

# 金黄色葡萄球菌肠毒素 C2 的基因克隆、表达及其生物学活性\*

徐明恺<sup>1,3)</sup> 张成刚<sup>1)\*\*</sup> 周亚凤<sup>2)</sup> 张先恩<sup>2)</sup>

(<sup>1)</sup>中国科学院沈阳应用生态研究所, 沈阳 110016; <sup>2)</sup>中国科学院武汉病毒研究所, 武汉 430071;

<sup>3)</sup>中国科学院研究生院, 北京 100039)

**摘要** 利用 PCR 技术从金黄色葡萄球菌的基因组 DNA 中克隆 SEC2 全长基因, PCR 产物与 pGEM-T 载体连接, 经测序证实后进行亚克隆, 构建其表达载体 pET-28a-SEC2, 在大肠杆菌 BL21(DE3)中表达成熟重组蛋白(rSEC2), 纯化 rSEC2 蛋白并对其生物学活性进行研究. 结果表明: 成功克隆了 SEC2 全长基因, 测序证实该基因共 717 bp, 编码 239 个氨基酸, 与 GenBank 中收录的 SEC2 成熟蛋白质序列完全一致, SEC2 基因登录 GenBank (Accession number: AY450554); 构建了 SEC2 的表达载体 pET-28a-SEC2, 并在大肠杆菌 BL21(DE3)中得到高效可溶性表达, 可溶性的 rSEC2 经 Ni<sup>2+</sup> 亲和层析纯化达到电泳纯, 纯化的 rSEC2 蛋白经蛋白质印迹检测, 并能有效刺激人外周血单个核细胞的增殖, 被 rSEC2 刺激的外周血单个核细胞在体外对肿瘤细胞的生长有显著的抑制作用.

**关键词** 金黄色葡萄球菌, 肠毒素 C2, 克隆表达, 生物学活性

**学科分类号** Q78

金黄色葡萄球菌肠毒素 (staphylococcal enterotoxins, SEs) 是一类细菌超抗原, 它们无需抗原递呈细胞 (antigen presenting cells, APCs) 的加工, 也不受组织相容性复合体 (MHC) 的限制, 在 APC 之外与 T 细胞受体 V $\beta$  链形成 MHC II-SE-TCRV $\beta$  复合物, 在 1~10  $\mu$ g/L 浓度时, 即能刺激大部分有 TCRV $\beta$  序列的 T 细胞增殖, 使之释放多种细胞因子, 产生极强的免疫应答效应<sup>[1]</sup>. 研究发现, SEs 可对肿瘤细胞产生超抗原依赖的细胞毒作用 (Sag-dependent cell-mediated T-cell-derived cytotoxicity, SDCC), 从而产生系统的抗肿瘤反应<sup>[2]</sup>. 目前对肠毒素的克隆表达研究多集中于 SEA 和 SEB, 而对于有三个亚型的 SEC 族研究较少. 三者的成熟蛋白氨基酸序列高度同源, SEC1 和 SEC3 的基因序列已有报道, 而 SEC2 的基因序列尚不清楚<sup>[3-5]</sup>, 克隆并测定 SEC2 的全基因序列对研究 C 型肠毒素三亚型之间的关系具有重要意义.

SEC2 抗肿瘤的作用已经应用于临床, 沈阳协合生物制药股份有限公司生产的抗肿瘤制剂高聚生其主要有效成分就是 SEC2<sup>[6]</sup>. 本研究克隆了金黄色葡萄球菌肠毒素 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.

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 细胞株、细菌菌株及载体** 人乳腺癌细胞 MCF-7 来源于同济医科大学; 产肠毒素 C2 的金黄色葡萄球菌菌株来源于沈阳协合生物制药股份有限公司 (菌种保藏号: 0165Z-1); 大肠杆菌 *E.coli* DH5 $\alpha$  及 *E.coli* BL21 (DE3) 由本室保存; pGEM-T 克隆载体为 Promega 公司产品; pET-28a 表达载体为 Novagen 公司产品.

**1.1.2 分子生物学试剂** 限制性内切酶 *EcoR* I、*Xho* I, Pyrobest DNA 聚合酶及 DL 2 000、DL 15 000 DNA 分子质量标准均为 TaKaRa 公司产品; T4 DNA 连接酶, 蛋白酶 K 及 RNase A 均为 Promega 公司产品; 蛋白质分子质量标准为 MBI Fermentas 产品; Ni-NTA 亲和层析柱材料购自 Novagen 公司; SEC2 标准品来源于沈阳协合生物制药股份有限公司; 兔抗 SEC2 抗体来源于中国药品生物制品检定所; PHA-P、淋巴细胞分离液、

\*辽宁省科技计划项目(2001305003).

\*\* 通讯联系人.

