

铜绿假单胞菌重组 Bb-pGEX-*OprI* 疫苗的构建及其保护力的研究^{*}

刘 潇, 李文桂[△], 罗广旭

重庆医科大学附属第一医院 传染病寄生虫病研究所 (重庆 400016)

【摘要】 目的 构建并鉴定含有铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*, Pa)外膜蛋白 I(*OprI*)基因与两歧双歧杆菌(*Bifidobacterium bifidum*, Bb)疫苗(Bb-pGEX-*OprI*),并研究该疫苗对小鼠 Pa 感染的保护作用。**方法** PCR 扩增 *OprI* 抗原编码基因并将其定向克隆至 pGEX-1 λ T,构建重组质粒 pGEX-*OprI*,将 pGEX-*OprI* 电穿孔转化 Bb,构建 Bb-pGEX-*OprI* 疫苗,进行双酶切、PCR 和测序鉴定后,异丙基- β -D-硫代半乳糖苷(IPTG)诱导表达,SDS-PAGE 和 Western blot 分别分析并鉴定表达产物。21 只小鼠随机分为 3 组,分别灌胃接种 Bb-pGEX-*OprI* 疫苗、空载体疫苗(Bb-pGEX-1 λ T)和 Bb。首次免疫后 4 周用 PA01 株攻击。攻击后 2 周处死小鼠取肺组织,计数肺组织的细菌菌落数。免疫前、首次免疫后 4 周和 PA01 株攻击后 2 周采小鼠静脉血,常规 ELISA 检测血清 IgG 及其亚类和 IgE。**结果** PCR 成功扩增出 194 bp 的 *OprI* 抗原编码基因;双酶切、PCR 和测序证实 *OprI* 基因成功克隆入 pGEX-1 λ T 中,并且 pGEX-*OprI* 成功转化 Bb,构建为 Bb-pGEX-*OprI* 疫苗;SDS-PAGE 显示 Bb-pGEX-*OprI* 表达相对分子质量约 32×10^3 的 *OprI*-谷胱甘肽转移酶(GST)融合蛋白;Western blot 证实融合蛋白能被 Pa 感染的鼠血清特异性识别。Bb-pGEX-*OprI* 疫苗组小鼠肺组织的细菌菌落数低于 Bb-pGEX-1 λ T 组和 Bb 组($P < 0.01$),Bb-pGEX-*OprI* 疫苗组小鼠血清 IgG、IgG2b、IgG3 和 IgE 水平在首次免疫后 4 周和攻击后 2 周依次升高,相同时间点 Bb-pGEX-*OprI* 疫苗组小鼠血清抗体水平平均高于 Bb-pGEX-1 λ T 和 Bb 组($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。**结论** 成功构建了重组疫苗 Bb-pGEX-*OprI*,其在小鼠抗 Pa 感染过程中可产生有效的体液免疫应答。

【关键词】 铜绿假单胞菌 两歧双歧杆菌 疫苗 免疫

Study on Construction of Recombinant Bb-pGEX-*OprI* Vaccine of *Pseudomonas aeruginosa* and Its Protection Effect

LIU Xiao, LI Wen-gui[△], LUO Guang-xu. Institute of Infectious and Parasitic Diseases, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China

