

doi: 10.7668/hbxb.2014.05.008

# 牛源性无乳链球菌分离鉴定及 *cfb* 基因的克隆和真核表达载体的构建

阾 威<sup>1</sup>,王 华<sup>1</sup>,马友记<sup>2</sup>,赵兴绪<sup>1</sup>,张 勇<sup>1</sup>

(1. 甘肃农业大学 动物医学院,甘肃 兰州 730070; 2. 甘肃农业大学 动物科学技术学院,甘肃 兰州 730070)

**摘要:**为研制奶牛乳房炎无乳链球菌的基因工程疫苗,采集隐性奶牛乳房炎奶样,利用 THB( Todd-Hewitt Broth) 固体选择培养基和色素试验,并结合无乳链球菌种属特异性基因 *cfb*,采用 PCR 技术从隐性乳房炎奶样中分离和鉴定无乳链球菌。根据 GenBank 已报道的链球菌 *cfb* 基因序列,经 ORF 分析和 B 细胞表位预测,利用 Primer 5.0 软件设计 *cfb* 因子富含 B 细胞表位区域引物,添加酶切位点和真核表达元件,以分离株无乳链球菌的基因组为模板,PCR 扩增 *cfb* 基因并连接 T 载体克隆测序,经测序确定无误后,连接 pcDNA<sup>TM</sup> 3.1 V5-His A( pcDNA-*cfb*) 真核载体,转化 DH5 $\alpha$  感受态细胞,提取重组质粒进行酶切和测序鉴定。结果显示,从 89 份隐性奶牛乳房炎奶样中分离得到 8 株无乳链球菌,成功构建了真核表达载体( pcDNA-*cfb*)。THB 和色素试验初步筛选,可以作为快速分离无乳链球菌的一种方法,利用 Bcepred 和 Lasergene-Protean 软件对分离得到的无乳链球菌 *cfb* 基因序列分析,在所克隆的 *cfb* 基因序列内有多优势抗原表位,因此,有望作为无乳链球菌基因工程疫苗研制的抗原靶标基因序列,为进一步研究其基因工程疫苗提供基础条件。

**关键词:** 奶牛隐性乳房炎; 无乳链球菌; *cfb* 基因; 真核载体构建

中图分类号: Q78 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2014)05-0039-06

## Construction of Eukaryotic Expression Vector of *cfb* Gene from Bovine *Streptococcus agalactiae*

KAN Wei<sup>1</sup>, WANG Hua<sup>1</sup>, MA You-ji<sup>2</sup>, ZHAO Xing-xu<sup>1</sup>, ZHANG Yong<sup>1</sup>

(1. College of Veterinary Medicine, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China;

2. Faculty of Animal Science and Technology, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China)

**Abstract:** In order to develop genetic engineering subunit vaccine, milk samples of cows with subclinical mastitis were collected. THB( Todd-Hewitt Broth) solid selective medium and pigment test were adopted, combined with species specific gene *cfb* to isolate and identify *Streptococcus agalactiae*. ORF and B cell epitope analysis were carried out according to the *cfb* gene sequences published in GenBank. Primers designed with Primer 5 in *cfb*'s B cell epitope enriched sequence and eukaryotic expression elements and restriction enzyme sites were added. Genome DNA of the isolates were extracted and served as PCR templates for *cfb* amplification, prior to link with the T-A cloning vector for sequencing. Correctly cloned *cfb* sequence were then linked to the pcDNA<sup>TM</sup> 3.1 V5-His A( pcDNA-*cfb*) and transformed to DH5 $\alpha$  competent cell for plasmid proliferation and sequencing. Results showed 8 strains of *Streptococcus agalactiae* were characterized from 89 milk samples, and the pcDNA-*cfb* was successfully constructed. Primary selection by THB selective medium and pigment test could be used for quick isolation of *Streptococcus agalactiae*. Analysis of the *cfb* sequence by Bcepred and Lasergene-Protean software showed the cloned *cfb* sequence contained multiple dominant B cell epitope, thus had the potential to serve as target gene sequence for genetic engineering subunit vaccine of *Streptococcus agalactiae*. This work could served as the basis for further developing genetic engineering subunit vaccine for *Streptococcus agalactiae*.

