

## Zfb 株牛源金黄色葡萄球菌生物学特性

赫娜<sup>1,2</sup> 王长法<sup>1\*</sup> 杨宏军<sup>1</sup> 何洪彬<sup>1\*</sup> 杨少华<sup>1</sup> 王立群<sup>2</sup> 高运东<sup>1</sup> 仲跻峰<sup>1</sup>

(1. 山东省农科院奶牛研究中心 山东 济南 250100)

(2. 东北农业大学 黑龙江 哈尔滨 150030)

**摘要:** 从临床患病牛乳样内分离出的金黄色葡萄球菌  $\beta$ -溶血型致病菌株, 命名为 zfb, 运用微生物学及现代分子生物学手段检测了该菌株的生物学特性, 以金葡菌 ATCC 25923 为对照株。结果表明, 金黄色葡萄球菌 zfb 不产生脂酶, 有抗药性, 在改良型血清软琼脂培养基中观察荚膜形态, 活体内和体外均显现散布型状态。同时, 以昆明小白鼠为动物模型, 测定了半数致死量和器官侵袭力。金黄色葡萄球菌牛源分离株 zfb 的半数致死率为  $10^{-4.33}/\text{mL}$ , 参考菌株 ATCC 25923 菌株的半数致死率为  $10^{-2.5}/\text{mL}$ 。对牛源金黄色葡萄球菌 zfb 的特性检测使其成为疫苗制备的候选者, 为进一步研究其致病机理及制备减毒活疫苗奠定了基础。

**关键词:** 金黄色葡萄球菌,  $\beta$ -溶血素, 半数致死量

## Characterization and Investigation of *Staphylococcus aureus* zfb Isolates from Bovine Mastitis

HE Na<sup>1,2</sup> WANG Chang-Fa<sup>1\*</sup> YANG Hong-Jun<sup>1</sup> HE Hong-Bin<sup>1\*</sup> YANG Shao-Hua<sup>1</sup>  
WANG Li-Qun<sup>2</sup> GAO Yun-Dong<sup>1</sup> ZHONG Ji-Feng<sup>1</sup>

(1. Research Center of Dairy Cattle, Shandong Academy of Agricultural Science, Jinan, Shandong 250100, China)

(2. Northeast Agricultural University, Harbin, Heilongjiang 150030, China)

**Abstract:** A *Staphylococcus aureus* strain, designated zfb, was isolated from a clinical bovine mastitis case of a dairy cow. *Staphylococcus aureus* zfb can have resistance to methicillin and no lipase contrast by ATCC 25923. The production of the capsule was assessed by the diffuse colonial morphology in serumsoft agar. A mouse infection model was used to determine the LD<sub>50</sub> and the invasiveness of SA zfb. The LD<sub>50</sub> of SA 25923 to experimental mice was  $10^{-2.5}/\text{mL}$ , and the LD<sub>50</sub> of SA zfb to experimental mice was  $10^{-4.33}/\text{mL}$ . The purpose to detect characteristics of SA zfb makes it an interesting candidate for the preparation and assay of an avirulent mutants against staphylococcal infections and further investigate on pathogenic mechanism.

**Keywords:** *Staphylococcus aureus*, Beta hemolysin, LD<sub>50</sub>

奶牛乳腺炎是一种常见病、多发病, 该病既能导致奶牛产奶量下降和牛奶品质降低, 又能影响奶

牛的发情和妊娠, 严重的因失去泌乳能力而被淘汰, 是造成奶牛业经济损失最严重的疾病之一<sup>[1]</sup>。目前

金黄色葡萄球菌(以下简称金葡菌)是许多国家最常见和最重要的乳腺炎致病菌,其导致的经济损失最大<sup>[2]</sup>,其流行率约在 5%~50%之间<sup>[3]</sup>。细菌的致病性主要取决于其毒力因子<sup>[4]</sup>,已有研究发现从患乳腺炎的牛体内分离的金葡菌菌株可表达 30 多种毒力因子<sup>[5]</sup>,主要包括溶血毒素(Hemolysin, HL),凝固酶, CAMP 因子、耐热核酸酶、荚膜多糖、脂酶、透明质酸酶、蛋白 A,杀白细胞素,肠毒素,毒性休克综合症毒素因子-1 等。其中溶血素和杀白细胞素能作用于奶牛乳腺上皮细胞,格外引起人们的关注<sup>[6]</sup>。但是否从奶牛乳腺炎分离出来的菌株均能产生这些毒力因子,哪些毒力因子影响金葡菌的侵袭力,国内外报道的较少。

