细胞数,总细胞数的四分之一数乘以  $10^4$  即为每毫升浓度;死细胞可着色台盼蓝,活的不着色,计数 200 个淋巴细胞,计算活细胞百分率[活细胞率%=(活细胞数/总细胞数)×100%]。

#### [0034] 1.2 DC 诱导及负载结核分枝杆菌 38kDa 抗原

(1) PBMC 用 10% FBS-RPMI 1640 培养基于 37° C、5% CO<sub>2</sub> 孵箱中培养 1.5h;

(2) 吸出上清 PBMC 换孔培养,加入含 IL-2 100U/ml、抗 CD3 单抗 30ng/ml 的 10% FBS-1640 培养基,备用;

(3) DC 用预温培养基轻轻漂洗两次,加入含 GM-CSF 100ng/ml、IL-4 100ng/ml 的 10% FBS-1640 培养基;

(4) 第 2、4、6 天,对 DC 培养物进行半量换液;

(5) 第 7 天,弃上清,换以含 TNF- $\alpha$  20ng/ml、38kDa 10 $\mu$ g/ml 的 10% FBS-1640 培养基 5ml;

#### 1.3 刺激出结核分枝杆菌 38kDa 抗原特异 T 细胞克隆

(1) DC 培养第 8 天,分别计数负载 38kDa 的 DC 和 PBMC,按 1:10 将两者混合培养,加入 10ng/ml IL-7;

(2) 混合培养后第 3、6 天,半量换液,并补加 50U/ml IL-2,继续培养;

(3) 以 5 天为一轮,重复上述步骤,进行 3 轮刺激。

#### [0035] 1.4 免疫磁珠(德国美天旆生物公司)分选 CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup> T 细胞。

#### [0036] 1.5 总 RNA 提取试剂盒(OMEGA)提取上述收集到的细胞沉淀的总 RNA。

#### [0037] 1.6 逆转录(RT)试剂盒(Fermentas)合成 cDNA。

#### [0038] 1.7 PCR 扩增 34 个 TCR V $\alpha$ 基因家族 CDR3 片段(参照文献:XIN-SHENG 等,2006, Clinical & Laboratory Haematology, 28: 405-415. doi: 10.1111/j.1365-2257.2006.00827.x)

利用 34 个 TCR V $\alpha$  家族特异性上游引物和共用下游 C $\alpha$  外、内侧引物做半巢式 PCR:

第一轮 PCR:每样本做 34 PCR 反应管,第 1~34 管分别加入 TCR V $\alpha$  1 至 V $\alpha$  34 家族上游引物,每管加下游共用 C $\alpha$  外侧引物 1 $\mu$ l,各引物浓度均为 10 $\mu$ M。每 PCR 反应管体积为 25 $\mu$ l,含 cDNA 模板 1.0 $\mu$ l,10mmol/L dNTP 0.5 $\mu$ l,10 $\times$ Buffer 2.5 $\mu$ l,25mmol/L MgCl<sub>2</sub> 1.5 $\mu$ l, Taq DNA 聚合酶 0.625U。PCR 反应条件:95° C 预变性 3min;95° C 30s,60° C 30s,72° C 1min,35 个循环;72° C 延伸 10min。

第二轮 PCR:反应总体积为 25 $\mu$ l,含第一轮 PCR 产物 2 $\mu$ l,10mmol/L dNTP 0.5 $\mu$ l,10 $\times$ Buffer 2.5 $\mu$ l,25mmol/L MgCl<sub>2</sub> 1.5 $\mu$ l, Taq DNA 聚合酶 0.625U, TCR V $\alpha$  34 个家族上游引物 1 $\mu$ l,下游 FAM 标记内侧 C $\alpha$  引物 1 $\mu$ l,各引物浓度均为 10 $\mu$ M。PCR 反应条件:95° C 2min;60° C 2min,72° C 10min,4 个循环。

#### [0039] 1.8 PCR 扩增 24 个 TCR V $\beta$ 基因家族 CDR3 片段(参照文献:XIN-SHENG 等,2006, Clinical & Laboratory Haematology, 28: 405-415. doi: 10.1111/j.1365-2257.2006.00827.x):



每样本做 24 个 PCR 反应管,每管加入 TCR C $\beta$ -FAM 下游引物 0.8  $\mu$ l,第 1 至第 24 管分别加入 TCR V $\beta$  1 至 TCR V $\beta$  24 上游引物 0.8  $\mu$ l,各引物浓度均为 10  $\mu$ M。PCR 反应体积为 25  $\mu$ l,含 cDNA 模板 1  $\mu$ l,10mmol/L dNTP 0.5  $\mu$ l, 10 $\times$ Buffer 2.5  $\mu$ l,25mmol/L MgCl<sub>2</sub> 1.5  $\mu$ l,Taq DNA 聚合酶 0.625U。PCR 反应条件:94 $^{\circ}$  C 变性 3min;94 $^{\circ}$  C 1min,55 $^{\circ}$  C 1min,72 $^{\circ}$  C 1min,35 个循环;72 $^{\circ}$  C 延伸 10min。

#### [0040] 1. 9 琼脂糖凝胶电泳

取 34 个 TCR V $\alpha$  和 24 个 TCR V $\beta$  基因家族 PCR 产物各 8  $\mu$ l,2% 琼脂糖凝胶电泳,100V,20min,采用凝胶成像系统照相。剩余 PCR 产物 -20 $^{\circ}$  C 保存备用。

#### [0041] 1. 10 CDR3 谱型分析

取 34 个 V $\alpha$ 、24 个 V $\beta$  基因家族 FAM 荧光标记 PCR 产物 2  $\mu$ l,在 373DNA 序列分析仪 (ABI, Perkin Elmer) 上进行 6% 聚丙烯酰胺凝胶电泳,收集电泳过程中不同时间出现的不同强度的荧光信号,GeneScan 672 软件自动分析收集的数据,转换为不同位置、高度和形态的峰,代表各 TCR 家族 CDR3 成员出现的频率,由此反映各 TCR 家族的克隆性。其中,具有单峰分布的 TCR 家族即是抗原特异性单克隆增生的 TCR 家族。

[0042] CDR3 谱型分析结果显示,结核分枝杆菌 38kDa 抗原刺激 CD8<sup>+</sup> T 细胞后,部分 TCR 基因家族谱型发生改变,由原来的 8 个或多于 8 个峰型的高斯分布变为少于 8 个峰的单寡峰分布,表明这些家族是由于 38kDa 抗原持续刺激引起的寡克隆或单克隆增生。比较刺激前后 CDR3 谱型的变化,找出刺激前为多克隆,刺激后呈单克隆扩增的 V $\alpha$  9、V $\beta$  5 基因家族 (见图 1)。

[0043] 测序结果显示,TCR  $\alpha$  9、 $\beta$  5 基因的 CDR3 序列分别如 SEQ ID NO: 1 和 SEQ ID NO: 2 所示,这两条 CDR3 序列编码的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 3 和 SEQ ID NO: 4 所示。

#### [0044] 2. 构建重组逆转录病毒载体 (构建流程见图 2)

##### 2.1 合成引物

依据 GeneBank 报道的 V $\alpha$  9、V $\beta$  5 基因家族 V 区序列特点,设计全长基因上、下游引物,依据人 C 区 9 个关键氨基酸突变后的序列 (即 mC $\alpha$  与 mC $\beta$ ) 分别设计上、下游引物,依据 2A 肽连接序列设计引物,全部引物由 Invitrogen 上海英骏生物技术有限公司合成,引物名称和序列 (5' to 3') 如下:

