

# 金黄色葡萄球菌 B 型肠毒素的构象研究

王小红<sup>1</sup>, 谢笔钧<sup>1</sup>, 史贤明<sup>2</sup>

(1. 华中农业大学食品科技学院, 湖北 武汉 430070) (2. 上海交通大学农业与生物学院, 上海 200240)

**摘要:** 采用扫描电镜、X-射线衍射仪、原子力显微镜、傅立叶红外光谱仪等现代结构分析手段, 对金黄色葡萄球菌 B 型肠毒素的蛋白质聚集态结构、立体形貌、分子链构象等进行较为系统的结构表征。结果表明: SEB 结构中有结晶区的形成, 结晶度为 37.8%, SEB 分子聚集在一起, 形态主要为片状和平板状, 具有一定的规整性; SEB 在稀溶液状态下其单分子链长度约为 1500 nm, 分子链宽度约为 20~40 nm, 分子链高 0.6 nm; SEB 是一种  $\beta$ -折叠结构含量较多的蛋白质。

**关键词:** 金黄色葡萄球菌 B 型肠毒素; 构象; 表征

中图分类号: Q939.1; 文献标识码: A; 文章编号: 1673-9078(2008)04-0309-04

## Conformation Study of Staphylococcal Enterotoxin B

WANG Xiao-hong<sup>1</sup>, XIE Bi-jun<sup>1</sup>, SHI Xian-ming<sup>2</sup>

(1. Department of Food Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

(2. Department of Agriculture and Biology, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200240, China)

**Abstract:** The aggregation structure, the molecule chain morphology and secondary structural parameters of SEB were investigated with modern structural analyzing techniques, such as X-ray diffraction, scan electron microscopy, atomic force microscopy and fourier transform infrared spectrum. Crystallization was found in SEB with the crystallinity of 37.8%. The conformation of the conglomerated SEB molecules was sheet and plate. In dilute solution, the length, width and height of the SEB molecular chain were 1500 nm, 20~40 nm and 0.6 nm, respectively. It was also found that the secondary structure of SEB was mainly of  $\beta$ -sheets.

**Key words:** staphylococcal enterotoxin B; conformation; Token

金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 是引起人类感染和细菌性食物中毒的一种重要致病菌, 在自然界中分布广泛。金黄色葡萄球菌致病力的强弱主要取决于它产生毒素和侵袭性酶的能力。在金黄色葡萄球菌分泌的 20 多种毒性蛋白中, 金黄色葡萄球菌产生的耐热性肠毒素, 是引起人类食物中毒和葡萄球菌胃肠炎的主要原因。所有的金黄色葡萄球菌肠毒素都有一个相同的基本结构即含有二硫键和单一多肽链, 不含有碳水化合物、脂肪和核酸<sup>[1]</sup>。金黄色葡萄球菌肠毒素是潜在的葡萄球菌胃肠炎性食物中毒的致病因子和刺激非特异性 T 细胞增殖的超抗原, 虽然这两种特性分属毒素蛋白质的不同结构区域所控制, 但它们之间仍然存在很大的相关性, 多数情况下, 超抗原活性的损失, 往往会伴随肠毒素活性的减少。由于金黄色葡萄球菌肠毒素的理化性质、生理功能均与其分子结构密切相关, 因此, 研究肠毒素的结构及其构象变化对于认识其结构功能关系及超抗原作用的具有十分重

要的意义。

本文在分离纯化 B 型肠毒素 (staphylococcal enterotoxin B, 简称 SEB) 的基础上, 采用扫描电镜、X-射线衍射仪、原子力显微镜、傅立叶红外光谱仪等现代结构分析手段, 从蛋白质聚集态结构、立体形貌、分子链构象等方面对金黄色葡萄球菌 B 型肠毒素的结构进行较为系统的表征, 对于进一步了解其结构与功能的关系具有一定的指导意义。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试剂和仪器

金黄色葡萄球菌 B 型肠毒素, 自制 (电泳纯)<sup>[2]</sup>; 扫描电镜 X-650, HITACHI Japan; X-射线衍射仪 D/MAX-RA, 日本; 原子力显微镜 AJ-III, 上海爱建纳米科技发展有限公司; 傅立叶红外光谱 NEXUS-470, NICOLET, USA。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 SEB 聚集状态的扫描电镜观察

