

屎肠球菌介导的铜绿假单胞菌重组 Ef-PA0057 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(Pa)重组 Ef-PA0057 疫苗, 研究其诱导的肺荷菌量保护力及体液免疫应答。方法 将 PA01 株 ATCC9027 的基因组 DNA 作为模板进行 PCR 克隆 PA0057 基因, 将克隆基因插入表达质粒 pGEX-1 λ T 得 pGEX-PA0057; 将重组质粒电穿孔 Ef TX0016 株, 构建 rEf-PA0057 疫苗; 双酶切和 PCR 鉴定的抽提质粒经异丙基- β -D-硫代半乳糖苷(IPTG)诱导后通过十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)和 Western blot 分析和鉴定表达产物; 用 5×10^8 克隆形成单位(CFU)的 rEf-PA0057 疫苗灌胃小鼠, 每周 3 次, 连续 3 周; 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, 分离肺脏, 培养肺细菌并行菌落计数; 分别于初次免疫后第 0、4、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 900 bp 的 PA0057 基因; 双酶切实证 PA0057 基因插入 pGEX-1 λ T 中; PCR 显示, rEf-PA0057 疫苗构建成功; 经 SDS-PAGE 证实, 重组菌表达 58 ku 的 PA0057-GST 融合蛋白, 目标蛋白的含量是菌体总蛋白的 18%; 通过 Western blot 提示, 融合蛋白可与 Pa 感染的鼠阳性血清发生结合反应; rEf-PA0057 疫苗组、空载体组和 Ef 对照组肺组织的菌落数分别为 $(0.297 \pm 0.011) \times 10^8$ CFU、 $(7.576 \pm 0.206) \times 10^8$ CFU 和 $(7.551 \pm 0.185) \times 10^8$ CFU, 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 对照组相比差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。结论 成功构建了 rEf-PA0057 疫苗, 该疫苗接种后产生的一个体液免疫反应可对抗铜绿假单胞菌 PA01 株的滴鼻攻击。

关键词 屎肠球菌; 铜绿假单胞菌; PA0057; 疫苗; 体液免疫

文献标志码 A 文章编号 1000 - 1492(2026)03 - 0518 - 06

doi:10.19405/j.cnki.issn1000 - 1492.2026.03.018

2025 - 12 - 21 接收

基金项目: 国家自然科学基金项目(编号: 30671835、30200239)

作者简介: 李文桂, 男, 博士, 研究员, 通信作者, E-mail: cqliwengui@

163.com

铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*, Pa) 是一种院内感染的常见致病菌, 用抗生素治疗易产生耐药性, 这就需要探索其他治疗方法。既往研究^[1]表明, 脂多糖、多糖、藻酸盐、鞭毛或菌毛均可作为

thione peroxidase 4 (GPX4), nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (NRF2), and Kelch-like ECH-associated protein 1 (Keap1), in renal tissues, HK-2 cells, and KLF4-overexpressing HK-2 cells. **Results** Compared with the control group, DN rats exhibited elevated serum BUN and SCR levels, glomerular hypertrophy, renal interstitial fibrosis, and decreased KLF4 expression. Additionally, MDA, Fe²⁺, and lipid peroxidation levels increased, indicating enhanced ferroptosis in renal tissues, accompanied by reduced GPX4 and NRF2 expression and elevated Keap1 levels. Similarly, HG-treated HK-2 cells showed decreased KLF4 expression, increased MDA, Fe²⁺ and lipid peroxidation, elevated ferroptosis, and dysregulated GPX4/NRF2/Keap1 expression. However, KLF4 overexpression reversed these alterations induced by high glucose treatment. **Conclusion** In the renal tissues of type 1 diabetic rats, the expression of KLF4 decreases the level of ferroptosis increases, and KLF4 overexpression could alleviate HG-induced HK-2 cell injury.

