

# 牛源金黄色葡萄球菌粘附因子 Efb 与 ClfA 的免疫生物学特性比较

刘云涛<sup>1</sup>, 苏艳<sup>1</sup>, 张宝江<sup>1</sup>, 苏玲玲<sup>2</sup>, 姜慧娇<sup>1</sup>

1 新疆农业大学动物医学学院, 新疆 乌鲁木齐 830052

2 新疆畜牧科学院饲料研究所, 新疆 乌鲁木齐 830000

刘云涛, 苏艳, 张宝江, 等. 牛源金黄色葡萄球菌粘附因子 Efb 与 ClfA 的免疫生物学特性比较. 生物工程学报, 2015, 31(9): 1335-1343.

Liu YT, Su Y, Zhang BJ, et al. Immunological comparison of Efb and ClfA of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine. Chin J Biotech, 2015, 31(9): 1335-1343.

**摘要:** 为评价与比较金黄色葡萄球菌的粘附因子 Efb (Extracellular fibrinogen-binding protein) 和 ClfA (Clumping factor A) 的抗原性、粘附特性及其抗血清对金黄色葡萄球菌菌体的识别能力、抗粘附能力及免疫保护力等免疫生物学特性, 分别构建 Efb 和 ClfA 的重组表达载体, 并用纯化的重组蛋白免疫实验动物, 分别检测家兔抗血清对菌体的识别能力、抗粘附能力以及小鼠抗血清的抗体效价和免疫保护作用。结果显示, Efb 和 ClfA 均有与纤维蛋白原 (Fibrinogen, Fg) 结合的能力, 且 Efb 蛋白对纤连蛋白 (Fibronectin, Fn) 的结合能力优于 ClfA ( $P < 0.01$ ), ClfA 免疫组抗血清对全细菌的识别能力优于 Efb 免疫组 ( $P < 0.01$ )。与对照组相比 Efb 和 ClfA 免疫组的抗血清均能显著抑制金黄色葡萄球菌对 Fg 和 Fn 的粘附 ( $P < 0.01$ ), Efb 免疫组对金黄色葡萄球菌的粘附抑制优于 ClfA, 两种粘附因子免疫小鼠后产生的血清抗体效价与对照组比较有显著的升高, 抗体滴度可达 1:40 500, 攻毒结果显示 Efb 与 ClfA 免疫组均对小鼠具有良好的保护效果。该研究结果对 Efb 在金黄色葡萄球菌的亚单位疫苗的应用奠定了基础。

**关键词:** 金黄色葡萄球菌, Efb, ClfA, 免疫生物学特性

**Received:** November 25, 2014; **Accepted:** January 21, 2015

**Supported by:** National Natural Science Foundation of China (Nos. 31260222, 31160191), High Technologies Research Program of Xinjiang (No. 201311108), Research Fund for Basic Veterinary of Higher Education of Xinjiang.

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

国家自然科学基金 (Nos. 31260222, 31160191), 新疆维吾尔自治区高新技术项目 (No. 201311108), 自治区普通高校重点学科基础兽医学项目资助。

# Immunological comparison of Efb and ClfA of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine

Yuntao Liu<sup>1</sup>, Yan Su<sup>1</sup>, Baojiang Zhang<sup>1</sup>, Lingling Su<sup>2</sup>, and Huijiao Jiang<sup>1</sup>

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

2 Feed Research Institute, Xinjiang Academy of Animal Science, Urumqi 830000, Xinjiang, China

**Abstract:** To compare immunological characteristics of Extracellular fibrinogen-binding protein (Efb) and Clumping factor A (ClfA) of *Staphylococcus aureus*, we constructed two prokaryotic expression vector pET28a-Efb and pET28a-ClfA. After prokaryotic expression and purification, Efb and ClfA were used to immunize experimental animal. After the second immunization the antisera were collected and the antibody titers, the bacteria binding activity and adhesion inhibition activity of these antisera were detected by enzyme linked immunosorbent assay, adhesion inhibition assay and challenge. Both Efb and ClfA had Fibrinogen binding activity whereas the former had better Fibronectin binding activity. The bacteria binding capability of antisera of rabbits immunized with ClfA was better than that with Efb ( $P<0.01$ ). Both antisera of Efb and ClfA could inhibit adherence activity of *Staphylococcus aureus* to Fibrinogen and Fibronectin adherence compare to the control group ( $P<0.01$ ), and Efb had better adhesion inhibition activity than ClfA. The antibody titer of immunized group could reach 1:40 500. After the second immunization, both Efb and ClfA had good protective efficacy. This result constitutes a good foundation for *Staphylococcus aureus* subunit vaccine development.