Tel: 024-83970378, Fax: 024-83970300

E-mail: ZhangCG@iae.ac.cn

收稿日期: 2004-10-10, 接受日期: 2004-12-01

AP-羊抗兔抗体及 NBT/BCIP 显色试剂盒购自武汉天源生物公司; 胶回收试剂盒购自杭州维特洁生化技术有限公司; 引物合成由上海生工生物工程公司完成; DNA 测序由上海联合基因生物公司完成; 其他试剂均为分析纯。

## 1.2 方法

**1.2.1 PCR 扩增 SEC2 基因.** 接种金黄色葡萄球菌于 LB 液体培养基, 过夜培养, 离心收集菌体. 参照《精编分子生物学实验指南》<sup>[7]</sup>提取总 DNA. 以总 DNA 为模板进行 PCR 扩增, 扩增程序为: 94℃ 变性 7 min, 94℃ 1 min, 45℃ 1 min, 72℃ 2 min, 5 个循环, 再 94℃ 45 s, 55℃ 45 s, 72℃ 2 min, 25 个循环, 最后 72℃ 延伸 10 min, 4℃ 保存。

**1.2.2 重组 pGEM-T-SEC2 质粒的构建.** PCR 扩增产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳, 胶回收试剂盒回收, 在 3' 端加 A 尾, 与 pGEM-T 克隆载体以 T4 DNA 连接酶 16℃ 连接过夜, 转化 *E.coli* DH5 $\alpha$  感受态, 提取质粒 DNA, 方法见《分子克隆》(第三版)<sup>[8]</sup>. 经 *EcoR* I、*Xho* I 双酶切鉴定后, Sanger 末端终止法测序. 测得的 DNA 序列翻译为蛋白质序列, 与 GenBank 收录的 SEC2 蛋白序列对比. 将正确的 SEC2 DNA 序列登录 GenBank.

**1.2.3 pET-28a-SEC2 表达载体的构建.** 经测序证实的含有正确重组的 pGEM-T-SEC2 质粒 DNA 以 *EcoR* I、*Xho* I 双酶切, 经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳, 胶回收试剂盒回收 SEC2 片段. 以 T4 DNA 连接酶接入经同样双酶切的 pET-28a 表达载体, 转化 *E.coli* BL21(DE3) 感受态细胞, 提取质粒 DNA, 经 *EcoR* I、*Xho* I 双酶切鉴定正确重组克隆。

**1.2.4 rSEC2 的表达.** 接种转化了重组质粒 pET-28a-SEC2 的 BL21(DE3) 单菌落于液体 LB 中, 过夜培养, 在设定条件下诱导表达. 离心收集菌体, 重悬于 20 mmol/L Tris-HCl pH 7.5 的缓冲液, 超声破碎, 离心收集上清, 用 1/5 体积相同缓冲液重悬沉淀. 分别取超声后的总样及离心后得到的上清和沉淀重悬液, 以 2 $\times$  上样缓冲液处理, SDS-PAGE 电泳分析表达产物<sup>[9]</sup>.

**1.2.5 rSEC2 的纯化.** 低温诱导制备的 rSEC2 可溶性表达上清于 4℃ 保存备用. 装填 Ni-NTA 亲和层析柱, 按常规上 Ni<sup>2+</sup>, 平衡层析柱, 低速上样, 平衡缓冲液 (20 mmol/L Tris-HCl, 0.5 mol/L NaCl pH 7.9) 平衡至基线, 洗脱缓冲液 (20 mmol/L Tris-HCl, 0.5 mol/L NaCl, 20~300 mmol/L 咪唑,

pH 7.9) 梯度洗脱, 收集洗脱峰, 浓缩, 除盐并以 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 分析纯度。

**1.2.6 rSEC2 的蛋白质印迹检测.** 分别将诱导后的全细胞蛋白和纯化后的 rSEC2 蛋白以 SDS-PAGE 分离, 半干转膜仪转移至硝酸纤维素膜, 2% 脱脂牛奶封闭, 以免抗 SEC2 抗体、AP-羊抗兔抗体依次处理, NBT/BCIP 显色试剂盒显色。

**1.2.7 rSEC2 刺激外周血单个核细胞增殖实验.** 取正常新鲜人外周血抗凝后, 密度梯度离心法分离外周血单个核细胞. 用含 10% 小牛血清的 RPMI-1640 培养液调节细胞浓度, 以 1 $\times$ 10<sup>5</sup> / 孔加到 96 孔板中, 分别将 SEC2 标准品和 rSEC2 以不同浓度加入各孔, 以 BSA 作为阴性对照, PHA-P 作为阳性对照, 每样 3 个复孔. 按常规条件培养 96 h, 加入 50  $\mu$ l / 孔的 MTT 液. 继续培养 4 h, 1 000 r/min 离心收集细胞, 加入 DMSO 120  $\mu$ l / 孔, 溶解 15 min 后, 酶标仪上以 570 nm 测定各孔的吸光值。

