

金葡菌肠毒素 C₂ 的克隆表达及其生物学活性

薛 乔, 应跃斌, 潘映秋, 李丹曦, 孙红颖, 陈枢青*

(浙江大学 药学院 生物制药研究室, 浙江 杭州 310031)

摘要: 目的 克隆金葡菌肠毒素 C₂ 全长基因, 构建 SEC₂ 的表达载体, 实现其可溶性表达, 并对纯化的 rSEC₂ 蛋白的生物学活性进行研究。方法 通过聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction, PCR) 从金葡菌 FR11230 菌株基因中得到肠毒素 SEC₂ 的基因, 将其克隆至融合表达载体 pGEX-4T-1, 转化大肠杆菌进行表达并对融合蛋白进行亲和色谱纯化。通过考察重组 SEC₂ 对淋巴细胞的增殖作用及其对肿瘤细胞杀伤活性的影响, 对其超抗原活性和免疫学活性进行研究。结果 得到正确的肠毒素 SEC₂ 基因序列并得到高效表达的融合蛋白, MTT 法结果表明, 重组 SEC₂ 表现出良好的促淋巴细胞增殖活性, 且能够增强淋巴细胞对肿瘤细胞的杀伤活性。结论 本研究成功克隆了 SEC₂ 基因, 表达并纯化出具有抗肿瘤生物学活性的重组 SEC₂ 蛋白, 为进一步对其分子抗肿瘤作用机制进行研究以及构建靶向抗肿瘤融合蛋白奠定了基础。

关键词: GST-SEC₂; 超抗原; 融合表达; 大肠杆菌; MTT 法

中图分类号: R967 文献标识码: A 文章编号: 0513 - 4870(2006)05 - 0406 - 06

Expression and bioactivity analysis of staphylococcal enterotoxin C₂

XUE Qiao, YING Yue-bin, PAN Ying-qiu, LI Dan-xi, SUN Hong-ying, CHEN Shu-qing*

(Department of Biopharmaceutics, College of Pharmaceutical Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310031, China)

Abstract: **Aim** To clone the gene of staphylococcal enterotoxin C₂ and express it in the form of a soluble fusion protein in *E. coli*. Then the activation of SEC₂ on mice lymphocyte and its lethal effects on tumor cells were studied. **Methods** Staphylococcus aureus SEC₂ gene was cloned into GST gene fusion vector pGEX-4T-1. The resultant plasmid pGEX-4T-SEC₂ was used to transform *E. coli* BL21, where the GST-SEC₂ fusion protein was expressed efficiently. The rSEC₂ protein was purified with Glutathione Sepharose 4B affinity column and digested with thrombin. The *in vitro* culture system was utilized to observe the activation of the SEC₂ on mice lymphocyte and the lethal effects on tumor cells of the activated mice lymphocyte. **Results** The proper gene of SEC₂ was cloned and purified rSEC₂ was obtained. The MTT results indicated that rSEC₂ have strong ability to stimulate mice lymphocyte to proliferate with a dose-dependent manner. With the proliferation of mice splenic lymphocyte, rSEC₂ has a strong lethal effect on tumor cells B16, K562 and K562-AD. **Conclusion** In this study, the gene of SEC₂ was cloned and the rSEC₂ protein was obtained, which had strong lethal effect on tumor cells B16, K562 and K562-AD.

Key words: GST-SEC₂; superantigen; fusion expression; *E. coli*; MTT

超抗原 (superantigens, SAGs) 是一组由细菌或病毒编码的蛋白质分子, 无需抗原提呈细胞 (APC) 加工处理, 即可直接与 APC 膜上的 MHC-II 类分子的

抗原结合槽外侧非限定性结合, 以完整的蛋白质分子形式被提呈给 T 细胞, 导致带有 V_β 的 T 细胞大量活化增殖。超抗原的特点就是只需极低质量浓度 (1 ~ 10 ng · mL⁻¹) 就可刺激大部分具有 TCR-V_β 序列的 T 细胞增生, 被激活的 T 细胞可达总数的 5% ~ 20%, 从而产生极强的免疫应答^[1]。金葡菌肠毒素 (staphylococcal enterotoxins, SEs) 是由金葡菌

收稿日期: 2005-08-02.