Primers	Sequences (5' to 3')
P1 V $\beta$ 5 sense	CCGGAATTCATGGGCTCCAGGCTGCTCTGTTGGGTGCTGCTTTG SEQ ID NO: 14)
P2 mC $\beta$ -antisense	CTTGTTTCAGGTCTCTACAACCTGTGAGTCTGGTGCCCTTGT (SEQ ID NO: 15)
P3 mC $\beta$ -sense	AGACTCACAGTTGTAGAGGACCTGAACAAGGTGTTCCCAC (SEQ ID NO: 16)
P4 mC $\beta$ -2A antisense	CTTCCACGTCTCCTGCTTGCTTTAAACAGAGAGAAGTTCGTGGCTCCGGAGCCGA AATCCTTTCTCTTGACCATGGCCAT (SEQ ID NO: 17)
P5 2A-V $\alpha$ 9 sense	CGAACTTCTCTCTGTTAAAGCAAGCAGGAGACGTGGAAGAAAACCCCGGTCCCA TGTGGGGAGCTTTCCTTCTCTATGT (SEQ ID NO: 18)
P6 mC $\alpha$ -5' antisense	GTCAGGGTCTGGATATTTGCAATCACAGAAAGTCTTGTTG (SEQ ID NO: 19)
P7 mC $\alpha$ -5' sense	TCTGTGATTGCAAATATCCAGAACCCTGACCCTGCCGTGT (SEQ ID NO: 20)
P8 mC $\alpha$ -3' antisense	CCGCTCGAGTCAGCTGGACCACAGCCGCAGCGTCATGAGCAG (SEQ ID NO: 21)
P9 C $\beta$ antisense	CCGCTCGAGTCAGAAATCCTTTCTCTTGACCATGGCCATCAACAC (SEQ ID NO:22)
P10 C $\alpha$ antisense	CATGCCATGGGCTGGACCACAGCCGCAGCGTCATGAGCAGATT (SEQ ID NO: 23)

## 2.2 重组 PCR 扩增 hV $\beta$ 5mC $\beta$ -2A-hV $\alpha$ 9mC $\alpha$ 融合全长基因

(1) 以步骤 1.6 制备的 cDNA 为模板,利用引物 P1 和 P9, Pfu DNA 聚合酶, PCR 扩增 hV $\beta$ 5hC $\beta$  全长基因序列(核苷酸序列如 SEQ ID NO: 5 所示,其所编码的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 6 所示)。

[0045] (2) 以 hV $\beta$ 5hC $\beta$  全长基因序列(SEQ ID NO: 5)为模板,利用引物 P1 和 P2, Pfu DNA 聚合酶, PCR 扩增 hV $\beta$ 5 区及 mC $\beta$  上突变位点之前的序列(S1 :hV $\beta$ 5 区)。

[0046] (3) 以含本实验室已经构建好的最小鼠源化 C 区(mC)的质粒 pMX-mmTCR $\beta$ 8-P2A-mmTCR $\alpha$ 3-IRES-GFP (具体序列与构建方法参见文献:Luo W. et al. J Mol Med. 2011, 89(9):903-13)为模板,利用引物 P3 和 P4, Pfu DNA 聚合酶, PCR 扩增 mC $\beta$  区及 5'端 P2A 序列(S2 :mC $\beta$ -5' 端 P2A 区)。

[0047] (4) 以步骤 1.6 制备的 cDNA 为模板,利用引物 P5 和 P10, Pfu DNA 聚合酶, PCR 扩增 hV $\alpha$ 9hC $\alpha$  全长基因序列(核苷酸序列如 SEQ ID NO: 7 所示,其所编码的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 8 所示)。

[0048] (5) 以 hV $\alpha$ 9hC $\alpha$  全长基因序列(SEQ ID NO: 7)为模板,利用引物 P5 和 P6, Pfu DNA 聚合酶, PCR 扩增含 3' 端 P2A、hV $\alpha$ 9 区及 5' 端 mC $\alpha$  的序列(S3 :3' 端 P2A-hV $\alpha$ 9 区)。

[0049] (6) 以含本实验室已经构建好的最小鼠源化 C 区(mC)的质粒

pMX-mmTCR $\beta$  8-P2A-mmTCR $\alpha$  3-IRES-GFP 为模板,利用引物 P7 和 P8,Pfu DNA 聚合酶,PCR 扩增 mC $\alpha$  区(S4 ;mC $\alpha$  区)。

[0050] (7) 以步骤 (2) 得到的 S1 和步骤 (3) 得到的 S2 作为模板,利用引物 P1 和 P4,Pfu DNA 聚合酶,重组 PCR 扩增 hV $\beta$  5mC $\beta$  -5' 端 P2A 序列 S5 (其中 hV $\beta$  5mC $\beta$  段的序列如 SEQ ID NO: 9 所示,其所编码的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 10 所示)。

[0051] (8) 以步骤 (5) 得到的 S3 和步骤 (6) 得到的 S4 作为模板,利用引物 P5 和 P8,Pfu DNA 聚合酶,重组 PCR 扩增 3' 端 2A-hV $\alpha$  9mC $\alpha$  序列 S6 (其中 hV $\alpha$  9mC $\alpha$  段的序列如 SEQ ID NO: 11 所示,其编码的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 12 所示)。

[0052] (9) 以步骤 (7) 得到的 S5 和步骤 (8) 得到的 S6 作为模板,利用引物 P1 和 P8,Pfu DNA 聚合酶,PCR 扩增 hV $\beta$  5mC $\beta$  -2A-hV $\alpha$  9mC $\alpha$  融合基因全长序列(SEQ ID NO: 13)。

[0053] 以上常规 PCR 反应体系 25  $\mu$  l,含 10 $\times$ Buffer 2.5  $\mu$  l,10mmol/L dNTP 0.5  $\mu$  l, Pfu DNA 聚合酶 0.2U,10  $\mu$  M 引物各 0.8  $\mu$  l,模板 DNA 1  $\mu$  l。PCR 反应条件:95 $^{\circ}$  C 变性 2min;95 $^{\circ}$  C 1min,72 $^{\circ}$  C 2min,35 个循环;72 $^{\circ}$  C 延伸 10min。

[0054] 重组 PCR 反应体系 25  $\mu$  l,含 10 $\times$ Buffer 2.5  $\mu$  l,10mmol/L dNTP 0.5  $\mu$  l, Pfu DNA 聚合酶 0.2U,10  $\mu$  M 引物 P5、P8 各 0.8  $\mu$  l,两种 PCR 产物模板各 1.5  $\mu$  l。PCR 反应条件:94 $^{\circ}$  C 变性 2min;94 $^{\circ}$  C 30s,52 $^{\circ}$  C 45s,72 $^{\circ}$  C 1min,3 个循环;94 $^{\circ}$  C 1min,72 $^{\circ}$  C 2min,32 个循环;72 $^{\circ}$  C 延伸 10min。

[0055] 2.3 构建含 hV $\beta$  5mC $\beta$  -2A-hV $\alpha$  9mC $\alpha$  融合基因的克隆载体

(1) 用胶回收试剂盒(Omega)回收 hV $\beta$  5mC $\beta$  -2A-hV $\alpha$  9mC $\alpha$  融合基因片段;  
(2) 用 DNA A-Tailing 试剂盒(TaKaRa)在上述基因片段末尾加 A;  
(3) 将 hV $\beta$  5mC $\beta$  -2A-hV $\alpha$  9mC $\alpha$  融合基因片段接入 pGEM-T 载体中,连接反应体系 10ml:pGEM-T 载体 1ml、10' ligation Buffer 1ml、T4 DNA 连接酶 1ml、0.2pmol 已加 A 纯化的 PCR 产物,16 $^{\circ}$  C 连接过夜。

[0056] (4) 常规方法将连接正确的质粒转化 E.coli DH5 $\alpha$  感受态菌。然后将菌涂布在 4ml 200mg/ml IPTG、40ml 20 mg/ml X-gal 的氨苄青霉素平板上;培养过夜,重组质粒转化的菌落呈白色,而空质粒转化的菌落呈蓝色。选择平板上白色菌落,转到装有 3ml Amp $^{+}$  LB 培养液的试管中,37 $^{\circ}$  C,160rpm 振摇 12-16h。