**Keywords:** *Staphylococcus aureus*, ClfA, Efb, immunological characteristics

金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus* 作为一种重要的致病菌，广泛存在于自然界，也是引起奶牛乳腺炎的主要病原菌之一<sup>[1]</sup>。粘附素是金黄色葡萄球菌表达的一类特异性蛋白，能够识别机体的细胞外基质并与之发生特异性结合，介导金黄色葡萄球菌粘附于宿主细胞表面，促进细菌对宿主组织的入侵，尤其是在该菌感染的早期，粘附被认为是细菌感染的重要一步，是构成细菌感染的先决条件<sup>[2]</sup>。粘附素分子中聚集因子 ClfA 被认为是在金黄色葡萄球菌表面最主要的粘附因子之一<sup>[3-4]</sup>。ClfA 能介导病原菌与细胞表面的 Fg 的结合，ClfA 的抗原决定表位位于配基结合的 A 区<sup>[5]</sup>。与 ClfA 分布于细胞表面不同，Efb 是一种分泌至细胞外的 Fg 结合蛋白，目前 Efb 被认为是在金黄色葡萄球菌感染

过程中的一个关键致病因子<sup>[6]</sup>。Efb 蛋白为一种双功能蛋白，既能够通过 Fg 结合抑制血小板的凝集，同时又能够抑制补体的激活<sup>[7-9]</sup>，因此 Efb 还是一个参与该菌免疫逃避的重要分子，研究其免疫对于防治其引起的感染具有重要意义。

ClfA 和 Efb 这两种粘附素均能够与 Fg 结合，且 ClfA 被认为在免疫原性及免疫保护特性方面具有非常明显的优势。为深入认识 Efb 分子在免疫原性及免疫保护特性方面的特点，本研究将 ClfA 和 Efb 分别进行表达和免疫，通过对 Efb 免疫后抗血清对菌体的识别能力、抗粘附能力、抗体效价以及免疫保护效果与 ClfA 进行对比，分析这两种粘附素分子在抗原性、抗粘附特性以及免疫原保护特性方面的差异，进而评估 Efb 作为免疫候选抗原的价值，为筛选和

构建金黄色葡萄球菌的亚单位疫苗奠定基础。

## 1 材料与方 法

### 1.1 质粒及菌株

牛乳源金黄色葡萄球菌新疆分离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；原核表达载体 pET-28a(+)、大肠杆菌 DH5 $\alpha$ 、大肠杆菌 BL21 (DE3) 均由新疆农业大学动物医学学院微生物实验室保存；家兔抗金黄色葡萄球菌血清由新疆农业大学动物医学学院微生物实验室制备并保存。

### 1.2 主要试剂

DL2000 DNA marker、DL5000 DNA marker、限制性内切酶 *EcoR* I、*Xho* I、*La-Taq* DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶购自 TaKaRa 公司；质粒提取试剂盒、胶回收试剂盒购自 Omega 公司；纤维蛋白原 (F8630, 65%–85%)、纤连蛋白 (F1141, 1 mg/mL)、弗氏完全佐剂、弗氏不完全佐剂购自 Sigma 公司；Blue Plus II Protein marker、Ni-NTA Resin 购自北京全式金生物技术公司；山羊抗鼠 HRP-IgG、山羊抗兔 HRP-IgG 购自北京中杉金桥生物技术有限公司；TMB 显色液、DAB 显色液、考马斯亮蓝 R-250 购自北京索莱宝科技有限公司。

### 1.3 实验动物

6–10 月龄雌性健康新西兰大白兔 2.5 kg，5–7 周龄雌性清洁级 C57BL/6 小鼠 (18–20 g)，购自新疆医科大学实验动物中心。

### 1.4 Efb 与 ClfA 重组质粒的构建

根据 GenBank 公布的金黄色葡萄球菌 *Efb* 和 *ClfA* 基因序列，应用 Primer 5.0 软件设计上下游引物，在上游引物中加入 *EcoR* I 酶切位点，

下游引物中加入 *Xho* I 酶切位点，引物序列见表 1，引物由生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成。以金黄色葡萄球菌分离株基因组为模板，PCR 扩增获得目的基因 *Efb* 和 *ClfA*，经 *EcoR* I/*Xho* I 酶切后的目的片段，连接到同样经 *EcoR* I/*Xho* I 酶切的 pET-28a(+) 载体中，连接产物转化至大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态细胞，酶切鉴定挑取阳性克隆，由生工生物工程 (上海) 股份有限公司测序。

