

• 论 著 •

金黄色葡萄球菌肠毒素 B 基因在大肠杆菌中的克隆及表达^{*}

李 飞^{1,2}, 周 帅^{1,2}, 董 慧^{1,2}, 黄艳梅^{1,2}, 梁秉绍^{1,2}, 李 娟^{1,2},
龙 燕^{1,2}, 王洁琳^{1,2}, 谢永强^{1,2}, 杨镒宇^{1,2}, 周珍文^{1,2△}

(1. 广州医科大学, 广州 510120; 2. 广州市妇女儿童医疗中心 510120)

摘 要:目的 扩增金黄色葡萄球菌肠毒素 B(SEB)基因,构建其原核表达载体,并进行诱导、表达,为其应用研究奠定基础。**方法** 根据 GenBank 中 SEB 的基因序列,设计一对分别含 *Bam*H I、*Xho* I 酶切位点的特异性引物,以金黄色葡萄球菌基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增后,经 *Bam*H I、*Xho* I 双酶切,并与做相应酶切的 pET-28α(+)连接,转化大肠杆菌 BL21,提取质粒进行双酶切鉴定及测序,用 IPTG 诱导表达融合蛋白,SDS-PAGE 和 Western blot 印迹鉴定表达产物。**结果** 成功扩增出 SEB 基因,基因大小为 801 bp,重组 PET-28α(+)-SEB 双酶切鉴定可见目的片段,测序结果显示 SEB 在正确读框中,序列比对分析显示其与相关报道核苷酸序列一致性达 99%。经 IPTG 诱导后,pET-28α(+)-SEB/BL21 在相应的相对分子质量(35×10^3)可见融合蛋白以包涵体形式表达,免疫印迹在相应分子量检测到目的蛋白。**结论** 克隆了 SEB 基因,并成功在大肠杆菌 BL21 中以包涵体形式表达,为肠毒素 B 应用研究奠定了基础。

关键词:金黄色葡萄球菌; 肠毒素 B; 克隆; 表达

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2016.18.001 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-9455(2016)18-2553-03

Cloning and expression of Staphylococcus aureus enterotoxin B gene in Escherichia coli^{*}

LI Fei^{1,2}, ZHOU Shuai^{1,2}, DONG Hui^{1,2}, HUANG Yanmei^{1,2},
LIANG Bingshao^{1,2}, LI Juan^{1,2}, LONG Yan^{1,2}, WANG Jielin^{1,2}, XIE Yongqiang^{1,2}, YANG Yiyu^{1,2}, ZHOU Zhenwen^{1,2△}

(1. Guangzhou Medical University, Guangzhou, Guangdong 510120, China; 2. Guangzhou Women and Children's Medical Center, Guangzhou, Guangdong 510120, China)

Abstract:**Objective** To amplify the Staphylococcus aureus enterotoxin B (SEB) gene and to construct its prokaryotic expression vector for conducting induction and expression to lay the foundation for its application research. **Methods** According to SEB gene sequences in the GenBank, a pair of specific primer containing *Bam*H I and *Xho* I enzyme digestion sites were designed. The SEB genome DNA served as the template for conducting PCR amplification, then after *Bam*H I and *Xho* I dual enzyme digestion, connected with the pET-28α(+) for making corresponding enzyme digestion. Escherichia coli BL21 was transformed. The plasmids were extracted for conducting the dual enzyme digestion identification and sequencing. The fusion protein was expressed by using the IPTG induction. The expressed product was identified by Western blot. **Results** SEB gene was successfully amplified, which size was 801bp, the recombinant PET-28α(+)-SEB dual enzyme digestion identification could find the target fragments, the sequencing results displayed that SEB was in the correct reading frame, the sequencing comparative analysis showed that its consistency to nucleotide sequence in the related report was 99%. After IPTG induction, the fusion protein could be expressed as the inclusion body in the corresponding molecular weight 35×10^3 of pET-28α(+)-SEB/BL21. The target protein could be detected in the corresponding molecular weight by Western blot. **Conclusion** SEB gene is cloned and successfully expressed as the inclusion body in Escherichia coli BL21, which lays a foundation for staphylococcus aureus SEB application research.

