

技术方法

DOI: 10.13406/j.cnki.cyxh.000140

金黄色葡萄球菌表面蛋白 SdrE 的表达、纯化及晶体生长

张绍城¹, 郭 珍¹, 张宏鹏¹, 苟冶然³, 龙小滨³, 汪德强²

(重庆医科大学 1. 检验医学院; 2. 感染性疾病分子生物学教育部重点实验室; 3. 附属第一医院内科, 重庆 400016)

【摘要】目的:对金黄色葡萄球菌表面蛋白质 (serine-aspartate repeat, SdrE) 进行克隆表达纯化及晶体培养, 以期解析其三维结构, 进而深入分析金黄色葡萄球菌感染的分子机制, 为研发新的抗菌药物提供基础。**方法:**利用 PCR 技术扩增 SdrE 基因, 构建重组质粒 pW28-SdrE, 并在大肠杆菌 (*Escherichia coli*, *E.coli*) B834 中表达, 用 Ni²⁺-NTA 亲和层析柱和 DEAE 阴离子交换层析柱纯化 SdrE 蛋白质, 再用 Hiload Superdex 200 凝胶层析柱分析其在溶液中的聚集状态, 用 Hampton 试剂盒初筛晶体及棋盘法优化晶体。**结果:**(1) 构建了重组质粒 pW28-SdrE, 并在 *E.coli* B834 中可溶性表达。(2) 获得了纯度较高 (85%) 的 SdrE 蛋白质, 该蛋白质在溶液中以单体形式存在。(3) 培养出晶形较好、衍射能力较强的 SdrE 蛋白质单晶。**结论:**利用经典的蛋白质纯化技术和晶体培养技术, 可以获得衍射能力较强的 SdrE 单晶, 为其三维结构的解析和基于结构的新型特异性抗菌药物的研发提供了重要的基础。

【关键词】金黄色葡萄球菌; 表面蛋白质 SdrE; 蛋白质表达纯化; 蛋白质晶体培养; 抗菌药物

【中图分类号】R378.1¹

【文献标志码】A

【收稿日期】2013-03-26

Expression, purification and crystallization of the surface protein SdrE from *Staphylococcus aureus*Zhang Shaocheng¹, Guo Zhen¹, Zhang Hongpeng¹, Gou Yeran³, Long Xiaobin³, Wang Deqiang²

(1. Department of Laboratory Medicine; 2. Key Laboratory of Molecular Biology on Infectious Diseases, Ministry of Education; 3. Department of Cardiology, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To determine the three dimensional structure and to analyze the molecular mechanism of *staphylococcus aureus* (*S.aureus*) infection for developing a new antibacterial drugs by cloning, expressing, purifying and crystallizing the surface protein SdrE from *S.aureus*. **Methods:** SdrE gene was amplified and cloned into the vector. Recombinant plasmid, pW28-SdrE, was transformed into *E.coli* B834 to express SdrE protein. SdrE protein was purified by Ni²⁺-NTA affinity chromatography column and DEAE anion-exchange chromatography column. State of aggregation in solution was analyzed by Hiload Superdex 200 gel filtration column. SdrE crystal was screened with Hampton kit and crystal was optimized with chessboard method. **Results:** (1) Recombinant plasmid pW28-SdrE was constructed and expressed in soluble form in *E.coli* B834 strain. (2) Purified SdrE exhibited as monomer in solution. (3) Single crystals of SdrE with good shape and diffraction capability were obtained. **Conclusions:** SdrE crystals can be grown by classic protein purification and crystal cultivation methods, which provides an important base for structural and functional study of SdrE in future and is necessary for developing new antibacterial drugs.

【Key words】 *Staphylococcus aureus*; surface protein SdrE; protein expression and purification; protein crystallization; antibiotic drug

金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*, *S.aureus*) 是革兰氏阳性球菌, 机会性致病, 全世界 1/3 人口均为其携带者, 共栖于人的鼻咽部, 以及腋窝、会阴、阴道、直肠等潮湿部位^[1-2]。主要引起皮肤及软组织

