

• 动物及兽医生物技术 •

牛乳源金黄色葡萄球菌 EsxA 蛋白的表达及免疫原性分析

易鸳鸯, 赵亚南, 马鹏睿, 李斌, 苏艳

新疆农业大学 动物医学学院, 新疆 乌鲁木齐 830052

易鸳鸯, 赵亚南, 马鹏睿, 等. 牛乳源金黄色葡萄球菌 EsxA 蛋白的表达及免疫原性分析. 生物工程学报, 2018, 34(5): 694–702.

Yi YY, Zhao YN, Ma PR, et al. Expression and immunogenicity analysis of EsxA protein of *Staphylococcus aureus* isolated from cow milk. Chin J Biotech, 2018, 34(5): 694–702.

摘要: 为分析牛乳源金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) EsxA 蛋白的免疫原性, 构建 EsxA-pET-28a 重组表达质粒, 重组质粒经诱导表达后进行 SDS-PAGE 和 Western blotting 鉴定。用纯化后重组 EsxA 蛋白免疫小鼠, 用间接 ELISA 检测免疫小鼠血清中的 IgG、IgG1 和 IgG2a 水平; 免疫小鼠经 *S. aureus* 菌株攻击后, 检测小鼠肝、脾、肾组织荷菌数和免疫保护率, 观察 *S. aureus* 菌株攻击后小鼠肝、脾、肾病理组织学变化。结果表明, 成功诱导表达了 EsxA 重组蛋白, 该重组蛋白免疫小鼠后血清抗体效价可达 1:900, 与对照相比, 重组蛋白免疫后可减少小鼠肝、脾、肾组织的荷菌数, 减轻这些脏器的病理损伤, 对免疫小鼠保护率达 75%。上述结果表明, 该重组 EsxA 蛋白具有良好的免疫原性。

关键词: 牛乳源金黄色葡萄球菌, EsxA 蛋白, 原核表达, 免疫原性

Expression and immunogenicity analysis of EsxA protein of *Staphylococcus aureus* isolated from cow milk

Yuanyang Yi, Ya'nan Zhao, Pengrui Ma, Bin Li, and Yan Su

College of Animal Medicine, Xinjiang Agricultural University, Urumqi 830052, Xinjiang, China

Abstract: To study the immunogenicity of EsxA protein of *Staphylococcus aureus*, the EsxA-pET-28a recombinant plasmid was constructed and the expression product was analyzed by SDS-PAGE and Western blotting after the positive recombinant plasmid was induced by IPTG. Mice were immunized with purified EsxA protein and then the IgG, IgG1 and IgG2a antibody

Received: October 24, 2017; **Accepted:** January 26, 2018

Supported by: National Natural Science Foundation of China (No. 31260222), Xinjiang Urumqi Autonomous Region Science and Technology Talents Training Project (No. qn2015y013), Urumqi Science and Technology Bureau Science and Technology Application Project (No. Y141210011).

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

国家自然科学基金 (No. 31260222), 新疆维吾尔自治区科技人才培养项目 (No. qn2015y013), 乌鲁木齐市科技局科技应用项目 (No. Y141210011) 资助。

were detected with indirect ELISA. Then the histopathological examination, bacteria loading and immune protection of immunized mice were studied after challenge with *S. aureus*. The recombinant protein EsxA was successfully induced and expressed. After immunization the EsxA specific antibody titer could reach 1:900. Bacteria loading and pathological damage of liver, spleen and kidney were reduced after immunization with EsxA in the immunized mice. The protection rate of immunized mice was 75%. In conclusion, EsxA protein has good immunogenicity.

Keywords: *Staphylococcus aureus*, EsxA protein, prokaryotic expression, immunogenicity

金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 是一种重要的人兽共患化脓性感染病原菌^[1], 近年来发现由该菌所致的感染呈逐年增加的趋势, 单纯依靠抗生素治疗由其引发的感染变得越来越困难。目前以 *S. aureus* 活的或灭活的菌体、细胞壁锚定蛋白、荚膜多糖、外毒素等为靶抗原的疫苗虽可显示出一定的保护作用, 但临床效果并不理想^[2-3]。

对于新的更有效抗原靶标的发掘和免疫反应类型的研究, 必将为有效的 *S. aureus* 疫苗的开发带来希望。*S. aureus* 的 ESAT-6 (Early secreted antigenic target-6 kDa) 分泌系统由 11 种蛋白组成, 可引发宿主严重炎症和细胞凋亡^[4-5]。EsxA 蛋白是该系统中一个主要的分泌蛋白, 是 *S. aureus* 的早期靶向蛋白, 可协助 *S. aureus* 的逃逸, 引起反复与持续性感染^[6]。EsxA 缺陷株可降低感染小鼠脓肿的形成, 该结果也提示 EsxA 蛋白在 *S. aureus* 致病过程中发挥着重要作用^[7-8]。研究表明, EsxA 蛋白可诱导宿主的 T 淋巴细胞增殖活化和细胞因子的产生^[9], Zhang 等^[10]研究发现, EsxA 蛋白可诱导小鼠产生 Th1 和 Th17 介导的免疫反应, 提示该蛋白在 *S. aureus* 疫苗研究中具有潜在发展前景^[11]。目前有关 *S. aureus* 的 EsxA 蛋白如何在机体与该菌的相互作用和免疫过程中发挥作用的机制尚不完全清楚。

