DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.01.018
第26卷第1期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 1
2004年1月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jan. 2004

文章编号:1000-5404(2004)01-0047-03

论著

超抗原SED突变体的构建表达和鉴定

李亚斐[1],朱锡华[2],黄云辉[2],杨 劲[2] (第三军医大学:[1]军事预防医学系流行病学教研室;[2]基础医学部全军免疫学研究所,重庆 400038)

提 要:目的 在预测的SED免疫识别活性位点处引入定点突变,构建SED突变体。方法 分别设计侧翼引物和突变引物,用megaprimer PCR方法引入突变碱基,将PCR产物与pTrcHis-B质粒连接,转化*E. coli* DH5α,用IPTG进行诱导表达,金属螯合亲和层析法纯化,免疫印迹检测纯化的蛋白。结果 测序结果表明在相应的位置引入了正确突变;SDS-PAGE和免疫印迹检测结果证实了目的蛋白的表达,将构建成功的突变体分别命名为SEDN23A、SEDN23A/H26R、SEDF45A、SEDL59A、SEDN61A、SEDI92A和SEDF203A。结论 成功构建了一系列SED突变体,为后续的免疫识别研究奠定了基础。

关键词:超抗原;葡萄球菌肠毒素D;突变体
中图法分类号:R392.11;R392.13;R394-33 文献标识码:A

Construction and identification of expression of superantigen SED mutants

LI Ya-fei[1], ZHU Xi-hua[2], HUANG Yun-hui[2], YANG Jin[2] ([1]Department of Epidemiology, College of Preventive Medicine, [2]Institute of Immunology, College of Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: **Objective** To construct staphylococcal enterotoxin D (SED) mutants expressed in *Escherichia coli* (*E. coli*). **Methods** The expected mutants were introduced into the SED DNA by megaprimer PCR method. The PCR products ligated to plasmid pTrcHis-B were transformed into *E. coli* DH5α for IPTG-induced expression. The target protein was purified by Ni-NTA metal-affinity chromatography and analyzed by SDS-PAGE and immunoblotting. **Results** The sequencing results showed that mutant nucleic acids were successfully introduced at the expected sites of SED gene. SDS-PAGE and immunoblotting confirmed that the proteins of SED mutants were obtained by Ni-NTA metal-affinity chromatography. The mutants were named as SEDN23A, SEDN23A/H26R, SEDF45A, SEDL59A, SEDN61A, SEDI92A, and SEDF203A, respectively. **Conclusion** Several SED mutants are successfully constructed, which lays a foundation for subsequent studies of immune recognition of SED.

Key words: superantigen; staphylococcal enterotoxin D; mutants

超抗原是一类新型蛋白质抗原分子,主要是一些细菌、病毒及支原体等微生物的分泌或代谢产物。超抗原的两大特点决定了其与普通抗原有着本质的区别:第一,它不需要抗原提呈细胞的内处理,而是以完整蛋白质的形式直接与主要组织相容性复合物Ⅱ类分子(major histocompatibility complex, MHCII)抗原结合槽的外侧特异性结合;第二,超抗原与T细胞的识别仅涉及TCR五个可变区(Vα、Jα、Vβ、Dβ和Jβ)中的Vβ。一种超抗原往往有数种T细胞受体Vβ(T cell receptor Vβ,TCRVβ)特异性,所以可激活比普通抗原高达10^3~10^5倍的T淋巴细胞,这一特性决定了超抗原具有强大的免疫刺激功能,也赋予了超抗原不同寻常的临床意义。

金黄色葡萄球菌超抗原家族由于涉及的疾病谱非常广泛,一直是比较活跃的研究领域。目前发现的金黄色葡萄球菌超抗原分子多达十余种[1,2]。葡萄球菌D型肠毒素(staphylococcal enterotoxin D, SED)是一种常见的毒性作用较强的金黄色葡萄球菌肠毒素,但对其免疫识别的研究相对较少,目前尚无涉及SED与TCR和MHC相互作用的研究。定点突变技术是对蛋白质免疫识别的具体部位和关键氨基酸进行精确定位的常用方法。我们对SED可能的活性位点进行预测,运用丙氨酸扫描突变方案,采用大引物PCR方法,构建了一系列SED突变体,为进一步的免疫识别研究及筛选和构建有应用前景的突变体奠定

