

金黄色葡萄球菌 SEG 蛋白 B 细胞线性表位的预测与验证

梁明燕, 戚莉芳, 李瑾年*, 张婷婷

(安徽农业大学动物科技学院, 合肥 230036)

摘要: 以金黄色葡萄球菌标准株 ATCC25923 的肠毒素 G 蛋白 (SEG) 氨基酸序列为分析材料, 应用 DNASTar 软件对该蛋白的二级结构、柔性区域、亲水性、表面可能性和抗原指数等参数进行综合分析, 预测出 SEG 蛋白 5 个可能的 B 细胞线性表位, 它们分别位于蛋白 N 端第 24~31、37~46、80~84、120~127 和 141~149 区域, 且预测的表位 2 (aa 37~46)、表位 4 (aa120~127) 和表位 5 (aa141~149) 位于 SEG 蛋白三维结构表面。合成位于蛋白三维结构表面的 3 个预测表位, 采用肽 ELISA 方法加以鉴定。结果表明, 它们均能与抗重组 SEG 蛋白纯化抗体发生特异性结合反应, 是 SEG 蛋白的 B 细胞线性表位。

关键词: 金黄色葡萄球菌; SEG 蛋白; B 细胞线性表位; 预测; 肽 ELISA

中图分类号: S852.61

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X (2013)03-0426-04

Prediction and verification of the linear B-cell epitopes of staphylococcal enterotoxin G protein

Liang Ming-yan, QI Li-fang, Li Jin-nian, ZHANG Ting-ting

(School of Animal Science and Technology, Anhui Agricultural University, Hefei 230036)

Abstract: In order to locate the B-cell linear epitopes of SEG protein, epitope prediction was performed using the amino acid sequence of SEG protein from *Staphylococcus aureus* standard strain ATCC25923. The secondary structure, flexible regions, hydrophilicity, surface accessibility and antigenic index of the protein were analyzed using the DNASTar Protean program, and five potential epitopes were screened, which were located at amino acid positions 24 to 31, 37 to 46, 80 to 84, 120 to 127 and 141 to 149. Among them, the epitopes at amino acid positions 37 to 46, 120 to 127 and 141 to 149 were entirely exposed on the surface of the 3D structure model of SEG protein. To verify the prediction, three potential epitope peptides exposed on the surface of the 3D structure were artificially synthesized and detected by peptide-ELISA. The results showed that the three potential epitopes exposed on the surface of the 3D structure had a specific binding to purified antibodies against SEG protein. They were indeed B-cell linear epitopes of the SEG protein.

Key words: *Staphylococcus aureus*; SEG protein; B-cell linear epitopes; prediction; peptide ELISA

金黄色葡萄球菌肠毒素 (staphylococcal enterotoxin, SE) 是由血浆凝固酶或耐热核酸酶阳性金黄色葡萄球菌分泌的一类结构相关、毒力相似、抗原性不同的耐热性胞外蛋白质^[1]。近年来, 国内每年由金黄色葡萄球菌肠毒素引起的食物中毒越来越多, 约占细菌性食物中毒 20%~25%^[2]。对此, 我国已将 SE 列为食品卫生检验中的法定检测项目。

国内外研究表明 SE 共有 18 个基因类型, 同一株金黄色葡萄球菌可能携带 2 种或 2 种以上肠毒素

基因, 且不同基因型检出率与菌株的分离地域和宿主来源有关^[3-4]。作者前期研究中采用 PCR 方法检测了 56 株牛乳源金黄色葡萄球菌合肥分离株携带 SE 基因的情况, 结果发现 53 株携带肠毒素基因, 且以 SEG 基因的携带率最高, 达 91.07%。提示应加强对合肥地区原料牛乳中 SEG 的检测。

目前对 SEG 蛋白的检测主要依靠 ELISA 方法, 但其特异性和敏感性仍不能令人满意。抗原表位是抗原分子中决定抗原特异性的特殊化学基团, 可被

收稿日期: 2012-07-13

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31272696) 资助。

作者简介: 梁明燕, 女, 硕士研究生。E-mail: liangmingyan1202@163.com

* 通信作者: 李瑾年, 女, 教授。E-mail: Lijinnian2000@163.com

B 细胞表面受体或抗体特异性识别并相互结合的表位为 B 细胞表位。建立基于抗原表位的 ELISA 方法, 可大大提高检测的特异性和敏感性。鉴于目前尚无 SEG 蛋白 B 细胞线性表位的研究报道, 本研究使用生物信息学软件预测联合试验验证方法筛选鉴定 SEG 蛋白的 B 细胞线性表位, 旨在为建立基于表位的 ELISA 检测方法奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