[0057] (5) 用质粒抽提试剂盒(Omega)提取质粒,用相应的限制性内切酶对初筛阳性重组质粒进行鉴定,并以重组质粒为模板,进行 PCR 扩增,琼脂糖凝胶电泳鉴定片段大小。最后将初筛阳性质粒送 Invitrogen 上海英骏生物技术有限公司进行测序。测序结果表明,该重组质粒所含外源基因序列与预测序列完全一致。

[0058] 2.4 重组逆转录病毒载体的构建

(1) 用限制性内切酶 EcoR I、Xho I 酶切含 hV $\beta$  5mC $\beta$  -2A-hV $\alpha$  9mC $\alpha$  融合基因的 T 载体与 pMX-IRES-GFP 空质粒,分别胶回收 hV $\beta$  5mC $\beta$  -2A-hV $\alpha$  9mC $\alpha$  融合基因片段与载体基因片段(方法同步骤 2.3);

(2) 将 hV $\beta$  5mC $\beta$  -2A-hV $\alpha$  9mC $\alpha$  融合基因连接入 pMX-IRES-GFP 载体(方法同步骤 2.3)后,转化感受态细菌 XL-10,涂布于含氨苄青霉素的固体培养基培养 12-16h 后,挑选单个菌落,摇菌过夜;

(3) 抽提质粒,酶切鉴定结果显示,基因片段插入正确(见图 3);

(4) 选择阳性菌落进行扩增培养,大量抽提质粒 DNA。

#### [0059] 2.5 逆转录病毒重组载体的包装

重组质粒与包膜蛋白质粒 VSV-G 以 1:1 的比例混合,采用磷酸钙转染法转染 GP2-293 细胞以包装逆转录病毒,实验按磷酸钙法细胞转染试剂盒(碧云天)说明操作。

#### [0060] 2.6 重组逆转录病毒的浓缩纯化

- (1) 收集病毒上清,10000g,4° C 离心 10min;
- (2) 回收病毒上清,50000g,4° C 离心 2h;
- (3) 1%-3% 原体积的 TNE 重悬,病毒完全溶解后,分装,-80° C 贮存;

#### 2.7 流式细胞术测定病毒滴度

- (1) 预先将 NIH3T3 细胞( $2 \times 10^5$ /孔)接种培养 24h;
- (2) 加入聚凝胺(PB)至终浓度 8mg/L,加入 10  $\mu$ l 待测滴度的病毒上清;
- (3) 感染 24h 后,更换新鲜培养液,去除假病毒颗粒;
- (4) 37° C 继续培养 3d 后,倒置荧光显微镜下观察绿色荧光蛋白(GFP)的表达;
- (5) 37° C 继续培养 5d 后,胰酶消化、PBS 洗涤 3 次后,用 200~300  $\mu$ l PBS 重悬,制备

密度为  $1 \sim 5 \times 10^6$ /ml 的单细胞悬液,流式细胞仪检测其 GFP 表达阳性率,按下列公式计算病毒滴度:病毒滴度(GFU/ml)=NIH3T3 细胞数  $\times$  阳性率 / 转染病毒上清量(ml)。

[0061] 荧光显微镜下观察, pMX-hV $\beta$ 5mC $\beta$ -2A-hV $\alpha$ 9mC $\alpha$ -IRES-GFP 逆转录病毒感染的 NIH3T3 细胞表达绿色荧光,表明 GFP 在细胞中的表达(图 4)。经流式细胞术检测,计算得重组病毒的滴度为  $1.97 \times 10^7$  IU/ml (图 5)。

#### [0062] 3. 鉴定重组逆转录病毒转染的 iNKT 细胞的抗结核活性

##### 3.1 iNKT 细胞的培养和分选

- (1) 分离与计数 PBMC (方法同步骤 1.1);
- (2) (以 24 孔板为例)每孔铺  $2 \times 10^6$  个 PBMC,在含 10% FBS 的 RPMI 1640 完全培养液在 37° C、5% CO<sub>2</sub> 条件下培养;
- (3) 分别在 1、3、5 天加入 IL-2 10U/ml、KRN7000 100ng/ml;
- (4) 将剩余的 PBMC 冻存,用于 7-14 天 iNKT 的扩增;
- (5) 第 8 天,将冻存的 PBMC 取出,向已增殖的 iNKT 细胞孔中加入  $2 \times 10^6$  个 PBMC,继续培养 7 天;
- (6) 第 15 天,用 V $\alpha$ 24<sup>+</sup>TCR 免疫磁珠分选 iNKT 细胞(方法同步骤 1.4);
- (7) 流式细胞术检测 iNKT 细胞的纯度 >95% (图 6)。

##### [0063] 3.2 测定重组病毒感染 iNKT 细胞最适 MOI

- (1) 将 iNKT 细胞感染前一天以  $5 \times 10^5$  个 / 孔接种于 6 孔板;
- (2) 转染当日弃细胞培养旧液,按 MOI 为 2、4、5、6、8、10、12 加入病毒贮存液,加入 PB 至终浓度为 8mg/L,37° C 培养 4h;
- (3) 加入培养基,稀释 PB 至 2mg/L,继续培养 5 天;
- (4) 离心收集细胞,PBS 洗涤 2 次,2% 多聚甲醛固定;
- (5) 流式细胞仪分析 iNKT 细胞 GFP 表达阳性率为 36.7%,确定最适 MOI=8 (图 7)。

##### [0064] 3.3 免疫荧光检测基因修饰 iNKT 细胞外源 TCR 的表达

- (1) 将重组病毒按 MOI=8 常规感染 iNKT 细胞;

- (2) 5 天后离心收集细胞, PBS 洗涤 2 次;
- (3) 细胞用 PBS 重悬, 加 APC 荧光素标记的小鼠抗人 TCR- $\beta$  5 单抗, 4 $^{\circ}$ C 避光孵育 30 min;
- (4) 离心收集细胞, PBS 洗涤 2 次, 2% 多聚甲醛固定;
- (5) 分别以 APC 标记的同型对照抗体 IgG1-APC 和 APC 标记的小鼠抗人 TCR- $\beta$  5 单抗进行免疫荧光染色, 同时以 PI 荧光染料染细胞核, 激光共聚焦显微镜下观察 iNKT 细胞表面结核特异 TCR 的表达(图 8)。可见修饰后的 iNKT 细胞表面显著表达外源 TCR 蛋白;
- (6) 分别以同型对照抗体 IgG1-APC 和人 TCR- $\beta$  5-APC 抗体标记, 流式细胞术检测, 结果表明, 表达结核抗原特异 TCR 的阳性细胞率为 60.9% (图 9)。

[0065] 3.4 ELISA 试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司)测定 iNKT 细胞的 IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ 、GrB 分泌水平

实验对照组设置: ①未转染组(未转染 iNKT 细胞 +38kDa 抗原冲击的 DC); ②空载体转染组(空载体转染 iNKT 细胞 +38kDa 抗原冲击的 DC); ③无关抗原组(TCR 基因修饰 iNKT 细胞 +OVA 冲击的 DC); ④相关抗原组(TCR 基因修饰 iNKT 细胞 +ESAT-6 冲击的 DC)和 ⑤ TCR 基因修饰组(TCR 基因修饰 iNKT 细胞 + 结核 38kDa 抗原冲击的 DC)。以下实验对照设置均同此。实验重复 3 次, 方法如下:

(1) 以  $5 \times 10^3$  个 / 孔接种负载 38kDa 抗原的 DC 于 96 孔板, 分别按照一定 E:T 值 (E:T=1、3、5、7、10 ;15、20、25、30) 加入抗原特异 TCR 基因修饰 iNKT 细胞, 与 DC 进行共培养, 每组设两个复孔;