### 1.5 重组蛋白的表达纯化及 Western blotting 分析

将测序正确重组质粒 pET-28a-Efb 与 pET-28a-ClfA 转化至大肠杆菌 BL21(DE3) 感受态细胞中，将阳性 BL21(DE3) 菌种接种于 LB 培养基 (含 50  $\mu$ g/mL Kan)，并以 pET-28a 作阴性对照，37  $^{\circ}$ C、200 r/min 振荡培养至  $OD_{600}$  值为 0.6，加入 IPTG 至终浓度 1 mmol/L，30  $^{\circ}$ C 诱导培养 5 h，分别取诱导表达前后菌液进行 SDS-PAGE 分析，并对表达的重组蛋白进行亲和层析纯化。

将重组蛋白经 SDS-PAGE 后，电转移到硝酸纤维素膜上。依次加入家兔抗金黄色葡萄球菌血清，HRP 标记山羊抗兔 IgG，在 DAB 显色液中显色，洗涤，观察结果。

表 1 引物序列及相应的酶切位点

Table 1 Primers sequences used for *Efb* and *ClfA*

Genes	Primer names	Primer sequences (5'–3')
<i>Efb</i>	F1	GCGGAATTCAGCGAAGGA TACGGTCCAAG
	R1	TATTCTCGAGTAGTTCTCA CTAATCC
<i>ClfA</i>	F2	GCGGAATTCGCAAGTGAA AATAGTGTTACGC
	R2	TATTCTCGAGTAATTTC CCAGGCTCATCAG

### 1.6 重组蛋白对 Fg 和 Fn 的结合活性测定

将重组蛋白以 20  $\mu\text{g}/\text{孔}$  分别与包被有 Fg (200  $\text{ng}/\text{孔}$ ) 和 Fn (50  $\text{ng}/\text{孔}$ ) 的酶标板相互作用, 37  $^{\circ}\text{C}$  作用 1 h, PBS 洗涤 3 次, 洗涤后以兔抗金黄色葡萄球菌血清为一抗 (稀释度 1:100), HRP 标记的山羊抗兔 IgG 为二抗 (稀释度 1:6000), 以 TMB 显色, 测定  $OD_{450}$  值。

### 1.7 家兔免疫试验

将 9 只雌性成年健康新西兰大白兔随机分为 3 组, 每组 3 只, 分别为 Efb 免疫组、ClfA 免疫组和 PBS 对照组。首次免疫时抗原与弗氏完全佐剂等体积混合, 第二次免疫和加强免疫抗原与弗氏不完全佐剂等体积混合。采用背部皮下多点注射方式, 单次免疫剂量为 200  $\mu\text{g}/\text{只}$ , 时间间隔均为 21 d。初次免疫后 14 d、35 d、42 d 采血, 分离血清-20  $^{\circ}\text{C}$  保存。

### 1.8 Efb 和 ClfA 兔抗血清抑制金黄色葡萄球菌粘附 Fg、Fn 能力的检测

分别以 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Fg 100  $\mu\text{L}$  和 6.25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Fn 100  $\mu\text{L}$  4  $^{\circ}\text{C}$  过夜包被酶标板<sup>[10-12]</sup>, 5%脱脂奶粉 37  $^{\circ}\text{C}$  封闭 1 h, 同时将处于对数生长期的金黄色葡萄球菌 ( $OD_{600}=1.0$ ) 与制备的免疫血清 (稀释度 1:25、1:100) 各 100  $\mu\text{L}$  37  $^{\circ}\text{C}$  孵育 1 h, 将孵育后的金黄色葡萄球菌加入到封闭后的酶标板中, 以对照组血清孵育的金黄色葡萄球菌作对照。37  $^{\circ}\text{C}$  作用 2 h, PBST 洗涤 3 次, 25%甲醛固定 30 min, 洗涤同上, 结晶紫染色 15 min, 洗涤同上, 最后用 95%乙醇脱色 5 min, 测定  $OD_{405}$  值。

### 1.9 小鼠免疫试验

将 18 只雌性 C57BL/6 小鼠随机分为 3 组, 每组 6 只, 分别为 Efb 免疫组、ClfA 免疫组和 PBS 对照组, 按 50  $\mu\text{g}/\text{只}$  皮下注射免疫, 免疫程序同新西兰大白兔免疫程序, 进行 2 次免疫。

初次免疫后 14 d、35 d、49 d、63 d 采血, 分析血清-20  $^{\circ}\text{C}$  保存备用。

### 1.10 小鼠免疫后血清抗体的检测

用间接 ELISA 检测免疫后的血清效价, 选择免疫后小鼠血清进行抗体水平监测。分别用 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的 Efb 和 ClfA 蛋白包被酶标板, 以待检血清为一抗, 1:6000 稀释的 HRP 标记山羊抗鼠 IgG 为二抗, TMB 为显色液, 测定  $OD_{450}$  值。

