

研究报告

金黄色葡萄球菌重组 GapC 蛋白的 GAPDH 活性及免疫原性分析

朱洪伟¹, 朱战波¹, 崔玉东^{1,2}, 张晶¹, 刘乐锋¹, 朴范泽¹

1 黑龙江八一农垦大学动物科技学院, 大庆 163319

2 黑龙江八一农垦大学生命科学技术学院, 大庆 163319

摘要: 为研究金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)表面 GapC 蛋白的 GAPDH 活性、免疫原性及免疫保护作用, 应用 PCR 方法扩增出 *S. aureus* 的 *gapC* 基因, 插入到 pQE-30 载体相应位点, 构建重组质粒 pQE/*gapC*。将其导入宿主菌 *E. coli* M15(pREP4)后, IPTG 诱导表达。重组蛋白纯化后进行 GAPDH 活性检测, 并与灭活全菌体分别免疫健康家兔。然后, 应用 ELISA 方法检测血清中 IgG 抗体水平及 IFN- γ 、IL-4 细胞因子浓度, 并用 1.0×10^8 CFU/mL *S. aureus* 菌株 Wood46 对免疫家兔攻毒。SDS-PAGE 结果显示, GapC 蛋白在 *E. coli* M15(pREP4)中获得表达; 经 GAPDH 活性检测及 Western Blot 检测, 重组蛋白具有较高的 GAPDH 活性和抗原特异性; 经 ELISA 检测, GapC 蛋白及全菌体组兔血清中 IgG 抗体水平迅速升高, 并在加强免疫后第 28 天达到最高(1:64 000), 加强免疫后第 14 d, 血清中细胞因子 IFN- γ 和 IL-4 浓度与对照组相比, 显著升高($P < 0.05$), 而全菌体免疫组升高不明显($P > 0.05$); 攻毒结果为蛋白免疫组家兔获得一定的免疫保护(4/5)。以上结果表明, 表达的重组 GapC 蛋白具有 GAPDH 活性、较好的免疫原性及免疫保护力, 可作为深入研究 *S. aureus* 基因工程疫苗的良好靶向。

关键词: 金黄色葡萄球菌, GapC 蛋白, GAPDH 活性, 免疫原性, 免疫保护

GAPDH Activity and Immunogenicity of *Staphylococcus aureus* Recombinant GapC Protein

Hongwei Zhu¹, Zhanbo Zhu¹, Yudong Cui^{1,2}, Jing Zhang¹, Lefeng Liu¹, and Fanze Piao¹

1 College of Animal Science and Technology, Heilongjiang August First Land Reclamation University, Daqing 163319, China

2 College of Life Science and Technology, Heilongjiang August First Land Reclamation University, Daqing 163319, China

Abstract: In order to characterize the Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) activity, immunogenicity and immunoprotection of the *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) surface protein GapC, *gapC* gene of *S. aureus* was amplified from strain BMSA/855/23-1 by PCR, and was inserted into pQE-30 vector subsequently. The recombinant plasmid, designated as pQE/*gapC*, was transformed into *E. coli* strain M15 (pREP4). The recombinant GapC fusion protein was successfully expressed in *E. coli* M15 induced with IPTG and its GAPDH activity was confirmed by GAPDH activity assay. Then, the recombinant GapC protein, inactivated *S. aureus* whole cell and placebo (PBS) were administrated to healthy rabbits respectively. The IgG antibody titers, concentration of IFN- γ and IL-4 cytokines in immunized rabbit sera were measured with Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). Finally,

Received: August 2, 2007; **Accepted:** September 3, 2007

Supported by: the Key Technologies R&D Program of Heilongjiang Province (No. GA02B501).