收稿日期: 2014-08-09

基金项目: “十二五”农村领域国家科技计划项目(2011AA10A210); 兰州市科技局科技三项(033143)

作者简介: 阾 威(1986-),男,甘肃武威人,硕士,主要从事临床兽医学研究。

通讯作者: 赵兴绪(1962-),男,甘肃定西人,教授,博士,博士生导师,主要从事临床兽医学和发育生物学研究。

张 勇(1970-),男,陕西西安人,教授,博士,博士生导师,主要从事临床兽医学研究。

**Key words:** Recessive bovine mastitis; *Streptococcus agalactiae*; *cfb* gene; Eukaryotic expression vector

无乳链球菌( Group B *Streptococci* or GBS) 是人和动物常见的条件性病原菌之一。早在 1887 年就有引起牛乳房炎的报道,而对人的感染仅在 50 年前才发现。现已确认,GBS 可引起奶牛乳房炎,人类主要是败血症、脑膜炎和心内膜炎<sup>[1-4]</sup>。在其黏附并定植于宿主细胞,免疫逃避和适应宿主环境方面与多种毒力因子相关<sup>[5-6]</sup>。CAMP 因子( *cfb* 基因编码) 是 GBS 分泌的一种溶血性物质,当 GBS 与金黄色葡萄球菌呈十字交叉共培养与血平板时,其交界部分会产生箭头状或半月形的特异溶血现象,被广泛用于 GBS 的生化鉴定<sup>[7-8]</sup>。实际上,血液中红细胞被潜在的鞘磷脂水解酶( 葡萄球菌和其他多种细菌分泌的一种蛋白) 第一次激活时,无乳链球菌 CAMP 因子即可引起红细胞的溶解<sup>[9]</sup>。鞘磷脂是红细胞膜成分,鞘磷脂水解酶一旦溶解红细胞膜中至少 45% 的鞘磷脂就会导致红细胞膜受损<sup>[10]</sup>。

CAMP 因子分别可以导致兔、鼠和人类的红细胞膜鞘磷脂 19%、25%、27% 溶解,因此,这些物种对 CAMP 因子不敏感。而对山羊、绵羊和奶牛红细胞膜的鞘磷脂溶解性分别达到了 46%、51% 和 52%<sup>[10-11]</sup>。CAMP 因子本身没有酶活性,但有试验表明,其单体可以结合并寡聚体化红细胞膜成分,尤其是糖基磷脂酰肌醇锚定蛋白,在红细胞膜上形成一个孔,造成绵羊、奶牛等红细胞的溶血<sup>[7,12]</sup>,所以可选用羊血平板进行 GBS 的 CAMP 试验。研究证实,动物机体的免疫球蛋白 IgG 和 IgM 的 Fc 片段能与 CAMP 因子基因相结合,从而可以激活 IgG 和 IgM 的 Fab 片段活性<sup>[13]</sup>,在机体抗感染免疫功能中发挥作用<sup>[5]</sup>。如果将纯化的 CAMP 因子静脉注射给家兔,可导致家兔迅速死亡,因而推测 CAMP 因子是一种主要的致病因子。国内外已有个别有关 CAMP 因子克隆和原核表达的研究<sup>[14-17]</sup>,但尚不全面。本试验借助 GBS 选择性培养基和特异生化反应,结合其特有的 *cfb* 基因快速分离得到了无乳链球菌,预测其抗原性,构建真核表达载体 pcDNA<sup>TM</sup>3.1 V5-His A-*cfb*,为无乳链球菌基因工程疫苗的研制提供基础材料。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

1.1.1 待检材料 89 份隐形乳腺炎奶样,采自宁夏吴忠市的 3 个奶牛场。

1.1.2 菌株 无乳链球菌标准菌株( 中国农业科学院兰州畜牧兽医研究所李宏胜研究员惠赠) 大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态细胞( 北京全式金公司)。

1.1.3 主要试剂和设备 试剂: THB 固体培养基、色素试验培养基、pGEM-T easy 载体、LB 固体、液体培养基,各种工具酶购自 Promega 公司,pcDNA<sup>TM</sup>3.1 V5-His A 真核载体购自 Invitrogen 公司,DNA 提取试剂盒、回收试剂盒购自北京全式金公司。

设备: 显微镜、恒温培养箱( DHP-9160B)、梯度 PCR 扩增仪( Bio-RAD, Mexico)、凝胶成像系统( Bio-RAD, USA)、DYY-42 型电脑三恒多用电泳仪与 DY-CP-31A 型电泳槽( 北京六一仪器厂)、超微量紫外分光光度计( 德国 Implen)。