### 1.11 Efb 和 ClfA 小鼠抗血清对金黄色葡萄球菌结合能力的检测

用 5%戊二醛预处理酶标板, 加入灭活金黄色葡萄球菌 200  $\mu\text{L}/\text{孔}$  ( $OD_{600}=0.4$ ), 37  $^{\circ}\text{C}$  孵育 16 h, 加入不同稀释度的待检血清, 37  $^{\circ}\text{C}$  孵育 2 h, PBS 洗涤 3 次, 除去未结合的抗体, 加入 HRP 标记山羊抗兔 IgG, 37  $^{\circ}\text{C}$  作用 45 min, 洗涤后以 TMB 显色。

### 1.12 小鼠攻毒试验

首次免疫后 76 d, 取金黄色葡萄球菌接种于 BHI 培养基, 37  $^{\circ}\text{C}$  培养, 每只小鼠攻毒量为  $2 \times 10^9$  CFU (1MLD), 分别对 Efb 免疫组、ClfA 免疫组和 PBS 对照组各小鼠进行攻毒, 攻毒后 1 周连续观察并记录小鼠死亡情况。

## 2 结果与分析

### 2.1 重组质粒的鉴定

重组表达质粒经 PCR 鉴定, 分别得到大小约为 400 bp 和 1600 bp 的片段, 经测序鉴定后序列正确。表明成功构建了原核表达质粒 pET-28a-Efb 与 pET-28a-ClfA。

### 2.2 重组蛋白的 SDS-PAGE 和 Western blotting 分析

对重组蛋白的 SDS-PAGE 结果显示, 与诱

导前相比, IPTG 诱导的表达产物分别在 23 kDa (图 1A) 与 90 kDa (图 1B) 处有明显的蛋白条带, 说明 Efb 和 ClfA 融合蛋白表达成功。Western

blotting 分析结果表明, 所表达的重组蛋白能够与兔抗金黄色葡萄球菌血清发生特异性反应 (图 2), 说明表达产物有良好的免疫原性。

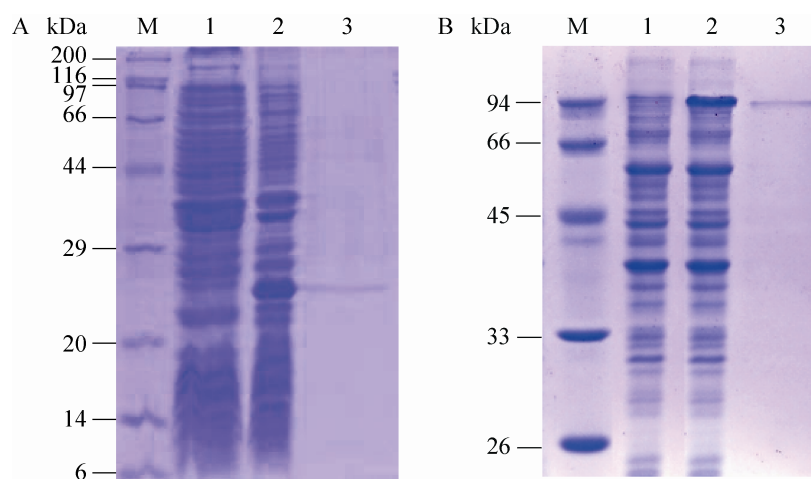


图 1 Efb 蛋白 (A) 和 ClfA 蛋白 (B) 的 SDS-PAGE 电泳

Fig. 1 SDS-PAGE analysis of expressed Efb protein (A) and ClfA protein (B). (A) M: protein marker; 1: pET-28a-Efb/BL21 before induced; 2: pET-28a-Efb/BL21 induced by IPTG; 3: purified Efb protein. (B) M: protein marker; 1: pET-28a-ClfA/BL21 before induced; 2: pET-28a-ClfA/BL21 induced by IPTG; 3: purified ClfA protein.

