

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
55 (10) :1343 - 1349; 4 September 2015
ISSN 0001 - 6209; CN 11 - 1995/Q
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>
doi:10.13343/j.cnki.wsxb.20150005

金黄色葡萄球菌黏附素 ClfA, FnBPA-A, FnBPA-BCD 联合免疫的免疫生物学特性

姜慧娇¹, 苏艳^{1*}, 申煜²

¹新疆农业大学动物医学学院, 新疆 乌鲁木齐 830052

²嘉吉饲料(新疆)有限公司, 新疆 昌吉 833000

摘要: 【目的】为比较金黄色葡萄球菌黏附素分子聚集因子 (ClfA) 与纤维蛋白结合蛋白 A (FnBPA) A 区 (FnBPA-A) 及 BCD 区 (FnBPA-BCD) 的抗原性、抗体的黏附抑制特性及其免疫保护力。【方法】分别表达了 ClfA 蛋白、FnBPA-A 和 FnBPA-BCD 蛋白, 并将表达纯化后得到 ClfA、FnBPA-A 和 FnBPA-BCD 重组蛋白单独或联合免疫小鼠, 收集免疫血清对其进行抗原性及免疫保护力的比较分析。【结果】结果显示, 重组蛋白 FnBPA-BCD 对 Fn 的结合能力高于其对 Fg 的结合, 而重组蛋白 ClfA 及 FnBPA-A 对 Fg 的结合能力高于 FnBPA-BCD。血清抗体的检测结果表明, ClfA 蛋白及 FnBPA-A 蛋白免疫组诱导抗体的水平均优于 FnBPA-BCD 组。3 种蛋白联合免疫组的血清抗体效价及抗体抗黏附能力明显优于单一蛋白免疫组 ($P < 0.05$)。3 种蛋白联合免疫组与 ClfA 蛋白免疫组免疫保护率为 100%, FnBPA-A 组与 FnBPA-BCD 组免疫保护率分别为 80% 与 50%。【结论】重组蛋白 ClfA 及 FnBPA-A 的免疫原性优于 FnBPA-BCD, 三者联合免疫较单一蛋白免疫在抗细菌的黏附、抗体诱导和免疫保护方面具有优势, 提示这 3 种蛋白联合免疫有利于达到更好的免疫效果。

关键词: 金黄色葡萄球菌, ClfA, FnBPA-A, FnBPA-BCD, 联合免疫, 免疫生物学特性

中图分类号: R392 文章编号: 0001-6209 (2015) 10-1343-07

金黄色葡萄球菌是一种重要的人畜共患病原菌, 可导致人类和动物的化脓性疾病, 有数据表明近 50% 的奶牛乳腺炎是由该菌引起的^[1]。黏附素在金黄色葡萄球菌对寄主细胞的侵入、定植和扩散过程中扮演着重要的角色。研究表明, 黏附素与哺乳动物细胞外基质 (ECM) 黏附能力的大小, 可直接影响其致病力^[2]。纤维蛋白结合蛋白 A (fibronectin binding protein A, FnBPA) 和聚集因子 A (clumping

factor A, ClfA) 两种黏附素被认为是金黄色葡萄球菌的两种最重要的毒力因子^[3-4]。FnBPA 能够介导金黄色葡萄球菌与细胞的纤维蛋白原 (fibrinogen, Fg) 及纤维连接素 (fibronectin, Fn) 的结合^[5]。FnBPA 含 A、B、C 和 D 区, 其中 A 区具有 Fg 结合活性; D 区具有 Fn 结合活性^[6]。ClfA 在细菌生长的各个阶段都出现。ClfA 可特异地与细胞外基质成分中的纤维蛋白原 (fibrinogen, Fg) 结合^[7]。

