

金黄色葡萄球菌类肠毒素 W 的超抗原活性位点预测与克隆表达

杨玉花¹ 库鑫^{2,3} 宫雅楠¹ 孟凡亮¹ 卜东波^{2,3,4} 郭亚慧^{1,5} 魏销玥¹ 龙丽瑾^{1,6}
范佳铭¹ 张茂俊¹ 张建中¹ 闫笑梅¹

¹中国疾病预防控制中心传染病预防控制所感染性疾病诊治协同创新中心/传染病预防控制国家重点实验室,北京 102206;²中国科学院计算技术研究所智能信息处理重点实验室,北京 100190;³中国科学院大学,北京 100049;⁴中科大数据研究院,郑州 450046;⁵内蒙古科技大学包头医学院,包头 014040;⁶中国医科大学,沈阳 110122
通信作者:闫笑梅,Email:yanxiaomei@icdc.cn

【摘要】 目的 预测金黄色葡萄球菌类肠毒素 W (SEIW) 与 T 细胞受体 (TCR) 的对接和超抗原活性位点,并对 SEIW 进行克隆表达和纯化。方法 利用 AlphaFold 对 SEIW 蛋白单体进行三维结构预测,借助 SAVES 在线服务器使用 ERRAT、拉氏图和 Verify_3D 等软件对蛋白模型进行评估。用 ZDOCK 服务器模拟 SEIW 与 TCR 的对接构象,并对 SEIW 与其他肠毒素的氨基酸序列进行比对。设计引物扩增 *selw* 基因,将该片段重组于 pMD18-T 载体中并进行测序;经限制性内切酶 *Bam*H I 和 *Hind* III 双酶切后将目的片段重组于表达质粒 pET-28a(+) 中,重组质粒鉴定后用 IPTG 诱导表达;用亲和层析法对表达于上清中的 SEIW 蛋白进行纯化,用 BCA 法对蛋白进行定量。结果 三维结构预测结果显示,SEIW 蛋白由氨基末端和羧基末端两个结构域组成,其中氨基末端结构域由 3 个 α -螺旋和 6 个 β -片层组成,羧基末端结构域由 2 个 α -螺旋和 7 个反向平行的 β -片层组成。SEIW 蛋白模型的整体质量因素得分为 98.08,其中 93.24% 的氨基酸 Verify_3D 得分 ≥ 0.2 ,且无氨基酸位于不允许区。模拟对接预测选择评分最高的对接构象(评分值为 1 521.328)作为分析对象,采用 PyMOL 软件分析 SEIW 与 TCR 之间形成的 19 个氢键。结合序列比对和既往研究结果,本研究预测发现了 SEIW 蛋白的 5 个重要超抗原活性位点,分别是 Y18、N19、W55、C88 和 C98。通过克隆表达和蛋白纯化,获得了高纯度的可溶性重组蛋白 SEIW。结论 研究预测了 SEIW 蛋白中 5 个可能的超抗原活性位点,成功构建并表达了 SEIW 蛋白,为进一步探索 SEIW 免疫识别机制奠定了基础。

【关键词】 金黄色葡萄球菌肠毒素; 分子对接; 超抗原活性位点; 克隆表达
基金项目:国家自然科学基金面上项目(81873959)

Prediction of superantigen active sites and clonal expression of staphylococcal enterotoxin-like W

Yang Yuhua¹, Ku Xin^{2,3}, Gong Yanan¹, Meng Fanliang¹, Bu Dongbo^{2,3,4}, Guo Yahui^{1,5}, Wei Xiaoyue¹, Long Lijin^{1,6}, Fan Jiaming¹, Zhang Maojun¹, Zhang Jianzhong¹, Yan Xiaomei¹

¹State Key Laboratory of Infectious Disease Prevention and Control, Collaborative Innovation Center for Diagnosis and Treatment of Infectious Diseases, National Institute for Communicable Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 102206, China; ²Key Lab of Intelligent Information Processing, Institute of Computing Technology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100190, China; ³University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China; ⁴Big Data

DOI: 10.3760/cma.j.cn112338-20220822-00725

收稿日期 2022-08-22 本文编辑 万玉立

引用格式:杨玉花,库鑫,宫雅楠,等.金黄色葡萄球菌类肠毒素 W 的超抗原活性位点预测与克隆表达[J].中华流行病学杂志,2023,44(4):629-635. DOI: 10.3760/cma.j.cn112338-20220822-00725.

Yang YH, Ku X, Gong YN, et al. Prediction of superantigen active sites and clonal expression of staphylococcal enterotoxin-like W[J]. Chin J Epidemiol, 2023, 44(4):629-635. DOI: 10.3760/cma.j.cn112338-20220822-00725.