为更深入、全面地认识和评价 EsxA 蛋白在 *S. aureus* 免疫过程的作用与特点, 本研究表达了牛乳源 *S. aureus* 的 EsxA 重组蛋白, 并以该重组蛋白免疫小鼠, 分析免疫后特异性 IgG 抗体亚型的变化规律和特征, 通过攻毒后比较分析不同组

织脏器的病理组织学变化、各组织荷菌数的变化及对小鼠的免疫保护效果, 综合评价了 EsxA 蛋白的免疫原性。该研究结果将为新型、高效、安全的 *S. aureus* 疫苗研发奠定基础。

1 材料与方法

1.1 质粒及菌株

牛乳源 *S. aureus* 分离株 GW20-2 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 α 、大肠杆菌 BL21(DE3)均由本室保存。

1.2 主要试剂

DL2000 DNA marker、DL5000 DNA marker、限制性内切酶 *EcoR* I、*Xho* I、*Taq* DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶购自 TaKaRa 公司; 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 显色液购自北京索莱宝科技有限公司。兔抗 *S. aureus* 多克隆抗体由本室用灭活 *S. aureus* 全菌免疫实验兔制备。

1.3 实验动物

18-20 g 雌性昆明白小鼠购自新疆维吾尔自治区动物疾病控制中心。将 42 只小鼠随机分为 3 组, 每组 14 只: EsxA 免疫组、灭活全菌免疫组和 PBS 对照组。

1.4 EsxA 基因的扩增及重组表达质粒的构建

根据 GenBank 中 *S. aureus* 的 EsxA 基因序列 (JOVN01000006.1) 设计引物, 上游引物 P1: 5'-GCGGAATTCATGGCAATGATTAAGATGAGT

CC-3' (下划线处为 *EcoR* I 酶切位点), 下游引物 P2: 5'-TAACTCGAGTTTGCAAACCGAAATTAT TAG-3' (下划线处为 *Xho* I 酶切位点)。预期扩增片段为 294 bp, 引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

以 *S. aureus* 分离株基因组为模板, 扩增获得目的基因 *EsxA*。反应体系: *Taq* 酶 0.25 μ L、*Taq* 缓冲液 II 2.5 μ L、25 mmol/L $MgCl_2$ 2.5 μ L、dNTPs (各 25 mmol/L) 4 μ L、上下游引物各 0.5 μ L、模板 DNA 1 μ L, 加 ddH₂O 至 25 μ L。反应程序: 94 $^{\circ}C$ 预变性 5 min; 94 $^{\circ}C$ 变性 45 s, 53 $^{\circ}C$ 退火 45 s, 72 $^{\circ}C$ 延伸 90 s, 30 个循环; 72 $^{\circ}C$ 延伸 15 min。*EsxA* 和 pET-28a(+) 载体分别经 *EcoR* I / *Xho* I 双酶切, 用 T4 DNA 连接酶连接, 连接产物转化大肠杆菌 BL21(DE3) 感受态细胞, PCR 鉴定后挑取阳性克隆送生工生物工程(上海)股份有限公司测序。

1.5 重组蛋白 EsxA 的诱导表达及纯化

将测序正确重组质粒转化至大肠杆菌 BL21 (DE3) 感受态细胞中, 挑取单菌落接种于含 50 μ g/mL 卡那霉素的 LB 液体培养基中 37 $^{\circ}C$ 振荡培养, 至 OD_{600} 为 0.6 时加入 IPTG 至终浓度 1 mmol/L, 30 $^{\circ}C$ 诱导表达 5 h, 离心收集菌体, 超声破碎菌体。用 Ni-NTA 亲和层析柱纯化重组蛋白质, 进行 SDS-PAGE 分析。

1.6 重组蛋白 EsxA 的 Western blotting 分析

将纯化后的 *EsxA* 蛋白转移到 NC 膜, 4 $^{\circ}C$ 过夜封闭, 用兔抗 *S. aureus* 多克隆抗体 (1:300 稀释) 为一抗, 37 $^{\circ}C$ 孵育 1 h, 清洗后用 HRP 标记山羊抗兔 IgG (1:1000 稀释) 为二抗, 37 $^{\circ}C$ 孵育 1 h, 清洗后用 DAB 显色液显色。

