

重组金葡菌肠毒素 O 的克隆表达及生物学活性分析

潘映秋, 丁 丁, 孙红颖, 陈枢青*

(浙江大学 药学院 药物毒理与生化药学研究所, 浙江 杭州 310058)

摘要: 克隆金葡菌肠毒素 O (SEO) 的全长基因, 实现其可溶性表达, 并对纯化的表达产物进行生物学活性分析。从金葡菌 FRI100 菌株基因组中得到 SEO 基因, 克隆至谷胱甘肽 S 转移酶 (GST) 融合表达载体 pGEX-4T-1, 转化大肠杆菌, 获高效表达。融合蛋白 GST-SEO 经 Glutathione Sepharose 4B 亲和纯化和凝血酶消化获重组 SEO (rSEO) 后, MTT 法检测脾淋巴细胞的增殖作用, 分析纯化后 rSEO 的生物学活性。测序结果表明, 得到正确的肠毒素 SEO 基因序列, 并获高效表达的融合蛋白; MTT 结果表明, rSEO 具有与 SEC 相当的显著的促淋巴细胞增殖以及抑制肿瘤细胞生长的能力。本研究成功克隆、表达、纯化了具有抗肿瘤生物学活性的 rSEO 蛋白, 为进一步研究该蛋白的抗肿瘤机制奠定了基础, 并有望成为一种新的超抗原制剂用于肿瘤的临床治疗。

关键词: 肠毒素; 超抗原; 重组蛋白; 细胞增殖

中图分类号: R967 文献标识码: A 文章编号: 0513 - 4870(2007)09 - 0943 - 06

Expression and bioactivity of the cloned staphylococcal enterotoxin O

PAN Ying-qiu, DING Ding, SUN Hong-ying, CHEN Shu-qing*

(Institute of Pharmacology and Toxicology and Biochemical Pharmaceutics, College of Pharmaceutical Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China)

Abstract: This study is to clone the gene of staphylococcal enterotoxins O, obtain recombinant protein (rSEO) and investigate its activity on mice lymphocyte. *Staphylococcus aureus* O gene is cloned into GST gene fusion vector pGEX-4T-1. The resultant plasmid pGEX-4T-SEO was used to transform *E. coli* BL21, where the GST-SEO fusion protein was expressed efficiently. Then SEO was purified by Glutathione Sepharose 4B affinity column and digested with thrombin. The bioactivity of SEO was analyzed by MTT assay on mice lymphocyte and tumor cells. The nucleotide sequence was confirmed to code for the protein correctly, and soluble SEO was expressed efficiently in *E. coli* BL21 with pGEX-4T-SEO. The protein purified by affinity chromatography resulted to be one single band by SDS-PAGE detection. The MTT assay of the purified rSEO demonstrated that its abilities of stimulating T cells and inhibiting the proliferation of K562, K562-ADM and B16 cells were equivalent to that of SEC *in vitro*. The expression plasmid pGEX-4T-SEO was constructed and the recombinant superantigen was expressed successfully, which may provide a foundation for the further research of the anticancer activity of SEO.

Key words: enterotoxin; superantigen; recombinant protein; cell proliferation

超抗原 (superantigen, SA_g) 是由某些细菌和病毒产生的一类功能相关的蛋白质抗原。SA_g 的免疫识别与普通抗原不同, 不需要抗原递呈细胞的内处理, 而是以完整蛋白质的形式直接与 II 型组织相容

性抗原 (MHC II) 的抗原结合槽外侧特异性结合, 以 TCR V_β 特异方式激活比普通抗原高达 $1 \times 10^3 \sim 1 \times 10^5$ 倍的 T 淋巴细胞, 分泌大量细胞因子^[1], 故在免疫治疗肿瘤方面具有广阔的前景。

目前对 SA_g 的研究多集中于金葡菌肠毒素 (staphylococcal enterotoxins, SEs)。SEs 是由金葡菌分泌的一系列具有超抗原活性的外毒素, 有多种血清型: SEA ~ SEE, SEG ~ SEQ, TTST-1 及 TTST-2,

收稿日期: 2007-01-12.