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 - 87217406,

E-mail: chenshuqing@zju.edu.cn

分泌的一组具有超抗原活性的细菌毒素。目前已发现了 SEs 的 15 个血清型 (SEA ~ SEO), 其中 SEC 包括 SEC₁, SEC₂ 和 SEC₃ 亚型^[2]。

具有 SAg 活性的 SEs 有很强的免疫激活作用, 将其注射动物, 数小时后血清中便出现大量的 TNF- α 和 TNF- β , 接着便出现 IL-2, IL-6, IL-1 及 INF- γ 水平的提高^[3]。将 SEs 直接应用于肿瘤细胞的治疗是 SEs 治疗肿瘤的最早模式, 这一应用始于 Dohlstien 等的发现。该发现表明利用超抗原来治疗 MHC-II⁺ 肿瘤细胞是完全可能的^[4]。SEC₂ 作为一种重要的肠毒素, 其抗肿瘤的作用已经应用于临床治疗, 并具有确切的疗效^[5]。本研究克隆了金葡菌肠毒素 SEC₂ 全长基因, 构建了 SEC₂ 的表达载体并实现了可溶性表达, 并对纯化的 rSEC₂ 蛋白的生物学活性进行研究, 为进一步研究 SEC₂ 及其融合蛋白的抗肿瘤活性奠定了基础。

材料和方法

菌株与质粒 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 均购自 Promega 公司, 质粒 pGEM-T-SEC₂ 和 pGEX-4T-1-SEC₂ 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。

实验细胞系 小鼠黑色素瘤 B16 细胞 (ATCC); 慢性髓原性白血病细胞 K562 (浙江大学肿瘤研究所); 耐药慢性髓原性白血病细胞 K562-AD: 阿霉素 (ADM) 抗性, ADM 质量浓度为 1 μ g \cdot mL⁻¹ (浙江大学药学院生物制药研究室逐步诱导 K562 建立), 以上细胞系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 EcoRI 和 XhoI、T4DNA 连接酶购自 NEB 公司; IPTG 和低熔点琼脂糖购自 BBI 公司; PCR 引物由上海生工生物工程技术服务有限公司代为合成; DNA 测序由上海联合基因集团有限公司完成; Glutathione Sepharose 4B 为 Amersham Pharmacia Biotech 公司产品; 凝血酶购自常州干红生化制药有限公司; 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材料有限公司; 进行 Western blotting 的抗 SEC₂ 抗体由浙江大学药学院生物制药研究室筛选制备。其他生化试剂 MTT, Con A 和 DNA 凝胶回收试剂盒均购于上海生工生物工程技术

服务有限公司。

引物的设计与合成 参照文献及数据库, 用 DNASTAR 软件分析 SEC₂ 的基因序列进行引物设计。合成的引物序列如下: 上游引物 Up-5' GTA AGA TTC GAG AGC CAA CCA GAC CC 3', 下游引物 Down-5' GGA CTC GAG TTA TCC ATT CTT TGT TGT A 3'。其中上游引物 5' 端引入 EcoRI 酶切位点, 下游引物 5' 端引入 XhoI 酶切位点和终止密码子 ATT。

金葡菌基因组的提取 接种金葡菌于 LB 液体培养基, 过夜培养, 离心收集菌体, 菌体用生理盐水洗过后, 用溶葡萄球菌剂重悬菌体, 加适量的蛋白酶 K, 37 $^{\circ}$ C 水浴至菌悬液黏稠, 加入等体积 4% SDS-100 mmol \cdot L⁻¹ Tris 裂解液, 室温下作用并不时振荡, 约 30 min 后加入等体积饱和酚混匀, 室温 15 min 稍加振荡, 12 000 r \cdot min⁻¹ 离心 30 min (4 $^{\circ}$ C), 吸收上层水相, 此水相反复用饱和酚抽提 2 次后, 吸水相加 0.1 体积 3 mol \cdot L⁻¹ NaAc (pH 5.5) 及 2 倍体积的 -20 $^{\circ}$ C 预冷的无水乙醇, 混匀后, 放置于 -20 $^{\circ}$ C。1 h 后, 12 000 r \cdot min⁻¹ 离心 10 min (4 $^{\circ}$ C), 小心倒去上清液, 灭菌去离子水溶解 DNA, 置于 -20 $^{\circ}$ C 备用^[6]。

