



# 牛源金黄色葡萄球菌FnBPA-A分子不同遗传多态性重组质粒的免疫生物学特性的比较

王彩蝶<sup>1</sup>, 苏艳<sup>1\*</sup>, 苏玲玲<sup>2</sup>, 韦海娜<sup>1</sup>, 张宝江<sup>1</sup>

<sup>1</sup> 新疆农业大学动物医学学院, 新疆 乌鲁木齐 830052

<sup>2</sup> 新疆畜牧科学院, 新疆 乌鲁木齐 830052

**摘要:** 【目的】为了解FnBPA-A分子遗传多态性对新疆部分地区牛源金黄色葡萄球菌免疫生物学特性的影响。【方法】对采自新疆不同地区的牛源金黄色葡萄球菌FnBPA-A氨基酸序列进行分析, 构建了FnBPA-A 8个不同遗传多态性的真核重组质粒, 分别免疫C57BL/6小鼠, 收集免疫后的抗血清。对不同重组质粒免疫小鼠后免疫保护力进行比较分析。【结果】进化树显示GS801、GS819、GS856属于同一分支, GW10-1、GW20-2、GY288、GY309为同一分支, GY278为一分支。免疫小鼠并进行攻击保护检测, GW20-2、GS801、GS819、GS856与GY288免疫组对小鼠的免疫保护率较高, GY278免疫组免疫保护率最低。【结论】FnBPA-A分子的遗传多态性可以影响免疫小鼠的免疫水平和攻毒保护力。

**关键词:** 金黄色葡萄球菌, FnBPA-A分子, 遗传多态性, 免疫生物学特性

金黄色葡萄球菌是1种重要的人畜共患病原菌, 可引起人及动物化脓性疾病和食源性食物中毒。该菌还是引起奶牛乳腺炎的重要致病菌之一, 给奶牛养殖和乳品工业造成严重经济损失<sup>[1-2]</sup>。黏附素是金黄色葡萄球菌表面表达的特异性蛋白, 可在该菌感染的早期发挥重要作用, 有助于该菌对宿主细胞的侵入、定殖和扩散。纤连蛋白结合蛋白(Fibronectin binding protein A, FnBPA)能够介导金黄色葡萄球菌结合于宿主细胞表面的纤维蛋白原和纤维连接素, 从而促进细菌对机体

的侵入<sup>[3]</sup>, 是该菌最主要的黏附因子之一<sup>[4]</sup>。几乎所有的金黄色葡萄球菌都拥有FnBPA<sup>[5]</sup>。谢秀兰等对奶牛乳房炎金黄色葡萄球菌FnBPA基因的检出率高达99.2%<sup>[6]</sup>。

FnBPA蛋白有A、B、C、D 4个功能区, 其中A区和D区最受关注, A区可介导细菌与纤维蛋白原(Fibrinogen, Fg)及与弹性蛋白(Elastin)的结合, D区可与纤连蛋白(Fibronectin, Fn)结合, 是主要的配基结合区<sup>[7-9]</sup>。研究表明FnBPA的免疫决定表位位于D区<sup>[10-11]</sup>。前期我们对FnBPA的研究结果还表

基金项目: 国家自然科学基金(31260222)

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

收稿日期: 2016-04-11; 修回日期: 2016-05-24; 网络出版日期: 2016-07-01

明A区比D区的免疫原性更佳<sup>[12]</sup>。以往研究对FnBPA分子A区的序列分析表明, A区具有明显的遗传多态性, 可对该菌的免疫产生重要的影响<sup>[13]</sup>。Loughman等<sup>[14]</sup>对FnBPA分子7种不同的同种异型分子N端A区的氨基酸序列分析结果表明, 这些分子的A区同源性较低, 在66%–76%, 这种遗传差异导致FnBPA分子抗原性的差异和较低的交叉免疫性。Scarpa等<sup>[15]</sup>以16株不同菌株来源的黏附素分子(FnBPA、ClfA和Efb)为抗原免疫后的高免血清具有明显的地域和菌株特异性。