Key words diabetic nephropathy; KLF4; ferroptosis; Keap1; NRF2; GPX4

Fund programs National Natural Science Foundation of China (No. 82170484); Key Research and Development Program of Anhui Province (No. 202004bll020025); Natural Science Research Project of Anhui Educational Committee (No. KJ2021A0247)

Corresponding authors Zhu Huaqing, E-mail: aydzhq@126.com; Wang Yi, E-mail: wangyi@ahmu.edu.cn

疫苗使用,但有许多缺陷,故需寻找其他抗原。PA0057 基因编码金属 β -内酰胺酶(metallo- β -lactamase, MBLs), MBLs 位于细菌的质粒(整合子)上,极易在细菌中传播^[2]。新德里金属 β -内酰胺酶(new delhi metallo- β -lactamase, NDM-1)是一种常见的 MBLs,在静电状态下存在一个关键的活性位点,借助 Zn^{2+} 和枸橼酸维持分子的空间结构;在活性位点上常伴随水解的氨苄西林,巯基可以整合 Zn^{2+} ,抑制 MBLs 的活性,推测 PA0057 蛋白是一种有希望的疫苗分子。

研究^[3]显示,将肠球菌联合枯草芽孢杆菌,或者肠球菌联合长双歧杆菌和嗜酸乳杆菌对炎症性肠病进行治疗,可显著改善该病的炎症反应,提示肠球菌具有较好的益生作用。屎肠球菌(*Enterococcus faecium*, Ef)可开发为疫苗载体^[4]。本实验克隆 PA0057 基因,将 Ef 作为表达载体构建重组 Ef-PA0057 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肺荷菌量和体液反应,初步探讨其诱导的保护性免疫机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒 Pa 的 PA01 株 ATCC9027 源自重庆医科大学附属儿童医院余家林教授,重庆医科大学附属第一医院传染病寄生虫病研究所保存屎肠球菌 TX0016 株和 BL21(pGEX-1 λ T)。

1.1.2 实验动物 21 只雌性 BALB/c 鼠,体质量约 16~20 g,SPF 级,6~8 周龄,购自重庆国家生物产业基地实验动物中心。本实验通过重庆医科大学附属第一医院生物医学伦理委员会批准,并按照实验动物伦理学要求报备(批件号:2019015)。

1.1.3 主要试剂与仪器 DNA 标志物(2019-DNA)、蛋白标志物(2019-P1)、胎牛血清(2019-F)、高效感受态细胞制备 Kits(2019-HK)、质粒提取 Kits(2019-PK)、高保真即用 PCR 扩增 Kits(2019-PH)、IPTG(2019-IG)、N,N-亚甲基双丙烯酰胺(2019-N1)、丙烯酰胺(2019-N2)、DAB(2019-D1)和考马斯亮蓝(2019-K1)、LB 液体和固体培养基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 均购自美国 Southern Biotech 公司(2019-AB);重庆医科大学附属第一医院传染病寄生虫病研究所自制 Pa 感染的小鼠阳性血清。酶标仪购自英国 Bio-TEK 公司(型号:thermo

scientific)。

1.2 方法

1.2.1 设计与合成引物 根据 GeneBank PA0057 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'-GCCGATTC-CGC CAT GGA TTG CTT CGT T-3'; P2 引物序列为 5'-GCCGAATTC-CCA CTG CAT CTC GCC CTT G-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)。

1.2.2 扩增及鉴定 PA0057 基因 常规培养 PA01 菌株,用细菌基因组的 DNA 提取 Kits 抽提基因组 DNA。然后,扩增及鉴定 PA0057 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、25 μ L 石蜡油密封。PCR 反应条件:95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min,95 $^{\circ}$ C 变性 1 min,58.5 $^{\circ}$ C 退火 45 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 45 s,共 30 个循环,最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min;用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳鉴定 PCR 产物。

1.2.3 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。

1.2.4 构建与鉴定 rEf-PA0057 疫苗 根据参考文献^[5]进行构建和鉴定。

1.2.5 表达与鉴定 rEf-PA0057 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。根据参考文献^[5]进行免疫印渍鉴定 rEf 疫苗。