Key words: Staphylococcus aureus; enterotoxin B; clone; expression

金黄色葡萄球菌是人类化脓性感染中常见的病原菌,根据美国疾控中心报道,金黄色葡萄球菌引起感染的比例仅次于大肠杆菌,近年来由于抗菌药物的广泛应用,耐甲氧西林的金黄色葡萄球菌(MRSA)感染日益严峻,已经与艾滋病、病毒性肝炎成并列地位。金黄色葡萄球菌产生多种毒素且大部分都产生肠毒素(SE),主要分为 SEA、SEB、SEC、SED、SEE 五种类型,多数食物中毒是由 SEA、SEB 引起^[2]。SEB 具有超抗原活性,不需要 T 淋巴细胞辅助直接激活 T 淋巴细胞。近年来研究发现,SEB 能与人或鼠的抗原递呈细胞表面的 II 类主要组织相容性复合体结合,形成 SEB-MHCII 复合体,T 细胞激活后产生干扰素、白细胞介素等^[3]。本研究旨在克隆金黄色葡萄球

肠毒素 SEB 基因,实现 SEB 的高效表达,为其功能及应用研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株 金黄色葡萄球菌分离自广州市妇女儿童中心 CICU 男性患儿的痰标本,年龄:1 月 7 天,菌株编号 1411061335。菌株鉴定由 VITEK2 全自动细菌鉴定仪完成。

1.1.2 试剂与仪器 DNA 提取、纯化试剂盒、pET-28α(+)质粒载体购自法马西亚公司,DNA Marker,胰蛋白胨、酵母提取物购自英国 Oxoid 公司。德国 Biometra 公司 PCR 仪,*Bam*H I、*Xho* I 限制性内切酶,Prime Script PCR 试剂,Ex-

^{*} 基金项目:广州市医药科技重点项目(201102A212013);广东省科技厅项目(2014A020212013)。

作者简介:李飞,男,硕士研究生在读,主要从事微生物免疫方面的研究。△ 通讯作者,E-mail:zzw6248@126.com。

Taq DNA 聚合酶, T4 DNA 连接酶等购自 Takara 公司, Tris 碱、IPTG、丙烯酰胺、甘氨酸、NC 膜等购自鼎国公司, 英国 uvitec 公司 GAS7508-T20 紫外凝胶成像分析系统, 上海力申公司 HF safe-1200 型生物安全柜, 德国 Sorvall 公司 micro 17R 台式高速冷冻离心机。

1.2 方法

1.2.1 SEB 基因扩增 根据 GenBank SEB(M11118.1 | STAENTB) 序列, 设计特异性引物一对, SEB P1: 5' CCCG-GATCCATGTATAAGAGATTATTTATTTTCAC3'; SEB P2: 5' AAACCTCGAGTCACTTTTCTTTGTCGTAAGATAA3' 下划线为酶切位点 *Bam*H I (GGATCC)、*Xho* I (CTCGAG)。采用煮沸法提取 DNA 模板, 将临床分离的金黄色葡萄球菌分离, 用无菌接种环挑取单个菌, 充分溶解于 100 μ L 蒸馏水中, 在沸水中煮 10 min 后冷却, 12 000 r/min 离心 2 min, 取上清作为 PCR 模板^[4]。在 γ -TaqTM 酶作用下进行 PCR 扩增, PCR 反应条件: 94 $^{\circ}$ C 5 min, 94 $^{\circ}$ C 45 s, 56 $^{\circ}$ C 45 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min 30 s, 共 34 循环, 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 15 min。

1.2.2 SEB 基因连接、转化 SEB 基因经 PCR 扩增后, 纯化 PCR 产物, 经 *Bam*H I、*Xho* I 双酶切, 纯化 SEB 酶切产物; pET-28 α (+) 质粒载体同样进行双酶切纯化, 两个双酶切后的纯化产物在 T4 DNA Ligase 作用下连接过夜后, 转化至大肠杆菌 DH5 α , 转种于 LB 平板(含 KANA 50 μ g/mL)上, 在 35 $^{\circ}$ C 温箱培养过夜。挑取单个菌落于含卡那霉素 50 μ g/mL 的 LB 液体培养基中, 37 $^{\circ}$ C 16 000 r/min 振摇 12~16 h。