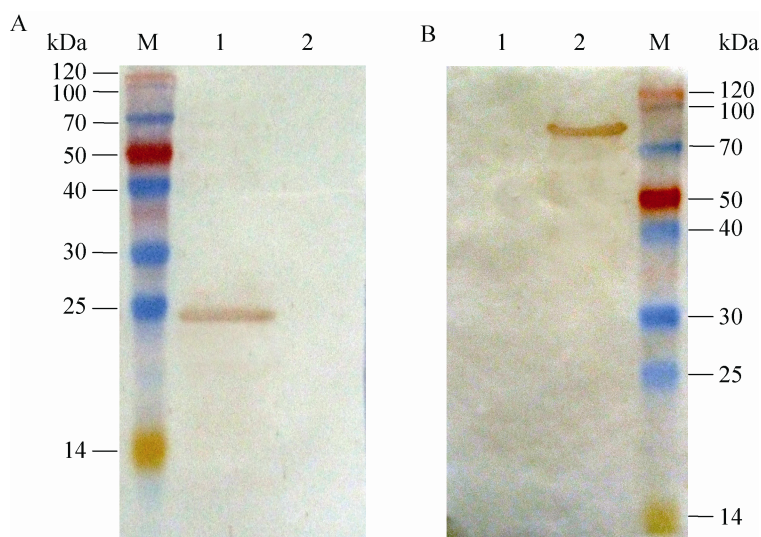


图 2 重组蛋白 Efb (A) 和 ClfA (B) 的 Western blotting 分析

Fig. 2 Western blotting analysis of expressed Efb protein (A) and ClfA protein (B). (A) M: protein marker; 1: Efb protein; 2: pET-28a induced. (B) M: protein marker; 1: pET-28a induced; 2: ClfA protein.

### 2.3 重组蛋白与 Fg 和 Fn 结合活性

分别用 Fg (5  $\mu\text{g/mL}$ ) 和 Fn (6.25  $\mu\text{g/mL}$ ) 包被酶标板后检测重组蛋白对二者的结合能力。检测结果表明：与 PBS 对照组相比，重组蛋白 Efb 和 ClfA 均对 Fg 表现出明显的结合能力 ( $P<0.01$ )。重组蛋白 Efb 对 Fn 的结合能力明显高于 ClfA ( $P<0.01$ )，该结果表明 Efb 在对 Fn 具有更强的结合优势 (图 3)。

### 2.4 重组蛋白抗血清抑制金黄色葡萄球菌粘附 Fg 和 Fn 能力检测

在重组蛋白抗血清抑制金黄色葡萄球菌粘附 Fg 和 Fn 试验中发现，与对照组相比 Efb 和 ClfA 免疫组抗血清均可抑制金黄色葡萄球菌对 Fg 和 Fn 的结合 ( $P<0.01$ )，ClfA 抗血清在抑制金黄色葡萄球菌对 Fg 的粘附方面优于 Efb

( $P<0.01$ ) (图 4A)，Efb 抗血清在抑制金黄色葡萄球菌对 Fn 的粘附方面优于 ClfA (图 4B)。

### 2.5 重组蛋白免疫小鼠的血清抗体效价检测

采用间接 ELISA 法检测小鼠血清抗重组蛋白 Efb 和 ClfA 的特异性 IgG 水平 (图 5)。检测结果表明第二次免疫 14 d 后，Efb 蛋白免疫组与 ClfA 蛋白免疫组血清效价可达 1 40 500 (图 6)，二者均具有良好的抗体诱导能力。

### 2.6 重组蛋白小鼠抗血清结合金黄色葡萄球菌能力检测

将 1 1 500、1 4 500、1 13 500 稀释的重组蛋白抗血清与包被的金黄色葡萄球菌作用 2 h 后，ELISA 法检测抗体对菌体的识别结合能力。结果显示，ClfA 蛋白免疫组抗血清对全细菌的结合能力优于 Efb ( $P<0.05$ ) (图 7)。

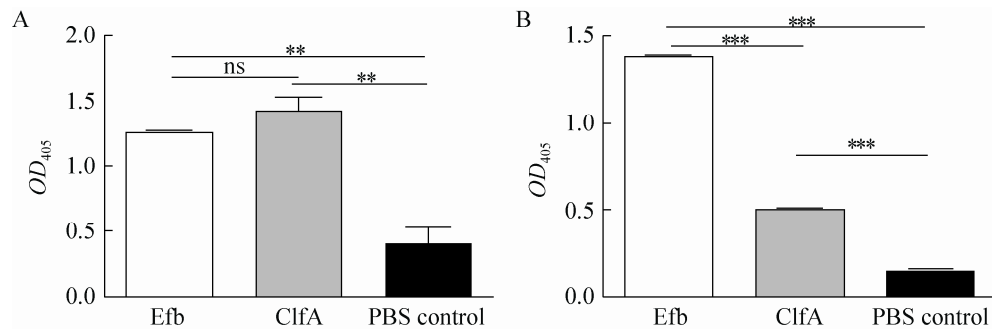


图 3 重组蛋白与 Fg (A) 和 Fn (B) 结合能力检测

Fig. 3 Binding activity of the recombinant proteins to Fg (A) and Fn (B). \*\* $P<0.01$ , \*\*\* $P<0.001$ , and ns means no significance, compared with mice immunized with PBS.