**1.2.8 rSEC2 激活外周血单个核细胞体外抑瘤实验.** 将外周血单个核细胞以 2 $\times$ 10<sup>5</sup> / 孔加到 96 孔板中, 每孔 100  $\mu$ l, 将 MCF-7 细胞以 1 $\times$ 10<sup>4</sup> / 孔加入各孔, SEC2 标准品和 rSEC2 分别以不同浓度加入各孔. 同时设空白对照孔 (仅加 RPMI 1640)、肿瘤细胞对照孔及 PBMC 本底释放孔 (加与实验孔等量的 PBMC 和 rSEC2). 同样方法以 BSA 为阴性对照设各孔, 每样三个复孔. 按常规条件培养 36 h, 加入 50  $\mu$ l / 孔的 MTT 液. 继续培养 4 h, 1 000 r/min 离心收集细胞, 加入 DMSO 120  $\mu$ l / 孔, 溶解 15 min 后, 酶标仪上以 570 nm 测定各孔的吸光值。

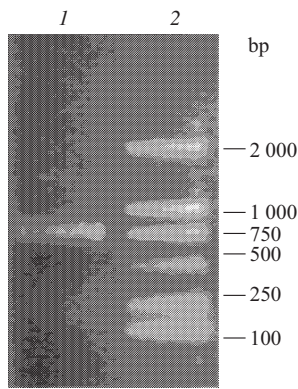
抑瘤率 (tumor growth inhibition / %) = 100 - [(实验孔 - PBMC 本底释放孔) / (肿瘤细胞对照孔 - 空白对照孔)]  $\times$  100.

## 2 结 果

### 2.1 SEC2 基因的 PCR 扩增

因目前尚无 SEC2 全基因序列的报道, GenBank 仅收录了 SEC2 的蛋白质序列而无 DNA 序列, 依据 GenBank 上收录的 SEC 类分子的蛋白质序列和 SEC1 及 SEC3 的 DNA 序列, 设计了以下引物: 上游引物 P1, 5' GAA TTC GAG AGT CAA CCA GAC CCT A 3'; 下游引物 P2, 5' CTC GAG TTA TCC ATT CTT TGT TGT A 3'; 横线所示为添加的酶切位点, 下游引物引入中止密码子, 扩增的基因片段为 SEC2 的成熟肽编码区, 约 720 bp. SEC2 的 PCR 扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电

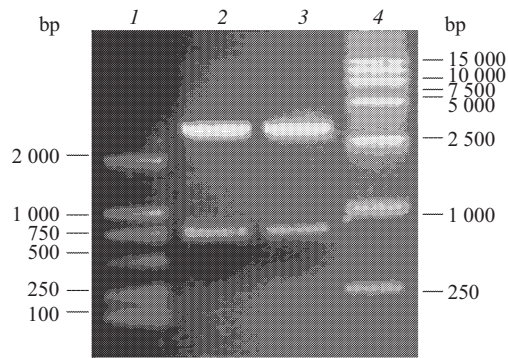
泳分析(图 1).



**Fig.1** PCR amplification of *sec2* gene from *Staphylococcus aureus* genomic DNA  
1: PCR products of *sec2*; 2: DL2000 DNA marker.

2.2 重组 pGEM-T-SEC2 质粒的构建

将带有 A 尾的 PCR 产物与 pGEM-T 克隆载体连接. 连接产物转化 *E.coli* DH5 $\alpha$  感受态, 提取重组子质粒 DNA, 经 *EcoR* I、*Xho* I 双酶切鉴定 (图 2).



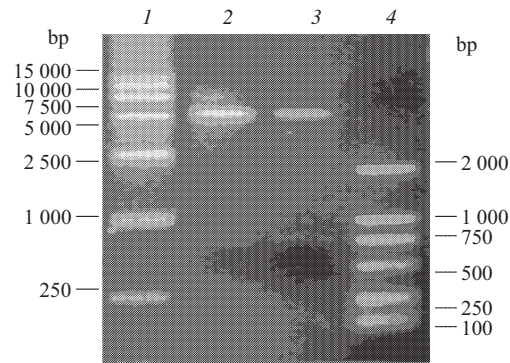
**Fig.2** Verification of positive clone with pGEM-T-SEC2 by double RE digestion  
1: DL2000 DNA marker; 2,3: result of double RE digestion of positive clone with pGEM-T-SEC2; 4: DL15 000 DNA marker.

酶切正确的重组质粒经 Sanger 末端终止法测序. 测得的 DNA 序列翻译成蛋白质序列后与 GenBank 收录的 SEC2 蛋白序列对比, 结果完全一致. 将正确的 SEC2 DNA 序列登录 GenBank, Accession number: AY450554.

2.3 pET-28a-SEC2 表达载体的构建

用 *EcoR* I、*Xho* I 从含有正确重组的 pGEM-T-SEC2 质粒 DNA 上切下 SEC2 全基因片段, 和经同样双酶切的 pET-28a 质粒 DNA 连接, 连接产物转化 *E.coli* BL21(DE3)感受态细胞, 提取

重组子质粒 DNA, 经 *EcoR* I、*Xho* I 双酶切鉴定正确重组克隆 (图 3).