1.2.3 表达蛋白质粒的构建及重组质粒的双酶切鉴定 从 -80 $^{\circ}$ C 低温冰箱中取出感受态细胞 E. coli BL21 置冰上, 待其自然融化后, 取 1 μ L pET-28 α (+)-SEB 质粒加入 100 μ L 感受态菌液中, 冰浴 30 min 后, 42 $^{\circ}$ C 加热 90 s 后, 再放置冰中 2 min; 加入 890 μ L 的 LB 培养液, 37 $^{\circ}$ C 振荡培养 60 min; 4 000 r/min 离心 10 min, 弃上清液, 剩 100 μ L 重悬菌液, 接种于含有 KANA 的 LB 平板, 35 $^{\circ}$ C 培养 12~16 h。挑取阳性菌落提取质粒进行 PCR、双酶切及基因测序(华大基因)鉴定^[5]。

1.2.4 pET-28 α (+)-SEB 在大肠杆菌 BL21 中的诱导表达 挑单个菌于 5 mL 的 LB 液体培养基中加入卡那霉素 5 μ L, 37 $^{\circ}$ C 16 000 r/min 振摇培养过夜; 取 1 mL 菌液至 400 mL 的 LB 培养基中按比例加入卡那霉素 400 μ L, 37 $^{\circ}$ C 摇菌至 OD₆₀₀ = 0.5 左右, 加 IPTG 调至终浓度 1 mmol/L, 低温低速(26 $^{\circ}$ C、15 000 r/min)诱导表达 5 h, 4 $^{\circ}$ C 8 000 r/min 离心 20 min, 弃去上清, 收集菌体。往菌体加入 10 mL PBS 重悬。 -20 $^{\circ}$ C 冷冻 30 min, 室温放置 30 min, 反复冻融 3~5 次。将菌液于冰上超声破壁(160 W, 超声 1 s, 停 2 s, 超声 12 min)后。8 000 r/min 4 $^{\circ}$ C 离心 15 min, 收集上清和沉淀, SDS-PAGE 电泳鉴定^[6]。

1.2.5 Western blot 分析 将表达产物经 SDS-PAGE 后电转移至 NC 膜, 使用 HRP 标记的抗 His 标签鼠单克隆抗体(1 : 1 000)及按照 DAB 显色试剂盒说明书进行 Western blot 鉴定。

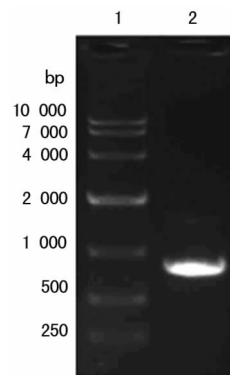
2 结果

2.1 SEB 基因的 PCR 扩增产物 琼脂糖凝胶电泳显示, 成功扩增出约 801 bp 的 DNA 片段, 与预期目的片段大小一致(图 1)。

2.2 重组 pET-28 α (+)-SEB 质粒的双酶切鉴定 pET-28 α (+)-SEB 重组质粒 *Bam*H I、*Xho* I 双酶切后, 切下大小约

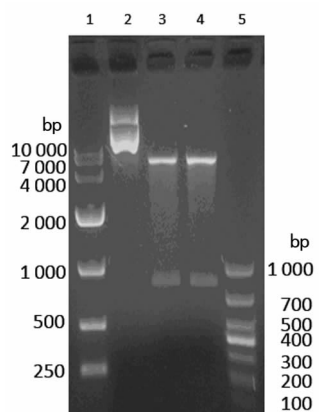
801 bp 的目的片段, 与 SEB 基因片段大小一致(图 2)。

2.3 pET-28 α (+)-SEB 的测序与分析 测序结果显示, 所获得 SEB 基因全长 801 bp, 起始于 ATG, 终止于 TGA, 编码 266 个氨基酸, 预测 SEB 蛋白相对分子质量为 31 556.6, 等电点为 pH 8.65, GRAVY 值为 -0.655, 推测该蛋白为碱性蛋白和亲水性蛋白。与 GenBank 中金葡萄球菌毒素 B 序列登陆号为: CP010952.1、AB716349.1、AB860415.1、AB716352.1 进行同源性比对, 结果分别为 99.00%、98.80%、98.75%、98.75%, 同菌属同源性比较, 与表皮葡萄球菌肠毒素(WP002457255.1)一致性为 65%, 与中间葡萄球菌肠毒素(WP001670267.1)一致性为 62%, 与伪中间葡萄球菌肠毒素(WP019166892.1)一致性为 51%。