感染, 包括脓疱病、毛囊炎、蜂窝织炎等, 同时也能导致菌血症、败血症、肺炎、骨髓炎、脑膜炎、心内膜炎等严重威胁人类生命健康的疾病^[3-5]。目前, 金黄色葡萄球菌引起的 60% 的社区感染和 80% 的医院感染均出现严重的耐药性, 包括多重耐药性。更严重的是临床上已有耐万古霉素的金黄色葡萄球菌菌株的报道^[6], 这就预示着治疗耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 (methicillin-resistant *S.aureus*, MRSA) 现有的最后防线正在丧失。然而, MRSA 感染致死率已

作者介绍: 张绍城, Email: zinssercheung@163.com,

研究方向: 病原微生物重要蛋白结构与功能研究。

通信作者: 汪德强, Email: cqwangdq@163.com。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (编号: 31240082)。

优先出版: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13406/j.cnki.cyxh.000140.html>

经远远超过 HIV 感染致死率^[1,7], 这表明 MRSA 感染已成为临床上较严重的问题, 新的抗菌药物的研制尤为重要。

研究表明, 金黄色葡萄球菌的表面蛋白质在感染宿主过程中发挥重要作用^[8], 但感染机制尚未被解释。金黄色葡萄球菌表面蛋白质 (serine-aspartate repeat, SdrE) 家族主要包括 C、D、E 3 个蛋白质^[5], 其中, SdrC 蛋白质主要与金黄色葡萄球菌黏附在鼻咽表皮细胞相关^[9]; SdrD 蛋白质为金黄色葡萄球菌感染宿主形成脓肿的必要条件^[10]; 而 SdrE 蛋白质能够通过黏附补体调节因子 H 来逃避宿主免疫反应^[11], 并且还能够独立诱导血小板发生聚集^[12], 已经发现 SdrE 在骨等感染中起主要作用^[5]。经序列比对发现, SdrE 在人等宿主中无同源蛋白质。因此, SdrE 蛋白质可以作为新的抗菌药物的作用靶点。目前, SdrE 蛋白质在金黄色葡萄球菌感染过程中的相关分子机制还未见报道, 若能够解析出金黄色葡萄球菌 SdrE 蛋白质的三维结构, 继而深入研究分析其介导的金黄色葡萄球菌感染的分子机制, 将有望研制出一种新的特异性抗金黄色葡萄球菌药物, 有助于金黄色葡萄球菌感染的临床治疗和控制。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 质粒及菌株 金黄色葡萄球菌 Mu50(ATCC-700699) 购自美国 ATCC 微生物菌种保存中心。大肠杆菌 (*Escherichia coli*, *E.coli*) DH5 α 及 *E.coli* B834 购自 Takara 公司。载体质粒 pW28 由 pET-28a(购自 Novagen 公司)改造而来。

1.1.2 主要试剂及仪器 DL 2000 DNA Marker, 蛋白质 Marker D530A, 各种限制性内切酶 (*EcoR* I 和 *Xho* I) 及缓冲液、Ex-Taq 酶及 Buffer 购自 Takara 公司, 质粒抽提试剂盒、T4 DNA 连接酶及 Buffer 购自 Promega 公司, 质粒纯化试剂盒购自上海生工公司, BCA 试剂盒购自 Pierce 公司, 晶体生长试剂盒购自 Hampton 公司。Gel Doc 1000 数字化凝胶成像仪、蛋白质电泳槽购自 Bio-Rad 公司, EPS-300 核酸电泳仪购自 Eppendorf 公司, PCR 仪、NANOD 1000 微量分光光度计购自 Thermo 公司, 超声波处理系统购自 SONICS 公司, 蛋白质超滤系统购自 Micon 公司, Ni²⁺-NTA 亲和层析柱、DEAE 阴离子交换层析柱、Hiload Superdex 200 凝胶层析柱购自 GE Healthcare 公司。

1.2 方法

1.2.1 pW28-SdrE 重组质粒的构建 在 NCBI 中检索金黄色葡萄球菌 Mu50 (*S.aureus* Mu50) 的全基因组序列, 并对 SdrE 基因进行初步生物信息学分析, 应用软件 Primer Premier 5 设计引物(序列参见表 1), 由北京华大基因公司合成。以金黄色葡萄球菌 Mu50 基因组 DNA 为模板, PCR 扩增 SdrE 基因, 反应条件为: 94 °C 预变性 5 min, 94 °C 变性 50 s、