取大小厚度适合于样品室要求的干燥的 SEB 样品粘着于样品台上, 置真空喷镀仪内镀上一层导电膜

收稿日期: 2007-12-26

作者简介: 王小红 (1970-), 女, 博士, 副教授, 研究方向为食品微生物与食品安全

(金)后,在日立 X-650 型扫描电镜上观察其表面结构。扫描电镜工作条件: 高压 25 kV,束流  $5\times 10^{-9}$  mA,工作距离 15 mm<sup>[3]</sup>。

1.2.2 SEB 的 X-射线衍射分析

SEB 的 X-射线衍射谱图采用粉晶衍射仪 D/MAX HIB 测定,测定条件:  $\text{CuK}_\alpha$  辐射,管压 35 kV,管流 30 mA,扫描速度 5°/min,狭缝宽度 0.3 mm,滤波片 Ni,温度 20 ℃,湿度 70%。

结晶度按公式  $X_c=W_c/(W_c+W_a)$  计算

式中:  $X_c$ -结晶度,  $W_c$ -结晶部分质量分数,  $W_a$ -非结晶部分质量分数。

面间距 (d):  $d=\lambda/2\sin\theta$

相对强度 (I):  $I=2\theta$  处的衍射强度/最大衍射强度

其中:  $\lambda$  为入射线波长,  $\theta$  为衍射角度<sup>[4]</sup>。

1.2.3 原子力显微镜观察 SEB 的立体形貌

SEB 溶于去离子水后 (1 mg/mL),再梯度稀释,直至样品浓度为  $1.0\times 10^{-3}$  mg/mL。取样品溶液 5  $\mu\text{L}$  滴在新鲜解离的云母片上,空气中干燥 60 min,固定后直接进行 AFM 观察<sup>[5]</sup>。

1.2.4 SEB 的傅立叶变换红外光谱分析

样品和溴化钾混合研磨后压片,用傅立叶红外光谱仪测定。光谱测定范围  $4000\text{ cm}^{-1}\sim 400\text{ cm}^{-1}$ ,仪器分辨率  $0.5\text{ cm}^{-1}$ ,扫描次数 32/64。

2 结果与分析

2.1 SEB 聚集状态的扫描电镜观察

图 1 是 SEB 的扫描电镜照片。从扫描电镜对 SEB 分子微观形态的观察可知,经喷金后 SEB 固态聚集体的表面紧密平整。SEB 分子聚集在一起,呈无规则片状、平板状结构,具有一定的规整性,并有结晶区的形成。

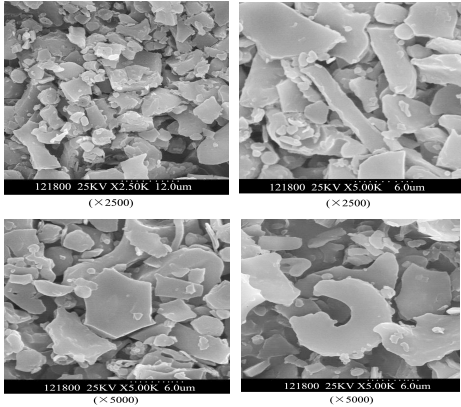


图 1 SEB 的扫描电镜照片  
Fig.1 SEM Image of SEB

2.2 SEB 的 X-射线衍射分析

SEB 的 X-射线衍射分析图谱见图 2,晶体参数见表 1。从图 2 可以看到 SEB 的衍射图出现一个较宽的衍射峰,为典型的高分子聚合物的衍射图,峰宽较大说明在结晶部分存在多种类似的结晶形态和晶格种类,反应 SEB 的结晶体既具有宏观的规则性又具有微观的不规整性,这与扫描电镜的观察结果相一致。根据结晶区峰面积和非结晶区面积计算 SEB 的结晶度为 37.8%。

表 1 SEB 的结晶特性

Table 1 Crystallization properties of SEB

(2 $\theta$ /°)	I/%	d/Å	WX/%
19.16	85.40	4.63	37.8
22.16	100.00	4.01	
28.46	59.05	3.14	
39.72	40.00	2.27	