基金项目: 新疆维吾尔自治区高新技术项目 (201311108); 自治区普通高校重点学科基础兽医学项目

* 通信作者。Tel: +86-991-8762704; E-mail: 2006au@163.com

作者简介: 姜慧娇 (1989 -), 女, 新疆石河子人, 硕士研究生, 主要从事兽医分子微生物及免疫学。E-mail: 727400435@qq.com

收稿日期: 2015-01-07; 修回日期: 2015-02-14

以往的研究结果表明,FnBPS 和 ClfA 的抗体均可一定程度阻断金黄色葡萄球菌对乳腺组织的黏附^[8-9]。Eric 等^[10]研制了针对金黄色葡萄球菌黏附素聚集因子(ClfA)的 DNA 疫苗,免疫小鼠产生了特异且效价很高的抗体,但腹腔攻毒时却不能提供保护。范鑫等将 FnBPA-D 与 ClfA-A 进行串联共表达,证明了该融合蛋白可在原核细胞中成功表达,且所表达的蛋白质具有免疫原性^[11]。将多种不同黏附因子的抗原表位融合或串联表达,虽然所表达蛋白也具有一定的免疫原性,但其也存在着抗原截短后导致的抗原有限表达,抗原结构可能改变等缺点。为使黏附因子通过原核表达时获得良好的折叠和空间构象以便于分析其抗原性和免疫保护作用,本研究分别表达了牛源金黄色葡萄球菌 ClfA, FnBPA-A 与 FnBPA-BCD 重组蛋白并单独或联合免疫实验动物,检测与比较免疫后的特异性抗体水平、抗体对菌的识别能力、抗细菌黏附能力以及攻毒保护力,期望探索基于金黄色葡萄球菌多种黏附素的免疫策略,阻断金黄色葡萄球菌对细胞的黏附过程,预防其感染的发生。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和载体:牛乳源金黄色葡萄球菌菌株由新疆农业大学动物医学学院微生物实验室分离、鉴定并保存。大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5 α 、BL21 (DE3),原核表达载体 pET-28a 为本实验室保存。

1.1.2 主要仪器和试剂:微型水平电泳槽、DYY-31A 型稳压稳流电泳仪(北京六一仪器厂);电热恒温摇床 DNP-9272 型(上海精宏实验设备有限公司);PCR 扩增仪、凝胶成像仪 Geldoc2000 (美国 Bio-Rad 公司);高速冷冻离心机、核酸蛋白测定仪,各型号移液器(德国 Eppendorf 公司);电热恒温水箱(上海一恒公司 DYY-31A);T4 连接酶、限制性内切酶 *Xho* I、*Eco*R I (大连宝生物公司);BM2000 DNA Marker、BM5000 DNA Marker(博迈德生物有限公司);琼脂糖(上海基因技术有限公司);pfu *Taq* Master Mix(北京康维世纪生物有限公司);DNA 胶回收试剂盒、基因组提取试剂盒(天根生化北京科技有限公司);弗氏佐剂(Sigma 公司);兔抗金黄色葡萄球菌全菌多抗(由金黄色葡萄球菌免疫家兔后制备);纤维蛋白原(Fg)(Sigma 公司,纯度 65%-85%)、纤维连接素(Fn)(Sigma 公司,1 mg/mL)。

1.1.3 试验动物:平均重约 2.5 kg 新西兰雌性大白兔 8 只,6 周龄雌性 C57BL/6 小鼠 50 只,购自新疆医科大学实验动物中心。

1.2 目的基因的克隆与载体构建

根据 GenBank 中已发布的基因序列,利用 Primer 5.0 软件设计 *ClfA*、*FnBPA-A*、*FnBPA-BCD* 基因 PCR 引物,并在上下游引物加上 *Xho* I、*Eco*R I 酶切位点,由上海生工生物工程有限公司合成(表 1)。提取金黄色葡萄球菌分离株基因组为模板,扩增 *ClfA*、*FnBPA-A* 与 *FnBPA-BCD* 基因。将测序正确的 PCR 产物酶切并与 pET-28a 载体连接,转化至大肠杆菌 DH5 α 。经 PCR 与酶切鉴定后的重组质粒送上海生工生物工程有限公司测序。

表 1. PCR 扩增所用引物

Table 1. PCR primer sequences used in this study

Genes	Primer sequence (5'→3')	Restriction site	T_m /°C	Size of amplification/bp
<i>ClfA</i>	F: GCGGAATTCGCAAGTGA AAAATAGTGT TACGC	<i>Eco</i> R I	58.0	1600
	R: TATTCTCGAGTAATTTCCACGAGGCTCATCAG	<i>Xho</i> I		
<i>FnBPA-A</i>	F: GCGGAATTCACTAACGTTAATCATAT	<i>Eco</i> R I	59.0	1600
	R: TATTCTCGAGTTTCAATGTATCCGTC	<i>Xho</i> I		
<i>FnBPA-BCD</i>	F: GCGGAATTCGAGGAATCAAATCCAATT	<i>Eco</i> R I	55.0	800
	R: TATTCTCGAGTTGTATCTTCTTCAATCG	<i>Xho</i> I		