注: 泳道 1 为 DNA 标记物 DL10000; 泳道 2 为 SEB 的 PCR 产物。

图 1 SEB 基因的 PCR 扩增



注: 泳道 1 为 DNA 标记物 DL10000; 泳道 2 为 pET-28 α (+) 酶切产物; 泳道 3、4 为重组质粒 pET-28 α (+)-SEB 酶切后产物; 泳道 5 为 DNA 标记物 DL1000。

图 2 重组质粒 pET-28 α (+)-SEB 的酶切鉴定

2.4 pET-28 α (+)-SEB 在大肠杆菌 BL21 中的诱导表达 以 pET-28 α (+) 空质粒转化菌 IPTG 诱导的样品为阴性对照, pET-28 α (+)-SEB 转化菌经 IPTG 诱导, 在相对分子质量为 35×10^3 附近位置可见融合蛋白, 与预测相符(31.6×10^3 加 His 及前导序列 3.5×10^3)。超声上清中未见重组蛋白表达, 仅在沉淀中以包涵体形式表达(图 3)。

2.5 重组蛋白 Western blot 分析 用 HRP 标记的抗 His 标签鼠单克隆抗体和 DAB 显色剂结合对上述 pET-28 α (+)-SEB 融合蛋白进行 Western blot 分析, 以 pET-28 α (+) 空质粒转化菌 IPTG 诱导的样品为阴性对照, 检测到约 35×10^3 大小的融合蛋白。见图 4。

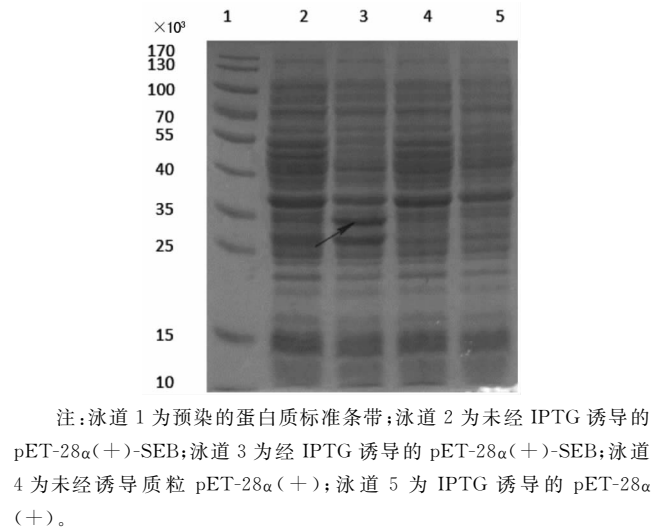


图 3 重组 pET-28α(+)-SEB 表达产物的 SDS-PAGE 电泳分析

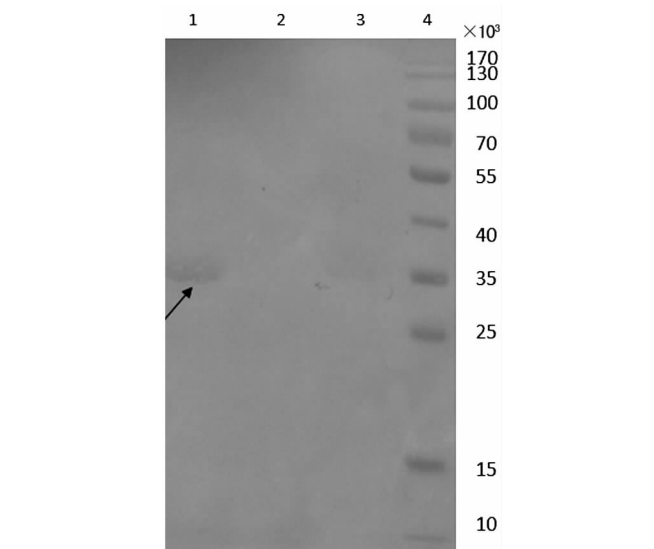


图 4 Western blot 检测 SEB 重组蛋白

3 讨 论

金黄色葡萄球菌肠毒素是引起食物中毒和院内感染的重要病原,肠毒素 B 是一种具有超抗原活性的外毒素,具有很强的生物学活性,在金葡脓毒症的发生、发展中起到重要作用。由于肠毒素 B 的超抗原性活性,目前已应用于临床肿瘤治疗研究^[7]。