近几年我们对山东济南及其周边地区规模化牛场进行了奶牛乳腺炎流行病学调查,初步发现从山东省患有乳腺炎的荷斯坦牛的牛乳中分离鉴定出的病原菌以金葡菌为主,而从严重临床型乳腺炎患牛乳汁中分离到的金葡菌 80%以上为  $\beta$ -溶血型菌株,我们推测  $\beta$ -溶血型金葡菌菌株可能致病性更强,造成的临床危害更大。同时我们还借助传统的生化鉴定方法分离鉴定了多株金葡菌菌株,其中 zfb 株能表现明显的  $\beta$  溶血现象。因此,本实验以从严重临床型乳腺炎患牛乳汁中分离鉴定的金葡菌山东分离株(zfb)为材料,借助微生物学分析方法及现代分子生物学技术进一步分析其各种毒力因子,深入分析其生物学特性,并以小鼠为模型比较了其与传统金葡菌菌株的毒力差异,为未来制备金葡菌弱毒株、开展其致病机理与免疫机理的研究奠定基础。

## 1 材料与方 法

### 1.1 试验材料

细菌菌株:金葡菌 zfb(*Staphylococcus aureus* zfb, SA zfb)菌株,本研究所保存的从临床乳腺炎牛乳中分离出的金葡菌分离株;参考菌株,金葡菌 ATCC 25923 和无乳链球菌(*Str. agalactiae* CVCC 1886)购自中国兽医药品监察所。

培养基:营养肉汤、营养琼脂、M-H 琼脂平板、高盐甘露醇发酵培养基、DNA 酶培养基、甲苯胺兰 DNA 培养基、Baird-Parker 培养基等均购自杭州天和微生物试剂有限公司;血琼脂培养基、油脂培养基、改良型 110 血清琼脂培养基(m110-SSA)等均为本研究室按常规方法自制。

试剂:药敏片等均购自杭州天和微生物试剂有限公司。

试验动物:雌性 BALB/c 小鼠,21 d~25 d,购自山东大学实验动物中心。

### 1.2 试验方法

1.2.1 微生物学检测:溶血素、甘露醇利用和脂酶检测。SA zfb 在营养肉汤培养液中 37°C 摇床培养 12 h,分别划线于血琼脂培养基、甘露醇发酵培养基、油脂培养基来检测溶血素、甘露醇利用和脂酶,37°C 恒温箱中培养 18 h,以 ATCC 25923 菌株为对照。

耐热核酸酶检测。运用甲苯胺-DNA 琼脂培养基测定试验菌株耐热核酸酶活性。将 SA zfb 与 ATCC 25923 菌株接种肉汤培养基,37°C 培养 18 h 后,100°C 水浴 15 min,冷却后取 50  $\mu$ L 菌液加入预先打孔的甲苯胺-DNA 琼脂平板孔内,37°C 放置 4 h,观察结果,从蓝色变成粉红色且粉红色圈直径大于 5 mm 者为阳性。DNA 酶(链道酶)检测。将被检细菌划线接种到脱氧核糖核酸平板培养基上,37°C 培养过夜,在平板表面加一层 1 mol/L 盐酸,厚度使菌落浸没,在菌落周围出现清晰,透明环者为阳性。

