

DOI:10.13350/j.cjpb.251103

• 论著 •

屎肠球菌介导的铜绿假单胞菌重组 Ef-PEA 疫苗的构建及其保护力观察^{*}

李文桂^{**}, 欧兴坤, 何爱琳

(重庆医科大学附属第一医院传染病寄生虫病研究所, 重庆市传染病与寄生虫病学重点实验室, 重庆 400016)

【摘要】 目的 构建屎肠球菌(Ef)介导的铜绿假单胞菌重组 rEf-PEA 疫苗,研究其诱导的保护力及体液免疫应答。

方法 将 PA01 株的基因组 DNA 作为模板进行 PCR 克隆 PEA 基因,将克隆基因插入 pGEX-1 λ T 得 pGEX-PEA;将重组质粒电穿孔屎肠球菌 TX0016 株,构建 rEf-PEA 疫苗;双酶切和 PCR 鉴定的抽提质粒经 IPTG 诱导后通过 SDS-PAGE 和 Western blot 分析和鉴定表达产物;用 5×10^8 CFU 的 rEf-PEA 疫苗灌胃小鼠,在初次接种后 4 周,取 5×10^7 CFU 的 PA01 株进行滴鼻攻击,在攻击后 2 周杀鼠,分离肺和脾组织,培养肺细菌并行菌落计数;分别于初次免疫后 0、4 和 6 周采静脉血,分离血清,ELISA 测定 IgG 及其亚类和 IgE。 **结果** PCR 克隆出 1 917 bp 的 PEA 基因;双酶切证实 PEA 基因插入 pGEX-1 λ T 中;PCR 显示 rEf-PEA 疫苗构建成功;经 SDS-PAGE 证实重组菌表达 PEA-GST 融合蛋白,目标蛋白的含量是菌体总蛋白的 21%;通过免疫印渍提示融合蛋白可被铜绿假单胞菌感染的鼠血清结合;rEf-PEA 疫苗组、空载体组和 Ef 对照组肺组织的菌落数分别为 $(0.368 \pm 0.005) \times 10^8$ CFU、 $(7.576 \pm 0.206) \times 10^8$ CFU 和 $(7.551 \pm 0.185) \times 10^8$ CFU,比较差异有统计学意义($P < 0.01$);疫苗组的血清抗体 IgG、IgG1、IgG2b、IgG3 和 IgE 在初次免疫后 4 周均升高,在攻击后 2 周达较高水平($P < 0.01$);同一时间点比较,疫苗组的血清抗体与空载体组或 Ef 对照组比较差异有统计学意义($P < 0.01$)。 **结论** 成功构建了 rEf-PEA 疫苗,该疫苗接种小鼠产生一个体液免疫反应对抗铜绿假单胞菌 PA01 株的滴鼻攻击。

【关键词】 屎肠球菌;铜绿假单胞菌;PEA;疫苗;体液免疫**【文献标识码】** A **【文章编号】** 1673-5234(2025)11-1398-05

[Journal of Pathogen Biology. 2025 Nov.;20(11):1398-1402.]

Construction of *Enterococcus faecium* -based recombinant Ef-PEA vaccine of *Pseudomonas aeruginosa* and its protection in mice

LI Wengui, OU Xingkun, HE Ailin (Chongqing Key Laboratory of Infectious and Parasitic Diseases, Institute of Infections and Parasitic Diseases, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China) ^{**}