Corresponding author: Yudong Cui. Tel/Fax: +86-459-6819290; E-mail: cuiyudong@yahoo.com

黑龙江省科技攻关重大项目(No. GA02B501)资助。

immunized rabbits were challenged with *S. aureus* strain Wood46 to evaluate the immunoprotection. The IgG antibody titers against GapC and whole cell in rabbit sera reached their peaks at day 28 after boost immunization (1:64 000). The concentration of IL-4 and IFN- γ in GapC groups rabbit sera increased significantly ($P<0.05$) at day 14 after boost immunization, while the concentration of those in whole cell group did not increase ($P>0.05$) compared with the placebo group. 4 rabbits in 5 of the protein immunized group were protected against challenge with 1×10^8 CFU *S. aureus*. The results above indicate that the expressed recombinant GapC protein have high GAPDH activity and immunogenicity, can also protect against *S. aureus* challenge to some extent. *S. aureus* GapC protein could be an attractive target for further genetic engineering vaccine.

Key words: *Staphylococcus aureus*, GapC protein, GAPDH activity, immunogenicity, immunoprotection

金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)是引起人和动物多种疾病的重要致病菌。由于不同 *S. aureus* 菌株间缺乏保守的、保护性良好的抗原, 目前研究的 *S. aureus* 疫苗在临床试验中效果均不理想, 因此亟需寻找一种保守的、保护性好的疫苗抗原^[1]。甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)是糖酵解途径中的一种关键酶。它可逆性地催化甘油醛-3-磷酸转化成 1, 3-二磷酸甘油酸。近年来, 人们发现具有 GAPDH 活性的蛋白是细菌、真菌和寄生虫感染的最佳疫苗靶向^[2-6]。研究表明人源和牛源 *S. aureus* 分离株表面存在着高度保守的 GAPDH 活性的蛋白: GapC 和 GapB^[7], 其中 GapC 具有较高的 GAPDH 活性。因此, 本研究通过基因工程方法表达 *S. aureus* GapC 蛋白, 并将纯化的表达蛋白免疫家兔后, 研究该蛋白的细胞、体液免疫水平及免疫原性, 为研制 *S. aureus* 基因工程疫苗提供一定参考和研究基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒和菌株

S. aureus 地方分离株 BMSA/855/23-1、*S. aureus* 标准株 Wood46、*E. coli* XL-I-Blue 宿主菌、*E. coli* M15 (pREP4)宿主菌、原核表达载体 pQE-30 均由本校预防兽医学实验室提供。

1.1.2 引物

根据 GenBank 上 *S. aureus gapC* 基因序列 (GenBank Accession No. AY356529), 应用 Oligo6.67 及 DNASTar 软件设计一对 PCR 引物, 其序列为: *gapC* Pf: 5' -CGCGGATCCATGGCAGTAAAAGTAG CAATT-3'; *gapC* Pr: 5' -AAATTAGGTACCTTTAGAA AGTTCAGCTAAGTAT-3'。上游引物位于基因的 1~21 位, 下游引物与 987~1008 位反向互补。并在上、下游

引物 5' 末端分别引入 *Bam*H I 和 *Kpn* I 限制性酶切位点 (下划线所示)。PCR 扩增的核酸片段大小为 1008 bp。引物由上海生工公司合成。

1.1.3 主要试剂

工具酶类及蛋白质 Marker 等均为 Fermentas (MBI) 公司产品; DNA Marker 为 TaKaRa 宝生物工程(大连)有限公司产品; PIPES、DMSO、甘油醛-3-磷酸(G-3-P)、HRP 标记的羊抗兔抗体、TSB 培养基为 Becton Dickinson 公司产品; BioSpin 质粒提取试剂盒及 DNA 凝胶回收试剂盒均为杭州博日公司产品; goat anti-rabbit interleukin 4 及 goat anti-rabbit γ interferon 细胞因子 ELISA 定量检测试剂盒为 BPB Biomedical 公司产品。DAB 底物显色液购自武汉博士德生物工程有限公司。

