

理化因素对葡萄球菌无毒诱变超抗原 GST-mTSST-1 免疫活性的影响

郭海勇¹, 郭伟生², 崔京春³, 钱爱东²

(1 吉林师范大学 生命科学学院, 吉林 四平 136000; 2 吉林农业大学 动物科学技术学院, 吉林 长春 130118;
3 大连民族学院 生命科学学院, 辽宁 大连 116600)

摘要:应用免疫琼脂扩散法检测温度、pH、反复冻融、保护剂等理化因素对 GST-mTSST-1 融合蛋白免疫活性的影响, 结果表明, 在 4 ℃ 30 d、20 ℃ 72 h、37 ℃ 72 h 条件下, GST-mTSST-1 融合蛋白的免疫活性不受影响, 但该蛋白不耐高温, 60 ℃ 5 min 完全失活, 耐碱不耐酸, 对反复冻融有较好的稳定性, 50 mg/mL 蔗糖保护剂有利于提高该蛋白的免疫稳定性, 为 GST-mTSST-1 融合蛋白规模化生产工艺的设计奠定了基础。

关键词:金黄色葡萄球菌; GST-mTSST-1; 理化因素; 免疫学活性; 超抗原

中图分类号: S852.611; S852.43

文献标识码: A

文章编号: 1001-411X(2011)02-0048-04

Effects of Physiochemical Factors on the Immune Reactivity of the Nontoxic and Mutant *Staphylococcus aureus* Superantigen GST-mTSST-1

GUO Hai-yong¹, GUO Wei-sheng², CUI Jing-chun³, QIAN Ai-dong²

(1 College of Life Sciences, Jilin Normal University, Siping 136000, China; 2 College of Animal Science and Technology, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China; 3 College of Life Science, Dalian Nationalities University, Dalian 116600, China)

Abstract: This study tested the effects of various physiochemical factors on the immune reactivity of GST-mTSST-1 fusion protein by agar-gel double immunodiffusion assay. The results showed that the immune reactivity of GST-mTSST-1 was maintained following storage at 4 ℃ for 30 d, at 20 ℃ for 72 h, and at 37 ℃ for 72 h. However, the reactivity was lost completely by high temperature treatment at 60 ℃ for 5 min. The immune reactivities of GST-mTSST-1 fusion protein was rapidly lost when pH was lowered, but was retained under high pH, which indicated the protein tolerate alkaline but not acidic condition. The protein was also stable following repeated freezing and thawing. Addition of 50 mg/mL sucrose in GST-mTSST-1 fusion protein solution was helpful to protect the immune reactivity, which could be a useful technique for the large-scale production of GST-mTSST-1 fusion protein.

Key words: *Staphylococcus aureus*; GST-mTSST-1; physiochemical factors; immune activity; superantigen

金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus* 是引起乳牛、羊的乳腺炎以及其他动物葡萄球菌病的主要病原菌, 给养殖业带来了重大的经济损失^[1-3]。尤其是耐药菌株 (MRSA) 的出现导致交叉污染传播而又难以治疗, 对人类健康造成严重威胁^[4-5]。金黄色葡萄球菌能产生多种引发感染的毒素, 其中能引起毒素

收稿日期: 2010-10-26

作者简介: 郭海勇 (1978—), 男, 讲师, 博士; 通信作者: 崔京春 (1968—), 女, 副教授, 博士, E-mail: cuijingchun@dlnu.edu.cn; 钱爱东 (1960—), 男, 教授, 博士, E-mail: qianaidong0115@163.com

基金项目: 国家自然科学基金 (30671554); 国家科技计划项目 (2002BA518A04); 吉林师范大学博士启动基金 (2009005)

性休克症候群的 TSST-1 与遗传性过敏性皮炎及乳牛乳腺炎有关^[6-8]。Kuroishi 等^[9]报道,从患乳腺炎乳牛的乳样中分离的金黄色葡萄球菌绝大部分产生 TSST-1 和 SEC 毒素,且在健康乳牛乳腺中人工注射 TSST-1、SEC 等超抗原毒素,可引起和临床上一致的乳腺炎症状的发生,从而认为超抗原毒素 TSST-1 和 SEC 是乳腺炎发生的重要病原因子。Woody 等^[10]和 Hu 等^[11]研究表明利用基因工程人工定位诱变技术研制的无毒性超抗原毒素蛋白在动物免疫试验中具有良好的抗炎症、抗休克作用,并进一步证明以无毒性超抗原毒素蛋白为抗原研制的无毒化基因重组疫苗还具有防止细菌附着,提高清除细菌的能力。