基因工程重组菌 pMALc4X-SEG/TB1 由本研究室构建。麦芽糖直链淀粉树脂亲和层析柱和兔抗标签蛋白 MBP 抗体购自 NEB 公司, HiTrap Protein G 亲和层析柱和羊抗兔酶标抗体 HRP-IgG 为 Pharmacia 公司产品, 双相乳化佐剂 A5 购自中牧生物佐剂有限公司。实验兔 (2 kg·只⁻¹) 购自于安徽医科大学实验动物中心。

1.2 兔抗重组 SE 蛋白抗体的制备与纯化

取甘油保存的基因工程重组菌 pMALc4X-SEG/TB1 接种 LB 培养液, 37 °C 振荡培养 3 h 至细菌对数生长期, 加入诱导剂 IPTG (终浓度为 0.5 mmol·L⁻¹) 诱导表达 4 h。按常规方法^[5]提取可溶性表达的融合蛋白 MBP-SEG, 并使用麦芽糖直链淀粉树脂亲和层析柱纯化融合蛋白。将纯化的融合蛋白与双相乳化佐剂 A5 等体积混合、充分乳化后, 背部皮下多点免疫家兔, 免疫剂量为 1 mg·只⁻¹。间隔 2 周后, 再加强免疫 1 次, 免疫剂量同上。分别于免疫前和免疫后 28 d 采集兔血分离血清, 使用 HiTrap Protein G 亲和层析柱按产品说明书中操作步骤纯化抗体。用纯化的重组融合蛋白为包被抗原 (5 μg·mL⁻¹), 1:5 000 稀释的羊抗兔 HRP-IgG 为二抗, 采用间接 ELISA 方法测定纯化前后抗体的效价。

1.3 SEG 蛋白 B 细胞线性表位的预测

以金黄色葡萄球菌标准株 ATCC25923 的 SEG 蛋白氨基酸序列 (GenBank 收录号 AY920262) 为分析材料, 应用 DNASTAR 软件中的 Protean 程序预测蛋白的二级结构、柔性区域、氨基酸亲水性、氨基酸表面可能性和抗原指数 (antigenicity index, AI)^[6]。综合分析各参数的预测结果, 筛选出亲水性好、表面可能性高、抗原性指数大、且位于 β-转角、无规则卷曲和柔性区域的序列作为 SEG 可能的 B 细胞线性表位。同时应用 Moe2008 软件模建 SEG 蛋白的三维结构, 使用 Synchronize 可视化程序将预测表位肽展示于蛋白三维结构上, 分析它们在蛋白三维结构中的位置。

1.4 预测表位肽的合成

通过 DNASTAR 软件预测到 SEG 蛋白可能含有 5 个 B 细胞线性表位, 其中预测表位 1 和表位 3 不同程度地镶嵌在 SEG 蛋白三维结构内部, 预测表位 2、表位 4 和表位 5 则完全暴露于三维结构表面。根据优势 B 细胞线性表位的特性, 选取 3 个位于蛋白三维结构表面的预测表位肽, 委托南京金斯瑞生物公司合成用于鉴定, 要求其纯度 >95%。同时合成 1 个无关对照肽 (序列为 TLLLFIAL, 是 SEA 蛋白信号肽的部分序列, 其亲水性, 表面可能性和抗原指数均很低) 作为后续验证试验的对照。

1.5 肽 ELISA 方法鉴定表位

用 0.1 mol·L⁻¹ 碳酸盐缓冲液 (pH 9.6) 稀释合成的预测表位肽和无关对照肽, 按 10 μg·mL⁻¹ 的量包被 ELISA 反应板, 4 °C 过夜。弃去包被液、洗涤 3 次后, 用 5% 脱脂奶粉封闭 24 h。洗涤后分别加 1:10 稀释的兔抗融合蛋白 MBP-SEG 纯化抗体和兔抗标签蛋白 MBP 抗体, 37 °C 作用 1 h, 同时设免疫前兔血清为阴性对照。洗涤后加 1:5 000 稀释的羊抗兔 HRP-IgG, 37 °C 作用 1 h。洗涤后加邻苯二胺 (OPD) 底物液显色 5 min, 测定 OD_{490nm} 值, 实验重复 2 次。