1.1.4 实验动物

新西兰大白兔 25 只, 雄性, 体重约 2 kg~2.5 kg, 由大庆市某养殖场提供。

1.2 *S. aureus gapC* 基因的 PCR 扩增

按参考文献[8]方法提取 *S. aureus* Wood46 株和分离株 BMSA/855/23-1 的基因组 DNA。以提取的 DNA 为模板, 在 50 μ L 反应体系中加入 dNTPs (各 0.2 mmol/L)、引物 *gapC* Pf 和 *gapC* Pr (各 1 μ mol/L)、 Mg^{2+} (2 mmol/L)、*Taq* DNA polymerase 1.25 u/50 μ L。按以下反应条件扩增 *S. aureus gapC* 基因: 95 $^{\circ}$ C 预热 2 min, 94 $^{\circ}$ C 1 min 30 s, 53.5 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 进行 30 个循环, 然后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。PCR 反应结束后, 取 3 μ L 产物以 0.1% 琼脂糖凝胶进行电泳。观察并记录结果。

1.3 GapC 重组蛋白原核表达载体的构建

PCR 产物用 Biospin DNA 凝胶回收试剂盒回收和纯化。纯化后的 DNA 与载体质粒 pQE30 进行 *Bam*H I 和 *Kpn* I 双酶切、连接。按 Inoue 法^[9]制备 *E. coli* M15(pREP4)及 XL-I-Blue 感受态细胞。将连

接产物按热休克法转化感受态细胞 *E. coli* XL-I-Blue, 增菌培养后用 Biospin 质粒提取试剂盒提取质粒, 对重组质粒进行酶切鉴定、PCR 鉴定及序列测定分析, 将转化获得的阳性重组质粒命名为 pQE/gapC。以热休克法将重组质粒 pQE/gapC 转化宿主菌 *E. coli* M15(pREP4)中, 重组菌命名为 *E. coli* M15(pQE/gapC+pREP4)。

1.4 GapC 重组蛋白的表达及纯化

取 50 μ L *E. coli* M15(pQE/gapC+pREP4)接种于 50 mL LB 培养基(含 100 μ g/mL 氨苄青霉素)中, 37°C 培养, OD_{600} 约为 0.4 时, 加 IPTG 至终浓度为 1 mmol/L, 继续剧烈振荡培养 5 h。每隔 1 h 吸取 1 mL 菌液, 10 000 r/min 离心, 弃上清, 在沉淀中加入 90 μ L 1 \times 上样缓冲液和 10 μ L 1 mmol DTT 后, 煮沸 5 min, 取 15 μ L 用于 SDS-PAGE。同时, 设未诱导重组菌和空载体对照。重组蛋白用透析袋电洗脱法纯化, 步骤如下: 诱导 50 mL 重组菌液, 取 8 mL 进行 SDS-PAGE 电泳。电泳完毕后取出凝胶, 置于 250 mmol/L 的 KCl 染液中染色 5 min, 小心切取白色目的蛋白条带, 将切下的胶条置透析袋内, 封口后置于含 Tris-甘氨酸电泳缓冲液的水平电泳槽内, 100 V 电泳 1 h, 使蛋白从凝胶上分离下来, 之后再反向电泳 5 min, 小心取出透析袋内胶条, 透析袋封口后, 于 PBS 液内 4°C 过夜透析, 次日, 用 PEG8000 浓缩蛋白溶液。用 Amersham 基因定量仪测定纯化的蛋白浓度。取 15 μ L 浓缩溶液, SDS-PAGE 检测纯化效果。

1.5 重组蛋白的 GAPDH 活性检测

S. aureus 全菌体用超声波破碎仪裂解细胞, 强度 250 W、处理时间 10 s, 间隔 5 s。处理 30 min 后, 反复冻融 3 次, 10 000 r/min (4°C)离心 5 min, 取上清进行检测; 纯化的重组蛋白 rGapC 可直接检测。5 μ g 蛋白与 20 mmol G-3-P、10 mmol NAD^+ 在 1 mL 的检测 buffer(40 mmol/L 三乙醇胺, 50 mmol/L Na_2HPO_4 , 5 mmol/L EDTA, pH 8.6)中孵育 30 min, 离心取上清, 测定其 OD_{340} 值。对照组省略 G-3-P。重复检测 3 次^[10]。

1.6 动物免疫

取健康家兔 25 只, 随机分成 5 组, 每组 5 只。其中 GapC 蛋白配以弗氏完全佐剂(1:1)免疫 2 组, 常规方法制备的全菌体灭活菌苗免疫 2 组, 对照

