

网络出版时间:2014-04-25 15:48

DOI:10.13207/j.cnki.jnwafu.2014.05.033

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13207/j.cnki.jnwafu.2014.05.033.html>

鸡恒定链功能片段跨物种增强小鼠对新城疫 F2 抗原免疫作用的研究

王琛,刘雪兰,陈芳芳,余为一

(安徽农业大学 安徽省人兽共患病重点实验室,安徽 合肥 230036)

[摘要] **【目的】**研究恒定链(Invariant chain,Ii)功能片段作为载体的跨物种免疫增强作用及其潜在机制。**【方法】**构建基于鸡 Ii 功能片段与新城疫病毒抗原表位 F2 的嵌合体(Ii-F2、Cyt/Tm/Ii-key/F2/AP、Tm/Ii-key/F2/AP、Ii-key/F2/AP、Ii-key/F2),将其定向克隆至原核表达载体 pET-32a 中,转化大肠杆菌 Rosetta(DE3)并用 IPTG 诱导表达,嵌合体融合蛋白纯化后免疫小鼠,用 ELISA 法测定血清抗体效价。同时,分别构建含鸡 Ii 和小鼠 MHC II 类分子基因的真核表达载体,并将其共转染 COS7 细胞,通过激光共聚焦显微镜观察其在细胞内的共定位。**【结果】**用 F2 与 Ii-key 等 Ii 功能片段连接的融合蛋白免疫的试验组小鼠的抗体效价,较单独用 F2 抗原肽免疫的对照组小鼠产生的抗体效价提高了 1.5~3 倍。显微观察发现,鸡 Ii 和小鼠 MHC II 分子在细胞内可以共定位。**【结论】**Ii 具有跨越物种限制增强免疫的作用。

[关键词] 恒定链;肽载体;嵌合体;异种免疫

[中图分类号] S858.315.3;S852.4⁺3 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1671-9387(2014)05-0033-06

Cross species enhancement of mice antigen immune function against NDV-F2 by invariant chain functional fragments of chicken

WANG Chen,LIU Xue-lan,CHEN Fang-fang,YU Wei-yi

(Key Laboratory of Zoonoses of Anhui Province,Anhui Agricultural University,Hefei,Anhui 230036,China)

Abstract: **【Objective】** This study aimed to research the cross species enhancement of mice antigen immune function against NDV-F2 with the invariant chain functional segments of chicken as immune carrier. **【Method】** Chimeras (Ii-F2,Cyt/Tm/Ii-key/F2/AP,Tm/Ii-key/F2/AP,Ii-key/F2/AP,Ii-key/F2) based on Ii and NDV epitope F2 were reconstructed before being inserted into the prokaryotic expression vector pET-32a and transformed into *E. coli* Rosetta (DE3). The recombinant bacteria were induced to express the chimeric proteins by IPTG. Mice were immunized with the purified proteins and the antibody titers were measured by ELISA. Meanwhile,chicken Ii and mouse MHC class II α or β chain genes were cloned into the eukaryotic expression vector and co-transfected in COS7 cells before the intracellular association was determined by confocal laser scanning microscope (CLSM). **【Result】** The mice immunized with these chimeric proteins increased antibody titers by 1.5—3 times compared with those immunized with F2 alone. Chicken Ii could co-locate and bind with mouse MHC class II molecule in the COS7 cells. **【Conclusion】** The Ii functional segments could be used as immune carrier to enhance the immune response.