若预测表位肽与兔抗重组 SEG 蛋白抗体反应的 OD_{490nm}(P)/预测表位肽与阴性血清反应的 OD_{490nm}(N) ≥ 2.1, 同时预测表位肽与兔抗标签蛋白 MBP 抗体反应的 OD_{490nm}(P)/预测表位肽与阴性血清反应的 OD_{490nm}(N) < 2.1, 则判断兔抗重组 SEG 蛋白抗体特异性识别了预测表位肽, 该预测表位肽是 SEG 蛋白的真正 B 细胞线性表位, 并根据 P/N 值大小间接判定各表位的免疫反应性强弱。

2 结果与分析

2.1 兔抗重组 MBP-SEG 蛋白抗体的效价

以纯化的融合蛋白为包被抗原, 羊抗兔 HRP-IgG 为二抗, 免疫前兔血清为阴性血清, 采用间接 ELISA 测得纯化前后兔抗重组 SEG 蛋白抗体的效价分别为 1:3 276 800 和 1:819 200, 完全可以满足后续试验的要求。

2.2 预测的 B 细胞线性表位及其在蛋白三维结构上的位置

应用 DNASTAR 软件预测 SEG 蛋白的二级结构、柔性区域、亲水性、表面可能性和抗原指数。综合各参数的预测结果, 筛选出 5 个位于 β 转角、无规则卷曲和柔性区域, 且亲水性指数 ≥ 0、表面可能性指数 ≥ 1 和平均抗原指数 ≥ 1 的氨基酸区段作为 SEG 蛋白可能的 B 细胞线性表位, 它们位于蛋白 N

端第 24~31、37~46、80~84、120~127 和 141~149 区域 (图 1 和表 1)。由图 2 可见, SEG 蛋白的三维结构较为规则, 预测表位 2 (aa37~46)、表位

4 (aa120~127) 和表位 5 (aa141~149) 位于 SEG 蛋白三维结构表面, 预测表位 1 (aa24~31) 和表位 3 不同程度地镶嵌在三维结构内部。

表 1 预测的 SEG 蛋白 B 细胞线性表位肽序列
Table 1 The peptide sequence of predicted B-cell linear epitopes from SEG protein

预测表位序号 Predicted epitope No.	序列位置 Sequence position	氨基酸序列 Amino acid sequence	平均抗原指数 Average AI
1	24aa~31aa	NSQDPDKI	2.01
2	37aa~46aa	VSDYKSNKGT	2.01
3	80aa~84aa	EYKSY	1.89
4	120aa~127aa	KSEPDINQ	2.38
5	141aa~149aa	NSENDRDK	1.92

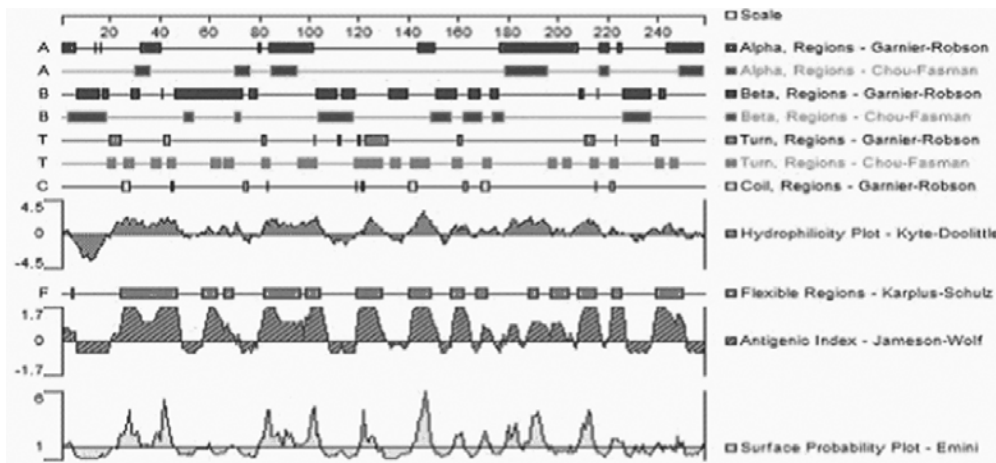
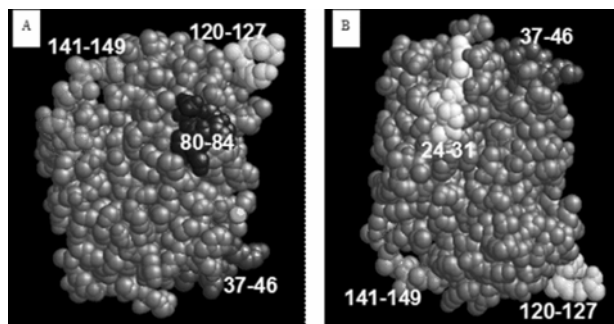