为 1 组。蛋白免疫组中 5 只家兔用于抗体及细胞因子水平检测, 5 只用于攻毒试验; 全菌体免疫组中 5 只用于抗体及细胞因子水平检测, 5 只用于攻毒试验。

蛋白免疫组首免采用颈部皮下多点注射 500 μ g 蛋白, 间隔 2 周, 腿部肌肉注射 300 μ g 进行加强免疫。全菌体免疫组采用相同免疫程序, 颈部皮下免疫, 每次免疫 1 mL(5×10^7 CFU/mL 灭活菌)。在免疫前二免后 7 d、14 d、21 d、28 d、35 d 进行采血, 每次采血 2 mL, 分离血清, -20°C 保存备用。

1.7 重组 GapC 蛋白的免疫原性检测

1.7.1 重组蛋白的 Western blotting 检测

未经诱导和 IPTG 诱导 4 h 的样品进行 SDS-PAGE。按半干法转印法将胶中的蛋白质将转移至 Nitrocellulose 膜上, 以稀释 1000 倍的二免 21 d 的兔血清为一抗; HRP 标记的羊抗兔为二抗(1:8000), DAB 为显色剂, 进行重组蛋白的免疫印迹检测。

1.7.2 IgG 水平的检测

将重组蛋白或全菌体抗原作适当稀释后, 包被 96 孔酶标板(10 μ g/孔), 以待检免疫血清为一抗, HRP 标记的羊抗兔为二抗, TMB 溶液为显色液, 进行间接 ELISA 检测, 测定样品 OD_{450} 的值, 反映出分离的血清样本中 IgG 含量。同时以样品 OD 值 \geq 阴性血清样品的 OD 值 + 3S(S 为标准方差)时对应的血清稀释度为该样品的效价。

1.7.3 细胞因子检测

按细胞因子 ELISA 定量检测试剂盒(BPB Biomedical)的操作步骤, 对二免 14 d 的蛋白免疫组及全菌体免疫组血清样本中的 IL-4 和 IFN- γ 浓度进行检测。根据标准品的浓度和 OD 值, 绘制标准曲线, 计算待检测样品中相应细胞因子的含量。特异性抗体和细胞因子产生水平均采用 SPSS10.0 统计软件进行统计学分析, 计量资料进行 t 检验。

1.8 攻毒试验

取 50 μ L -20°C 冻存的 *S. aureus* Wood46 菌液接种到 5 mL TSB 培养基中, 37°C 培养复壮后, 按平板计数法测定菌数, 取对数生长期的细菌用 PBS 离心洗涤, 稀释至终浓度为 1.0×10^8 CFU/mL。对二免后第 28 天的 GapC 蛋白免疫组、全菌体免疫组和对照组各 5 只家兔攻毒, 每只兔耳缘静脉注射 1 mL 菌液。跟踪观察并记录家兔的精神状态、进食、饮水、排

便、体温等体征表现。攻毒 5 d 后, 将存活家兔全部处死, 剖检观察病变, 同时无菌采取每只家兔的肝、脾和淋巴结, 进行细菌分离鉴定。根据家兔的临床表现、病理变化和细菌分离鉴定结果, 分析确定 GapC 重组蛋白疫苗的免疫效力。

2 结果

2.1 目的基因的获取及序列测定

S. aureus Wood46 株和分离株 BMSA/855/23-1 基因组 DNA 的 PCR 扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳, 均可见一条特异 DNA 条带, 与预期值大小 (1008 bp) 相符(图 1)。PCR 产物与 pMD18-T 载体连接后送上海生工公司测序, 结果该序列与 GenBank 上发表的 *S. aureus* BM10 株 *gapC* 基因序列(Accession No. AY356529)序列一致性为 99.3%, 推演的 *gapC* 氨基酸序列与 *S. aureus* BM10 GapC 氨基酸序列比较, 氨基酸序列一致性为 99.4%。将所得的氨基酸序列输入 NCBI 网页 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>, 经 Conserved Domain 查询, 结果输入氨基酸序列与 Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, NAD binding domain 相似。