[△] Corresponding author, E-mail: cqliwengui@163.com

【Abstract】 Objective To construct the recombinant Bb-pGEX-*OprI* vaccine of *Pseudomonas aeruginosa* (Pa) outer membrane protein I (*OprI*) and study its protection effect in mice against Pa. **Methods** The *OprI* gene was amplified by PCR, and cloned into pGEX-1 λ T to generate pGEX-*OprI*. The pGEX-*OprI* was transformed into *Bifidobacterium bifidum* (Bb) to construct recombinant Bb-pGEX-*OprI* vaccine by electroporation. After identification with double enzyme digestion, PCR and sequencing, the vaccine was then induced with IPTG, and its expression was analyzed and identified by SDS-PAGE and Western blot respectively. Twenty-one mice were randomly divided into 3 groups and vaccinated by intragastric administration with Bb-pGEX-*OprI*, Bb-pGEX-1 λ T and Bb respectively. All mice were challenged with PA01 strain at 4 weeks after the first vaccination. At 2 weeks after the challenge, mice were sacrificed to separate their lungs, and the numbers of bacterial colonies in lungs were counted. Venous blood was collected before vaccination, at 4 weeks after the first vaccination and 2 weeks after the challenge of PA01 strain. The serum IgG, IgG subclasses and IgE were detected by routine ELISA. **Results** The *OprI* gene of 194 bp was successfully amplified by PCR. Double enzyme digestion, PCR and sequencing confirmed that the *OprI* gene was successfully cloned into pGEX-1 λ T and pGEX-*OprI* was successfully transformed into Bb, constructing the Bb-pGEX-*OprI* vaccine. SDS-PAGE indicated that Bb-pGEX-*OprI* vaccine expressed an *OprI*-GST fusion protein with the relative molecular mass of approximately 32×10^3 . Western blot verified that the fusion protein could be specifically identified by the sera of mice infected with Pa. The number of bacterial colonies in lung of Bb-pGEX-*OprI* vaccine group was lower than that of Bb-pGEX-1 λ T or Bb control ($P < 0.01$). The levels of serum IgG, IgG2b, IgG3 and IgE in Bb-pGEX-*OprI* vaccine group rose at 4 weeks after the first vaccination and 2

^{*} 重庆市科委地方病专项基金(No. 2008AB5055、No. 2008AB5008 和 No. 2008AB5054)资助

[△] 通信作者, E-mail: cqliwengui@163.com

weeks after the challenge successively. The levels of serum antibodies in Bb-pGEX-*OprI* vaccine group were higher than those in Bb-pGEX-1λT or Bb control at the same time point ($P < 0.01$ or $P < 0.05$). **Conclusion** The recombinant Bb-pGEX-*OprI* vaccine was successfully constructed and produced an effective humoral immune response against the Pa infection.

【Key words】 *Pseudomonas aeruginosa* *Bifidobacterium bifidum* Vaccine Immune

铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*, Pa)是一种革兰阴性的条件致病菌,是院内感染的常见致病菌之一。Pa的外膜通透性降低、主动泵出系统活跃、抗菌活性酶产生和生物膜形成等^[1-3]因素使其对多种抗生素具有耐药性。Pa感染若治疗不及时、不彻底,易转为慢性感染,使治疗更加困难,所以疫苗研制成为一种替代抗生素治疗的更好途径。

FINKE等^[4]将Pa的重组外膜蛋白I(outer membrane protein I, OprI)加Al(OH)₃佐剂腹腔注射免疫BALB/c小鼠,发现免疫组小鼠的半数致死量(LD₅₀)是对照组的4倍,此研究首次证明OprI可对Pa产生特异性保护力,提示重组OprI可对抗Pa的攻击感染,是一种有希望的疫苗候选分子。两歧双歧杆菌(*Bifidobacterium bifidum*, Bb)是一种肠道益生菌,近年来成为基因工程疫苗新型载体研究的热点之一^[5-6]。本研究拟构建Pa重组疫苗Bb-pGEX-*OprI*,研究该疫苗免疫小鼠产生的保护力,为探索该疫苗的保护性免疫机制提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 主要试剂及仪器 DNA提取试剂盒、质粒提取试剂盒、PCR试剂盒、异丙基-β-D-硫代半乳糖苷(IPTG,上海生工公司);蛋白Marker(重庆鼎国公司);*Bam*H I、*Eco*R I、DNA marker、T4 DNA连接酶(Fermentas);HRP标记羊抗鼠IgG、IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3和IgE(Southern Biotech);Pa抗原、Pa感染的鼠血清由本室制备。PCR仪(MJ Research);电泳仪、凝胶成像分析仪(Bio-Rad),酶标仪(Thermo Scientific)。