基金项目: 浙江省科技厅重大攻关项目 (2004C13041).

* 通讯作者 Tel: / Fax: 86 - 571 - 88208411,

E-mail: chenshuqing@zju.edu.cn

SEC包括3个亚型 SEC₁ ~ SEC₃^[2]。1996年世界上第1个用于临床的超抗原抗肿瘤药物高聚生金葡素(沈阳协和集团研制)在临床正式推广应用,它是从金葡菌代谢产物中提取的生物反应调节剂,有效成分是 SEC。目前还有恩格菲、思复胜等同样以 SEC 作为有效成分的临床药物用于肿瘤放化疗的辅助治疗,大量的临床数据证明使用 SEC后肿瘤患者的免疫能力获得了显著提高^[3,4]。

尽管 SEC的治疗效果已经过多年临床考验,但金葡素制剂仍然是一种混合物,其主要的有效成分肠毒素 C相对含量极低,而且存在着大量杂质蛋白及多肽等,使其在临床应用上的毒副作用难以监控。如有报道,患者在应用金葡菌滤液制剂联合顺铂治疗恶性胸水过程中出现的主要副作用为发热,约占治疗组患者总数的 65.5%^[5];也有报道指出,有部分肿瘤患者在使用金葡菌滤液制剂联合卡铂治疗恶性胸腔积液过程中出现了发热和局部疼痛等副作用^[6]。虽然大部分副作用都是暂时性的,但对肿瘤患者的治疗和康复仍造成了不良影响。因此,对于目前金葡菌滤液制剂在临床应用中遇到的问题,需要制备高纯度的肠毒素并建立严格、可控的质量标准,以减少在使用过程中产生的毒副作用并增强抑制肿瘤疗效。

目前研究最为深入的金葡菌肠毒素主要有 SEA、SEB和 SEC等,对其他肠毒素的研究较少。本研究首次在国内报道了在大肠杆菌中大量表达重组 SEO(*r*SEO)蛋白,通过亲和层析纯化得到高纯度的目的蛋白,并对纯化的 *r*SEO蛋白的体外生物学活性进行研究,为进一步研究各种肠毒素的作用机制以及新的抗肿瘤制剂的开发奠定了基础。

材料与方法

质粒、菌株与细胞系 大肠杆菌 DH5 α 及 BL21为浙江大学药学院生物制药研究室保存;质粒 pGEM-T和 pGEX-4T-1 购自 Promega 公司;质粒 pGEM-T-SEO和 pGEX-4T-SEO为浙江大学药学院生物制药研究室构建。

实验动物 ICR小鼠,体重(20 \pm 2)g,雌雄兼用,购自浙江省医学科学院实验动物部,合格证:SCXK(浙)2003-0001。

实验细胞系 耐药慢性髓原性白血病细胞 K562-ADM:阿霉素(ADM)抗性,ADM质量浓度为 1 μ g \cdot mL⁻¹,由浙江大学药学院生物制药研究室逐步诱导 K562建立;慢性髓原性白血病细胞 K562及

小鼠黑色素瘤细胞 B16均由浙江大学药学院生物制药研究室保存。

主要试剂 Taq聚合酶、限制性内切酶 BamHI、XhoI及 T4DNA连接酶均购自 NEB公司;IPTG、低熔点琼脂糖购自 BBI公司;PCR引物由上海生工生物工程有限公司合成;DNA测序由上海联众基因科技研究院完成;Glutathione Sepharose 4B为 Amersham Pharmacia Biotech公司产品;凝血酶购自常州千红生化制药有限公司;BCA试剂盒购自碧云天生物技术研究所以;RPMI 1640培养基为 Gibco公司产品;胎牛血清(FCS)购自杭州四季青生物工程有限公司;SEC₂蛋白为浙江大学药学院生物制药研究室制备保存^[7];其他生化试剂 MTT、ConA和 DNA凝胶回收试剂盒均购于上海生工生物工程有限公司。