1.1.4 引物 无乳链球菌 16S RNA 鉴定引物: 根据已报道的无乳链球菌( GenBank: JQ289586. 1) 16S RNA 基因的保守序列,设计 1 对引物:

上游引物: 5'-CTGGTCTAAGGAGTTGCGAACGGG-3';

下游引物: 5'-ATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACGC-3'。

无乳链球菌 CAMP 因子基因克隆加鉴定引物: 利用已报道的无乳链球菌 *cfb* 基因序列以及酶切位点分析在其开放阅读框( ORF) 两侧设计 1 对引物: 上游引物: 5'-AACGCTCGAGTTTTTCATTGCGTGCC AACCC-3', 包含一个 *Xho* I 的酶切位点; 下游引物: 5'-ACTGAAGCTTCTGTTTGAAGTGCTGCTTGTAATG-3', 包含一个 *Hind* III 酶切位点。

重组质粒检测或测序引物:

上游引物: T7 Promoter: 5'-TAATACGACTCACT ATAGGG-3';

下游引物: BGH Reverse: 5'-TAGAAGGCACAGT AGAGG-3'。引物由上海生工生物工程有限公司合成,PCR 扩增条件如下表 1。

表 1 基因扩增使用的引物

Tab. 1 Primers for gene amplification

基因名称 Gene name	引物序列 Primer sequences	退火温度/℃ T <sub>m</sub>	片段长度/bp Length
16S rRNA	F: 5'-CTGGTCTAAGGAGTTGCGAACGGG-3' R: 5'-ATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACGC-3'	56.0	721
<i>cfb</i>	F: 5'-AACGCTCGAGTTTTTCATTGCGTGCC AACCC-3' R: 5'-ACTGAAGCTTCTGTTTGAAGTGCTGCTTGTAATG-3'	57.0	492

## 1.2 方法

1.2.1 无乳链球菌的快速分离 将采集的奶样作为菌株分离样品,用移液器移取 100  $\mu$ L 奶样均匀涂布于 THB 固体培养基上,37  $^{\circ}$ C 培养 18~24 h,挑取灰白色、表面光滑、边缘整齐、直径 0.5~0.75 mm 的细小菌落,转入色素培养基中进行穿刺培养,37  $^{\circ}$ C 培养 18~24 h 后,随机挑取一株穿刺线为黄色的菌落,在 THB 固体培养基上纯化培养,进行革兰氏染色镜检。

提取已纯化菌株的 DNA 作为 PCR 扩增模板,以表 1 引物及条件,扩增其 16S rRNA 基因和 *cfb* 基因,经连接转化并准确测序,测序结果在线 Blast 检测,以鉴定无乳链球菌。

1.2.2 无乳链球菌 *cfb* 基因的克隆测序 参照表 1 无乳链球菌 *cfb* 基因引物和 PCR 扩增条件,以分离株无乳链球菌 DNA 为模板,扩增其加酶切位点的 *cfb* 基因序列。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳回收,连接 pGEM-T 载体,转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$ ,经蓝白斑筛选, *Xho* I、*Hind* III 双酶切鉴定以及测序鉴定。

1.2.3 分离株无乳链球菌 *cfb* 基因序列分析 将上一步鉴定为阳性克隆菌液送往上海生工生物工程有限公司测序,测序所得基因序列采用 Bcepred、Lasergene-Protean 和 Lasergene-MegAlign 软件进行 B 细胞抗原表位预测分析和序列同源性分析。

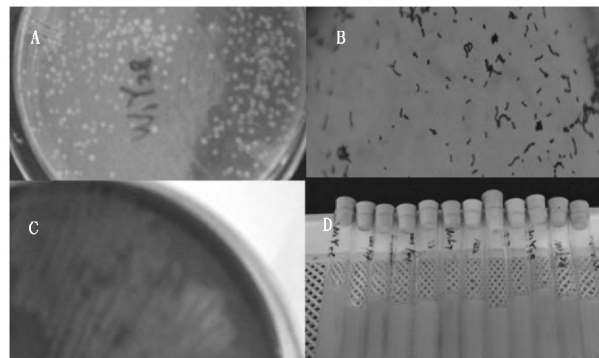
1.2.4 无乳链球菌 *cfb* 基因真核表达载体质粒的构建 利用 *Xho* I、*Hind* III 双酶切 pGEM-T-*cfb*,回收 492 bp 片段,pcDNATM 3.1A 同样酶切,T<sub>4</sub> DNA 连接酶 16  $^{\circ}$ C 过夜连接,连接液转化 DH5 $\alpha$  感受态细胞,构建重组表达质粒 pcDNA<sup>TM</sup>3.1 V5-His A-*cfb*,经蓝白斑筛选后,将阳性菌落接种于加有氨苄抗性的 LB 液体培养基中,37  $^{\circ}$ C 振荡过夜培养,提取质粒进行 *Xho* I、*Hind* III 双酶切鉴定以及 PCR 鉴定。