血浆凝固酶测定。试管中加入 0.5 mL 兔血浆(EDTA 为抗凝剂),再加入等量金葡菌肉浸液 肉汤 24 h 培养物充分混匀,37°C 水浴箱内培养,每 0.5 h 观察 1 次,连续观察 6 h,出现凝固,即将小试管倾斜或倒置时,内容物不流动,判为阳性。同时做阴性对照。凝集因子测定。取生理盐水滴于载玻片上,被检细菌菌落在生理盐水中研磨成浓的细菌悬液,加入一滴未稀释的兔血浆,以等量生理盐水为对照,迅速摇动,观察结果。若加血浆处迅速出现凝固颗粒,而对照中未出现凝固颗粒者,为阳性。若超过两分钟后始出现凝固颗粒者不计为阳性。

CAMP 溶血现象检测。参照 Litwin 等<sup>[7]</sup>方法通过 CAMP 反应检测试验金葡菌菌株是否产生  $\beta$  溶血毒素。将能产生 CAMP 因子的无乳链球菌参考菌株(*Str. agalactiae* CVCC 1886)和试验菌株垂直划线于血琼脂平板上,37°C 恒温培养 18 h~24 h。观察它们是否产生协同溶血现象。

荚膜检测。利用改良型 110 金葡菌培养基和血清琼脂培养基,配制成改良后的金葡菌 110 号血清琼脂培养基(m110-SSA)。向 m110-SSA 培养基中接种浓度小于 50 CFU/mL 的菌液,用涡旋混合器

剧烈混合,覆盖 2%琼脂,然后在 37°C 下培养 18 h~24 h。根据金葡菌在 m110-SSA(pH 6.0)中的菌落形态来估计荚膜的体外(试管内)诱导产物<sup>[8]</sup>。用弥散(D)或者紧密(C)来评价菌落形态,出现密集的为紧密菌落,表现为弥散状态时为弥散菌落。在活体中英膜产物测定用 m110-SSA(pH 7.0),采样于接种 8 h 的小鼠腹膜,回收在 9 mmol/L NaCl 中。

**耐药性检测。**采用 K-B 法检测菌株耐药性,在 M-H 琼脂中加入 2%~4% NaCl 溶液,35°C 培养 24 h,采用较稳定的头孢西丁纸片代替甲氧西林,如抑菌环 19 mm,判定为耐甲氧西林葡萄球菌 MRSA 株 (European Antimicrobial Resistance Surveillance System, 2002)。

**1.2.2 双重 PCR 法检测  $\alpha$ 、 $\beta$  溶血型:**引物设计:根据公开发表的序列设计引物,并由上海生物工程公司合成。引物如下:

$\alpha$ F1: 5'-GAAGTCTGGTGAAAACCTGA-3';  $\alpha$ F2: 5'-TGAATCCTGTCGCTAATGCC-3'。 $\beta$ T1: 5'-CAATAGTGCCAAAGCCGAAT-3';  $\beta$ T2: 5'-TCCAGCACCA CAACGAGAAT-3'。溶菌酶预先处理 1 h 后,酚、氯仿法提取金葡菌 DNA。扩增的目的基因大小分别为:  $\alpha$ -HL 为 704 bp,  $\beta$ -HL 为 496 bp。25  $\mu$ L PCR 反应体系: 10 $\times$ PCR buffer 2.5  $\mu$ L, Mg<sup>2+</sup> 1.5  $\mu$ L, dNTPs 0.5  $\mu$ L, Taq 酶 0.5  $\mu$ L, 引物各 1  $\mu$ L, 模板 2  $\mu$ L, 无菌双蒸水 14  $\mu$ L。扩增条件为: 94°C 3 min; 94°C 1 min, 60°C 45 s, 72°C 1 min, 30 个循环; 72°C 10 min。