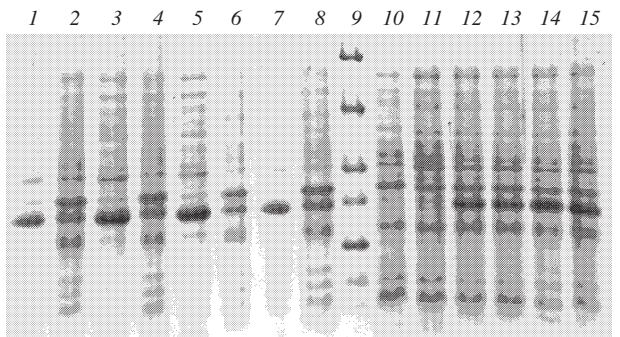


**Fig.3** Verification of positive clone with pET-28a-SEC2 by double RE digestion  
1: DL 15000 DNA marker; 2,3: Result of double RE digestion of positive clone with pET-28a-SEC2; 4: DL2000 DNA marker.

连入 pET-28a 的 SEC2 基因, 在表达时其氨基端融合了 6 个组氨酸的纯化标签, 可利用金属螯合层析的方法进行高效纯化.

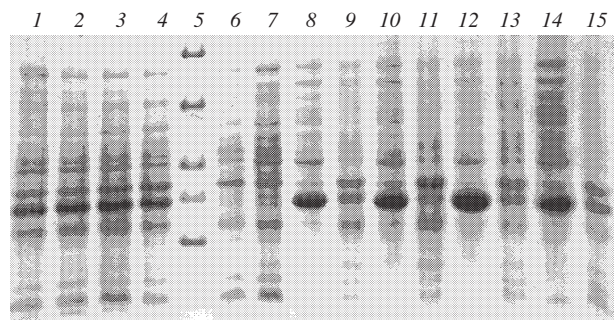
2.4 rSEC2 蛋白的表达和纯化

分别设定诱导物 IPTG 终浓度、诱导温度和诱导时间梯度, 优化 rSEC2 的表达条件. SDS-PAGE 电泳分析表明, rSEC2 蛋白的总表达量随着 IPTG 的增加而增加, 但当 IPTG 浓度大于 1.0 mmol/L 时, 由于蛋白质合成速度过快而使 rSEC2 蛋白在胞内不能得到充分正确的折叠, 并以不溶性包涵体的形式表达出来, 1.0 mmol/L IPTG 浓度可以得到较高的可溶性蛋白表达量 (图 4).



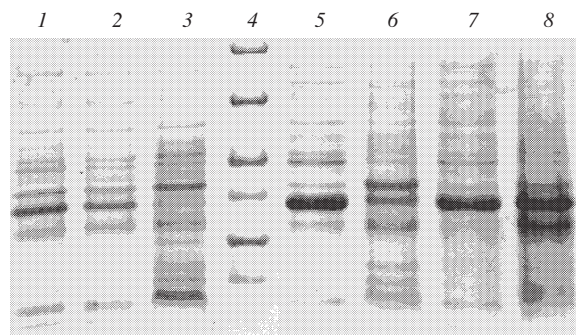
**Fig.4** Effect of IPTG concentration on soluble expression of rSEC2 (induced at 30 $^{\circ}$ C for 4 h)  
1, 3, 5, 7: the soluble expression of rSEC2 induced with 0.2, 0.6, 1.0 and 1.5 mmol/L IPTG; 2, 4, 6, 8: the inclusion expression of rSEC2 induced with 0.2, 0.6, 1.0 and 1.5 mmol/L IPTG; 9: protein molecular mass marker (116, 66, 45, 35, 25, 18.4 and 14.4 ku from the top band ); 10: induced BL21(DE3) with plasmid pET-28a; 11: BL21(DE3) with positive plasmid without induction; 12~15: total protein expression of rSEC2 induced with 0.2, 0.6, 1.0 and 1.5mmol/L IPTG.

诱导时间 4 h 以及 30℃ 的诱导温度可以得到 rSEC2 高效表达, 经薄层扫描分析, 其表达量占菌体蛋白总量的 30% 以上, 且可溶性组分占总表达量的 90% 以上(图 5, 图 6).



**Fig.5 Effect of inducing duration on soluble expression of rSEC2 (induced at 30℃ with 1.0 mmol/L IPTG)**

1~4: total protein expression of rSEC2 induced for 2, 3, 4, 5 h; 5: protein molecular mass marker (116, 66, 45, 35, 25, 18.4 and 14.4 ku from the top band); 6: induced BL21(DE3) with plasmid pET-28a; 7: BL21(DE3) with positive plasmid without induction; 8, 10, 12, 14: the soluble expression of rSEC2 induced for 2, 3, 4, 5 h; 9, 11, 13, 15: the inclusion expression of rSEC2 induced for 2, 3, 4, 5 h.