1.1.2 质粒和菌种 PA01标准株由重庆医科大学附属儿童医院余加林教授惠赠;BL21(pGEX-1λT)和Bb菌种由本室保存。

1.1.3 实验动物 雌性BALB/c小鼠21只,体重20~25 g,购于重庆医科大学实验动物中心。

1.2 方法

1.2.1 *OprI*基因的扩增及鉴定 按DNA提取试剂盒说明书提取Pa基因组DNA。*OprI*引物P1:

5'-GCGGATTCTGAGCAGCCACTCCAAAGAAACGAAGCT-3'(下划线部分为*Bam*H I酶切位点), P2: 5'-GCGAATTCCTATTACTTGCGGCTGGC TTTTTC-3'(下划线部分为*Eco*R I酶切位点),扩增片段长194 bp,引物由上海生工公司合成。50 μL反应体系:2×PCR Master 25 μL,上、下游引物各2 μL, DNA模板3 μL,灭菌去离子水18 μL。条件:94℃,2 min;共35个循环(94℃,30 s;55℃,30 s;72℃,30 s);72℃,2 min。12 g/L琼脂糖凝胶电泳鉴定产物。

1.2.2 重组质粒pGEX-*OprI*的构建 将BL21(pGEX-1λT)加入含氨苄青霉素(Amp,质量浓度为50 μg/mL)LB液体培养基中,37℃、200 r/min摇床培养48~72 h,按质粒提取试剂盒说明提取pGEX-1λT。将*OprI*的PCR产物和pGEX-1λT均用*Bam*H I和*Eco*R I进行双酶切,酶切体系均为60 μL:42 μL扩增产物或载体,1.3 μL *Bam*H I,1.3 μL *Eco*R I,6 μL 10×Tango Buffer,9.4 μL灭菌去离子水。37℃酶切2 h。用纯化的酶切产物建立20 μL连接体系:目的基因4 μL,载体片段12 μL,10×T4 Buffer 2 μL,T4 DNA连接酶2 μL。4℃连接过夜。

1.2.3 重组疫苗Bb-pGEX-*OprI*的构建及鉴定

1.2.3.1 pGEX-*OprI*质粒电穿孔转化感受态Bb Bb菌种于含0.5 mol/L蔗糖的MRS液体培养基中,37℃厌氧培养48~72 h,收集菌体,用100 mL/L甘油制备感受态。共加入3次甘油,每次菌液与甘油充分混匀后离心10 min收集菌体。甘油体积依次为50、25和10 mL,离心转速依次为3 000、2 000、1 500 r/min。最后加入1.5 mL甘油,用于电转化。电转化参数:电压800~2 500 V,时间5 ms,电穿孔1~5次。电转化后加入MRS培养基,150 r/min培养2 h,取适量菌液划线接种至含Amp的MRS筛选平板上,37℃培养48~72 h。

1.2.3.2 重组疫苗的双酶切和PCR鉴定 挑选筛选平板上的阳性单克隆菌落加入液体培养基中增菌,提取重组质粒,用上述酶切体系再次进行双酶切鉴定。以提取的重组质粒为模板,按照上述PCR方

法扩增 *OprI*。

1.2.4 重组疫苗的诱导表达及 SDS-PAGE 分析

阳性重组菌培养至吸光度(A)值为 0.5~0.8,取适量做对照,其余菌液加入 1 mmol/L IPTG,收集诱导 1、2、3、4、5 和 6 d 的菌体。20 μL/孔加样,以 100 g/L分离胶进行电泳。pGEX-1λT 质粒含有谷胱甘肽转移酶基因(*GST*),*OprI* 基因插入其下游可表达为 *OprI*-*GST* 融合蛋白。