1.7 小鼠免疫

将纯化的 *EsxA* 蛋白按 1:1 体积比与弗氏佐剂乳化, 皮下注射免疫小鼠, 共免疫 2 次 (初次免疫加弗氏完全佐剂, 第 2 次免疫加弗氏不完全佐剂), *EsxA* 免疫组的剂量为 50 μ g, 灭活全菌组

免疫剂量为 0.6×10^7 CFU, PBS 对照组注射量为 100 μ L, 初次免疫后 3 周进行第 2 次免疫, 第 2 次免疫剂量同第一次免疫剂量。初次免疫后 0、14、35、42 d 断尾采血, 分离血清备用。

1.8 免疫小鼠抗体水平及抗体亚型的检测

用间接 ELISA 方法检测多克隆抗体亚型。用纯化后的 *EsxA* 重组蛋白包被 ELISA 板, 100 ng/孔, 4 $^{\circ}C$ 过夜。37 $^{\circ}C$ 封闭 1 h, 将梯度稀释的各免疫组小鼠血清加入孔中, 37 $^{\circ}C$ 作用 1 h, 加入 1:4000 稀释 HRP 标记的羊抗鼠 IgG、IgG2a、IgG1, 100 μ L/孔, 37 $^{\circ}C$ 作用 30 min, 洗涤 5 次, 用 TMB 显色 15 min, 最后用 1 mol/L 硫酸终止反应, 测定 OD_{450} 值。

1.9 小鼠攻毒试验

首次免疫后第 42 天, 对小鼠腹腔接种 *S. aureus* 分离株 GW20-2, 每只小鼠攻击菌量为 1×10^8 CFU, 攻毒后连续 14 d 观察并记录小鼠的发病和死亡情况, 并计算保护率。

1.10 病理组织学观察

攻毒后第 10 天, 分别取各试验组小鼠肝、脾和肾组织置于 10% 福尔马林溶液中固定, 制作石蜡切片, HE 染色, 观察各脏器的病理组织学变化。

1.11 菌体载量检测

攻毒后第 3 天, 处死实验组及空白组小鼠各 3 只, 将死亡小鼠无菌条件下剖检取出其肝、脾和肾并称其重量; 加入灭菌生理盐水进行充分研磨, 梯度稀释后涂布于固体培养基, 每个稀释度 3 个重复, 37 $^{\circ}C$ 倒置培养 12 h; 对培养结果进行细菌计数。

2 结果与分析

2.1 重组蛋白的表达及纯化

SDS-PAGE 结果显示, 转化后大肠杆菌 BL21 (DE3) 经 IPTG 诱导后在 16.7 kDa 左右处有明显的蛋白带 (图 1), 大小与预期一致, 纯化的结果也表明 *EsxA* 重组蛋白表达成功。

2.2 重组蛋白的 Western blotting 分析

将纯化的 EsxA 重组蛋白进行 Western blotting 分析, 结果显示诱导表达并纯化的 EsxA 重组蛋白能够与兔抗 *S. aureus* 血清发生特异性反应 (图 2), 表明该重组蛋白有良好的抗原性。

2.3 EsxA 免疫小鼠后的抗体检测

2.3.1 IgG 的检测

用间接 ELISA 对小鼠第 2 次免疫后抗体的检测结果表明, 免疫组小鼠的 EsxA 特异性抗体水平与对照组相比明显升高 ($P < 0.01$), 且免疫后抗体随免疫时间增加呈上升趋势 (图 3A), EsxA 免

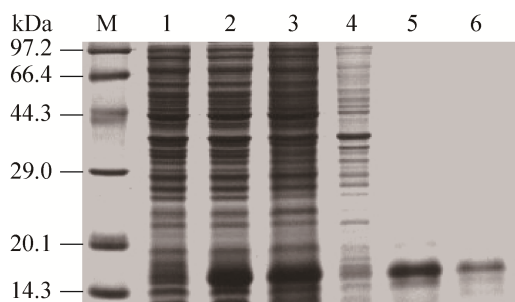


图 1 重组蛋白 EsxA 的 SDS-PAGE 分析

Fig. 1 SDS-PAGE analysis of recombinant protein EsxA. M: protein marker; 1: recombinant bacterial extract before induction; 2: recombinant bacterial extract after induction; 3: supernatant after ultrasonic disruption; 4: pellets after ultrasonic disruption; 5-6: purified recombinant protein.

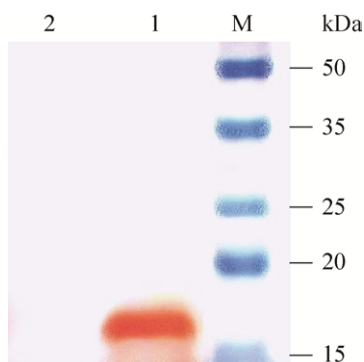


图 2 重组蛋白 EsxA 表达后的 Western blotting 分析

Fig. 2 Western blotting analysis of the expressed recombinant protein EsxA. M: prestained protein marker; 1: purified protein EsxA; 2: negative control.