Academy, Zhongke, Zhengzhou 450046, China; ⁵ Baotou Medical College, Inner Mongolia University of Science and Technology, Baotou 014040, China; ⁶ China Medical University, Shenyang 110122, China
Corresponding author: Yan Xiaomei, Email: yanxiaomei@icdc.cn

[Abstract] Objective The docking and superantigen activity sites of staphylococcal enterotoxin-like W (SEIW) and T cell receptor (TCR) were predicted, and its SEIW was cloned, expressed and purified. **Methods** AlphaFold was used to predict the 3D structure of SEIW protein monomers, and the protein models were evaluated with the help of the SAVES online server from ERRAT, Ramachandran plot, and Verify_3D. The ZDOCK server simulates the docking conformation of SEIW and TCR, and the amino acid sequences of SEIW and other serotype enterotoxins were aligned. The primers were designed to amplify *selw*, and the fragment was recombined into the pMD18-T vector and sequenced. Then recombinant plasmid pMD18-T was digested with *BamH* I and *Hind* III. The target fragment was recombined into the expression plasmid pET-28a(+). After identification of the recombinant plasmid, the protein expression was induced by isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside. The SEIW expressed in the supernatant was purified by affinity chromatography and quantified by the BCA method. **Results** The predicted three-dimensional structure showed that the SEIW protein was composed of two domains, the amino-terminal and the carboxy-terminal. The amino-terminal domain was composed of 3 α -helices and 6 β -sheets, and the carboxy-terminal domain included 2 α -helices and 7 antiparallel β -sheets composition. The overall quality factor score of the SEIW protein model was 98.08, with 93.24% of the amino acids having a Verify_3D score ≥ 0.2 and no amino acids located in disallowed regions. The docking conformation with the highest score (1 521.328) was selected as the analysis object, and the 19 hydrogen bonds between the corresponding amino acid residues of SEIW and TCR were analyzed by PyMOL. Combined with sequence alignment and the published data, this study predicted and found five important superantigen active sites, namely Y18, N19, W55, C88, and C98. The highly purified soluble recombinant protein SEIW was obtained with cloning, expression, and protein purification. **Conclusions** The study found five superantigen active sites in SEIW protein that need special attention and successfully constructed and expressed the SEIW protein, which laid the foundation for further exploration of the immune recognition mechanism of SEIW.

[Key words] Staphylococcal enterotoxins; Molecular docking; Superantigen active site; Clonal expression

Fund program: General Project of National Natural Science Foundation of China (81873959)

金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*),是一种重要的病原体,可引起一系列临床综合征,从皮肤和软组织感染等非侵入性感染到心内膜炎、骨髓炎和菌血症等侵入性感染^[1-2]。葡萄球菌超抗原(SAGs)是金黄色葡萄球菌产生的典型的毒力因子,可绕过抗原加工和呈递,直接结合抗原提呈细胞上的主要组织相容性复合体 II 类分子与 T 细胞受体(TCR)上的 $V\beta$ 链并形成桥梁,诱导 T 淋巴细胞的异常快速增殖并释放大量的促炎细胞因子^[3-5]。葡萄球菌肠毒素(SE)是一类低分子量的单链碱性球状蛋白,属于 SAGs,是引起葡萄球菌食物中毒的重要毒力因子^[6-7]。金黄色葡萄球菌类肠毒素 W (SEIW)是近几年发现的新型类肠毒素。最初被认为是金黄色葡萄球菌类肠毒素 U(SEIU)的等位基因突变体,命名为 SEIU2。后续研究证明 SEIW 是由核心基因编码的新型类肠毒素,与金黄色葡萄球菌肠毒素 A(SEA)氨基酸序列有 36% 的同源性^[8],在金黄色葡萄球菌分离株中的携带率达到了 90% 以上^[3,9]。研究表明 SEIW 能诱导 $V\beta$ -T 细胞大量增

殖,具有典型的超抗原特征;菌血症动物模型证明了 SEIW 能增加肝脏的细菌载量,有助于金黄色葡萄球菌的致病^[3]。目前对于该蛋白的研究相对较少,为了进一步了解 SEIW 的超抗原活性位点,本研究利用 AlphaFold 和 ZDOCK 服务器模拟 SEIW 与 TCR 分子的对接,并结合 SEIW 和其他肠毒素的氨基酸多序列比对共同预测重要的可能的超抗原活性位点;利用大肠埃希菌重组表达系统在体外表达 SEIW 融合蛋白,为进一步运用定点突变技术研究 SEIW 超抗原活性位点提供理论依据。

材料与方法

1. 菌株和载体:

(1) 菌株:DC51619 菌株(中国 CDC 传染病预防控制所感染性疾病诊治协同创新中心保存)、感受态细胞 BL21(DE3)(中国江苏康为世纪生物科技股份有限公司)

(2) 载体:原核表达载体 pET-28a(+)(中国

CDC 传染病预防控制所感染性疾病诊治协同创新中心保存)、pMD18-T 载体(日本 TaKaRa 公司)

