

基础研究

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.000441

金黄色葡萄球菌重组表皮剥脱毒素 A 的原核表达

王毅¹, 肖异珠², 杨致邦³, 欧阳莹², 李咏梅², 罗晓燕²

(1. 重庆医科大学基础医学院免疫学教研室, 重庆 400016; 2. 重庆医科大学附属儿童医院皮肤科, 重庆 400014;

3. 重庆医科大学基础医学院病原生物学教研室, 重庆 400016)

【摘要】目的:通过基因工程技术获取重组表皮剥脱毒素 A(recombine exfoliative toxin A, rETA), 为深入研究表皮剥脱毒素的致病机制提供实验材料。**方法:**根据 GenBank 公布的 ETA 基因序列设计引物, 从金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*, *S.aureus*)基因组中扩增 ETA 基因, 插入原核表达载体 pQE30, 构建重组质粒 pQE30-ETA。将 pQE30-ETA 转化表达菌 *E.coli* M15, 优化诱导表达条件, SDS-PAGE 分析重组蛋白的表达, Western blot 鉴定。重组蛋白经 Ni²⁺-NTA 树脂纯化后, 注入 BALB/C 小鼠皮下, 观察皮肤病理改变, 鉴定重组蛋白的生物学活性。**结果:**重组质粒 pQE30-ETA 序列分析显示插入的基因片段全长 927 bp, 与基因文库中的 ETA 序列完全吻合。SDS-PAGE 分析显示表达产物相对分子量约为 27 kD, 在 IPTG 终浓度 0.1 mmol/L, 诱导时间 4 h, 可得到最大表达量的可溶性蛋白, 约为 20%。Western blot 显示与 *S.aureus* 产生的 ETA 蛋白在同一位置, 重组蛋白经 Ni²⁺-NTA 树脂纯化后蛋白纯度达 90% 以上, 注射重组蛋白的小鼠表皮内出现水疱和裂隙。**结论:**成功构建了重组质粒 pQE30-ETA, 表达了具有生物学活性的重组 *S.aureus* 表皮剥脱毒素 A。

【关键词】金黄色葡萄球菌; 葡萄球菌性烫伤样皮肤综合征; 表皮剥脱毒素 A; 原核表达

【中图分类号】R378.1

【文献标志码】A

【收稿日期】2014-08-11

Prokaryotic expression of exfoliative toxin A from *Staphylococcus aureus*Wang Yi¹, Xiao Yizhu², Yang Zhibang³, Ouyang Ying², Li Yongmei², Luo Xiaoyan²

(1. Teaching and Research Section of Immunology, School of Basic Medical Sciences, Chongqing Medical University; 2. Department of Dermatology, The Affiliated Children's Hospital of Chongqing Medical University;

3. Teaching and Research Section of Pathogenic Biology, School of Basic Medical Sciences, Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To obtain the recombine exfoliative toxin A(rETA) by the technique of gene engineering and to provide materials to study the pathogenic mechanism of the exfoliative toxin(ET). **Methods:** The primers were designed according to the gene sequence of ETA gene announced by GeneBank. The ETA gene was amplified from the genome of *S.aureus* and was inserted into the prokaryotic expression vector pQE30. The recombinant plasmid pQE30-ETA was built and was translated into *E.coli* M15. After the expression conditions being optimized, the recombinant plasmid pQE30-ETA was expressed. The expression product was analyzed by SDS-PAGE and confirmed by Western blot. After being purified with Ni²⁺-NTA resin, the purified protein was injected into the subcutaneous of BALB/C mice and pathological modifications of BALB/C mice were observed to identify the biologic activity of the rETA. **Results:** The gene sequence analysis of the recombinant plasmid pQE30-ETA showed that the inserted gene fragment was 927 bp and was corresponded with the ETA gene sequence in GenBank database. The analysis of SDS-PAGE showed that the relative molecular mass of expression was 27 kD and the recombinant solubility protein reached the highest expression(20%) when IPTG being at a final concentration of 0.1 mmol/L and the induction time of 4 h. Western blot showed that the recombinant protein was at the same location with the ETA protein produced by *S.aureus*. The purity of the recombinant protein was over 90% after being purified with Ni²⁺-NTA resin. The splitting and blister were appeared in the epidermis of mouse injected with recombinant protein. **Conclusion:** The construction of the recombinant plasmid pQE30-ETA and the expression of rETA with biologic activity are successful.