(2) 共培养 6、12、18、24、30、36h 后, 收集各孔培养上清, 按试剂盒说明书进行操作。

[0066] ELISA 结果显示:

① 在效靶比 (E:T)=7, 与负载结核 38kDa 抗原的 DC 混合培养 18h 时, 38kDa 抗原特异 TCR 基因修饰的 iNKT 细胞 IFN- $\gamma$  分泌水平达到最高值  $2225.954 \pm 53.655$  pg/ml, 显著高于未转染、空转染的 iNKT 细胞和与未负载结核抗原或负载其它非特异抗原的 DC 共培养的 TCR 基因修饰的 iNKT 细胞 ( $P < 0.001$ ), 见图 10;

② 在 E:T=20, 与负载结核 38kDa 抗原的 DC 混合培养 24h 时, 38kDa 抗原特异 TCR 基因修饰的 iNKT 细胞 TNF- $\alpha$  分泌水平达到最高值  $1299.701 \pm 13.183$  pg/ml, 显著高于未转染、空转染的 iNKT 细胞和与未负载结核抗原或负载其它非特异抗原的 DC 共培养的 TCR 基因修饰的 iNKT 细胞 ( $P < 0.001$ ), 见图 11。

[0067] ③ 在 E:T=20, 与负载结核 38kDa 抗原的 DC 混合培养 24h 时, 38kDa 抗原特异 TCR 基因修饰组 GrB 分泌量 ( $11.364 \pm 0.031$  pg/ml) 显著高于未转染、空转染的 iNKT 细胞和与未负载结核抗原或负载其它非特异抗原的 DC 共培养的 TCR 基因修饰的 iNKT 细胞 ( $P < 0.001$ ), 见图 12。

[0068] 3.5 时间分辨荧光免疫分析试剂盒 (PerkinElmer) 测定 iNKT 细胞的杀伤活性。

[0069] 时间分辨免疫荧光检测结果显示: 在 E:T=30, 与负载结核 38kDa 抗原的 DC 混合培养 4h 时, TCR 基因修饰的 iNKT 细胞杀伤活性最高, 达到 84.20%, 显著高于未转染、空转染的 iNKT 细胞和与未负载结核抗原或负载其它非特异抗原的 DC 共培养的 TCR 基因修饰的 iNKT 细胞的杀伤水平 ( $P < 0.001$ ), 见图 13。

[0070] 上述的实验结果显示: 携带结核抗原特异 TCR 基因的逆转录病毒转染的 iNKT 细胞

可成功表达外源性 TCR 基因,特异性识别结核 38kDa 抗原并介导 IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$  细胞因子分泌和细胞毒活性,具有结核病基因治疗的应用价值,可为结核病的过继细胞免疫治疗开辟新径。



20

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 927

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Human

&lt;400&gt; 5

```

atgggctcca ggctgctctg ttgggtgctg ctttgtctcc tgggagcagg cccagtaaag      60
gctggagtca ctcaactcc aagatatctg atcaaacga gaggacagca agtgacactg      120
agctgctccc ctatctctgg gcataggagt gtatcctggt accaacagac cccaggacag      180
ggccttcagt tcctctttga atacttcagt gagacacaga gaaacaaagg aaacttcctt      240
ggtcgattct cagggcgcca gttctctaac tctcgctctg agatgaatgt gagcaccttg      300
gagctggggg actcggcctt ttatctttgc gccagcagcg cgcctgacac cggctcagga      360
gctttctttg gacaaggcac cagactcaca gttgtagagg acctgaacaa ggtgttccca      420
cccgaggtcg ctgtgtttga gccatcagaa gcagagatct cccacacca aaaggccaca      480
ctgggtgtcc tggccacagg cttcttcccc gaccacgtgg agctgagctg gtgggtgaat      540
gggaaggagg tgcacagtgg ggtcagcaca gaccgcagc ccc tcaagga gcagcccgcc      600
ctcaatgact ccagatactg cctgagcagc cgcctgaggg tctcggccac cttctggcag      660
aacccccgca accacttccg ctgtcaagtc cagttctacg ggctctcgga gaatgacgag      720
tggaccagg atagggccaa acccgtcacc cagatcgtca gcgccgaggc ctggggtaga      780
gcagactgtg gctttacctc ggtgtcctac cagcaagggg tctgtctgc caccatctc      840
tatgagatcc tgctagggaa ggccacctg tatgctgtgc tggtcagcgc cttgtgttg      900
atggccatgg tcaagagaaa ggatttc                                          927

```

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 308

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Human

&lt;400&gt; 6

```

Gly Ser Arg Leu Leu Cys Trp Val Leu Leu Cys Leu Leu Gly Ala Gly
1           5           10           15
Pro Val Lys Ala Gly Val Thr Gln Thr Pro Arg Tyr Leu Ile Lys Thr
           20           25           30
Arg Gly Gln Gln Val Thr Leu Ser Cys Ser Pro Ile Ser Gly His Arg
           35           40           45
Ser Val Ser Trp Tyr Gln Gln Thr Pro Gly Gln Gly Leu Gln Phe Leu
           50           55           60
Phe Glu Tyr Phe Ser Glu Thr Gln Arg Asn Lys Gly Asn Phe Pro Gly
65           70           75           80

```



Arg Phe Ser Gly Arg Gln Phe Ser Asn Ser Arg Ser Glu Met Asn Val  
 85 90 95  
 Ser Thr Leu Glu Leu Gly Asp Ser Ala Leu Tyr Leu Cys Ala Ser Ser  
 100 105 110  
 Ala Pro Asp Thr Gly Ser Gly Ala Phe Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu  
 115 120 125  
 Thr Val Val Glu Asp Leu Asn Lys Val Phe Pro Pro Glu Val Ala Val  
 130 135 140  
 Phe Glu Pro Ser Glu Ala Glu Ile Ser His Thr Gln Lys Ala Thr Leu  
 145 150 155 160  
 Val Cys Leu Ala Thr Gly Phe Phe Pro Asp His Val Glu Leu Ser Trp  
 165 170 175  
 Trp Val Asn Gly Lys Glu Val His Ser Gly Val Ser Thr Asp Pro Gln  
 180 185 190  
 Pro Leu Lys Glu Gln Pro Ala Leu Asn Asp Ser Arg Tyr Cys Leu Ser  
 195 200 205  
 Ser Arg Leu Arg Val Ser Ala Thr Phe Trp Gln Asn Pro Arg Asn His  
 210 215 220  
 Phe Arg Cys Gln Val Gln Phe Tyr Gly Leu Ser Glu Asn Asp Glu Trp  
 225 230 235 240  
 Thr Gln Asp Arg Ala Lys Pro Val Thr Gln Ile Val Ser Ala Glu Ala  
 245 250 255  
 Trp Gly Arg Ala Asp Cys Gly Phe Thr Ser Val Ser Tyr Gln Gln Gly  
 260 265 270  
 Val Leu Ser Ala Thr Ile Leu Tyr Glu Ile Leu Leu Gly Lys Ala Thr  
 275 280 285  
 Leu Tyr Ala Val Leu Val Ser Ala Leu Val Leu Met Ala Met Val Lys  
 290 295 300  
 Arg Lys Asp Phe  
 305