基金项目:全军"九五"重点科题基金资助项目(96Z039)
Supported by the Key Research Projects of "Ninth Five-year" Plan of PLA (96Z039)
作者简介:李亚斐(1972-),女,河南省汝州市人,博士,讲师,主要从事分子免疫和分子流行病学方面的研究,发表论文5篇。电话:(023)68752286, E-mail: lyafei@hotmial.com
收稿日期:2003-04-28;修回日期:2003-09-20

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒和菌株 pTrcHis-B 由 Karp 教授(university of texas southwestern medical center)惠赠; pTrcHis-SED 重组质粒由本室构建[3]; *E. coli* DH5α。

1.1.2 主要试剂 限制性内切酶 *Eco*RⅠ、*Bam*HⅠ(华美公司); *Taq*DNA 聚合酶(上海生工生物公司); T4 DNA 连接酶(MBI 公司); dNTP(上海生工生物公司); 凝胶回收试剂盒(MILLIPORE 公司)。

1.1.3 引物 按 GeneBank 公布的 SED cDNA 序列, 根据选定的突变位点, 设计引物(上海生工生物公司合成)如下:

侧翼引物:

P1 5′ CGGGATCCGTCAGTAAAAGAGAAAGAATTGC 3′
*Bam*HⅠ

P2 5′ CCGGAATTCAATGGCTTTAGTGTCTGATG 3′
*Eco*RⅠ

R1 5′ GGAATTGGGCATCGATTAACT 3′

突变引物:

T23 5′ GTTTCATCGCATTTAGCGCGGTACT 3′

T45 5′ CTAACGCTTGATCTCCTGTACT 3′

T59 5′ TCAAAATTGATCGCGTCAGTAA 3′

T61 5′ AATCTTCAAACGCGATAAGGTCAGT 3′

T92 5′ AACAATTCGCGCTATATCT 3′

T203 5′ AAGGGTGATGCGCCCGAAAAAC 3′

1.2 方法

1.2.1 大引物法引入突变 参照文献[4]介绍的方法。原理如图 1。第一轮 PCR 产物片段纯化后用作大引物, 第二轮 PCR 产物酶切后用于连接。

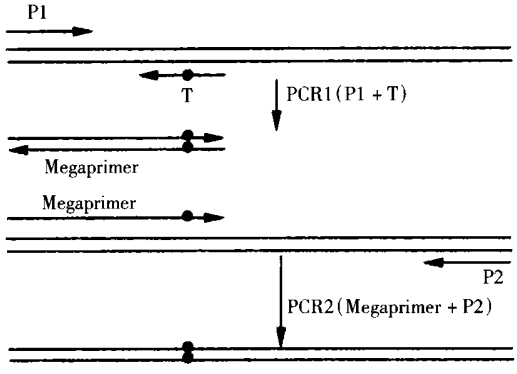


图 1 大引物 PCR 定点突变示意图

Fig 1 Schematic construction of mutants by megaprimer PCR method

1.2.2 突变体表达载体的构建 pTrcHis-B 质粒和 PCR 回收产物分别经 *Eco*RⅠ 和 *Bam*HⅠ 双酶切后进行连接反应。阳性重组子的筛选、鉴定均参照文献[5]进行。

1.2.3 序列测定 采用 PE310 型 DNA 自动测序仪进行双脱氧末端终止法测序, 由基康公司完成。用 Vector NTI Version6.0 软件的 AlignX 进行多重序列比较。测序引物如下。