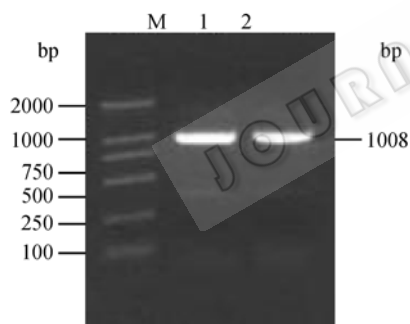


图 1 *S. aureus gapC* 基因 PCR 扩增产物的电泳分析结果
Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of PCR product of *S. aureus gapC* gene

M: DL2000 DNA marker; 1: PCR product of Wood46 strain;
2: PCR product of BMSA/855/23-1 strain

2.2 重组 GapC 蛋白原核表达载体的构建结果

对重组 pQE/gapC 质粒进行了 PCR 鉴定(图 2A)及酶切鉴定(图 2B)。结果, 重组质粒经 *Bam*H I、*Kpn* I 双酶切的 DNA 片段与实际大小 (3439 bp 及 1008 bp) 相符(图 2A); *Bam*H I 单酶切后可见两条 DNA 条带, 与实际大小 10 300 bp (pREP4) 及 4447 bp 相符(图 2B)。

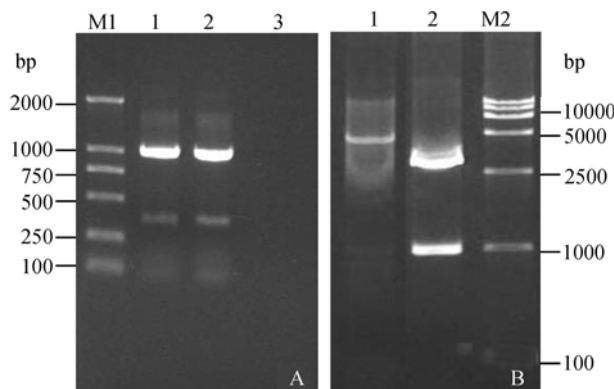


图 2 重组 pQE/gapC 质粒的 PCR 鉴定及酶切鉴定结果

Fig. 2 Identification of the recombinant pQE/gapC plasmids by PCR and restriction endonuclease digestion

M1: DL2 000 DNA marker; A1、A2: positive clones by PCR identification; A3: PCR negative clone; B1: pQE/gapC plasmid digested with *Bam*H I; 2: pQE/gapC digested with *Bam*H I & *Kpn* I; M: DNA marker DL15000

2.3 重组 GapC 蛋白的表达及蛋白检测结果

对重组的菌株 M15(pQE/gapC+pREP4) 和空质粒菌的诱导结果为, 表达的重组蛋白大小约在 35.0 kD 左右, 与 GapC 重组融合蛋白大小(36.8 kD)相符。Western blot 检测证实, 重组蛋白能与抗血清发生反应, 具有良好的反应原性(图 3)。

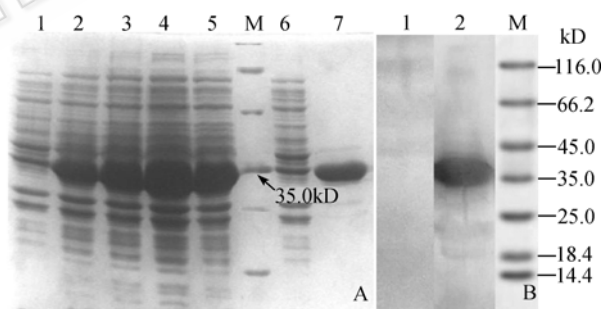


图 3 表达产物的 SDS-PAGE(A)和 Western blotting(B)分析

Fig. 3 SDS-PAGE (A) and Western blotting assay (B) of the expressed product

A1: uninduced *E. coli* M15 (pQE/gapC+pREP4); A2~A5: 3 h, 4 h, 5 h, 6 h induced *E. coli* M15 (pQE/gapC+pREP4) respectively; M: protein molecular weight marker; A6: 6 h induced *E. coli* M15 (pQE-30); A7: purified GapC protein; B1: Western blotting of uninduced *E. coli* M15 (pQE/gapC+pREP4); B2: Western blotting of the expressed product by using the anti-GapC serum from rabbits; M: protein molecular weight marker