**1.2.3  $\beta$ -溶血素基因全长序列扩增:**根据 GenBank 上发表的金葡菌  $\beta$ -溶血素(*hlyB*)基因序列(Accession number NC\_007622)以及酶切位点分析,在其开放阅读框(ORF)两侧共 993 bp 设计一对引物。上游引物: 5'-GCGGATCCATGGTGAAAAAACAAT-3' 含一个 BamH I 酶切位点,下游引物: 5'-GCAAGCT ICTATTTACTATAGGCTTTGAT-3' 含一个 Hind III 酶切位点。PCR 产物与 pMD18-T 载体连接,转化 *E. coli* JM109, 提取质粒经 BamH I 和 Hind III 双酶切后琼脂糖电泳鉴定。鉴定阳性的克隆菌由上海生物工程技术有限公司测序。

**1.2.4 半数致死量测定:**将试验菌株加入营养肉汤液中 37°C 培养 72 h, 4000 rpm 离心 10 min, 重悬于营养肉汤中,使其浓度约为 10<sup>10</sup> CFU/mL。21 d~25 d 实验用小白鼠, 6 只为一组, 共 6 组, 分别通过腹腔注射 1 mL 不同浓度菌液(10<sup>4</sup> CFU/mL~10<sup>10</sup> CFU/mL)。

72 h 后记录数据。采用 Karber 法,按公式  $\text{LogLD}_{50} = L+d(S-0.5)$  计算试验菌株半数致死量(LD<sub>50</sub>), 式中 LD<sub>50</sub> 用对数表示, L 为细菌最低稀释度的对数; d 为组距, 即稀释系数; S 为死亡比值的和。

**1.2.5 小鼠器官侵袭力:**将试验菌株加入营养肉汤液中 37°C 培养 18 h, 测 OD<sub>640</sub> 值, 调整菌浓度到 2.7 $\times$ 10<sup>7</sup> CFU/mL 左右。21 d~25 d 实验用小白鼠, 6 只为 1 组, 共 7 组, 腹腔注射菌液 1 mL, 2 h、4 h、6 h、8 h、10 h 后, 乙醚致死小鼠, 无菌采集肾、肝、肺, 称重, 剪碎, 加入 1 mL 无菌生理盐水, 均化器均化。取 50  $\mu$ L 匀浆液均匀涂布在 Baird-Parker 平板上, 37°C 温箱培养, 观察, 计算菌落数。

## 2 结果

### 2.1 表型鉴定

牛源分离株 SA zfb 和金葡菌 ATCC 25923 的几种胞外蛋白质和它的表型特征见表 1

表 1 牛源金葡菌 zfb 及参考菌株 ATCC 25923 的几种胞外蛋白质和它的表型特征

Table 1 Phenotypic characteristics of strain SA zfb and 25923

生化特性 Characteristic	分离株 zfb	参考菌株 25923
$\alpha$ -溶血素 $\alpha$ -hemolysin	+	+
$\beta$ -溶血素 $\beta$ -hemolysin	+	+
血浆凝固酶 Coagulase	+	+
凝集因子 Clumping factor	-	-
脂酶 Lipase	-	+
耐热核酸酶 Thermonuclease	+	+
CAMP 因子 CAMP factor	+	+
甘露醇利用 Mannitol utilization	+	+
DNA 酶 DNase	+	+
在 pH 7.0 m110-SSA 中菌落形态 Colonial morphology in m110-SSA at pH 7.0	D	D
在 pH 6.0 m110-SSA 中菌落形态 Colonial morphology in m110-SSA at pH 6.0	D	C
在 pH 7.0 时生长状况 At pH 7.0 after in vivo growth	D	D
在 pH 6.0 时生长状况 At pH 6.0 after in vivo growth	D	C
对甲氧西林的抗性 Resistance to methicillin	R	W

Note: D: Diffuse; C: Compact (colonial morphology in m110-SSA medium); R: resistant to antibiotics; W: without resistant to antibiotics.