2. 试剂: LB 琼脂、LB 肉汤(中国北京路桥技术股份有限公司);超保真酶、T4 连接酶、卡那霉素、异丙基- β -D-硫代半乳糖苷(IPTG)试剂(中国北京金全生物技术股份有限公司);限制性内切酶 *BamH* I 和 *Hind* III(日本 TaKaRa 公司);SDS-PAGE 胶配置试剂盒、10 \times SDS-PAGE 电泳缓冲液、蛋白酶抑制剂混合物(中国江苏康为世纪生物科技股份有限公司);PCR 产物纯化试剂盒、胶回收 DNA 试剂盒(美国 Omega 公司);质粒小提试剂盒(德国 Qiagen 公司)、蛋白定量试剂盒[赛默飞世尔科技(中国)有限公司]。

3. 仪器设备:梯度 PCR 仪(德国 Sensoquest 公司)、5804R 型冷冻离心机(德国 Eppendorf 公司)、超声破碎仪(德国 Bandelin 公司)、DYY-6C 型核酸电泳仪(中国北京六一仪器厂)、低温空气浴摇床(瑞士 INFORS 公司)、蛋白纯化仪(瑞典 GE 公司)、SDS-PAGE 电泳槽(美国伯乐公司)

4. SEIW 蛋白三维结构的预测及评估:将 fasta 格式的 SEIW 氨基酸序列输入至 AlphaFold 软件中^[10],设置参数 *evoformer block* 的层数为 48, *structure module* 的层数为 8,循环 3 次,用 5 个模型预测得到 5 个结果,选择预测局部距离差检验(pLDDT)最高的模型作为最终选用的蛋白模型。利用 UCLA-DOE 的 SAVES 在线服务器(<https://saves.mbi.ucla.edu/>),使用 ERRAT、拉氏图(Ramachandran Plot)和 Verify_3D 等软件对 SEIW 蛋白模型预测结构进行评估。采用 ERRAT 软件计算 0.35 nm 范围之内不同的原子类型对之间形成的非键相互作用的数目(侧链),当得分>85 时,说明预测结果准确度较高;PROCHECK 软件中的拉氏图利用蛋白中非键合原子间的最小接触距离,体现氨基酸残基理论上可以出现的构象,表示蛋白中允许和不允许的构象,要求位于不允许区的氨基酸数目 $\leq 5\%$ 。Verify_3D 用来检查评估模型的三维结构和氨基酸一级序列的匹配度,当超过 80% 的氨基酸残基的得分 ≥ 0.2 时,说明构象合理。使用 ZDOCK 3.0.2 服务器(<https://zdock.umassmed.edu/>)进行蛋白单体和 TCR(PDB ID: 4udt)的对接,ZDOCK 自动默认参数设定(设置对接网格大小为 128,间距为 1.2 Å),输出 10 个打分最高的对接构象,选择打分最高的对接构象作为分析对象,获得的结果用 PyMOL 软件进行分析。

5. SEIW 与其他肠毒素氨基酸序列比对:从美国国立生物技术信息中心数据库里下载 SEA、SEB、SEC3、SED、SEE、SEN 的氨基酸序列,利用 Geneious 软件中的 Align 对 SEIW 与上述肠毒素的氨基酸序列比对。

6. 重组蛋白的克隆表达:

(1)目的基因的扩增:根据 *selw* 序列设计引物。正向引物(F):5'-CCC CGG ATC CAT CGA ATA TTC AGA CTT ACA TC-3',反向引物(R):5'-CCC CAA GCT TTT ATG ATT TGA ATA AAT AGA TAT CT-3'。正反向引物中分别引入保护碱基和 *BamH* I、*Hind* III 的酶切位点(画横线处)。

(2)重组质粒表达载体的构建:PCR 产物纯化后连接到 pMD-18-T 载体上,进行蓝白斑筛选后,将菌落 PCR 鉴定阳性的菌落进行测序。将测序正确的产物-T 载体和表达载体 pET-28a(+)同时用 *BamH* I 和 *Hind* III 进行酶切,酶切成功的目的片段连接到表达载体上后转化至感受态细胞 BL21(DE3)中,在含卡那霉素的 LB 固体培养基上进行菌落 PCR 和重组质粒双酶切鉴定。

(3)重组蛋白的诱导表达、纯化及蛋白定量:将鉴定正确的重组质粒 pET-28a(+)-*selw* 接种在含有卡那霉素抗性的 LB 固体培养基上,挑取单克隆过夜培养种子液,按 1:100 的比例扩大培养至含有终浓度为 50 $\mu\text{g/ml}$ 卡那霉素抗性的 LB 液体培养基中,待 A_{600} 的值升高至 0.6~0.8 时,加入终浓度为 1 mmol/L 的 IPTG 诱导剂,16 $^{\circ}\text{C}$ 过夜诱导表达。将表达后的菌液离心洗涤、超声破碎后再次离心,上清用 0.45 μm 滤膜过滤后,用 AKTA 蛋白纯化仪-镍亲和层析柱纯化带有 His 标签的重组蛋白,纯化完后进行 SDS-PAGE 观察蛋白的纯化效果,并利用 BCA 蛋白定量试剂盒对重组蛋白 SEIW 进行定量。