疫组诱导的抗体水平低于灭活全菌免疫组, 显示其具有一定的抗体诱导能力 (图 3B)。

2.3.2 小鼠血清抗体亚型的检测

ELISA 检测结果表明, 免疫后各免疫组小鼠血清中都产生了特异性抗体 IgG1 和 IgG2a。EsxA 免疫组小鼠血清中的抗体亚型以 IgG1 为主, 且 IgG1 抗体水平显著高于灭活全菌免疫组及对照组 (图 4, $P < 0.05$)。

2.3.3 小鼠免疫保护力检测

首次免疫后第 42 天, 以 *S. aureus* 菌株 GW20-2 对小鼠攻毒并观察 14 d。结果显示, PBS 对照组全部死亡, 灭活全菌免疫组的保护率为 87.5%, EsxA 免疫组的保护率为 75% (图 5)。

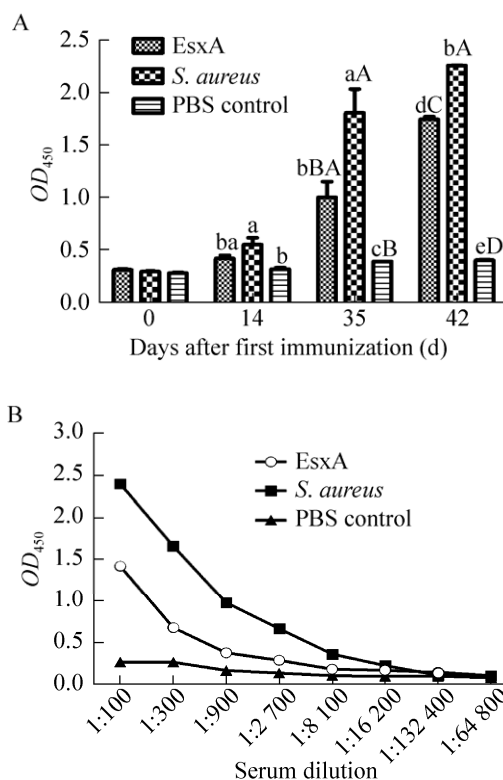


图 3 免疫小鼠的血清 IgG 检测

Fig. 3 Serum IgG detection of immunized mice. (A) Antibody level changes of immunized mice. (B) Serum antibody titers detection of immunized mice. Different minuscule letters means significant difference $P < 0.05$, Different capital letters means extremely significant difference, $P < 0.01$.

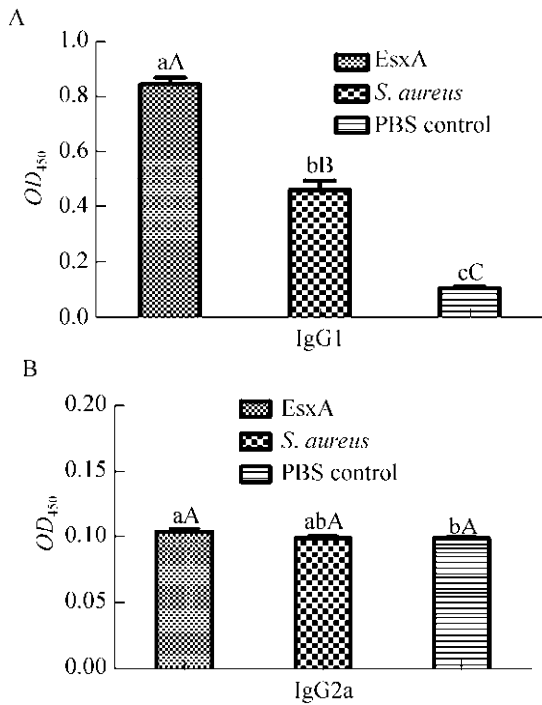


图4 免疫小鼠血清抗体亚型的检测结果

Fig. 4 Detection results of serum antibody subtype levels of immunized mice. (A) Detection of serum IgG1 of different immunization groups. (B) Detection of serum IgG2a of different immunization groups. Different minuscule letters means significant difference $P < 0.05$, Different capital letters means extremely significant difference, $P < 0.01$.