目的基因片段的扩增、克隆及序列鉴定 用上述步骤提取到的金葡菌基因组为模板, 进行 PCR 扩增反应^[7]。100 μ L 的反应体系中加入: 10 \times 反应缓冲液 10 μ L, MgCl₂ (2.5 \times 10⁻³ mol \cdot L⁻¹) 10 μ L, dNTP (2.5 \times 10⁻³ mol \cdot L⁻¹) 4 μ L, 质粒模板 1 μ L, 上游引物 (20 \times 10⁻⁶ mol \cdot L⁻¹) 3 μ L, 下游引物 (20 \times 10⁻⁶ mol \cdot L⁻¹) 3 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: 94 $^{\circ}$ C 5 min, 32 个循环 (94 $^{\circ}$ C 30 s, 54 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 40 s), 72 $^{\circ}$ C 5 min。

将 PCR 产物回收后直接与 pGEM-T 载体以 T4 DNA 连接酶连接, 将连接产物转化入用 CaCl₂ 方法制备的感受态细菌 DH5 α , 通过蓝白筛选, 挑阳性克隆用内切酶 EcoRI 和 XhoI 对质粒进行双酶切鉴定。将有插入片段的克隆进行测序, 然后用 DNASTAR 软件将序列与 GeneBank 中的基因进行比较, 以确定 PCR 扩增是否正确。

SEC₂ 序列在 pGEX-4T-1 载体中的亚克隆和诱导表达 大量提取重组 pGEM-T 载体质粒, 用 EcoRI 和 XhoI 酶切出目的片段 SEC₂ 后, 纯化连入 pGEX-4T-1 载体, 转化感受态细胞 DH5 α , 构建的表达质粒相应地命名为 pGEX-4T-1-SEC₂。酶切鉴定正确后,

用提取的质粒再次转化表达宿主 BL21。挑取阳性菌株在含氨苄青霉素 ($100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 的 $2 \times \text{YT}$ 培养基中 37°C 振荡培养过夜,次日按 1% 接种于新鲜培养基中, 30°C 振荡培养 3.5 h 至 $A_{600} = 0.5$, 加入 IPTG 至终浓度为 $0.5 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 继续培养 4 h, 离心收集菌体。

融合蛋白的可溶性鉴定及亲和色谱纯化 诱导后菌液在 4°C 下 $7\ 700 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 弃上清液, 按每毫升培养物用冰预冷的磷酸盐缓冲液 (PBS) 50 μL 重悬。超声破碎菌体, 加 20% Triton X-100 至终浓度为 1%, 轻轻混匀放置 30 min。 $12\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 4°C 下离心 10 min, 转移上清液。取诱导后破菌上清液蛋白样品及诱导后破菌沉淀蛋白样品进行 SDS-PAGE 分析表达产物的溶解性^[8]。

用冰预冷的 PBS 10 mL 将 Glutathione Sepharose 4B 凝胶珠 1.33 mL 洗涤数次, 以 PBS 按 50% 比例重悬, 该糊状琼脂糖凝胶可于 4°C 短期保存备用。取适量诱导后破菌上清液蛋白样品, 每 10 mL 培养物加入 50% Glutathione Sepharose 4B 混悬液 300 μL (可结合融合蛋白 8 mg), 室温下混匀, 放置 30 min, 用 PBS 1.5 mL 洗涤 3 次。在脂糖珠中加入还原型谷胱甘肽缓冲液 ($0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris-HCl, $0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 谷胱甘肽, pH 8.0), 将融合蛋白从凝胶珠中释放出来, 重复洗脱多次直至洗脱完全, 用 Gene Quant pro 的 280 nm 紫外吸收对融合蛋白的洗脱进行检测。洗脱液中融合蛋白浓度最高可达到 $2.149 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