本研究中, 我们对来自新疆不同地区的8株牛乳源金黄色葡萄球菌分离株(GS801、GS819、GS856、GW10-1、GW20-2、GY288、GY309、GY278) FnBPA-A分子的遗传多态性进行了分析, 这8株菌FnBPA分子A区的氨基酸同源性在72.4%–99.8%, 具有不同遗传多态性特征, 基于此我们构建了FnBPA-A分子的8个不同遗传多态性真核重组质粒(pVAX1-FnBPA-856、pVAX1-FnBPA-819、pVAX1-FnBPA-801、pVAX1-FnBPA-10-1、pVAX1-FnBPA-20-2、pVAX1-FnBPA-278、pVAX1-FnBPA-288、pVAX1-FnBPA-309), 将其免疫小鼠, 检测其免疫后抗血清对不同金黄色葡萄球菌分离株的识别能力和抗血清中细胞因子的含量、免疫后刺激淋巴细胞增殖的能力, 并对小鼠进行了攻毒保护力的检测。旨在分析和揭示牛源金黄色葡萄球菌FnBPA分子A区的遗传多态性对其免疫生物学特性的影响。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌株和重组质粒:** 牛源金黄色葡萄球菌菌株为新疆农业大学微生物实验室分离、鉴定并保存, 共8株: GS801、GS819、GS856、GW10-1、GW20-2、GY288、GY309、GY278。

**1.1.2 主要试剂:** BM2000 DNA Marker、BM5000、

DNA Marker(博迈德生物有限公司); 高效真核转染试剂(Vigofect, 威格拉斯生物技术有限公司); 山羊抗兔IgG酶标二抗、FITC标记羊抗兔IgG (中杉金桥); 纤维蛋白原(Sigma公司, F8630, 纯度65%–85%); 金牌超量大提质粒试剂盒(康为世纪)。

**1.1.3 实验仪器:** 低温高速离心机(Beckman公司); 微型水平电泳槽(北京六一仪器厂); 核酸蛋白测定仪(德国Eppendorf公司); 酶标仪(BIOTEC)。

**1.1.4 实验动物:** 6周龄雌性C57BL/6小鼠100只, 购自上海斯莱克实验动物有限责任公司。

### 1.2 牛源金黄色葡萄球菌分离株FnBPA-A遗传多态性分析

使用生物信息学软件MEGA及Megalign, 对来自新疆不同地区金黄色葡萄球菌分离株的FnBPA-A氨基酸序列进行序列分析, 并根据FnBPA-A基因序列分析建立进化树。

### 1.3 pVAX1-FnBPA-A不同真核表达重组质粒的构建与间接免疫荧光检测

用BamH I 和EcoR I 内切酶分别对纯化后的FnBPA-A PCR产物和真核表达载体pVAX1双酶切, 回收酶切产物, 用T4 DNA连接酶进行4 °C过夜连接。将连接产物转化DH5 $\alpha$ 感受态细胞, PCR鉴定和双酶切鉴定都为阳性的送上海生物工程技术服务有限公司进行测序。

为鉴定构建的8个不同FnBPA-A重组质粒的表达情况, 将培养的293T细胞转染前1 h更换新鲜的完全培养液, 将构建的8个不同遗传多态性FnBPA-A重组质粒DNA提取纯化后与转染试剂分别溶于150 mmol/L NaCl溶液中, 混匀后逐滴滴入293T细胞培养液中。转染后的293T细胞继续培养48 h后, 进行间接免疫荧光检测。用5% BSA室温封闭30 min; 加入1 : 100稀释的一抗(兔抗金黄色葡萄球菌多克隆抗体, 由本室制备), 4 °C孵育过夜; 加入1 : 500荧光二抗(FITC标记羊抗兔IgG), 孵

育30 min, 用50%缓冲甘油封片后用荧光显微镜观察。

### 1.4 FnBPA-A不同遗传多态性重组质粒对小鼠的免疫

在对来自新疆不同地区牛源金黄色葡萄球菌分离株FnBPA-A序列分析的基础上, 构建了8种不同遗传多态性重组质粒。将6周龄雌性C57BL/6小鼠随机分为10组, 每组10只, 分别为: pVAX1-FnBPA-856、pVAX1-FnBPA-819、pVAX1-FnBPA-801、pVAX1-FnBPA-10-1、pVAX1-FnBPA-20-2、pVAX1-FnBPA-278、pVAX1-FnBPA-288、pVAX1-FnBPA-309、pVAX1以及PBS对照组。分别将纯化后的重组质粒100  $\mu\text{g}$ 与壳聚糖佐剂等体积混合, 对实验鼠腿部肌肉多点注射(100  $\mu\text{g}$ /只)。2周后, 进行第2次免疫(100  $\mu\text{g}$ /只), PBS对照组免疫方法同上, 于第1次免后第0、14、30天采血并分离血清。