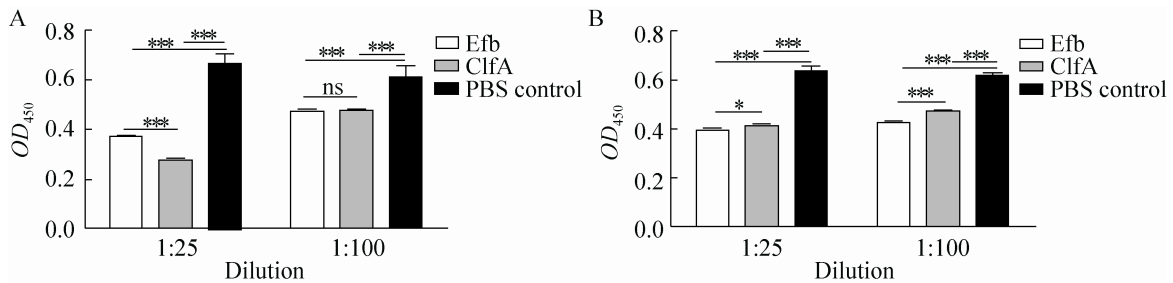


图 4 重组蛋白抗血清抑制金黄色葡萄球菌粘附 Fg (A) 和 Fn (B) 能力检测

Fig. 4 Fg (A) and Fn (B) adhesion inhibition assay of sera from rabbits immunized with Efb or ClfA protein. \* $P<0.05$ , \*\*\* $P<0.001$ , and ns means no significance, compared with mice immunized with PBS.

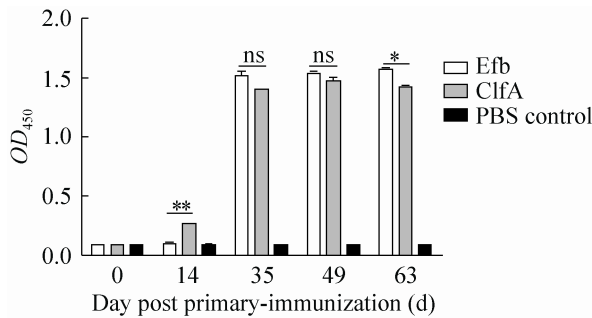


图5 Efb 与 ClfA 免疫小鼠抗体的变化

Fig. 5 Serum antibody changes in mice immunized with Efb or ClfA protein. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , and ns means no significance, compared with mice immunized with PBS.

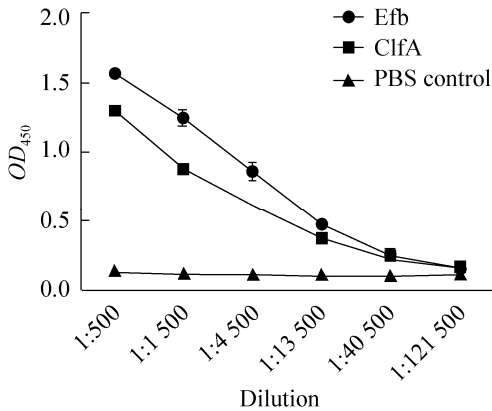


图6 ELISA 测定 Efb 与 ClfA 鼠抗血清效价

Fig. 6 Serum antibody titers of mice immunized with Efb or ClfA protein detected by ELISA.

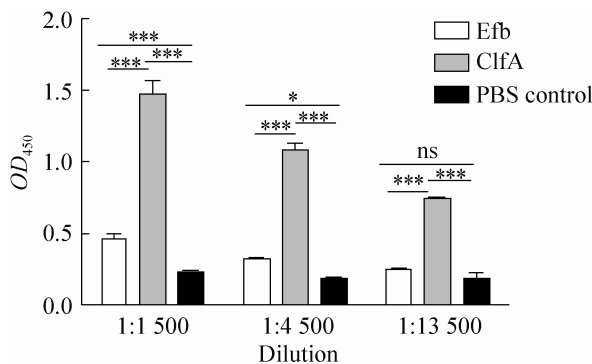


图7 重组蛋白抗血清结合金黄色葡萄球菌能力的 ELISA 检测

Fig. 7 Binding to *S. aureus* by the sera from rabbits immunized with Efb or ClfA by ELISA. \* $P < 0.05$ , \*\*\* $P < 0.001$ , and ns means no significance, compared with mice immunized with PBS.