【Key words】staphylococcus aureus; staphylococcal scalded skin syndrome; exfoliative toxins A; prokaryotic expression

作者简介: 王毅, Email: 421355043@qq.com,

研究方向: 抗感染免疫研究。

通信作者: 肖异珠, Email: yizhuxiao@sina.com。

优先出版: <http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1046.r.20150112.1651.006.html>

(2015-01-12)

葡萄球菌性烫伤样皮肤综合征(staphylococcal scalded skin syndrome,SSSS)是由金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*,*S.aureus*)产生的表皮剥脱毒素(exfoliative toxin,ET)引起的以皮肤形成浅表水疱为特征的皮肤病,根据其临床表现分为局限型和泛发型,其致病机制和机体的免疫性尚未明了^[1-2]。该病主要影响婴幼儿,但有肾功能衰竭或免疫缺陷的成人也可患此病^[3]。SSSS 的发病率近年来明显上升,并具有较高死亡率和误诊率,深入研究 ET 的致病机制,提高对 SSSS 的诊断和防治水平,具有重要的临床意义^[4-7]。

Melish 和 Glasgow^[8]首次证实 ET 是 SSSS 的致病物质,根据其抗原性,可分为 ETA、ETB、ETC、ETD 4 种血清型,其中 ETA 和 ETB 与人类 SSSS 的发病有关^[9]。编码 ETB 的基因位于 *S.aureus* 的质粒上,编码 ETA 的基因位于 *S.aureus* 的染色体上。Watanabe 等^[10]克隆表达了重组 ETB,对研究 ETB 的致病作用提供了实验材料。本文克隆表达重组 ETA,为深入研究 ET 的致病机制,更有效地防治 SSSS 提供实验材料。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株、质粒和动物 经 PCR 确定产生 ET 的 *S.aureus* 由重庆医科大学附属儿童医院皮肤科从 SSSS 患儿分离并保存^[11]; *E.coli* M15 为第三军医大学基础部微生物学教研室惠赠; *E.coli* DH5 α 、pQE30 质粒为重庆医科大学基础医学院病原生物学教研室保存。清洁级 BALB/C 新生小鼠,6~8 周龄,雌性,体质量 17~20 g,购自重庆医科大学动物实验中心。

1.1.2 主要试剂 质粒提取试剂盒购于 Omega 公司;胶回收试剂盒购于北京盖宁公司;PCR 试剂盒、限制性内切酶(*Bam*H I、*Hind* III)、Tag 酶、T4 DNA 连接酶、小分子量蛋白质 Marker 和 DL2 000 DNA Marker 购于 Takara 公司;绵羊抗 ETA 多克隆 IgG 购于 Abcam 公司,HRP 标记兔抗绵羊 IgG 购于 Bioworld Technology 公司。PVDF 膜购于凯基公司;牛血清白蛋白、琼脂糖、IPTG、SDS、DTT、EDTA、丙烯酰胺、N,N'-亚甲丙烯酰胺、考马斯亮蓝 R250 等均购于 Sigma 公司;LB(Luria-Bertani, LB)培养基、胰蛋白胨、酵母抽提物购于 Oxoid 公司; Ni²⁺-NTA 购于 Qiagen 公司,其它试剂均为分析纯售品。

1.2 方法

1.2.1 目的基因 ETA 的 PCR 扩增 根据 GenBank 公布的 ETA 基因序列(序列号 L25 372、M20 371),用 Premier 5.0 软件设计引物,在上游引物中加入 *Bam*H I 酶切位点,在下游引物中加入 *Hind* III 酶切位点。引物序列如下:P1:5'-CCGGGATCCTTAGGATGATTAATAATGAAT-3';P2:5'-CGT AAGCTTGCAGTCAGCTTCTTACTG-3'。引物由 Invitrogen 公司合成,配制成 5 μ mol/L 贮存液保存。将 *S.aureus* 接种于 LB 培养液中,37 $^{\circ}$ C,200 r/min 振荡培养 12 h。取菌液按细菌基