2.4 重组蛋白的 GAPDH 活性检测结果

取 *S. aureus* 全菌体及纯化的重组蛋白 rGapC 各 5 μ g, 进行 GAPDH 活性检测, 结果用 OD_{340} 值表示。结果显示, 重组 GapC 蛋白三次检测结果平均 OD_{340} 值为 0.467, 明显高于全菌体蛋白(0.135), 和对照组

(0.012)。说明重组 GapC 蛋白比全菌体蛋白形成了较多的 NADH, 即具有较高的 GAPDH 活性(图 4)。

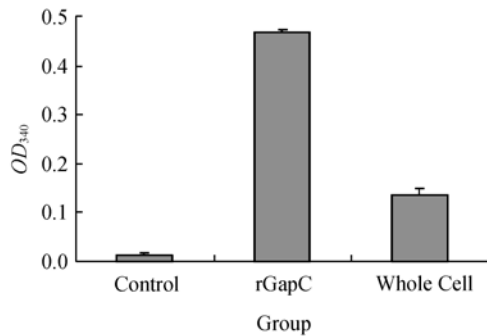


图 4 重组 GapC 蛋白 GAPDH 活性检测结果
Fig. 4 GAPDH activity assay results of the recombinant GapC protein

2.5 血清特异性抗体水平的检测

用 ELISA 法对各组兔血清中抗 GapC 抗体水平进行了测定。重组蛋白与全菌体加强免疫 2 周后, IgG 效价水平均可高达到 1:32 000 至 1:64 000。

将二免血清按 1:100 倍稀释进行间接 ELISA, 反映抗体消长水平。结果二免后蛋白及全菌体免疫组抗体水平均明显升高, 随着时间推移, 抗体效价缓慢上升, 二免后 28 d 达到高峰, 此后抗体效价有所下降。而对照组升高不明显(图 5)。

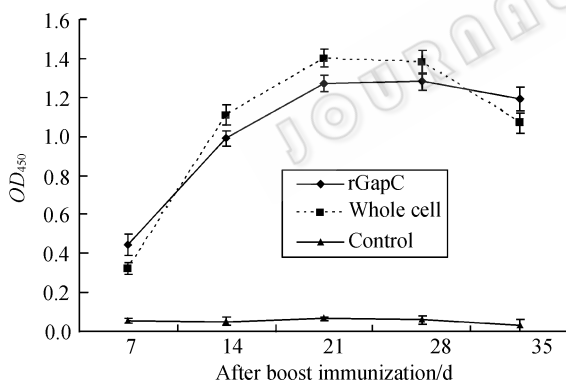


图 5 二免兔后血清 IgG 抗体消长曲线(n=5)
Fig. 5 Dynamic curves of antibody IgG from the serums of boost immunized rabbits(n=5)

2.6 免疫组及对照组兔血清细胞因子含量对比

应用细胞因子 ELISA 检测试剂盒对各组血清中 IFN- γ 及 IL-4 浓度进行定量检测。结果蛋白免疫组实验动物的 IFN- γ 及 IL-4 浓度与对照组比较差异均显著($P<0.05$); 蛋白免疫组 IFN- γ 及 IL-4 浓度与全菌体免疫组比较差异均显著($P<0.05$)。而全菌体免疫组两种细胞因子浓度与对照组比较差异均不显著

($P>0.05$)(表 1)。

表 1 免疫组及对照组兔血清细胞因子含量对比($X\pm S$)
Table 1 Concentrations of cytokines in sera of vaccine immunized and control rabbits($X\pm S$)

Group	n	IFN- γ	IL-4
A rGapC	5	182.9 \pm 12.4*	205.8 \pm 23.4*
B Whole cell	5	52.4 \pm 9.9**	60.7 \pm 11.4**
C Saline control	5	49.0 \pm 13.6	54.4 \pm 12.7