融合蛋白的凝血酶消化 由于融合蛋白 GST-SEC₂ 中 GST 和 SEC₂ 两个完整的结构域之间含有凝血酶的酶切位点, 可以将经过 Glutathione Sepharose 4B 纯化的融合蛋白 GST-SEC₂ 用凝血酶消化。用凝血酶对 GST-SEC₂ 进行酶切, 1 mL 含 GST-SEC₂ 蛋白 1 mg 的体系中加入 $4.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl 33 μL , $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ CaCl₂ 25 μL 以及 $20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 凝血酶 10 μL , 16°C 水浴酶切 16 h 以上。再次用 Glutathione Sepharose 4B 琼脂糖凝胶珠纯化消化产物, 其中酶切下的 GST 结合在凝胶珠上, 收集的流出液即是较纯的 rSEC₂ 蛋白。

Western blotting 法检测 将纯化的 SEC₂ 样品用 SDS-PAGE 电泳分离后, 将电泳条带通过电转化至醋酸纤维素膜上 (100 V, 1 h)。 4°C 下, 转化完全的醋酸纤维素膜用 10% 脱脂牛奶封闭过夜。 PBS 和 0.05% Tween-20 洗液洗 3 次后, 用抗 SEC₂ 抗体作为一抗 37°C 下孵育 2 h。洗液洗涤 3 次后, 用辣根

过氧化物酶标记的抗小鼠 IgG 二抗与膜共孵育 1 h。以 3,3'-二氨基苯联胺为显色底物, 在 H_2O_2 存在的条件下显色 5 min。

MTT 法测定 rSEC₂ 增殖小鼠脾淋巴细胞对肿瘤细胞的杀伤活性^[9-14] 设调零孔 (仅含培养基)、肿瘤细胞对照孔 (含培养基和肿瘤细胞)、淋巴细胞本底释放孔 [含空白孔 (仅含脾淋巴细胞)、阳性对照孔 (脾淋巴细胞 + Con A) 和实验孔 (脾淋巴细胞 + 肿瘤细胞)、阳性对照孔 (脾淋巴细胞 + 肿瘤细胞 + Con A) 和实验孔 (脾淋巴细胞 + 肿瘤细胞 + 系列浓度梯度的 rSEC₂)], 每孔设 3 个复孔。Con A 终质量浓度为 $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, rSEC₂ 终质量浓度分别为 10, 1, 0.1, 0.01 和 $0.001 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。以 BALB/c 小鼠脾淋巴细胞为靶细胞, 调整细胞数为 $5 \times 10^6 \cdot \text{mL}^{-1}$ 加入 96 孔板中, 每孔 100 μL , 实验孔中分别加入细胞数为 $5 \times 10^6 \cdot \text{mL}^{-1}$ 的脾淋巴细胞与细胞数为 $2.5 \times 10^5 \cdot \text{mL}^{-1}$ 的肿瘤细胞混合悬液 100 μL / 孔, 最后按不同浓度将 Con A 与 rSEC₂ 用 10% FCS RPMI 1640 培养基稀释并分别加入各测试孔中, 并小心吹打混匀。

铺板后 44 h 在待测孔中加入 15 μL 孔的 MTT 溶液, 小心吹打混匀后, 培养箱中继续培养 4 h, 小心吸出上清液, 并加入 120 μL 孔的 DMSO, 吹打助溶后培养箱中放置 10 min, 酶标仪双波长法 (570 nm 为测定波长, 630 nm 为参考波长) 测定各孔 $A_{570 \text{ nm}} - A_{630 \text{ nm}}$ 值, 仅含培养基的调零孔调零。按下式计算抑瘤率: 抑瘤率 (%) = $100 - [(\text{抑瘤作用孔} - \text{淋巴细胞本底释放孔}) / (\text{肿瘤细胞对照孔} - \text{淋巴细胞本底释放孔})] \times 100$, 作图分析肠毒素对肿瘤细胞的抑制作用, 并用 Student *t* 检验做统计分析。

结果

1 SEC₂ 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 720 bp, 与预计的大小基本一致, SEC₂ 基因的扩增片段纯化后与 pGEM-T 载体连接, 经 *EcoRI* 及 *XhoI* 双酶切鉴定, 琼脂糖凝胶电泳显示, 切出大小约 720 bp 的重组片段。挑取一个阳性克隆测序后用 DNASTAR 软件将序列与 PubMed 的 GeneBank 中基因序列号为 AY450554 基因进行比较, 结果显示插入载体的目的基因与已知序列完全一致 (图 1)。