1.3 重组蛋白的表达与纯化

将测序正确的阳性重组质粒,转化大肠杆菌 BL21 (DE3),选取阳性克隆进行诱导表达。将阳性 BL21 (DE3) 菌种按 1% 接种于 5 mL 含卡那霉素的

液体 LB 培养基中,以 pET-28a 作阴性对照,37 °C 200 r/min 振荡培养过夜。按 1% 接种于含卡那霉素的液体 LB 培养基中 37 °C 振荡培养至 OD_{600} 值为 0.6-0.8。加入诱导剂 IPTG 至终浓度为 1 mmol/L,

37 °C 振荡培养 5 h, 分别取诱导表达菌液及对照菌液进行 SDS-PAGE 分析。

用 HisTrap™ 试剂纯化重组蛋白。将鉴定为阳性的重组菌诱导并收集菌体, 用 PBS 将沉淀悬起, 超声波破碎 10 min, 破碎后的上清按说明书进行纯化。收集的蛋白洗脱液, 进行 SDS-PAGE 分析。

1.4 重组蛋白 Western blot 分析

纯化后的重组蛋白, 经 15% SDS-PAGE 后转印至硝酸纤维素膜, 以免抗金黄色葡萄球菌全菌多抗为一抗, HRP 标记的羊抗兔 IgG 进行 Western-blot 分析。

1.5 重组蛋白对 Fg 和 Fn 的结合能力检测

用 5 μg/mL Fg 及 5 μg/mL Fn 分别包被酶标板, 100 μL/孔, 4 °C 过夜; 每孔加 5% 脱脂奶粉 200 μL, 37 °C 封闭 2 h; 加 200 μL 浓度为 0.1 μg/mL 纯化蛋白, 4 °C 过夜; 每孔加 100 μL 兔抗金黄色葡萄球菌抗体, 室温孵育 1 h; 加 HRP 标记的羊抗兔 IgG, 37 °C 1 h; 加 100 μL TMB, 37 °C 显色 10 - 20 min; 用 100 μL 1 mol/L H₂SO₄ 终止反应, 测定 OD₄₅₀ 值。

1.6 重组蛋白免疫小鼠及其抗体效价检测

6 周龄雌性 C57BL/6 小鼠随机分为 5 组, 每组 10 只, 分别为 ClfA 免疫组、FnBPA-A 免疫组、FnBPA-BCD 免疫组、ClfA + FnBPA-A + FnBPA-BCD 联合免疫组, 以及 PBS 对照组。分别将纯化后的重组蛋白 50 μg 与弗氏完全佐剂等体积充分乳化后, 对实验鼠皮下多点注射免疫; 2 周后, 将等量重组蛋白与等体积弗氏不完全佐剂充分乳化后进行第二次免疫, PBS 对照组免疫方法同上。分别于一免第 0、14、30 天采血并分离血清, 以纯化的 ClfA、FnBPA-A、FnBPA-BCD 蛋白为包被抗原, 按间接 ELISA 检测血清抗体效价。

1.7 小鼠免疫抗血清对金黄色葡萄球菌识别能力的检测

用 5% 戊二醛溶液处理酶标板, 200 μL/孔, 37 °C 作用 2 h, 去离子水洗涤 4 次; 过夜培养的金黄色葡萄球菌, 1% 接种于新鲜 LB 中 37 °C 培养 8 - 12 h; 4000 r/min 离心 15 min, 沉淀重悬于稀释至 1 × 10⁹ CFU/mL; 将稀释后的菌悬液 100 μL/孔包被于戊二醛处理过的酶标板中, 37 °C、18 - 24 h 至干燥; 5% 脱脂乳 37 °C 封闭 2 - 3 h; 加入待检免疫血清 37 °C 孵育 1 h, HRP 标记的山羊抗鼠 IgG 为二抗进行 ELISA 检测。

1.8 重组蛋白免疫保护力检测

首免 40 d 后, 使用本实验室分离鉴定的牛源金黄色葡萄球菌毒株, 分别对 ClfA 免疫组、FnBPA-A 免疫组、FnBPA-BCD 免疫组、ClfA + FnBPA-A + FnBPA-BCD 联合免疫组, 以及 PBS 对照组攻毒, 剂量为 1 MLN (2 × 10⁹ CFU), 7 d 观察并记录小鼠死亡情况。

