



## 金黄色葡萄球菌黏附素 ClfA 等抗体抑制该菌黏附牛乳腺上皮细胞效果的比较

马鹏睿, 王彩蝶, 张宝江, 苏艳\*

新疆农业大学动物医学学院, 新疆 乌鲁木齐 830052

**摘要:**【目的】为从免疫的角度比较和分析黏附素分子细胞外纤维蛋白原结合蛋白(Extracellular fibrinogen-binding protein, EfB)和纤维连接蛋白结合蛋白 A (Fibronectin binding protein, FnBP)对聚集因子 A (Clumping factor A, ClfA)抑制牛源金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*, SA)黏附牛乳腺原代上皮细胞作用的增强效果。【方法】本试验分离培养牛乳腺上皮细胞并鉴定; 将真核重组质粒 EfB 和 FnBPA 分别与 ClfA 组合免疫新西兰大白兔, 并利用免疫后抗体体外抑制 2 株 SA 分离株侵染牛乳腺上皮细胞, 采用平板计数法定量检测与比较不同免疫组合诱导抗体对黏附的抑制作用; 对 SA 和乳腺上皮细胞分别进行荧光染色, 观察不同免疫组合诱导的抗体对黏附抑制效果的差异。【结果】成功分离培养了牛乳腺原代上皮细胞; 证明了构建的 ClfA、FnBPA 和 EfB 真核重组表达质粒均可在细胞中表达, 且在免疫实验兔后可诱导特异性抗体的产生; 细菌平板计数和荧光染色观察的结果表明, 黏附素分子单独和组合免疫的抗体对该菌不同菌株(GY278 和 GY309)的黏附抑制能力不同, ClfA 抗体的黏附抑制能力最强, FnBPA 分子 A 区的黏附抑制能力优于 D 区。FnBPA、EfB 分别与 ClfA 联合免疫抗体对黏附的抑制程度高于黏附素分子单独免疫组, FnBPA 分子 A 区对 ClfA 黏附抑制的增强作用优于 D 区, FnBPA-A 区与 EfB 相比对 ClfA 的黏附抑制增强差异不显著。【结论】FnBPA-A、FnBPA-D 和 EfB 分别与 ClfA 联合免疫可不同程度地影响 ClfA 的黏附抑制效果, 该结果为以黏附素分子为靶点的牛乳腺炎疫苗的研究提供了实验数据。

**关键词:** 金黄色葡萄球菌, 黏附素分子, 抗体, 牛乳腺上皮细胞, 黏附抑制

金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*, SA) 不仅是引起人类多种传染性疾病的病原菌, 还可感染奶牛引起顽固且危害严重的乳腺炎, 严重制约奶牛业和乳品业的发展<sup>[1]</sup>。尽管应用抗生素治疗该病是一种快速而方便的方法, 但随着各种抗生素的广泛大量的应用, 导致抗药性菌株的出现,

基金项目: 乌鲁木齐市科技局科技应用项目(Y141210011); 新疆维吾尔自治区科技人才培养项目(qn2015yx013); 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: 2017-03-29; 修回日期: 2017-06-07; 网络出版日期: 2017-07-10

进而影响治疗效果。此外, 抗生素残留也会严重影响奶制品的品质。用 SA 疫苗预防由其引起的感染被认为是一种简便而节约的方法。

以往研究表明, SA 的黏附可介导该菌的入侵<sup>[2-3]</sup>, 是感染发生的先决条件<sup>[4]</sup>。黏附素分子特异性抗体可抑制该菌的黏附功能, 部分保护实验动物抵抗 SA 感染<sup>[5]</sup>。SA 目前备受关注的黏附分子包括聚集因子 A (Clumping factor A, ClfA)、纤维连接蛋白结合蛋白 A (Fibronectin binding protein A, FnBPA) 和细胞外纤维蛋白原结合蛋白 (Extracellular fibrinogen-binding protein, EfB)。ClfA 可介导 SA 黏附于基质蛋白<sup>[6]</sup>, FnBPA 介导 SA 结合宿主细胞表面的纤维蛋白原和纤维连接素<sup>[7]</sup>。FnBPA 的 A 区 (FnBPA-A) 与 D 区 (FnBPA-D) 是该蛋白较受关注的功能区<sup>[8-9]</sup>。EfB 除具有黏附功能外, 还参与该菌的免疫逃避<sup>[10-12]</sup>。目前认为利用黏附素特异抗体阻断 SA 乳腺上皮细胞的黏附是防治该菌引起乳腺炎的一种有效思路。以往有关黏附素分子联合免疫对牛乳腺原代上皮细胞黏附抑制的研究报道较少。

为从免疫的角度比较和分析 EfB 和 FnBPA 的不同功能区对 ClfA 黏附抑制的不同增强效果, 本研究以 EfB、FnBPA-A 及 FnBPA-D 重组质粒分别单独及与 ClfA 联合免疫获得特异性多克隆抗体, 通过对细胞进行菌落计数, 比较不同免疫组合抗体对该菌黏附的抑制效果, 同时采用荧光染色观察抗体的抑制效果, 以期为合理利用黏附素分子实现对该菌引起的奶牛乳腺炎的防控提供参照。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌株、细胞及质粒:** 大肠杆菌 DH5 $\alpha$ 、