56 °C 退火 30 s、72 °C 延伸 1 min, 共循环 30 次, 72 °C 后延伸 10 min, 4 °C 保存。采用张阳丽和汪德强^[13]的方法构建重组质粒, 测序工作由本实验室测序中心完成。

表 1 引物序列

Tab.1 Sequences for primers		
基因	引物序列	碱基数 (bp)
SdrE	正向 5' - CCGGAATTCGATAAACTGCGAC AGAAGA -3'	1 425
	反向 5' - CCGCTCGAGTCATTATCAACGTC TTCCCAT -3'	

注: 划线处为 *EcoR* I 和 *Xho* I 的酶切位点

1.2.2 SdrE 的表达 将质粒鉴定正确的重组质粒转化至 *E.coli* B834 表达菌株中, 用三分区划线法铺于含 50 mg/L 卡那霉素的 (Luria-Bertani) 固体培养基上, 37 °C 恒温培养 12 h, 挑取单菌落加入 1 ml LB 液体培养基中, 37 °C, 180 r/min, 摇床培养至 A_{600nm} 约为 0.2 时, 加入异丙基- β -D-硫代吡喃半乳糖苷 (isopropyl β -D-1-thiogalactoside, IPTG) (终浓度为 1 mmol/L) 于 37 °C 摇床中诱导表达, 3 h 离心分离菌体, 用 15% SDS-PAGE 电泳鉴定目的基因是否表达。然后对目的基因表达的菌种进行表达条件的优化(包括培养时间、温度、诱导剂 IPTG 浓度等), 并最终在以下条件表达重组蛋白质: 将过夜培养的细菌液按 1:100 体积比接种至 LB 液体培养基中, 37 °C, 200 r/min, 摇床培养至 A_{600nm} $\approx$ 0.6 时, 以终浓度 0.3 mmol/L IPTG 诱导剂, 于 20 °C 恒温条件下诱导表达 10 h。

1.2.3 SdrE 的纯化 用 Binding Buffer (20 mmol/L Tris-HCl pH 8.0, 300 mmol/L NaCl) 重悬菌体, 混匀, 在冰水浴中进行超声波破碎: 4 °C, 超声 4 s, 间隔 6 s, 振幅 30%, 超声时间 10 min。然后高速低温离心 (4 °C, 12 000 r/min, 15 min), 取上清液以 4 s/滴的流速穿过经 Binding Buffer 平衡过的 Ni²⁺-NTA 亲和层析柱, 然后用 200 ml Washing Buffer (15 mmol/L 咪唑, 20 mmol/L Tris-HCl pH 8.0, 300 mmol/L NaCl) 洗脱杂蛋白质, 最后用 100 ml Elution Buffer (500 mmol/L 咪唑, 20 mmol/L Tris-HCl pH 8.0, 300 mmol/L NaCl) 洗脱目的蛋白质。为进一步提高蛋白质的纯度, 使用 DEAE 阴离子交换层析柱继续纯化(图 1)。

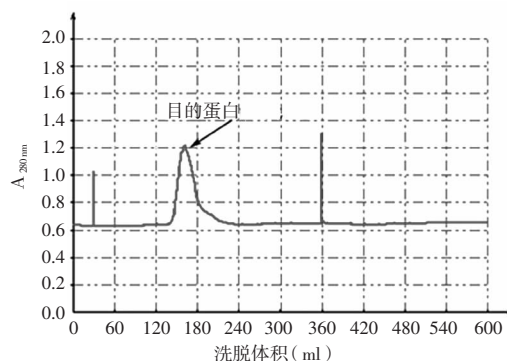


图 1 SdrE DEAE 层析纯化图谱

Fig.1 Chromatographic curve of SdrE DEAE

上样前用平衡缓冲液(20 mmol/L Tris-HCl pH 8.0)平衡 DEAE 层析柱,最后用 600 ml 梯度洗脱液(0~500 mmol/L NaCl, 20 mmol/L Tris-HCl pH 8.0)进行洗脱,并用自动收集器收集洗脱样品(1 ml/min)。用 15% SDS-PAGE 电泳及灰度扫描比分析蛋白质样品的纯度,并用 BCA 法测定蛋白质样品浓度。将蛋白质冻存于-80 °C 备用。