因组 DNA 提取试剂盒的说明提取 *S.aureus* 基因组 DNA。以提取的 DNA 为模板 PCR 扩增 ETA,扩增条件:94 $^{\circ}$ C 预变性 4 min,94 $^{\circ}$ C 变性 30 s,55 $^{\circ}$ C 退火 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 60 s,共 32 个循环,最后 1 个循环结束后 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。反应体系:Tag DNA 聚合酶 0.25 μ l,10 $\times$ 扩增缓冲液(不含 Mg²⁺)5 μ l,MgCl₂ 3 μ l,4 种 dNTP 混合物 4 μ l,模板 DNA 5 μ l,P1 1 μ l,P2 1 μ l,加无菌超纯水至 50 μ l。反应结束后,取 5 μ l 用 1%琼脂糖凝胶电泳鉴定。

1.2.2 pQE30-ETA 重组质粒的构建 按胶回收试剂盒的操作步骤回收 PCR 扩增产物,并纯化。将纯化产物用 *Bam*H I 和 *Hind* III 双酶切。反应体系:PCR 纯化产物 40 μ l,*Bam*H I 2 μ l,*Hind* III 2 μ l,10 $\times$ K buffer 6 μ l,灭菌纯水 10 μ l,总体积 60 μ l,37 $^{\circ}$ C 水浴 3 h。将含有 pQE30 质粒的 *E.coli* DH5 α 于 37 $^{\circ}$ C,200 r/min 培养 16 h,取 5 ml 菌液提取质粒 pQE30。将提取的 pQE30 质粒用 *Bam*H I 和 *Hind* III 双酶切,反应体系:pQE30 30 μ l,*Bam*H I 1 μ l,*Hind* III 1 μ l,10 $\times$ K buffer 4 μ l,灭菌纯水 4 μ l,总体积共 40 μ l,37 $^{\circ}$ C 水浴 6 h 后,取 5 μ l 电泳鉴定,回收 pQE30 酶切片段。连接 ETA 酶切片段与 pQE30 载体酶切片段,反应体系:ETA 片段 8 μ l,pQE30 酶切片段 2 μ l,T4 DNA 连接酶 1 μ l,T4 Buffer 2.5 μ l,无菌超纯水 11.5 μ l,总体积 25 μ l,16 $^{\circ}$ C 水浴过夜,收集连接产物,命名为 pQE30-ETA。

1.2.3 pQE30-ETA 的鉴定 采用 CaCl₂ 法制备感受态 *E.coli* DH5 α ,将 *E.coli* DH5 α 接种于 LB 平板培养 14 h,挑取单个菌落接种于 3 ml LB 培养液中,37 $^{\circ}$ C 200 r/min 振荡培养 16 h。取培养液按 1:20 的体积加入新鲜 LB 培养液中,200 r/min 振荡培养 3 h 后,取 1.5 ml 菌液,冰浴 10 min,4 $^{\circ}$ C 4 000 r/min 离心 5 min。弃上清液,加入预冷的 100 mmol/L CaCl₂ 2 000 μ l 重悬,置 0 $^{\circ}$ C 冰水浴中 2 h,加入上述连接产物 10 μ l 混悬,于 0 $^{\circ}$ C 冰水浴中 30 min,再在 42 $^{\circ}$ C 下热击 90 s 后立即放入 0 $^{\circ}$ C 冰水浴中 2 min;加入 800 μ l 新鲜 LB 培养液,37 $^{\circ}$ C 60 r/min 振荡培养 1 h。取 100 μ l 菌液涂于含有终浓度为 100 μ g/ml 氨苄青霉素的 LB 平板上,37 $^{\circ}$ C 过夜。挑取生长良好的单个菌落,用含有终浓度为 100 μ g/ml 氨苄青霉素的 LB 培养液增菌后,用质粒提取试剂盒抽提质粒。用 *Bam*H I 与 *Hind* III 双酶切重组质粒 pQE30-ETA,反应体系:pQE30-ETA 质粒 10 μ l,*Bam*H I 2 μ l,*Hind* III 2 μ l,10 $\times$ K buffer 2 μ l,灭菌超纯水 4 μ l,总体积 20 μ l;37 $^{\circ}$ C 水浴 4 h 后电泳鉴定。将经酶切鉴定后的重组质粒送上海生工测序。以 pQE30-ETA 质粒为模板,按 1.2.1 的方法进行扩增,取 5 μ l 扩增产物琼脂糖凝胶电泳,凝胶图像分析仪分析。