金黄色葡萄球菌无毒诱变超抗原 GST-mTSST-1 是利用基因工程定点突变技术将中毒性休克综合征毒素基因(tst)中的致病性碱基进行人工诱变构建的基因工程菌发酵表达、亲和层析纯化制备的可作为免疫抗原的融合蛋白。GST-mTSST-1 融合蛋白在纯化制备及保存过程中,温度、pH 等各种理化因素对其免疫活性可能产生影响。本研究对温度、pH、反复冻融、保护剂等理化因素对 GST-mTSST-1 融合蛋白免疫活性的影响进行初步研究,旨在为 GST-mTSST-1 作金黄色葡萄球菌所致乳牛乳腺炎的疫苗开发奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

葡萄球菌 GST-mTSST-1 融合蛋白:由大连翔大生物技术研究中心实验室提供,样品 I 和样品 II 为不同批次制备提纯的 GST-mTSST-1 融合蛋白。试验前,采用 Bradford 方法测定样品 I、II 的最终平均质量浓度分别为 3.38 和 4.75 mg/mL,各取一定量加入 50 mg/mL 无菌蔗糖,制成样品 I'、II'。经 SDS-PAGE 分析表明,样品 I、II 均为相对分子质量约 47 000,且纯度较高的 GST-mTSST-1 融合蛋白。

抗葡萄球菌 GST-mTSST-1 融合蛋白阳性血清:由大连翔大生物技术研究中心实验室制备保存。

1.2 主要仪器

UV-1601 紫外分光光度计由日本岛津公司生产;垂直板电泳仪购自大连捷迈科贸有限公司;CTHI-150B 恒温恒湿培养箱由美国 STIK 公司生产。

1.3 GST-mTSST-1 融合蛋白免疫活性的检测方法

取待测样品及 -20℃ 保存样品各 1 管,分别做 2、4、8、16、32 倍比稀释,以 -20℃ 保存样品作为原始对照,按崔京春等^[12]方法进行双向免疫琼脂扩散

试验。

1.4 温度对 GST-mTSST-1 融合蛋白免疫活性的影响

1.4.1 4℃ 下不同保存时间对 GST-mTSST-1 融合蛋白免疫活性的影响 取分装冻存的样品 I、I'、II、II' 各 4 管,4℃ 下保存 7、15 和 30 d 后,按 1.3 方法检测 GST-mTSST-1 融合蛋白免疫活性。

1.4.2 20、37℃ 下不同保存时间对 GST-mTSST-1 融合蛋白免疫活性的影响 取分装冻存的样品 I、I'、II、II' 各 12 管,20、37℃ 条件下各保存 12、18、24、48 和 72 h 后,检测 GST-mTSST-1 融合蛋白免疫活性。

1.4.3 50~70℃ 作用不同时间对 GST-mTSST-1 融合蛋白免疫活性的影响 取分装冻存的样品 I、I'、II、II' 各 20 管,在 50、55、60 和 70℃ 条件下分别放置 2、3、4 和 5 min 后,检测 GST-mTSST-1 融合蛋白免疫活性。

1.5 pH 对 GST-mTSST-1 融合蛋白免疫活性的影响

将纯化的样品 I、I'、II、II',分别与适量的磷酸缓冲液(pH 6.0、7.0、7.2 和 8.0)、醋酸缓冲液(pH 4.2、4.6、4.8 和 5.0)、Tris-HCl 缓冲液(pH 9、10 和 11)混合,使 GST-mTSST-1 融合蛋白终质量浓度为 1 mg/mL,4℃ 放置 24 h,按 1.3 方法检测 GST-mTSST-1 融合蛋白免疫活性。

1.6 反复冻融对 GST-mTSST-1 融合蛋白免疫活性的影响

取分装冻存的样品 I、I'、II、II' 各 8 管,反复冻融 6 次,取每次冻融后样品 I、I'、II、II' 各 1 管,按 1.3 方法检测 GST-mTSST-1 融合蛋白的免疫活性。