Key words: invariant chain;peptide carrier;chimera;cross species

[收稿日期] 2013-04-22

[基金项目] 国家自然科学基金项目(31172306);安徽省自然科学基金项目(11040606M90)

[作者简介] 王琛(1987—),男,山东潍坊人,在读硕士,主要从事微生物与免疫研究。E-mail:85287312@qq.com

[通信作者] 余为一(1952—),男,上海市人,教授,博士生导师,主要从事微生物与免疫学研究。E-mail:yuweiyi@ahau.edu.cn

肽疫苗具有特异性强、安全、有效等特点,目前已经应用于癌症、糖尿病等疾病的治疗^[1-2],构建具有增强抗原递呈免疫载体的嵌合体肽疫苗无疑是一种提高治疗效果的有效方法。恒定链(Invariant chain,Ii)是一种Ⅱ型跨膜糖蛋白,呈非多态性^[3-4],作为MHCⅡ类分子伴侣蛋白,在递呈外源性抗原的过程中发挥着重要作用。Ii的CLIP片段占据MHCⅡ类分子内的肽结合区凹槽,阻止内源性多肽的结合^[5-6];当外源性抗原肽进入时,凹槽中的CLIP片段被酶解,抗原肽进入凹槽并被递呈到细胞表面,以便被CD4⁺ Th细胞识别,从而激活免疫应答^[7]。

用抗原肽取代Ii的CLIP片段的嵌合体,其抗原肽占据MHCⅡ类分子“凹槽”,优先进入MHCⅡ类分子输运呈递途径,不仅可增强抗感染免疫,还可以改变异常免疫应答的性质^[8]。Adams等^[9]报道,用Ii关键基团Ii-key结构(即四肽LRMK,与CLIP区N端相连)与抗原肽连接构建的嵌合体具有免疫增强作用。目前,Ii-key结构成为重要的免疫载体,并在多肽疫苗中得到了应用^[10-13]。此外,用小鼠Ii跨膜区(Cyt)、胞浆区(Tm)的功能片段连接抗原肽免疫小鼠,能够增强免疫效应^[14]。但是尚不清楚Ii这些功能片段的作用是否具有跨物种的限制。为此,本研究构建了基于鸡Ii功能片段和新城疫病毒(NDV)的F306肽段中第二个抗原表位(即F2片段^[15])的多个嵌合体,用其免疫小鼠,通过细胞共定位和抗体水平研究鸡Ii活性片段在小鼠体内的免疫效果,以期构建跨物种免疫载体奠定基础。

表 1 基因片段与嵌合体引物序列
Table 1 Primer sequences of the chimeras

基因片段或嵌合体名称 Names of genetic segments and Chimeras	引物序列 Primer sequences
Full Ii	F:5'-CGGGATCCATGGCTGAGGAGCAGCGGGA-3' R:5'-GCGTCGACCTACTTGGCTTTCACCA-3'
Ii-F2(F2 replace CLIP)	F:5'-CGGGATCCATGGCTGAGGAGCAGCGGGA-3' R:5'-GCGTCGACCTACTTGGCTTTCACCA-3'
Cyt/Tm/Ii-key/F2/AP	F:5'-CGGGATCCATGGCTGAGGAGCAGCGGGA-3' R:5'-GCGTCGACCTAGGGAGCCATCTTCCCAACT-3'
Tm/Ii-key/F2/AP	F:5'-CGGGATCCATGAGAAGTGCCTGTC-3' R:5'-GCGTCGACCTAGGGAGCCATCTTCCCAACT-3'
Ii-key/F2/AP	F:5'-CGGGATCCATGCTGCAGAGGAAGAATGCTG-3' R:5'-GCGTCGACCTAGGGAGCCATCTTCCCAACT-3'
Ii-key/F2	F:5'-CGGGATCCATGCTGCAGAGGAAGAATGCTG-3' R:5'-GCGTCGACCTACATCTTCCCAACT-3'
F2	F:5'-CGGGATCCATGAATGCTGCCAACAT-3' R:5'-GCGTCGACCTACATCTTCCCAACT-3'

注:F引物序列中下划线部分为BamHⅠ酶切位点,R引物序列中下划线部分为SalⅠ酶切位点。
Note:The underlined sequences in the primers F groups are Restriction Enzyme cutting sites of BamHⅠ and the underlined sequences in the primers R groups are Restriction Enzyme cutting sites of SalⅠ.