结 果

1. SEIW 与 TCR 对接模型预测:AlphaFold 共预测 5 个 SEIW 单体结构模型,5 个模型的 pLDDT 的值分别为 95.13、95.33、95.03、94.56、94.98。最终选择模型 2 为对接蛋白单体(图 1A)。SEIW 的空间结构与已知其他肠毒素的结构相似,具有两个结构域(氨基末端结构域和羧基末端结构域)。氨基末端由与“寡糖/寡核苷酸折叠”类似的 β -基序组成,包含 3 个 α -螺旋($\alpha 1\sim\alpha 3$)及 6 个 β -片层($\beta 1\sim\beta 6$);羧基末端的 β -grasp 结构域由 2 个 α -螺旋($\alpha 4$ 、 $\alpha 5$)和

反向平行的β-片层(β7~β13)组成。氨基末端的前17个氨基酸与羧基末端相邻。ERROT评估结果显示,SEIW蛋白预测模型的整体质量因素得分为98.08,表明模型的准确度高;拉氏图的评估结果见图1B,优化后的最合适区氨基酸数目为94.1%,无氨基酸位于不允许区,表明模型构架结构合理。Verify_3D的结果显示,93.24%的氨基酸的评分≥0.2,说明模型和氨基酸序列的匹配度高。利用ZDOCK服务器对SEIW与TCR进行对接后,输出了10个评分高的对接构象,选择评分最高的对接构象作为分析对象(图1C),其评分值为1 521.328,符合ZDOCK筛选相互作用蛋白的要求(具体打分见表1)。使用PyMOL软件分析SEIW与TCR相应的氨基酸残基之间形成的19个氢键,氢键信息见表2。模型显示,TCR与SEIW蛋白的氨基末端结构域相邻。

2. SEIW与TCR对接的重要位点汇总分析:序

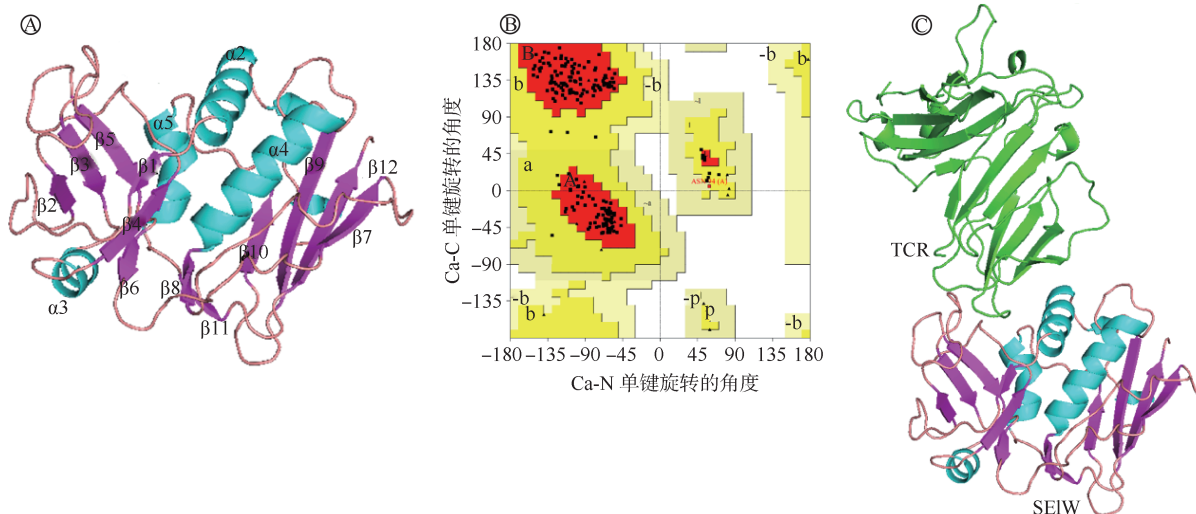
表1 ZDOCK对接模型评分值

模型名称	分值
SEIW-TCR-1	1 521.328
SEIW-TCR-2	1 502.312
SEIW-TCR-3	1 475.223
SEIW-TCR-4	1 447.242
SEIW-TCR-5	1 431.992
SEIW-TCR-6	1 405.735
SEIW-TCR-7	1 396.352
SEIW-TCR-8	1 395.121
SEIW-TCR-9	1 392.788
SEIW-TCR-10	1 391.315