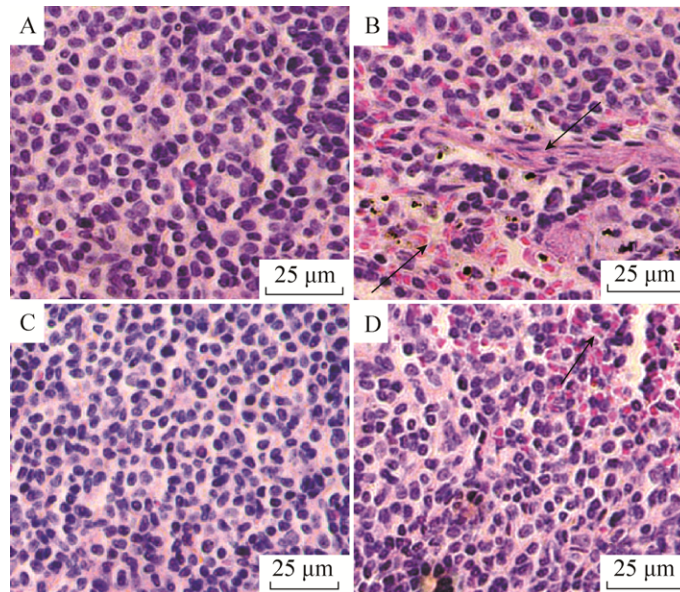


图6 各组小鼠脾脏病理组织学变化 (HE 染色, 400×)

Fig. 6 Histological changes of spleens from mice of various groups (HE staining, 400×). (A) No challenge control group. (B) *S. aureus* challenge group. (C) Recombinant protein EsxA immunized group. (D) Inactivated whole bacteria immunization group.

2.3.4 病理组织学观察

攻毒后第 10 天对小鼠不同组织进行病理组织学观察。

脾脏：与未攻毒对照组相比，攻毒对照组小鼠脾脏内出现了结缔组织增生和出血现象，可观察到红细胞的群集。灭活全菌免疫组小鼠的脾脏变化不明显，EsxA 免疫组小鼠的脾脏出现出血 (图 6)。

肾脏：与未攻毒对照组相比，攻毒组小鼠出

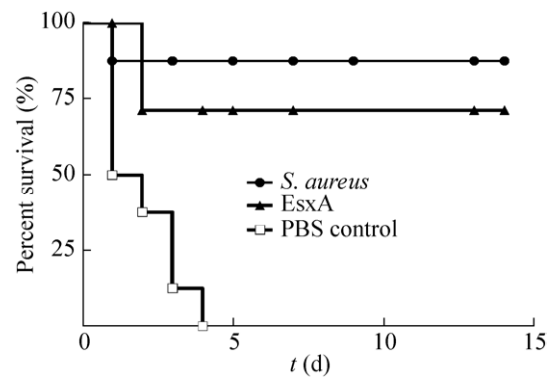


图5 免疫小鼠攻毒保护力检测

Fig. 5 Detection of survival rate of immunized mice following challenge.

现了明显的肾间质充血、水肿，肾小管水肿。灭活全菌免疫组和 EsxA 免疫组小鼠肾间质充血、水肿现象有所减轻(图 7)。

肝脏：与未攻毒对照组相比，攻毒组小鼠出

现了肝脏胆汁外泄、肝细胞颗粒变性、肝细胞溶解、坏死。灭活全菌免疫组和 EsxA 免疫组小鼠肝脏胆汁外泄、肝细胞颗粒变性、肝细胞溶解、坏死有减轻，病理变化有明显差异(图 8)。

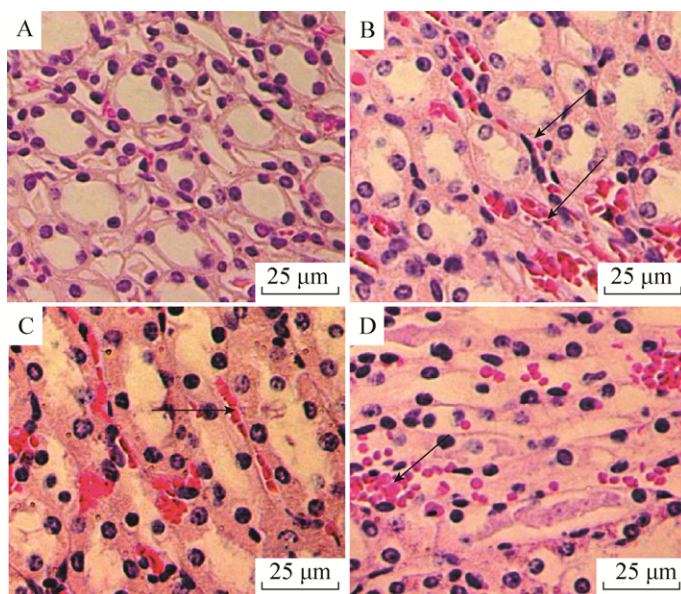


图 7 各组小鼠肾脏病理组织学变化(HE 染色, 400×)

Fig. 7 Histological changes of kidneys from mice of various groups (HE staining, 400×). (A) No challenge control group. (B) *S. aureus* challenge group. (C) Recombinant protein EsxA immunization group. (D) Inactivated whole bacteria immunization group.

