

# 金黄色葡萄球菌肠毒素 B 基因的克隆和在大肠杆菌中高效表达

杨立泉 吴文芳\* 时成波 吕安国 冯家勋\*\* 柏学亮\*\*

(中国科学院沈阳应用生态研究所, 沈阳 110016)

**摘 要** 利用 PCR 方法从金黄色葡萄球菌 STSw 基因组 DNA 中扩增出约 700bp 的 DNA 片段, 将之克隆到 pGEM-7Zf (+) 载体上并转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$  菌株。重组质粒的测序结果表明克隆到了 *seb* 基因, 它含有 717bp (不包括 N 端 81bp 的信号肽编码区), 其核苷酸序列与文献报道完全一致。将其连接于表达载体 7ZTS 上, 转化到大肠杆菌 JM109 (DE3) 内。表达的 SEB 占总蛋白 33.5%。

**关键词** SEB, 基因克隆和表达, 超抗原

中图分类号 Q936 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2002)05-0597-04

金黄色葡萄球菌肠毒素(Staphylococcal enterotoxins, SEs) 是一类引起食物中毒的蛋白质, 它由某些产毒金黄色葡萄球菌分泌至胞外。根据血清型的不同将它分为 SEA, SEB, SEC1, SEC2, SEC3, SED, SEE 7 种类型, 其中 SEB 是很重要的一种<sup>[1]</sup>。

近年来, SEB 以其独特的超抗原性质被广泛用于抗癌研究。它能与人或鼠抗原递呈细胞表面的 II 类主要组织相容性复合体(MHC II) 结合, 形成 SEB-MHC II 复合物。此复合物被 T 细胞表面受体的 V $\beta$  部位特异识别, 并通过 V $\beta$  激活 T 细胞, 进而大量释放各种细胞因子<sup>[2]</sup>。SEB 的致病及抗癌机制都是由于它能快速激活大量的 T 细胞<sup>[3]</sup>。小鼠体内的研究表明, SEB 具有强大的肿瘤杀伤能力, 对黑色素瘤、淋巴瘤<sup>[4]</sup>和乳腺癌<sup>[5]</sup>等细胞都具有很强的细胞毒性。我国在这一领域的研究尚属空白。

对 *seb* 基因的克隆和表达必将加深我们对超抗原 SEB 的了解, 并为 SEB 抗癌机理的研究和 SEB 类抗癌药物的开发奠定基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌株** 金黄色葡萄球菌 STSw 和 *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ , JM109 (DE3) 为本室保存。

**1.1.2 试剂** :Taq DNA polymerase, pGEM-7Zf 载体购自大连宝生物公司。Pfu DNA polymerase, dNTP, Hind III, *kpn* I, *Nde* I, T4 DNA Ligase 皆为美国 Promega 公司产品, 胶回收及质粒提取试剂盒都是上海华舜公司产品。琼脂糖购自 FMC 生物制品公司。其余产品均为国产分析纯。

**1.1.3 仪器** :Sprint PCR 仪是英国 Hybaid 公司产品, 离心机 micromax230 由 IEC(International Equipment Company) 公司制造, 基因脉冲转化仪是 Bio-Rad 产品。DF-D 电泳仪是北京东方特力科贸中心产品。

### 1.2 方法

**1.2.1 金黄色葡萄球菌 STSw 基因组 DNA 的提取** :按《精编分子生物学实验指南》中的方法所述<sup>[6]</sup>。

**1.2.2 PCR 引物设计及反应条件** :根据文献中 *seb* 基因的核苷酸序列, 设计一组引物:

SEB-F 5'-ACGGTACCGAGAGTCAACCG-3'

SEB-R 5'-ACTAAGCTTCTTTTCTTTGTGCG-3'

以金黄色葡萄球菌 STSw 基因组 DNA 为模板, 在原浓度和稀释 100 倍、200 倍、500 倍条件下分别进行 PCR 扩增。退火温度分别采用 50 $^{\circ}$ C、53 $^{\circ}$ C、55 $^{\circ}$ C、57 $^{\circ}$ C、59 $^{\circ}$ C。扩增条件: 97 $^{\circ}$ C 1min; 95 $^{\circ}$ C 40s, 退火温度 30s, 72 $^{\circ}$ C 45s, 共 30 个循环, 72 $^{\circ}$ C 5min。