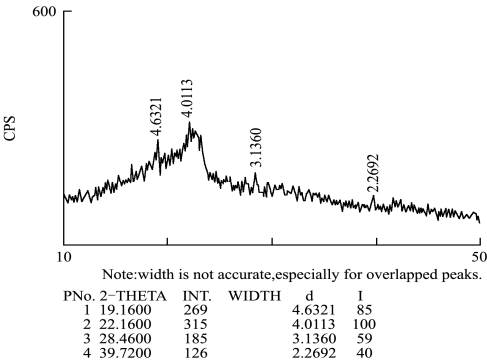


图 2 SEB 的 X-射线衍射图

Fig.2 The X-ray diffraction spectrum of SEB

2.3 原子力显微镜观察 SEB 的立体形貌

原子力显微镜由 G Binnig, C Quate 和 C Gerber 于 1986 年发明,现已成为一种观察细胞生物大分子形态结构的强有力的工具<sup>[6]</sup>。原子力显微镜作为一种新颖的物质结构分析方法,可以研究蛋白质分子在水溶液和无水存在时的聚集状态,该聚集状态的改变与蛋白质分子的结构和形态密切相关。利用原子力显微镜观察时,将极稀浓度的蛋白质水溶液在无外界环境干扰的情况下自然浓缩干燥,使蛋白质分子均一地沉降到云母片表面,因而原子力显微镜观测到的蛋白质分子形态更接近于其在溶液中的形态。本研究在扫描电镜观测 SEB 聚集态结构的基础上,进一步用原子力显微镜观测其单分子链的微观结构和形貌。图 3 是 SEB 在水溶液状态 ( $1.0\times 10^{-3}$  mg/mL) 时,一个观察视野下的原子力显微镜图。在该浓度条件下,SEB 处于一种分散的状态,在原子力显微镜下能观察到 1 个孤立状态下的 SEB 分子链,分子链形态为典型的无规线团链。其单分子链长度约 1500 nm,分子链宽度约为

20~40 nm, 分子链高 0.6 nm, 没有发现支链结构的存在。

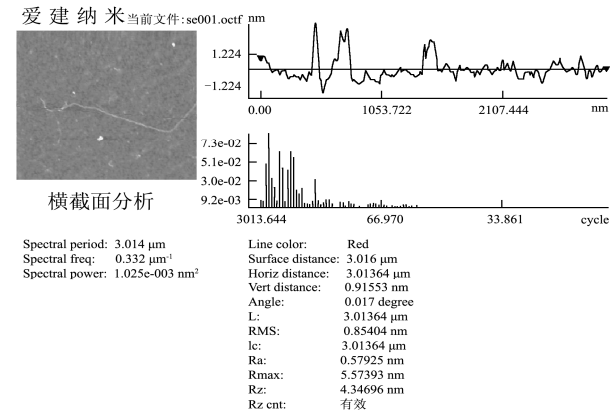


图 3 SEB 的原子力显微镜图

Fig.3 The AFM image of SEB in rare concentration

2.4 SEB 的傅立叶变换红外光谱分析

蛋白质的分子结构可以分为一级、二级、三级和四级结构。蛋白质的功能, 不仅与蛋白质的一级结构有关, 而且还与蛋白质的空间结构有关。测定蛋白质的空间结构有助于全面阐明蛋白质结构与功能的相互关系。SEB 的傅立叶变换红外光谱图如图 4 所示。从图 4 可看出 SEB 具有蛋白质的特征红外吸收峰, 经分析, 各吸收峰的归属如表 2。