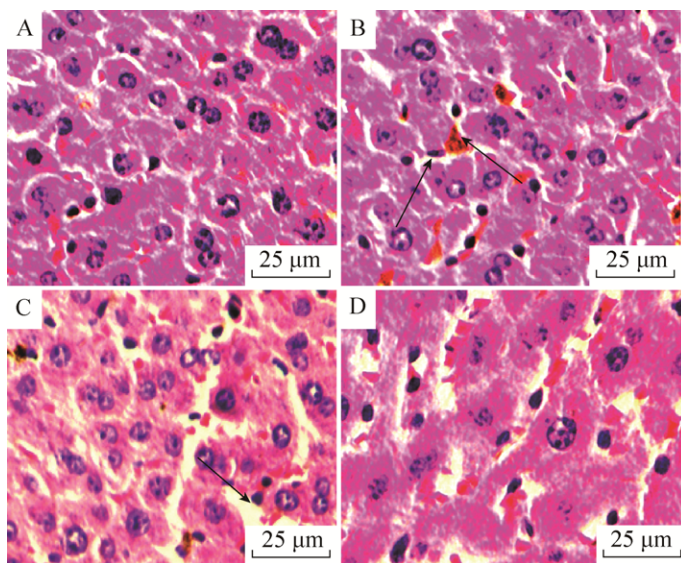


图 8 各组小鼠肝脏病理组织学变化 (HE 染色, 400×)

Fig. 8 Histological changes of livers from mice of various groups (HE staining, 400×). (A) No challenge control group. (B) *S. aureus* challenge group. (C) Recombinant protein EsxA immunized group. (D) Inactivated whole bacteria immunization group.

2.3.4 荷菌数检测

对小鼠攻毒后第3天,检测小鼠脾脏、肾脏和肝脏组织荷菌数(图9)。结果表明,灭活全菌免疫组和 EsxA 免疫组小鼠脾脏、肾脏和肝脏组织荷菌数均显著低于对照组,EsxA 免疫组小鼠脾脏组织荷菌数明显低于全菌免疫组,该结果与脾脏的病理组织学观察结果一致。

3 讨论

高致病性的金黄色葡萄球菌威胁人类和动物的健康,不仅可导致严重的感染,在世界范围内造成巨大的损失,且该类感染具有治愈率低、反复发生等特点^[12]。在 *S. aureus* 新型疫苗研发中,抗原的选择非常重要。*S. aureus* 的致病性由许多不同因子决定^[13],以往对 *S. aureus* 研究的过程中已证明了该菌的多种黏附因子在该菌感染时和免疫逃避中发挥重要作用,这些黏附分子在免疫后也可诱导机体产生抵抗 *S. aureus* 感染的抗体^[14]。以往实验证据也表明,在对实验动物以 *S. aureus* 攻击时,单一抗原往往不能提供完全的保护^[15-16]。基于 *S. aureus* 黏附因子的研究表明,应当重视 *S. aureus* 多种抗原成分的研究应用,同时注意其免疫反应的类型,例如对 Th17 和 Th1 介导的免疫反应的诱导与调节^[17-18]。

EsxA 是 *S. aureus* 的 ESX 系统的一个早期蛋白^[19],是该菌的重要毒力因子^[20-21],已被证明与

该菌感染过程中的脓肿形成有关^[22]。近期研究发现 *S. aureus* 分泌的 EsxA 是与结核分枝杆菌 ESAT-6 序列同源的一种蛋白^[23]。目前结核杆菌的 ESAT-6、CFP-10 已被作为非常有潜力的抗结核亚单位疫苗进入临床测试,并基于这两种分子形成了商业化的检测技术^[24]。国内学者将结核分枝杆菌 mpt59 和 EsxA 蛋白融合表达,并将该融合蛋白初步用于结核患者的快速诊断,证明其诊断结核的敏感性为 97.8%,特异性为 100%^[25]。

本研究成功表达与纯化了牛乳源 *S. aureus* 的 EsxA 蛋白,该重组蛋白可与该菌阳性血清特异性结合,免疫小鼠可有效诱导特异性抗体,抗体效价可达 1:900,表明该蛋白具有良好的免疫原性和反应原性。本研究中我们将 EsxA 蛋白与灭活全菌抗原分别进行免疫进行对比后发现,EsxA 蛋白免疫可在该菌对脾脏的感染定植方面表现出优于灭活全菌免疫的特点,也进一步证明了对该菌的有效免疫中多种抗原成分应用的必要性。

Zhang 等^[9]发现重组的 EsxA 和 EsxB 蛋白用于免疫小鼠,可显著提高小鼠对 *S. aureus* 的免疫力,且证明了其可诱导 Th17(T-helper 17)及 IL17(Interleukin 17)介导的免疫反应。本研究中用 EsxA 免疫小鼠后分析其诱导的抗体类型,结果表明,EsxA 重组蛋白和灭活全菌免疫组小鼠 IgG1 的抗体水平显著高于 IgG2a 的抗体水平,EsxA 重组蛋白和灭活全菌免疫小鼠后主要诱导