2 结果和分析

2.1 重组质粒的构建与鉴定

以提取的金黄色葡萄球菌基因组 DNA 为模板, 对 3 种目的基因分别进行 PCR 扩增, 扩增产物经琼脂糖凝胶电泳鉴定, 得到 *ClfA*、*FnBPA-A* 基因片段大小在 1600 bp, *FnBPA-BCD* 基因片段 800 bp, 均与预期大小相符。将测序正确的 PCR 产物经 *EcoR* I 和 *Xho* I 双酶切消化并纯化后与 pET-28a 载体连接, 重组质粒酶切及测序均正确。

2.2 重组蛋白的表达及纯化结果

测序正确的重组质粒转化大肠杆菌 BL21 (DE3) 中诱导表达, SDS-PAGE 显示重组蛋白 ClfA、FnBPA-A、FnBPA-BCD, 分别在 94、80 和 60 kDa 处出现条带, 其大小与预期相符, 而空载体对照诱导前后没有浓染条带出现。纯化的重组蛋白经 SDS-PAGE 鉴定分别在 94、80 和 60 kDa 处有清晰的条带。

2.3 重组蛋白的 Western-blot 分析

将纯化后的重组蛋白 ClfA、FnBPA-BCD 用兔抗金黄色葡萄球菌免疫血清为一抗进行 Western-blot 检测, 分别在 94、80 和 60 kDa 处可见明显的条带, 而空载体对照无条带 (图 1), 表明这 3 种重组蛋白具有良好反应原性。

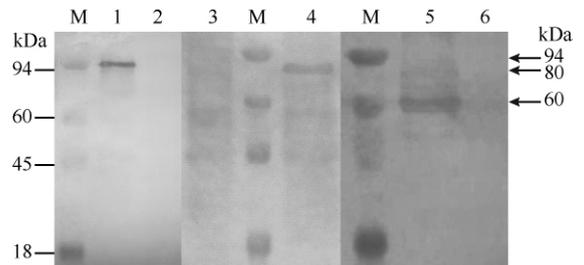


图 1. 重组蛋白 ClfA、FnBPA-A、FnBPA-BCD 的免疫印迹分析

Figure 1. Western-blot analysis of His-ClfA, His-FnBPA-A and His-FnBPA-BCD recombinant protein. M, protein marker; lane 1, ClfA; lane 2-3, pET28a; lane 4, FnBPA-A; lane 5, FnBPA-BCD.

2.4 重组蛋白 ClfA、FnBPA-A、FnBPA-BCD 对 Fg 和 Fn 的结合能力检测结果

重组蛋白 ClfA、FnBPA-A、FnBPA-BCD 分别与 Fg、Fn 结合试验结果表明(图 2),3 种重组蛋白对 Fg、Fn 均有一定的结合能力,与 PBS 对照组相比差异显著($P<0.01$)。重组蛋白 ClfA 对 Fg 的结合能

力明显高于 FnBPA-A 与 FnBPA-BCD ($P<0.01$),FnBPA-BCD 与牛 Fg 结合能力最弱。重组蛋白与 Fn 的体外结合结果显示,FnBPA-A、FnBPA-BCD 与 Fn 结合能力明显优于 ClfA ($P<0.01$),而重组蛋白 FnBPA-A、FnBPA-BCD 与 Fn 结合能力差异不显著($P>0.05$)。

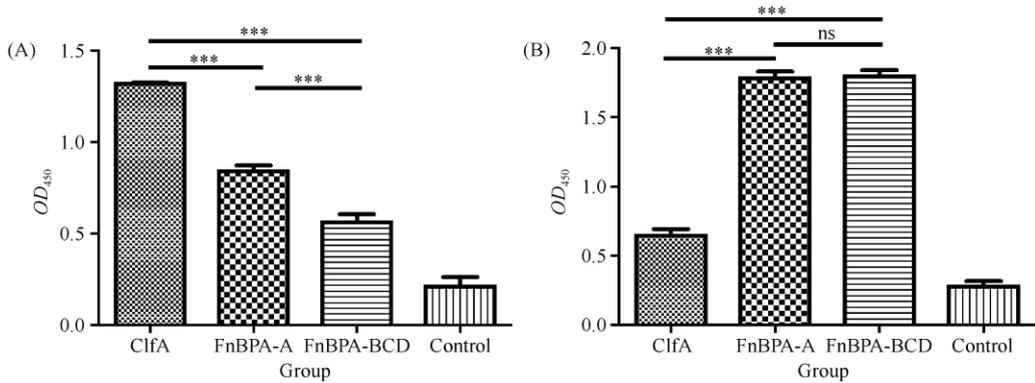


图 2. 表达蛋白对 Fg (A)、Fn (B) 结合能力的比较

Figure 2. Binding ability of recombinant proteins to Fg (A) and/or Fn (B).