表2 金黄色葡萄球菌类肠毒素W(SEIW)与T细胞受体(TCR)之间形成氢键的列表

氢键	SEIW			TCR			距离(Å)
	氨基酸位点	氨基酸	离子	氨基酸位点	氨基酸	离子	
1	86	TYR	OH	101	GLU	OE1	0.81
2	55	TRP	NE1	73	GLY	O	2.75
3	85	GLY	N	98	GLY	O	2.86
4	84	TYR	N	100	TYR	OH	2.90
5	94	ASN	O	29	GLU	O	3.12
6	18	TYR	OH	34	TYR	OH	3.21
7	83	ASN	O	100	TYR	OH	3.23
8	19	ASN	OD1	99	GLY	O	3.38
9	195	GLY	O	100	TYR	OH	3.41
10	26	ASP	ND2	51	GLN	OE1	3.41
11	196	HIS	N	100	TYR	OH	3.46
12	97	GLN	NE2	97	LEU	O	3.68
13	53	ASP	OD1	31	ASN	OD1	3.84
14	56	LYS	NZ	51	GLN	NE2	3.91
15	21	LYS	NZ	57	GLU	OE2	4.08
16	22	VAL	O	32	ARG	NH2	4.49
17	98	CYS	O	100	TYR	OH	4.50
18	54	ASP	OD	72	LYS	O	4.53
19	194	TYR	OH	101	GLU	OE2	4.55

列比对结果显示,SEIW与SEA、SEB、SEC3、SED、SEE、SEN在羧基末端相对保守(图2),既往文献实验验证的与TCR相互作用的肠毒素位点主要集中在氨基端,如SEA的位点N25、C96、C106、S206和N207,SED的位点N23和F46。结合既往文献报道的活性位点和不同肠毒素序列间同一位点的保守



注:A为SEIW蛋白单体,蓝色为SEIW蛋白的α-螺旋,桃红色为β-片层,棕色为不规则卷曲;B为SEIW蛋白模型评估的拉氏图,红色区域为完全允许区,黄色区域为允许区,白色为不允许区;C为SEIW与TCR对接模型,绿色代表TCR

图1 金黄色葡萄球菌类肠毒素W(SEIW)单体预测、评估及SEIW与T细胞受体(TCR)对接预测

性,总结出SEIW可能的重要位点:Y18、W55、N19、C88和C98(表3),并且这些位点与分子对接预测的可能形成氢键的氨基酸残基位点重合。

表3 金黄色葡萄球菌类肠毒素与T细胞受体作用的重要位点汇总

类别	Y18	N19	W55	C88	C98
氢键	是	是	是	否	是
不同肠毒素序列的保守性	否	是	否	是	是
既往文献报道	否	是	否	是	是

3. 重组蛋白的克隆表达:

(1)pET-28a(+)-*selw* 重组质粒的构建:*selw* 基因 PCR 扩增以菌株 DC51619 为模板,PCR 产物与 T 载体连接成功后基因测序,结果显示 *selw* 基因全长 669 bp(图 3A),无碱基突变。将测序正确的目的片段与表达载体 pET-28a(+)连接成功后,提取质粒进行双酶切鉴定,结果显示除质粒条带外,在接近 700 bp 有一目标条带(图 3B),提示重组质粒表达载体 pET-28a(+)-*selw* 构建成功。

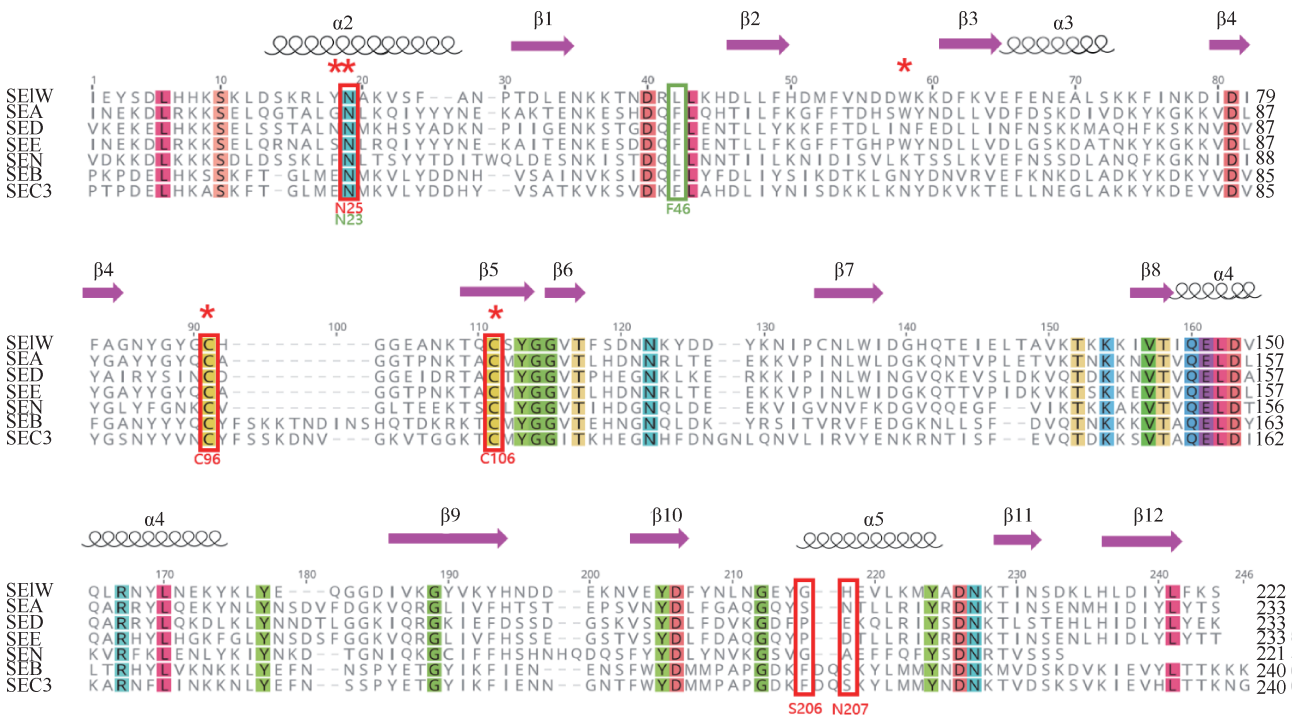
(2)重组蛋白的诱导表达、纯化及定量:经过对诱导表达条件的摸索,发现在 IPTG 终浓度为 1 mmol/L、16 °C 诱导 14 h 时更有利于 *selw* 基因的表达。收集表达好的菌体,超声破碎后进行 SDS-PAGE 检测,结果显示重组表达的 SEIW 蛋白