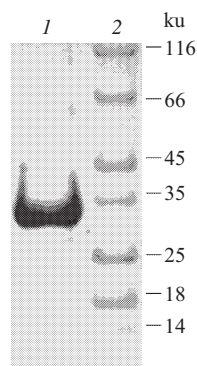
**Fig.6 Effect of inducing temperature on soluble expression of rSEC2 (induced with 1.0 mmol/L IPTG for 4 h)**

1,2: total protein expression of rSEC2 induced at 30℃ and 37℃; 3: induced BL21(DE3) with plasmid pET-28a; 4: protein molecular mass marker (116, 66, 45, 35, 25, 18.4 and 14.4 ku from the top band); 5,7: the soluble expression of rSEC2 induced at 30℃ and 37℃; 6,8: the inclusion expression of rSEC2 induced at 30℃ and 37℃.

低温诱导表达的可溶性蛋白经 Ni-NTA 亲和层析柱纯化, 纯化产物经 SDS-PAGE 分离, 考马斯亮蓝染色分析, 呈现一条带, 证明纯度达电泳纯(图 7).

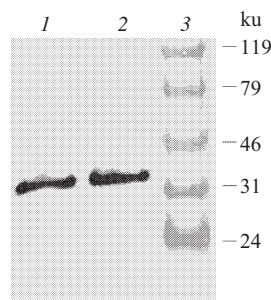
## 2.5 rSEC2 的蛋白质印迹检测

诱导后的全细胞蛋白和纯化后的 rSEC2 蛋白经蛋白质印迹检测, 表明其表达产物和纯化产物为目的蛋白 rSEC2(图 8).



**Fig.7 Purification of rSEC2 by Ni-NTA**

1: purified rSEC2; 2: protein molecular mass marker.

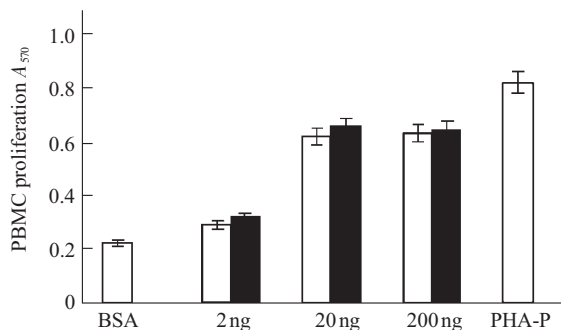


**Fig.8 Western blotting of rSEC2**

1: purified rSEC2; 2: total protein of bacterial protein; 3: prestained protein molecular mass marker.

## 2.6 rSEC2 刺激外周血单个核细胞增殖实验

以 PHA-P 为阳性对照, BSA 为阴性对照, 对纯化所得的 rSEC2 的活性进行检测, 结果表明 rSEC2 在 20 μg/L 浓度时即可显著地刺激外周血单个核细胞的增殖, 其活性与 SEC2 标准品无显著差异( $P > 0.05$ )(图 9).



**Fig.9 Proliferation of PBMC by rSEC2**

□: rSEC2; ■: SEC2 standard.

## 2.7 rSEC2 激活外周血单个核细胞体外抑瘤实验

以 BSA 为阴性对照, rSEC2 激活的外周血单个核细胞可有效地抑制肿瘤细胞的生长, 其活性与 SEC2 标准品无显著差异( $P > 0.05$ )(图 10).

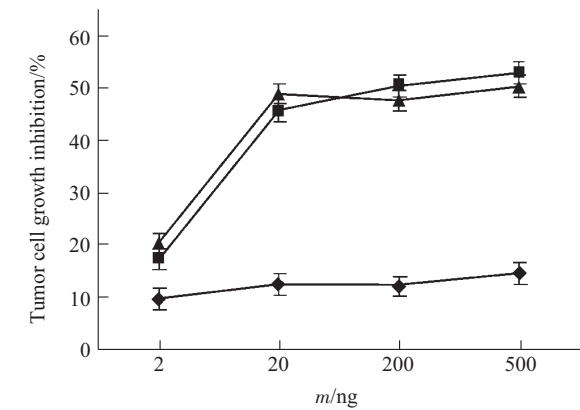


Fig.10 Anti-tumor activity of rSEC2 by activating PBMC  
◆—◆: BSA; ■—■: SEC2 standard; ▲—▲: rSEC2.