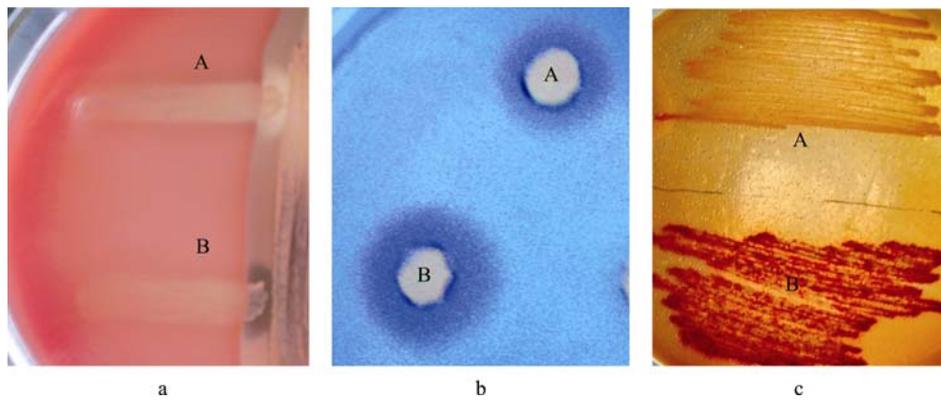


图 1 试验菌株 CAMP 反应(a)、耐热核酸酶(b)与脂酶特性鉴定(c)

Fig. 1 Identification of CAMP reaction (a), thermonuclease (b) and lipase (c)

注: A: 金葡菌 zfb; B: 参考菌株 ATCC 25923.

Note: A: SAzfb; B: Type strain 25923.

SA zfb 菌株与参考菌株 ATCC 25923 在血琼脂平板上都表现出明显的  $\beta$  溶血现象, 均分解甘露醇, 具有耐热核酸酶、血浆凝固酶和 CAMP 反应活性。但 SA zfb 菌株的 CAMP 反应强度、耐热核酸酶活性均低于参考菌株 ATCC 25923(见图 a 及 b); 另外, 分离株 SA zfb 在 mL10-SSA 中一直表现出散布型的菌落形态, 而参考菌株表现为紧密型的菌落形态(见图 c); 此外, SA zfb 菌株不分解油脂, 且具有耐甲氧西林的特性。

## 2.2 双重 PCR 法检测 $\alpha$ 、 $\beta$ 溶血素基因

分离株 SA zfb 和参考菌株 ATCC 25923 经双重 PCR 反应均可同时扩增到  $\alpha$  和  $\beta$  溶血素基因(见图 2), 与血琼脂平板上显示的溶血现象相吻合, 但 SA zfb 菌株的  $\alpha$  溶血能力明显低于 25923 菌株。进一步

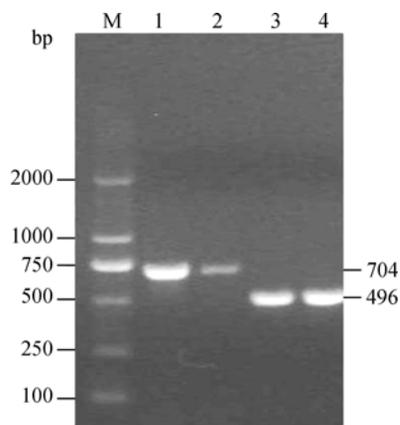


图 2  $\alpha$ 和 $\beta$ 溶血素基因的双重 PCR 鉴定结果

Fig. 2 Identification of  $\alpha$ -HL and  $\beta$ -HL gene

Note: M: Marker DL 2000; 1: Type strain 25923  $\alpha$ -HL gene; 2: Isolate SAzfb  $\alpha$ -HL gene; 3: Type strain 25923  $\beta$ -HL gene; 4: Isolate SA zfb  $\beta$ -HL gene.