2.5 小鼠血清抗体效价的检测

对不同免疫组抗体的检测结果显示(图 3),3 种蛋白联合免疫组抗体水平明显优于其余各免疫组 ($P<0.01$),血清抗体效价可达 1:121500。其后依次为血清抗体效价为 1:40500 的 FnBPA-A 组和 ClfA 组、FnBPA-BCD 组血清抗体效价 1:4500。FnBPA-BCD 组在整个免疫过程中抗体增加不明显,仅略高于 PBS 对照组。

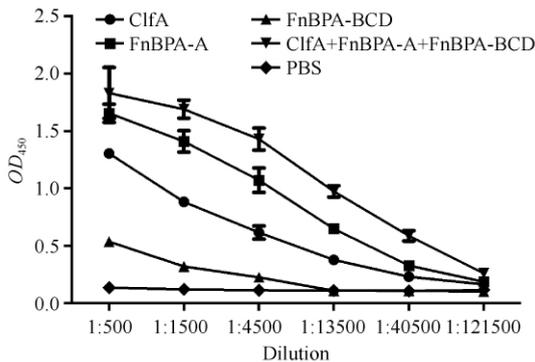


图 3. 二免后小鼠血清特异性抗体效价检测

Figure 3. Antibody detection after immunized with recombinant proteins.

2.6 小鼠免疫血清对全菌的识别能力测定

不同免疫组特异性抗血清对金黄色葡萄球菌识别能力的检测结果显示(图 4),与 PBS 对照组相比,

各免疫组抗血清对金黄色葡萄球菌均有一定的识别能力;3 种蛋白联合免疫组血清与金黄色葡萄球菌的识别能力明显优于其余各组 ($P<0.01$),其次为 ClfA 免疫组、FnBPA-A 免疫组、FnBPA-BCD 免疫组。ClfA 免疫组对菌体的识别能力优于 FnBPA-A 免疫组和 FnBPA-BCD 单独免疫组,FnBPA-BCD 免疫组对金黄色葡萄球菌的识别能力最弱。

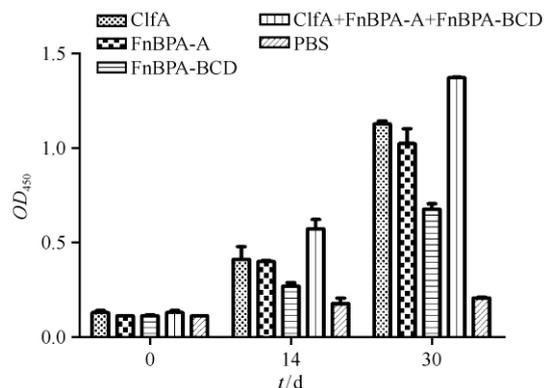


图 4. 小鼠免疫血清对金黄色葡萄球菌全菌识别能力检测

Figure 4. Detection of binding ability to *Staphylococcus aureus* of serum after immunized mice with recombinant proteins. t/d: Day post primary immunization.

2.7 重组蛋白免疫保护力检测

首免后 40 d 用牛源金黄色葡萄球菌菌株攻击,

观察小鼠死亡情况。结果显示(图 5), ClfA 免疫组与 3 种蛋白联合免疫组保护率可达到 100%, FnBPA-A 组与 FnBPA-BCD 组蛋白保护率分别为 80% 和 50%, 对照组全部死亡。表明 ClfA 免疫组和 3 种蛋白联合免疫组具有较佳的免疫保护作用。

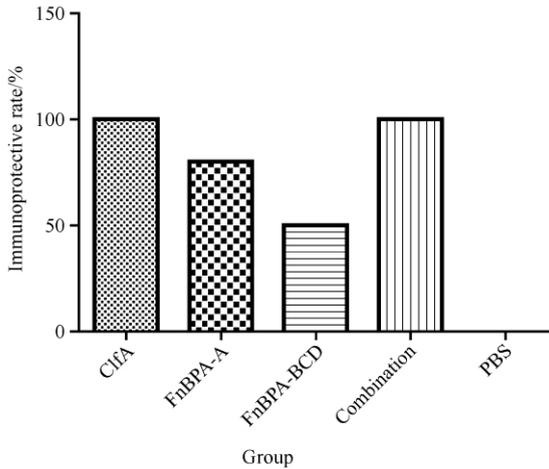


图 5. 重组蛋白免疫保护力检测

Figure 5. Detection of immunoprotective rate after immunized with recombinant proteins.