1.2.4 SdrE 在溶液中的聚集状态 利用凝胶层析法测定 SdrE 在溶液中的聚集状态。先用标准蛋白质对 Superdex 200 凝胶层析柱进行标定,流速为 1.0 ml/min,然后测定 SdrE 在 buffer(20 mmol/L Tris-HCl pH 8.0, 200 mmol/L NaCl)中的聚集状态。标准蛋白质为:溶菌酶(lysozyme, 14.4 kD),胰凝乳蛋白酶原(chymotrypsin, 25 kD),鸡卵清蛋白质(chicken ovalbumin, 43 kD),胎牛血清蛋白质(bovine serum albumin, 67 kD)。根据层析洗脱曲线记录下标准蛋白质及 SdrE 的洗脱体积,计算出 SdrE 在溶液中的分子量大小并对其聚合形式作出分析判断。

1.2.5 SdrE 晶体筛选 将纯化后的 SdrE 蛋白经高速低温(4 °C, 12 000 r/min, 30 min)离心后,用 Index、Salt1、Salt2、PEG-GRx1、PEGx2、PEG Screen I、PEG Screen II 等 Hampton 试剂盒进行蛋白质晶体初筛生长。生长条件为:生长池中含 1 μ l SdrE 蛋白和 1 μ l 上述试剂,平衡池中含 100 μ l 试剂,室内温度控制为 20 °C 恒温。然后利用棋盘法对晶体生长较好的条件进行优化(如沉淀剂、pH 缓冲液、蛋白质浓度、添加剂浓度与种类等),直到获得衍射能力强的单晶。初筛生长采用坐滴气相扩散法,优化生长采用悬滴气相扩散法。

2 结果

2.1 SdrE 基因的克隆与表达质粒的构建

经 1% 琼脂糖核酸电泳鉴定显示,PCR 扩增产物和双酶切(*EcoR* I 和 *Xho* I)后的重组质粒均在 1 425 bp 左右出现单一特异性条带(见图 2),与预期目的片段核酸分子长度一致。且 DNA 测序结果也证实其中有 SdrE 基因插入,序列与 GenBank 收录的 SdrE 基因序列完全吻合,结果表明重组质粒构建成功。

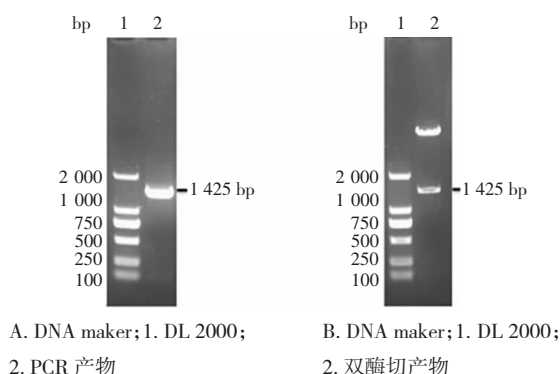
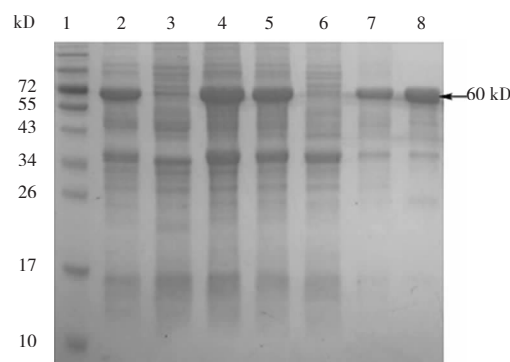


图 2 SdrE 基因扩增及双酶切鉴定

Fig.2 Agarose electrophoresis of SdrE amplification and digestion identification

2.2 重组蛋白质的表达和纯化

SDS-PAGE 电泳(图 3)显示:与阴性对照相比,经 IPTG 诱导的全细胞液中明显显示出一条分子量约为 60 kD 的蛋白质条带,与重组蛋白质表观分子量相符合;表达产物为可溶性上清表达;经一系列纯化后,灰度扫描比显示目的蛋白质纯度达到 85%,测得其浓度为 36.3 mg/ml,分装后冻存于-80 °C 备用。



1. 蛋白 marker; 2. IPTG 诱导; 3. 未诱导; 4. 全菌液; 5. 上清液; 6. 穿透液; 7. Ni²⁺-NTA 洗脱液; 8. DEAE 洗脱液