1.2.6 动物免疫及攻击方案 按随机数字表法将实验动物分为 rEf-PA0057 疫苗组、空载体组和 Ef 对照组,每组有 7 只小鼠。取 5×10^8 CFU 的疫苗重悬于 100 μ L 的 LB 培养液中,每天接种 1 次,连续 3 d,持续 3 周。在初次免疫后 4 周用 5×10^7 CFU 的 PA01 株重悬于 10 μ L 的 LB 培养液进行单次滴鼻攻击。

1.2.7 计数肺细菌负荷 根据参考文献^[6]计数肺细菌负荷。

1.2.8 ELISA 检测血清抗体 以 1 μ g/孔的 PaAg(课题组自制的粗抗原)包被 96 孔酶标板,分别加入 1:100 的小鼠血清和 1:6 000 的 HRP 标记羊抗鼠 IgG、IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3 和 IgE 100 μ L,用酶标仪测 A_{492} 值。

1.3 统计学处理 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,多组均数比较采用单因素方差分析及其两两比较

SNK-*q* 检验,两组均数比较采用两独立样本 *t* 检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 扩增与检测 PA0057 基因 将 Pa 的基因组 DNA 用作模板进行 PCR 克隆 PA0057 基因片段,经琼脂糖凝胶电泳出现大小约 900 bp 的靶基因片段(图 1A)。

2.2 双酶切鉴定 pGEX-PA0057 pGEX-PA0057 的双酶切产物经 1.2% 琼脂糖电泳显现大小约 5 000 bp 的 pGEX 载体条带和 900 bp 的靶基因条带,但空载体无靶基因条带(图 1B)。

2.3 PCR 鉴定 rEf-PA0057 疫苗 将从 rEf-PA0057 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 900 bp 的靶基因条带(图 1C)。

2.4 SDS-PAGE 分析 rEf-PA0057 疫苗 SDS-PAGE 显示,IPTG 诱导的 rEf-PA0057 疫苗表达 58 ku 与 PA0057-GST 相符的蛋白条带,诱导 5 h 表达量较

高,表达蛋白的含量是菌体总蛋白的 18 % (图 1D)。

2.5 Western blot 鉴定 rEf-PA0057 疫苗 采用 Pa 感染的鼠阳性血清识别 rEf-PA0057 疫苗表达的 58 ku 融合蛋白(图 1E)。

2.6 计数肺细菌负荷 rEf-PA0057 疫苗组的菌体数量低于两个对照组,差异有统计学意义($F = 4\ 697.969, P < 0.001$);空载体和 Ef 对照组比较,差异无统计学意义($q = 0.232, P = 0.821$)。见表 1。

表 1 rEf-PA0057 疫苗免疫及 PA01 株攻击后小鼠肺荷菌量 ($n = 7, \bar{x} \pm s$)

Tab. 1 Bacterial load in the lungs of mice following immunization with the rEf-PA0057 vaccine and challenge with PA01 strain ($n = 7, \bar{x} \pm s$)

Group	Lung bacteria load ($\times 10^8$ CFU)
rEf-PA0057	0.297 \pm 0.011
Blank vector	7.576 \pm 0.206***
Ef control	7.551 \pm 0.185***