* $P<0.05$ vs groups B and C, ** $P>0.05$ vs group C

2.7 GapC 重组蛋白的免疫保护效果

2.7.1 攻毒后实验动物的临床表现

攻毒前连续观察 3 d, 试验家兔未见任何异常表现, 体温值在 38.5 $^{\circ}$ C~39.5 $^{\circ}$ C 之间。攻毒后, 1 只蛋白免疫组、2 只全菌体组的家兔出现临床症状; 而对照组家兔全部表现出明显的临床症状, 且有 1 只死亡。攻毒后所有家兔体温均升高, 但未表现临床症状的家兔体温升至 39.5 $^{\circ}$ C~40.2 $^{\circ}$ C, 2 d 后恢复至正常体温, 而表现出发病症状的家兔体温升至 41 $^{\circ}$ C 以上, 且 3 d 后体温仍高于 41.0 $^{\circ}$ C。

2.7.2 攻毒后实验动物的剖检结果

1 只蛋白免疫组、2 只全菌体组家兔剖检时可见肾脏显著肿大, 表面有出血点, 且分布有多处点状向内凹陷的病灶, 针尖至米粒大小, 其他未见异常。实验对照组家兔病理变化与免疫组家兔病理变化相似, 但病变程度较严重。

2.7.3 攻毒动物细菌分离结果

1 只蛋白免疫组、2 只全菌体免疫组表现出临床症状的家兔及所有对照组家兔脏器中均分离到与攻毒菌特性一致葡萄球菌, 而其他免疫家兔均未从脏器中分离到攻毒用的葡萄球菌。因此, 综合免疫组及对照组家兔在临床症状、剖检病理变化及攻毒菌分离鉴定结果, 认为重组 GapC 蛋白免疫实验家兔后对 *S. aureus* 攻击获得 4/5 免疫保护, 全菌体免疫组获得 3/5 免疫保护。

3 讨论

S. aureus 抗原成分复杂且菌株间保守性很差, 疫苗研制一直受到抗原选择方面的限制。具有 GAPDH 活性的 GapC 蛋白是 *S. aureus* 高度保守的表面蛋白, 在 Perez-Casal 等^[7]所检测的 11 株 *S. aureus* 奶牛乳房炎临床分离株中都存在编码该蛋白的基

因。这些特性使 GapC 蛋白具备了成为良好免疫抗原的必备条件。

在无机磷酸(Pi)和 NAD^+ 存在时, GAPDH 能够催化 G-3-P 氧化磷酸化成为 1, 3-二磷酸甘油酸, 反应脱下的氢和电子转给脱氢酶的辅酶 NAD^+ , 生成 NADH 和 H^+ , 因此可以通过检测 NADH 的形成来测定 GAPDH 活性, 而 NAD 的浓度变化可通过 OD 值来反映^[10]。本研究结果重组 GapC 蛋白具有较高的 GAPDH 活性, 而全菌体细胞壁本身也含有一定量 GapC 蛋白, 因而其 GAPDH 活性明显高于对照组。同时, 本研究所用的重组蛋白经 SDS 处理裂解为单链构象后, 仍具有较高的 GAPDH 活性, 表明蛋白的 GAPDH 活性为构象非依赖性的。

ELISA 结果表明在首免后多数兔血清中 IgG 水平迅速升高, 在二免 4 周时血清中 IgG 水平达到最高值(1:64000)。而 Perez-Casal^[11]等研究表明 GapC 蛋白的体液免疫水平在首免后 42 d 可达到 10^6 。其原因可能是实验动物的不同、所选用的佐剂差异或所建立的检测方法的精确度的差异等。本研究只检测了血清总 IgG 抗体水平, 而对具有凝集和抗毒素作用的 IgG1 及具有免疫调理作用的 IgG2a 亚型抗体水平没有进行探讨, 该方面的数据有待于进一步的试验加以补充完善。蛋白免疫组兔血清中 IFN- γ 和 IL-4 水平都有显著性升高($P < 0.05$), 而全菌体组变化不明显($P > 0.05$), 这可能与 *S. aureus* 全菌体复杂的抗原成分有关, 例如 *S. aureus* 荚膜多糖具有抗吞噬活性, 能阻止中性粒细胞识别抗细胞壁成分的抗体。荚膜多糖免疫原性弱, 不能引起抗体反应且为 T 细胞非依赖性抗原, 不能刺激产生细胞免疫^[1]。