图 3 SdrE 纯化结果

Fig.3 SDS-PAGE results of SdrE after purification

2.3 凝胶层析鉴定 SdrE 在溶液中的聚集状态

用标准蛋白质(溶菌酶、胰凝乳蛋白酶原、鸡卵清蛋白质、胎牛血清蛋白质)对 Superdex 200 凝胶层析柱进行标定后,根据洗脱体积和分子量进行拟合,发现其间存在如下关系: $\text{Log MW} = -0.01712 V_e + 6.05667$ (R^2 值为 0.9726)。以相同条件用 Superdex 200 凝胶层析柱对 SdrE 层析分析,其洗脱体积约为 78.2 ml(图 4)。利用前面拟合所得的公式计算发现其在溶液中分子量约为 52.2 kD,结合前面实验分析,提示 SdrE 在溶液(20 mmol/L Tris-HCl pH 8.0, 200 mmol/L NaCl)中以单体形式存在。

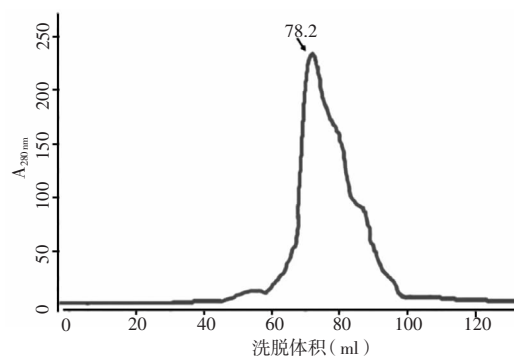


图 4 凝胶层析检测 SdrE 在溶液中的聚集形式

Fig.4 Gathered form of SdrE in solution detected by Superdex 200

2.4 SdrE 晶体生长及衍射

运用棋盘法对晶体初筛生长晶形较好的条件进行优化,

在 0.2 mol/L NaSCN, 20% PEG3350, 0.1 mol/L Bis-Tris pH 5.5 条件下, 20 °C, 21 d 得到晶形好且较大的片状单晶(图 5)。将晶体携带至上海同步辐射光源(shanghai synchrotron radiation facility, SSRF)进行衍射数据收集, 由于未加晶体冻存保护液, 在同步辐射光源下显示晶体有冻裂迹象, 但其分辨率较强, 能达到 1.5 Å(图 6)。目前正在继续优化晶体及其冻存保护液, 以期尽快解析出 SdrE 蛋白质的三维结构。



图 5 SdrE 蛋白质初筛晶体

Fig.5 Prescreening crystal of SdrE

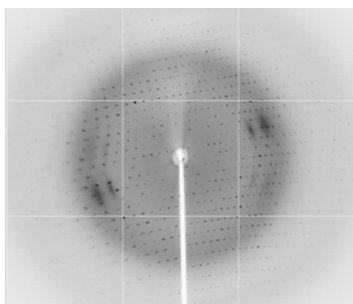


图 6 SdrE 蛋白质晶体在 SSRF 的衍射图

Fig.6 X-ray diffraction image from a SdrE crystal by SSRF

3 讨论

金黄色葡萄球菌感染流行于全世界, 尤其是 MRSA 感染已成为世界公共卫生安全面临的最严重问题, 其感染百分比在全球分布不均: 在美国已超过 50%, 在亚洲国家大约为 17%, 而在欧洲各国从 1%~32% 不等^[4]。目前, 虽然 SdrE 蛋白质在疫苗研制的动物模型中能够良好的保护小鼠不受金黄色葡萄球菌的感染^[6], 但是有关金黄色葡萄球菌表面蛋白(ClfA、SdrG、IsdB)的疫苗开发尝试均未通过临床三期试验^[14], 且现有的针对金黄色葡萄球菌的全细胞疫苗在很大程度上不能产生保护性免疫反应^[6]。再加上, SdrE 能够在不影响补体调节因子 H 的功能的情况下与之发生结合, 从而躲避补体旁路途径, 产生免疫逃逸^[11]。因此, 新的特异性抗金黄色葡萄球菌药物的研发具有必然性, 而作为潜在的药物靶标的 SdrE 蛋白质对新一代抗生素的开发有重大意义。