【Abstract】 Objective To construct an *Enterococcus faecium* (Ef)-based recombinant Ef-PEA vaccine of *Pseudomonas aeruginosa* (Pa) and study protective immune mechanism in mice. **Methods** The PEA gene was cloned from the genomic DNA of PA01 strain by PCR and inserted into pGEX-1 λ T to construct pGEX-PEA, the recombinant plasmid was electroporated into TX0016 strain to construct rEf-PEA vaccine, the plasmid was extracted from rEf for PCR. The rEf vaccine was expressed through IPTG induction, and the expression protein was analysed by SDS-PAGE and Western blot. BALB/c mice were immunized intragastrically with 5×10^8 CFU rEf-PEA vaccine 3 times per week for 3w. 4w after the first immunization, mice were challenged intranasally with 5×10^7 CFU of PA01 strain. 2w after challenge, mice were sacrificed, and their lungs were separated. Bacteria in lungs were incubated and colonies were counted, sera were collected at 0, 4, and 6w after the first immunization, the IgG and its subclasses, and IgE were detected by ELISA. **Results** The 1 917 bp PEA gene was successfully cloned by PCR. PCR showed that PEA gene was amplified when the extracted plasmid from rEf as template; the relative molecular mass (M_r) of the expressed PEA-GST fusion protein was approximately 95 ku by SDS-PAGE, the amount of the expressed protein was 21% of the total bacterial proteins; Western blot showed that the target protein could be recognized by Pa sera. The colony numbers of lung tissue in rEf-PEA vaccine group, blank vector group and Ef control group were $(0.368 \pm 0.005) \times 10^8$ CFU, $(7.576 \pm 0.206) \times 10^8$ CFU and $(7.551 \pm 0.185) \times 10^8$ CFU, respectively; the levels of IgG, IgG1, IgG2b, IgG3 and IgE increased; at the same time point, there was significant difference compared with the two control group ($P < 0.01$). **Conclusion** The rEf-PEA vaccine was

^{*} **【基金项目】** 国家自然科学基金项目(No. 30801052, 30671835, 30500423, 30200239)。

^{**} **【通信作者(简介)】** 李文桂(1967-),男,湖北郧县人,博士,研究员,主要从事机会致病菌的研究。E-mail: cqliwengui@163.com

constructed in success, it may induce mice to produce a humoral response against challenge with *P. aeruginosa*.

【Keywords】 *Enterococcus faecium*; *Pseudomonas aeruginosa*; PEA; vaccine; humoral immunity

铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*, Pa)是一种机会致病性病原体,用抗生素治疗常产生耐药性,这就需要探索其他治疗方法,多项研究^[1-2]证实脂多糖、多糖、藻酸盐、鞭毛或菌毛均可作为疫苗使用,但有许多缺陷,故需寻找分子抗原。Pa 外毒素 A (*P. aeruginosa* exotoxin A, PEA) 既有较强的免疫原性,又有较好的佐剂效应,可作为粘膜佐剂使用。刘祥^[3]研究发现 PEA 重组蛋白可诱导小鼠产生较好的保护力,表明 PEA 抗原具有作为疫苗的潜力。

屎肠球菌(*Enterococcus faecium*, Ef)是常见的肠道益生菌之一,可开发为疫苗载体^[4]。本研究克隆 PEA 基因,将 Ef 作为表达载体构建重组 Ef-PEA 疫苗。将 rEf 疫苗口服灌胃 BALB/c 鼠,Pa 滴鼻攻击后探索其产生的保护力和体液反应,初步探讨其诱导的保护性免疫机制。

材料与方法

1 材料

1.1 菌株和质粒 屎肠球菌 TX0016 株和 BL21 (pGEX-1 λ T)由本所保存。

1.2 实验动物 21 只雌性 BALB/c 鼠,体质量约 16~20 g,SPF 级,6~8 周龄,购于重庆国家生物产业基地实验动物中心。

1.3 主要试剂和仪器 DNA 标志物、蛋白标志物、胎牛血清;高效感受态细胞制备 Kits、质粒提取 Kits、高保真即用 PCR 扩增 Kits、IPTG、N,N-亚甲基双丙烯酰胺、DAB 和考马斯亮蓝均购自北京鼎国兴盛生物技术公司;HRP 标记的羊抗小鼠 IgG、IgG1、IgG2b、IgG3、IgE 和 IgA 购自美国 Southern Biotech 公司;本所自制 Pa 感染的小鼠血清、LB 液体和固体培养基。酶标仪购自英国 Bio-TEK 公司。