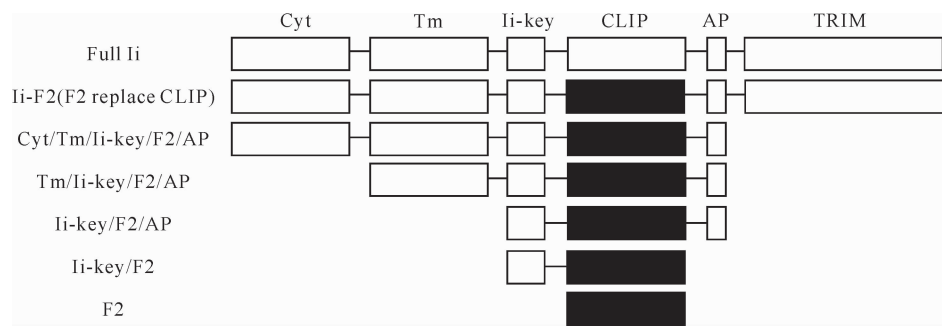


图 1 嵌合体结构示意图
Fig.1 Schematic diagram of the chimeras

将各嵌合体片段分别插入 pET-32a、pGEX-4T-1 载体,构建重组质粒 pET-32a-Ii、pET-32a-Ii-F2、pET-32a-Cyt/Tm/Ii-key/F2/AP、pET-32a-Tm/Ii-key/F2/AP、pET-32a-Ii-key/F2/AP、pET-32a-Ii-key/F2、pET-32a-F2 和 pGEX-4T-1-F2,将其转化至 *E. coli* Rosetta(DE3)工程菌中,然后将转化后的菌株送上海生工生物工程有限公司进行测序鉴定;同时,提取重组质粒用 *Bam*H I/*Sal* I 进行双酶切鉴定。PCR 扩增产物和双酶切产物用 10 g/L 琼脂糖凝胶进行电泳检测。

1.4 嵌合体抗原的制备与小鼠免疫

将上述 1.2 节中获得的重组菌加入适量的 IPTG(终浓度为 1.0 mmol/L),振荡培养 5 h。用超声波破碎菌体(180 W 超声 5 s,间隔 10 s,36 个循环),经 Native-PAGE 电泳后,按于在江等^[16]的方法用 0.25 mol/L KCl 切胶法纯化融合蛋白,对纯化后的蛋白进行 SDS-PAGE 电泳鉴定。

将试验小鼠随机分为 6 个试验组和 1 个对照组,每组 3 只,6 个试验组小鼠分别用纯化的 His-Ii-F2、His-Cyt/Tm/Ii-key/F2/AP、His-Tm/Ii-key/F2/AP、His-Ii-key/F2/AP、His-Ii-key/F2 和 His-F2 融合蛋白腹腔注射免疫约 100 μ L/只,免疫剂量为 50 μ g/只。对照组小鼠腹腔注射等体积的生理盐水。常规免疫 5 周后眼球采血,收集血清,于-20 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.5 抗体检测

采用间接 ELISA 法检测嵌合体抗体效价,以重组质粒 pGEX-4T-1-F2 表达的 GST-F2 融合蛋白作为抗原包被酶标板。以辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗小鼠 IgG 为二抗,最后以邻苯二胺(OPD)进行显色反应,室温放置 10~15 min 后终止反应,用酶标仪检测 492 nm 波段的吸光值,并对所得数据进行统计学分析。每个样品重复 3 孔。

1.6 真核载体的构建、转染及共定位观察

为探究鸡 Ii 是否能与小鼠 MHC II 类分子结合,本试验还用含鸡 *Ii* 基因的重组真核表达质粒 pmCherry-C1-Ii,以及含增强型绿色荧光蛋白(GFP)和小鼠 MHC II α 链、 β 链的 pEGFP-MHC II α 和 pEGFP-MHC II β 的重组真核表达质粒,经 LipofectamineTM 2000 共转染 COS7 细胞^[14],转染 48 h 后置于激光共聚焦显微镜(Zeiss)下,观察鸡 Ii 与小鼠 MHC II α 、 β 链的共定位情况。