BL21(DE3)、牛乳源 SA 分离株 GY278、GY309 及 293T 细胞由新疆农业大学动物医学学院微生物与免疫实验室保存。重组质粒 pVAX1-FnBPA-A、pVAX1-FnBPA-D、pVAX1-ClfA、pVAX1-EfB、pVAX1-GFP, 重组蛋白 EfB、FnBPA-A、FnBPA-D 及 ClfA, 由新疆农业大学动物医学学院微生物实验室构建并保存。

**1.1.2 实验动物:** 2.0–2.5 kg 雌性新西兰大白兔, 购于新疆医科大学实验动物中心。

**1.1.3 主要试剂:** 质粒提取试剂盒购自北京康为世纪生物科技有限公司, 真核转染试剂购于北京威格拉斯生物技术有限公司, HRP 标记山羊抗兔二抗购自北京中杉金桥生物技术有限公司。DiI、CFSE 均购自 Thermo Fisher 公司。

### 1.2 重组质粒在真核细胞中的瞬时表达

将纯化后的重组质粒 pVAX1-ClfA、pVAX1-FnBPA-A、pVAX1-FnBPA-D、pVAX1-EfB、pVAX1-1 和 pVAX1-GFP 按转染说明书转染 293T 单层细胞, 以 pVAX-1、pVAX1-GFP 作对照。转染后 48 h 细胞固定 30 min, 洗涤 3 次; 0.2% Triton X-100 处理细胞 5 min, 封闭 30 min, 洗涤 3 次; 分别加入 ClfA、FnBPA-A、FnBPA-D、EfB 多克隆抗体及阴性抗体作用 1 h, PBS 洗涤 3 次; 加入 1 : 500 稀释的 FITC 标记羊抗兔二抗, 37 °C 作用 45 min, PBS 洗涤 3 次, 封片, 荧光显微镜观察结果。

### 1.3 重组质粒免疫实验兔

将 24 只雌性新西兰大白兔随机分为 8 组, 每组 3 只。分别为 FnBPA-A 组、ClfA 组、FnBPA-D 组、EfB 组、ClfA+FnBPA-A 组、ClfA+FnBPA-D 组、ClfA+EfB 组、PBS 对照组。将纯化的重组质粒与壳聚糖等体积混匀, 700  $\mu$ g/只腿部肌肉注射;

3周后进行第二次免疫,免疫方法同上。首次免疫后0、15、32、37、42 d采血,分离血清备用。

#### 1.4 酶联免疫吸附(ELISA)检测抗体

用间接ELISA方法检测多克隆抗体效价。用ClfA、EfB、FnBPA-A、FnBPA-D重组蛋白包被ELISA板,100 ng/孔,4 °C过夜,封闭1 h,1 : 300稀释的各组免疫兔血清为一抗,1 : 4000稀释HRP标记的羊抗兔IgG作二抗,37 °C作用45 min,洗涤5次,TMB显色,1 mol/L硫酸终止反应,测定 $OD_{450}$ 值。

#### 1.5 牛乳腺上皮细胞的分离纯化培养及鉴定

剪取新鲜的牛乳腺组织切除脂肪及结缔组织并用灭菌PBS洗涤,剪切并吹打分散培养,胰酶消化除去成纤维细胞,继续培养。

用免疫荧光染色法鉴定纯化后的乳腺细胞中角蛋白18的表达。将纯化的乳腺上皮细胞加入有盖玻片的培养板中培养,以4%多聚甲醛固定10 min,洗涤3次。封闭30 min,PBS洗涤3次。加入1 : 100兔抗角蛋白18抗体,37 °C孵育1 h,洗涤3次。1 : 100 FITC-山羊抗兔IgG抗体,37 °C作用1 h,洗涤3次,荧光显微镜观察。

#### 1.6 细菌的培养

将SA菌株GY278、GY309接种于鲜血培养基37 °C过夜培养。挑取单菌落接种于液体培养基中培养5 h,收集菌体用DMEM重悬并调节菌体浓度为 $1 \times 10^8$  CFU/mL。

#### 1.7 抗体对黏附的抑制

待乳腺上皮细胞生长汇集达到80%时,PBS洗涤3次,0.2% Triton X-100作用5 min。以MOI=100 : 1比例用SA与细胞作用2 h,对照组用DMEM培养液处理。PBS洗涤3次,胰

蛋白酶消化,终止消化后1 : 10000稀释,取100  $\mu$ L细胞液涂板(3个重复),37 °C培养进行菌落计数。

将50  $\mu$ L ClfA、FnBPA及EfB特异血清(1 : 5稀释)与SA( $5 \times 10^8$  CFU/mL)37 °C作用1 h。将与抗体作用后的细菌按MOI=100 : 1加到乳腺上皮细胞中,37 °C作用1 h。PBS洗涤5次。胰酶消化使细胞分散。将细胞进行1 : 10000稀释,取100  $\mu$ L细胞液涂板(3个重复),37 °C培养进行菌落计数。

#### 1.8 荧光染色法观察黏附及黏附抑制

将培养的SA用PBS洗涤3次;用含1 : 1000 CFSE染料染色10 min。细胞生长汇集达80%,PBS洗涤2次;用DiI染色10 min;PBS洗涤3次。将染色后的SA与乳腺上皮细胞37 °C、5% CO<sub>2</sub>条件下作用2 h,洗涤5次,封片后用荧光显微镜观察黏附。

将染色后的SA与等体积的含黏附素分子免疫血清(1 : 5稀释)37 °C作用30 min(3个重复),将与抗体作用后的细菌按MOI=100 : 1加到染色后的乳腺上皮细胞中作用2 h,PBS洗涤3次,封片后荧光显微镜观察。