*** $P < 0.001$ vs rEf-PA0057 group.

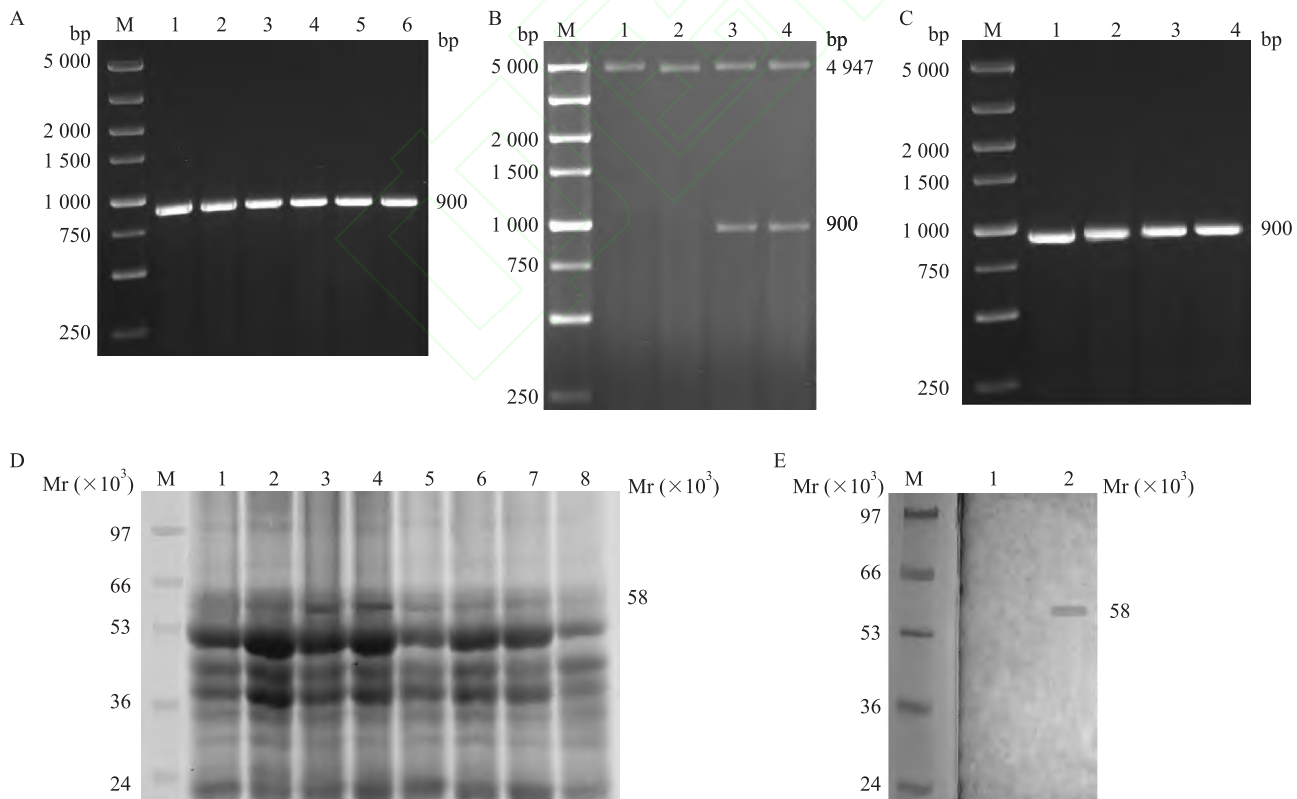


图 1 rEf-PA0057 疫苗的构建与鉴定

Fig. 1 Construction and identification of rEf-PA0057 vaccine

A: Identification of PCR product of PA0057 gene, M: DNA marker, 1-6: PCR products of PA0057; B: Double endonuclease identification of pGEX-PA0057, M: DNA marker, 1/2: pGEX-1λT vector, 3/4: endonuclease products of pGEX-PA0057; C: PCR identification of target gene of rEf-PA0057 vaccine, M: DNA marker, 1-4: PCR products of pGEX-PA0057; D: SDS-PAGE analysis detected the expression product of rEf-PA0057 vaccine, M: Protein marker, 1: rEf-RhlR without culture, 2-8: rEf-PA0057 cultured for 1, 3, 5, 7, 9, 11 and 13 h, respectively; E: Western blot detected the expression product of rEf-PA0057 vaccine, M: Protein marker, 1: Control, 2: PA0057 protein.