2 GST-SEC₂ 融合表达载体的构建及鉴定

将重组 pGEM-SEC₂ 质粒用 *EcoRI* 和 *XhoI* 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(图 2),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-SEC₂。

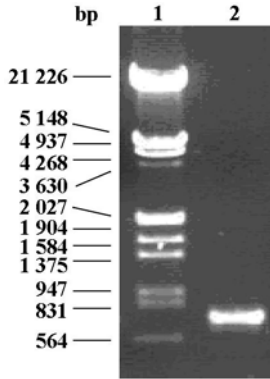


Figure 1 PCR amplification of SEC₂ gene with the RE digestion site from the first PCR products. 1: DNA marker; 2: PCR products of SEC₂ with the RE digestion site

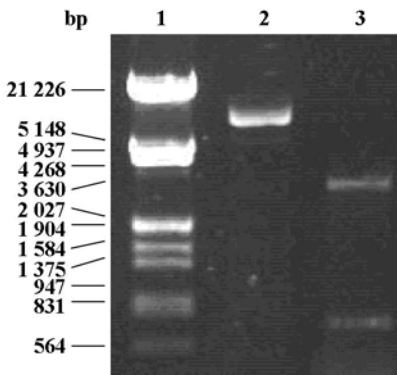


Figure 2 Verification of positive clone with pGEM-T-SEC₂ by double RE digestion. 1: DNA marker; 2, 3: Result of double RE digestion of positive clone with pGEM-T-SEC₂

3 GST-SEC₂的融合表达和可溶性

携有 pGEX-4T-SEC₂重组质粒的宿主菌经 IPTG 诱导后,蛋白质电泳结果显示重组菌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-SEC₂融合蛋白的大小相符(图 3)。通过 Quantity One 软件分析,融合蛋白约占菌体总蛋白的 40%。将菌体裂解,上清液与沉淀一起上样 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳。结果表明重组蛋白可溶性较好,裂菌上清液含有较多的目的蛋白,因沉淀物体积仅占总体积的 3%左右,故所表达的目的蛋白大部分是可溶的。

4 表达的 GST-SEC₂的纯化、酶切及其酶切后的纯化

表达的融合蛋白经 Glutathione Sepharose 4B 琼

脂糖珠亲和色谱纯化后,在谷胱甘肽洗脱液中得到较高纯度蛋白质(图 3)。Quantity One 扫描分析显示,目的蛋白质纯度为 98%。通过蛋白质定量,计算可溶性目的产物的得量约为 2 mg·mL⁻¹。用凝血酶对 GST-SEC₂进行酶切,1 mL 含 1 mg GST-SEC₂蛋白的体系中加入 4.5 mol·L⁻¹ NaCl 33 μ L, 0.1 mol·L⁻¹ CaCl₂ 25 μ L 以及 20 g·L⁻¹ 凝血酶 10 μ L, 16 $^{\circ}$ C 水浴酶切 16 h 以上。酶切后的体系经过分子筛脱去谷胱甘肽后,再次经 Glutathione Sepharose 4B 琼脂糖珠亲和色谱纯化后,得到纯的 rSEC₂蛋白。