本研究以临床分离金葡菌株,使用单菌落煮沸法,获得扩增模板,与传统集菌提取基因组 DNA 相比,单菌落煮沸法无需特殊试剂,操作简单。使用简易模板,首次扩增即成功获得 SEB 基因,表明此种方法所提取基因组 DNA 质量可满足实验需求。

同源性分析发现 SEB 基因与其他国家地区肠毒素 B 基因同源性非常高(一致性 99%),表明 SEB 在不同区域金葡菌株

间的高度保守性。同时与葡萄球菌其他菌属(表皮葡萄球菌,中间葡萄球菌)同源性在 60% 左右,同源性较低,提示金葡菌 SEB 作为金葡感染诊断抗原的可能性,后续将研究重组 SEB 与其他菌种间的交叉反应性,并使用其进行诊断研究。SEB 预测蛋白相对分子质量为 31.6×10^3 , His 标签及前导序列相对分子质量为 3.5×10^3 , SDS-PAGE 示在 35×10^3 处见目的条带,与预测相对分子质量加融合 His 标签大小相仿,Western blot 在相同相对分子质量大小检测到融合蛋白,表明 SEB 成功融合表达。

pET-28α 表达载体包含 T7 启动子,可通过表达菌株所产生的 T7RNA 聚合酶进行有效转录,插入 6 * His 标签下游进行融合表达,可克服转录和转录后水平对外源基因表达可能带来的不利影响^[8],但由于 pET 系列载体的高效表达特性,所以致使表达的蛋白很可能为包涵体。本实验中,尝试低温低速诱导 SEB 蛋白表达,但仍以包涵体形式存在。试验中,对 IPTG 诱导浓度及时间进行摸索,表明 IPTG 终浓度 1 mmol/L,诱导时间 5 h 所获表达量最大,为后续大规模纯化研究奠定了基础。

综上所述,成功建立 SEB 融合蛋白的高效表达体系,为获得高纯度的 SEB 蛋白和以 SEB 为模式抗原的相关临床科研研究奠定了物质基础。

参考文献

[1] Reddy P, Chadaga S, Noskin GA. Antibiotic considerations in the treatment of multidrug-resistant (MDR) pathogens; a case-based review[J]. J Hosp Med, 2009, 4 (6): E8-15.

[2] 刘飞. 金黄色葡萄球菌肠毒素检测方法的研究进展[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2010, 26(5): 511-513.

[3] 刘玉枝, 王凤玲, 陈洋, 等. 金黄色葡萄球菌致病毒素基因与耐药性的相关性研究[J]. 检验医学与临床, 2012, 9 (17): 2151-2153.

[4] 黄艳梅, 周帅, 陈吟霜, 等. 金黄色葡萄球菌 EsxA 基因的克隆及表达[J]. 热带医学杂志, 2015, 15 (6): 728-730, 740.

[5] Jian JC, Wang Y, Yan XY, et al. Molecular cloning and prokaryotic expression of vp5 gene of grass carp reovirus strain GCRV096[J]. Virus Genes, 2013, 47(3): 483-489.

[6] 李建杰, 陈大玮, 闫浩, 等. 牛奶主要过敏原 β-乳球蛋白的一基因片段的克隆、表达、纯化及抗原性鉴定[J]. 中国食品卫生杂志, 2011, 23(2): 109-113.

[7] 张亮, 张国利, 陈萍, 等. 金黄色葡萄球菌肠毒素 B 的原核表达及纯化[J]. 中国生物制品学杂志, 2013, 26(6): 804-806, 812.

[8] 容莉莉, 杨镒宇, 关锐梨, 等. 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 CHIPS 基因的克隆、序列分析及原核表达[J]. 广州医药, 2013, 44(4): 1-4.