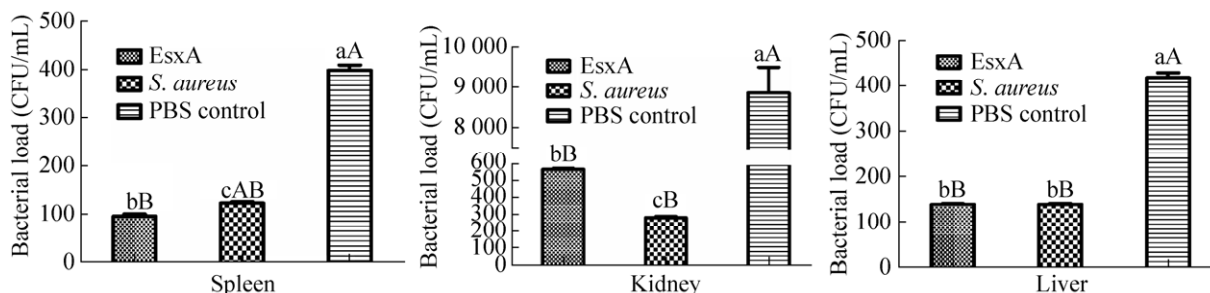


图9 各组小鼠的脾、肾和肝脏组织荷菌数检测

Fig. 9 Detection of bacterial loads from mice of various groups.

产生了以 Th2 为主的体液免疫应答, EsxA 蛋白在诱导 IgG1 型抗体反应方面优于灭活全菌疫苗。本研究的结果也表明, EsxA 重组蛋白也能诱导一定水平的 IgG2a 抗体的产生, 但与对照组差异不显著。

Wang 等^[20]推测, EsxA 具有开发为预防 *S. aureus* 感染疫苗的潜力, 其可能成为针对该菌感染非常有效的疫苗靶标。本研究中我们发现, 用 EsxA 免疫后攻毒, 小鼠肝、脾和肾脏的菌体定植均低于未免疫对照组, 尤其是小鼠脾脏中 *S. aureus* 的计数显著低于灭活全菌免疫组, 该结果表明 EsxA 是一种有潜力和有价值的免疫靶标。尽管本研究中 EsxA 蛋白诱导特异 IgG1 型抗体水平灭活全菌疫苗, 但免疫后的攻毒保护力却低于灭活全菌疫苗, 我们对该研究结果分析认为, 在 *S. aureus* 免疫中可能非抗体依赖的免疫保护和多种抗原成分的参与会发挥重要的保护作用, 这一点与 Misstear 等^[26]的论点是一致的。

本研究中 EsxA 免疫组与灭活全菌免疫组相比, 在免疫保护力上虽未显出明显优势, 但具有能控制疾病的发生和严重程度的独特优势。

REFERENCES

- [1] Zhou H, Li HP. The progress of *Staphylococcus aureus* surface proteins. Lett Biotechnol, 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.
- [2] Yang YL, Yi SQ, Chen W. Vaccines and immunotherapeutic approaches against *Staphylococcus aureus*. Prog Microbiol Immunol, 2012, 40(2): 47–52 (in Chinese).
杨益隆, 易绍琼, 陈薇. 金黄色葡萄球菌疫苗及其免疫治疗进展. 微生物学免疫学进展, 2012, 40(2): 47–52.
- [3] Chen YG, Yang DQ. Research progress of *Staphylococcus aureus* vaccine. Chin J Biol, 2010, 23(11): 1271–1274 (in Chinese).
陈益国, 阳大庆. 金黄色葡萄球菌疫苗的研究进展. 中国生物制品学杂志, 2010, 23(11): 1271–1274.
- [4] Sundaramoorthy R, Fyfe PK, Hunter WN. Structure of *Staphylococcus aureus* EsxA suggests a contribution to virulence by action as a transport chaperone and/or adaptor protein. J Mol Biol, 2008, 383(3): 603–614.
- [5] Otto M. *Staphylococcus aureus* toxins. Curr Opin Microbiol, 2014, 17: 32–37.
- [6] Anderson M, Aly KA, Chen YH, et al. Secretion of atypical protein substrates by the ESAT-6 secretion system of *Staphylococcus aureus*. Mol Microbiol, 2013, 90(4): 734–743.
- [7] Kneuper H, Cao ZP, Twomey KB, et al. Heterogeneity in ess transcriptional organization and variable contribution of the Ess/Type VII protein secretion system to virulence across closely *Staphylococcus aureus* strains. Mol Microbiol, 2014, 93(5): 928–943.
- [8] Zhou HQ, Du H, Zhang HF, et al. EsxA might as a virulence factor induce antibodies in patients with *Staphylococcus aureus* infection. Braz J Microbiol, 2013, 44(1): 267–271.
- [9] Bagnoli F, Fontana MR, Soldaini E, et al. Vaccine composition formulated with a novel TLR7-dependent adjuvant induces high and broad protection against *Staphylococcus aureus*. Proc Natl Acad Sci USA, 2015, 112(12): 3680–3685.
- [10] Zhang BZ, Hua YH, Yu B, et al. Recombinant ESAT-6-like proteins provoke protective immune responses against invasive *Staphylococcus aureus* disease in a murine model. Infect Immun, 2015, 83(1): 339–345.
- [11] Sørensen AL, Nagai S, Houen G, et al. Purification and characterization of a low-molecular-mass T-cell antigen secreted by *Mycobacterium tuberculosis*. Infect Immun, 1995, 63(5): 1710–1717.
- [12] Schukken YH, Leslie KE, Barnum DA, et al. Experimental *Staphylococcus aureus* intramammary challenge in late lactation dairy cows: quarter and cow effects determining the probability of infection. J Dairy Sci, 1999, 82(11): 2393–2401.
- [13] Stranger-Jones YK, Bae T, Schneewind O. Vaccine assembly from surface proteins of *Staphylococcus aureus*. Proc Natl Acad Sci USA, 2006, 103(45): 16942–16947.
- [14] Shao JG, Zhang BJ, Li SC, et al. Comparison and