## 2 结果和分析

### 2.1 重组质粒在真核细胞中瞬时表达的检测

用间接免疫荧光法检测AClfA、EfB、FnBPA-D及FnBPA-A重组质粒转染293T细胞后的表达。结果显示(图1),转染后48 h阳性对照组和实验组可看到绿色荧光细胞,阴性对照组未见荧光,表明构建的ClfA、FnBPA-A、FnBPA-D及EfB的真核表达质粒在真核细胞中成功表达。

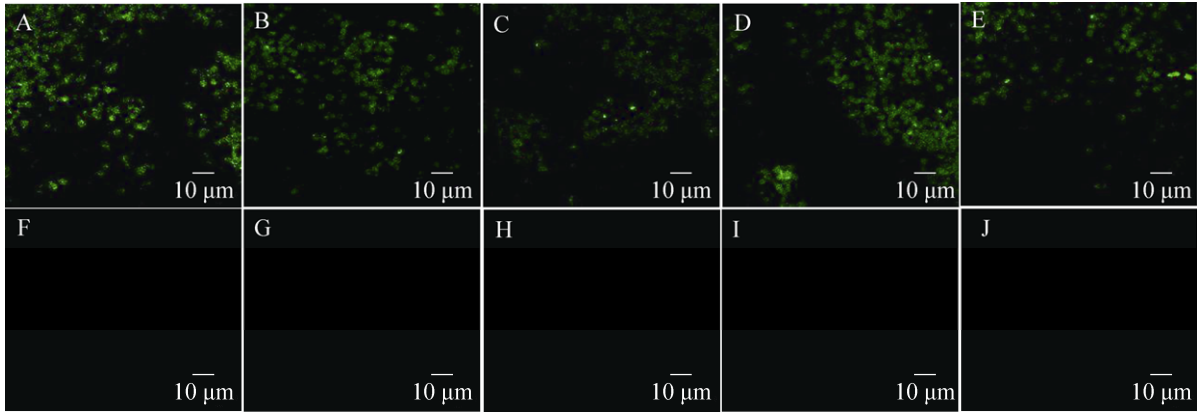


图 1. 荧光显微镜观察重组质粒在 293T 细胞中的表达

Figure 1. Expression of recombinant plasmid in 293T cells observed under fluorescent microscope. A: pVAX1-GFP; B: pVAX1-FnBPA-A; C: pVAX1-EfB; D: pVAX1-ClfA; E: pVAX1-FnBPA-D; F: pVAX1-1; G: pVAX1-FnBPA-A control; H: pVAX1-EfB control; I: pVAX1-ClfA control; J: pVAX1-FnBPA-D control.

## 2.2 多克隆抗体水平的检测

除对照组外,各免疫组在首免后第 15 天血清抗体水平开始升高,二免后 ClfA 抗体水平高于 FnBPA-A 组、EfB 组和 FnBPA-D 组,联合免疫组高于单独免疫组( $P < 0.01$ ),且 ClfA+FnBPA-A 免疫组的抗体水平高于 ClfA+EfB 免疫组(图 2-A),血清抗体效价高达 1 : 72900, EfB 组和 FnBPA-D 组

的血清抗体效价可达 1 : 24300 (图 2-B)。

## 2.3 牛乳腺上皮细胞的纯化与培养

组织块培养 3-5 d 后,可见成纤维细胞由组织块游离出,继续培养 6-8 d 开始有乳腺上皮细胞游离长出。待细胞长至 80%,对细胞消化和纯化,纯化后的乳腺上皮细胞如图 3-A 和图 3-B 所示。

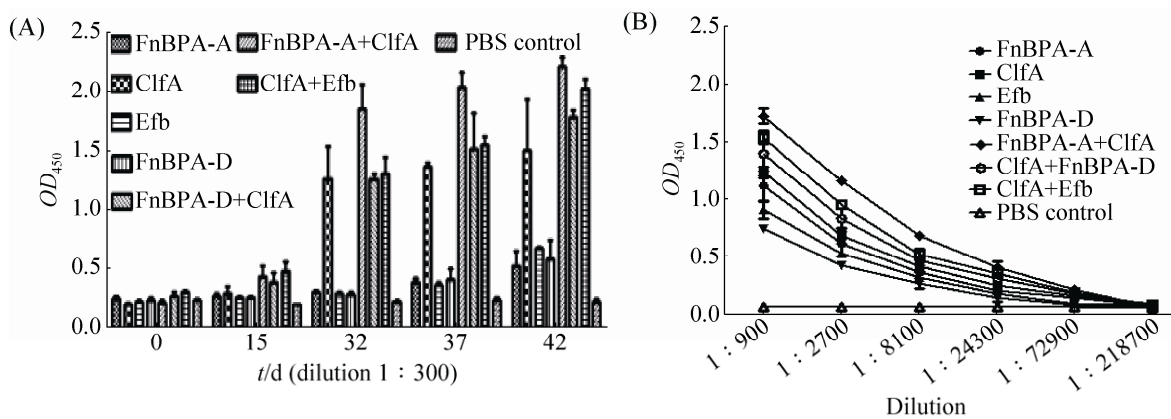


图 2. 免疫兔血清抗体检测

Figure 2. Serum antibody detection of immunized rabbit. A: Serum antibody changes; B: Serum antibody titers of immunized rabbit.