2 结果与分析

2.1 Ii 功能片段-抗原肽嵌合体的鉴定

图 2 显示,嵌合体的 PCR 扩增获得了 710 bp 的 Ii、692 bp 的 Ii-F2、374 bp 的 Cyt/Tm/Ii-key/F2/AP、300 bp 的 Tm/Ii-key/F2/AP、152 bp 的 Ii-key/F2/AP、146 bp 的 Ii-key/F2、128 bp 的 F2,重组质粒 pET-32a-Ii、pET-32a-Ii-F2、pET-32a-Cyt/Tm/Ii-key/F2/AP、pET-32a-Tm/Ii-key/F2/AP、pET-32a-Ii-key/F2/AP、pET-32a-Ii-key/F2 和 pET-32a-F2 经 *Bam*H I/*Sal* I 双酶切,均获得了预期长度的目的片段。测序结果显示,所有克隆的 DNA 序列与模板序列一致。该结果表明,本试验成功地构建了 Ii 功能片段的嵌合体。

2.2 嵌合体融合蛋白的纯化

对纯化的嵌合体融合蛋白进行 SDS-PAGE 电泳检测。图 3 结果显示,在 44.7 (His-Ii-F2),33.2 (His-Cyt/Tm/Ii-key/F2/AP),29.2 (His-Tm/Ii-key/F2/AP),24.4 (His-Ii-key/F2/AP),24.0 (His-Ii-key/F2)和 23.8 (His-F2)ku 处有相应的目的条带,大小与预期结果相符。

2.3 Ii 功能片段诱导的抗体水平

用 pGEX-4T-1-F2 重组质粒表达的带 GST 标签的 GST-F2 融合蛋白作为包被抗原,经间接

ELISA 检测,结果(图 4)显示,对照组小鼠抗 F2 抗体效价约为 $(0.7 \pm 0.06) \times 10^4$,而 Ii-key/F2、Ii-key/F2/AP、Cyt/Tm/Ii-key/F2/AP、Tm/Ii-key/F2/AP 和 Ii-F2 融合蛋白免疫组抗 F2 的抗体水平

为 $1.2 \times 10^4 \sim 2.2 \times 10^4$,分别为对照组的 1.5、2.5、3、3 和 3 倍。这表明以鸡 Ii 功能片段为载体构建的嵌合体在小鼠体内均具有不同程度的免疫增强作用。

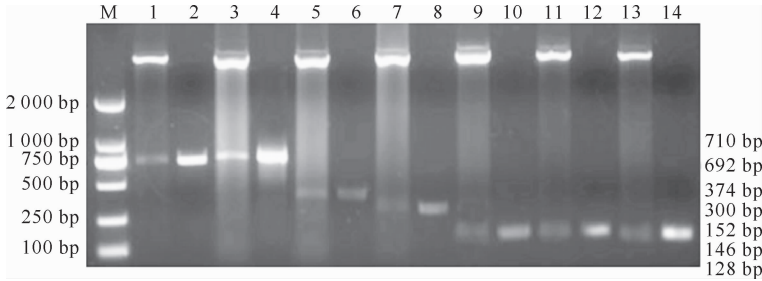


图 2 嵌合体的 PCR 扩增及其重组质粒的 *Bam*H I /*Sal* I 双酶切鉴定

M, DL2000 Marker;1,3,5,7,9,11,13. pET-32a-Ii, pET-32a-Ii-F2、pET-32a-Cyt/Tm/Ii-key/F2/AP、pET-32a-Tm/Ii-key/F2/AP、pET-32a-Ii-key/F2/AP、pET-32a-Ii-key/F2、pET-32a-F2 双酶切产物;2,4,6,8,10,12,14. Ii、Ii-F2、Cyt/Tm/Ii-key/F2/AP、Tm/Ii-key/F2/AP、Ii-key/F2/AP、Ii-key/F2、F2 的 PCR 产物