为客观判定攻毒后实验动物发病的情况, 试验跟踪观察攻毒前后实验动物体温变化, 临床症状和病理变化, 对动物的组织脏器进行了细菌分离鉴定。攻毒后所有家兔体温均有不同程度的升高, 但免疫组家兔体温升高值较比对照组小, 短时间即回落至正常值, 表明免疫家兔虽有短暂的体温升高, 但可迅速恢复健康, 获得免疫保护。目前普遍认为 *S. aureus* 是一种细胞内寄生菌, 特异性细胞免疫应答是清除胞内菌, 达到防治病原体感染的关键^[12]。因而可以考虑应用基因疫苗策略, 将含保守性抗原基因的真核表达质粒导入机体, 使其在体内表达, 刺激机体产生特异性体液和细胞免疫, 达到防治感

染的目的^[13]。

REFERENCES

- [1] Archer GL. *Staphylococcus aureus*: A well-armed pathogen. *Clinical Infectious Disease*, 1998, **26**: 1179–1181.
- [2] Gil-Navarro I, Gil ML, Casanova M, *et al.* The glycolytic enzyme glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Candida albicans* is a surface antigen. *Journal of Bacteriology*, 1997, **179**: 4992–4999.
- [3] Argiro LL, Kohlstadt SS, Henri SS, *et al.* Identification of a candidate vaccine peptide on the 37 kD *Schistosoma mansoni* GAPDH. *Vaccine*, 2000, **18**: 2039–2048.
- [4] Rosinha GM, Myioshi A, Azevedo V, *et al.* Molecular and immunological characterization of recombinant *Brucella abortus* glyceraldehyde-3-phosphatedehydrogenase, a T- and B-cell reactive protein that induces partial protection when co-administered with an interleukin-12-expressing plasmid in a DNA vaccine formulation. *Journal of Medical Microbiology*, 2002, **51**: 661–671.
- [5] Argiro LL, Kohlstadt SS, Henri SS, *et al.* Identification of a candidate vaccine peptide on the 37 kD *Schistosoma mansoni* GAPDH. *Vaccine*, 2000, **18**: 2039–2048.
- [6] Muller-Schollenberger V, Beyer W, Schinitzler P, *et al.* Immunization with *Salmonella* typhimurium-delivered glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase protects mice against challenge infection with *Echinococcus multilocularis* eggs. *International Journal for Parasitology*, 2001, **31**: 1441–1449.
- [7] Goji N, Potter AA, Perez-Casal J, *et al.* Characterization of two proteins of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine clinical mastitis with homology to glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Veterinary Microbiology*, 2004, **99**: 269–279.
- [8] Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, *et al.* Short Protocols in Molecular Biology, 2nd ed. New York: John Wiley & Sons Press, 1995.
- [9] Sambrook J, Russell D. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd eds. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- [10] Modun BR, Williams P. The *Staphylococcal* transferrin-binding protein is a cell wall glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Infection and Immunity*, 1999, **67**(3): 1086–1092.
- [11] Perez-Casal J, Prysliak T, Kerro-Dego O, *et al.* Immune responses to a *Staphylococcus aureus* GapC/B chimera and its potential use as a component of a vaccine for *S. aureus* mastitis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 2006, **109**: 85–97.
- [12] Donnelly JJ, Liu MA, Ulmer JB. Antigen presentation and DNA vaccines. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 2000, **162**: 190–193.
- [13] Kerro-Dego O, Prysliak T, Potter AA, *et al.* DNA-protein immunization against the GapB and GapC proteins of a mastitis isolate of *Staphylococcus aureus*. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 2006, **13**: 125–138.