3 讨论

ClfA 与 FnBPA 同属于金黄色葡萄球菌 MSCRAMMs, 参与金黄色葡萄球菌与宿主的黏附以及生物膜结构的形成。ClfA 可在金黄色葡萄球菌生长的各个阶段表达, 其由 933 个氨基酸组成, 含 A 区和 R 区。ClfA 能够与纤维蛋白原(Fg)和纤维连接素(Fn)结合^[6]。

FnBPA 由 1018 个氨基酸组成, 含 A、B、C 和 D 区, 免疫决定表位位于配基结合的 D 区^[12], FnBPA 的 A 区是一个由非重复序列组成的独特伸展区, 具有结合 Fg 的作用。本研究中选择表达的功能区为 FnBPA 的 A 区及 BCD 区。

对重组蛋白免疫小鼠后的血清抗体检测结果显示, ClfA 重组蛋白第二次免疫后的血清效价优于 FnBPA-BCD 蛋白, 表明 ClfA 蛋白的免疫效果可能优于 FnBPA-BCD 蛋白。ClfA 在诱导抗体方面显示出其优势, 分析原因可能是 ClfA 蛋白的 A 区所含的抗原表位多, 分子量较大, 这一结果与以往我们利用生物信息软件对 ClfA 抗原性的预测得出 ClfA 具有良好的抗原性^[13]的结果是一致的。

由于金黄色葡萄球菌的黏附作用是通过多种黏附素实现的, 要实现对其黏附的有效抑制, 有必要同时对不同黏附素抗体的抗黏附能力进行深入细致的比较与研究。以往试验证据也表明, 在对实验动物进行金黄色葡萄球菌攻击时, 单一抗原往往不能提供完全的保护^[10]。姜晓娟等对金黄色葡萄球菌 ClfA 的 A 区基因进行了克隆表达, 并对表达产物进行了免疫特性的研究, 证明了针对 ClfA 的抗体可一定程度阻断金黄色葡萄球菌的黏附作用^[8]。史冬艳等对 FnBPB-D 基因进行了表达并研究了其抗血清的活性, 也证明了该黏附素分子的多克隆抗体可一定程度的阻断金黄色葡萄球菌的黏附作用^[9]。虽然 Shkreta 等设计了针对金黄色葡萄球菌 ClfA (221 - 550 aa) 和 FnBP (D1 21 - 34; D3 20 - 33) 的二价核酸疫苗, 免疫怀孕 7 个月的奶牛, 再用相应的重组蛋白加强免疫一次, 证明其能引起奶牛明显的细胞免疫反应和体液免疫反应^[14]。但在这些试验中均未对免疫原的黏附抑制功能进行检测。

在本试验中我们分别表达 ClfA、FnBPA-BCD 及 FnBPA-BCD 重组蛋白并进行联合免疫, 评估并比较了三者联合及单独免疫所诱导抗体的特点, 及免疫后的抗体对金黄色葡萄球菌菌体的识别、抗黏附及免疫后的保护效果。免疫后的检测结果表明 3 种重组蛋白中 ClfA, FnBPA-A 的免疫原性较好, 而联合免疫 3 种重组蛋白则能够产生高水平的特异性抗体。何焱^[15]用 FnBPA-D 蛋白免疫家兔, 血清抗体效价可达 1:256000。赵艳^[16]以 FnBPA 的 D 区蛋白诱导表达免疫家兔, 二免血清效价达 1:3200。本实验的研究结果表明 FnBPA-BCD 的免疫原性在 3 种重组蛋白中最弱, 结合以往的研究, FnBP 中 Fn 结合位点的蛋白结构往往处于一种高度的无序状态, 而当其与 Fn 发生特异性结合后, 才表现出特定的高级结构^[17-18]。分析其产生的抗体水平及免疫保护力差异均与此有关, 因此重组蛋白 FnBPA-BCD 可能存在免疫过程中构像改变而导致其抗体识别 FnBPA-BCD 困难。