Fig. 2 Double digestion identification of PCR products and recombinant plasmids with *Bam*H I /*Sal* I

M, DL2000 Marker;1,3,5,7,9,11,13. Double digestion of pET-32a-Ii, pET-32a-Ii-F2, pET-32a-Cyt/Tm/Ii-key/F2/AP, pET-32a-Tm/Ii-key/F2/AP, pET-32a-Ii-key/F2/AP, pET-32a-Ii-key/F2, pET-32a-F2;2,4,6,8,10,12,14. PCR products of Ii, Ii-F2, Cyt/Tm/Ii-key/F2/AP, Tm/Ii-key/F2/AP, Ii-key/F2/AP, Ii-key/F2, and F2

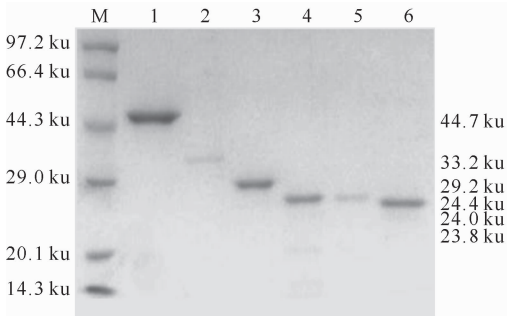


图 3 纯化后嵌合体融合蛋白的 SDS-PAGE 电泳检测

M, 蛋白质分子质量标准;1~6. 分别为纯化的 His-Ii-F2、His-Cyt/Tm/Ii-key/F2/AP、His-Tm/Ii-key/F2/AP、His-Ii-key/F2/AP、His-Ii-key/F2 和 His-F2 融合蛋白

Fig. 3 Identification of the purified chimeric fusion proteins with SDS-PAGE

M, Marker of protein molecular mass;1~6. Purified chimeric proteins His-Ii-F2, His-Cyt/Tm/Ii-key/F2/AP, His-Tm/Ii-key/F2/AP, His-Ii-key/F2/AP, His-Ii-key/F2, and His-F2

2. 4 鸡 Ii 与小鼠 MHC II 类分子的共定位

激光共聚焦显微镜观察结果(图 5)表明,在细胞相同位置共定位的蛋白分子会形成橙色荧光。该结果说明,鸡 Ii 与鼠 MHC II 类分子能在细胞膜上共定位,表示两者具有相互作用。

3 讨 论

MHC II 类分子的多态性是动物与病原长期选择的结果,MHC II 分子与抗原肽之间的亲和力大小

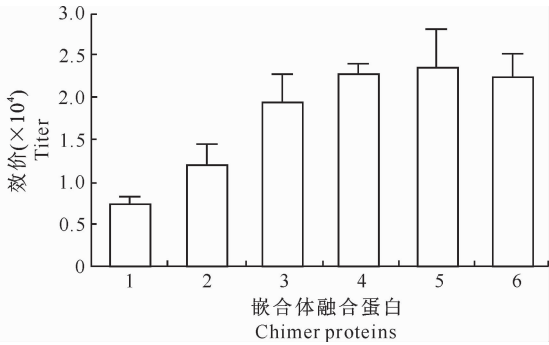


图 4 嵌合体融合蛋白免疫小鼠产生的特异性抗体水平

1. His-F2;2. His-Ii-key/F2;3. His-Ii-key/F2/AP;4. His-Tm/Ii-key/F2/AP;5. His-Cyt/Tm/Ii-key/F2/AP;6. His-Ii-F2

Fig. 4 Specific antibody titers of Kunming mice immunized with various recombinant proteins