2.7 检测血清IgG及其亚类和IgE ELISA检测小鼠血清IgG及其亚类和IgE,结果见图2,3组均未检出IgG2a。在同一时间点的不同组间比较,3组免疫前的血清IgG、IgG1、IgG2b、IgG3和IgE水平较低,差异无统计学意义($F=0.483、0.874、0、0.245、0.689$);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,差异有统计学意义(初次免疫后4周的 $F=662.558、159.463、62.080、73.060$ 和 $83.896, P<0.01$;攻击后2周的 $F=178.500、244.069、232.053、113.740$ 和 $126.824, P<0.01$);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,差异有统计学意义($F=2495.027、478.625、0、260.185$ 和 $652.773, P<0.01$)。

3 讨论

研究^[7-9]表明Ef是一种新型疫苗载体,但其细胞壁较厚,外源基因很难转入。电穿孔具有较高的转化效率。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。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-PA0057疫苗经IPTG诱导3~5 h后可表达PA0057-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18%,提示表达效率较低,可能与启动子及其调控元件有关,需要深入研究;经Western blot证实,小鼠Pa阳性血清结合重组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。

肺组织的细菌负荷是评价Pa疫苗保护力的主要指标之一。研究者^[10]将PA0057重组蛋白加弗氏佐剂皮下注射大鼠可对抗PA0315株的气管内注射攻击。本研究将rEf-PA0057疫苗灌胃小鼠及PA01株攻击后,肺组织的细菌负荷明显低于对照组,与上述结果相似,提示该疫苗可诱导小鼠产生较强的保护力。

重组Ef菌是一种常见的口服疫苗,可诱导小鼠产生免疫应答,血清抗体是评价Pa疫苗免疫的一个关键指标。欧兴坤等^[11]用rEfs-LasR疫苗灌胃BALB/c鼠,PA01株攻击后产生高水平的IgG抗体,

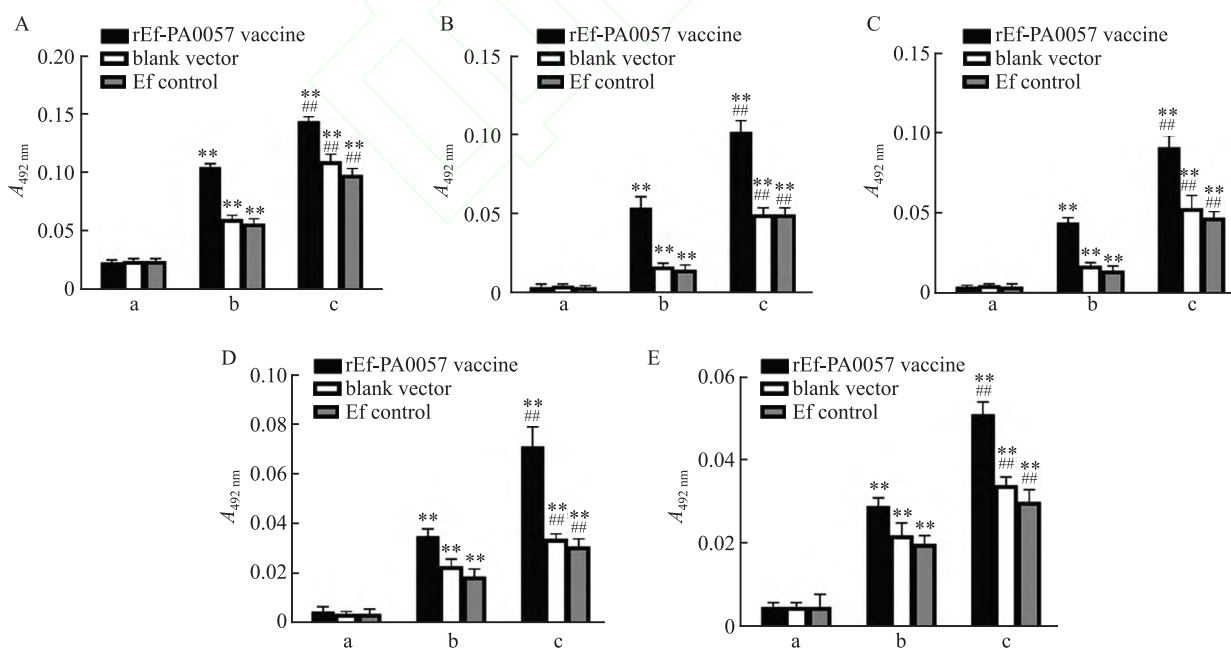


图2 rEf-PA0057疫苗免疫和PA01株攻击后诱导的体液免疫应答

Fig. 2 Humoral immune response following immunization with rEf-PA0057 and challenge with PA01