## 2 结果与分析

### 2.1 无乳链球菌分离结果

利用 THB 固体培养基从奶样中分离 45 株疑似链球菌,将疑似链球菌穿刺接种于色素试验培养基中,其中有 12 株疑似链球菌 (W3Y6、W1Y1、W1Y29、W1Y19、W1Y44、W1Y7、W1Y56、W1Y28、W2Y2、W2Y10、W1Y26、W1Y21) 使色素培养基变为黄色,可初步判定为疑似无乳链球菌。疑似无乳链球菌在 THB 固体平板上培养菌落均为白色、圆形、湿润、光滑、微隆起、边缘整齐。菌体为球形或卵圆形,直径 0.5~2.0  $\mu$ m,而在 THB 液体培养基培养时菌体多呈双个或短链状排列,革兰氏染色

呈阳性反应,血琼脂平板呈现  $\beta$  溶血(图 1)。



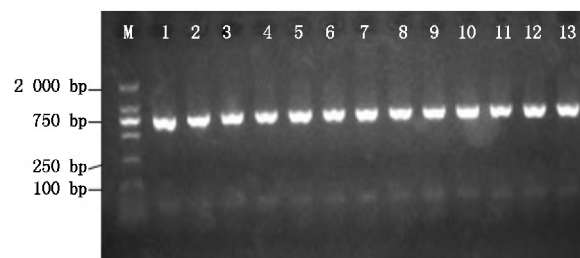
A. THB 选择培养无乳链球菌; B. 疑似无乳链球菌镜检结果; C. 疑似无乳链球菌溶血; D. 色素试验。

A. *Streptococcus agalactiae* on THB selective medium; B. Suspected *Streptococcus agalactiae*; C.  $\beta$ -hemolysis of suspected *Streptococcus agalactiae*; D. Islam medium assay.

图 1 无乳链球菌的分离

Fig. 1 Isolation of *Streptococcus agalactiae*

对奶样中分离的 12 株疑似无乳链球菌进行 PCR 鉴定,结果显示,经 PCR 扩增后,被检测的 12 株细菌都可以扩增出预期大小的 16S rRNA 基因序列(图 2),而 12 株中有 8 株可以扩增出预期大小的 *cfb* 的基因序列(图 3),条带单一,特异性好。回收 *cfb* 基因扩增产物,经连接转化后准确测序,序列在线 Blast 检测,检测结果显示,8 株分离株 (W3Y6、W1Y1、W1Y29、W1Y19、W1Y44、W1Y7、W1Y56、W1Y28) *cfb* 基因同已报道无乳链球菌序列具有高度同源性(>99.0%)。综合选择性培养的生理生化特性与分子鉴定结果,可判定所分离的菌株为无乳链球菌。



M. 2000 DNA Marker; 1. 标准菌株; 2. W3Y6; 3. W1Y1; 4. W1Y29; 5. W1Y19; 6. W1Y44; 7. W1Y7; 8. W1Y56; 9. W1Y28; 10. W2Y2; 11. W2Y10; 12. W1Y26; 13. W1Y21。图 3 同。

M. 2000 DNA Marker; 1. Standard strain; 2-13. Isolates strains. The same as Fig. 3.

图 2 分离株 16S rRNA 基因的 PCR 扩增

Fig. 2 Amplification of 16S rRNA gene for the isolated bacteria

### 2.2 无乳链球菌 *cfb* 基因克隆和测序结果

以任意分离株无乳链球菌的 DNA 为模板,PCR 扩增其 *cfb* 基因片段,PCR 产物经 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测分析,发现在接近 500 bp 处有 1 条特异性的 DNA 片段条带,与预期目的基因片段大小相近。回收其目的基因片段,转化 DH5 $\alpha$  感受态细胞,经蓝