图 1 SEG 蛋白的二级结构和其它参数的预测结果
Figure 1 The predicted secondary structure and various parameters of SEG protein



A、B 分别表示 SEG 蛋白三维结构的正反面 A and B represent the right side and reverse side of 3D structure of the SEG protein

图 2 SEG 蛋白的三维结构及预测表位在蛋白结构上位置
Figure 2 Positions of predicted epitopes in 3D structure of the SEG protein

2.3 预测表位的验证结果

采用肽 ELISA 方法验证 3 个暴露于 SEG 蛋白三维结构表面的预测表位肽。结果由表 2 可见, 3 个预测表位肽均能与 MBP-SEG 纯化抗体发生较强的结合反应 ($P/N \geq 2.1$), 而不能与标签蛋白 MBP 抗体

发生结合反应 ($P/N \leq 2.1$), 无关对照肽与 2 种抗体均不发生结合反应 ($P/N \leq 2.1$), 说明这 3 个预测表位肽与 MBP-SEG 纯化抗体的结合反应是特异性的, 从而证实它们为 SEG 蛋白的 B 细胞线性表位, 并且 3 个表位的免疫反应性强弱依次是表位 5 (aa141~149)、表位 4 (aa120~127) 和表位 2 (aa37~46)。

3 讨论

抗原表位是抗原分子中决定抗原特异性的特殊化学基团。准确而快速地鉴定抗原表位在疾病诊断、单克隆抗体制备、人工疫苗与蛋白质药物设计以及免疫干预治疗等方面具有重要的应用价值^[7-10]。金黄色葡萄球菌肠毒素 (SE) 检测的经典方法是动物实验, 虽然该方法的结果判断直观, 但存在动物来源比较困难, 动物个体差异大, 灵敏度低、特异性较低等不足, 现已不被采用。ELISA 检测是目前检测 SE 最常用的方法, 但仍存在特异性不是很高的问题^[11]。在确定金黄色葡萄球菌肠毒素 G 蛋白

(SEG)抗原表位的基础上,建立基于表位的 ELISA 检测方法,则可大大提高 SEG 检测的特异性和敏感性。然而,目前 SEG 蛋白的 B 细胞线性表位尚不清楚。对此,本研究联合使用表位预测与试验验证

方法首次筛选鉴定了 SEG 蛋白的 3 个 B 细胞线性表位,它们是 SEG 蛋白 N 端第 37~46、120~127 和 141~149 肽段区域。

表 2 肽 ELISA 法检测预测表位肽的免疫反应性
Table 2 Immunoreactivity of the predicted epitope peptides detected by peptide-ELISA

预测表位 Predictive epitope No.	预测表位肽与不同抗体反应的 OD_{490} 值 ($\bar{x} \pm s$) Average OD_{490} value of double wells caused by the reaction between the epitope peptide and different antibody			P/N 比值 P/N value (sample OD value/ OD value of negative control)	
	MBP-SEG Antibody	MBP Antibody	Negative Serum	MBP-SEG antibody /negative serum	MBP antibody /negative serum
	2	1.099±0.839	0.384±0.125 0	0.324±0.041 5	3.392
4	1.069±0.095	0.215±0.049 0	0.242±0.052 0	4.417	0.888
5	0.914±0.086	0.172±0.053 2	0.180±0.013 2	5.078	0.956
参考肽 Reference peptide	0.295±0.065	0.115±0.020 6	0.178±0.025 0	1.657	0.646