1.2.4 重组蛋白的表达及鉴定 取鉴定后的 *E.coli* DH5 α 单个阳性克隆菌落接种于 5 ml 含 100 μ g/ml 氨苄青霉素的 LB 培养液中,37 $^{\circ}$ C 200 r/min 振荡过夜,提取重组质粒 pQE30-ETA,按 1.2.3 的方法将 *E.coli* M15 制备成感受态细菌,将重组质粒 pQE30-ETA 转化入表达菌 *E.coli* M15 中。挑取 1 个阳性克隆 M15 菌落,接种于 2 ml 含 100 μ g/ml 氨苄青霉素和 25 μ g/ml 卡那霉素的 LB 培养液中,同时以含空 pQE30 质粒的 M15 菌和不含质粒的 M15 菌为对照,37 $^{\circ}$ C 150 r/min 振荡过夜。吸取菌液以 1:20 比例转种于新鲜的含氨苄青霉素和卡那霉素的 LB 培养液中,于 37 $^{\circ}$ C 培养至 A_{600nm}=0.4~0.6 时,

加入终浓度分别为 0.1、0.5、1.0 mmol/L 及 2.0 mmol/L 的 IPTG, 分别诱导 1、2、3、4 h 和 24 h, 以确定最适 IPTG 诱导浓度和诱导时间。收集菌液, 5 000 r/min 离心 5 min, 弃上清, 沉淀液用浓度为 5% 的浓缩胶, 12% 的分离胶 SDS-PAGE 电泳, 凝胶图像分析仪分析。以绵羊抗 ETA 多克隆 IgG 为一抗, HRP 标记兔抗绵羊 IgG 为二抗, 产生 ET 的 *S.aureus* 为阳性对照, Western blot 鉴定表达的重组蛋白。

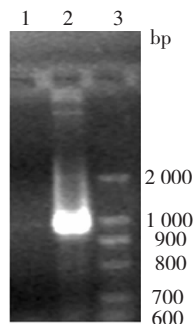
1.2.5 重组蛋白的大量表达和纯化 挑取单个阳性克隆 M15 菌落, 接种于 5 ml 含 100 μ g/ml 氨苄青霉素和 25 μ g/ml 卡那霉素的 LB 培养液中, 同时以含空 PQE30 质粒的 DH5 α 菌为对照, 37 $^{\circ}$ C 150 r/min 振荡过夜。吸取菌液, 按 1:20 比例转种于盛有 100 ml 相同新鲜培养液的培养瓶中, 于 37 $^{\circ}$ C 培养至 $A_{600\text{nm}}=0.6$ 时, 加入终浓度为 0.5 mmol/L 的 IPTG, 25 $^{\circ}$ C 诱导表达 4 h。收集菌液, 4 $^{\circ}$ C 8 000 r/min 离心 10 min, 弃上清。沉淀物按 3 ml/g 湿菌的比例加入 Lysis Buffer (50 mmol NaH_2PO_4 , 300 mmol NaCl, 10 mmol 咪唑), 反复吹打令细菌悬浮, 冰浴 15 min, 加溶菌酶至终浓度为 1 mg/ml。超声破碎细菌, 条件为功率 280 W, 破碎 10 s, 间隔 10 s, 总破碎时间为 30 min。破碎液 4 $^{\circ}$ C, 8 000 r/min 离心 25 min, 收集上清液。在 8 ml 上清液中加入 2 ml 50% 的 Ni^{2+} -NTA 树脂溶液, 0 $^{\circ}$ C 冰浴 1 h, 其间不断地震荡混匀。将混合物转入下垫滤纸的注射器中, 自然流干, 收集流出液。用 4 ml Wash Buffer (50 mmol NaH_2PO_4 , 300 mmol NaCl, 20 mmol 咪唑) 冲洗 2 次, 收集洗涤液。用 1 ml Elution Buffer (50 mmol NaH_2PO_4 , 300 mmol NaCl, 250 mmol 咪唑) 冲洗 4 次, 收集洗涤液。取以上液体各 30 μ l 作 12% SDS-PAGE 分析, Bradford 法测定蛋白含量。