白斑选择后,挑取阳性克隆测序,测序结果显示,分离株无乳链球菌 *cfb* 基因与 GenBank 登录号 JQ289562.1、JQ289578.1、JQ289563.1、JQ289567.1、JQ289585.1、GU217532.1、HQ148672.1、JQ289575.1、X72754.1、JQ289564.1、JQ289568.1、EF694027.1、JQ289562.1 的菌株同源率为 99%。

### 2.3 分离株无乳链球菌 *cfb* 克隆基因序列分析结果

采用 Bcepred 和 Lasergene-Protean 软件通过亲水性方案 (Hydrophilicity)、柔韧性方案 (Flexibility)、抗原指数方案 (Antigenic index)、表面可及性 (Surface probability) 4 种参数对已克隆目的基因蛋

白序列进行 B 细胞表位初步预测,确定 *cfb* 的优势抗原表位的氨基酸残基为 2 ~ 10、88 ~ 98、99 ~ 108、109 ~ 118 位 (图 4)。

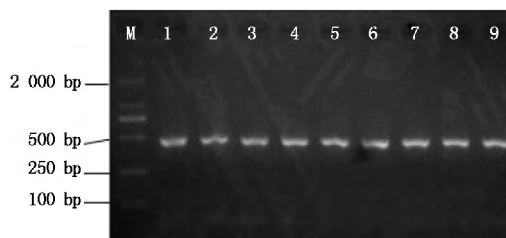


图 3 分离株 *cfb* 基因克隆

Fig. 3 Amplification of *cfb* gene for the isolated bacteria

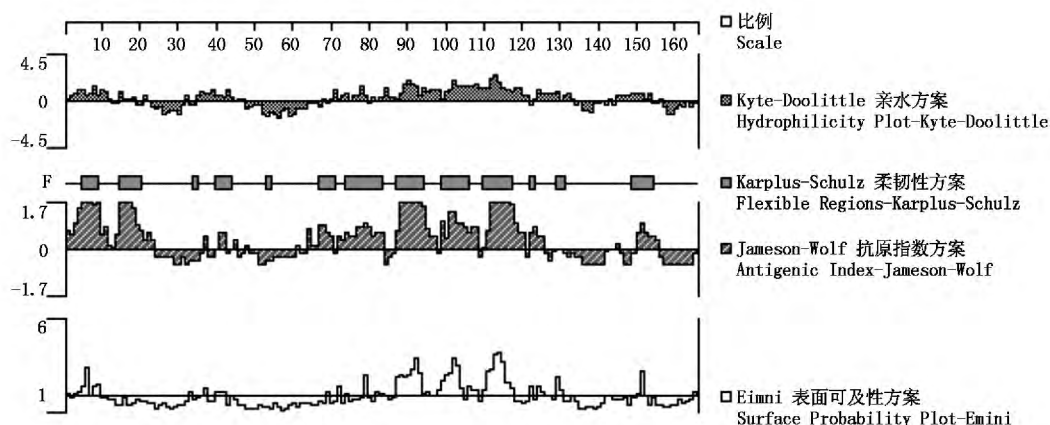


图 4 分离株无乳链球菌株的 B 细胞抗原表位初步预测

Fig. 4 B cell antigen epitope preliminary forecast of isolates strain *streptococcus agalactiae*

采用 Lasergene-MegAlign 对 *cfb* 基因进行同源性和进化分析,分析结果如图 5 所示。分离株 14 号与已报道菌株 (1 ~ 12 号) 同源性  $\geq 98.0\%$ , 与 13