DNASTAR 软件是一个预测 B 细胞线性表位的成熟软件,其原理是通过分析蛋白质抗原的氨基酸理化性质和二级结构特点,筛选出亲水性好,表面可能性高,抗原性指数大,且位于 β -转角、无规则卷曲和柔性区域序列作为可能的 B 细胞线性表位^[6]。由于上述所预测的表位可能掩埋于蛋白质三维结构的内部而不能真正发挥抗原作用,导致预测的准确性在 75%左右。为了提高表位预测的可靠性,我们从蛋白质数据库中搜索 SEG 蛋白的同源序列,使用 Moe2008 软件模建 SEG 蛋白三维结构,并将 DNASTAR 软件预测的 5 个可能表位肽展示于 SEG 蛋白三维结构上,选取其中 3 个位于三维结构表面的预测表位进行肽 ELISA 鉴定,从而确定位于 SEG 蛋白 N 端第 37~46、120~127 和 141~149 区域的肽段为 SEG 蛋白的 3 个优势 B 细胞线性表位。我们认为表位预测联合试验验证方法是一种省时、省力和经济的筛选和鉴定优势 B 细胞线性表位的方法。

本研究采用肽 ELISA 鉴定预测表位肽的结果显示 3 个预测表位肽均能与 MBP-SEG 纯化抗体发生特异性反应,且它们的免疫反应性强弱依次是表位 5 (aa141~149)、表位 4 (aa120~127) 和表位 2 (aa37~46),而 DNASTAR 软件预测的平均抗原指数结果显示表位 5 为 1.92,表位 4 为 2.38,表位 2 为 2.01。表明软件预测结果与试验结果仍有一定差距,试验验证是必要的。

参考文献:

[1] Balaban N, Rasooly A. Staphylococcal enterotoxins [J]. Int J Food Microbiol, 2006, 61 (1):1-10.

[2] 姜秀杰, 孙伟, 王广廷, 等. 金黄色葡萄球菌食物中毒病原检测及方法比较[J]. 中国中医药现代远程教育, 2009, 7(7): 48.

[3] Aydin A, Sudagidan M, Muratoglu K. Prevalence of staphylococcal enterotoxins, toxin genes and genetic-relatedness of foodborne *Staphylococcus aureus* strains isolated in the Marmara Region of Turkey [J]. Int J Food Microbiol, 2011, 148(2): 99-106.

[4] 王营, 于宏伟, 郭润芳, 等. 金黄色葡萄球菌肠毒素基因分布的研究[J]. 河北农业大学学报, 2010, 33(5): 84-88.

[5] Joseph S, David W. Molecular Cloning: A Laboratory Manual [M]. New York: Cold Spring Harbor Lab Press, 2001: 1248-1252.

[6] 崔莎莎, 徐松宝, 姜岩硕, 等. 肠出血性大肠埃希菌 O157: H7 紧密黏附素 C300 与 LTB 融合蛋白 B 细胞表位预测[J]. 北华大学学报: 自然科学版, 2011, 12(3): 296-299.

[7] Saravanan P, Shrivastava S, Kumar S. Synthesis of highly immunogenic multiple antigenic peptides for epitopes of viral antigen to use in ELISA [J]. INT J Pept Res Ther, 2009, 15 (4): 313-321.

[8] Okumura M, Yoshimatsu K, Araki K, et al. Epitope analysis of monoclonal antibody E5/G6, which binds to a linear epitope in the nucleocapsid protein of hantaviruses [J]. Arch Virol, 2004, 149 (12): 2427-2434.

[9] Welsh R M, Fujinami R S. Pathogenic epitopes heterologous immunity and vaccine design [J]. Nat Rev Microbiol, 2007, 5(7): 555-563.

[10] Bergot A S, Durgeau A, Levacher B, et al. Antigen quality determines the efficiency of antitumor immune responses generated in the absence of regulatory T cells [J]. Cancer Gene Ther, 2010, 17 (9) : 645-654.

[11] 云盛, 索晓敏, 徐正挺, 等. 金黄色葡萄球菌肠毒素检测的研究进展[J]. 现代生物医学进展, 2012, 12(19): 3756-3758.