1. His-F2;2. His-Ii-key/F2;3. His-Ii-key/F2/AP;4. His-Tm/Ii-key/F2/AP;5. His-Cyt/Tm/Ii-key/F2/AP;6. His-Ii-F2

与抗原递呈效应密切相关^[17]。Ii 作为 MHC II 分子的重要伴侣,在其递呈抗原过程中起重要的辅助作用。Kim 等^[18]用人乳突淋瘤病毒(Human papilloma virus, HPV-16)抗原肽 E6、E7 连接 Ii 共免疫小鼠,增强了特异性 CD8⁺ T 淋巴细胞的免疫应答,提高了小鼠存活期。Zinckgraf 等^[19]用禽流感病毒 H5N1 的 HA 抗原表位与人 Ii-key 连接后对志愿者免疫,发现其免疫效果较单一抗原免疫增强了 3~10 倍。Voutsas 等^[20]研究发现, Ii-Key/HER-2/neu

776-790aa 嵌合体多肽能够诱导促进细胞增殖并增强 CD4⁺ T 淋巴细胞的应答,还能明显增强特异性

CD8⁺ T 淋巴细胞的细胞毒作用^[21],而且特异性抗体水平也有明显提高^[22]。

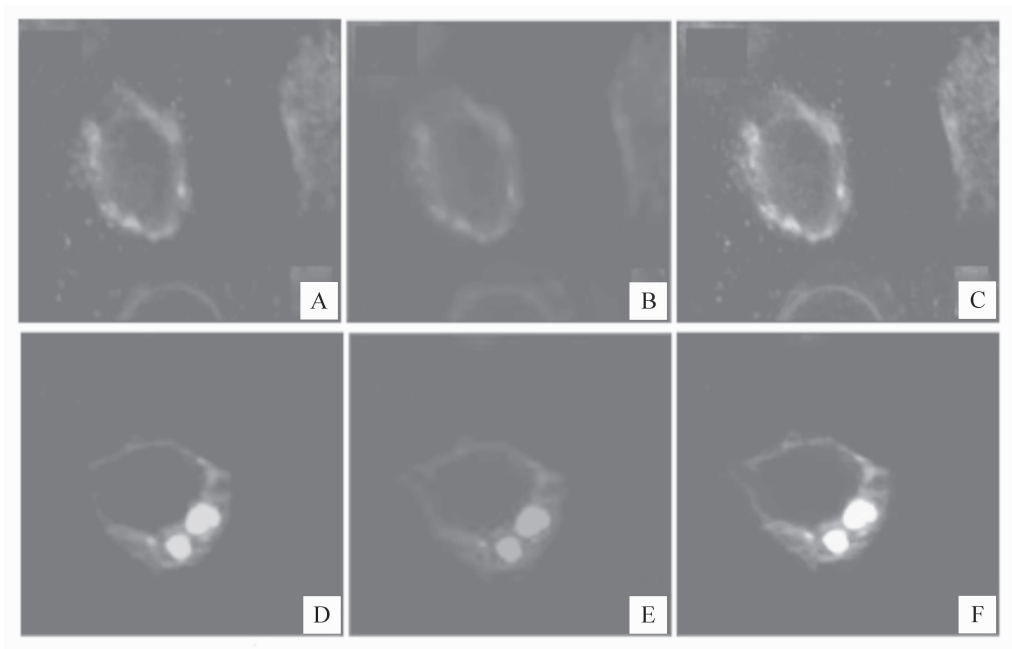


图 5 鸡 Ii 与小鼠 MHC II 类分子在 COS7 细胞中的共定位
A. 小鼠 MHC II 类 α ; B. 鸡 Ii 分子; C. 鸡 Ii 与 MHC II 类 α 共定位; D. 小鼠 MHC II 类 β ; E. 鸡 Ii 分子; F. 鸡 Ii 与 MHC II 类 β 共定位
Fig. 5 Location of chicken Ii and mouse MHC class II in COS7 cells
A. Mouse MHC II α ; B. Chicken Ii; C. The co-location of chicken Ii and mouse MHC II α ; D. Mouse MHC II β ;
E. Chicken Ii; F. The co-location of chicken Ii and mouse MHC II β