2 方法

2.1 设计与合成引物 根据 PEA 基因的 cDNA 序列以及载体 pGEX-1 λ T 的特点设计 P1 和 P2 引物。P1 引物序列为 5'-GCGGATTC-ATG CAC CTG ACA CCC CA-3'; P2 引物序列为 5'-GCGAATTC-TTA CTT CAG GTC CTC GC-3'。引物 5' 端分别引入 BamH I 和 EcoR I 酶切位点(下划线部分)和 2 个保护性碱基(GC)。

2.2 扩增及鉴定 PEA 基因

2.2.1 提取基因组 DNA 常规培养 PA01 菌株,用细菌基因组的 DNA 提取 Kits 抽提基因组 DNA。

2.2.2 扩增及鉴定 PEA 基因 PCR 扩增体系:PCR

master 25 μ l, P1 和 P2 引物各 2 μ l, 基因组 DNA 模板 2 μ l, 去离子水 19 μ l, 25 μ l 石蜡油密封。PCR 反应条件:95 $^{\circ}$ C 预变性 4 min, 94 $^{\circ}$ C 变性 1 min, 58 $^{\circ}$ C 退火 1 min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 3 min, 共 30 个循环, 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min; 用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳鉴定 PCR 产物。

2.3 制备屎肠球菌 TX0016 株感受态 根据参考文献[5]制备 TX0016 株的感受态。

2.4 构建与鉴定 rEf-PEA 疫苗 根据参考文献[5]进行构建和鉴定。

2.5 表达与鉴定 rEf-PEA 疫苗

2.5.1 诱导表达 rEf 疫苗 常规培养 rEf 疫苗, IPTG 诱导后 1、3、5、7、9、11 和 13 h 收集菌体沉淀,煮沸裂解,分别进行 SDS-PAGE 电泳和凝胶成像仪扫描分析。

2.5.2 免疫印渍鉴定 rEf 疫苗 根据参考文献[5]进行免疫印渍鉴定 rEf 疫苗。

2.6 动物免疫及攻击方案 将小鼠随机分为 rEf-PEA 疫苗组、空载体组和 Ef 对照组,每组有 7 只小鼠。根据参考文献[6]进行动物免疫及攻击。

2.7 计数肺细菌负荷 根据参考文献[6]计数肺细菌负荷。

2.8 ELISA 检测血清抗体 以 1 μ g/孔的 PaAg 包被 96 孔酶标板,分别加入 1:100 稀释的小鼠血清和 1:6 000 稀释的 HRP 标记羊抗鼠 IgG、IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3 和 IgE 100 μ l,用酶标仪测 A₄₉₂ 值。

3 统计学分析

借助 SPSS 26.0 软件统计数据,数据结果用($\bar{x} \pm s$)表示,肺细菌的菌落数用($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间比较采用 SNK-q 检验,两者比较采用独立样本的 *t* 检验, *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

结 果

1 扩增与鉴定 PEA 基因

将 Pa 的基因组 DNA 用作模板进行 PCR 克隆 PEA 基因片段,经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳出现大小约 1 917 bp 的靶基因片段(图 1)。

2 双酶切鉴定 pGEX-PEA

pGEX-PEA 的双酶切产物经 1.2% 琼脂糖电泳显现大小约 4 947 bp 的 pGEX 载体条带和 1 917 bp 的靶基因条带,但空载体无靶基因条带(图 2)。