## 2.7 不同粘附因子免疫小鼠的免疫保护率

免疫后 76 d, 选取牛源金黄色葡萄球菌菌株攻毒, 攻毒后观察小鼠死亡情况。结果显示, 攻毒后 72 h, 对照组全部死亡, Efb 免疫组的存活率为 83.3%, ClfA 免疫组的存活率为 100%。试验结果显示, Efb 与 ClfA 对金黄色葡萄球菌的攻击均具有保护作用, ClfA 的保护效力强于 Efb。

## 3 讨论

在金黄色葡萄球菌感染的早期, 粘附到上皮细胞和细胞外基质的能力决定金黄色葡萄球菌的定居和繁殖, 促进细菌对宿主组织的入侵<sup>[2]</sup>。金黄色葡萄球菌在感染过程中可表达多种粘附素分子, 这些粘附素分子可通过不同的机制与途径和细菌表面结合, 影响宿主对该菌的免疫识别, 从而对感染的结果产生重要影响。

研究发现, 金黄色葡萄球菌的持续感染与其能够产生多种与宿主的免疫系统相互作用的免疫调节分子有关<sup>[13]</sup>。补体系统是天然免疫的核心组分之一, 尤其是 C3 组分可在补体激活中及在天然免疫与获得性免疫的转换中发挥重要作用<sup>[14]</sup>。Efb 蛋白能够与补体中的 C3b 组分结合而抑制补体的激活, 进而影响补体介导的调理和吞噬作用<sup>[6]</sup>。研究已证实 Efb 蛋白为一种双功能蛋白, 其既能够通过 Fg 结合, 又能够抑制补体的激活<sup>[7-9]</sup>, 因此 Efb 不仅是金黄色葡萄球菌感染过程中的一个关键致病因子, 还是参与该菌免疫逃避的重要分子。

以往对 Efb 的研究多集中于其免疫后的抗体对补体的抑制功能, 对其免疫后抗体的粘附抑制和免疫保护特性进行的研究较少。此外在金黄色葡萄球菌众多粘附素分子中, ClfA 被认

为金黄色葡萄球菌粘附于宿主细胞最主要的粘附因子之一<sup>[15]</sup>, ClfA 的抗体可部分阻断产生相应粘附素的金黄色葡萄球菌对细胞的粘附<sup>[16]</sup>。Eric 等研制的针对金黄色葡萄球菌 ClfA 的 DNA 疫苗, 免疫小鼠可产生高效价的抗体, 却不能在腹腔攻毒时提供保护<sup>[17]</sup>。这提示我们对多种粘附因子的抗原性、抗粘附特性及免疫保护特性进行比较研究的必要性。

为深入认识 Efb 蛋白的免疫生物学特性及免疫保护效果, 本研究分别表达了分离自牛乳腺炎的金黄色葡萄球菌的粘附素 Efb 和 ClfA, 比较二者的粘附特性并将 Efb 免疫后抗体的粘附抑制和免疫保护力与 ClfA 进行对比, 从而评估 Efb 在免疫方面的潜力和价值。

本研究以重组蛋白 Efb 与 ClfA 分别免疫小鼠, 血清抗体检测结果表明 Efb 与 ClfA 在免疫小鼠后均可诱导小鼠产生高效价的抗体。对重组蛋白 Efb 和 ClfA 与 Fg 和 Fn 的结合活性比较研究结果显示, 两种重组蛋白均可结合 Fg, 重组蛋白 Efb 对 Fn 的结合活性大于蛋白 ClfA ( $P<0.01$ )。两种蛋白对比后结果表明, Efb 具有较强的 Fn 结合活性, 明显优于 ClfA 对 Fn 的结合。

在前期对 Efb 与 ClfA 研究的基础上<sup>[18-19]</sup>, 本研究进一步将 Efb 蛋白免疫后抗血清的抗粘附能力和免疫保护力与 ClfA 蛋白免疫组进行比较与分析, 重组蛋白 Efb 与 ClfA 抗血清均可显著抑制金黄色葡萄球菌对 Fg 和 Fn 的粘附 ( $P<0.01$ )。Efb 抗血清在抑制细菌对 Fn 的粘附方面优于 ClfA, 而 ClfA 抗血清在抑制细菌对 Fg 的粘附方面优于 Efb。

本研究结果还发现 ClfA 蛋白免疫小鼠血清抗体对细菌的亲合力高于 Efb 蛋白免疫组, 这

与 Melania 等的研究结果一致<sup>[20]</sup>。本研究免疫保护试验显示 ClfA 在免疫保护方面优于 Efb, 因此推测 Efb 免疫后的抗体对菌体识别能力低于 ClfA 免疫组, 可能导致了 Efb 免疫组攻毒后出现比 ClfA 免疫组保护率低。

本研究的对比结果表明 Efb 分子与 ClfA 一样, 也具有良好的免疫原性和较强的免疫保护力, 因此本研究结果提示 Efb 具有很好的潜力作为金黄色葡萄球菌疫苗的候选分子。