1.2.6 重组蛋白的生物学活性鉴定 取纯化的重组蛋白按每克体质量 5 μ g 注入 BALB/C 新生小鼠的颈背部皮下, 同时以 PBS 作为对照。观察小鼠皮肤形成大疱或尼氏征阳性反应, 即人为地稍用力摩擦皮肤, 可发生表皮剥脱, 每小时观察 1 次, 共观察 24 h, 观察后取小鼠皮肤进行组织病理检查。

2 结果

2.1 目的基因 ETA 的 PCR 扩增

PCR 扩增产物经琼脂糖电泳分析可见在 900~1 000 bp 间有一条带, 大小与 ETA 基因分子量一致 (图 1)。



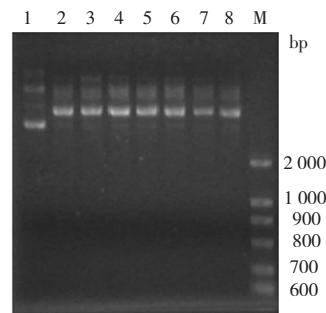
1. control; 2. PCR amplification; 3. DNA marker (DL2 000)

图 1 ETA 基因 PCR 扩增产物电泳图

Fig.1 Agarose gel electrophoresis of ETA by PCR amplification

2.2 重组质粒 pQE30-ETA 的鉴定

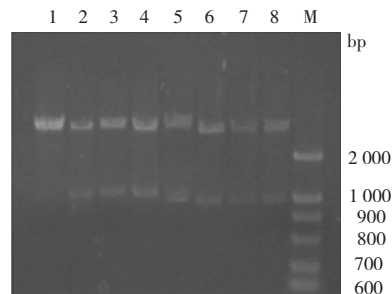
经 1% 琼脂糖凝胶电泳分析可见 pQE30-ETA 的电泳条带滞后于空 pQE30 质粒, 表明 pQE30-ETA 分子量大于空 pQE30 质粒 (图 2)。重组质粒 pQE-ETA 转化 *E.coli* DH5 α 后, 提取质粒经双酶切电泳分析可见空 pQE30 质粒在 3.4 kb 处出现条带, pQE30-ETA 在 920 bp 和 3.4 kb 处出现条带, 920 bp 处条带与 ETA 基因分子量一致, 3.4 kb 处条带与 pQE30 分子量一致 (图 3)。分别以质粒 pQE30-ETA、质粒 pQE30 为模板进行 PCR 扩增后, 琼脂糖凝胶电泳可见以 pQE30-ETA 质粒为模板扩增出 920 bp 条带, 而以 pQE30 质粒为模板却无此条带 (图 4)。阳性克隆测序结果显示插入的基因片段全长 927 bp, 其序列与基因文库中的 ETA 基因序列完全吻合 (测序图略)。



1. PQE30; 2~8. PQE30-ETA; M. DNA marker (DL2 000)

图 2 PQE30-ETA 质粒和 PQE30 质粒电泳图

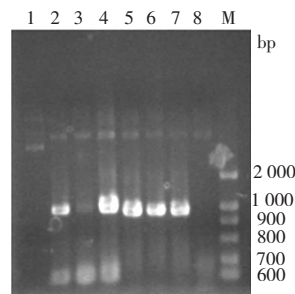
Fig.2 Agarose gel electrophoresis of PQE30 and PQE30-ETA



1. pQE30/BamH I + Hind III; 2~8. pQE30-ETA/BamH I + Hind III; M. DNA marker (DL2 000)

图 3 pQE-ETA 双酶切琼脂糖凝胶电泳图

Fig.3 Agarose gel electrophoresis of pQE-ETA with BamH I + Hind III digestion



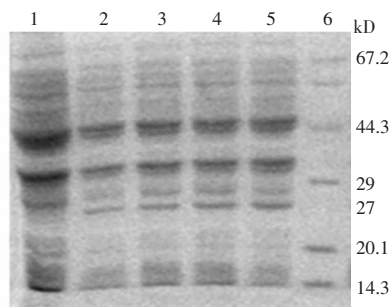
1. pQE30; 2~8. pQE30-ETA; M. DNA marker (DL2 000)