在上清和沉淀里均有表达(图 4A)。离心收集上清后用 AKTA 纯化仪进行纯化,纯化效果见图 4B。对纯化的 SEIW 蛋白进行定量,得到重组蛋白的浓度为 0.622 mg/ml。

讨 论

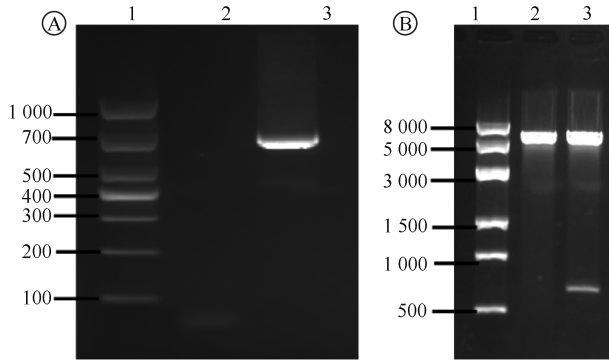
SEIW 是由核心基因编码的新型超抗原,几乎分布于金黄色葡萄球菌所有的流行克隆系,如 CC1、CC5、CC8、CC45、CC121 和 CC398 等,现已发现 14 个主要的等位基因变异体,氨基酸序列一致性高达 92%^[3,9]。SEIW 是目前预测的,存在于人类和家畜重要流行克隆 CC398 的唯一超抗原。体外实验表明,该蛋白的缺失可以导致 CC398 菌株失去促进 T 细胞增殖活性,表明该蛋白在致病性方面具有重要的功能^[11-12]。

AlphaFold 是一种新型的、准确性好、精密度高的预测蛋白 3D 结构的程序,甚至能分析 X-射线晶体学很难解决的楔入细胞膜中的蛋白质结构^[10],现已得到广泛的应用。ZDOCK 使用快速傅里叶变换算法在 3D 网络上实现高效的全局对接搜索,并利用形状互补性、静电学和统计势项的组合进行评分,在蛋白质-蛋白质刚性对接方面有很高的预测



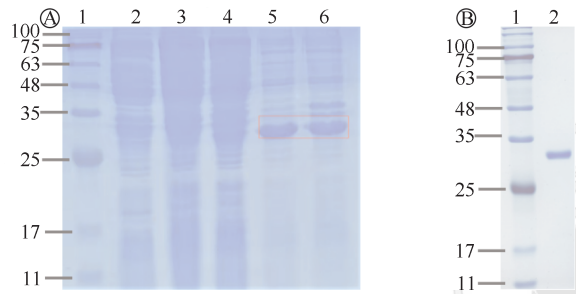
注:红色方框表示SEA与TCR的作用位点;绿色方框表示SED与TCR的作用位点;α表示α-螺旋,β表示β-片层,剩余未标注的位点表示不规则卷曲;*表示SEIW与TCR的预测位点

图2 金黄色葡萄球菌类肠毒素 W (SEIW) 与金黄色葡萄球菌肠毒素 (SEA、SED、SEE、SEN、SEB、SEC3) 的氨基酸序列对比



注: A: *selw* 基因 PCR 扩增: 1: Marker; 2: 阴性对照; 3: 目标条带; B: 重组质粒双酶切鉴定: 1: Marker; 2: 空质粒; 3: 重组质粒

图3 金黄色葡萄球菌类肠毒素 W (SEIW) PCR 扩增及重组质粒双酶切鉴定



注: A: 重组 pET-28a(+)-*selw* 诱导表达: 1: Marker; 2: 未诱导空质粒; 3: 诱导空质粒; 4: 未诱导重组质粒; 5: 破碎后上清; 6: 破碎后沉淀; B: SEIW 蛋白纯化: 1: Marker; 2: 纯化后蛋白