鸡恒定链与人和小鼠等哺乳动物 Ii 存在约 60% 的同源性,主要的功能区序列保守。本研究通过激光共聚焦显微镜观察发现,鸡的 Ii 能够与小鼠 MHC II α 或 β 链在 COS7 细胞内共定位,并且经过体内试验证明,用鸡 Ii-key 及其活性片段携带抗原肽免疫小鼠能够增强特异性体液免疫应答水平。对于免疫增强的效果,各个功能片段所起的作用并不相同:鸡恒定链 CLIP 区 N 端的 Ii-key 结构能够促进抗原肽与 MHC II 分子的结合,而 N 端的胞浆区、跨膜区和 C 端的 AP 结构均能起到辅助作用,可进一步增强免疫效果。此外,有研究还表明,鹌鹑 Ii 与鸡和小鼠的 MHC II α 或 β 链也存在跨越种间的相互作用^[23]。上述结果表明,尽管禽类与哺乳动物 Ii 之间存在序列上的差异,但是作为 MHC II 分子伴侣的 Ii,在禽类与哺乳动物中均维持相似的功能特性,而且异种 Ii 可以跨越物种限制。此外,Ii 具有可连接多种抗原肽的潜力,并且可以不使用免疫佐剂^[2],这为 Ii 成为跨物种抗原肽载体的结构基础提供了依据。但是不同物种,如哺乳动物与禽类的 Ii,尤其是 Ii-key 氨基酸序列存在明显不同,选择何种 Ii 功能片段作为免疫载体最为有效,还有待于进一

步研究。

[参考文献]

[1] Beyan H, Von Hofe E, Leslie R D. Study of T cell response to Ii-Key/MHC class II epitope hybrids in human type 1 diabetes [J]. Diabetes, 2008, 51: 232.
[2] Holmes J P, Benavides L C, Gates J D, et al. Results of the first phase I clinical trial of the novel Ii-key hybrid preventive HER-2/neu peptide (AE37) vaccine [J]. J Clin Oncol, 2008, 26 (20): 3426-3433.
[3] Lipp J, Dobberstein B. Signal recognition particle-dependent membrane insertion of mouse invariant chain: A membrane-spanning protein with a cytoplasmically exposed amine terminus [J]. Cell Biology, 1986, 102: 2169-2175.
[4] Claesson L, Peterson P A. Association of human gamma chain with class II transplantation antigens during intracellular transport [J]. Biochemistry, 1983, 22: 3206-3213.
[5] Jasanoff A, Wagner G, Wiley D C. Structure of a trimeric domain of the MHC class II-associated chaperonin and targeting protein Ii [J]. EMBO J, 1998, 17: 6812-6818.
[6] Stumtpner P, Benaroch P. Interaction of MHC class II molecules with the invariant chain: Role of the invariant chain (81-90) region [J]. EMBO J, 1997, 16: 5807-5818.
[7] Busch R, Rinderknecht C H, Roh S, et al. Achieving stability