虽然已经有 Sdr 家族蛋白质的初步晶体学研究报道, Zhang 等^[15]对 SdrD 蛋白质的黏附结构域(237~

547)和 Xiang 等^[16]对 SdrE 蛋白质的黏附结构域(269~597)进行的表达纯化及初步晶体学研究。然而, 到目前为止仍未解析出 SdrD 及 SdrE 的黏附结构域结构。生物信息学分析显示, SdrE 氨基酸序列在 N 端和 C 端均存在跨膜结构域。本研究选择的 SdrE 片段含有 475 个氨基酸(141~615 个, 包括 N 端结构域和黏附结构域), 若能够最终解析出其三维结构, 对 Sdr 家族蛋白质的研究和应用具有重要意义。

尽管在蛋白质纯化阶段, SdrE 蛋白质容易发生变更性沉淀, 但是, 通过将相关溶液的 pH 值调节至 8.0 后, 成功克服了 SdrE 蛋白质变性沉淀这一难点。最终, 本研究通过重组质粒的构建, 成功的在 *E.coli* B834 中大量表达可溶性 SdrE 蛋白质。并在低温条件下, 纯化获得了纯度较高的 SdrE 蛋白。应用 Hiload Superdex 200 凝胶层析柱分析, 只有一个 SdrE 的洗脱峰, 表明 SdrE 在溶液中只有一种聚集状态。根据分子筛的洗脱体积计算表明, 首次发现 SdrE 蛋白质在溶液中以单体形式存在。

蛋白质三维结构是其行使相应功能的基础, 而晶体的获得一直是蛋白质晶体学的关键, 对蛋白质三维结构的解析至关重要。本研究应用悬滴气相扩散法, 已经获得了晶形好、衍射能力较强的金黄色葡萄球菌 SdrE 蛋白质的单晶, 为进一步优化晶体冻存保护液、收集高分辨率的晶体衍射数据及解析其三维结构奠定了重要基础。本研究将继续致力于 SdrE 三维结构的解析, 并且从分子水平探索金黄色葡萄球菌感染机制, 为基于结构开展新型特异性抗金黄色葡萄球菌药物的研发提供重要模型。

参 考 文 献

- [1] Hammer ND, Skaar EP. Molecular mechanisms of *Staphylococcus aureus* iron acquisition[J]. *Annu Rev Microbiol*, 2011, 65: 129-147.
- [2] Dreisbach A, van Dijk JM, Buist G. The cell surface proteome of *Staphylococcus aureus*[J]. *Proteomics*, 2011, 11(15): 3154-3168.
- [3] Yu FY, Li TJ, Huang XY, et al. Virulence gene profiling and molecular characterization of hospital-acquired *Staphylococcus aureus* isolates associated with bloodstream infection[J]. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2012, 74(4): 363-368.
- [4] Miller LS, Cho JS. Immunity against *Staphylococcus aureus* cutaneous infections[J]. *Nat Rev Immunol*, 2011, 11(8): 505-518.
- [5] Sitkiewicz I, Babiak I, Hryniewicz W. Characterization of transcription within sdr region of *Staphylococcus aureus*[J]. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 2011, 99(2): 409-416.
- [6] Stranger-Jones YK, Bae T, Schneewind O. Vaccine assembly from surface proteins of *Staphylococcus aureus*[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(45): 16942-16947.

技术方法

DOI: 10.13406/j.cnki.cyxh.000146

高效液相色谱法测定面粉中偶氮甲酰胺的含量

向 露¹, 易廷辉², 王 雅¹, 王俊苏³, 彭 涛⁴, 王国民³, 母昭德¹

(1. 重庆医科大学药学院药物分析教研室, 重庆 400016; 2. 重庆市农业委员会农业环境监测站, 重庆 401121; 3. 重庆出入境检验检疫局、进出口食品安全工程技术研究中心, 重庆 400020; 4. 中国检验检疫科学研究院农产品安全中心, 北京 100123)

【摘要】目的:建立面粉中偶氮甲酰胺(azodicarbonamide, ADC)的高效液相色谱检测方法。**方法:**样品经丙酮提取, 正己烷脱脂, 进入高效液相色谱后采用 Eclipse XDB-CN 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm)进行分离, 以乙腈-20 mmol/L 乙酸铵为流动相进行梯度洗脱, 二极管阵列检测器检测波长为 245 nm。**结果:**ADC 在 1.0~90.0 mg/kg 范围内线性关系良好, 相关系数(r)大于 0.99, 定量限为 5 mg/kg($S/N \geq 10$), 在 5.0、10.0、45.0 mg/kg 3 个添加水平下回收率在 68.6%~116.9%之间, 相对标准偏差均小于 7.0 %。**结论:**建立的面粉中 ADC 液相色谱方法简单快捷, 准确可靠, 适用于面粉中 ADC 的测定。