图4 金黄色葡萄球菌类肠毒素 W (SEIW) 诱导表达及纯化

准确性^[13]。本研究利用 AlphaFold 软件对 SEIW 蛋白进行三维结构预测,并借助 SAVES 在线服务器中的 ERRAT、拉氏图和 Verify_3D 对预测模型进行评估,然后通过 ZDOCK 对 SEIW 和 TCR 进行对接,以较高的准确性成功模拟了 SEIW 与 TCR 的结合方式,并结合 SEIW 和其他肠毒素的氨基酸多序列比对共同预测重要的可能的氨基酸位点。

根据核苷酸或氨基酸序列的相似性,可将超抗原分成 5 个组^[14],本研究的 SEIW 与 SEA 共同属于第 3 组^[8]。单体预测模型显示,SEIW 由两个结构域组成,氨基末端的寡糖/寡核苷酸-折叠结构域和羧基末端的 β -grasp 结构域,相对保守的 TCR 结合位点位于分隔这两个结构域的浅槽中;两个结构域之间由一个横跨分子中心的结构保守的 α -螺旋分割,这与已经报道的超抗原的结构相似^[4,15-17]。SEIW 的空间结构高度保守, α -螺旋和 β -折叠多数位于氨基酸序列的保守区,而不规则卷曲多位于非保守区。

有研究报道,位点 Y18 和 W55 可能是 SEIW 与 TCR 相互作用的重要免疫活性位点^[3],本研究的对

接结果也显示 Y18、W55 可与 TCR 形成氢键。对接构象同时显示位于 α -螺旋内的 N19 可形成氢键,可能影响 SEIW 与 TCR 的结合,此位点与研究报道的 SEA、SEB 和 SEC3 (编号分别为 N25、N23、N23) 共同超抗原锚点高度保守^[18-20],说明此位点对 SEIW 和 TCR 的相互作用可能具有重要影响。前期的突变研究显示, N25、C96、C106、S206 和 N207 五个位点是 SEA 与 TCR 相互作用位点^[18, 21-22]; N23、F46 是 SED 与 TCR 作用位点^[23]。这些残基的共同特点是单个氨基酸残基的理化性质的变化,即可影响凹槽与抗原肽的结合,如当某氨基酸突变为丙氨酸时,能显著影响 T 淋巴细胞的增殖和细胞因子的释放。经报道,位于环区上的位点通过氢键和范德华力能影响肠毒素与 TCR 之间的相互作用^[22],而 TCR 位点中 W55 和 C88 均位于环区,并同时与已被报道的 SEA 相对应的位点保持一致,值得重点关注。根据序列比对后氨基酸位点的保守性及汇总文献数据,本研究预测以下 5 个位点为重要的可能的 TCR 结合位点: Y18、N19、W55、C88 和 C98。但是序列比对发现 Y18 和 W55 两个位点与其他肠毒素相对应的位点保守性较低,因此后续还需对不同来源的 SEIW 氨基酸序列进行多态性分析进一步验证 Y18 和 W55 的保守性。

综上所述,本研究对 SEIW 与 TCR 进行分子对接模型预测,结合多序列比对分析总结出了 5 个需要重点关注的可能的超抗原活性位点,为进一步探索 SEIW 免疫识别机制提供了理论依据;同时运用体外重组技术成功构建并表达了 SEIW 蛋白,为后续构建突变体奠定了基础。

利益冲突 所有作者声明无利益冲突

作者贡献声明 杨玉花: 实验设计、实施研究、分析数据、论文撰写; 库鑫、宫雅楠、孟凡亮、卜东波: 实施研究、采集数据、分析/解释数据; 郭亚慧、龙丽瑾、范佳铭: 采集数据、分析/解释数据; 魏销玥: 采集数据、分析/解释数据、技术或材料支持; 张茂俊、张建中: 课题讨论、论文指导和修改; 闫笑梅: 课题总体设计、课题讨论、论文指导和修改

参 考 文 献

[1] Lowy FD. Staphylococcus aureus infections[J]. N Engl J Med, 1998, 339(8): 520-532. DOI: 10.1056/nejm199808203390806.

[2] Hanawa T, Shimoda-Komatsu Y, Araki K, et al. Skin and soft tissue infections caused by different genotypes of PVL-positive community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains[J]. Jpn J Infect Dis, 2020, 73(1):72-75. DOI:10.7883/yoken.JJID.2019.162.