### 1.5 小鼠免疫后攻毒保护力检测

第2次免疫21 d后, 使用本实验室分离鉴定的牛源金黄色葡萄球菌毒株, 分别对各组小鼠进行腹腔攻毒实验, 剂量为5  $LD_{50}$ ( $2 \times 10^9$  CFU)<sup>[12]</sup>, 观察并记录小鼠死亡情况。

## 2 结果和分析

### 2.1 对不同分离菌株FnBPA-A氨基酸序列分析

根据对8个新疆地区分离株FnBPA-A氨基酸序列(FnBPA N端59-562氨基酸)比对结果(图1-A), FnBPA-A氨基酸序列同源性在74.8%–99.8% (图1-B), 氨基酸系统发育进化树显示GS801、GS819、GS856属于同一分支, GW10-1、GW20-2、GY288、GY309为同一分支, GY278为一分支(图1-C)。

### 2.2 FnBPA-A不同遗传多态性重组质粒的构建

FnBPA-A 8个不同遗传多态性重组质粒经PCR鉴定后, 可得到约1500 bp左右的目的片段, 结合测序结果的验证, 表明重组质粒构建成功。

### 2.3 转染细胞的间接免疫荧光检测

提取纯化后的pVAX1-FnBPA-A转染293T细胞, 48 h后进行间接免疫荧光检测。荧光显微镜观察可见: 转染有FnBPA-A重组质粒的细胞中检测到荧光, 而在空载体和空细胞对照中没有观察到荧光, 表明重组质粒可在293T细胞中表达(图2)。

### 2.4 重组质粒免疫后的攻毒保护力检测

第2次免疫后第21天对小鼠进行攻毒保护力实验, 结果显示(表1), GW20-2免疫组保护率最高, 可达100%。GS819、GS856、GS801、GY288免疫组次之, 保护率为83.3%; GW10-1与GY309免疫保护率分别为66.7%和50.0%; GY278免疫保护力最低为33.3%; 对照组全部死亡。

## 3 讨论

金黄色葡萄球菌感染过程中表达的一系列细胞膜相关蛋白中, 具有良好免疫原性的蛋白包括A蛋白、胶原纤维结合蛋白、纤维蛋白原结合蛋白ClfA和Efb以及纤连蛋白结合蛋白FnBPA和FnBPB<sup>[17]</sup>, 其中FnBPA被认为是在该菌感染早期最重要的致病因子。FnBPA的A区片段较大, 由3个独立的亚区N1、N2和N3组成<sup>[18]</sup>, 其二级结构稳定, 适合做免疫原。Zuo等<sup>[19]</sup>对FnBPA不同区段免疫效果评价后认为FnBPA分子A区中的30–500氨基酸片段免疫效果较好。

据报道FnBPA的A区至少有7个亚型, 且不同的亚型之间也存在地区差异性。Memon等<sup>[13]</sup>对FnBPA分子的A区7种不同亚型的遗传多态性进行分析表明, FnBPA分子的A区中的N2、N3亚区为变异性较大的区域, 同源性分别为77.5%和66.2%, N1亚区的保守性较高为92.4%。对FnBPA-A分子的空间结构分析表明, 这些变异氨基酸多位于该分子的表面暴露区, 保守的氨基酸多位于Fg、Fn的结合区。针对FnBPA分子A区的多克隆抗体

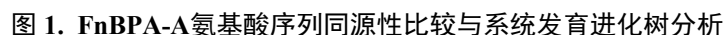


Figure 1. Amino acid sequence comparison and phylogenetic analysis of FnBPA-A. A: alignment of the amino acid sequences of FnBPA-A of 8 different *S. aureus* isolates; B: homology comparison of the amino acid of FnBPA-A; C: phylogenetic tree of FnBPA-A.