ClfA 蛋白免疫组与 3 种蛋白联合免疫组保护力都达到 100%, 但是联合免疫组无论从抗体效价还是菌体结合试验中均呈现明显高于 3 种蛋白单独免疫组。由此推断, 金黄色葡萄球菌黏附素重组蛋白联合免疫可能具有更多的潜在优势。

参考文献

- [1] Talbot BG, Lacasse P. Progress in the development of mastitis vaccines. *Livestock Production Science*, 2005, 98 (1): 101-103.
- [2] Lammers A, Nuijten PJM, Kruijt E, Zurwieden NS, Vecht U, Smith HE, Zijdeveld FGV. Cell tropism of *Staphylococcus aureus* in bovine mammary gland cell cultures. *Veterinary Microbiology*, 1999, 67 (2): 77-89.
- [3] Zhou H, Li H. The progress of *Staphylococcus aureus* surface proteins. *Letters in Biotechnology*, 2004, 15 (1): 73-75. (in Chinese)
周宏, 李韩平. 金黄色葡萄球菌表面蛋白研究进展. *生物技术通讯*, 2004, 15 (1): 73-75.
- [4] Shi D, Hao Y, Zhang A. Advance in the study of *Staphylococcus aureus* from cow mastitis. *Progress in Veterinary Medicine*, 2010, 31 (7): 82-86. (in Chinese)
史冬艳, 郝永清, 张爱荣. 奶牛金黄色葡萄球菌性乳房炎研究进展. *动物医学进展*, 2010, 31 (7): 82-86.
- [5] Hettinga KA, Valenberg HJF Van, Lam TJGM. Detection of mastitis pathogens by analysis of volatile bacterial metabolites. *Journal of Dairy Science*, 2008, 91 (10): 3834-3839.
- [6] Patti JM, Allen BL, Mc Gavin MJ. MSCRAMM-mediated adherence of microorganisms to host tissues. *Annual Review of Microbiology*, 1994, 48 (1): 585-617.
- [7] Brouillette E, Lacesse P, Shkreta L. DNA immunization against the clumping factor A (ClfA) of *Staphylococcus aureus*. *Vaccine*, 2002, 20 (17): 2348-2357.
- [8] Jiang X, Hao Y, Zhang A, Fan X, Chen X. Cloning and expression of the region A of clumping factor A gene of *Staphylococcus aureus* and its immunological characteristics. *Chinese Veterinary Science*, 2009, 39 (7): 626-631. (in Chinese)
姜晓娟, 郝永清, 张爱荣, 范鑫, 陈晓杰. 金黄色葡萄球菌凝聚因子 A 区基因的克隆表达及表达产物免疫特性的研究. *中国兽医科学*, 2009, 39 (7): 626-631.
- [9] Shi D, Hao Y. Expression of fibronectin-binding protein B (FnbpB) region D of *Staphylococcus aureus* and antiserum activity. *Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine*, 2010, 32 (5): 356-359. (in Chinese)
史冬艳, 郝永清. 奶牛乳房炎金黄色葡萄球菌 FnBPB-D 基因的表达及其抗血清活. *中国预防兽医学报*, 2010, 32 (5): 356-359.
- [10] Eric B, Pierre L, Lulzim S, Bélanger J, Grondin G, Diarra MS, Fournier S, Talbot BG. DNA immunization against the clumping factor A (ClfA) of *Staphylococcus aureus*. *Vaccine*, 2002, 20 (17): 2348-2357.
- [11] Gao X, Xu H, Lie L. Tandem expression of FnbpA, ClfA, Ebps antigen epitopes of *Staphylococcus aureus* and the preparation of the polyclonal antibody. *China Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2011, 38 (5): 97-100. (in Chinese)
高翔, 许会会, 雷连成. 金黄色葡萄球菌 FnbpA、ClfA、Ebps 抗原表位的串联表达及多克隆抗体的制备. *中国畜牧兽医*, 2011, 38 (5): 97-100.
- [12] Stutzmann MP, Entenza JM, Vaudaux P, Francioli P, Glauser MP, Moreillon P. Study of *Staphylococcus aureus* pathogenic genes by transfer and expression in the less virulent organism *Streptococcus gordonii*. *Infection and Immunity*, 2001, 69 (2): 657-664.
- [13] Shao J, Su Y. Clone and sequence analysis of ClfA gene of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine milk in Xinjiang area. *Journal of Xinjiang Agricultural University*, 2013, 36 (2): 103-107. (in Chinese)
邵俊高, 苏艳. 新疆地区牛乳源金黄色葡萄球菌黏附因子 ClfA 基因的克隆与序列分析. *新疆农业大学学报*, 2013, 36 (2): 103-107.
- [14] Shkreta L, Talbot BG, Diarra MS, Lacasse P. Immune responses to a DNA/protein vaccination strategy against *Staphylococcus aureus* induced mastitis in dairy cows. *Vaccine*, 2004, 23 (1): 114-126.
- [15] He Y, Xie H, Yang L, Hao Y. Comparison of immunogenicity between the expressed protein of FnBP A gene and D gene of *Staphylococcus aureus* from cattle. *Chinese Veterinary Science*, 2014, 44 (5): 480-484. (in Chinese)
何焱, 谢红霞, 杨岚, 郝永清. 牛源金黄色葡萄球菌 FnBPA A 基因与 D 基因表达产物的免疫原性比较. *中国兽医科学*, 2014, 44 (5): 480-484.
- [16] Zhao Y, Zhang A, Hao Y. Cloning and expression of the D fragment of fibronectin-binding protein A gene from *Staphylococcus aureus*. *Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine*, 2009, 31 (5): 361-364. (in Chinese)
赵艳, 张爱荣, 郝永清. 金黄色葡萄球菌 FnBPA D 基因片段的表达. *中国预防兽医学报*, 2009, 31 (5): 361-364.
- [17] Casolini F, Visai L, Joh D, Conaldi PG, Toniolo A, Höök M, Speziale P. Antibody response to fibronectin-binding adhesin FnbpA in patients with *Staphylococcus*