3 PCR 鉴定 rEf-PEA 疫苗

将从 rEf-PEA 疫苗提取的质粒作为模板进行

PCR 扩增,借助琼脂糖凝胶电泳显示 1 917 bp 的靶基因条带(图 3)。

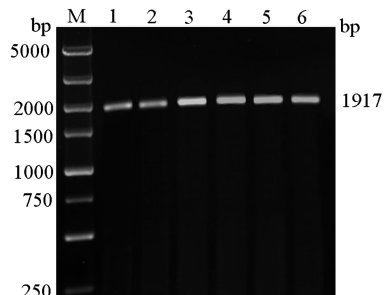


图 1 鉴定 PEA 基因 PCR 扩增产物

Fig. 1 Identification PCR product of PEA gene

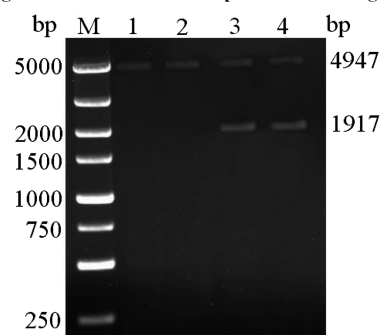


图 2 双酶切鉴定重组质粒

Fig. 2 Double endonuclease identification of pGEX-PEA

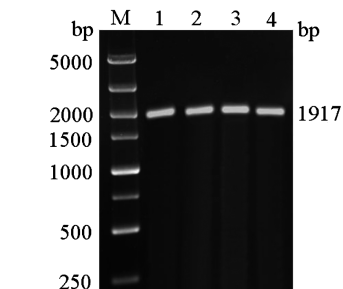


图 3 PCR 鉴定 rEf-PEA 疫苗

Fig. 3 PCR identification for rEf-PEA vaccine

4 SDS-PAGE 分析 rEf-PEA 疫苗

SDS-PAGE 显示 IPTG 诱导的 rEf-PEA 疫苗表达 95 ku 与 PEA-GST 相符的蛋白条带,诱导 3~5 h 表达量较高,表达蛋白的含量是菌体总蛋白的 21% (图 4)。

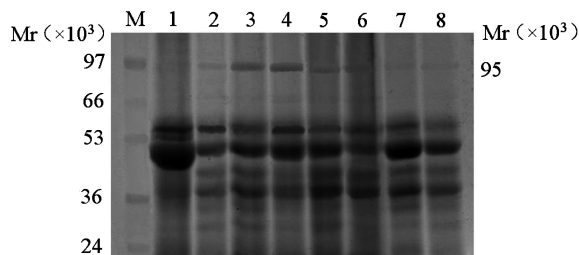


图 4 SDS-PAGE 分析 rEf-PEA 疫苗

Fig. 4 SDS-PAGE analysis for expression product of rEf-PEA vaccine

5 免疫印渍鉴定 rEf-PEA 疫苗

Pa 感染的鼠血清识别 rEf-PEA 疫苗表达的 95 ku 融合蛋白(图 5)。

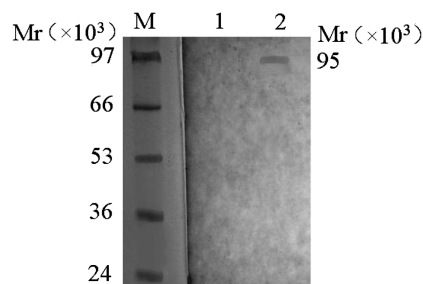


图 5 免疫印渍鉴定 rEf-PEA 表达产物

Fig. 5 Western blot for expression product of rEf-PEA vaccine

6 计数肺细菌负荷

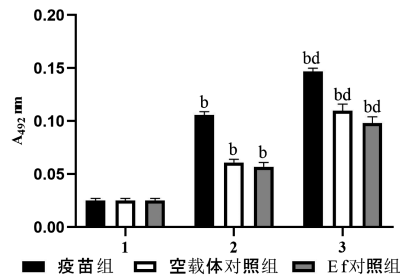
rEf-PEA 组、空载体组、Ef 对照组肺荷菌量分别为 $(0.368 \pm 0.005) \times 10^8$ CFU、 $(7.576 \pm 0.206) \times 10^8$ CFU、 $(7.551 \pm 0.185) \times 10^8$ CFU。rEf-PEA 疫苗组的菌体数量低于两个对照组,比较差异有统计学意义 ($F = 4714.622, P < 0.01$);空载体和 Ef 对照组比较,比较差异无统计学意义 ($t = 0.232, P = 0.821$)。