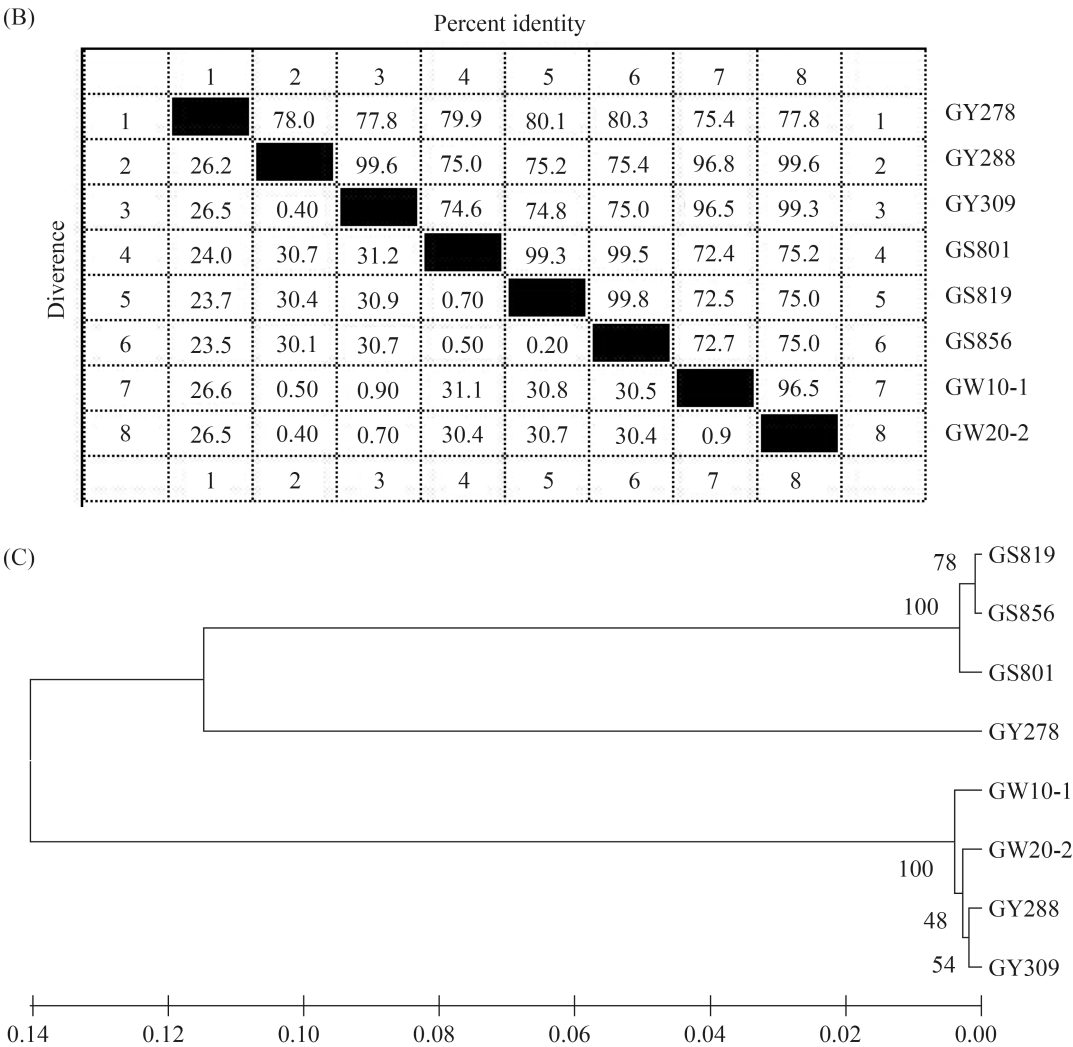


Figure 1. Continued.