引物设计 参照 SignalP 3.0 Server预测的 SEO的成熟肽基因序列,设计如下一对引物序列,上游引物 Up-5' GGA TCC AAT GAA GAA GAT C 3',下游引物 Down-5' CTC GAG TTT CAG ATT GTT ATG 3',其中上游引物 5'引入 BamHI酶切位点(划线部分),下游引物 5'分别引入 XhoI酶切位点(划线部分)及终止密码子 ATT。

金葡菌基因组的提取及目的基因的扩增、克隆及鉴定 将金葡菌(FRI100)接种于 LB液体培养基中过夜培养,离心收集菌体后重悬,加蛋白酶 K,37 $^{\circ}$ C水浴至菌悬液黏稠,加入 SDS-Tris裂解液。室温下处理后饱和酚抽提 2次,离心收集上层水相后,加入 NaAc(pH 5.5)以及无水乙醇,混匀,放置于 -20 $^{\circ}$ C。1 h后离心去上清液,灭菌去离子水溶解 DNA,置于 -20 $^{\circ}$ C备用^[8]。

以金葡菌基因组为模板,PCR扩增^[8]。反应体系(100 μ L)如下:10 \times 反应缓冲液 10 μ L, MgCl₂(25 mmol \cdot L⁻¹) 6 μ L, dNTP(10 mmol \cdot L⁻¹) 4 μ L,质粒模板 2 μ L,上游引物(20 μ mol \cdot L⁻¹) 4 μ L,下游引物(20 μ mol \cdot L⁻¹) 4 μ L, Taq聚合酶 1 U,补水至 100 μ L,分装成 4 \times 25 μ L体系。扩增条件如下:94 $^{\circ}$ C 5 min(94 $^{\circ}$ C 30 s, 52 $^{\circ}$ C 60 s, 72 $^{\circ}$ C 60 s), 32个循环, 72 $^{\circ}$ C 10 min。

PCR产物回收后与 pGEM-T载体以 T4DNA连接酶连接,转化至感受态大肠杆菌 DH5 α 中并扩增,蓝白筛选挑阳性克隆,经 BamHI与 XhoI酶切鉴定后送样测序。DNA序列验证构建得到的重组 pGEM-T-SEO质粒。

目的基因的亚克隆及重组 SEO 的诱导表达用 *Bam*HI 和 *Xho*I 分别酶切 pGEM-T-SEO 和 pGEX-4T-1 质粒。回收 pGEM-T-SEO 质粒酶切产物的小片段即含酶切位点的编码 SEO 成熟肽基因片段以及 pGEX-4T-1 质粒酶切产物的大片段,将两者连接,构建了表达质粒 pGEX-4T-SEO。将该重组质粒转入大肠杆菌 DH5 α 扩增并提取质粒,经过 *Bam*HI 和 *Xho*I 酶切鉴定。

从含有 pGEX-4T-SEO 重组质粒的大肠杆菌 DH5 α 中提取该质粒,转化至大肠杆菌 BL21 中,通过抗生素抗性筛选阳性克隆,获得可以大量表达谷胱甘肽-S 转移酶 (glutathione S-transferase, GST)-SEO 融合蛋白的工程菌株。将上述工程菌单菌落接种于含氨苄青霉素 ($100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 的 LB 培养基 5 mL 中, 37°C 振荡培养 6 h, 作为种子液。将该种子液以 1% ~ 5% 的接种量接种于含氨苄青霉素的 $2 \times \text{YT}$ 培养基中, 37°C 振荡培养至培养物的吸收度 (A_{600}) 为 0.5 左右后,按 0.01% ~ 0.1% 加入 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ IPTG 诱导表达 12 h。