7 检测血清 IgG 及其亚类和 IgE

3 个试验组的血清均未出现 IgG2a。同一时间点的 3 个试验组比较,免疫前的血清 IgG、IgG1、IgG2b、IgG3 和 IgE 水平较低,比较差异无统计学意义 (F 值分别为 0.078、2.138、0.523、0.181 和 0.804, P 均 > 0.05);在首次免疫后 4 周和攻击后 2 周,与空载体组和 Ef 对照组相比,疫苗组的血清 IgG、IgG1、IgG2b、IgG3 和 IgE 水平均明显升高,比较差异有统计学意义 (初次免疫后 4 周的 F 值分别为 712.937、250.231、356.883、69.502 和 67.483,均 $P < 0.01$;攻击后 2 周的 F 值分别为 220.123、174.081、141.600、171.622 和 121.116,均 $P < 0.01$);同组间在不同时间点比较,疫苗组的 IgG 及其亚类和 IgE 均表现为攻击后 2 周 $>$ 首次免疫后 4 周 $>$ 免疫前,比较差异有统计学意义 (F 值分别为 4102.120、424.008、2407.283、470.596 和 533.297,均 $P < 0.01$,图 6~10)。

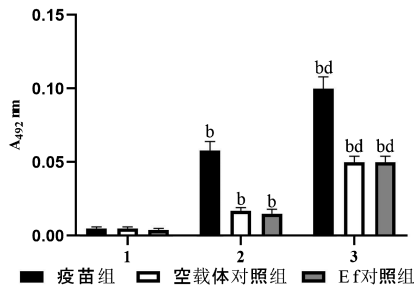
讨 论

肠球菌细胞壁较厚导致外源基转入困难^[7]。研究发现电穿孔的操作步骤简单和转化效率较高^[8]。脉冲场电压、电容、脉冲时间和脉冲次数等影响电穿孔的转化效率^[9]。使用含有醋酸锂和二硫苏糖醇的 10% 甘油或高渗缓冲液预处理感受态细菌数次可显著增加感染效率。大肠埃希菌是目前常用的蛋白表达系统,表达效率可达 30% 左右。由于该菌含有较多的内源性蛋白酶,极易造成目的蛋白的降解,所以采用蛋白酶缺



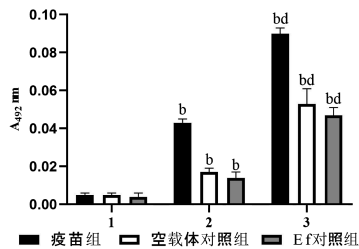
1 免疫前 2 首次免疫后4周 3 攻击后2周。^b $P<0.01$ vs 1; ^d $P<0.01$ vs 2

图6 rEf-PEA疫苗免疫及PA01株攻击后血清IgG检测
Fig. 6 Sera IgG detection in mice by vaccination with rEf-PEA vaccine against PA01 strain



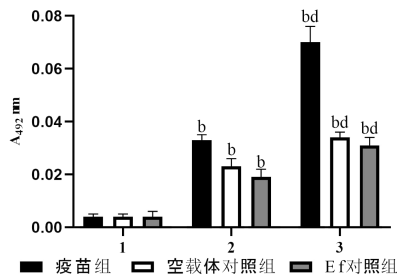
1 免疫前 2 首次免疫后4周 3 攻击后2周。^b $P<0.01$ vs 1; ^d $P<0.01$ vs 2

图7 rEf-PEA疫苗免疫及PA01株攻击后血清IgG1检测
Fig. 7 Sera IgG1 detection in mice by vaccination with rEf-PEA vaccine against PA01 strain



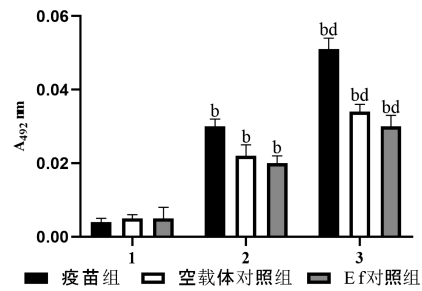
1 免疫前 2 首次免疫后4周 3 攻击后2周。^b $P<0.01$ vs 1; ^d $P<0.01$ vs 2

图8 rEf-PEA疫苗免疫及PA01株攻击后血清IgG2b检测
Fig. 8 Sera IgG2b detection in mice by vaccination with rEf-PEA vaccine against PA01 strain