号菌株为 97.8%。进化树分析可以看出分离株与已报道组处于 2 个群,已报道组菌株位于 1 个群,而分离株菌株单独处于 1 个群。

		同源性 Percent identity														Divergence	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14		
趋异性	1		99.4	99.2	99.2	99.2	99.2	99.2	99.0	99.0	99.0	99.0	98.8	98.6	1	JQ289562.1	
	2	0.2		99.0	99.0	99.0	99.0	99.0	99.0	98.8	98.8	98.8	98.6	98.4	2	EF694027.1	
	3	0.4	0.6		99.6	99.6	99.6	99.6	99.6	99.4	99.4	99.4	99.2	98.2	3	HQ148672.1	
	4	0.4	0.6	0.0		99.6	99.6	99.6	99.6	99.4	99.4	99.4	99.2	98.2	4	JQ289567.1	
	5	0.4	0.6	0.0	0.0		99.6	99.6	99.6	99.4	99.4	99.4	99.2	98.2	5	JQ289575.1	
	6	0.4	0.6	0.0	0.0	0.0		99.6	99.6	99.4	99.4	99.4	99.2	98.2	6	JQ289563.1	
	7	0.4	0.6	0.0	0.0	0.0	0.0		99.6	99.4	99.4	99.4	99.2	98.2	7	JQ289568.1	
	8	0.4	0.6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0		99.4	99.4	99.4	99.2	98.2	8	JQ289565.1	
	9	0.6	0.8	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2		99.6	99.2	99.2	99.0	98.0	9	JQ289586.1
	10	0.6	0.8	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.0		99.2	99.2	99.0	98.0	10	JQ289585.1
	11	0.4	0.6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.2	0.2		99.2	99.0	98.0	11	JQ289578.1
	12	0.6	0.8	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.4	0.4	0.2		99.0	98.0	12	GU217532.1
	13	0.8	1.0	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.6	0.6	0.6	0.6		97.8	13	X72754.1
	14	0.8	1.0	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2	1.4	1.4	1.2	1.4	1.7		14	Isolates

1 ~ 13, GenBank 已报道菌株; 14. 分离株。

1 - 13, GenBank reported strains; 14. Isolated strain.

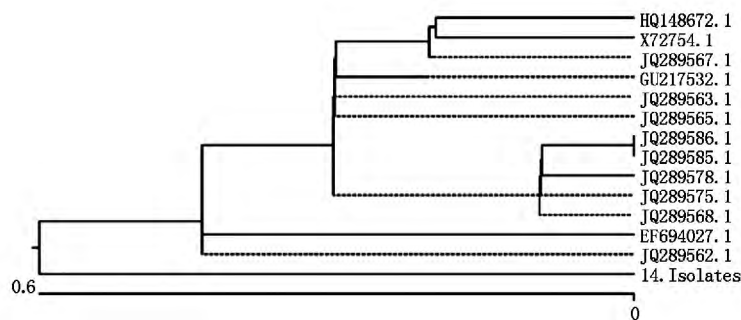
图 5 分离株与已报道菌株 *cfb* 基因同源性比较

Fig. 5 Isolated strain compared with reported strain *cfb* gene homology

### 2.4 无乳链球菌 *cfb* 基因真核表达载体的构建结果

将所克隆的 *cfb* 基因组入 pcDNA<sup>TM</sup>3.1 V5-His A 构建真核表达质粒 pcDNA<sup>TM</sup>3.1 V5-His A-*cfb*, 提取质粒经 *Xho* I 和 *Hind* III 双酶切后在 500 bp 略下和 5 000 bp 以上各有 1 条 DNA 条带, 并进 PCR 检

测同样在接近 500 bp 处有一条特异性条带 (图 7、8)。重组质粒测序显示, 在 pcDNA<sup>TM</sup>3.1 V5-His A 真核载体多克隆位点出现 *cfb* 目的基因序列, 说明重组质粒构建成功。