3 讨 论

肠毒素 C 是肠毒素家族中特殊的一类, 分为 SEC1、SEC2 和 SEC3 三个亚型. 三亚型之间蛋白质分子羧基端高度保守, 而只在氨基端略有差异. 亚型间分子上的关联度与免疫学的关联度相对应. 可以推断肠毒素 C 氨基端决定了亚型间的特异性抗原决定簇, 而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<sup>[9]</sup>. 在分析比较了 SEC1、SEC3 和 SEB 的基因序列后, Couch<sup>[10]</sup>推断出是基因间的重组造成了 SE 的抗原多样性

针对于 SEC2 的研究多集中于 SEC2 蛋白的晶体结构, 而关于 SEC2 基因的克隆及异源表达未见报道, GenBank 仅收录了 SEC2 的蛋白质序列而无其 DNA 序列, 由于密码子的简并性问题, 由蛋白质序列反推 DNA 序列是不准确的, 这对设计 PCR 引物造成困难. 进一步对比 SEC 三个亚型的蛋白质序列, 发现三者成熟蛋白氨基端 6 个氨基酸一致, 羧基端则完全一致, 亚型间的高度保守性提供了利用 SEC1 和 SEC3 的 DNA 序列设计 SEC2 特异性 PCR 引物的可能性和可行性.

将测序所得的 DNA 序列翻译为蛋白质序列, 与 GenBank 中收录的 SEC2 蛋白质序列完全一致, 证明所克隆的基因正是 SEC2 基因. 将克隆的 SEC2 基因与 SEC1 和 SEC3 基因相比较的结果如下(序列不相同处以阴影表示):

|     |          |                                                   |      |
|-----|----------|---------------------------------------------------|------|
| 1   | GAGAGG   | CAACCCAGACCCCTACGCCAGATGAGTTGCACAAAAGCGAGTTAAATTT | sec1 |
| 1   | GAGAGG   | CAACCCAGACCCCTACGCCAGATGAGTTGCACAAAATCAAGTGAGTT   | sec2 |
| 1   | GAGAGG   | CAACCCAGACCCCTATGGCCAGATGAGTTTGCACAAAATCAAGTGAGTT | sec3 |
| 51  | CACTGGT  | TTGATGGAAATATGAAAAGTTTTATATGATGATCGTTATGTAT       | sec1 |
| 51  | TACTGGT  | TACGATGGGTAATATGAAAATATTTTTATATGATGATCATTTATGTAT  | sec2 |
| 51  | TACTGGT  | TACGATGGGTAATATGAAAATATTTTTATATGATGATCATTTATGTAT  | sec3 |
| 101 | CAGCAACT | TAAAGTTAAGTCTGTAGATAAAATTTTTTGGCACATGATTTTAATTT   | sec1 |
| 101 | CAGCAACT | TAAAGTTATGTCTGTAGATAAAATTTTTTGGCACATGATTTTAATTT   | sec2 |
| 101 | CAGCAACT | TAAAGTTAAGTCTGTAGATAAAATTTTTTGGCACATGATTTTAATTT   | sec3 |
| 151 | TATAACAT | TAGTGATAAAAAAACTGAAAAATTTATGACAAAAGTGAAAAACAGA    | sec1 |
| 151 | TATAACAT | TAGTGATAAAAAAACTGAAAAATTTATGACAAAAGTGAAAAACAGA    | sec2 |
| 151 | TATAACAT | TAGTGATAAAAAAACTGAAAAATTTATGACAAAAGTGAAAAACAGA    | sec3 |
| 201 | GTTTATTA | AAATGAAGATTTAGCAAAAGAAAGTACAAAAGATGAAGTAGTTGATG   | sec1 |
| 201 | GTTTATTA | AAATGAAGATTTAGCAAAAGAAAGTACAAAAGATGAAGTAGTTGATG   | sec2 |
| 201 | GTTTATTA | AAATGAAGATTTAGCAAAAGAAAGTACAAAAGATGAAGTAGTTGATG   | sec3 |
| 251 | TGTATGG  | ATCAAAATTAATATGTAAACTTGCTATTTTTTCATCCAAAAGATAAAT  | sec1 |
| 251 | TGTATGG  | ATCAAAATTAATATGTAAACTTGCTATTTTTTCATCCAAAAGATAAAT  | sec2 |
| 251 | TGTATGG  | ATCAAAATTAATATGTAAACTTGCTATTTTTTCATCCAAAAGATAAAT  | sec3 |
| 301 | GTAGGTAA | AGTTTACAGGTGGTAAAACTTGTATGTATGGAGGAATAACAAA       | sec1 |
| 301 | GTAGGTAA | AGTTTACAGGTGGTAAAACTTGTATGTATGGAGGAATAACAAA       | sec2 |
| 301 | GTAGGTAA | AGTTTACAGGTGGTAAAACTTGTATGTATGGAGGAATAACAAA       | sec3 |
| 351 | ACATGAAG | GAAACCACTTTTGATAATGGGAACTTACAAAATGTACTTTATAA      | sec1 |
| 351 | ACATGAAG | GAAACCACTTTTGATAATGGGAACTTACAAAATGTACTTTATAA      | sec2 |
| 351 | ACATGAAG | GAAACCACTTTTGATAATGGGAACTTACAAAATGTACTTTATAA      | sec3 |
| 401 | GAGTTTAT | GAAAAATAAAAGAAACACAAATTTCTTTTGAAAGTGCAAACTGAT     | sec1 |
| 401 | GAGTTTAT | GAAAAATAAAAGAAACACAAATTTCTTTTGAAAGTGCAAACTGAT     | sec2 |
| 401 | GAGTTTAT | GAAAAATAAAAGAAACACAAATTTCTTTTGAAAGTGCAAACTGAT     | sec3 |
| 451 | AAGAAAAA | GTGTAAACAGCTCAAGAACCTAGACATAAAAAGCTAGGAATTTTTTT   | sec1 |
| 451 | AAGAAAAA | GTGTAAACAGCTCAAGAACCTAGACATAAAAAGCTAGGAATTTTTTT   | sec2 |
| 451 | AAGAAAAA | GTGTAAACAGCTCAAGAACCTAGACATAAAAAGCTAGGAATTTTTTT   | sec3 |
| 501 | AATTTAA  | TAAAAAAATTTTGTATGAGTTTAAACAGTTTCAACCATATGAAACAG   | sec1 |
| 501 | AATTTAA  | TAAAAAAATTTTGTATGAGTTTAAACAGTTTCAACCATATGAAACAG   | sec2 |
| 501 | AATTTAA  | TAAAAAAATTTTGTATGAGTTTAAACAGTTTCAACCATATGAAACAG   | sec3 |
| 551 | GGTATATA | AAAAATTTATTTGAAAAATAACGGGCAATACTTTTTTGGTATGATATG  | sec1 |
| 551 | GATATATA | AAAAATTTATTTGAAAAATAACGGGCAATACTTTTTTGGTATGATATG  | sec2 |
| 551 | GATATATA | AAAAATTTATTTGAAAAATAACGGGCAATACTTTTTTGGTATGATATG  | sec3 |
| 601 | ATGCCCTG | CACCAGGAGATAAGTTTGACCAATCTAAATATTTAATGATGTA       | sec1 |
| 601 | ATGCCCTG | CACCAGGAGATAAGTTTGACCAATCTAAATATTTAATGATGTA       | sec2 |
| 601 | ATGCCCTG | CACCAGGAGATAAGTTTGACCAATCTAAATATTTAATGATGTA       | sec3 |
| 651 | CAACGACA | CAATAAAAAACGGTTGATTCTAAAAAGTGTGAAGATAGAAGTCCACC   | sec1 |
| 651 | CAACGACA | CAATAAAAAACGGTTGATTCTAAAAAGTGTGAAGATAGAAGTCCACC   | sec2 |
| 651 | CAACGACA | CAATAAAAAACGGTTGATTCTAAAAAGTGTGAAGATAGAAGTCCACC   | sec3 |
| 701 | TTACAAC  | AAAAGAATGGATAA                                    | sec1 |
| 701 | TTACAAC  | AAAAGAATGGATAA                                    | sec2 |
| 701 | TTACAAC  | AAAAGAATGGATAA                                    | sec3 |