**1.2.3 PCR 产物的回收** 按上海华舜试剂盒使用说

收稿日期 2002-04-12, 修回日期 2002-07-01。

基金项目 沈阳市科委项目(No. 2001221-03) 亦为沈阳应用生态研究所与屹昌科技集团股份有限公司合作项目。

\* 通讯作者。 Tel 86-24-23916244, E-mail sw2fl@sina.com

\*\* 广西大学分子遗传所研究员

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

说明书操作。

**1.2.4 PCR 产物与 pGEM-7Zf 载体的连接:**将 pGEM-7Zf(+)载体和 PCR 产物分别用 *Hind* III 和 *Kpn* I 进行双酶切,用试剂盒纯化后用 T4 ligase 进行连接反应。连接产物经乙醇纯化后转化感受态细胞。

**1.2.5 感受态细胞的制备和电击转化方法:**按《分子克隆实验指南》中的方法操作<sup>[7]</sup>。

**1.2.6 DNA 序列测定:**用试剂盒提取经双酶切鉴定的阳性质粒,送大连宝生物测序。

**1.2.7 构建表达 SEB 的工程菌:**

(1) PCR 引物的设计及扩增条件:为构建含 *Nde* I 和 *Hind* III 酶切位点的 *seb* 基因,设计一组引物。

SEB F: 5'-AATATGGCATATGGAATCTCAGCCGATCCTAAAC-3'

SEB R: 5'-ACTAAGCTTCTATTACTTTTTCTTACTAGTAAG-3'

F 引物中引入了 *Nde*I 酶切位点和 ATG 起始密码子。R 引物中引入 *Hind* III 位点。用 pfu 酶,以 pGEM-7Zf(+)-*seb* 为模板进行 PCR 扩增。反应条件:97℃ 变性 1min,95℃ 45s,40℃ 45s,72℃ 1min,30 个循环,72℃ 延伸 1min。

(2) PCR 产物与 7ZTS 载体的连接及转化:将 PCR 产物与 7ZTS 载体分别用 *Nde* I 和 *Hind* III 双酶切,用 T4Ligase 连接,纯化后转化 *E. coli* JM109(DE3)。

(3) *seb* 基因的表达:分别挑取 JM109(DE3)单菌落于 LB(含 Amp 50μg/mL)中,37℃ 过夜培养。次日,以 1% 接种量转接新鲜 LB(含 Amp 50μg/mL)。当  $OD_{600}$  达到 0.6~0.8 时,用 1.0mmol/L 的 IPTG 诱导,于 32℃ 表达 10h。取 1mL 发酵液,离心得菌体,用 ddH<sub>2</sub>O 洗 1 次,悬于 1 倍 SDS 样品缓冲液,沸水浴煮 10min,12 000g 离心 2min,取 15μL 进行 15% SDS-PAGE 电泳,考马斯亮蓝染色,结果用薄层扫描仪在波长 600nm 处扫描。

菌体用 Tris-盐酸溶解,超声波破碎、离心,上清液进行 15% SDS-PAGE 电泳。

**1.2.8 与天然 SEB 的抗体反应活性:**使用依据反相乳胶凝集反应检测金黄色葡萄球菌肠毒素的试剂盒。试剂盒由日本デンカ生研株氏会社生产,按说明书操作。

## 2 结 果

### 2.1 *seb* 基因的扩增

以金黄色葡萄球菌 STSw 基因组 DNA 为模板,

SEB-R 和 SEB-F 为引物可以有效地扩增出所预期的约 700bp 的 *seb* 基因特异带。在模板稀释 500 倍,退火温度 59℃ 条件下大量扩增了 *seb* 基因(图 1)。提高退火温度和降低模板浓度对提高特异性带产量是非常有效的。

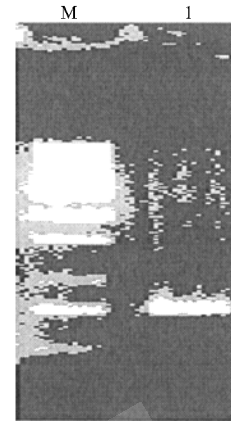


图 1 PCR 法扩增 *seb* 基因

Fig. 1 Amplification of *seb* gene by PCR

M. Marker(1kb); 1. The annealing temperature is 59℃ and the concentration of template is 1/500 of the original concentration