A: Sera IgG detection in mice following immunization with rEf-PA0057 and challenge with PA01; B: Sera IgG1 detection in mice following immunization with rEf-PA0057 and challenge with PA01; C: Sera IgG2b detection in mice following immunization with rEf-PA0057 and challenge with PA01; D: Sera IgG3 detection in mice following immunization with rEf-PA0057 and challenge with PA01; E: Sera IgE detection in mice following immunization with rEf-PA0057 and challenge with PA01; a: before immunization; b: 4 weeks after first immunization; c: 2 weeks after challenge; ** $P<0.01$ vs before immunization; ### $P<0.01$ vs 4 weeks after first immunization.

从而对抗 Pa 的感染。本实验将 rEf-PA0057 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 PA0057 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或抗体依赖补体介导的细胞毒作用。

IgG 亚类诱导 Th 细胞产生不同类型的细胞因子。早期研究^[12-13]表明,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。刘潇等^[14]用重组 Bb-OprI 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-PA0057 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 周达到较高水平,推测该疫苗表达的 PA0057 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^[15]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。本研究将 rEf-PA0057 疫苗灌胃小鼠后的血清 IgE 在初次免疫后 4 周升高,在攻击后 2 周达到较高水平,类似 rBb-OprFI 疫苗诱导的免疫效应,推测该疫苗表达的 PA0057 抗原能促使 B 细胞产生 IgE 应答,分泌的 IgE 抗体又能与肥大细胞或嗜碱性粒细胞结合,从而使 Fc ϵ R1 受体发生桥联作用,释放多种生物活性介质来抵御 Pa 的感染。

参考文献

- [1] Wood S J, Goldufsky J W, Seu M Y, et al. *Pseudomonas aeruginosa* cytotoxins: mechanisms of cytotoxicity and impact on inflammatory responses [J]. *Cells*, 2023, 12 (1): 195. doi: 10.3390/cells12010195.
- [2] 贺松, 胡晓武, 张玲, 等. 新德里金属 β -内酰胺酶基因序列比对与蛋白分子结构[J]. *中国微生物学杂志*, 2013, 25 (3): 289-92. doi:10.13381/j.cnki.cjm.2013.03.004.
- [2] He S, Hu X W, Zhang L, et al. Sequence alignment and molecular structure analysis of New Delhi metallo- β -lactamase genes [J]. *Chin J Microecol*, 2013, 25 (3): 289-92. doi: 10.13381/j.cnki.cjm.2013.03.004.
- [3] Chen S, Fu Y, Liu L L, et al. Live combined *Bacillus subtilis* and *Enterococcus faecium* ameliorate murine experimental colitis by immunosuppression [J]. *Int J Inflamm*, 2014, 2014: 878054. doi:10.1155/2014/878054.
- [4] Díaz A M, Almozni B, Molina M A, 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): 553-62. doi: 10.3920/BM2017.0081.
- [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): 1042-5. doi:10.13350/j.cjpb.200910.
- [5] He A L, Li W G, Liang C C. Construction, identification, and expression of the recombinant Ef-PopB vaccine of *Pseudomonas aeruginosa* [J]. *J Pathog Biol*, 2020, 15 (9): 1042-5. doi: 10.13350/j.cjpb.200910.
- [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. doi:10.13423/j.cnki.cjmi.009189.
- [6] He A L, Li W G. *Enterococcus faecium*-mediated oligopeptidase B of *Pseudomonas aeruginosa* (Ef-PopB) vaccine induces protective effects and humoral immune responses in mice [J]. *Chin J Cell Mol Immunol*, 2021, 37 (5): 396-400. doi: 10.13423/j.cnki.cjmi.009189.
- [7] Hendrickx A P, van Schaik W, Willems R J. The cell wall architecture of *Enterococcus faecium*: from resistance to pathogenesis [J]. *Future Microbiol*, 2013, 8 (8): 993-1010. doi: 10.2217/fmb.13.66.
- [8] Nikyar A, Bolhassani A. Electroporation: an effective method for *in vivo* gene delivery [J]. *Drug Deliv Lett*, 2022, 12 (1): 35-45. doi:10.2174/2210303112666220127113328.
- [9] Ribeiro V T, Asevedo E A, de Paiva Vasconcelos L T C, 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): 6495-504. doi:10.1007/s00253-019-09948-z.
- [10] Thomas L D, Kyd J M, Bastin D A, et al. Immunisation with non-integral OMPs promotes pulmonary clearance of *Pseudomonas aeruginosa* [J]. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 2003, 37 (2-3): 155-60. doi:10.1016/S0928-8244(03)00073-7.
- [11] 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): 312-6. doi: 10.13753/j.issn.1007-6611.2022.03.009.
- [11] Ou X K, Li W G. *Enterococcus faecalis*-mediated vaccine of *Pseudomonas aeruginosa* induces immunoprotection and humoral immunity in mice [J]. *J Shanxi Med Univ*, 2022, 53 (3): 312-6. doi:10.13753/j.issn.1007-6611.2022.03.009.
- [12] Pan T, Tan R, Li M, et al. IL17-producing $\gamma\delta$ T cells may