图4中SEB的特征结构如下: 3419 cm<sup>-1</sup>的宽峰是 N-H和O-H的伸缩振动, 为蛋白质的特征吸收, 该峰在3400 cm<sup>-1</sup>左右较宽的范围, 说明存在着明显的分子间氢键和氮氢键。在3000~2800 cm<sup>-1</sup>处的一组峰是蛋白质C-H伸缩振动。蛋白质二级结构的酰胺 I 带红外光谱范围为: α-螺旋结构1645~1662 cm<sup>-1</sup>; 无规卷曲1638~1645 cm<sup>-1</sup>; β-折叠1615~1638 cm<sup>-1</sup>[7]。但是蛋白质的这三种二级结构的酰胺 I 振动区域往往在1645 cm<sup>-1</sup>~1680 cm<sup>-1</sup>范围内彼此重叠, 很难进行定量的解析。图4中1647 cm<sup>-1</sup>处的强吸收峰显示蛋白质酰胺 I 谱带的C=O伸缩振动, 由于受氨基影响C=O伸缩振动吸收向低波数位移。蛋白质酰胺 II 谱带肽键官能团—HN—C=O的特征吸收峰出现在 1541 cm<sup>-1</sup>和 1399 cm<sup>-1</sup>, 它们分别为—HN—C=O的反式构型和顺式构型的吸收峰, 从红外图谱中可以显示反式吸收强度(1541 cm<sup>-1</sup>) 大于顺式吸收(1399 cm<sup>-1</sup>), 表明SEB处于较稳定的状态。

对于蛋白质二级结构的分析一般是观察酰胺III的振动吸收。各种二级结构的酰胺III带振动区域为: α-螺旋结构1340~1290 cm<sup>-1</sup>; 无规卷曲1288~1255 cm<sup>-1</sup>; β-折叠1248~1220 cm<sup>-1</sup>[8]。且有序结构酰胺III

带强度较弱, 而无规卷曲则有相对较强的酰胺III<sup>[9]</sup>。从SEB的FT-IR图中可以看出在1343 cm<sup>-1</sup>、1280 cm<sup>-1</sup>和1242 cm<sup>-1</sup>的红外吸收分别属于α-螺旋、无规卷曲和β-折叠结构, 其中β-折叠(1242 cm<sup>-1</sup>) 所占比例远大于无规卷曲(1280 cm<sup>-1</sup>) 和α-螺旋(1343 cm<sup>-1</sup>), 说明SEB是一种β-折叠结构含量较多的蛋白质。

表 2 SEB 的红外光谱吸收峰归属

Table 2 FT-IR band assignments of SEB		
Name	cm <sup>-1</sup>	Vibrational mode
Amide A	3419	υ <sub>N-H</sub>
	2922	υ <sub>C-H</sub>
Amide I	1647	υ <sub>C=O</sub>
Amide II	1541	δ <sub>N-H</sub> υ <sub>C-N</sub>
Amide II	1399	δ <sub>N-H</sub> υ <sub>C-N</sub>
Amide III	1343	δ <sub>N-H</sub> υ <sub>C-N</sub>
	1280	δ <sub>N-H</sub> υ <sub>C-N</sub>
	1242	δ <sub>N-H</sub> υ <sub>C-N</sub>

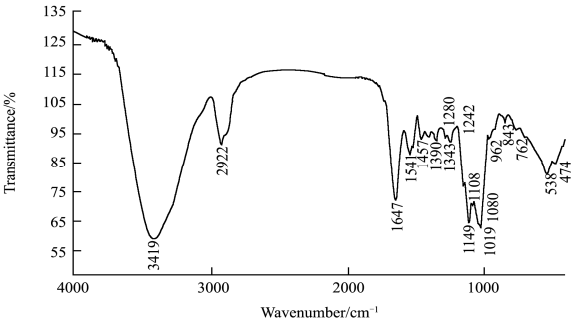


图 4 SEB 的红外光谱

Fig.4 FT-IR spectrum of SEB

3 结论

3.1 扫描电镜和 X-射线衍射对 SEB 的分析表明, 其聚集态结构既有宏观上的规则性和完整性又具有微观上的不规整性。具体表现为 SEB 呈无规则片状、平板状, 具有一定的规整性, 在 X 射线分析中 SEB 具有较高的结晶度(37.8%)但同时结晶峰形比较宽, 表明 SEB 结晶中不只一种结晶结构状态存在。

3.2 对 SEB 分子的原子力显微镜观测的结果证实了其单一多肽链构象, 获得了 SEB 的单分子链参数, 其分子链长度约 1500 nm, 分子链宽度约为 20~40 nm, 分子链高 0.6 nm。

3.3 SEB 的红外光谱分析表明, SEB 是一种 β-折叠结构含量较多的蛋白质。

(下转第 315 页)