上游引物: 5′ GAGGTATATATTAATGTATCG 3′

下游引物: 5′ GATTTAATCTGTATCAGG 3′

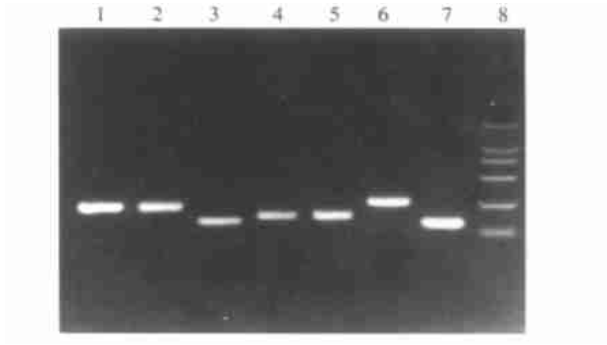
1.2.4 SED 突变体的表达和纯化 取 10 ml 重组 DH5α(已转化 pTrcHis-SED)过夜饱和培养菌, 接种于 1 L LB(含 Amp 50 μg/ml), 37 ℃振荡至 A_{600}为 0.6, 加入 IPTG 至浓度为 1 mmol/L, 37 ℃ 振荡培养 5 h, 4 ℃离心收集细菌。将收集的细菌 50 倍浓缩溶于裂解液中, 加入溶菌酶至 100 μg/ml, 冰上孵育 30 min。冰上超声破菌后离心, 取上清。在制备好的细菌裂解液中加入 Ni-NTA 树脂(1 ml 树脂/4 ml 裂解液), 4 ℃温和摇动孵育 1 h。将 Ni-NTA 树脂装柱。缓冲液反复洗柱, 直至流出液 A_{280}小于 0.01。用 10 ml 的洗脱缓冲液洗脱蛋白, 收集洗脱液。取各组分洗脱液 5 μl, 进行 SDS-PAGE 凝胶分析, 初步鉴定蛋白的量和纯度。将蛋白含量和纯度较高的组分混合, PEG-6000 浓缩蛋白溶液。浓缩的蛋白溶液于 PBS 中充分透析, 准确定量后, 分装成小份, -70 ℃冻存备用。

1.2.5 SED 突变体表达产物的免疫印迹分析 参照文献[5]介绍的方法进行。

2 结果

2.1 大引物片段的 PCR 扩增

引物 R1/T23、P1/T45、P1/T59、P1/T61、P1/T92、P2/T203 分别以回收的 SED DNA 为模板扩增, 产物经 2% 的琼脂糖凝胶电泳检测, 结果见图 2。



1, 2: Product of PCR with R1/T23: 218 bp; 3: Product of PCR with P1/T45: 160 bp; 4: Product of PCR with P1/T29: 189 bp; 5: Product of PCR with P1/T61: 192 bp; 6: Product of PCR with P1/T92: 283 bp; 7: Product of PCR with P2/T203: 149 bp; 8: DNA Marker DL2 000: 2 000, 1 000, 750 500, 250 100 bp

图 2 PCR 扩增的大引物片段

Fig 2 Purified SED mutants by SDS-PAGE analysis

2.2 SED 突变体全长 DNA 片段的扩增

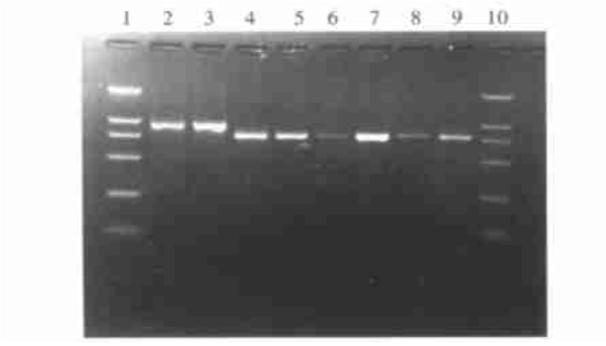
琼脂糖凝胶回收大引物片段, 各大引物分别与相应的侧翼引物以回收的 SED DNA 为模板扩增, 产物经 2% 的琼脂糖凝胶电泳检测, 结果见图 3。