- analysis of the biological of activity antiserum after immunizing with expressed different domains of *Staphylococcus aureus* adhes in FnBPA isolated from bovine milk. Chin J Animal Veter Sci, 2015, 46(7): 1208–1214 (in Chinese).
- 邵俊高, 张宝江, 李善春, 等. 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.
- [15] Jiang HJ, Su Y, Shen Y. Characterization of antiserum after co-immunized with adhesins expressing ClfA, FnBPA-A and FnBPA-BCD of *Staphylococcus aureus*. Acta Microbiol Sin, 2015, 55(10): 1343–1349 (in Chinese).
- 姜慧娇, 苏艳, 申煜. 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. 微生物学报, 2015, 55(10): 1343–1349.
- [16] Eric B, Pierre L, Lulzim S, et al. DNA immunization against the clumping factor A (ClfA) of *Staphylococcus aureus*. Vaccine, 2002, 20(17/18): 2348–2357.
- [17] Proctor RA. Challenges for a universal *Staphylococcus aureus* vaccine. Clin Infect Dis, 2012, 54(8): 1179–1186.
- [18] Kumar P, Chen K, Kolls JK. Th17 cell based vaccines in mucosal immunity. Curr Opin Immunol, 2013, 25(3): 373–380.
- [19] Korea CG, Balsamo G, Pezzicoli A, et al. *Staphylococcal* Esx proteins modulate apoptosis and release of intracellular *Staphylococcus aureus* during infection in epithelial cells. Infect Immun, 2014, 82(10): 4144–4153.
- [20] Wang YN, Hu M, Liu Q, et al. Role of the ESAT-6 secretion system in virulence of the emerging community-associated *Staphylococcus aureus* lineage ST398. Sci Rep, 2016, 6: 25163.
- [21] Sundaramoorthy R, Fyfe PK, Hunter WN. Structure of *Staphylococcus aureus* EsxA suggests a contribution to virulence by action as a transport chaperone and/or adaptor protein. J Mol Biol, 2008, 383(3): 603–614.
- [22] Burts ML, Williams WA, Debord K, et al. EsxA and EsxB are secreted by an ESAT-6-like system that is required for the pathogenesis of *Staphylococcus aureus* infections. Proc Natl Acad Sci USA, 2005, 102(4): 1169–1174.
- [23] Burts ML, Dedent AC, Missiakas DM. Esa C substrate for the ESAT-6 secretion pathway and its role in persistent infections of *Staphylococcus aureus*. Mol Microbiol, 2008, 69(3): 736–746.
- [24] Li H, Xu JJ, Chen W. The structure and function of *M. tuberculosis* RD-1 region encoded proteins. Prog Biochem Biophys, 2009, 36(10): 1260–1266 (in Chinese).
- 李浩, 徐俊杰, 陈薇. 结核分枝杆菌 RD-1 区编码蛋白的结构和功能. 生物化学与生物物理进展, 2009, 36(10): 1260–1266.
- [25] Shi J, Zhu YK, Zheng DW, et al. Prokaryotic expression and immunogenicity analysis of *mpt59* and *esxA* fusion gene from *Mycobacterium tuberculosis*. J Zhengzhou Univ: Med Sci, 2015, 50(6): 761–765 (in Chinese).
- 石洁, 朱岩昆, 郑丹薇, 等. 结核分枝杆菌 *mpt59* 和 *esxA* 融合基因编码蛋白的原核表达及免疫原性观察. 郑州大学学报, 2015, 50(6): 761–765.
- [26] Misstear K, McNeela EA, Murphy AG, et al. Targeted nasal vaccination provides antibody-independent protection against *Staphylococcus aureus*. J Infect Dis, 2014, 209(9): 1479–1484.

(本文责编 陈宏宇)