以生物软件 DNASTar 分析 C 型肠毒素三型型蛋白质序列和基因序列的同源性(表 1), SEC2 和 SEC3 的同源性最高, 蛋白质序列的同源性和基因序列的同源性相一致.

**Table 1 Homology of SEC1, SEC2 and SEC3**

|         | %         |           |           |
|---------|-----------|-----------|-----------|
|         | SEC1-SEC2 | SEC1-SEC3 | SEC2-SEC3 |
| Protein | 97.1      | 96.2      | 98.3      |
| DNA     | 97.2      | 97.1      | 99.3      |

本实验采用先克隆至 pGEM-T 载体, 再亚克隆至 pET-28a 表达载体的方法, 在设计引物时酶切位点外侧不必另外添加保护碱基, PCR 反应采用退火温度由低到高的两重循环, 减小了非特异性扩增的可能性, 从基因组 DNA 中扩增出唯一的条带.

由于添加纯化标签以及表达载体本身的特点, 本文表达的重组 SEC2 较野生型在 N 端增加了 36 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 的生物学活性影响应该较小. 生物软件 DNASTar 分析结果显示, rSEC2 由 275 个氨基酸组成, 分子质量约为 31.4 ku, 等电点为 7.25; 而野生型 SEC2 由 239 个氨基酸组成, 分子质量约为 27.6 ku, 等电点为 6.61. 外周血单个核细胞增殖实验和体外抑瘤实验进一步证明, rSEC2 的生物活性与野生型相当.

目前, 超抗原用于肿瘤治疗的研究是肿瘤免疫治疗的一个热点方向. 高聚生是我国沈阳协合生物制药股份有限公司自行研制的第一个应用于临床的超抗原抗肿瘤药物, 其主要有效成分就是 SEC2<sup>[4]</sup>. 通过近 10 年来的临床研究表明, 将高聚生单独或与其他化疗药物联合应用能对恶性肿瘤产生较好的疗效, 如配合化疗能抑制化疗引起的肝癌细胞多药抗药性基因的表达, 提高 NK 细胞活性, 改善患者的生存质量<sup>[11,12]</sup>. 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, 为进一步研究其抗肿瘤作用机制, 构建靶向抗肿瘤融合蛋白奠定了基础.