<210> 7

<211> 810

<212> DNA

<213> Human

<400> 7

atgtggggag ctttccttct ctatgtttcc atgaagatgg gaggcactgc aggacaaagc 60

cttgagcagc cctctgaagt gacagctgtg gaaggagcca ttgtccagat aaactgcacg 120

taccagacat ctgggtttta tgggctgtcc tgggtaccagc aacatgatgg cggagcaccc 180

acattttcttt cttacaatgc tctggatggt ttggaggaga caggtcgttt ttcttcattc 240  
 cttagtcgct ctgatagtta tggttacctc cttctacagg agctccagat gaaagactct 300  
 gcctcttact tctgcgctgt gagagcccga ggaggaaaca cacctcttgt ctttggaag 360  
 ggcacaagac tttctgtgat tgcaaatatc cagaaccctg accctgccgt gtaccagctg 420  
 agagactcta aatccagtga caagtctgtc tgcctattca ccgattttga ttctcaaaca 480  
 aatgtgtcac aaagtaagga ttctgatgtg tatatcacag acaaaaactgt gctagacatg 540  
 aggtctatgg acttcaagag caacagtgtc gtggcctgga gcaacaaatc tgactttgca 600  
 tgtgcaaacg cttcaacaa cagcattatt ccagaagaca cttcttccc cagcccagaa 660  
 agttcctgtg atgtcaagct ggtcgagaaa agctttgaaa cagatacgaa cctaaacttt 720  
 caaacctgt cagtgattgg gttccgaatc ctcctcctga aagtggccgg gtttaatctg 780  
 ctcatgacgc tgcggctgtg gtccagctga 810

<210> 8

<211> 268

<212> PRT

<213> Human

<400> 8

Trp Gly Ala Phe Leu Leu Tyr Val Ser Met Lys Met Gly Gly Thr Ala  
 1                   5                   10                   15  
 Gly Gln Ser Leu Glu Gln Pro Ser Glu Val Thr Ala Val Glu Gly Ala  
                   20                   25                   30  
 Ile Val Gln Ile Asn Cys Thr Tyr Gln Thr Ser Gly Phe Tyr Gly Leu  
                   35                   40                   45  
 Ser Trp Tyr Gln Gln His Asp Gly Gly Ala Pro Thr Phe Leu Ser Tyr  
                   50                   55                   60  
 Asn Ala Leu Asp Gly Leu Glu Glu Thr Gly Arg Phe Ser Ser Phe Leu  
 65                   70                   75                   80  
 Ser Arg Ser Asp Ser Tyr Gly Tyr Leu Leu Leu Gln Glu Leu Gln Met  
                   85                   90                   95  
 Lys Asp Ser Ala Ser Tyr Phe Cys Ala Val Arg Ala Arg Gly Gly Asn  
                   100                   105                   110  
 Thr Pro Leu Val Phe Gly Lys Gly Thr Arg Leu Ser Val Ile Ala Asn  
                   115                   120                   125  
 Ile Gln Asn Pro Asp Pro Ala Val Tyr Gln Leu Arg Asp Ser Lys Ser  
                   130                   135                   140  
 Ser Asp Lys Ser Val Cys Leu Phe Thr Asp Phe Asp Ser Gln Thr Asn  
 145                   150                   155                   160  
 Val Ser Gln Ser Lys Asp Ser Asp Val Tyr Ile Thr Asp Lys Thr Val  
                   165                   170                   175

Leu Asp Met Arg Ser Met Asp Phe Lys Ser Asn Ser Ala Val Ala Trp  
                   180                                  185                                  190  
 Ser Asn Lys Ser Asp Phe Ala Cys Ala Asn Ala Phe Asn Asn Ser Ile  
                   195                                  200                                  205  
 Ile Pro Glu Asp Thr Phe Phe Pro Ser Pro Glu Ser Ser Cys Asp Val  
                   210                                  215                                  220  
 Lys Leu Val Glu Lys Ser Phe Glu Thr Asp Thr Asn Leu Asn Phe Gln  
                   225                                  230                                  235                                  240  
 Asn Leu Ser Val Ile Gly Phe Arg Ile Leu Leu Leu Lys Val Ala Gly  
                                   245                                  250                                  255  
 Phe Asn Leu Leu Met Thr Leu Arg Leu Trp Ser Ser  
                                   260                                  265

<210> 9

<211> 927

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 9

atgggctcca ggctgctctg ttgggtgctg ctttgtctcc tgggagcagg cccagtaaag 60  
 gctggagtca ctcaactcc aagatatctg atcaaaacga gaggacagca agtgacactg 120  
 agctgctccc ctatctctgg gcataggagt gtatcctggg accaacagac cccaggacag 180  
 ggccttcagt tcctctttga atacttcagt gagacacaga gaaacaaagg aaacttcctt 240  
 ggtcgattct cagggcgcca gttctctaac tctcgctctg agatgaatgt gagcaccttg 300  
 gagctggggg actcggcctt ttatctttgc gccagcagcg cgctgacac cggctcagga 360  
 gctttctttg gacaaggcac cagactcaca gttgtagagg acctgaacaa ggtgttccca 420  
 cccgaggtcg ctgtgtttga gccatcaaaa gcagagatcg cacacacca aaaggccaca 480  
 ctgggtgtgcc tggccacagg cttcttcccc gaccacgtgg agctgagctg gtgggtgaat 540  
 gggaaggagg tgcacagtgg ggtcagcaca gaccgcgagc ccctcaagga gcagcccgcc 600  
 ctcaatgact ccagatactg cctgagcagc cgctgaggg tctcggccac cttctggcag 660  
 aacccccgca accacttccg ctgtcaagtc cagttctacg ggctctcgga gaatgacgag 720  
 tggaccagg atagggccaa acccgtcacc cagatcgtca gcgccgaggc ctggggtaga 780  
 gcagactgtg gcattacctc ggcatactac caccaagggg tctgtctgc caccatctc 840  
 tatgagatcc tgctagggaa ggccacctg tatgctgtgc tggtcagcgc cttgtgttg 900  
 atggccatgg tcaagagaaa ggatttc 927

<210> 10

<211> 308

<212> PRT

<213> 人工序列

&lt;400&gt; 10

Gly Ser Arg Leu Leu Cys Trp Val Leu Leu Cys Leu Leu Gly Ala Gly  
 1                   5                   10                   15  
 Pro Val Lys Ala Gly Val Thr Gln Thr Pro Arg Tyr Leu Ile Lys Thr  
                   20                   25                   30  
 Arg Gly Gln Gln Val Thr Leu Ser Cys Ser Pro Ile Ser Gly His Arg  
                   35                   40                   45  
 Ser Val Ser Trp Tyr Gln Gln Thr Pro Gly Gln Gly Leu Gln Phe Leu  
                   50                   55                   60  
 Phe Glu Tyr Phe Ser Glu Thr Gln Arg Asn Lys Gly Asn Phe Pro Gly  
 65                   70                   75                   80  
 Arg Phe Ser Gly Arg Gln Phe Ser Asn Ser Arg Ser Glu Met Asn Val  
                   85                   90                   95  
 Ser Thr Leu Glu Leu Gly Asp Ser Ala Leu Tyr Leu Cys Ala Ser Ser  
                   100                   105                   110  
 Ala Pro Asp Thr Gly Ser Gly Ala Phe Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu  
                   115                   120                   125  
 Thr Val Val Glu Asp Leu Asn Lys Val Phe Pro Pro Glu Val Ala Val  
                   130                   135                   140  
 Phe Glu Pro Ser Lys Ala Glu Ile Ala His Thr Gln Lys Ala Thr Leu  
 145                   150                   155                   160  
 Val Cys Leu Ala Thr Gly Phe Phe Pro Asp His Val Glu Leu Ser Trp  
                   165                   170                   175  
 Trp Val Asn Gly Lys Glu Val His Ser Gly Val Ser Thr Asp Pro Gln  
                   180                   185                   190  
 Pro Leu Lys Glu Gln Pro Ala Leu Asn Asp Ser Arg Tyr Cys Leu Ser  
                   195                   200                   205  
 Ser Arg Leu Arg Val Ser Ala Thr Phe Trp Gln Asn Pro Arg Asn His  
                   210                   215                   220  
 Phe Arg Cys Gln Val Gln Phe Tyr Gly Leu Ser Glu Asn Asp Glu Trp  
 225                   230                   235                   240  
 Thr Gln Asp Arg Ala Lys Pro Val Thr Gln Ile Val Ser Ala Glu Ala  
                   245                   250                   255  
 Trp Gly Arg Ala Asp Cys Gly Ile Thr Ser Ala Ser Tyr His Gln Gly  
                   260                   265                   270  
 Val Leu Ser Ala Thr Ile Leu Tyr Glu Ile Leu Leu Gly Lys Ala Thr  
                   275                   280                   285  
 Leu Tyr Ala Val Leu Val Ser Ala Leu Val Leu Met Ala Met Val Lys  
                   290                   295                   300