1 免疫前 2 首次免疫后4周 3 攻击后2周。^b $P<0.01$ vs 1; ^d $P<0.01$ vs 2

图9 rEf-PEA疫苗免疫及PA01株攻击后血清IgG3检测
Fig. 9 Sera IgG3 detection in mice by vaccination with rEf-PEA vaccine against PA01 strain



1 免疫前 2 首次免疫后4周 3 攻击后2周。^b $P<0.01$ vs 1; ^d $P<0.01$ vs 2

图10 rEf-PEA疫苗免疫及PA01株攻击后血清IgE检测
Fig. 10 Sera IgE detection in mice by vaccination with rEf-PEA vaccine against PA01 strain

陷型的菌株进行表达可能是一个理想选择;BL21 菌就是一种 Lon 和 OmpT 蛋白酶缺陷型的大肠埃希菌。pGEX-1 λ T 是一个融合表达载体,将小剂量的 IPTG 在细菌对数生长的中后期加入可提高目的蛋白的表达量,但对菌体有一定毒性^[10-11]。本研究将肠球菌作为表达菌株,当重组 Ef 的 A_{600} 值达到 0.5~0.8 时,使用终浓度为 1 mol/L 的 IPTG 进行诱导,通过 SDS-PAGE 证实 rEf 疫苗经 IPTG 诱导 3~5 h 后可表达 PEA-GST 融合蛋白;借助薄层扫描显示靶蛋白的含量占菌体总蛋白的 21%;经免疫印渍证实 Pa 血清结合重组 Ef 表达的融合蛋白,这为下一步研究重组 Ef 疫苗的保护力提供了便利。

将重组质粒 pIRES-PEA-PcrV 或多聚乳酸羟乙酸(PLGA)包裹 PEA 形成 PLGA-PEA 耦合物肌肉注射 BALB/c 鼠 3 次,在初次注射后 6 周用 5×10^7 CFU 的 PA01 株进行滴鼻攻击,在攻击后 3 d 发现肺组织的细菌负荷大量减少。然后,将 PEA-His 蛋白皮下注射昆明种小鼠 3 次,在初次接种后 6 周显示血清 IgG 抗体滴度为 1:8 000,此时腹腔注射 1×10^6 CFU 的 PA01 株进行攻击,在攻击后 5 d 显现免疫组和对照组的存活率分别为 60%(12/20)和 30%(4/12)^[12]。本研究经灌胃途径将 rEf 疫苗接种小鼠,PA01 株攻击后肺组织的细菌负荷明显减少,表明该疫苗可对抗 PA01 株的滴鼻攻击。

重组 Ef 菌是一种常见的口服疫苗,口服后可在肠道上皮和肠道相关淋巴组织(GALT)粘附、侵入和增殖,目的抗原经 M 细胞摄取后,传递至小肠集合淋巴结处,经抗原提呈细胞(APC)处理后致敏 T 和 B 淋巴细胞,致敏的 T 和 B 淋巴细胞进入淋巴导管后经胸导管进入血液循环,到达消化道、支气管和鼻粘膜的固有层和腺体,产生粘膜、体液或细胞免疫应答。记忆 B 细胞的寿命较长,是浆细胞的重要来源,浆细胞产生抗体杀死再次接触的病原体^[13]。

血清抗体是评价 Pa 疫苗免疫的一个关键指标。

欧兴坤等^[14]用 rEfs-LasR 疫苗灌胃 BALB/c 鼠, PA01 株攻击后产生高水平的 IgG 抗体, 从而对抗 Pa 的感染。本实验将 rEf-PEA 疫苗接种小鼠后血清 IgG 升高, 经 PA01 株攻击后 2 周更为明显, 推测该疫苗分泌的 PEA 可使 B 细胞分化并产生抗体; 当机体再次遭遇相同抗原刺激时, 记忆 B 细胞能快速应急并分裂形成新的浆细胞, 从而使抗体水平升高, 产生抗体依赖细胞介导的细胞毒作用(ADCC)或抗体依赖补体介导的细胞毒作用(CDCC)。