2 结果与分析

2.1 温度对 GST-mTSST-1 融合蛋白免疫活性的影响

GST-mTSST-1 融合蛋白样品 I、I'、II、II' 在 4℃ 30 d、20℃ 72 h、37℃ 72 h 条件下,经双向免疫琼脂扩散试验检测其免疫活性没有变化,其发生阳性反应的稀释倍数均为 32 倍。50~70℃ 作用不同时间对 GST-mTSST-1 融合蛋白的免疫活性的影响结果见表 1。从表 1 可以看出 GST-mTSST-1 融合蛋白 I、II 的免疫活性在 55℃ 3 min 时均降低,而 GST-mTSST-1 融合蛋白 I'、II' 的免疫活性均在 55℃ 4 min 时开始降低,且样品 I' 比样品 II' 活性下降得明显,这可能与蛋白浓度有关,低浓度的 GST-mTSST-1 融合蛋白受高温的影响明显。在 60℃ 5 min、70℃ 2 min 所有样品的免疫活性都丧失,表明 GST-mTSST-1 融合蛋白不耐高温,对高温敏感,50 mg/mL 蔗糖有利于保护高温对 GST-mTSST-1 融合蛋白免疫活性的影响。

表 1 高温对 GST-mTSST-1 融合蛋白免疫活性的影响¹⁾

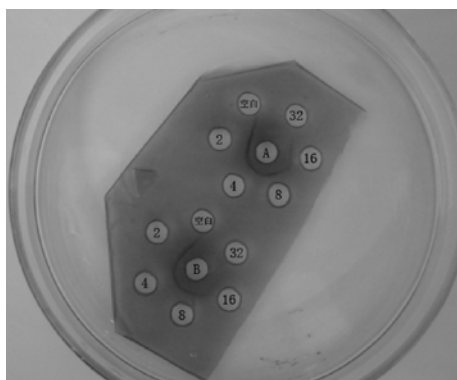
Tab. 1 The effect of immune activity of GST-mTSST-1 by high temperature

样品	50 °C	55 °C				60 °C				70 °C
	5 min	2 min	3 min	4 min	5 min	2 min	3 min	4 min	5 min	2 min
I	32 [×]	32 [×]	16 [×]	8 [×]	4 [×]	4 [×]	—	—	—	—
I'	32 [×]	32 [×]	32 [×]	16 [×]	8 [×]	8 [×]	4 [×]	2 [×]	—	—
II	32 [×]	32 [×]	16 [×]	16 [×]	8 [×]	8 [×]	4 [×]	2 [×]	—	—
II'	32 [×]	32 [×]	32 [×]	16 [×]	16 [×]	16 [×]	8 [×]	2 [×]	—	—

1)表中“32[×]、16[×]、8[×]、4[×]、2[×]”均为阳性反应的稀释倍数;“—”为阴性反应。

2.2 不同 pH 对 GST-mTSST-1 融合蛋白免疫活性的影响

不同 pH 的缓冲溶液与样品 I、I'、II、II'作用 24 h 后,琼脂扩散检测结果表明:pH5~10 对 GST-mTSST-1 融合蛋白的免疫活性均无影响;pH4.8 和 11 时,GST-mTSST-1 融合蛋白的免疫活性开始降低(图 1);在 pH4.2 时,GST-mTSST-1 融合蛋白完全失活,说明 GST-mTSST-1 融合蛋白耐碱不耐酸,对酸比较敏感,且 50 mg/mL 的蔗糖保护剂对强酸碱的抵抗力不明显,与未加蔗糖的 GST-mTSST-1 融合蛋白无明显差别。



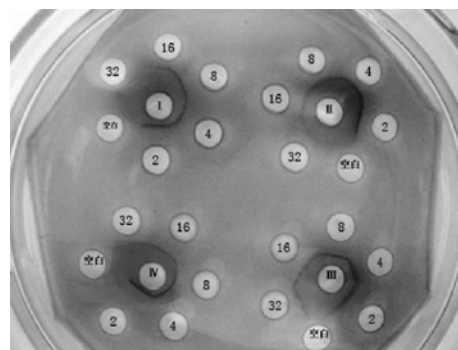
A:pH 11 时,样品 I 的琼脂扩散结果;B:pH4.8 时,样品 I 的琼脂扩散结果;2、4、8、16、32: GST-mTSST-1 融合蛋白稀释倍数;空白:阴性对照。