5 Western blotting 结果

蛋白质印迹结果表明,表达蛋白 SEC₂能被免疫鼠血清所识别(图 4)。

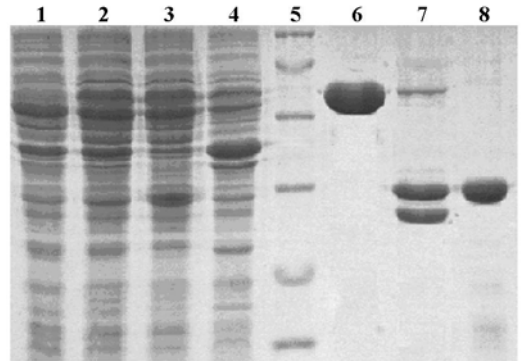


Figure 3 Soluble expression of SEC₂ (cultured at 37 $^{\circ}$ C for 3 h and incubated at 30 $^{\circ}$ C for 6 h). 1: Total protein expression of non-induced BL21 (DE3) with plasmid pGEX-4T-SEC₂; 2: Induced BL21 (DE3) with plasmid pGEX-4T-SEC₂; 3: Supernatant of the induced BL21 (DE3) with plasmid pGEX-4T-SEC₂ after disrupting by sonicator; 4: Cell debris pellet of the induced BL21 (DE3) with plasmid pGEX-4T-SEC₂ after disrupting by sonicator; 5: Protein molecular mass marker (96, 66, 43, 31, 21 and 14.4 kD from the top band); 6: Purified GST-rSEC₂; 7: Digestion product of the GST-rSEC₂ by thrombin; 8: Purified rSEC₂

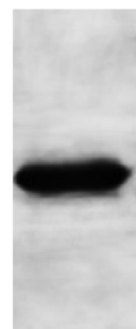


Figure 4 Western blotting analysis of the recombinant protein rSEC₂

6 MTT法测定 rSEC₂增殖小鼠脾淋巴细胞对肿瘤细胞的杀伤活性

以 Con A为阳性对照,大肠杆菌来源的 GST蛋白为阴性对照,以小鼠脾淋巴细胞为靶细胞,肿瘤细胞 K562, K562-AD和 B16为作用细胞,对纯化所得的 rSEC₂的活性进行检测,结果表明, rSEC₂在 100 μg·L⁻¹时即可显著地刺激脾淋巴细胞的增殖,并且其激活的脾淋巴细胞可有效地抑制肿瘤细胞的生长。见图 5和 6。

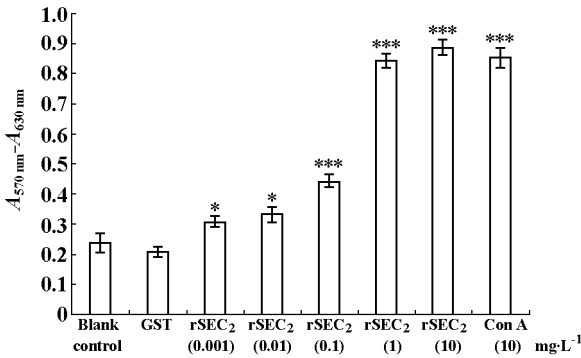


Figure 5 Proliferation of ICR mice's splenic lymphocyte stimulated with rSEC₂ for 48 h. * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ vs blank control

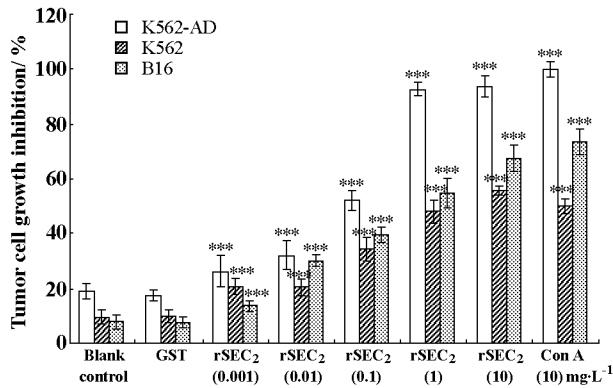


Figure 6 Lethal effect on K562-AD, K562 and B16 of ICR mice's splenic lymphocyte stimulated with different concentration of rSEC₂. *** $P < 0.001$ vs blank control

讨论

肠毒素 C具有 SEC₁, SEC₂和 SEC₃等 3个亚型, 3个亚型之间蛋白质分子序列十分保守,在 239个氨基酸中 SEC₁与 SEC₂的相似度为 97.4%,仅在氨基酸端有 7个氨基酸之差。而 SEC₁与 SEC₃的相似度为 94.4%。3个亚型间序列的关联决定了各亚型特异性抗原决定簇的关联,尤其是其高度保守的羧基端决定了肠毒素 C的生物学活性和亚型间免疫交

叉反应的抗原决定簇^[15]。

由于用于纯化的表达担体 GST以及表达载体本身的特点,本实验表达的重组 SEC₂较野生型在 N端增加了 5个氨基酸,这是由于 GST与 rSEC₂之间的凝血酶酶切位点距离 rSEC₂有 5个氨基酸。而 SEC的活性位点集中于 C端,故增加的氨基酸对 SEC₂的生物学活性影响较小。