【关键词】偶氮甲酰胺; 面粉; 高效液相色谱法; 测定**【中图分类号】**O657.7+2**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2013-09-11

Determination of azodicarbonamide in flour by high performance liquid chromatography

Xiang Lu¹, Yi Tinghui², Wang Ya¹, Wang Junsu³, Peng Tao⁴, Wang Guomin³, Mu Zhaode¹

(1. Teaching and Research Section of Pharmaceutical Analysis, College of Pharmacy, Chongqing Medical University; 2. Chongqing City Agricultural Environmental Monitoring Station, Chongqing Agriculture Committee; 3. Chongqing Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Chongqing Engineering Technology Research Center for Import and Export Food Safety; 4. Agro-product Safety Research Center, Chinese Academy of Inspection and Quarantine)

【Abstract】Objective: To develop an analytical method based on high performance liquid chromatography (HPLC) for the determination of azodicarbonamide (ADC) in flour. **Methods:** Samples

作者介绍: 向 露, Email: xianglu51@163.com,

研究方向: 药物分析。

通信作者: 母昭德, Email: mzd2008@tom.com。

基金项目: 国家“十二·五”科技支撑计划资助项目(编号: 2012BAD33B02、2012BAK08B01); 国家质检公益行业科研专项基金资助项目(编号: 201210016、201210086)。

优先出版: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13406/j.cnki.cyxh.000146.html>were extracted with acetone, degreased with *n*-hexane, then separated with a agilent Eclipse XDB-CN column(250 mm × 4.6 mm, 5 μm) using acetonitrile-ammonium acetate (20 mmol/L) as mobile phase with a gradient elution program and were detected with diode array detector with the wavelength of 245[7] Boucher HW, Corey GR. Epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* [J]. Clin Infect Dis, 2008, 46(s5): S344-S349.[8] Mazmanian SK, Liu G, Jensen ER, et al. *Staphylococcus aureus* sortase mutants defective in the display of surface proteins and in the pathogenesis of animal infections [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2000, 97(10): 5510-5515.[9] Corrigan RM, Mijalovic H, Foster TJ. Surface proteins that promote adherence of *Staphylococcus aureus* to human desquamated nasal epithelial cells [J]. BMC Microbiology, 2009, 9: 22.[10] Cheng AG, Kim HK, Burts ML, et al. Genetic requirements for *Staphylococcus aureus* abscess formation and persistence in host tissues [J]. FASEB J, 2009, 23(10): 3393-3404.[11] Sharp JA, Echague CG, Hair PS, et al. *Staphylococcus aureus* surface protein SdrE binds complement regulator factor H as an immune evasion tactic [J]. PLoS One, 2012, 7(5): e38407.

[12] O'Brien L, Kerrigan SW, Kaw G, et al. Multiple mechanisms for

the activation of human platelet aggregation by *Staphylococcus aureus*: roles for the clumping factors ClfA and ClfB, the serine-aspartate repeat protein SdrE and protein A [J]. Mol Microbiol, 2002, 44(4): 1033-1044.

[13] 张阳丽, 汪德强. 人 α1 微球蛋白的克隆、表达、纯化及生物学活性鉴定 [J]. 重庆医科大学学报, 2012, 37(5): 445-448.

[14] Broker BM, van Belkum A. Immune proteomics of *Staphylococcus aureus* [J]. Proteomics, 2011, 11(15): 3221-3231.[15] Zhang LQ, Xiang H, Gao JL, et al. Purification, characterization, and crystallization of the adhesive domain of SdrD from *Staphylococcus aureus* [J]. Protein Expr Purif, 2010, 69(2): 204-208.[16] Xiang H, Gao FF, Wang DC, et al. Characterization, crystallization and preliminary X-ray analysis of the adhesive domain of SdrE from *Staphylococcus aureus* [J]. Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun, 2010, 66(Pt 7): 858-861.

(责任编辑: 冉明会)