### 2.2 基因与载体的连接、转化及鉴定

pGEM-7Zf 载体和 PCR 产物分别用 *Hind* III 和 *Kpn* I 进行双酶切和纯化,处理后的连接物转化 *E. coli* DH5α 感受态细胞,在选择性平板上挑选 5 个白色菌落用 *Hind* III 和 *Kpn* I 双酶切,编号为 1 和 5 两个菌的质粒,释放出约 700bp DNA 片段(如图 2 所示),证明这 2 个菌即是转化子。

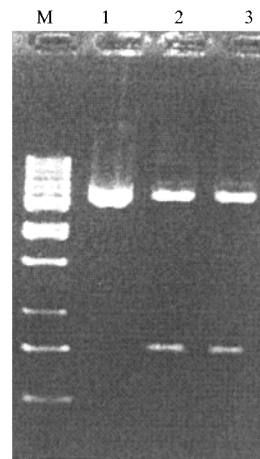


图 2 双酶切鉴定重组质粒

Fig. 2 Determination of the recombinant plasmid by means of double enzyme cleavage

M. 1kb marker; 1. pGEM-7Zf(+) plasmid digested by *Sac* I; 2, 3. The recombinant plasmid digested by *Hind* III and *kpn* I

### 2.3 重组质粒的测序

两个转化子重组质粒测序结果表明,所克隆的 DNA 片段含有 *seb* 的 717bp 成熟蛋白基因,其碱基序列与文献报道<sup>[8]</sup>一致。

### 2.4 构建含 *Nde*I 和 *Hind* III 酶切位点的 *seb* 基因的克隆

用 *pfu* 酶,以 7ZTS-*seb* 为模板,利用 1.2.7 节中设计的一对引物扩增出 720bp 的目的片段,利用柱回收试剂盒回收此片段,并采用 *Nde*I 和 *Hind* III 双酶切此片段,得到具有双粘性末端的目的基因片段。

### 2.5 目的基因与 7ZTS 载体的连接 转化和鉴定

将双切后的目的基因与同样双酶切的 7ZTS 载体于 15℃ 连接过夜。连接物处理后,转化 *E. coli* JM109( DE3 )。挑选 7 个白色转化子,提取质粒进行双酶切鉴定。用 *Hind* III 和 *Nde*I 对质粒双酶切,产生 720bp 的 DNA 片段,初步证实了这 7 个菌株都是转化子。取 7 个转化子中编号为 3 号菌株质粒进行 DNA 序列的测定。测序结果表明,*seb* 基因完全按预先设计方式连接到 7ZTS 载体上,碱基序列完全正确。

### 2.6 SEB 的表达

将 3 号菌 JM109( DE3 )-*seb* 在 LB 培养基中培养,经 IPTG 诱导后收集菌体,进行 SDS-PAGE 电泳,在 JM109( DE3 )-*seb* 的细胞蛋白电泳图谱中有一明显表达带,分子量约 27.1kD(见图 3)。560nm 波长的薄层扫描显示此表达蛋白占菌体总蛋白的 33.5%。表达的 SEB 大多是可溶性的,约占总 SEB 的 70%。

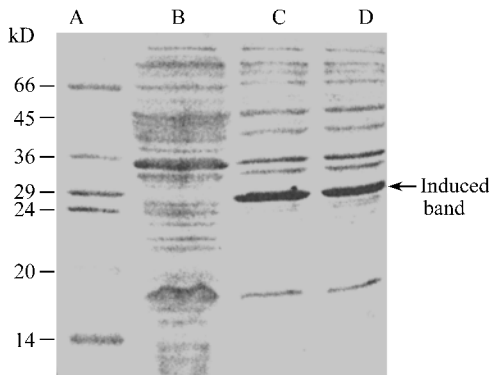


图 3 细胞总蛋白的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳

Fig. 3 SDS-polyacrylamide electrophoresis of JM109( DE3 )-*seb*

- A. Protein marker, middle( 14-66kD ); B. JM109( DE3 ) with 7ZTS ;  
C. The total proteins of JM109( DE3 )-7ZTS-*seb* ; D. The soluble proteins of JM109( DE3 )-7ZTS-*seb*