IgG 亚类诱导 Th 细胞产生不同类型的细胞因子。有研究^[15-16]证实 Th1 细胞主要辅助细胞免疫, 而 Th2 细胞辅助体液免疫; 将 PA01 株滴鼻感染 α g TCR 鼠, 在感染后 2 d 显示肺组织中的 B 细胞表达 CD69 分子增强, 血清 IgG、IgA 和 IgM 降低, 提示 IL-17 诱导 α g T 细胞参与 CD19⁺ B 细胞激活以及 Ig 的产生。江帆等^[17]用重组 Bb-OprH 疫苗接种和 PA01 株攻击后显示小鼠血清 IgG 亚类提升。本研究将 rEf-PEA 疫苗灌胃小鼠后的血清抗体 IgG、IgG1、IgG2b 和 IgG3 在初次免疫后 4 周均升高, 在攻击后 2 周达较高水平, 推测该疫苗表达的 PEA 抗原经 APC 内化后, 在内质网中 MHC-II 类分子链与恒定链组装成九聚体, 然后转运并表达在 APC 的表面, 被特异性 T 细胞 TCR 所识别, 产生有效的免疫应答。

梁诚诚等^[18]用 rBb-OprFI 疫苗灌胃 BALB/c 鼠后显示血清 IgE 在初次免疫后 4 周显著升高, 在攻击后 2 周得到提升, 提示该类疫苗可诱导小鼠产生 IgE 型的免疫反应。本研究 rEf-PEA 疫苗接种和 PA01 株攻击后 IgE 升高, 推测其刺激 B 细胞产生 IgE, 该抗体与肥大细胞或嗜碱性粒细胞结合, 促使发生桥联的 Fc ϵ R I 受体释放多种生物活性物质对抗 Pa 的感染。

目前研发肠球菌介导的疫苗^[19-24]有: 表达铜绿假单胞菌 LasR 蛋白的重组 Ef-LasR 疫苗、表达结核分枝杆菌 ESAT-6 蛋白的重组 Efs-ESAT-6 疫苗、表达细粒棘球绦虫 Eg95-EgA31 融合蛋白的重组 Efs-Eg95-EgA31 疫苗、表达多房棘球绦虫 EmII/3-Em14-3-3 融合蛋白的重组 Efs-EmII/3-Em14-3-3 疫苗、表达日本血吸虫 Sj26GST/Sj4-3-3 的重组 Efs-Sj26GST/Sj4-3-3 疫苗。将这些疫苗的 I、II 和 III 期临床实验尽快纳入研究, 将其用于相关人群的接种具有相应价值。

【参考文献】

- [1] Hoggarth A, Weaver A, Pu QQ, et al. Mechanistic research holds promise for bacterial vaccines and phage therapies for *Pseudomonas aeruginosa* [J]. Drug Des Devel Ther, 2019, 13 (43): 909-924.
- [2] Wood SJ, Goldufsky JW, Seu MY, et al. *Pseudomonas aeruginosa* cytotoxin: mechanisms of cytotoxicity and impact on inflammatory responses [J]. Cells, 2023, 12: 195.
- [3] 刘祥. 重组铜绿假单胞菌外毒素 A 的原核表达和多克隆抗体

制备及免疫保护功能评价 [J]. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2016, 42(1): 33-38.