融合蛋白的可溶性鉴定及亲和层析纯化 诱导后的菌液,离心弃上清液,预冷的磷酸盐缓冲液 (PBS) 重悬菌体。超声破碎菌体后,离心收集上清液,低温保存待用。取诱导后破菌上清液样品和诱导前的菌体总蛋白进行 SDS-PAGE,分析表达产物的溶解性^[9]。

Glutathione Sepharose 4B 亲和层析柱纯化目的蛋白,具体操作按照 Amersham Pharmacia Biotech 的产品说明书进行。用 Gene Quant pro 的 280 nm 紫外吸收对融合蛋白的洗脱进行检测,并用 SDS-PAGE 检验各收集组分的纯度与浓度。

融合蛋白的凝血酶消化及纯化 融合蛋白 GST-SEO 中 GST 和 SEO 两个完整的结构域之间含有凝血酶的酶切位点,可用凝血酶消化后,通过 Glutathione Sepharose 4B 琼脂糖凝胶柱纯化,收集流出液得到高纯度的目的蛋白。SDS-PAGE 检测溶液中的蛋白纯度与浓度,纯化后的蛋白溶液脱盐后冻干保存。

rSEO 分子筛 HPLC 纯度检测 色谱柱: Bio-rad Bio-Sil SEC 250-5 (300 mm \times 7.8 mm); 流动相: TEAN 缓冲液 (pH 7.0); 流速: $0.5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$; 检测波长: 280 nm; 进样量: 100 μL , 对 rSEO 的纯度进行检测。

MTT 法测定 rSEO 对 ICR 小鼠脾淋巴细胞的增殖作用^[10-12] BCA 法测定 ConA、GST、SEC₂ 和

rSEO 的浓度,在 570 nm 处测定吸收度,计算待测蛋白浓度。

以 ICR 小鼠的脾淋巴细胞为靶细胞,将其悬浮于含 10% 小牛血清的 RPMI 1640 培养液中,调整细胞数为 $5 \times 10^6 \cdot \text{mL}^{-1}$,每孔 100 μL 铺于 96 孔板中,设调零孔 (培养基)、空白孔 (培养基、脾淋巴细胞)、阴性对照孔 (培养基、脾淋巴细胞、GST)、阳性对照孔 (培养基、脾淋巴细胞、ConA)、SEC₂ 对照孔 (培养基、脾淋巴细胞、SEC₂) 和 rSEO 测定孔 (培养基、脾淋巴细胞、rSEO),每种设 4 个复孔。GST、ConA、SEC₂ 和 rSEO 的终质量浓度分别为 0.01, 0.02, 0.1, 0.2, 1, 2, 10, 20 及 $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。于铺板后 44 h 在待测孔中加入 MTT 溶液 10 μL 孔,培养箱中继续培养 4 h 后,小心吸除上清液,并加入 DMSO 120 μL 孔, 37°C 孵育 10 min,待甲臜沉淀完全溶解,酶标仪双波长法 (测定波长为 570 nm,参考波长为 630 nm) 测定各孔 $A_{570 \text{ nm}} - A_{630 \text{ nm}}$ 值,实验结果用刺激指数 SI (stimulation index) 表示: $\text{SI} = \text{供试品组平均吸收度值} / \text{空白对照组平均吸收度值}$ 。