扩增 SA zfb 菌株的  $\beta$  溶血素基因全长, 测序结果显示基因 ORF 全长为 993 bp(登录号: EF690812), 可编码 330 个氨基酸, 与已报道的 *hlyB* 核苷酸序列(登录号: NC\_007622)的同源性为 98.5%, 氨基酸序列同源性为 99.4%。其中有 15 个碱基发生了变异, 分别是 G94T, G165C, A300G, C318T, T336C, T351G, T390A, G435A, A496G, T567A, T573C, C678T, T942C, C969T, A972T(NC\_007622 在前), 导致 Ala32Ser, Ile166Val 两处氨基酸发生了点突变。

## 2.3 半数致死量测定

金葡菌参考菌株 25923 和牛金葡菌分离株 zfb 感染小鼠的结果统计如表 2 所示。SA zfb 的  $LD_{50}$  为 4.33, 显著高于对照株 25923 的 2.5。

## 2.4 小鼠器官侵袭力

高浓度的分离株 SA zfb( $10^9$  CFU/mL)对鼠侵袭后, 大量鼠在 2 h 内死亡。将浓度稀释 100 倍后, 鼠

表 2 金葡菌参考菌株 25923 和 SA zfb 对小鼠的半数致死量实验结果  
Table 2  $LD_{50}$  of mice infected with ACTT25923 and SAzfb respectively

稀释倍数 Dilution	动物数量 Animal Number	参考菌株 25923 死亡个体数/存活数 Mortality/Survival	分离株 Zfb 死亡个体数/存活数 Mortality/Survival
$10^{-1}$	6	6/0	6/0
$10^{-2}$	6	5/1	5/1
$10^{-3}$	6	1/5	6/0
$10^{-4}$	6	0/6	2/4
$10^{-5}$	6	0/6	2/4
$10^{-6}$	6	0/6	2/4
Total	36	12/23	23/13
$LD_{50}$		2.50	4.33

在 10 h 内死亡。调整菌浓度到  $2.7 \times 10^7$  CFU/mL 左右, 攻击小鼠, 器官侵袭结果见图 3。图中显示, 金葡菌分离株和参考菌株均可从腹腔扩散到肾、肺、肝中, 且肾脏及肺是最早受侵染器官, 随着时间的推移, 到接菌 8 h 时肾脏及肺处侵染菌数显著下降, 而肝脏中细菌数趋于稳定, 是主要的靶器官。

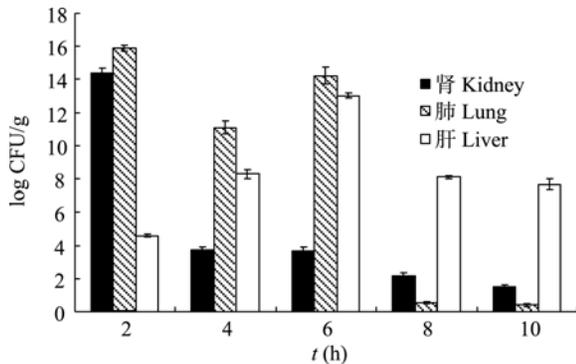


图 3 牛源分离株 zfb 侵袭过的鼠的器官内细菌数的时间变化图

Fig. 3 Recovery of viable *S. aureus* from kidney, lung and liver of mice after intraperitoneal inoculation with *S. aureus* which isolated from a subclinical bovine mastitis. Data are the mean  $\pm$ SD log CFU/g

### 3 讨论

金葡菌感染引发的乳腺炎是影响我国奶牛生产效益的头号疫病, 预防和治疗比较困难, 因为金葡菌不但能寄生在细胞外液的乳汁中, 而且还能存活在细胞(主要是吞噬细胞和嗜中性粒细胞)内, 寄生在细胞内的细菌不但妨碍了抗菌药物治疗, 而且可成为再次感染的病原菌。很多金葡菌菌株在长期的自然选择过程中产生了耐药性, 如 zfb 株不仅对普通的青链霉素产生耐药, 而且具有耐甲氧西林的特性, 因而在生产上对奶牛的危害更大。

多年来畜禽生产实践证明: 接种疫苗是预防畜禽传染性疫病最方便、有效和经济的措施。因此控制金葡菌乳腺炎最有效方法是在青年牛时接种疫苗预防, 但国内外至今还没有研制出有效的金葡菌疫苗供生产上使用, 究其原因可能是对金葡菌感染奶牛引发乳腺炎致病机制及何种毒力因子起主要作用研究的不够深入, 导致疫苗设计因缺乏针对性而失败。