- [3] Vrieling M, Tuffs SW, Yebra G, et al. Population analysis of *Staphylococcus aureus* reveals a cryptic, highly prevalent superantigen SEI_W that contributes to the pathogenesis of bacteremia[J]. *mBio*, 2020, 11(5): e02082-20. DOI: 10.1128/mBio.02082-20.
- [4] Fraser JD, Proft T. The bacterial superantigen and superantigen-like proteins[J]. *Immunol Rev*, 2008, 225(1): 226-243. DOI:10.1111/j.1600-065X.2008.00681.x.
- [5] Krakauer T. Staphylococcal superantigens: pyrogenic toxins induce toxic shock[J]. *Toxins (Basel)*, 2019, 11(3): 178. DOI:10.3390/toxins11030178.
- [6] Liu YX, Chen W, Ali T, et al. Staphylococcal enterotoxin H induced apoptosis of bovine mammary epithelial cells *in vitro*[J]. *Toxins (Basel)*, 2014, 6(12): 3552-3567. DOI: 10.3390/toxins6123552.
- [7] McCormick JK, Yarwood JM, Schlievert PM. Toxic shock syndrome and bacterial superantigens: an update[J]. *Annu Rev Microbiol*, 2001, 55: 77-104. DOI: 10.1146/annurev.micro.55.1.77.
- [8] Okumura K, Shimomura Y, Murayama SY, et al. Evolutionary paths of streptococcal and staphylococcal superantigens[J]. *BMC Genomics*, 2012, 13: 404. DOI: 10.1186/1471-2164-13-404.
- [9] Aung MS, Urushibara N, Kawaguchiya M, et al. Prevalence and genetic diversity of staphylococcal enterotoxin (-like) genes *sey*, *selw*, *selx*, *selz*, *sel26* and *sel27* in community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*[J]. *Toxins (Basel)*, 2020, 12(5): 347. DOI: 10.3390/toxins12050347.
- [10] Jumper J, Evans R, Pritzel A, et al. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold[J]. *Nature*, 2021, 596(7873): 583-589. DOI: 10.1038/s41586-021-03819-2.
- [11] Uhlemann AC, Porcella SF, Trivedi S, et al. Identification of a highly transmissible animal-independent *Staphylococcus aureus* ST398 clone with distinct genomic and cell adhesion properties[J]. *mBio*, 2012, 3(2): e00027-12. DOI: 10.1128/mBio.00027-12.
- [12] Uhlemann AC, Mcadam PR, Sullivan SB, et al. Evolutionary dynamics of pandemic methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus* ST398 and its international spread via routes of human migration[J]. *mBio*, 2017, 8(1): e01375-16. DOI: 10.1128/mBio.01375-16.
- [13] Pierce BG, Wiehe K, Hwang H, et al. ZDOCK server: interactive docking prediction of protein-protein complexes and symmetric multimers[J]. *Bioinformatics*, 2014, 30(12): 1771-1773. DOI: 10.1093/bioinformatics/btu097.
- [14] Xu SX, McCormick JK. Staphylococcal superantigens in colonization and disease[J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2012, 2: 52. DOI: 10.3389/fcimb.2012.00052.
- [15] Proft T, Fraser JD. Bacterial superantigens[J]. *Clin Exp Immunol*, 2003, 133(3): 299-306. DOI: 10.1046/j.1365-2249.2003.02203.x.
- [16] Rödström KEJ, Regenthal P, Lindkvist-Petersson K. Structure of staphylococcal enterotoxin E in complex with TCR defines the role of TCR loop positioning in superantigen recognition[J]. *PLoS One*, 2015, 10(7): e0131988. DOI: 10.1371/journal.pone.0131988.
- [17] Zeng C, Liu Z, Han Z. Structure of Staphylococcal Enterotoxin N: Implications for Binding Properties to Its Cellular Proteins [J/OL]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(23): 5921. DOI: 10.3390/ijms20235921.
- [18] Rödström KEJ, Regenthal P, Bahl C, et al. Two common structural motifs for TCR recognition by staphylococcal enterotoxins[J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 25796. DOI: 10.1038/srep25796.
- [19] Fields BA, Malchiodi EL, Li HM, et al. Crystal structure of a T-cell receptor β -chain complexed with a superantigen[J]. *Nature*, 1996, 384(6605): 188-192. DOI: 10.1038/384188a0.
- [20] Li HM, Llera A, Tsuchiya D, et al. Three-dimensional structure of the complex between a T cell receptor β chain and the superantigen staphylococcal enterotoxin B [J]. *Immunity*, 1998, 9(6): 807-816. DOI: 10.1016/s1074-7613(00)80646-9.
- [21] Grossman D, van M, Mollick JA, et al. Mutation of the disulfide loop in staphylococcal enterotoxin A. Consequences for T cell recognition[J]. *J Immunol*, 1991, 147(10): 3274-3281. DOI: 10.4049/jimmunol.147.10.3274.
- [22] Benkerroum N. Staphylococcal enterotoxins and enterotoxin-like toxins with special reference to dairy products: An overview [J]. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2018, 58(12): 1943-1970. DOI: 10.1080/10408398.2017.1289149.
- [23] Li YF, Zhu XH, Huang YH, et al. Mutational analysis of the binding of staphylococcal enterotoxin D to the T cell receptor V β chain and major histocompatibility complex class II [J]. *Immunol Lett*, 2006, 105(1): 55-60. DOI: 10.1016/j.imlet.2005.12.005.