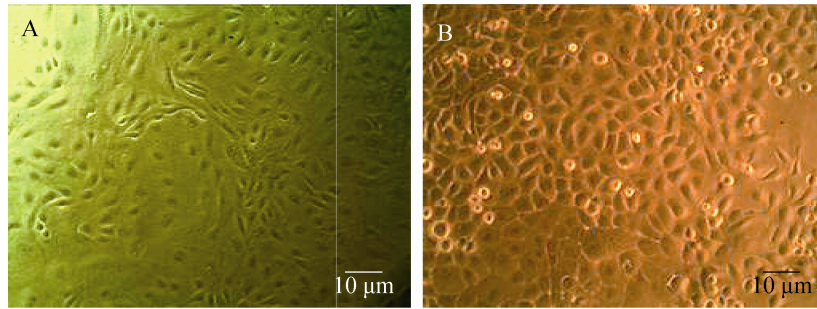


图 3. 分离纯化的牛乳腺上皮细胞(100×)

Figure 3. Bovine primary mammary epithelial cells that isolated and purified (100×). A: The oval shape mammary epithelial cell; B: The irregular polygon mammary epithelial cell.

#### 2.4 牛乳腺上皮细胞的鉴定

对分离纯化的乳腺上皮细胞中特异性角蛋白 18 用免疫荧光的方法检测其表达。荧光显微镜观察结果显示(图 4), 纯化的乳腺上皮细胞角蛋白 18 检测呈阳性, 细胞质中有明显绿色荧光, 细胞核中无荧光出现, 表明分离纯化后的细胞为乳腺上皮细胞。

#### 2.5 抗体的体外黏附抑制试验

利用 GY278 和 GY309 检测抗体的黏附抑制, 细菌平板计数结果及荧光显微镜观察的结果显示, ClfA 单独免疫组的抗体对这 2 种菌的黏附抑

制作用最强, FnBPA-A 次之, Efb 及 FnBPA-D 单独免疫组抑制水平较低, 各免疫组与对照组相比差异均极显著( $P < 0.01$ ) (图 5)。

FnBPA-A、FnBPA-D、Efb 分别与 ClfA 联合免疫时诱导的抗体对 SA GY278 和 GY309 黏附上皮细胞的抑制水平高于黏附素分子单独免疫组。对菌株 GY278 的黏附抑制, FnBPA-A+ClfA、FnBPA-D+ClfA、Efb+ClfA 各联合免疫组之间无显著差异, 但从对菌株 GY309 的黏附抑制来看, FnBPA-A 和 Efb 对 ClfA 黏附抑制的增强程度明显高于 FnBPA-D (图 6)。

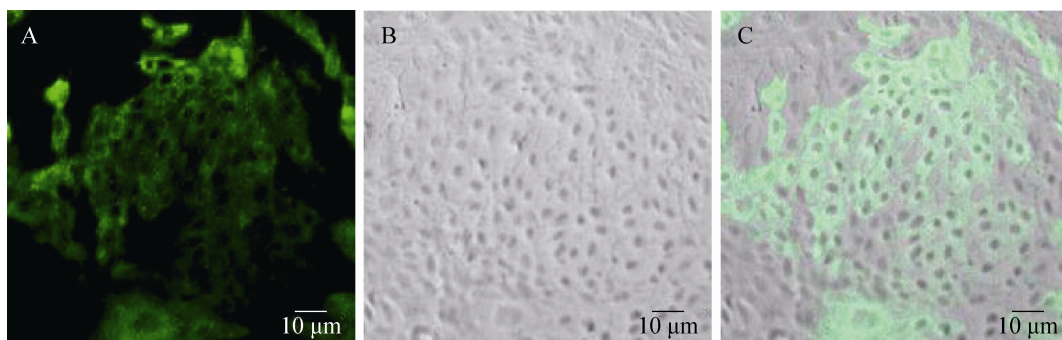


图 4. 免疫荧光鉴定角蛋白 18 (200×)

Figure 4. Immunofluorescence identification of keratin 18 (200×). A: Fluorescent image of cells stained with anti-cytokeratin 18 antibody; B: Cell images with normal microscope; C: Mergence of images of A and B.