MTT 法测定 rSEO 的体外抑瘤活性^[13] 以小鼠脾淋巴细胞为效应细胞,分别以 K562、K562-ADM 或 B16 为靶细胞,设调零孔 (培养基)、肿瘤细胞对照孔 (培养基、肿瘤细胞)、淋巴细胞本底释放孔 [含空白孔 (培养基、脾淋巴细胞)、阴性对照孔 (培养基、脾淋巴细胞、GST)、阳性对照孔 (培养基、脾淋巴细胞、ConA)、SEC₂ 对照孔 (培养基、脾淋巴细胞、SEC₂) 和 rSEO 测定孔 (培养基、脾淋巴细胞、rSEO)] 以及抑瘤作用孔 [含空白孔 (培养基、脾淋巴细胞、肿瘤细胞)、阴性对照孔 (培养基、脾淋巴细胞、肿瘤细胞、GST)、阳性对照孔 (培养基、脾淋巴细胞、肿瘤细胞、ConA)、SEC₂ 对照孔 (培养基、脾淋巴细胞、肿瘤细胞、SEC₂) 和 rSEO 测定孔 (培养基、脾淋巴细胞、肿瘤细胞、rSEO)], 每种设 3 个复孔。GST、ConA、SEC₂ 和 rSEO 的终质量浓度分别为 0.001, 0.01, 0.1, 1 及 $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。淋巴细胞本底释放孔中以细胞数 5×10^6 孔加入,抑瘤作用孔中每孔以 5×10^6 个脾淋巴细胞和 2.5×10^5 个 K562、K562-ADM 或 B16 肿瘤细胞的混合悬液加入。

吸收值测定方法同 MTT 法。按下式计算抑瘤率: 抑瘤率 (%) = $100 - [(\text{抑瘤作用孔} - \text{淋巴细胞本底释放孔}) / (\text{肿瘤细胞对照孔})] \times 100$ 。

统计学处理 应用 SPSS 12.0 进行统计学分析。实验数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间差异比较采用 *t* 检验。

结果

1 SEO基因片段的克隆及测序

PCR扩增出一条特异性的片段,大小约为 700 bp,与预期的片段大小一致,SEO基因的扩增片段纯化后与 pGEM-T载体连接,经 *Bam*HI和 *Xho*I双酶切鉴定,琼脂糖凝胶电泳显示,切出大小约 700 bp 的重组片段(图 1)。获得的阳性克隆测序结果显示插入载体的目的基因与 Signal P 3.0 Server预测的目的序列完全一致。

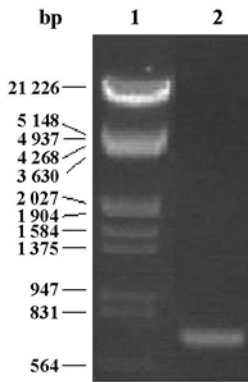


Figure 1 PCR amplification of SEO gene. 1: DNA Marker; 2: PCR products of SEO

2 GST-SEO融合表达载体的构建及鉴定

将重组 pGEM-T-SEO质粒用 *Bam*HI和 *Xho*I双酶切回收目的基因片段,插入表达载体 pGEX-4T-1的多克隆位点,插入片段的编码读框与上游的 GST编码读框一致,转化大肠杆菌 DH5 α 。随机挑选克隆,经酶切鉴定获得阳性克隆 pGEX-4T-SEO,结果见图 2。

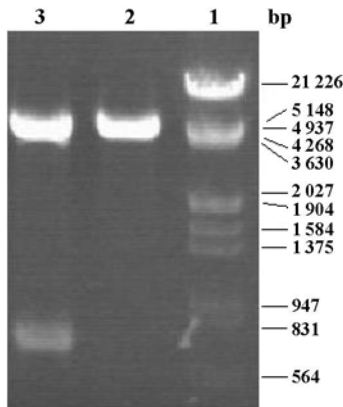


Figure 2 Verification of positive clone with pGEX-4T-SEO by double endonuclease digestion. 1: DNA marker; 2: pGEX-4T-SEO; 3: pGEX-4T-SEO digested with *Bam*HI and *Xho*I