2.3 突变体表达载体的构建及酶切鉴定

将 SED 突变体全长 PCR 产物酶切后与 pTrcHis-B 连

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

接, 转化 DH5α, 挑取可疑阳性单菌落, 小量抽提质粒后, 进行酶切鉴定。结果可见 744 bp 的插入片段。



1, 10: DNA Marker DL2 000; 2 000, 1 000, 750, 500, 250, 100 bp; 2, 3: Product of PCR with megaprimer R1/T23 and P2: 915 bp; 4—7: Products of PCR respectively with megaprimer P1/T45, P1/T59, P1/T61, P1/T92, P2/T203 and P2: 744 bp; 8: Product of PCR with megaprimer P2/T203 and P1: 744 bp; 9: Product with P1/P2 PCR: 744 bp

图 3　PCR 扩增的突变体全长 DNA

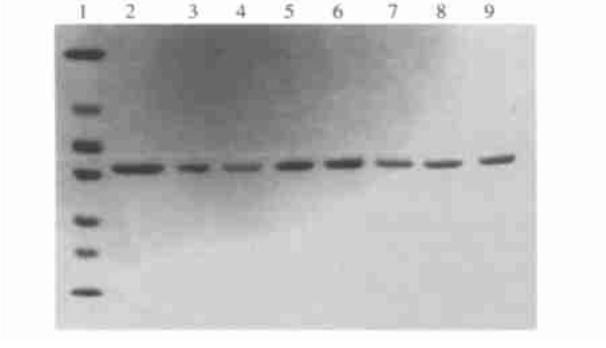
Fig 3　PCR products of full-length DNA of mutants

2.4　序列测定

测序结果表明在 45、59、61、92、203 位氨基酸对应的 DNA 序列处均引入了正确的突变, 其它位点未见突变。此外, 在 23 位氨基酸对应的 DNA 序列处引入突变的同时, 26 位氨基酸对应的 DNA 序列处有一随机突变, 将 His 突变为 Arg, 重复测序确证后, 保留此双突变。重新构建 23 位的单突变体, 测序验证引入正确突变。将构建成功的突变体分别命名为 SEDN23A、SEDN23A/H26R、SEDF45A、SEDL59A、SEDN61A、SEDI92A 和 SEDF203A。

2.5　SED 突变体的表达、纯化和鉴定

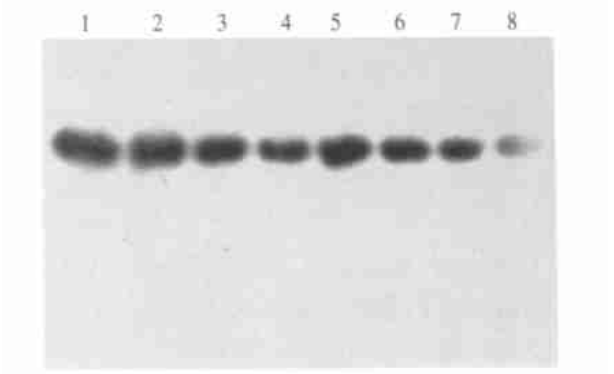
阳性重组菌经大规模诱导表达后, 经 Ni-NTA 柱进行纯化, SDS-PAGE 分析结果, 见图 4。将纯化的突变体蛋白进行免疫印迹分析, 结果在与 SED 同样大小的位置处出现特异结合带(图 5)。



1: Middle molecular weight protein markers: 66, 45, 36, 29, 24, 20.1, 14.2 $\times 10^3$; 2: Purified SED: 30×10^3; 3—9: Purified SEDN23A, SEDN23A/H26R, SEDL59A, SEDN61A, SEDI92A, and SEDF203A

图 4　SDS-PAGE 分析纯化的 SED 突变体

Fig 4　Analysis of purified SED mutants by SDS-PAGE



1: SED; 2—8: SEDN23A, SEDN23A/H26R, SEDL59A, SEDN61A, SEDI92A, and SEDF203A

图 5　SED 突变体蛋白的免疫印迹分析

Fig 5　Immunoblot analysis of SED mutants

3　讨论

近十年来, 超抗原一直是免疫学研究中的热门课题之一[6]。业已证明, 超抗原参与多种感染性疾病、自身免疫性疾病甚至艾滋病的发病过程[7]。对超抗原免疫识别机制的深入研究, 可望进一步为相关疾病的防治提供新的方法。针对细菌性超抗原的 TCR 或 MHC 结合位点, 将其进行改造后制成超抗原减毒预防性疫苗, 可用于预防细菌感染引起的毒素休克综合征[8]。此外, 超抗原所活化的大量 T 细胞以及活化细胞所分泌的大量细胞因子对肿瘤细胞具有强大的杀伤作用, 而针对超抗原的免疫识别位点, 将超抗原改造成人体可耐受的免疫毒素, 可望成为新一代抗肿瘤免疫分子[9]。因此对超抗原免疫识别的研究具有重要的理论和应用价值。