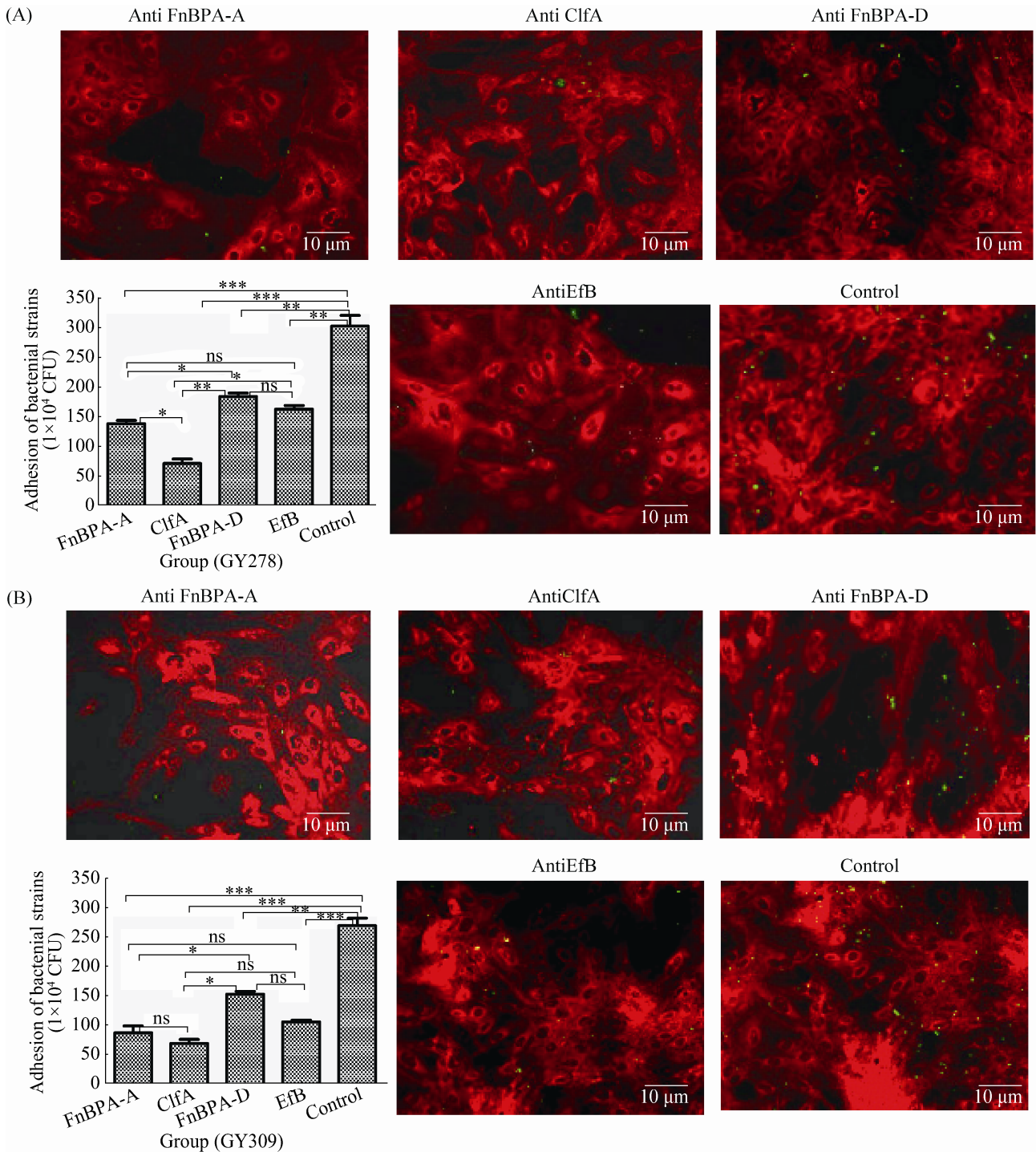


图 5. 黏附素单独免疫的多克隆抗体对 SA 菌株 GY278 和 GY309 黏附牛乳腺上皮细胞的拮抗作用

Figure 5. Adhesion inhibition of polyclone antibody of rabbit immunized with single adhesin on the SA strains GY278 and GY309 to bovine mammary epithelial cells. A: Adhesion inhibition of anti-serum from rabbit immunized with single adhesins testing with SA strains GY278; B: Adhesion inhibition of anti-serum from rabbit immunized with single adhesins testing with SA strains GY309. Fluorescent staining was observed under microscope (200 $\times$ ), \*\*\* ( $P < 0.001$ ) and \*\* ( $P < 0.01$ ) indicate extremely significant difference, \* ( $P < 0.05$ ) indicates significant difference, ns and ( $P > 0.05$ ) indicate no difference, the bacteria plate counting results represents three independent experiments.