1.2.5 Western blot 鉴定融合蛋白 以空载体做对照,SDS-PAGE 分析后,半干法转膜,常规方法封闭、洗膜,一抗孵育 *Pa* 感染的鼠血清(1 : 100),二抗为 HRP 标记羊抗鼠 IgG(1 : 1 000),用现配的二氨基联苯胺显色液显色并成像。

1.2.6 动物免疫及攻击 小鼠随机分为 3 组,分别灌胃接种 Bb-pGEX-*OprI* 疫苗、空载体疫苗(Bb-pGEX-1λT)和 Bb 对照,每组 7 只,5×10⁹ CFU 疫苗重悬于 100 μL MRS 培养基,连续接种 3 周,每周连续接种 3 d。首次免疫后 4 周用 5×10⁶ CFU 的 PA01 株重悬于 10 μL LB 液体培养基,鼻腔内一次性接种进行攻击。

1.2.7 肺组织细菌计数 攻击后 2 周处死小鼠,无菌取肺组织,匀浆稀释后涂皿,37 ℃ 培养 2 d,进行菌落计数。

1.2.8 ELISA 检测血清抗体 免疫前和首次免疫后 4 周小鼠尾静脉取血,PA01 株攻击后 2 周摘除眼球取血,分离血清冻存备用。常规 ELISA 检测抗体:1 μg/孔 *Pa* 抗原包被,小鼠血清 1 : 100 稀释,HRP 标记的羊抗鼠 IgG、IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3 和 IgE 均以 1 : 6 000 稀释,酶标仪测 A₄₅₀ 值。

1.2.9 统计学方法 数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示。肺细菌计数用 lg (CFU/mL) 表示。满足方差齐性和正态性的数据多组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 SNK-*q* 检验;不满足方差齐性或正态性的数据采用非参数检验。*P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 *OprI* 基因的 PCR 扩增结果

扩增结果见图 1,获得约 194 bp 的 *OprI* 基因片段。

2.2 重组疫苗的双酶切和 PCR 鉴定

从具有 Amp 抗性的重组菌中提取的重组质粒经双酶切后产生约 4 947 bp 的 pGEX-1λT 载体片段和 194 bp 的 *OprI* 基因片段(图 2),以重组质粒为模板 PCR 扩增出约 194 bp 的 *OprI* 基因片段,经上海生工

公司测序证实插入的片段与设计序列一致。

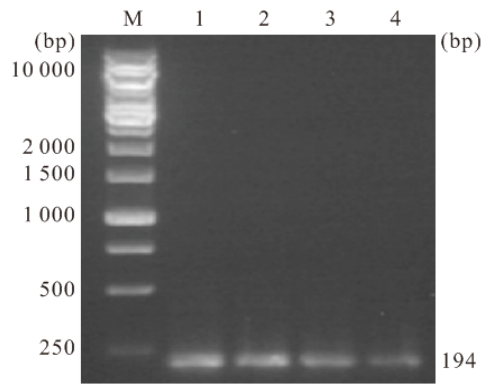


图 1 *OprI* 基因的 PCR 扩增结果

Fig 1 PCR result of *OprI* gene

M: DNA marker; 1-4: PCR products of *OprI* gene

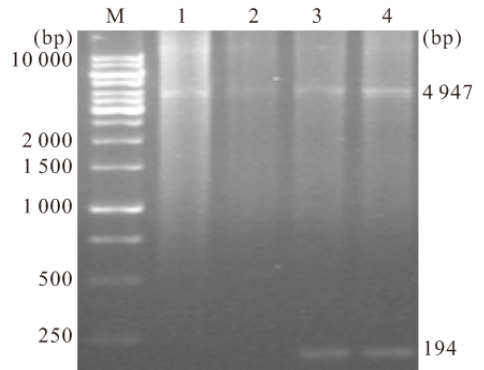


图 2 pGEX-*OprI* 双酶切鉴定

Fig 2 Identification of pGEX-*OprI* with double enzyme digestion

M: DNA marker; 1, 2: pGEX-1λT; 3, 4: pGEX-*OprI* digested with *Bam*H I and *Eco*R I