	85	90	95
Lys Asp Ser Ala Ser Tyr Phe Cys Ala Val Arg Ala Arg Gly Gly Asn			
	100	105	110
Thr Pro Leu Val Phe Gly Lys Gly Thr Arg Leu Ser Val Ile Ala Asn			
	115	120	125
Ile Gln Asn Pro Asp Pro Ala Val Tyr Gln Leu Arg Asp Ser Lys Ser			
	130	135	140
Ser Asp Lys Ser Val Cys Leu Phe Thr Asp Phe Asp Ser Gln Thr Asn			
145	150	155	160
Val Ser Gln Ser Lys Asp Ser Asp Val Tyr Ile Thr Asp Lys Thr Val			
	165	170	175
Leu Asp Met Arg Ser Met Asp Phe Lys Ser Asn Ser Ala Val Ala Trp			
	180	185	190
Ser Asn Lys Ser Asp Phe Ala Cys Ala Asn Ala Phe Asn Asn Ser Ile			
	195	200	205
Ile Pro Glu Asp Thr Phe Phe Pro Ser Ser Asp Val Pro Cys Asp Val			
	210	215	220
Lys Leu Val Glu Lys Ser Phe Glu Thr Asp Thr Asn Leu Asn Phe Gln			
225	230	235	240
Asn Leu Ser Val Ile Gly Phe Arg Ile Leu Leu Leu Lys Val Ala Gly			
	245	250	255
Phe Asn Leu Leu Met Thr Leu Arg Leu Trp Ser Ser			
	260	265	

<210> 13

<211> 1803

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 13

atgggctcca ggctgctctg ttgggtgctg ctttgtctcc tgggagcagg cccagtaaag	60
gctggagtca ctcaactcc aagatatctg atcaaacga gaggacagca agtgacactg	120
agctgctccc ctatctctgg gcataggagt gtatcctggt accaacagac cccaggacag	180
ggccttcagt tctcttttga atacttcagt gagacacaga gaaacaaagg aaacttcct	240
ggtcgattct cagggcgcca gttctetaac tctcgctctg agatgaatgt gagcaccttg	300
gagctggggg actcggcct ttatctttgc gccagcagcg cgctgacac cggctcagga	360
gctttctttg gacaaggcac cagactcaca gttgtagagg acctgaacaa ggtgttccca	420
cccagggtcg ctgtgtttga gccatcaaaa gcagagatcg cacacacca aaagccaca	480
ctgggtgtgcc tggccacagg cttcttcccc gaccacgtgg agctgagctg gtgggtgaat	540
gggaaggagg tgcacagtgg ggtcagcaca gaccgcagc ccctcaagga gcagcccgc	600

ctcaatgact ccagatactg cctgagcagc cgcctgaggg tctcggccac cttctggcag	660
aacccccgca accacttccg ctgtcaagtc cagttctacg ggctctcgga gaatgacgag	720
tggaccagg atagggccaa acccgtcacc cagatcgtca gcgccagggc ctggggtaga	780
gcagactgtg gcattacctc ggcacacctc caccaagggg tcctgtctgc caccatcctc	840
tatgagatcc tgctagggaa ggccaccctg tatgctgtgc tggtcagegc cttgtgttg	900
atggccatgg tcaagagaaa ggatttcggc tccggagcca cgaacttctc tctgttaaag	960
caagcaggag acgtggaaga aaaccccgt cccatgtggg gagctttcct tctctatggt	1020
tccatgaaga tgggaggcac tgcaggacaa agccttgagc agccctctga agtgacagct	1080
gtggaaggag ccattgtcca gataaactgc acgtaccaga catctgggtt ttatgggctg	1140
tcctggtacc agcaacatga tggcggagca cccacatttc tttcttacia tgctctggat	1200
ggtttggagg agacaggteg tttttcttca ttccttagtc gctctgata g ttatggttac	1260
ctccttctac aggagctcca gatgaaagac tctgcctctt acttctgcgc tgtgagagcc	1320
cgaggaggaa acacacctct tgtctttgga aagggcacaa gactttctgt gattgcaaat	1380
atccagaacc ctgaccctgc cgtgtaccag ctgagagact ctaaaccag tgacaagtct	1440
gtctgcctat tcaccgattt tgattctcaa acaaagtgt caciaagtaa ggattctgat	1500
gtgtatatca cagacaaaac tgtgctagac atgaggtcta tggacttcaa gagcaacagt	1560
gctgtggcc t ggagcaacaa atctgacttt gcatgtgcaa acgccttcaa caacagcatt	1620
attccagaag acaccttctt ccccagctca gacgttcct gtgatgtcaa gctggctgag	1680
aaaagctttg aaacagatac gaacctaac tttcaaaacc tgtcagtgat tgggttccga	1740
atcctcctcc tgaaagtggc cgggtttaat ctgctcatga cgctgcggct gtggtccagc	1800
tga	1803

<210> 14

<211> 44

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 14

ccggaattca tgggctccag gctgctctgt tgggtgctgc ttg	44
---	----

<210> 15

<211> 40

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 15

cttgttcagg tcctctacia ctgtgagtct ggtgccttgt	40
---	----

<210> 16

<211> 40

<212> DNA

<213> 人工序列	
<400> 16	
agactcacag ttgtagagga cctgaacaag gtgttcccac	40
<210> 17	
<211> 79	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 17	
cttccacgtc tcctgcttgc tttaacagag agaagttcgt ggctccggag ccgaaatcct	60
ttctcttgac catggccat	79
<210> 18	
<211> 79	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 18	
cgaacttctc tctgttaaag caagcaggag acgtggaaga aaaccccggt cccatgtggg	60
gagctttcct tctctatgt	79
<210> 19	
<211> 40	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 19	
gtcagggttc tggatatttg caatcacaga aagtcttgtg	40
<210> 20	
<211> 40	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 20	
tctgtgattg caaatatcca gaaccctgac cctgccgtgt	40
<210> 21	
<211> 42	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 21	