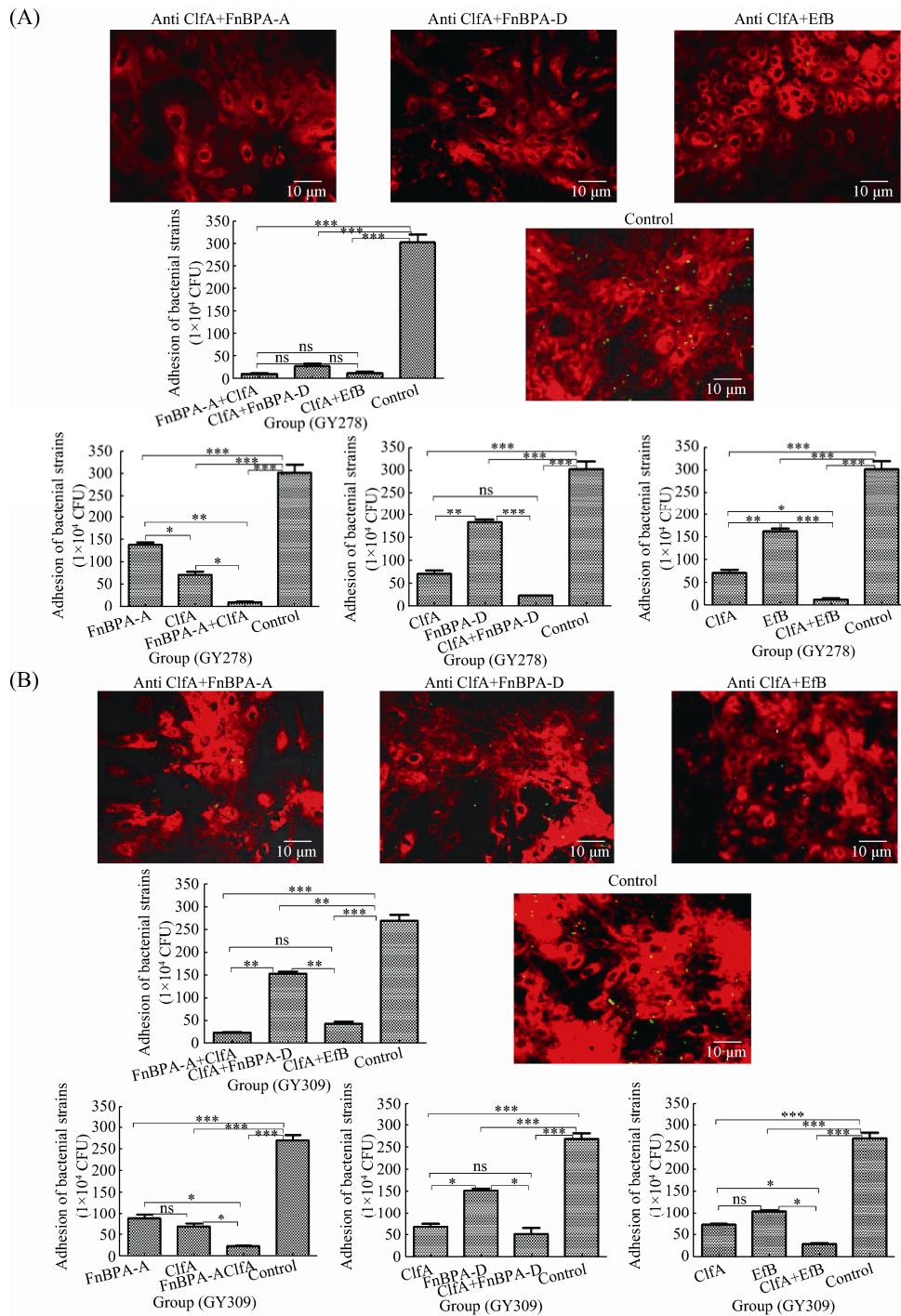


图 6. 黏附素联合免疫的多克隆抗体对 SA 菌株 GY278 和 GY309 黏附牛乳腺上皮细胞的拮抗作用

Figure 6. Adhesion inhibition of polyclonal antibody of rabbit immunized with adhesins in combination on the adhesion of SA strains GY278 and GY309 to bovine mammary epithelial cells. A: Adhesion inhibition of anti-serum from rabbit immunized with adhesins in-combination testing with SA strains GY278; B: Adhesion inhibition of anti-serum from rabbit immunized with adhesins in-combination testing with SA strains GY309. Fluorescent staining was observed under microscope (200 $\times$ ), \*\*\* ( $P < 0.001$ ) and \*\* ( $P < 0.01$ ), indicate extremely significant difference, \* ( $P < 0.05$ ) indicates significant difference, ns and ( $P > 0.05$ ) indicate no difference, the bacteria plate counting results represents three independent experiments.

### 3 讨论

乳腺上皮细胞是 SA 感染牛乳腺时重要且关键的靶细胞, 体外培养牛乳腺原代上皮细胞是研究 SA 侵染乳腺的理想细胞模型。目前的研究多以猴肾上皮细胞系 Marc-145、牛乳腺上皮细胞系 MAC-T 及哺乳动物乳腺上皮细胞系 BME-UV19 作为细胞模型研究黏附和黏附抑制作用。陈智等<sup>[13]</sup>证明, ClfA 重组蛋白抗血清经 50 倍稀释后可以抑制 41% 的 SA 对 Marc-145 细胞的黏附。Castagliuolo 等<sup>[14]</sup>用编码 4 种黏附分子(ClfA、FnBPA、Efb 及 Can)的 pDNA 混合物对小鼠进行鼻内免疫接种, 诱导的特异性抗体可抑制 SA 黏附 BME-UV19 细胞。最近崔新洁等<sup>[15]</sup>以纯化培养的牛乳腺原代上皮细胞为模型, 发现 SA 感染可引起由 Caspase 3 和 Caspase 8 介导的乳腺原代上皮细胞凋亡。有关抗体对该菌与牛乳腺原代上皮细胞黏附抑制作用的研究还未见报道。

Bouchard 等<sup>[16]</sup>对 SA 和 MAC-T 分别进行了荧光染色, 观察到经不同荧光染色的 SA、乳酸杆菌和乳腺上皮细胞及其作用效果, 该研究发现乳酸杆菌可对 SA 黏附和侵入 MAC-T 细胞具有明显的抑制效果。因此利用荧光染色法观察病原菌和细胞之间的黏附及相互作用, 可为体外研究该菌的致病机制和筛选治疗药物提供有用的模式。

本研究采用牛乳腺组织块培养法结合胰酶消化法成功分离纯化并得到牛乳腺原代上皮细胞, 利用培养的上皮细胞和荧光染色法进一步对 3 种不同黏附素分子以不同方式免疫后抗体的黏附抑制效果进行了比较, 该研究对于进一步利用黏附素分子开展 SA 引起的奶牛乳腺炎的生物防治提供了基础实验数据。