## REFERENCES

- [1] DeGraves FJ, Fetrow J. Economics of mastitis and mastitis control. *Vet Clin N Am-Food A*, 1993, 9(3): 421-434.
- [2] Patti JM, Allen BL, McGavin MJ, et al. MSCRAMM-mediated adherence of microorganisms to host tissues. *Annu Rev Microbiol*, 1994, 48(1): 585-617.
- [3] Dickinson RB, Nagel JA, McDevitt D, et al. Quantitative comparison of clumping factor- and coagulase-mediated *Staphylococcus aureus* adhesion to surface-bound fibrinogen under flow. *Infect Immun*, 1995, 63(8): 3143-3150.
- [4] Francois P, Vaudaux P, Lew PD. Role of plasma and extracellular matrix proteins in the physiopathology of foreign body infections. *Ann Vasc Surg*, 1998, 12(1): 34-40.
- [5] Noureldin ANM, Shkreta L, Talbot BG, et al. DNA immunization of dairy cows with the clumping factor A of *Staphylococcus aureus*. *Vaccine*, 2006, 24(12): 1997-2006.
- [6] Zhang X, Gao YP, Dong J, et al. Expression, purification of *Staphylococcus aureus* Efb protein and preparation of its functional antibody. *Bull Acad Mil Med Sci*, 2009, 33(6): 531-534 (in Chinese).  
张鑫, 高亚萍, 董洁, 等. 金黄色葡萄球菌 Efb 蛋白的表达、纯化及功能抗体的制备. *军事医学科学院院刊*, 2009, 33(6): 531-534.



- [7] Lee LY, Liang X, Hook M, et al. Identification and characterization of the C3 binding domain of the *Staphylococcus aureus* extracellular fibrinogen-binding protein (Efb). *J Biol Chem*, 2004, 279(49): 50710–50716.
- [8] Hammel M, Sfyroera G, Ricklin D, et al. A structural basis for complement inhibition by *Staphylococcus aureus*. *Nat Immunol*, 2007, 8(4): 430–437.
- [9] Palma M. Multiple Binding sites in the interaction between an extracellular fibrinogen-binding protein from *Staphylococcus aureus* and fibrinogen. *J Biol Chem*, 1998, 273(21): 13177–13181.
- [10] Mongodin E, Bajolet O, Cutrona J, et al. Fibronectin-binding proteins of *Staphylococcus aureus* are involved in adherence to human airway epithelium. *Infect Immun*, 2002, 70(2): 620–630.
- [11] Massey RC, Dissanayake SR, Cameron B, et al. Functional blocking of *Staphylococcus aureus* adhesins following growth in *ex vivo* media. *Infect Immun*, 2002, 70(10): 5339–5345.
- [12] Piroth L, Que YA, Widmer E, et al. The fibrinogen- and fibronectin-binding domains of *Staphylococcus aureus* fibronectin-binding protein A synergistically promote endothelial invasion and experimental endocarditis. *Infect Immun*, 2008, 76(8): 3824–3831.
- [13] Lowy MD. *Staphylococcus aureus* infections. *N Engl J Med*, 1998, 9(12): 520–532.
- [14] Lambris JD. The multifunctional role of C3, the third component of complement. *Trends Immunol*, 1988(12): 387–393.
- [15] Brouillette E. DNA immunization against the clumping factor A (ClfA) of *Staphylococcus aureus*. *Vaccine*, 2002, 20(17): 2348–2357.
- [16] Jiang XJ, Hao YQ, Zhang AR, et al. Cloning and expression of the region A of clumping factor A gene of *Staphylococcus aureus* and its immunological characteristics. *Chin Vet Sci*, 2009, 39(7): 626–631 (in Chinese).  
姜晓娟, 郝永清, 张爱荣, 等. 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.
- [17] Eric B, Pierre L, Lulzim S, et al. DNA immunization against the clumping factor A (ClfA) of *Staphylococcus aureus*. *Vaccine*, 2002, 20(17): 2348–2357.
- [18] Wei HN, Wang SM, Shao JG, et al. Cloning and sequence analysis of *Efb* gene of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine milk. *J Xinjiang Agric Univ*, 2012, 35(6): 469–473 (in Chinese).  
韦海娜, 王世民, 邵俊高, 等. 牛乳源金黄色葡萄球菌 *Efb* 基因的克隆与序列分析. *新疆农业大学学报*, 2012, 35(6): 469–473.
- [19] Shao JG, Su Y. Clone and sequence analysis of ClfA Gene of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine milk in Xinjiang area. *J Xinjiang Agric Univ*, 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粘附因子 *ClfA* 基因的克隆与序列分析. *新疆农业大学学报*, 2013, 36(2): 103–107.
- [20] Scarpa M, Piccinini R, Brun P, et al. Relationship between virulence factor genes in bovine *Staphylococcus aureus* subclinical mastitis isolates and binding to anti-adhesin antibodies. *J Dairy Res*, 2010, 77(2): 159–167.

(本文责编 郝丽芳)