运用定点突变技术进行超抗原免疫识别的研究是一种快速、有效的方法。但存在的风险是局部氨基酸的突变可能影响整个蛋白质的折叠或稳定性, 因此, 氨基酸的替换应尽量避免引起蛋白质整体构象的变化。除了突变位点的选择外, 替换氨基酸种类的选择也对保持蛋白质整体构象至关重要。丙氨酸是 20 种氨基酸中最没有"个性"的氨基酸, 既没有侧链和特别的构象, 也没有化学反应性, 可以出现在蛋白质结构的任何部位, 因此, 用丙氨酸替换可删除氨基酸的侧链, 使局部空间位阻和静电势能最小化, 而保持蛋白质的基本构象不变。鉴于此, 本研究利用常用的丙氨酸扫描突变(alanine scanning mutagenesis)来替换被突变的氨基酸残基。

目前在克隆化 DNA 中引入突变的方案有多种, 大致可分为四类: ①寡核苷酸介导的诱变; ②基因合

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

成;③区域特异性诱变;④利用 PCR 引入突变。在上述几种方法中,PCR 最适合于在 DNA 中导入预期的定点突变,该方法简便、快速,而且引入突变的效率极高,理论上可达 100%。目前常用的两种引入突变的 PCR 方法为重叠区扩增基因拼接法(gene splicing by overlap extension, gene SOEing)[10]和大引物 PCR(megaprimer PCR)[11]。重叠区扩增基因拼接法需要两个侧引物,两个突变引物,3 次 PCR,才能构建一个突变体。而大引物 PCR 只需一个突变引物,2 次 PCR 即能构建一个突变体,是目前 PCR 突变方法中最简便、最经济、最有效的方法,因此,本研究选用大引物 PCR 法在选定的位点成功引入了预期突变。

总上,本研究在已建立 SED 原核表达系统的基础上,在预测的 SED 活性位点处引入了定点突变,并对突变体进行了原核表达和纯化,为 SED 免疫识别研究及筛选有应用前景的突变体奠定了基础。

参考文献:

[1] Marrack P, Kappler J. The staphylococcal enterotoxins and their relatives[J]. Science, 1990, 248(4956): 705-711.

[2] Munson S H, Tremaine M T, Betley M J, *et al*. Identification and characterization of staphylococcal enterotoxin types G and I from *Staphylococcus aureus*[J]. Infect Immun, 1998, 66(7): 3337-3348.

[3] 李亚斐, 朱锡华, 黄云辉, 等. 超抗原 SED 在大肠杆菌中的原核表达[J]. 免疫学杂志, 2002, 18(2): 92-94.

[4] Barik S. Site-directed mutagenesis in vitro by megaprimer PCR[J]. Methods Mol Biol, 1996, 57: 203-215.

[5] J. 萨姆布鲁克, E. F. 弗里奇, T. 曼尼阿蒂斯. 分子克隆实验指南[M]. 北京: 科学出版社, 1992. 16-56, 888-897.

[6] 李亚斐. 细菌性超抗原的结构及其免疫识别[J]. 国外医学免疫学分册, 2002, 25(5): 256-258.

[7] Kotzin B L, Leung D Y, Kappler J, *et al*. Superantigens and their potential role in human disease[J]. Adv Immunol, 1993, 54: 99-166.

[8] Bavari S, Dyas B, Ulrich R G. Superantigen vaccines: a comparative study of genetically attenuated receptor-binding mutants of staphylococcal enterotoxin A[J]. J Infect Dis, 1996, 174(2): 338-345.