黏附素分子是 SA 定居、繁殖和感染宿主的先决条件。除介导黏附外, 其还赋予该菌逃避宿主

的防御。以往多项研究均表明, 阻断和抑制 SA 的黏附功能可部分保护实验动物抵抗该菌的感染。姜晓娟<sup>[17]</sup>、Li 等<sup>[18]</sup>对 ClfA 进行原核表达并免疫家兔, 抗血清可以阻止 A 黏附胶原蛋白, 并具有吞噬调理作用。张鑫等<sup>[5]</sup>证明了 Efb 免疫家兔后诱导产生的特异性抗体能够阻断补体的激活。Delfani 等<sup>[19]</sup>用 ClfA-IsdB-Hlg 重组蛋白免疫 BALB/C 鼠, 该蛋白诱导的抗体可以调理和增强巨噬细胞对 SA 的吞噬。Hall 等<sup>[20]</sup>用 ClfA 单抗被动免疫小鼠可以保护其不发生由 SA 引起的乳房炎。

以往研究曾将重组表达的 FnBPA 不同功能区、ClfA 及 Efb 的抗体对牛源纤维蛋白原(Fg)和纤维连接素(Fn)的黏附抑制能力进行了比较<sup>[18,21-22]</sup>, 这些研究是利用包被 Fg 和 Fn 检测这些黏附素分子抗体对 Fg 和 Fn 黏附抑制功能, 这种 Fg 和 Fn 尚不能完全代表牛乳腺上皮细胞表面的黏附素受体。Castagliuolo 等<sup>[14]</sup>用编码 4 种黏附分子(ClfA、FnBPA、Efb 及 Can)的 pDNA 混合物对小鼠进行鼻内免疫可有效抵御由该菌引起的乳腺内的感染。但该研究未对 FnBPA 的 2 个不同的功能区 FnBPA-A 及 FnBPA-D 进行比较, 也未对黏附素分子联合免疫后抗体的黏附抑制特点进行评估与研究, 且这些研究也都未涉及牛乳腺原代上皮细胞。

本研究的结果表明, 黏附素分子 FnBPA、Efb 与 ClfA 以不同方式组合免疫后其抗体对上皮细胞的黏附抑制作用具有差异, 其中 ClfA 抗体对 SA 黏附上皮细胞的抑制作用最强, FnBPA-A 抗体对黏附抑制作用比 FnBPA-D 强, 在以 GY309 菌株作测试菌时, FnBPA-A 还表现出明显的增强 ClfA 黏附抑制特点, 增强效果优于 FnBPA-D。本研究的结果表明, FnBPA-A 具有较好的潜力成为抗该菌感染的靶分子, 不同黏附素分子以不同组合免疫诱导的抗体对黏附抑制作用显著高于单独免疫。



## 参考文献

- [1] De Vliegher S, Fox LK, Piepers S, McDougall S, Barkema HW. Invited review: Mastitis in dairy heifers: nature of the disease, potential impact, prevention, and control. *Journal of Dairy Science*, 2012, 95(3): 1025–1040.
- [2] Zhou H, Xiong ZY, Li HP, Zheng YL, Jiang YQ. An immunogenicity study of a newly fusion protein Cna-FnBP vaccinated against *Staphylococcus aureus* infections in a mice model. *Vaccine*, 2006, 24(22): 4830–4837.
- [3] Patti JM, Allen BL, McGavin MJ, Höök M. MSCRAMM-mediated adherence of microorganisms to host tissues. *Annual Review of Microbiology*, 1994, 48: 585–617.
- [4] Josefsson E, Hartford O, O'Brien L, Patti JM, Foster T. Protection against Experimental *Staphylococcus aureus* arthritis by vaccination with clumping factor A, a novel virulence determinant. *The Journal of Infectious Diseases*, 2001, 184(12): 1572–1580.
- [5] Zhang X, Gao YP, Dong J, Liu Y, Wu N, Shao NS, Yang G. Expression, purification of *Staphylococcus aureus* Efb protein and preparation of its functional antibody. *Bulletin of the Academy of Military Medical Sciences*, 2009, 33(6): 531–534. (in Chinese)  
张鑫, 高亚萍, 董洁, 刘玉, 吴娜, 邵宁生, 杨光. 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.
- [6] McDevitt D, Francois P, Vaudaux P, Foster TJ. Molecular characterization of the clumping factor (fibrinogen receptor) of *Staphylococcus aureus*. *Molecular Microbiology*, 1994, 11(2): 237–248.
- [7] Hettinga KA, van Valenberg HJF, Lam TJGM, van Hooijdonk ACM. Detection of mastitis pathogens by analysis of volatile bacterial metabolites. *Journal of Dairy Science*, 2008, 91(10): 3834–3839.
- [8] Shao JG, Zhang BJ, Li SC, Wang CD, Wang GQ, Su Y. Comparison and analysis of the biological activity of antiserum after immunizing with expressed different domains of *Staphylococcus aureus* adhesin FnBPA isolated 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.
- [9] Wang SM, Su Y. Bioinformatic analysis on *Staphylococcus aureus* fibronectin-binding protein A (FnBPA) signal peptide and its eukaryotic secret expression. *Journal of Xinjiang Agricultural University*, 2012, 35(3): 212–216. (in Chinese)  
王世民, 苏艳. 金黄色葡萄球菌纤连结合蛋白信号肽的生物信息学分析及其真核分泌表达. *新疆农业大学学报*, 2012, 35(3): 212–216.
- [10] Hammel M, Sfyroera G, Ricklin D, Magotti P, Lambris JD, Geisbrecht BV. A structural basis for complement inhibition by *Staphylococcus aureus*. *Nature Immunology*, 2007, 8(4): 430–437.
- [11] Lee LYL, Liang XW, Höök M, Brown EL. Identification and characterization of the C3 binding domain of the *Staphylococcus aureus* extracellular fibrinogen-binding protein (Efb). *Journal of Biological Chemistry*, 2004, 279(49): 50710–50716.
- [12] Garcia BL, Ramyar KX, Ricklin D, Lambris JD, Geisbrecht BV. Advances in understanding the structure, function, and mechanism of the SCIN and Efb families of *Staphylococcal* immune evasion proteins//Lambris JD, Hajishengallis G. *Current Topics in Innate Immunity II*. New York: Springer, 2012: 113–133.
- [13] Chen Z, Liu SN, Mou K, Cao BL, Zhao HK. Prokaryotic expression of *Staphylococcus aureus* ClfA and assay for its antisera bioactivity. *Chinese Veterinary Science*, 2010, 30(1): 29–31, 46. (in Chinese)  
陈智, 刘少宁, 牟凯, 曹丙蕾, 赵宏坤. 金黄色葡萄球菌聚集因子 A 蛋白的原核表达及抗血清活性分析. *中国兽医学报*, 2010, 30(1): 29–31, 46.
- [14] Castagliuolo I, Piccinini R, Beggiao E, Palù G, Mengoli C, Ditadi F, Vicenzoni G, Zecconi A. Mucosal genetic immunization against four adhesins protects against *Staphylococcus aureus*-induced mastitis in mice. *Vaccine*, 2006, 24(20): 4393–4402.
- [15] Cui XJ, Hu QL, Li YP, Tao L, Xiu L, Liu BC, Chen Y, Wang X. The apoptosis of bovine primary mammary epithelial cells induced by *Staphylococcus aureus*. *Scientia Agricultura Sinica*, 2013, 46(15): 3212–3219. (in Chinese)  
崔新洁, 胡庆亮, 李奕平, 陶琳, 修磊, 刘秉春, 陈媛, 王潇. 金黄色葡萄球菌诱导牛原代乳腺上皮细胞的凋亡. *中国农业科学*, 2013, 46(15): 3212–3219.
- [16] Bouchard DS, Rault L, Berkova N, Le Loir Y, Even S. Inhibition of *Staphylococcus aureus* invasion into bovine mammary epithelial cells by contact with live *Lactobacillus casei*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2013, 79(3): 877–885.
- [17] Jiang XJ, Hao YQ, Zhang AR, Fan X, Chen XJ. 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的免疫学特性.