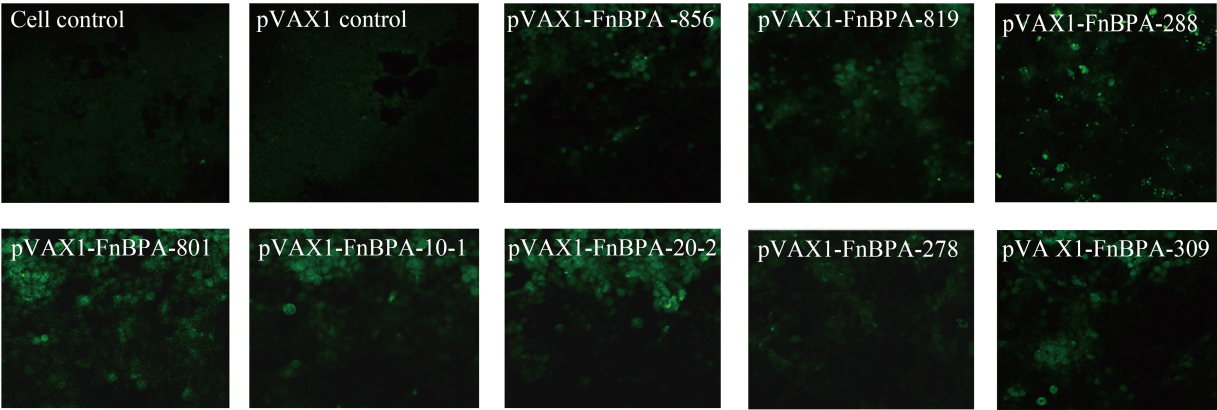


图 2. 间接免疫荧光检测FnBPA-A重组质粒在293T细胞中的表达  
Figure 2. Detection of expression of recombinant plasmid in 293T cells by IFA.

表1. 小鼠攻毒试验

Table 1. The challenge test results of the mice

Immunization group	Challenge mice	Protection rate/%
PV-819	6	83.33 (5/6)
PV-856	6	83.33 (5/6)
PV-801	6	83.33 (5/6)
PV-278	6	33.33 (2/6)
PV-10-1	6	66.67 (4/6)
PV-20-2	6	100.00 (6/6)
PV-288	6	83.33 (5/6)
PV-309	6	50.00 (3/6)
PVAX1	6	0 (0/6)
Control	6	0 (0/6)

对不同亚型蛋白结合力可以表现出4–7倍的差异。我们前期对牛源金黄色葡萄球菌本地流行株的分子流行病学调查表明, 新疆地区流行的菌株FnBPA分子A区序列具有一定的地域特征<sup>[20]</sup>。本研究中我们选取来自新疆不同地区的8株流行株, 其FnBPA分子A区的同源性在74.8%–99.8%, 该结果也表明FnBPA分子的A区具有明显的遗传多态性。这与Keane等<sup>[8]</sup>对7个亚型的FnBPA分子A区分析得出其氨基酸序列差异性可达24.5%–34.1%的结果一致。

FnBPA分子A区的遗传多态性可导致其抗原性的差异<sup>[21]</sup>。本研究中以金黄色葡萄球菌FnBPA-A不同遗传多态性重组质粒免疫小鼠后, 本研究的结果表明GY278株FnBPA-A分子与其它菌株氨基酸同源性差异较大, 进一步导致免疫实验动物小鼠后免疫保护效果的差异性。Memon等<sup>[13]</sup>发现FnBPA-A 7个不同亚型抗体对FnBPA-A分子的结合力也表现较大的差异性。我们分析这种FnBPA分子A区结构域抗原性的差异可影响其体液免疫, 并可能有助于金黄色葡萄球菌逃避机体的免疫及有利于其侵染宿主。这种体液免疫的差异性和实验动物的免疫保护力关联度不高。

FnBPA-A不同真核重组质粒免疫小鼠产生的保护率不同, GW20-2免疫组保护力最高, GY278免疫组的免疫保护力最低。该结果也提示我们牛源金黄色葡萄球菌FnBPA-A的遗传多态性可以通过其抗原性和免疫功能进而影响其免疫保护力。综上所述, 我们的研究结果表明, FnBPA-A的遗传多态性可影响该菌的免疫和免疫保护效果, 该结果对今后合理设计金黄色葡萄球菌的免疫原及免疫策略预防本地区金黄色葡萄球菌性乳腺炎具有重要意义。