2.3 SDS-PAGE 分析

Bb-pGEX-*OprI* 在相对分子质量约 32×10³ (*OprI*:6×10³,*GST*:26×10³)处出现与预期相符的特异性 *OprI*-*GST* 融合蛋白条带(图 3)。凝胶分析显示诱导 3 d 后表达量达较高水平,融合蛋白约占菌体

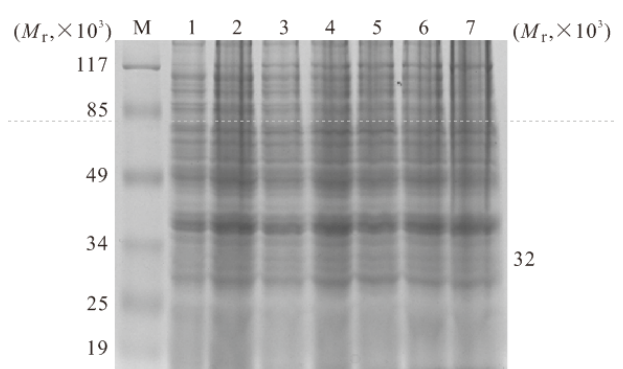


图 3 Bb-pGEX-*OprI* 表达蛋白的 SDS-PAGE 分析

Fig 3 SDS-PAGE of expressed proteins of Bb-pGEX-*OprI*

M: Protein marker; 1: Expressed proteins of Bb-pGEX-*OprI* without induction; 2-7: Expressed proteins of Bb-pGEX-*OprI* induced for 1, 2, 3, 4, 5 and 6 d respectively

总蛋白的 6%。未经诱导的重组菌无此条带出现。

2.4 Western blot 鉴定

Bb-pGEX-*OprI* 疫苗表达的融合蛋白可被 Pa 感染的鼠血清识别,在相对分子制质量约 32×10^3 处出现特异性反应条带,空载体对照无此条带(图 4)。

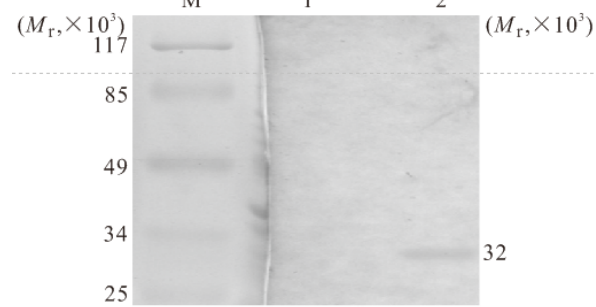


图 4 Bb-pGEX-*OprI* 表达蛋白的 Western blot 鉴定
Fig 4 Western blot of expressed protein of Bb-pGEX-*OprI*
M: Protein marker; 1: Control; 2: *OprI*-GST protein

2.5 肺组织的细菌菌落数

小鼠肺组织细菌菌落计数显示,Bb-pGEX-*OprI* 疫苗组 $[(7.653\pm0.082)\lg\text{CFU/mL}]$ 低于 Bb-pGEX- λ T 组 $[(8.730\pm0.062)\lg\text{CFU/mL}]$ 和 Bb 组 $[(8.788\pm0.065)\lg\text{CFU/mL}]$ (P 均 <0.01),Bb-pGEX- λ T 组和 Bb 组之间差异无统计学

意义($P>0.05$)。

2.6 小鼠血清 IgG 及其亚类和 IgE 水平

IgG1、IgG2a 在所有组所有时点均未检出。同组内不同时间点比较,3 组小鼠免疫后 4 周和攻击后 2 周的 IgG、IgG2b、IgG3 和 IgE 水平均明显高于免疫前 (P 均 <0.01),3 组攻击后 2 周的 IgG、IgG2b 和 IgE 较首次免疫后 4 周升高 (P 均 <0.01),Bb-pGEX-*OprI* 疫苗组攻击后 2 周的 IgG3 水平较首次免疫后 4 周升高 ($P<0.05$)。见附表。