图 1 pH 对 GST-mTSST-1 融合蛋白免疫活性的影响

Fig. 1 Effect of immune activity of GST-mTSST-1 fusion protein by pH

2.3 反复冻融对 GST-mTSST-1 融合蛋白免疫活性的影响

GST-mTSST-1 融合蛋白经反复冻融 1~6 次,琼脂扩散检测,结果表明:样品 I、II 在第 5 次冻融时活性开始降低,降低 1 个稀释度;加入 50 mg/mL 蔗糖保护剂的样品 I'、II'经第 6 次冻融,活性稍微降低(沉淀线不清晰),琼脂扩散检测结果见图 2。从检测结果可知 GST-mTSST-1 融合蛋白对反复冻融具有一定的稳定性,反复冻融 4 次不影响其免疫活性,50 mg/mL 的蔗糖保护剂有利于保护 GST-mTSST-1 融合蛋白的免疫活性,对抵抗反复冻融起到一定的作用。



I:样品 I 第 5 次冻融琼脂扩散结果;II:样品 I'第 6 次冻融琼脂扩散结果;III:样品 I'第 5 次冻融琼脂扩散结果;IV:样品 I 未经冻融对照组;2、4、8、16、32: GST-mTSST-1 融合蛋白稀释倍数;空白:阴性对照。

图 2 反复冻融对 GST-mTSST-1 融合蛋白免疫活性的影响

Fig. 2 Effect of immune activity of GST-mTSST-1 fusion protein on repeated freeze-thaw

2.4 保护剂蔗糖对 GST-mTSST-1 融合蛋白免疫活性的影响

在温度、pH、反复冻融对 GST-mTSST-1 融合蛋白免疫活性的影响试验中,对添加蔗糖的 GST-mTSST-1 融合蛋白样品进行双向免疫琼脂扩散试验检测,结果表明 50 mg/mL 蔗糖的添加不影响 GST-mTSST-1 融合蛋白的免疫活性,且有利于延缓毒素蛋白遇热变性失活,能维持其对多次反复冻融的稳定性,但其对强酸碱的抵抗力不明显,与未加蔗糖的 GST-mTSST-1 融合蛋白活性无明显差异。

3 讨论

金黄色葡萄球菌是引发乳牛乳腺炎主要病原菌之一,能产生许多类型肠毒素,目前已鉴定的金黄色葡萄球菌肠毒素有 SEA、SEB、SEC、SED、SEE、SEH、SEI、SEIJ、SEIK、SEIL、SEIM、SEIN、SEIO、SEIP、SEIQ、SEIR、SEIU 和 TSST-1,但引起乳牛乳腺炎的关键因子是 SEC 和毒性休克综合征毒素(TSST-1)^[4,13]。通过基因定点突变、构建表达、分离纯化获得金黄色葡萄球菌无毒变异体 GST-mTSST-1 融合蛋白,经优化的双向免疫琼脂扩散法^[12]测得 GST-mTSST-1 融合蛋白与 rTSST-1 具有相同的生物免疫活性和相同的表面抗原决定簇,可作为免疫原开发研制乳牛乳腺

炎疫苗^[14]。

良好的蛋白质抗原应具有较强的稳定性,其稳定性主要由蛋白质本身的结构特点和周围环境决定,在分离纯化过程中,温度、pH、盐浓度变化等都有可能造成结构变化和免疫活性降低,其中温度和 pH 是影响 GST-mTSST-1 融合蛋白稳定性的重要因素。为了使整个分离纯化、保存过程中各种理化因素不影响 GST-mTSST-1 融合蛋白的免疫活性,本试验对 GST-mTSST-1 融合蛋白的稳定性进行了初步研究,结果表明:GST-mTSST-1 融合蛋白对一定范围内的温度、酸碱变化表现出较好的稳定性,在 4 ℃ 30 d、20 ℃ 72 h、37 ℃ 72 h, GST-mTSST-1 融合蛋白免疫活性没有变化,说明常规的制备工艺过程中温度条件的变化不会影响 GST-mTSST-1 融合蛋白的免疫活性;但在 60 ℃ 5 min、70 ℃ 2 min 时融合蛋白失活,表现对热不稳定,因此提纯工艺过程中不能采用热变性的方法;GST-mTSST-1 融合蛋白在 4 ℃ pH10 作用 24 h 时免疫活性无降低,在 pH4.8 时开始降低,而在 pH4.2 时完全失活,因此在提纯工艺设计过程中要避免在低于 pH4.8 的酸性条件下进行。另外, GST-mTSST-1 融合蛋白对反复冻融也表现出了较好的稳定性,反复冻融到第 5 次时活性刚开始降低。在整个试验过程中对添加 50 mg/mL 蔗糖保护剂的 GST-mTSST-1 融合蛋白进行了研究,表明蔗糖的添加不影响 GST-mTSST-1 融合蛋白的免疫活性,而有利于维持其对热、反复冻融的稳定性,延缓毒素蛋白的变性失活。主要可能是蔗糖具有弱还原性,作为填充剂对粒子赋型,其羟基能替代蛋白表面的水的羟基,使得蛋白的主相变温度变化不大,其空间位阻效应避免了生物活性物质由于发生相变所造成的机械损伤,从而使之能更有效地保护 GST-mTSST-1 融合蛋白的免疫活性。另外,动物保护试验证明蔗糖不影响免疫效果^[14],因此在保存 GST-mTSST-1 融合蛋白的过程中应适量添加蔗糖作为蛋白保护剂,这为乳牛乳腺炎疫苗研制过程中的抗原蛋白提纯工艺设计及保存条件的确定提供了试验依据,有利于乳牛乳腺炎疫苗的开发,对防治金黄色葡萄球菌乳牛乳腺炎具有重要意义。