## 参考文献

- [1] Lu CP. Veterinary microbiology. Beijing: China Agriculture Press, 2001. (in Chinese)  
陆承平. 兽医微生物学. 北京: 中国农业出版社, 2001.
- [2] Jin NY, Hu ZM, Feng SZ. New zoonosis. Beijing: Science Press, 2007: 577–599. (in Chinese)  
金宁一, 胡仲明, 冯书章. 新编人兽共患病学. 北京: 科学出版社, 2007: 577–599.
- [3] Melchior MB, van Osch MHJ, Graat RM, van Duijkeren E, Mevius DJ, Nielen M, Gaastra W, Fink-Gremmels J. Biofilm formation and genotyping of *Staphylococcus aureus* bovine mastitis isolates: evidence for lack of penicillin-resistance in Agr-type II strains. *Veterinary Microbiology*, 2009, 137(1/2): 83–89.
- [4] Gaudreau MC, Lacasse P, Talbot BG. Protective immune responses to a multi-gene DNA vaccine against *Staphylococcus aureus*. *Vaccine*, 2007, 25(5): 814–824.
- [5] Herman-Bausier P, El-Kirat-Chatel S, Foster TJ, Geoghegan JA, Dufrène YF. *Staphylococcus aureus* fibronectin-binding protein A mediates cell-cell adhesion through low-affinity homophilic bonds. *mBio*, 2015, 6(3): e00413–15.
- [6] Xie XL, Liu XY, Wang JD, Fan CM, Yang HJ, Kang XD. Detection of the main 8 virulence genes of *Staphylococcus aureus* from bovine mastitis. *China Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2014, 41(10): 47–50. (in Chinese)  
谢秀兰, 刘溪源, 王建东, 范春梅, 杨慧君, 康晓冬. 奶牛乳房炎金黄色葡萄球菌8种毒力基因的PCR检测. 中国畜牧兽医, 2014, 41(10): 47–50.
- [7] Stemmerk V, Jones RPO, Moroz O, Atkin KE, Edwards AM, Turkenburg JP, Leech AP, Massey RC, Potts JR. Evidence for

- steric regulation of fibrinogen binding to *Staphylococcus aureus* fibronectin-binding protein A (FnBPA). *The Journal of Biological Chemistry*, 2014, 289(18): 12842–12851.
- [ 8 ] Keane FM, Loughman A, Valtulina V, Brennan N, Speziale P, Foster TJ. Fibrinogen and elastin bind to the same region within the A domain of fibronectin binding protein A, an MSCRAMM of *Staphylococcus aureus*. *Molecular Microbiology*, 2007, 63(3): 711–723.
- [ 9 ] Wann ER, Gurusiddappa S, Höök M. The fibronectin-binding MSCRAMM FnbpA of *Staphylococcus aureus* is a bifunctional protein that also binds to fibrinogen. *The Journal of Biological Chemistry*, 2000, 275(18): 13863–13871.
- [10] Joh HJ, House-Pompeo K, Patti JM, Gurusiddappa S, Höök M. Fibronectin receptors from gram-positive bacteria: comparison of active sites. *Biochemistry*, 1994, 33(20): 6086–6092.
- [11] He Y, Hao YQ. Cloning and antigen epitopes prediction of fibronectin-binding protein A gene a domain of bovine *Staphylococcus aureus*. *China Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2014, 41(5): 7–11. (in Chinese)  
何焱, 郝永清. 牛源金黄色葡萄球菌FnbpA-A基因克隆及抗原表位预测. *中国畜牧兽医*, 2014, 41(5): 7–11.
- [12] Shao JG, Zhang BJ, Li SC, Wang CD, Wang GQ, Su Y. Comparison and analysis of biological of activity antiserum after immunizing with expressed different domain of *Staphylococcus aureus* adhesin FnBPA from bovine milk. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2015, 46(7): 1208–1214. (in Chinese)  
邵俊高, 张宝江, 李善春, 王彩蝶, 王国勤, 苏艳. 牛乳源金黄色葡萄球菌黏附素分子FnBPA不同功能区生物学活性的比较分析. *畜牧兽医学报*, 2015, 46(7): 1208–1214.
- [13] Memon J, Yang YC, Kashifa J, Yaqoob M, Buriroa R, Soomroa J, Wang LP, Fan HJ. Genotypes, virulence factors and antimicrobial resistance genes of *Staphylococcus aureus* isolated in bovine subclinical mastitis from Eastern China. *Pakistan Veterinary Journal*, 2013, 33(4): 486–491.
- [14] Loughman A, Sweeney T, Keane FM, Pietrocola G, Speziale P, Foster TJ. Sequence diversity in the A domain of *Staphylococcus aureus* fibronectin-binding protein A. *BMC Microbiology*, 2008, 8(1): 74.
- [15] Scarpa M, Piccinini R, Brun P, Grillo A, Palù G, Mengoli C, Daprà V, Castagliuolo I, Zecconi A. Relationship between virulence factor genes in bovine *Staphylococcus aureus* subclinical mastitis isolates and binding to anti-adhesin antibodies. *Journal of Dairy Research*, 2010, 77(2): 159–167.
- [16] Shen H, Lu S, Chen SN, Guan JY, Liu EH. Effects of forsythoside on proliferation and secretion of mouse spleen lymphocytes *in vitro*. *Acta Laboratorium Animalis Scientia Sinica*, 2012, 20(4): 66–70. (in Chinese)  
沈红, 芦山, 陈舒楠, 官佳懿, 刘恩宏. 连翘酯苷对小鼠脾脏淋巴细胞体外增殖与分泌功能的影响. *中国实验动物学报*, 2012, 20(4): 66–70.
- [17] McCarthy AJ, Lindsay JA. Genetic variation in *Staphylococcus aureus* surface and immune evasion genes is lineage associated: implications for vaccine design and host-pathogen interactions. *BMC Microbiology*, 2010, 10(1): 173.
- [18] Ponnuraj K, Bowden MG, Davis S, Gurusiddappa S, Moore D, Choe D, Xu Y, Hook M, Narayana SVL. A "dock, lock, and latch" structural model for a staphylococcal adhesin binding to fibrinogen. *Cell*, 2003, 115(2): 217–228.
- [19] Zuo QF, Cai CZ, Ding HL, Wu Y, Yang LY, Feng Q, Yang HJ, Wei ZB, Zeng H, Zou QM. Identification of the immunodominant regions of *Staphylococcus aureus* fibronectin-binding protein A. *PLoS One*, 2014, 9(4): e95338.
- [20] Zhang XX, Shi QH, Wang SM, Su Y. Clone and sequence analysis of FnbpA gene of *Staphylococcus aureus* isolated from Xinjiang dairy cow with subclinical mastitis. *Journal of Xinjiang Agricultural University*, 2010, 33(5): 422–426. (in Chinese)  
张向新, 石庆华, 王世民, 苏艳. 新疆奶牛乳腺炎致病性金黄色葡萄球菌FnbpA基因的克隆与序列分析. *新疆农业大学学报*, 2010, 33(5): 422–426.
- [21] 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.