图 4 重组质粒 pQE30-ETA 的 PCR 鉴定

Fig.4 Identification of recombinant plasmid pQE30-ETA by PCR

2.3 重组蛋白的表达和纯化

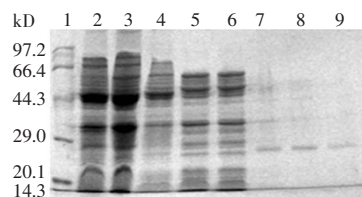
表达菌全菌蛋白 SDS-PAGE 电泳图见图 5, 在相对分子量 27 kD 处可见明显的外源蛋白的表达。IPTG 浓度 0.1 mmol/L, 诱导时间 4 h, 可得到最大的表达量。图像软件分析表明, 目的蛋白表达量占全菌蛋白 20% 以上。重组蛋白用 Ni^{2+} -NTA 树脂提纯, SDS-PAGE 分析可见单一条带, 图像软件分析表明纯度可达 90% 以上 (图 6)。Bradford 法测定重组蛋白含量为 0.25 mg/ml。



1. pQE30-ETA induced without IPTG; 2-5. pQE30-ETA induced with 0.1 mmol/L IPTG (1, 2, 3 and 4 hour); 6. Protein marker

图 5 ETA 表达蛋白的 SDS-PAGE 电泳图

Fig.5 Agarose gel electrophoresis of expressed protein ETA



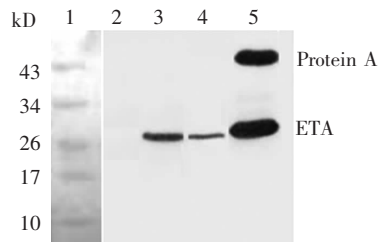
1. Protein marker; 2. pQE30-ETA induced without IPTG; 3. pQE30-ETA induced with IPTG; 4. Supernatant of pQE30-ETA induced with IPTG after sonicating; 5. Effluent of pQE30-ETA induced with IPTG and treated with Ni^{2+} -NTA resin; 6. Washings of pQE30-ETA induced with IPTG and treated with Ni^{2+} -NTA resin; 7-9. Purified rETA protein

图 6 纯化的重组蛋白 SDS-PAGE 分析

Fig.6 SDS-PAGE of the purified recombinant protein

2.4 重组蛋白 Western blot 鉴定

PVDF 膜显色后在相对分子量 27 000 D 处出现相应的条带, 大小与预期的一致, 与金黄色葡萄球菌产生的 ETA 蛋白在同一位置 (图 7)。



1. Protein marker; 2. *E. coli* M15 without vector pQE30-ETA; 3-4. Induced protein of *E. coli* M15 with vector pQE30-ETA; 5. Protein A and ETA produced by *S. aureus*

图 7 重组蛋白的 Western blot 鉴定

Fig.7 Identification of recombination protein by Western blot

2.5 重组蛋白的生物学活性鉴定

注入重组蛋白的新生 BALB/C 小鼠在 6 h 内出现了尼氏征阳性反应, 而注入 PBS 的对照小鼠则无此反应, 小鼠皮肤组织病理检测结果见 (图 8~10)

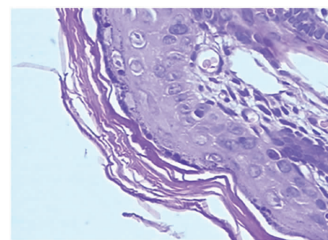


图 8 注射 PBS 的对照小鼠的完整皮肤 (HE, 40 ×)

Fig.8 Intact skin of control mouse injected with PBS (HE, 40 ×)

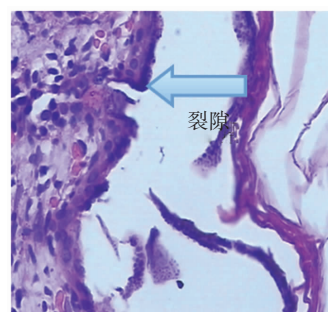


图 9 注射重组蛋白小鼠在表皮颗粒层出现的特征性裂隙 (HE, 40 ×)

Fig.9 Characteristic splitting at the stratum granulosum of mouse injected with recombinant protein (HE, 40 ×)