ccgctcgagt cagctggacc acagccgcag cgtcatgagc ag 42

<210> 22

<211> 45

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 22

ccgctcgagt cagaaatcct ttctcttgac catggccatc aacac 45

<210> 23

<211> 43

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 23

catgcatgg gctggaccac agccgcagcg tcatgagcag att 43

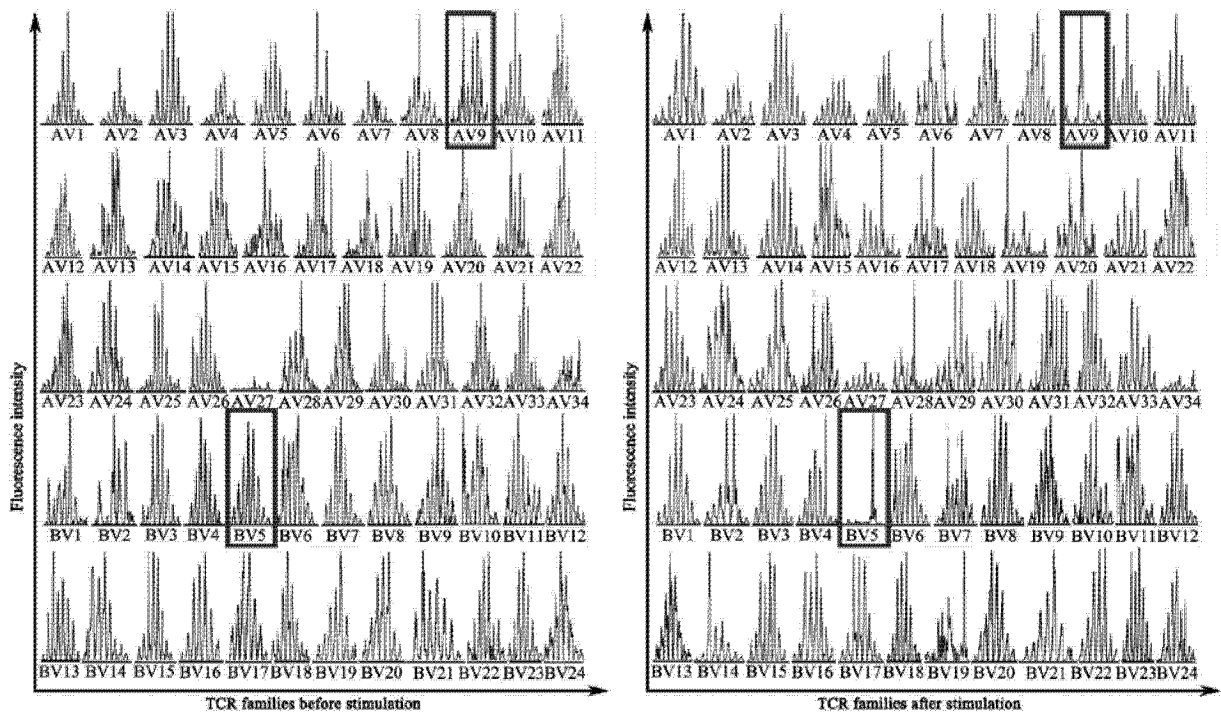


图 1

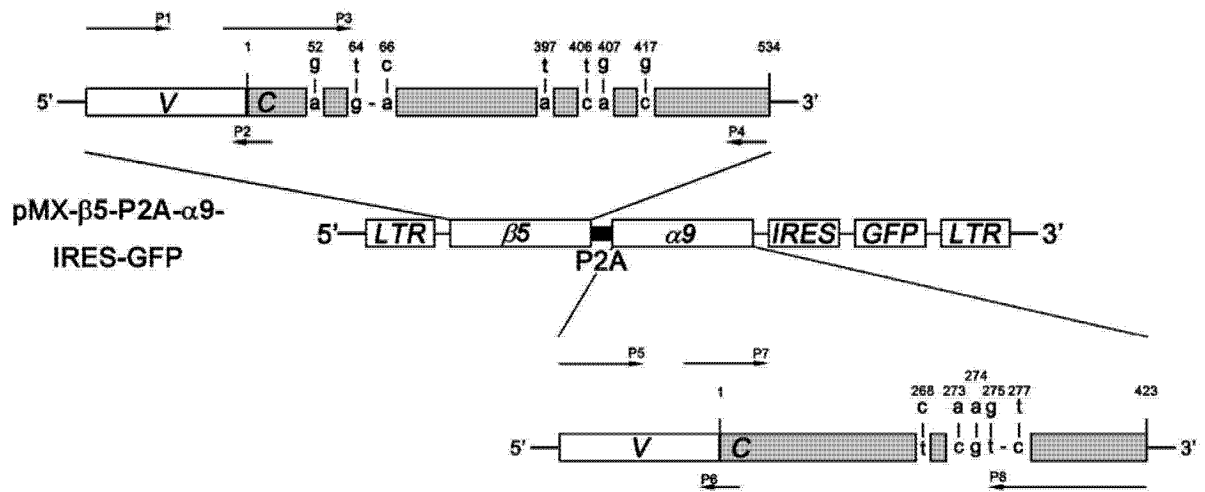


图 2

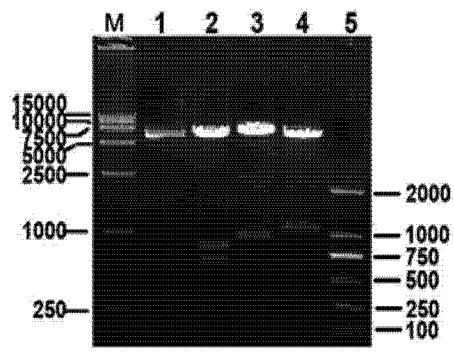


图 3