3 GST-SEO融合蛋白的纯化、酶切及其酶切后的纯化

转化有 pGEX-4T-SEO重组质粒的宿主菌经 IPTG诱导后,SDS-PAGE结果显示该菌体有一条明显的融合蛋白表达条带,分子质量约为 53 kD,与预期的 GST-SEO融合蛋白的大小相符(图 3)。通过软件分析,目的蛋白 GST-SEO占细菌总蛋白含量的 15% ~ 25%,SDS-PAGE结果显示目的蛋白具有良好的水溶性。

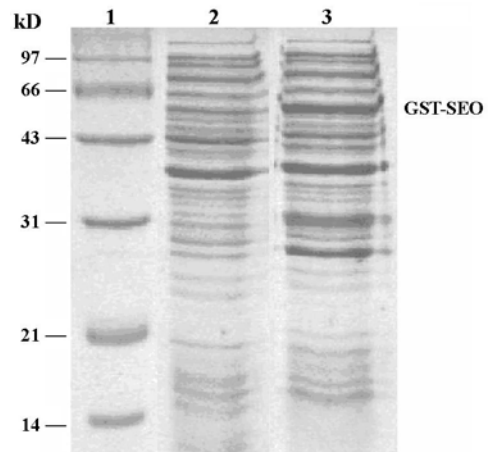


Figure 3 Soluble expression of GST-SEO (cultured at 37 °C for 4 h and induced at 30 °C for 12 h). 1: Protein molecular mass marker; 2: Total protein expression of non-induced BL21 with plasmid pGEX-4T-SEO; 3: Supernatant of the induced BL21 with plasmid pGEX-4T-SEO after disruption by sonicator

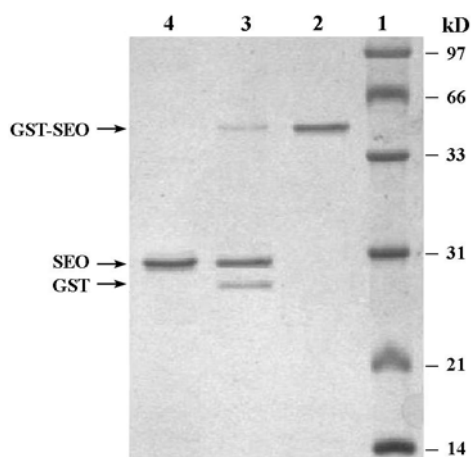
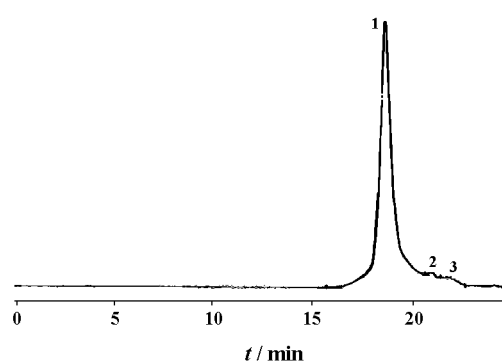
表达的融合蛋白经 Glutathione Sepharose 4B琼脂糖亲和层析柱纯化后,在还原型谷胱甘肽(γ -glutamylcysteinylglycine, GSH)洗脱液中得到较高纯度蛋白质。Quantity One扫描分析显示,目的蛋白质纯度约为 95%。通过蛋白质定量,计算可溶性目的产物的得量约为 2 mg \cdot mL⁻¹。用凝血酶对 GST-SEO进行酶切,酶切后的体系经过分子筛脱去 GSH后,再次经 Glutathione Sepharose 4B琼脂糖亲和层析柱纯化后,得到纯的 rSEO蛋白。GST-SEO和 rSEO纯化蛋白电泳结果见图 4。分子筛 HPLC结果显示,纯化后的 rSEO蛋白的纯度在 92%以上(图 5)。