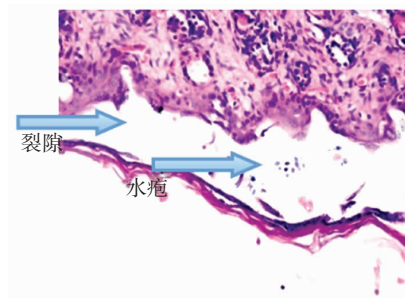


图 10 注射重组蛋白小鼠表皮内出现的水疱和裂隙 (HE, 40 ×)

Fig.10 Splitting and blister in epidermis of mouse injected with recombinant protein (HE, 40 ×)

3 讨论

S. aureus 产生的 ET 是引起 SSSS 和其局限型—大疱性脓疱疮的致病物质。该病主要影响婴幼儿, 但有肾功能衰竭或免疫缺陷的成人也可患此病^[3]。SSSS 的发病率近年来明显上升, 虽然多数患者在经抗生素治疗后能完全恢复, 但有部分患者虽经积极的抗生素治疗仍不能获得满意疗效甚至死亡。在婴幼儿患者中, 正确使用抗生素治疗后仍有 3% 死亡

率,而在成年患者即使恰当使用抗生素治疗死亡率仍高达 50%^[8-9]。临床对 SSSS 的诊断主要依据始于口、眼周围,继而迅速蔓延至颈、胸、背、腋下、腹股沟等皮肤的弥漫性红斑和脓疱液细菌培养,但需与非金葡菌中毒性表皮坏死松解(toxic epidermal necrolysis, TEN)、过敏性皮炎、药物皮疹等疾病相鉴别^[5-6],在基层医院误诊率可高达 76.5%^[7]。因此,深入研究 ET 的致病机理及机体对 ET 的防御机制具有重要的临床意义。

大量研究表明 *S.aureus* 分泌的 ET 与 SSSS 的发病密切相关^[11]。ET 是 *S.aureus* 分泌的一种外毒素,约 5% 的 *S.aureus* 菌株可产生 ET。目前已证实 ET 有 A、B、C、D 4 种血清型,其中 ETA 和 ETB 与人类 SSSS 的发病有关,ETC、ETD 菌株则多见于皮肤深层的感染。ETA 和 ETB 具有 40% 的序列同源性,编码 ETA 的基因位于细菌染色体上,而 ETB 的基因位于质粒上。ETA、ETB 分别由 242、246 个氨基酸组成,分子量分别为 26.9、27.3 kD^[12]。ET 的血清型与 SSSS 的临床表现之间可能存在一定关系。Yamasaki 发现,从局限型分离出来的金葡菌以产 ETA 为主,而 ETB 与泛发型相关^[13]。因此,获得有活性的 ETA 和 ETB 是深入研究 SSSS 的重要材料。虽然可以从产 ET 的 *S.aureus* 培养物中提取天然的 ET,但提取过程复杂,得率很低。而且 *S.aureus* 能产生多种分子量相近的外毒素,纯化不完全可导致其它毒素的污染,使研究结果受到影响。故本文根据基因文库中提供的 ETA 序列,原核表达 ETA 蛋白。

根据基因文库中提供的 ETA 序列(序列号 L25 372、M20 371),ETA 基因全长为 1 455 bp,其中产生蛋白质的翻译指令(coding sequence, CDS)为 374~1 216 bp 间的 842 个碱基。为了表达有活性的 ETA 蛋白,本文选择引物扩增的 927 bp 片段包括了该 CDS 的 842 个碱基。本文以临床分离的能产生 ETA 的 *S.aureus* 基因组为模板,经 PCR 扩增,获得大小与 ETA 基因分子量一致的基因片段。将 ETA 基因克隆至原核表达载体 pQE30 转化 *E.coli* DH5 α 后,提取的质粒经双酶切后电泳分析可见 pQE30-ETA 在 920 bp 和 3.4 kb 处出现条带,920 bp 处条带与 ETA 基因分子量一致,3.4 kb 处条带与 pQE30 分子量一致。以质粒 pQE30-ETA 为模板进行 PCR 扩增后,琼脂糖电泳可见 920 bp 条带,测序结果显示插入的基因片段全长 927 bp,与基因文库中的 ETA 基因序列完全吻合,表明成功构建了重组质粒 pQE30-ETA。将 pQE30-ETA 通过 *E.coli* M15 表达,优化了诱导表达的条件,获得大量纯化的重组 ETA 蛋白。