# Immunological characteristic comparison of different genetic polymorphism recombinant of FnBPA-A of bovine *Staphylococcus aureus* strain

Caidie Wang<sup>1</sup>, Yan Su<sup>1\*</sup>, Lingling Su<sup>2</sup>, Haina Wei<sup>1</sup>, Baojiang Zhang<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Veterinary Medicine College of Xinjiang Agricultural University, Urumqi 830052, Xinjiang Uyghur Autonomous Region, China

<sup>2</sup> Xinjiang Sciences Academy of Animal Husbandry, Urumqi 830052, Xinjiang Uyghur Autonomous Region, China

**Abstract:** [Objective] To understand the impact of genetic polymorphism of FnBPA-A on the immune biological characteristics of *Staphylococcus aureus*. [Methods] Sequence of FnBPA-A of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine in Xinjiang was analyzed and 8 different genetic polymorphism eukaryotic recombinants of FnBPA-A were constructed. C57BL/6 mice were immunized with these recombinant plasmids and mice sera were collected. Level of the immune protection of immunized mice was compared. [Results] GS801, GS819 and GS856 were on the same branch; GW10-1, GW20-2, GY288 and GY309 belong to the same branch; GY278 was on a different branch. For the challenge experiment, GW20-2, GS801, GS819, GS856 and GY288 showed better protection. [Conclusion] The genetic polymorphism of FnBPA-A could significantly affect the immune protection of immunized mice.

**Keywords:** *Staphylococcus aureus*, FnBPA-A, genetic polymorphism, immunological characteristics

(本文责编: 李磊)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31260222)

\*Corresponding author. Tel: +86-991-8762704; E-mail: 2006au@163.com

Received: 11 April 2016; Revised: 24 May 2016; Published online: 1 July 2016