4 MTT法测定 rSEO的生物学活性

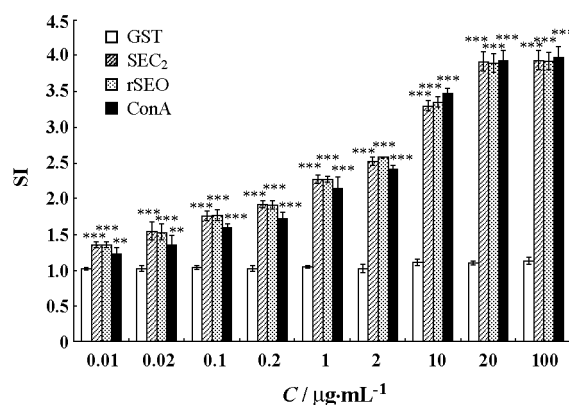
以 ConA为阳性对照,大肠杆菌来源的 GST蛋白为阴性对照,小鼠脾淋巴细胞为靶细胞,对纯化所得的 rSEO的活性进行检测,并同 SEC₂进行对比,共 4只小鼠,结果见图 6。与阴性对照组相比,在

Table 1 Comparison of growth inhibitory effects of rSEO and SEC₂ on K562, K562-ADM and B16 cells by MTT assay ($n=4$, $\bar{x} \pm s$)

Sample	IC ₅₀ (95% confidence interval) / $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$		
	K562	K562-ADM	B16
SEC ₂	0.142 (0.126 - 0.175)	0.098 (0.093 - 0.103)	0.158 (0.130 - 0.188)
rSEO	0.137 (0.113 - 0.163)	0.098 (0.086 - 0.110)	0.149 (0.126 - 0.174)
ConA	0.179 (0.151 - 0.199)	0.138 (0.112 - 0.153)	0.285 (0.258 - 0.315)

**Figure 4** Purification of GST-SEO and rSEO. 1: Protein molecular mass marker; 2: Purified GST-SEO; 3: Digestion product of GST-SEO by thrombin; 4: Purified rSEO**Figure 5** High-performance size-exclusion chromatography (HPSEC) chromatogram. 1: Purified rSEO; 2 and 3: Impurity

0.01 和 0.02 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ConA 作用 48 h 后,小鼠脾淋巴细胞有显著增加 ($P < 0.01$);在其他浓度的 SEC₂、rSEO 和 ConA 的作用下,小鼠脾淋巴细胞均有极显著增加 ($P < 0.001$),同时随着作用蛋白浓度的增加,作用效果也更加显著。在 20 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,两种肠毒素蛋白已使淋巴细胞达到最大增殖。rSEO 使淋巴细胞达到最大增殖一半时所需的有效

**Figure 6** Comparison of stimulating effects of rSEO and SEC₂ on mouse lymphocytes by MTT assay. $n=4$, $\bar{x} \pm s$. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs the negative control (GST) group

浓度 (95%置信区间)为 0.149 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ (0.119 ~ 0.181 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$), SEC₂ 为 0.148 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ (0.119 ~ 0.177 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)。rSEO 对 ICR 小鼠脾淋巴细胞的增殖作用与 SEC₂ 大体相当。

MTT 法测定 rSEO 和 SEC₂ 的体外抑瘤活性,与抑瘤阴性对照孔相比,在 0.01 ~ 10 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 rSEO, SEC₂ 和 ConA 作用后抑瘤率均有极显著的增高 ($P < 0.001$),并且随着浓度的增加作用效果也更加显著。如表 1 所示, rSEO 与 SEC₂ 对这 3 种肿瘤细胞的 IC₅₀ 相近,抑制作用基本相当。

讨论

目前,已有多种肠毒素蛋白实现重组表达并完成了生物学活性实验,而针对 SEO 的研究相对较少。本实验首次在国内成功表达了重组 SEO 蛋白,表达强度占全菌蛋白的 15% ~ 25% 左右,且为可溶性表达,便于后续分离纯化。融合蛋白经凝血酶高效切割后,所得到的重组蛋白与相应的天然蛋白相比,仅在 N 端多出 2 个氨基酸残基 (分别为甘氨酸和丝氨酸),通过 Swiss-PdbViewer 软件分析发现增加的氨基酸对 rSEO 的生物学活性影响较小。