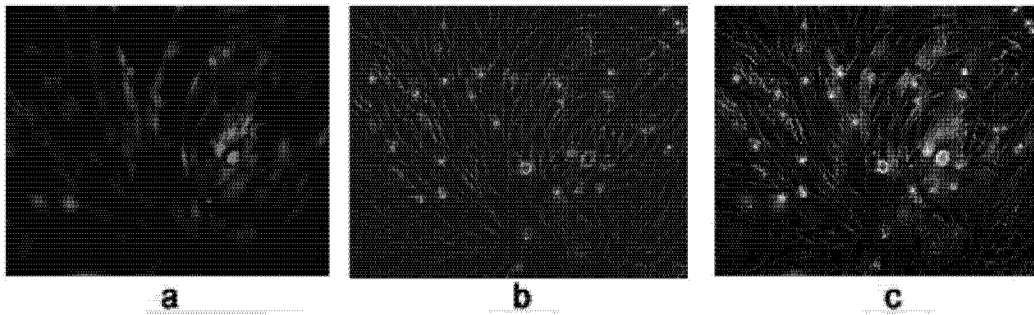


图 4

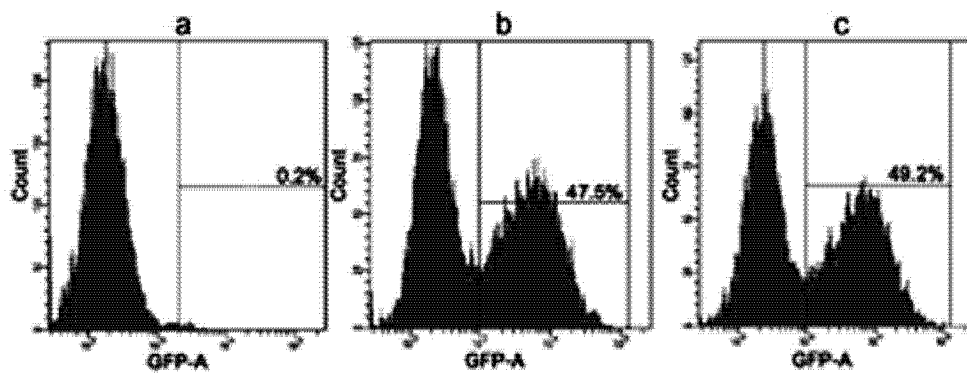


图 5

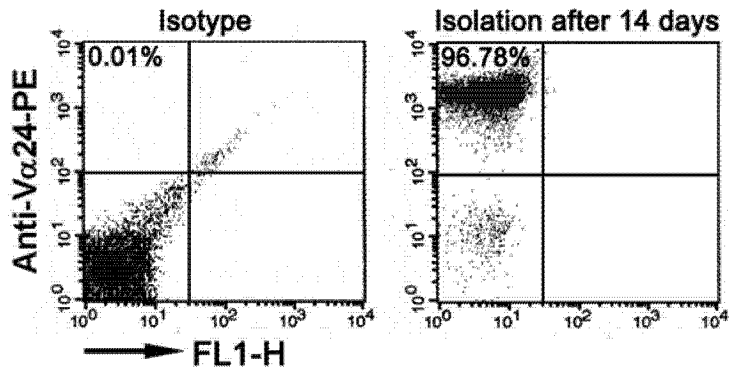


图 6

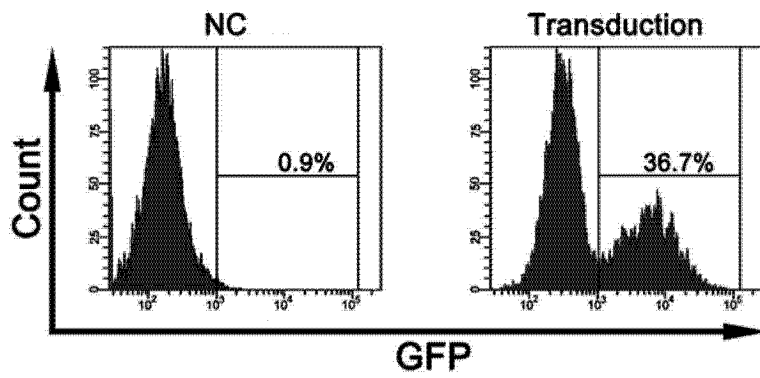


图 7

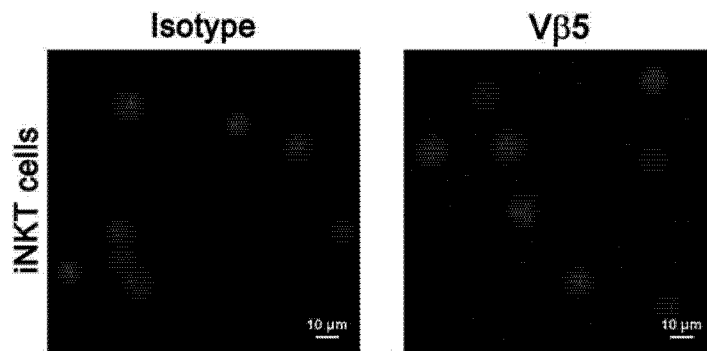


图 8

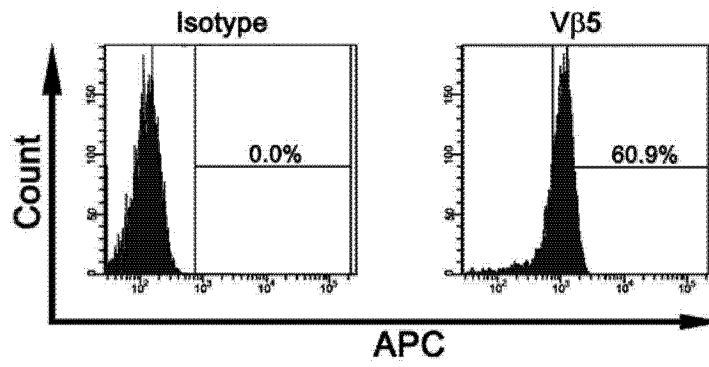


图 9

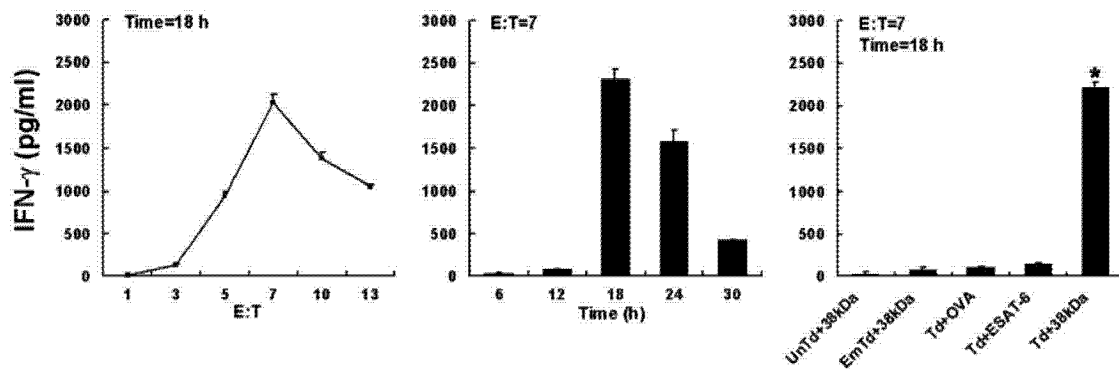


图 10

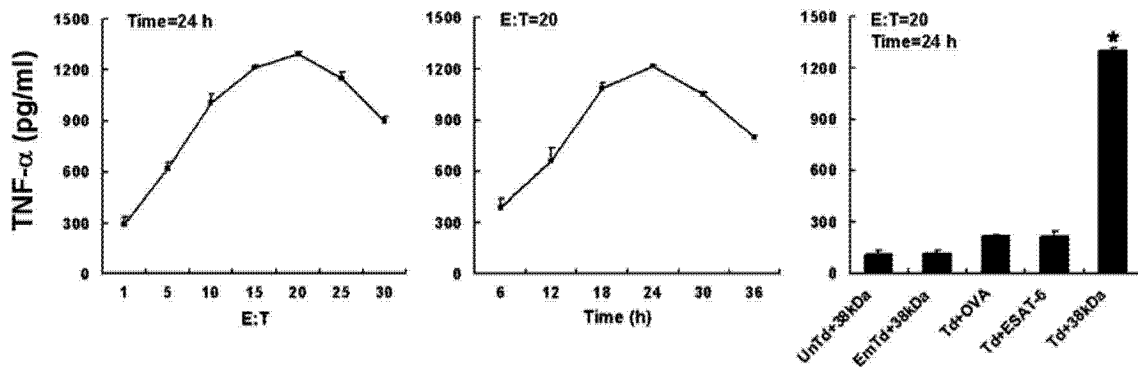


图 11

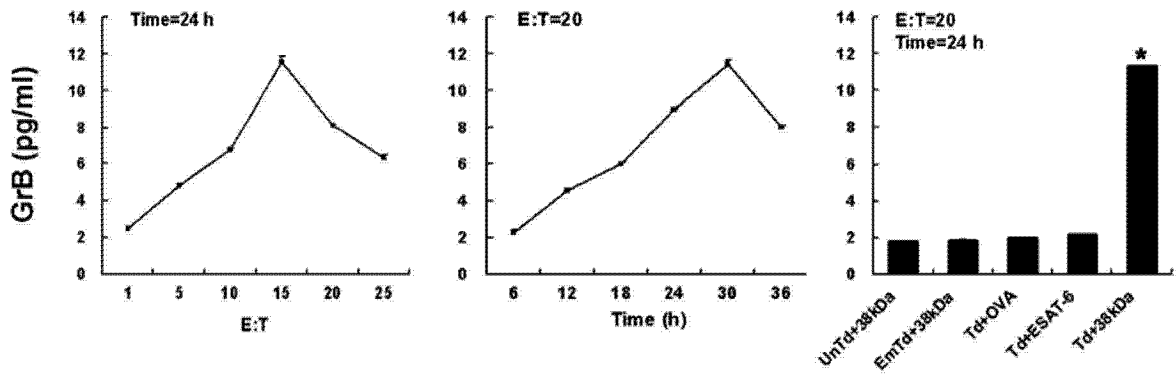


图 12

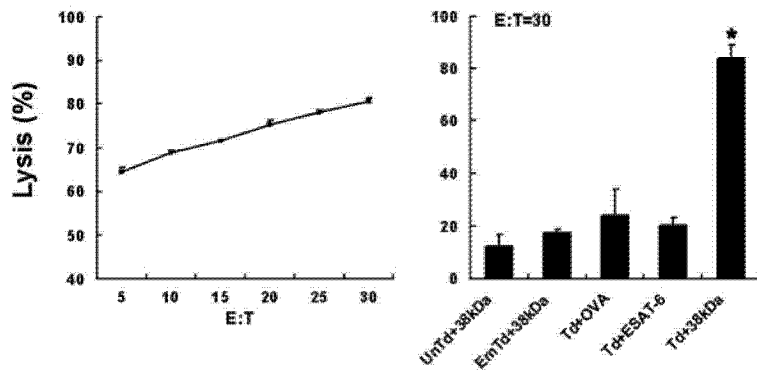


图 13