- through editing and chaperoning; Regulation of MHC class II peptide binding and expression [J]. *Immunol Rev*, 2005, 207: 242-260.
- [8] Neumann J, Koch N. Assembly of major histocompatibility complex class II subunits with invariant chain [J]. *FEBS Lett*, 2005, 579: 6055-6059.
- [9] Adams S, Albericio F, Alsina J, et al. Biological activity and therapeutic potential of homologs of an Ii peptide which regulates antigenic peptide binding to cell surface MHC class II molecules [J]. *Arzneimittel-Forschung*, 1997, 47(9): 1069-1077.
- [10] Xu M, Li X, Sposato M, et al. Ii-Key/HPV16 E7 hybrid peptide immunotherapy for HPV16⁺ cancers [J]. *Vaccine*, 2009, 27(34): 4641-4647.
- [11] Holst P J, Sorensen M R, Jensen C M M, et al. MHC class II-associated invariant chain linkage of antigen dramatically improves cell-mediated immunity induced by adenovirus vaccines [J]. *J Immunol*, 2008, 180(5): 3339-3346.
- [12] Zinckgraf J W, Sposato M, Zielinski V, et al. Identification of HLA class II H5N1 hemagglutinin epitopes following subviral influenza A (H5N1) vaccination [J]. *Vaccine*, 2009, 27(39): 5393-5401.
- [13] Perez S A, Kallinteris N L, Bissias S, et al. Results from a phase I clinical study of the novel Ii-Key/HER-2/neu(776-790) hybrid peptide vaccine in patients with prostate cancer [J]. *Clinical Cancer Research*, 2010, 16(13): 3495-3506.
- [14] Chen F F, Meng F T, Pan L, et al. Boosting immune response with the invariant chain segments via association with non-peptide binding region of major histocompatibility complex class II molecules [J]. *BMC Immunology*, 2012, 13: 55.
- [15] 程宝艳, 彭明义, 余为一, 等. 新城疫病毒 F 蛋白抗原表位串联基因的构建及其原核表达 [J]. *中国兽医学报*, 2010, 30(6): 734-737.
- Cheng B Y, Peng M Y, Yu W Y, et al. Construction of prokaryotic expression vector for F protein epitope gene cascade of Newcastle disease virus [J]. *Chinese Journal of Veterinary Science*, 2010, 30(6): 734-737. (in Chinese)
- [16] 于在江, 马学恩, 周建华. 切胶纯化表达蛋白包涵体的可行性分析 [J]. *生物技术*, 2007, 17(3): 46-48.
- Yu Z J, Ma X E, Zhou J H. A modified method for purification of inclusion bodies proteins in gel slices [J]. *Biotechnology*, 2007, 17(3): 46-48. (in Chinese)
- [17] Biedrzycka A, Radwan J. Population fragmentation and major histocompatibility complex variation in the spotted suslik, *Spermophilus suslicus* [J]. *Mol Ecol*, 2008, 17(22): 4801-4811.
- [18] Kim D, Hoory T, Monie A, et al. Enhancement of DNA vaccine potency through coadministration of CIITA DNA with DNA vaccines via gene gun [J]. *J Immunol*, 2008, 180(10): 7019-7027.
- [19] Zinckgraf J W, Sposato M, Zielinski V, et al. Identification of HLA class II H5N1 hemagglutinin epitopes following subviral influenza A (H5N1) vaccination [J]. *Vaccine*, 2009, 27(39): 5393-5401.
- [20] Voutsas I F, Gritzapis A D, Mahaira L G, et al. Induction of potent CD4⁺ T cell-mediated antitumor responses by a helper HER-2/neu peptide linked to the Ii-Key moiety of the invariant chain [J]. *Int J Cancer*, 2007, 121(9): 2031-2041.
- [21] Kallinteris N L, Ku S Z, Lu X Q, et al. Enhanced CD4⁺ T-cell response in DR4-transgenic mice to a hybrid peptide linking the Ii-Key segment of the invariant chain to the melanoma gp100(48-58) MHC class II epitope [J]. *J Immunother*, 2005, 28(4): 352-358.
- [22] Gillogly M E, Kallinteris N L, Xu M, et al. Ii-Key/HER-2/neu MHC class-II antigenic epitope vaccine peptide for breast cancer [J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2004, 53(6): 490-496.
- [23] Chen F F, Wu C, Pan P, et al. Cross-species association of quail invariant chain with chicken and mouse MHC II molecules [J]. *Developmental and Comparative Immunology*, 2013, 40(1): 20-27.