参考文献:

- [1] FITZGERALD J R, MONDAY S R, FOSTER T J, et al. Characterization of a putative pathogenicity island from bovine *Staphylococcus aureus* encoding multiple superantigens [J]. J Bacteriol, 2001, 183(1): 63-70.
- [2] HOLBROOK T C, MUNDAY J S, BROWN C A, et al. Toxic shock syndrome in a horse with *Staphylococcus aureus* pneumonia[J]. J Am Vet Med Assoc, 2003, 222(5): 620-623, 601-602.
- [3] 郭海勇, 崔京春, 钱爱东. 葡萄球菌 GST-mTSST-1 融合蛋白抗体间接 ELISA 检测方法的建立[J]. 中国兽医科学, 2007, 37(12): 1041-1045.
- [4] HU D L, OMOE K, INOUE F, et al. Comparative prevalence of superantigenic toxin genes in methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* isolates [J]. J Med Microbiol, 2008, 57(9): 1106-1112.
- [5] SCHLIEVERT P M, STRANDBERG K L, LIN Y C, et al. Secreted virulence factor comparison between methicillin-resistant and methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus*, and its relevance to atopic dermatitis [J]. J Allergy Clin Immunol, 2010, 125(1): 39-49.
- [6] JARRAUD S, MOUGEI C, THIOULOUSE J, et al. Relationships between *Staphylococcus aureus* genetic background, virulence factors, agr groups (alleles), and human disease [J]. Infect Immun, 2002, 70(2): 631-641.
- [7] JOHN C C, NIERMANN M, SHARON B, et al. Staphylococcal toxic shock syndrome erythroderma is associated with superantigenicity and hypersensitivity [J]. Clin Infect Dis, 2009, 49(12): 1893-1896.
- [8] CUI Jing-chun, ZHANG Bao-jun, LIN Yang-chun, et al. Protective effect of glutathione S-transferase-fused mutant staphylococcal enterotoxin C against *Staphylococcus aureus*-induced bovine mastitis [J]. Vet Immunol Immunopathol, 2010, 135(1-2): 64-70.
- [9] KUROISHI T, KOMIN K, KAI K, et al. Concentrations and specific antibodies to staphylococcal enterotoxin C and toxic shock syndrome toxin 1 in bovine mammary gland secretions, and inflammatory response to the intramammary inoculation of these toxins [J]. Vet Med Sci, 2003, 65(8): 899-906.
- [10] WOODY M A, KRAKAUER T, STILES B G. Staphylococcal enterotoxin B mutants (N23K and F44S): Biological effects and vaccine potential in a mouse model [J]. J Vaccine, 1997, 15: 133-139.
- [11] HU D L, KATSUHIKO O, SANAE S, et al. Vaccination with non-toxic mutant TSST-1 protects *Staphylococcus aureus* infection [J]. Journal of Infectious Diseases, 2003, 188(9): 743-751.
- [12] 崔京春, 郭海勇, 孙传丽, 等. 金黄色葡萄球菌 GST-mTSST-1 的免疫活性检测方法的研究 [J]. 大连民族学院学报, 2005, 7(3): 51-53.
- [13] OMOE K. Diversity of staphylococcal enterotoxins [J]. Nippon Saikingaku Zasshi, 2005, 60(2): 357-363.
- [14] 郭海勇. 葡萄球菌无毒诱变超抗原 GST-mTSST-1 对小鼠免疫保护性的研究 [D]. 长春: 吉林农业大学动物科学技术学院, 2005.