aureus infections. *Infection and Immunity*, 1998, 66 (11): 5433-5442.

[18] Hu C, Gong R, Guo A. Protective effect of ligand-binding

domain of fibronectin-binding protein on mastitis induced by *Staphylococcus aureus* in mice. *Vaccine*, 2010, 28 (24): 4038-4044.

Characterization of antiserum after co-immunized with adhesins expressing ClfA, FnBPA-A and FnBPA-BCD of *Staphylococcus aureus*

Huijiao Jiang¹, Yan Su^{1*}, Yu Shen²

¹Veterinary Medicine College of Xinjiang Agricultural University, Urumqi 830052, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China

²Jiaji (Xinjiang) Feed Co. Ltd., Changji 831100, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China

Abstract: [Objective] To compare the antigenicity, adhesion inhibition activity and immune protection of the serum immunized with recombinant adhesins Clumping factor A (ClfA), Fibronectin binding protein A-A (FnBPA-A) and Fibronectin binding protein A-BCD (FnBPA-BCD) of *Staphylococcus aureus*. [Methods] *ClfA*, *FnBPA-A* and *FnBPA-BCD* genes were expressed and the resulting recombinant proteins were induced and purified. After immunizing mice with these purified proteins in combination or alone, the serum antibodies of mice were analyzed and compared for their antigenicity, adhesion inhibition activity and immune protection. [Results] The recombinant FnBPA-BCD protein had better fibronectin (Fn) binding ability than that of fibrinogen (Fg) binding and ClfA. FnBPA-A had better binding capacity to Fg than that of FnBPA-BCD. The antibody titer induced by ClfA and FnBPA-A were better than that of FnBPA-BCD, and three proteins co-immunization group had better antibody titer and adhesion inhibition to *Staphylococcus aureus* than those of single recombinant protein immunization group ($P < 0.05$). The immune protection rate for both ClfA and three proteins co-immunization group were 100% and for FnBPA-A and FnBPA-BCD immunization group the immune protection rate were 80% and 50%, respectively. [Conclusion] Our data suggest that coimmunization with these 3 recombinant proteins helps to achieve better immune effect.

Keywords: *Staphylococcus aureus*, ClfA, FnBPA-A, FnBPA-BCD, co-immunization, immunological characteristics

(本文责编:李磊,王晋芳)

Supported by the High Technology Project of the Autonomous Region of Xinjiang (201311108) and by Research Fund for Basic Veterinary of Higher Education of Xinjing

* Corresponding author. Tel: +86-991-8762701; E-mail: 2006au@163.com

Received: 7 January 2015 / Revised: 14 February 2015