## 参 考 文 献

- Balaban N, Rasooly A. Staphylococcal enterotoxins. *Int J Food Microbio*, 2000, **61**: 1~10
- Dohlsten M, Sundstedt A, Bjorklund M, *et al.* Superantigen-induced cytokines suppress growth of human colo-carcinoma cells. *Int Cancer*, 1993, **54**: 482~488
- Hovde C J, Hackett S P, Bohach G A. Nucleotide sequence of the staphylococcal enterotoxin C3 gene: sequence comparison of all three type C staphylococcal enterotoxins. *Mol. Gen. Genet*, 1990, **220** (2): 329~333
- Passalacqua E F, Brehm R D, Acharya K R, *et al.* Crystallization and preliminary X-ray analysis of a microbial superantigen staphylococcal enterotoxin C2. *J Mol Biol*, 1993, **233** (1): 170~172
- Bohach G A, Schlievert P M. Nucleotide sequence of the staphylococcal enterotoxin C1 gene and relatedness to other pyrogenic toxins. *Mol Gen Genet*, 1987, **209**: 15~20
- 陈廷祚. 高聚生研发历程述评及其用于癌症治疗的理论基础. *微生物学免疫学进展*, 2001, **29** (2): 63~69
- Chen T Z. *Prog Microbiol Immunol*, 2001, **29** (2): 63~69
- Ausubel F M, Brent R, Kingston R E, *et al.* *Short Protocols in Molecular Biology*. 4rd. New York: John Wiley & Sons, 1999. 2.12
- Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning*. 3rd. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. 27~30
- 汪家政, 范明. 蛋白质技术手册. 北京: 科学出版社, 2002. 77~100
- Wang J Z, Fan M. *Manual of Protein Technology*. Beijing: Science Press, 2002. 77~100
- Couch J L, Betley M J. Nucleotide sequence of the type C3 staphylococcal enterotoxin gene suggests that intergenic recombination causes antigenic variation. *J Bacteriol*, 1989, **171** (8): 4507~4510
- 江学良, 权启镇, 谢宗贵, 等. 高聚金葡素对中晚期肝癌患者多药抗药性基因表达及 NK 细胞活性的影响. *中国肿瘤临床*, 1998, **25** (7): 546~547
- Jiang X L, Quan Q Z, Xie Z G, *et al.* *Chin J Tumor Clin*, 1998, **25** (7): 546~547
- 胥全彬, 刘传暄, 马清钧. 金黄色葡萄球菌肠毒素 A 的基因克隆、表达及活性试验. *生物工程学报*, 2003, **19** (4): 402~406
- Xu Q B, Liu C X, Ma Q J. *Chin J Biotech*, 2003, **19** (4): 402~406

## Gene Cloning, Soluble Expression and Bioactivity Analysis of Staphylococcal Enterotoxin C2\*

XU Ming-Kai<sup>1,3)</sup>, ZHANG Cheng-Gang<sup>1)\*\*</sup>, ZHOU Ya-Feng<sup>2)</sup>, ZHANG Xian-En<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup>Institute of Applied Ecology, The Chinese Academy of Sciences, Shenyang 110016, China;

<sup>2)</sup>Wuhan Institute of Virology, The Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430071, China;

<sup>3)</sup>Graduate School of The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China)

**Abstract** The sec2 gene was cloned from the genomic DNA of *Staphylococcus aureus* by PCR and ligated with the pGEM-T vector and confirmed by DNA sequencing. The expression vector pET-28a-SEC2 was constructed to express rSEC2 protein in *E.coli*. Puried rSEC2 protein was taken to bioactivity analysis. The cloned sec2 gene contains 717 nucleotides coding 239 amino acids which was accordance with that reported in GenBank. Cloned sec2 sequence was submitted to GenBank and the Accession number is AY450554. Soluble rSEC2 protein could be expressed effectively in BL21(DE3) and puried by Ni-NTA. Western blotting, PBMC proliferation assay and *in vitro* anti-tumor assay revealed that rSEC2 has the function of native SEC2. It was concluded that the whole sec2 gene was cloned and expressed in *E.coli*. Puried rSEC2 protein was proved to have the equivalent function of native SEC2.

**Key words** *Staphylococcus aureus*, SEC2, cloning and expression, bioactivity analysis

---

\*This work was supported by a grant from Sciees and Technology Project of Liaoning (2001305003).

\*\*Corresponding author . Tel: 86-24-83970378, Fax: 86-24-83970300, E-mail: ZhangCG@iae.ac.cn

Received: October 10, 2004 Accepted: December 1, 2004