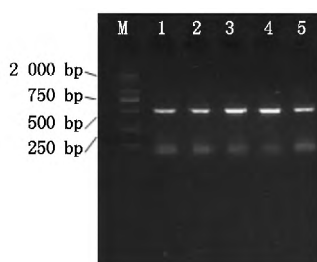


14. 分离株; 其他为已报道菌株。

14. Isolated strain; The other is reported strains.

图 6 分离株与已报道菌株进化树分析

Fig. 6 Isolated strain and reported strain evolutionary tree analysis

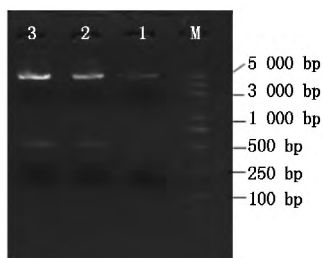


M. 2000 DNA Marker; 1 ~ 5: 阳性克隆。

M. 2000 DNA Marker; 1 ~ 5. Positive clones.

图 7 重组质粒 PCR 检测

Fig. 7 Recombinant plasmid PCR detection



M. 2000 bp DNA Marker; 1 ~ 3. 不同浓度重组质粒酶切鉴定。

M. 2000 bp DNA Marker. 1 ~ 3. Enzymolysis identification of recombinant plasmid with different concentration.

图 8 重组质粒酶切鉴定

Fig. 8 Enzymolysis identification of recombinant plasmid

### 3 讨论

对奶样中无乳链球菌可以利用 THB 固体选择性培养基及色素培养基达到快速分离的结果,其中在 THB 固体培养基中加入 0.1 ~ 0.2  $\mu\text{g/mL}$  结晶紫可以抑制奶样中革兰氏阳性的葡萄球菌生长,奶样中革兰氏阴性杆菌可以加入多粘菌素 B 15  $\mu\text{g/mL}$  抑制其生长。无乳链球菌在 THB 固体选择培养基上呈灰白色、表面光滑、边缘整齐的细小菌落,而在血琼脂平板上呈  $\beta$  或  $\alpha$  溶血,转入色素培养基穿刺培养使穿刺线为黄色<sup>[18]</sup>。通过 THB 固体选择培养基和色素试验项目鉴定 12 株分离菌,初步判定分离菌株为无乳链球菌。进一步通过 16S rRNA 基因和 *cfb* 基因对这些分离株进行分子鉴定,确定其中 8 株

为无乳链球菌。

兰氏分群中作为 B 群的无乳链球菌是奶牛乳房炎的主要致病菌,本试验从宁夏吴忠患乳房炎奶样中分离得到无乳链球菌,并提取其基因组 DNA,利用 PCR 技术,成功地克隆出无乳链球菌 CAMP 因子(*cfb* 基因)的基因序列。测序结果显示,克隆的基因片段与预期克隆的无乳链球菌 CAMP 因子基因长度、大小一致,与已报道的无乳链球菌 CAMP 因子的基因序列(GenBank: JQ289586.1)相比,有 5 个碱基位点发生突变,第 121 位 T 突变为 G,第 163 位 G 突变为 A,第 241 位 A 突变为 G,第 319 位 C 突变为 T,第 331 位 C 突变为 T,同源率为 99%。

利用基因重组技术,本试验成功地将已克隆并经测序分析的 CAMP 因子基因导入表达型真核载体质粒 pcDNA<sup>TM</sup>3.1 V5-His A 中,经软件分析,所得基因序列内部无 *Xho* I 和 *Hind* III 酶切位点,pcDNA<sup>TM</sup>3.1A 经上述 2 种酶切后,不会影响基因序列编码区的内部结构。

对于无乳链球菌所能表现的 CAMP 现象,很久以来一直被作为实验室检测或诊断无乳链球菌的一个重要试验<sup>[19-23]</sup>。因此,设计无乳链球菌 CAMP 因子基因的特异性引物,PCR 扩增其特异性基因片段,可以作为无乳链球菌的鉴定或临床诊断的一个重要指标。现研究证实,CAMP 因子是无乳链球菌的一种重要致病因子,因而本试验通过分子生物学方法并结合无乳链球菌部分生化特征,可快速鉴定并分离无乳链球菌,为进一步开展奶牛链球菌性乳房炎的流行病学调查及其病原菌分布的研究提供数据支持。有研究表明<sup>[21-23]</sup>,在动物机体全身感染中,CAMP 因子的释放会导致宿主细胞免疫应答效应的降低,从而导致动物机体的感染加重。在试验研究中克隆并表达无乳链球菌的 CAMP 因子蛋白,对阐明它在宿主体内的作用机理及其免疫原性研究有重要意义,为奶牛乳腺炎无乳链球菌基因工程疫