本实验采用亲和层析对目的蛋白进行纯化,具有步骤简单、纯化速度快的特点,相比从金葡菌培养滤液中分离提取以及利用离子交换层析或分子筛层析等方法能获得更高纯度的 rSEO 蛋白,有助于质量标准的建立以及减少毒副作用和增强疗效,同时亦有助于对 SEO 作用机制的进一步研究以及靶向抗肿瘤融合蛋白的构建。

体外应用该蛋白刺激小鼠脾淋巴细胞增殖和抑制肿瘤细胞生长实验,结果证明 rSEO 蛋白具有典型的超抗原活性。鉴于应用于临床的金葡菌滤液制剂的主要有效成分为 SEC,本实验通过比较证实 rSEO 蛋白的超抗原活性与 SEC 相当,因此有望开发成为一种新的超抗原制剂用于肿瘤患者的临床康复和治疗。

References

- [1] Li YF, Zhu XH, Huang YH, et al. Localization of MHC class II binding sites on superantigen SED [J]. Chin J Immunol (中国免疫学杂志), 2004, 20: 454 - 456, 458.
- [2] Baker MD, Acharya KR. Superantigens: structure-function relationships [J]. Int J Med Microbiol, 2004, 293: 529 - 537.
- [3] Chen TZ. The exploitation of HAS and its application in tumor therapy [J]. Prog Microbiol Immunol (微生物学免疫学进展), 2001, 29: 63 - 69.
- [4] Zhang JF, Yu WB, Xu XL, et al. High potency and specific tumoricidal activity of HAS-stimulated lymphocytes induced by tumor antigen pulsed dendritic cells [J]. J Cell Mol Immunol (细胞与分子免疫学杂志), 2001, 17: 149 - 151.
- [5] Li JQ, Yang QL, Zeng R, et al. Clinical observations of treatment cisplatin combined with HAS on malignancy pleural fluid [J]. J Mod Oncol (现代肿瘤医学), 2003, 11: 126 - 126.
- [6] Li H, Bao XH, Yang WB. Curative effect of highly agglutinative staphylococcal combined with carboplatin to treat malignant pleural effusions [J]. J Intern Intensive Med (内科急危重症杂志), 2000, 6: 126 - 126, 129.
- [7] Ying YB, Pan YQ, Zhang W, et al. Purification and bioactivity analysis of staphylococcal enterotoxin C₂ [J]. Chin J Pharm (中国医药工业杂志), 2006, 37: 28 - 32.
- [8] Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, et al. Short Protocols in Molecular Biology [M]. 4th ed. New York: John Wiley & Sons, 1999: 2 - 12.
- [9] Fan M. Handbook of Protein Technique (蛋白质技术手册) [M]. Beijing: Science Press, 2002: 77 - 100.
- [10] Yang LJ, Sui YF, Chen ZN. Preparation and activity of conjugate of monoclonal antibody HAbl8 against hepatoma F(ab')₂ fragment and staphylococcal enterotoxin A [J]. World J Gastroenterol, 2001, 7: 216 - 221.
- [11] Sundberg EJ, Sawicki MW, Southwood S, et al. Minor structural changes in a mutated human melanoma antigen correspond to dramatically enhanced stimulation of a CD4⁺ tumor-infiltrating lymphocyte line [J]. J Mol Biol, 2002, 319: 449 - 461.
- [12] Xue Q, Ying YB, Pan YQ, et al. Expression and bioactivity of staphylococcal enterotoxin C₂ [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2006, 41: 406 - 411.
- [13] Zeng QH, Lü XS, Tang HH. The determination of sensitivity of tumor cells to chemotherapeutics by MTT assay [J]. Chin J Gen Surg (中国普通外科杂志), 2000, 9: 552 - 554.