经 Western blot 鉴定表达的 rETA 和金黄色葡萄球菌产生的 ETA 蛋白在同一位置与绵羊抗 ETA 多克隆 IgG 发生反应,注入新生小鼠皮下出现了尼氏征阳性反应,表明成功表达了具有生物学活性的可溶性 ETA 蛋白。虽然 rETA 蛋白的表达量不够理想,但也避免了过量表达后包涵体的形成,使纯化蛋白工作较为简单,且保证了其生物学活性^[14]。本文的结果为诊断 SSSS 感染、研究其致病机理和制备抗体提供了可靠的 ETA 蛋白和制备方法。

参 考 文 献

- [1] Iwatsuki K, Yamasaki O, Morizane S, et al. Staphylococcal cutaneous infections: invasion, evasion and aggression[J]. *Dermatological Science*, 2006, 42(3): 203-214.
- [2] Handler MZ, Schwartz RA. Staphylococcal scalded skin syndrome: diagnosis and management in children and adults[J]. *J Eur Acad Dermatol Venereol*, 2014. doi: 10.1111/jdv.12541 [Epub ahead of print].
- [3] Tseng HC, Wu WM, Lin SH. Staphylococcal scalded skin syndrome in an immunocompetent adult, clinically mimicking toxic epidermal necrolysis[J]. *J Dermatol*, 2014, 41(9): 853-854.
- [4] Lamand V, Dauwalder O, Tristan A, et al. Epidemiological data of staphylococcal scalded skin syndrome in France from 1997 to 2007 and microbiological characteristics of *Staphylococcus aureus* associated strains[J]. *Clin Microbiol Infect*, 2012, 18(12): E514-E521.
- [5] 刘 磊, 张晓彬. 葡萄球菌性烫伤样皮肤综合征 50 例临床分析[J]. *中华实用诊断与治疗杂志*, 2013, 27(6): 598-599.
- [6] 方远芳. 综合治疗葡萄球菌性烫伤样皮肤综合征 28 例分析[J]. *华夏医学*, 2014, 27(2): 89-90.
- [7] 陈 峰, 肖芳棉, 李胜利. 小儿童葡萄球菌性烫伤样皮肤综合征 17 例诊治分析[J]. *陕西医学杂志*, 2005, 34(9): 1089-1091.
- [8] Nishifuji K, Sugai M, Amagi M. Staphylococcal exfoliative toxins: "molecular scissors" of bacteria that attack the cutaneous defense barrier in mammals[J]. *J Dermatol Sci*, 2008, 49(1): 21-31.
- [9] Braunstein I, Wanat KA, Abuabara K, et al. Antibiotic sensitivity and resistance patterns in pediatric staphylococcal scalded skin syndrome[J]. *Pediatr Dermatol*, 2014, 31(3): 305-308.
- [10] Watanabe T, Sato H, Hatakeyama Y, et al. Cloning of the gene coding for *Staphylococcus hyicus* exfoliative toxin B and its expression in *Escherichia coli*[J]. *J Bacteriol*, 2000, 182(14): 4101-4103.
- [11] Bukowski M, Wladyka B, Dubin G. Exfoliative toxins of *Staphylococcus aureus*[J]. *Toxins (Basel)*, 2010, 2(5): 1148-1165.
- [12] Hanakawa Y, Schechter NM, Lin C, et al. Enzymatic and molecular characteristics of the efficiency and specificity of exfoliative toxin cleavage of desmoglein[J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(7): 5268-5277.
- [13] Yamasaki O, Yamaguchi T, Sugai M, et al. Clinical manifestations of staphylococcal scalded-skin syndrome depend on serotypes of exfoliative toxins[J]. *J Clin Microbiol*, 2005, 43(4): 1890-1893.
- [14] 韩 飞, 杨致邦. 幽门螺杆菌 hp1188 基因的克隆表达[J]. *重庆医科大学学报*, 2010, 35(6): 822-825.

(责任编辑: 关蕴良)