同一时间点不同组间比较,免疫前 IgG、IgG2b、IgG3 和 IgE 水平在 3 组间的差异均无统计学意义 (P 均 >0.05)。首次免疫后 4 周,Bb-pGEX-*OprI* 疫苗组的 IgG 水平高于空载体组和 Bb 组 (P 均 <0.01),空载体组高于 Bb 组 ($P<0.05$),Bb-pGEX-*OprI* 疫苗组和空载体组的 IgE 水平均明显高于 Bb 组 (P 均 <0.01),Bb-pGEX-*OprI* 疫苗组高于空载体组 ($P<0.05$)。对首次免疫后 4 周的 IgG2b、IgG3 及攻击后 2 周的 IgG、IgG2b、IgG3 和 IgE 水平进行三组间的两两比较,发现 Bb-pGEX-*OprI* 疫苗组和空载体组均高于 Bb 组,Bb-pGEX-*OprI* 疫苗组均高于空载体组 (P 均 <0.01)。见附表。

Table Detection on antibodies in sera of mice immunized with vaccine and challenged with PA01 strain							
Time	Group	IgG	IgG1	IgG2a	IgG2b	IgG3	IgE
BV	A	0.030±0.002	0	0	0.005±0.001	0.005±0.002	0.006±0.001
	B	0.030±0.002	0	0	0.006±0.002	0.005±0.002	0.006±0.001
	C	0.030±0.002	0	0	0.006±0.001	0.005±0.002	0.006±0.001
FV _{4w}	A	0.069±0.003 * , aa, bb	0	0	0.028±0.002 * * , aa, bb	0.022±0.002 * * , aa, bb	0.026±0.002 * * , aa, b
	B	0.056±0.002 * * , a	0	0	0.019±0.002 * * , aa	0.016±0.002 * * , aa	0.024±0.002 * * , aa
	C	0.052±0.004 * *	0	0	0.015±0.001 * *	0.010±0.002 * *	0.020±0.001 * *
C _{2w}	A	0.100±0.006 * * , # , aa, bb	0	0	0.046±0.003 * * , # , aa, bb	0.025±0.003 * * , # , aa, bb	0.039±0.002 * * , # , aa, bb
	B	0.081±0.004 * * , # , aa	0	0	0.041±0.002 * * , # , aa	0.019±0.002 * * , # , aa	0.035±0.002 * * , # , aa
	C	0.070±0.002 * * , #	0	0	0.037±0.002 * * , #	0.014±0.002 * * , #	0.029±0.002 * * , #

BV: Before vaccination; FV_{4w}: 4 weeks after first vaccination; C_{2w}: 2 weeks after challenge; A: Bb-pGEX-*OprI*; B: Bb-pGEX- λ T; C: Bb. * $P<0.05$, * * $P<0.01$, vs. BV in the same group; # $P<0.05$, ## $P<0.01$, vs. FV_{4w} in the same group; a $P<0.05$, aa $P<0.01$, vs. C group at the same time point; b $P<0.05$, bb $P<0.01$, vs. B group at the same time point

3 讨论

MIZUNO 等^[7]首次分离出 Pa 的 *OprI* 蛋白,相对分子质量为 8×10^3 。LAM 等^[8]发现急性慢性 Pa 感染患者和动物血清的抗体均可识别 *OprI*,表明 *OprI* 具有较好的免疫原性,适合成为一种疫苗候选分子。LOOTS 等^[9]发现 *OprI* 可黏附于鸡气管黏膜和小肠上皮细胞,与抗原提呈细胞和上皮细胞的 Toll 样受体结合进而促进抗原的摄取,这对 *OprI* 黏膜疫苗研究有重要意义。