Matsunaga 等(1993)发现从特急性和急性乳腺炎乳样中分离的金葡菌菌株产生  $\beta$ -HL 比例明显高

于从慢性乳腺炎乳样中分离的金葡菌菌株<sup>[9]</sup>; 后来 Larsen 等<sup>[10]</sup>证实从诱发乳腺炎的 462 株金葡菌中, 有 97% 扩增到 -HL 基因, 且在血琼脂平板上表现溶血。应用传统生物化学技术提取 -HL, 研究 -HL 功能, 发现注射 -HL 能诱发兔、小鼠乳腺发生炎症变化和血管损伤; -HL 不仅对牛红细胞具明显的溶解作用, 对 MAC-T 也有微弱的细胞毒作用, 而且还能增加金葡菌对 MAC-T 的粘附能力, 促进金葡菌自身的增殖。上述结果显示, 金葡菌 -HL 在引发奶牛乳腺炎过程中可能起重要作用。因此在牛源分离株中我们挑选含有强 -HL 的金葡菌菌株作为研究对象, 检测其微生物学特性, 研究其高致病性的机理。试验发现分离株与参考菌株之间的差异主要在于: 1) 分离株 zfb 的半数致死量为  $10^{-4.33}$ /mL, 参考菌株为  $10^{-2.5}$ /mL; 2) 分离株不具有脂酶; 3) 分离株主要分泌  $\beta$  溶血素; 4) 分离株具有荚膜多糖; 5) 在改良型 110 血清软琼脂培养基上分离株 SA zfb 一直保持弥散形态, 而参考菌株在 pH 6.0 时变为紧凑形态。据此我们推测  $\beta$  溶血素、具有荚膜及弥散状态等可能是导致分离株高致病性的原因之一。此外, Bogni 等(1998)发现个别金葡菌突变株由于受到外界物理或化学因素影响, 导致其蛋白 A、 $\alpha$  溶血素等一种或几种胞外蛋白产生发生困难; 或影响了 agr、sar 或 sae 等基因的表达, 均能导致突变株比亲本株致病性减少 2 到 10 倍<sup>[11]</sup>。因此, 胞外蛋白的产量可能与分离株及参考菌株致病性强弱相关。高浓度的分离株 SA zfb 对鼠侵袭后, 大量鼠在 2 h 内死亡, 稀释 100 倍后, 鼠在 10 h 内死亡, 对不同时间鼠器官内细菌浓度作了粗估, 发现肾脏内细菌的浓度变化与国内外其他学者测定曲线相符, 肾脏及肺为最先侵袭器官, 肝脏为主要靶器官。上述结果表明牛源金葡菌 zfb 可作为制备减毒活疫苗的候选菌株, 也为进一步研究其致病机理奠定了基础。

后期实验将以牛源分离株 SA zfb 为亲本通过化学方法制备弱毒性突变株, 扩增突变株的  $\beta$  溶血素基因全长, 与亲本菌株  $\beta$  溶血素基因比较, 研究其致病机理。同时, 以突变株作为减毒活疫苗免疫接种鼠, 研究其对同源及异源金葡菌的免疫保护效果, SA zfb 的  $\beta$  溶血素基因缺失株能否抑制乳腺炎的免疫接种实验正在进行中。