### 2.7 工程菌表达的 SEB 的免疫活性测定

所克隆的工程菌产生的肠毒素 B 和天然的肠毒素 B 一样都能与天然肠毒素 B 产生的抗体发生凝集作用,表明工程菌表达的 SEB 和天然的 SEB 在免疫功能上没有区别。

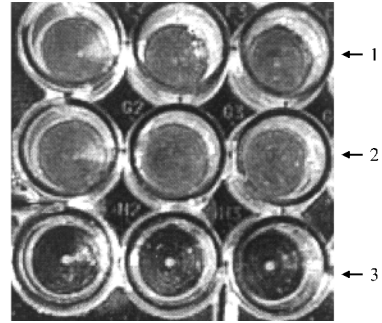


图 4 反相乳胶凝集反应

Fig. 4 The reverse phase latex agglutinations

1. SEB produced by engineered strain 2. SEB standard 3. Control

## 3 讨论

我们利用 *Taq* 酶成功地从金葡菌基因组中扩增出 *seb* 基因,而利用 *pfu* 进行过多次实验都扩增不出任何条带。*pfu* 具有很强的 3'→5' 外切酶活性,因此具有高保真的性质。它能很强烈地降解短链或 A、T 含量高的引物,导致在利用此类引物进行 PCR 时遇到困难。我们利用 *Pfu* 扩增 *seb* 基因失败可能与引物 A、T 含量太高有关。

在本工作中,我们使用了自己构建的 7ZTS 表达载体<sup>[9]</sup>。此表达载体具有强的 T7 启动子, T7 噬菌体基因 10 的 SD 序列和 T7 终止子,能高效表达天然蛋白基因。SEB 的高表达进一步验证了 7ZTS 表达载体的高效性。

基因工程菌 JM109( DE3 )-7ZTS-*seb* 所表达的 SEB 绝大部分以可溶性形式存在,并且它还能与 SEB 抗体发生特异性相互作用。此实验结果表明,基因工程菌所表达的 SEB 与天然 SEB 在空间结构上可能相同或十分相似。反相乳胶凝集试验是 SEB 具有生物学活性的一个佐证。

在 *seb* 基因高表达的基础上,我们打算利用蛋白质工程法改造 SEB 分子以降低其毒性,并开发新型的 SEB 导向药物。

### REFERENCES(参考文献)

- [ 1 ] Bergdoll M S. Staphylococcal intoxications, New York: Academic Press, 1979

- coccal enterotoxins : role of class II molecules and T cell surface structure. *Cell Immunol*, 1989, **120**( 1 ) 92 ~ 101
- [ 3 ] Philippa M , John K. The staphylococcal enterotoxins and their relatives. *Science*, 1990, **148** :705 ~ 711
- [ 4 ] Ochi A , Migita K , Xu J *et al.* *In vivo* tumor immunotherapy by a bacterial superantigen. *J Immunol*, 1993, **151**( 6 ) 3180 ~ 3186
- [ 5 ] Pulaski B A , Terman D S , Khan S *et al.* Cooperativity of Staphylococcal aureus enterotoxin B superantigen , major histocompatibility complex class II , and CD80 for immunotherapy of advanced spontaneous metastases in a clinically relevant postoperative mouse breast

- cancer model. *Cancer Res*, 2000, **15** ~~60~~( 10 ) 2710 ~ 2715
- [ 6 ] Ausubel F *et al.* Short protocol in molecular biology. 3<sup>rd</sup>( 精编分子生物学实验指南 , 第三版 ) , Science press ,1999
- [ 7 ] Sambrook J , Fritsch E F , Maniatis T. Molecular cloning : A laboratory Manual. 2<sup>nd</sup>( 分子克隆实验指南 , 第二版 ) , Science press ,1998
- [ 8 ] Christopher L Jones , Saleem A Khan. Nucleotide sequence of the Enterotoxin B gene from staphylococcus aureus. *Journal of Bacteriology*, 1986, **166**( 1 ) 29 ~ 33
- [ 9 ] Chinese patents. No : 02109681.3