本研究使用的质粒 pGEX- λ T 含有高效的 *tac* 启动子,使 mRNA 的转录水平明显提高,含有大肠

杆菌和 Bb 的复制起始点,GST 基因是多克隆位点上游的标签蛋白编码基因,GST 蛋白与目的蛋白的融合表达可增加融合蛋白的溶解性。朱佑明等^[5]利用 pGEX- λ T 使 Pa 的 *OprF* 蛋白在 Bb 中正确表达。本研究构建了 pGEX-*OprI*,并将其电穿孔转化 Bb,诱导表达结果提示 *OprI* 基因在 Bb 中获得表达。凝胶分析结果显示表达的融合蛋白占菌体总蛋白的 6%,诱导 3 d 后表达量达较高水平,提示该疫苗能够表达 *OprI*-GST 蛋白。Western blot 结果显示融合蛋白可与 Pa 感染的鼠血清发生反应,提示该融合蛋白具有一定的抗原性。

周必英等^[6]用细粒棘球绦虫重组 Bb-Eg95-

EgA31 疫苗灌胃免疫小鼠,原头节攻击后发现囊重抑制率为 62.67%,提示灌胃免疫是一种较好的途径。本研究也采用灌胃途径免疫小鼠,PA01 株攻击后发现疫苗组肺组织的细菌菌落数明显低于对照组,表明该疫苗可诱导小鼠产生一定的保护力。

本研究发现首次免疫后 4 周疫苗组的血清 IgG 升高,与 ZHANG 等^[10]报道相似。我们推测灌胃免疫后重组 Bb 菌在小鼠肠道定植并高效、稳定地表达 OprI 抗原,经肠道派氏集合淋巴小结内的 M 细胞摄取后转运给抗原提呈细胞,后者将抗原呈递给 T 细胞,进而使其分化为 Th 细胞,Th 细胞辅助 B 细胞分化为浆细胞产生抗体,通过再循环途径进入血液,使血清中抗体升高。IgG 可通过中和作用和细胞毒作用(ADCC)等途径杀死 Pa。

本研究发现首次免疫后 4 周的疫苗组小鼠血清 IgG2b 和 IgG3 明显升高,与 DUNKLEY 等^[11]结果相似,提示 IgG2b 和 IgG3 与保护作用有关。推测在 Th1 和 Th2 细胞分泌的干扰素- γ 和转化生长因子- β 等细胞因子的作用下浆细胞产生较多的 IgG3 和 IgG2b。IgG2b 和 IgG3 可通过激活补体清除 Pa,Pa 的调理吞噬作用需要补体固定,特别是 C3b^[12],IgG2b、IgG3 和补体分别结合巨噬细胞及中性粒细胞上的 Fc 受体和补体受体发挥联合调理作用,促进这些细胞对 Pa 菌体的吞噬。IgG3 还可结合 NK 细胞上的 Fc 受体产生 ADCC 杀伤 Pa。

王国富等^[13]用表达福氏志贺菌 ipaB 蛋白的重组 Bb 疫苗多次灌胃免疫小鼠,发现首次免疫后 4 周,免疫鼠血清 IgE 升高。本研究显示首次免疫后 4 周免疫鼠的血清 IgE 升高,推测多次免疫后疫苗表达的 OprI 抗原使 B 细胞分泌特异性 IgE 增多并使肥大细胞、嗜碱性粒细胞和嗜酸性粒细胞活化脱颗粒发挥促炎症作用而抵抗 Pa 的感染。

BRIDGE 等^[14]发现免疫表达 Pa O 抗原的重组沙门氏菌疫苗,并用 PA103 株攻击的小鼠,血清 IgG 较首次免疫后 27 d 的更高,抗体介导的调理吞噬作用也更显著。本研究发现 PA01 株攻击后 2 周血清 IgG 及其亚类和 IgE 均较首次免疫后 4 周升高,表明该疫苗不仅可以在接种后引起中和抗体升高,并且能产生良好的免疫记忆,提示用该疫苗首次灌胃免疫后,部分 B 细胞成为记忆性 B 细胞,用 PA01 株攻击后,记忆性 B 细胞再次接触到 Pa 菌体表面的 OprI 抗原,抗体浓度迅速增高,产生的体液免疫应答比首次免疫后更加高效和持久。