苗的研究提供基本材料。

### 参考文献:

- [1] Farley M M. Group B streptococcal disease in nonpregnant adults [J]. *Clinical Infectious Diseases* 2001 33 ( 4 ) : 556 – 561.
- [2] Martins E R ,Florindo C ,Martins F ,et al. Streptococcus agalactiae serotype Ib as an agent of meningitis in two adult nonpregnant women [J]. *Journal of Clinical Microbiology* 2007 45 ( 11 ) : 3850 – 3852.
- [3] Cordoba-Lopez A ,Bueno Alvarez-Arenas M I ,Monterrubio-Villa J ,et al. Streptococcus agalactiae pleural empyema in a healthy adult [J]. *Enferm Infecc Microbiol Clin* , 2002 20: 478 – 479.
- [4] Keefe G P. Streptococcus agalactiae mastitis: a review [J]. *The Canadian Veterinary Journal La Revue Vétérinaire Canadienne* 1997 38 ( 7 ) : 429 – 437.
- [5] Rajagopal L. Understanding the regulation of Group B streptococcal virulence factors [J]. *Future Microbiology* , 2009 4 ( 2 ) : 201 – 221.
- [6] Maisey H C ,Doran K S ,Nizet V. Recent advances in understanding the molecular basis of group B streptococcus virulence [J]. *Expert Rev Mol Med* 2008 10: e27.
- [7] Lang S H ,Palmer M. Characterization of streptococcus agalactiae CAMP factor as a pore-forming toxin [J]. *Journal of Biological Chemistry* 2003 278 ( 40 ) : 38167 – 38173.
- [8] Munch-Petersen E ,Christie R. Further notes on a lytic phenomenon shown by group B streptococci [J]. *The Australian Journal of Experimental Biology and Medical Science* 1945 23: 193 – 195.
- [9] Milhas D ,Clarke C J ,Hannun Y A. Sphingomyelin metabolism at the plasma membrane: implications for bioactive sphingolipids [J]. *FEBS Letters* 2010 584 ( 9 ) : 1887 – 1894.
- [10] Titball R W. Bacterial phospholipases C [J]. *Microbiological Reviews* 1993 57 ( 2 ) : 347 – 366.
- [11] Rodi P M ,Cabeza M S ,Gennaro A M. Detergent solubilization of bovine erythrocytes. Comparison between the insoluble material and the intact membrane [J]. *Biophysical Chemistry* 2006 122 ( 2 ) : 114 – 122.
- [12] Lang S ,Xue J ,Guo Z ,et al. Streptococcus agalactiae CAMP factor binds to GPI-anchored proteins [J]. *Medical Microbiology and Immunology* 2007 196 ( 1 ) : 1 – 10.
- [13] Jorgens D ,Sterzik B ,Jehrenbach F J. Unspecific binding of group B streptococcal coccylolysin ( CAMP factor ) to immunoglobulins and its possible role in pathogenicity [J]. *Journal of Experimental Medicine* 1987 165 ( 3 ) : 720 – 732.
- [14] Schneewind O ,Friedrich K ,Lütticken R. Cloning and expression of the CAMP factor of group B streptococci in *Escherichia coli* [J]. *Infection and Immunity* 1988 56 ( 8 ) : 2174 – 2179.
- [15] Gase K ,Ferretti J J ,Primeaux C ,et al. Identification , cloning and expression of the CAMP factor gene ( cfa ) of group A streptococci [J]. *Infection and Immunity* , 1999 67 ( 9 ) : 4725 – 4731.
- [16] Jiang M ,Babiuk L A ,Poner A A. Cloning ,sequencing and expression of the CAMP factor gene of *Streptococcus uberis* [J]. *Microbial Pathogenesis* 1996 20 ( 5 ) : 297 – 307.
- [17] Frey J ,Perrin J ,Nicolet J. Cloning and expression of a cohemolysin ,the CAMP factor of *Actinobacillus pleuropneumoniae* [J]. *Infection and Immunity* 1989 57 ( 7 ) : 2050 – 2056.
- [18] Stackbrandt E ,Goodfellow M. Nucleic acid techniques in bacteri systematics [M]. Newyork: awiley-interscience publication 1991: 115 – 175.
- [19] Darling C L. Standardization and evaluation of the CAMP reaction for the prompt presumptive identification of *Streptococcus agalactiae* ( Lancefield group B ) in clinical material [J]. *Clin Microbiol* 1975 1 ( 2 ) : 171 – 174.
- [20] Phillips E A ,Tapsall J W ,Smith D D. Rapid tube CAMP test for identification of *Streptococcus agalactiae* ( Lancefield group B ) [J]. *Journal of Clinical Microbiology* , 1980 12 ( 2 ) : 135 – 137.
- [21] Brown J ,Farnsworth R ,Wannamaker L W ,et al. CAMP factor of group B streptococci: production , assay , and neutralization by sera from immunized rabbits and experimentally infected cows [J]. *Infection and Immunity* , 1974 9 ( 2 ) : 377 – 383.
- [22] Podbielski A ,Blankenstein O ,Lütticken R. Molecular characterization of the cfb gene encoding group B streptococcal CAMP-factor [J]. *Med Microbiol Immunol* , 1994 183 ( 5 ) : 239 – 256.
- [23] Takaisi-Kikuni N B ,Jurgens D ,Wecke J ,et al. Immunohistochemical localization of CAMP factor ( protein B ) in *Streptococcus agalactiae* [J]. *Microbios* 1997 89 ( 360 / 361 ) : 171 – 185.