## Cloning of Staphylococcal Enterotoxin B Gene and Its Highly Expression in *Escherichia coli*

YANG Li-Quan WU Wen-Fang\* SHI Cheng-Bo LU An-Guo FENG Jia-Xun\*\* BAI Xue-Liang\*\*

( Shenyang Institute of Applied Ecology of Chinese Academy of Science , Shenyang 110015 , China )

**Abstract** An about 700 bp DNA fragment was amplified from genome DNA of *S. aureus* TSTw by PCR. This fragment was cloned into pGEM-7ZK( + ) and the recombinant plasmid was transformed into *E. coli* DH5 $\alpha$ . The sequencing result of the recombinant plasmid demonstrated that it contains seb gene with 717 bp( without signal encoding region of 81 bp ) which has the same nucleotide sequence as described in literature. The seb gene was cloned into expression vector 7ZTS and was transformed into *E. coli* JM109( DE3 ). The expression level of SEB was as high as 33.3% of the cell total proteins.

**Key words** SEB , gene cloning and expression , superantigen

Received : 04-12-2002

This work was supported by Grant from Shenyang Community of Science and Technology ( No. 2001221-03 ) and from Eternal Technology Group Ltd.

\* Corresponding author. Tel : 86-24-23916244 ; E-mail : w2fl@sina.com

## 消除病原菌的酶

在自然界 , 生物之间的拮抗关系是客观存在的 , 科研人员利用这种关系为医疗服务 , 用于治疗疾病。对一切病原菌( 致病菌 ) 都有可能通过两条途径以治之 : 一是利用致病菌的天然拮抗体来治疗 ; 二是藉助酶的特定功能来消灭病原体。就前者而言 , 如常见的肺炎病症是肺炎链球菌( *Streptococcus pneumoniae* ) 感染的结果 , 对它的致命拮抗体 , 主要有两类 : 一是肺炎链球菌的噬菌体 ; 二是肺炎链球菌的蛭弧菌( *Bdellovibrio* ) 。两者的功能是一致的 , 均营寄生生活 , 不过肺炎链球菌噬菌体是细菌病毒 , 而蛭弧菌则完全具有真细菌一般结构 , 对其结构与功能需进一步研究。至于用酶的特定功能来破灭病原体 , 这是应用于工业、农业、医药等领域值得深入探究的重要课题 , 特别是在医学领域里 , 耐药性、抗药性以及赖药性已引起临床医学的高度重视。新型酶制剂及其应用研究与开发将为人类制服( 或杀灭 ) 某些重要病原菌( 包括耐药性或赖药性菌株 ) 找到一条新途径。有两方面的研究成果 : 一是肺炎链球菌噬菌体产生一种水解酶即酰胺酶( *amidase-Pal* ) , 有些用于临床实践 , 实验室试验研究结果表明 , 利用这种酶杀灭此种病原菌只要几秒钟 , 经该酶处理之后 , 即可杀灭 15 种常见的血清型肺炎链球菌 , 还包手对青霉素产生抗药性的菌 , 其杀伤力非常显著。用患此病的实验小鼠试验所获结果证明 , 利用这种酰胺酶 Pal 处理一个疗程( 通过口、鼻各缓慢滴入 50 $\mu$ L 或 700 单位 ) 之后 5h , 肺炎链球菌被消灭 , 对人体咽部的正常微生物几乎没有任何副作用。由此可见 , 源于肺炎链球菌噬菌体的酰胺酶 Pal 有些制成酶制剂用于临床 , 既能清除肺炎链球菌 , 又不影响正常菌群 , 很有开发价值。二是杀灭耐药金黄色葡萄球菌( *Staphylococcus aureus* ) 的溶葡萄球菌酶。我国上海复旦大学研究人员经过多年的研究 , 开发一类针对某些耐药性病原菌和用于日常消毒领域的酶制产品 , 他们称之为多功能的 FE 复合型酶制剂 , 其中含有通过基因克隆的溶葡萄球菌酶。此 FE 复合型酶制剂产品不仅杀灭耐药性金葡球菌 , 表现它的有效性和稳定性 , 而且在日常消毒方面得到广泛应用 , 具有广谱的杀菌作用。目前 , 这种复合型生物酶制剂产品在我国上海已实现产业化 , 展现出广阔的应用前景。

( 柯 为 )