## 参 考 文 献

- [1] Cao L, Li SJ. Advance on mastitis vaccine in dairy cows. *Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine*, 2006, **8**: 30–32. (in Chinese)
- [2] Oviedo-Bovso J, Cardoso-Correa BI, Cajero-Juárez M, *et al.* The capacity of bovine endothelial cells to eliminate intracellular *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* is increased by the proinflammatory cytokines TNF-alpha and IL-1beta. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 2008, **54**(1): 53–59.
- [3] Hettinqa KA, Van Valenberq HJ, Lam TJ, *et al.* Detection of mastitis pathogens by analysis of volatile bacterial metabolites. *J Dairy Sci*, 2008, **91**(10): 3834.
- [4] 陆承平. 猪链球菌病与猪链球菌. 东南大学出版社, 1999, pp: 339–343.
- [5] Iandolo JJ. The genetics of staphylococcal enterotoxins and virulence factors. In: Iglewski BH, Clark VL (eds.). *Molecular Basis of Bacterial Pathogenesis*. Academic Press, San Diego, 1990, pp: 399–426.
- [6] Calvino LF, Donnelly WJ, Dodd K. Effect of partially purified *Staphylococcus aureus* beta-haemolysin on the mammary gland of the mouse. *Zentralbl Veterinarmed B*, 1993, **40** (8): 559–568.
- [7] Litwin CM, Johnson JM. Identification, cloning, and expression of the CAMP-like factor autotransporter gene(cfa) of *Bartonella henselae*. *Infect Immun*, 2005, **73**(7): 4205–4213.
- [8] Opdebeeck J, Frost JA, O'boyle D, *et al.* The expression of capsule in serum-soft agar by *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis. *Vet Microbiol*, 1987, **13**: 225–234.
- [9] Matsunaga T, Kamata S, Kakiichi N, *et al.* Characteristics of *Staphylococcus aureus* isolated from peracute, acute and chronic bovine mastitis. *J Vet Med Sci*, 1993, **55**(2): 297–300.
- [10] Larsen HD, Aarestrup FM, Jensen NE. Geographical variation in the presence of genes encoding superantigenic exotoxins and beta-hemolysin among *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Europe and USA. *Vet Microbiol*, 2002, **85**(1): 61–67.
- [11] Bogni C, Segura M, Giraudo J, *et al.* Avirulence and immunogenicity in mice of a bovine mastitis *Staphylococcus aureus* mutant. *Can J Vet Res*, 1998, **62**: 293–298.

## 征订启事

## 《基因组学与应用生物学》征订启事

《基因组学与应用生物学》是由广西大学主管和主办，公开发行的双月刊科学期刊。广西大学聘请中国科学院院士及美国国家科学院外籍院士张启发博士任主编，北京大学教授朱玉贤博士和海南省热带农业资源研究所所长方宣钧博士任执行主编，国内众多的著名学者出任编委。

《基因组学与应用生物学》将面向基因组学、分子遗传学、生化与分子生物学、生物信息学等基础学科领域，着重刊登农林科学、医药科学、动物科学、环境与生态科学以及生物学实验技术与方法等应用生物学领域的最新研究进展和成果。将开设综述与专论、研究论文、新技术新基因新种质等栏目。本刊按国际标准编排，题目摘要、图表、引用文献等均实行中英文对照，实现网上领先发表模式。

《基因组学与应用生物学》，前身是原《广西农业大学学报》，创刊于1982年。广西农业大学合并入广西大学以后更名为《广西农业生物科学》。《广西农业生物科学》已入编《中文核心期刊要目总览》2008年版（即第五版）之综合性农业科学类的核心期刊，是中国科学引文数据库(CSCD)来源期刊，也是中国科技核心期刊即中国科技论文统计源期刊。2001年入选国家新闻出版总署“中国期刊方阵”，先后被国际知名检索系统——英国国际农业与生物科学研究中心(CABI)、美国《化学文摘》(CA)、美国《剑桥科学文摘：自然科学》(CSA: NS)、英国《动物学记录》(ZR)、俄罗斯《文摘杂志》(AJ)等收录。

承载着《广西农业生物科学》的历史与荣誉，《基因组学与应用生物学》将在新的高度开拓奋进，为现代生命科学和应用生物学的研究与发展提供学术交流的平台，使之成为中国科学家走向世界的桥梁。《基因组学与应用生物学》《Genomics and Applied Biology》，ISSN1674-568X，CN45-1369/Q，双月刊，双月28日出版，国内定价：人民币¥40.00/期，人民币¥240.00/年；国际定价：美元\$40.00/期，美元\$240.00/年。