参 考 文 献

- [1] BLAIR JM, RICHMOND GE, PIDDOCK LJ. Multidrug efflux pumps in Gram-negative bacteria and their role in antibiotic resistance. *Future Microbiol*, 2014, 9 (10): 1165-1177.
- [2] KHATUA B, VAN VLEET J, CHOUDHURY BP, *et al.* Sialylation of outer membrane porin protein D: a mechanistic basis of antibiotic uptake in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Cell Proteomics*, 2014, 13(6): 1412-1428.
- [3] HILL D, ROSE B, PAJKOS A, *et al.* Antibiotic susceptibilities of *Pseudomonas aeruginosa* isolates derived from patients with cystic fibrosis under aerobic, anaerobic, and biofilm conditions. *J Clin Microbiol*, 2005, 43(10): 5085-5090.
- [4] FINKE M, DUCHÊNE M, ECKHARDT A, *et al.* Protection against experimental *Pseudomonas aeruginosa* infection by recombinant *P. aeruginosa* lipoprotein I expressed in *Escherichia coli*. *Infect Immun*, 1990, 58 (7): 2241-2244.
- [5] 朱佑明, 罗永艾, 李文桂. 铜绿假单胞菌重组 Bb-OprF 疫苗构建及鉴定. *中国人兽共患病学报*, 2011, 27(4): 303-306.
- [6] 周必英, 陈雅棠, 李文桂, 等. 细粒棘球绦虫重组 Bb-Eg95-EgA31 融合蛋白诱导小鼠免疫应答. *免疫学杂志*, 2010, 26 (3): 232-237.
- [7] MIZUNO T, KAGEYAMA M. Separation and characterization of the outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Biochem*, 1978, 84(1): 179-191.
- [8] LAM JS, MUTHARIA LM, HANCOCK RE, *et al.* Immunogenicity of *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane antigens examined by crossed immunoelectrophoresis. *Infect Immun*, 1983, 42(1): 88-98.
- [9] LOOTS K, REVETS H, GODDEERIS BM. Attachment of the outer membrane lipoprotein (OprI) of *Pseudomonas aeruginosa* to the mucosal surfaces of the respiratory and digestive tract of chickens. *Vaccine*, 2008, 26(4): 546-551.
- [10] ZHANG M, SUN C, GU J, *et al.* *Salmonella Typhimurium* strain expressing OprF-OprI protects mice against fatal infection by *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiol Immunol*, 2015, 59(9): 533-544.
- [11] DUNKLEY ML, RAJYAGURU S, MCCUE A, *et al.* *Pseudomonas aeruginosa*-specific IgG1 and IgG2 subclasses in enhancement of pulmonary clearance following passive immunisation in the rat. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 2003, 39(1): 37-44.
- [12] DIGIANDOMENICO A, WARRENER P, HAMILTON M, *et al.* Identification of broadly protective human antibodies to *Pseudomonas aeruginosa* exopolysaccharide Psl by phenotypic screening. *J Exp Med*, 2012, 209(7): 1273-1287.
- [13] 王国富, 薛士鹏, 吴利先. 双歧杆菌介导的福氏志贺菌 Bb-ipaB 疫苗免疫机制研究. *中国病原生物学杂志*, 2013, 8(4): 315-317.
- [14] BRIDGE DR, WHITMIRE JM, MAKOBONGO MO, *et al.* Heterologous *Pseudomonas aeruginosa* O-antigen delivery using a *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium wecA* mutant strain. *Int J Med Microbiol*, 2016, 306(7): 529-540.

(2017-07-08 收稿, 2017-10-20 修回)

编辑 沈 进