[9] Forsberg G, Ohlsson L, Brodin T, *et al*. Therapy of human non-small-cell lung carcinoma using antibody targeting of a modified superantigen[J]. Br J Cancer, 2001, 85(1): 129-136.

[10] Aiyar A, Xiang Y, Leis J. Site-directed mutagenesis using overlap extension PCR[J]. Methods Mol Biol, 1996, 57: 177-191.

[11] Ke S H, Madison E L. Rapid and efficient site-directed mutagenesis by single-tube 'megaprimer' PCR method[J]. Nucleic Acids Res, 1997, 25(16): 3371-3372.

(编辑 薛国文)

(上接 46 页)

置是水平位,因为该位置可避免对上方伤口的刺激损伤和晶体襻脱出。调整时,应用晶体钩交替压缩上、下弹性襻,使之离开房角接触后再旋转到位,切不可随意旋转,以免造成大范围房角损伤或虹膜根部离断。有时后房压力高,虹膜膨隆明显,或瞳孔缩小不明显,使旋转困难,这时不必强求将襻调整到水平位,只须将襻调整到离开角巩缘切口就可以了。本组近 1/3 病例未完全调整到水平位,术后效果及反应与调整到水平位者无明显区别。⑤常规作虹膜周切。因为前房晶体植入者均存在晶体后囊膜破损或缺如,容易产生瞳孔阻滞,引起青光眼及前房变浅,晶体接触损伤内皮,所以本组在晶体植入后均常规作了虹膜周切,从而避免了上述并发症。注意周切孔不要靠近晶体襻,以免襻对切口产生刺激。

3.3 前房晶体植入的优点

前房晶体植入的效果是良好的,本组 76.9%术眼术后视力在 0.5 以上,与一般后房型人工晶体植入的效果相似,术后视力较差者,主要与同时存在的角膜白斑、眼底病变等因素有关。

在不适合植入普通后房晶体的情况下,植入新型前房人工晶体可能比植入缝线固定型后房晶体具有更多的优点。其一是前房晶体植入操作较简单,植入较容易,而缝线固定型晶体植入的操作则较复杂,植入较困难。其二是前房晶体植入并发症较少而轻,安全度较大。由于新型襻弹性好,且设计为四点固定,在前房内固定良好,不会因为眼球运动而在前房内活动,克服了以前硬质闭合襻引起房角和内皮严重损伤、炎症反应重的缺点。本组 2 例术中出血是因为初期植入时经验不足,旋转晶体时对襻未足够压缩离开房角,以致损伤虹膜根部引起出血,操作熟练后是完全可以避免的。术后前房积血主要是巩膜隧道切口出血,与晶体本身无关。术后炎症反应较重或角膜水肿较明显者,主要是白内障摘除时操作较多,或外伤本身引起的炎症反应所致,而与晶体植入关系可能较小。而缝线固定型后房晶体植入时,缝针穿过睫状沟易引起眼内出血,且出血常进入玻璃体而难于吸收,同时操作较多,对玻璃体搅动大,术后炎症反应也可能较重。另外,前房晶体发生倾斜的情况也比缝线固定型后房晶体少[5]。

关键词: 前房; 人工晶体

中图法分类号: R318.18; R779.6 文献标识码: B

参考文献:

[1] Auffarth G U, Wesendahl T A, Brown S J, *et al*. Are there acceptable anterior chamber intraocular lenses for clinical use in the 1990s? An analysis of 4104 explanted anterior chamber intraocular lenses[J]. Ophthalmology, 1994, 101(12): 1913-1922.

[2] Weene L E. Flexible open-loop anterior chamber intraocular lens implants[J]. Ophthalmolgy, 1993, 100(11): 1636-1639.

[3] 何守志, 郝燕霞, 李晓陵, 等. 新型弹性开放襻前房型人工晶体二期植入[J]. 中华眼科杂志, 1996, 32(4): 282-284.

[4] 宋维贤, 施玉英, 王 钢. 前房型人工晶体 36 例临床分析[J]. 中国实用眼科杂志, 1995, 13(5): 267-269.

[5] 李凤鸣. 眼科全书[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1996. 1690-1691.

(编辑 陈聪连)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net