超抗原用于肿瘤治疗的研究是肿瘤免疫治疗的一个热点。我国在超抗原研究方面起步较早。1996年沈阳协和集团研制的抗癌新药高聚金葡素 (HAS)^[16]在临床正式推广应用,它是世界上第 1个应用于临床的超抗原抗癌药物,是从金葡菌代谢产物中提取的生物反应调节剂,其主要有效成分是 SEC₂。近十年的临床研究表明,高聚金葡素单独或与其他化疗药物联合应用可在卵巢癌、肝癌及口腔癌等恶性肿瘤的治疗中取得一定的效果。

可是,由于高聚金葡素仍然是一个混合物,成分复杂,距离一个真正的疗效确定、质量可控的新药还有很多工作要做。本实验成功克隆了 SEC₂基因,表达并纯化出具有抗肿瘤生物学活性的重组 SEC₂蛋白,为进一步对其分子抗肿瘤作用机制的研究以及构建靶向抗肿瘤融合蛋白奠定了基础。

References

- [1] Wang JP, Guo DD, Lü HX. The investigation of the superantigen and its lethal effect on tumor [J]. Med Recapit (医学综述), 2004, 10: 723 - 724.
- [2] Sophie J, Marie AP, Annick L, et al. *egc*, A highly prevalent operon of enterotoxin gene, forms a putative nursery of superantigens in *Staphylococcus aureus* [J]. J Immunol, 2001, 166: 669 - 677.
- [3] Kuge S, Miura Y, Nakamura Y, et al. Superantigen induced human CD₄⁺ helper/killer cell and application to tumor immunotherapy [J]. J Immunol, 1995, 154: 1777 - 1785.
- [4] Wang QQ, Cao XT. Investigation progress in superantigen with tumor immunotherapy and gene therapy [J]. J Pract Oncol (实用肿瘤学杂志), 2003, 18: 431 - 434.
- [5] 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.
- [6] Gao ZX, Zheng YL, Chao FH, et al. The clone and sequencing of staphylococcal enterotoxin gene B [J]. Chin Anim Prod Food (中国畜产与食品), 1999, 6: 50 - 51.
- [7] Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, et al. Short Protocols in Molecular Biology [M]. 4th ed. New York: John Wiley & Sons, 1999: 2 - 12.
- [8] Wang JZ, Fan M. Handbook of Protein Technique (蛋白

- 质技术手册) [M]. Beijing: Science Press, 2002: 77 - 100.
- [9] Liu M, Ma H, Li BQ. Probe into the detection of mice lymphopoiesis by MTT [J]. Chin J Lab Anim Sci (中国实验动物学杂志), 1999, 9: 146 - 149.
- [10] Mosmann T. Tapid colorimetric assay for cellular growth and survival. Application to proliferation and cytotoxicity assays [J]. J Immunol Methods, 1983, 65: 55.
- [11] Ohyama S, Yonemura Y, Kinoshita K, et al. Chemosensitivity test for gastric cancer by *in vitro* MTT assay [J]. Gan To Kagaku Ryoho, 1991, 18: 1593 - 1597.
- [12] Camichael J. Chemosensitivity testing of human lung cancer cell lines using the MTT assay [J]. Br J Cancer, 1988, 57: 540 - 547.
- [13] Zeng QH, Lü XS, Tang HH. Measuring the sensitivity of the tumor cells to the chemical therapy [J]. Chin J Gen Surg (中国普通外科杂志), 2000, 9: 552 - 554.
- [14] Yu DH, Lu HG, Cheng B, et al. The lethal effect of staphylococcal enterotoxin A on malignant melanoma B16 [J]. Chin J Dermatol (中华皮肤科杂志), 2004, 37: 609.
- [15] Hovde CJ, Hackett SP, Bohach GA. Nucleotide sequence of the staphylococcal enterotoxin C3 gene: sequence comparison of all three type C staphylococcal enterotoxins [J]. Mol Gen Genet, 1990, 220: 329 - 333.
- [16] 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.