- 中国兽医科学, 2009, 39(7): 626–631.
- [18] Li X, Wang X G, Thompson CD, Park S, Park WB, Lee JC. Preclinical efficacy of clumping factor A in prevention of *Staphylococcus aureus* infection. *mBio*, 2016, 7(1): e02232-15.
- [19] Delfani S, Imani Fooladi AA, Mobarez AM, Emaneini M, Amani J, Sedighian H. *In silico* analysis for identifying potential vaccine candidates against *Staphylococcus aureus*. *Clinical and Experimental Vaccine Research*, 2015, 4(1): 99–106.
- [20] Hall AE, Domanski PJ, Patel PR, Vernachio JH, Syribeys PJ, Gorovits EL, Johnson MA, Ross JM, Hutchins JT, Patti JM. Characterization of a protective monoclonal antibody recognizing *Staphylococcus aureus* MSCRAMM protein clumping factor A. *Infection and Immunity*, 2003, 71(12): 6864–6870.
- [21] Liu YT, Su Y, Zhang BJ, Su LL, Jiang HJ. Immunological comparison of Efb and ClfA of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2015, 31(9): 1335–1343. (in Chinese)  
刘云涛, 苏艳, 张宝江, 苏玲玲, 姜慧娇. 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.
- [22] 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 Microbiologica Sinica*, 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.

## Adhesive inhibition comparison of *Staphylococcus aureus* to bovine mammary epithelial cells by antibodies against 3 different adhesins

Pengrui Ma, Caidie Wang, Baojiang Zhang, Yan Su\*

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

**Abstract:** [Objective] To compare the inhibition effects of antibodies against extracellular fibrinogen-binding protein (Efb) and fibronectin binding protein (FnBPA) to clumping factor A (ClfA) of *Staphylococcus aureus* (SA) to bovine mammary epithelial cells (bMEC) by immunization method. [Methods] The antibodies were obtained by immunizing rabbits with the recombinant plasmids Efb or FnBPA in-combination with ClfA. The antibodies inhibition effects on adereing of 2 SA strains to bMEC were tested using plate counting method and observed by fluorescent staining of SA and bMEC, respectively. [Results] Our results indicated that the antibodies had different inhibition effects on adhesion of SA (GY278 and GY309). ClfA antibody showed the highest inhibition ability. FnBPA-A showed greater inhibition enhancement to ClfA than FnBPA-D. [Conclusion] The in-combination immunization of FnBPA-A, FnBPA-D and Efb with ClfA could affect the antibodies inhibition to various degrees and this result provided experiment basis for the development of bovine mastitis vaccine.

**Keywords:** *Staphylococcus aureus*, adhesin, antibody, bovine mammary epithelial cell, adhesion inhibition

(本文责编: 李磊)

Supported by the Science and Technology Application Project of Urmqi Science and Technology Bureau (Y141210011), by the Science and Technology Talent Training Project of Xinjiang Uygur Autonomous Region (qn2015yx013) and by the National Natural Science Foundation of China (31260222)

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

Received: 29 March 2017; Revised: 7 June 2017; Published online: 10 July 2017