- [4] Diaz AM, Almozni B, Molina MA, et al. Potentiation of the humoral immune response elicited by a commercial vaccine against bovine respiratory disease by *Enterococcus faecalis* CECT7121 [J]. Benef Microbes, 2018, 9(4): 553-562.
- [5] 何爱琳, 李文桂, 梁诚诚. 铜绿假单胞菌重组 Ef-PopB 疫苗的构建、鉴定及表达 [J]. 中国病原生物学杂志, 2020, 15(9): 1042-1045.
- [6] 何爱琳, 李文桂. 屎肠球菌介导的铜绿假单胞菌寡肽酶 B(Ef-PopB)疫苗诱导小鼠产生保护作用及体液免疫应答 [J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2021, 37(5): 396-400.
- [7] Hendrickx AP, van Schaik W, Willems RJ. The cell wall architecture of *Enterococcus faecium*: from resistance to pathogenesis [J]. Future Microbiol, 2013, 8(8): 993-1010.
- [8] 罗维, 艾磊, 周越. 小鼠巨噬细胞 RAW264. 7 细胞电穿孔转染条件的建立和验证 [J]. 中国实验动物学报, 2020, 28(2): 193-200.
- [9] Nikyar A, Bolhassani A. Electroporation: an effective method for *in vivo* gene delivery [J]. Drug Deliv Lett, 2022, 12(1): 35-45.
- [10] Tran DTM, Phan TTP, Huynh TK, et al. Development of inducer-free expression plasmids based on IPTG-inducible promoters for *Bacillus subtilis* [J]. Microb Cell Fact, 2017, 16 (1): 130.
- [11] Ribeiro VT, Asevedo EA, de Paiva Vasconcelos LTC, et al. Evaluation of induction conditions for plasmid pQE-30 stability and 503 antigen of *Leishmania i. chagasi* expression in *E. coli* M15 [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2019, 103 (16): 6495-6504.
- [12] 李文桂, 陈雅棠. 铜绿假单胞菌外毒素 A 蛋白疫苗的研制现状 [J]. 生物技术通讯, 2020, 31(3): 359-374.
- [13] Tomayko MM, Allman D. What B cell memories are made of [J]. Curr Opin Immun, 2019, 57(1): 58-64.
- [14] 欧兴坤, 李文桂. 以粪肠球菌为载体的铜绿假单胞菌疫苗诱导小鼠的保护力及体液免疫应答 [J]. 山西医科大学学报, 2022, 53(3): 312-316.
- [15] 胡雪莉, 杨维平, 田芳. 调节性 B 细胞与蠕虫免疫的调控 [J]. 中国病原生物学杂志, 2013, 8(3): 281-284.
- [16] Pan TT, Tan RM, Li ML, et al. IL-17-producing α g T cells may enhance humoral immunity during pulmonary *Pseudomonas aeruginosa* infection in mice [J]. Front Cell Infect Microbiol, 2016, 12(6): 170.
- [17] 江帆, 李文桂, 刘潇. 铜绿假单胞菌重组 Bb-OprH 疫苗疫苗诱导的保护力及体液免疫应答. 中国病原生物学杂志, 2019, 14(7): 786-789.
- [18] 梁诚诚, 李文桂. 铜绿假单胞菌重组 Bb(pGEX-OprF/I)疫苗诱导的保护力及体液免疫应答. 实用医学杂志, 2020, 36(5): 586-589.
- [19] 欧兴坤, 李文桂. 铜绿假单胞菌重组 Efs-LasR 疫苗的构建、鉴定及表达 [J]. 中国病原生物学杂志, 2021, 16(6): 630-633, 638.
- [20] 李文桂, 欧兴坤, 何爱琳. 粪肠球菌介导结核分枝杆菌重组 Efs (pGEX-ESAT-6)疫苗的构建、鉴定及表达 [J]. 中国病原生物学杂志, 2023, 18(10): 1137-1140.
- [21] 李文桂, 欧兴坤, 何爱琳. 粪肠球菌介导的细粒棘球绦虫重组 Efs-Eg95-EgA31 疫苗的构建、鉴定及表达 [J]. 中国病原生物学杂志, 2022, 17(9): 1025-1029.
- [22] 李文桂, 欧兴坤, 何爱琳. 粪肠球菌介导的多房棘球绦虫重组 Efs-EmII/3-Em14-3-3 疫苗的构建、鉴定及表达 [J]. 中华地方病学杂志, 2023, 42(11): 876-882.
- [23] 李文桂, 欧兴坤, 何爱琳. 粪肠球菌介导的日本血吸虫重组疫苗的构建、鉴定及表达 [J]. 中华地方病学杂志, 2023, 42(3): 173-177.
- [24] 李文桂, 欧兴坤, 何爱琳. 粪肠球菌介导的日本血吸虫重组 EfsSj14-3-3 疫苗的构建、鉴定及表达 [J]. 热带医学杂志, 2024, 24(6): 818-822.

【收稿日期】 2025-04-30 【修回日期】 2025-07-10