enhance humoral immunity during pulmonary *Pseudomonas aeruginosa* infection in mice [J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2016, 6: 170. doi:10.3389/fcimb.2016.00170.

- [13] 王海昆,姚萍,杨涛,等. AdipoRon通过调节脂质代谢和重塑巨噬细胞表型改善肝纤维化的功能研究[J]. *安徽医科大学学报*, 2025, 60(4): 656-63. doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2025.04.010.
- [13] Wang H K, Yao P, Yang T, et al. AdipoRon improves fibrosis liver function by regulating lipid metabolisms and remodeling macrophages polarization[J]. *Acta Univ Med Anhui*, 2025, 60(4): 656-63. doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2025.04.010.
- [14] 刘潇,李文桂,罗广旭. 铜绿假单胞菌重组 Bb-pGEX-OprI

疫苗的构建及其保护力的研究[J]. *四川大学学报(医学版)*, 2018, 49(1): 13-7. doi:10.13464/j.scuxbyxb.2018.01.003.

- [14] Liu X, Li W G, Luo G X. Study on construction of recombinant bb-pGEX-OprI vaccine of *Pseudomonas aeruginosa* and its protection effect[J]. *J Sichuan Univ Med Sci Ed*, 2018, 49(1): 13-7. doi:10.13464/j.scuxbyxb.2018.01.003.
- [15] 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[J]. *实用医学杂志*, 2020, 36(5): 586-9.
- [15] Liang C C, Li W G. Protective effect and humoral immune response in mice immunized with recombinant Bb(pGEX-OprF-I) vaccine of *Pseudomonas aeruginosa* [J]. *J Pract Med*, 2020, 36(5): 586-9.

Construction of *Enterococcus faecium* -based recombinant Ef-PA0057 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 Infectious and Parasitic Diseases, The First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400016)

Abstract Objective To construct an *Enterococcus faecium* (Ef)-based recombinant Ef-PA0057 vaccine of *Pseudomonas aeruginosa* (Pa) and to study its protective immune mechanism in mice. **Methods** The PA0057 gene was cloned from the genomic DNA of PA01 strain ATCC9027 by PCR and inserted into pGEX-1λT to construct pGEX-PA0057. The recombinant plasmid was electroporated into TX0016 strain to construct rEf-PA0057 vaccine. The plasmid was extracted from rEf for PCR. The rEf vaccine was expressed through IPTG induction, and the expression of protein was analyzed by SDS-PAGE and Western blot. BALB/c mice were immunized intragastrically with 5×10^8 CFU rEf-PA0057 vaccine 3 times per week for 3 weeks. 4 weeks after the first immunization, mice were challenged intranasally with 5×10^7 CFU of PA01 strain. 2 weeks 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 6 weeks after the first immunization. The IgG and its subclasses, and IgE were detected by ELISA. **Results** The 900 bp PA0057 gene was successfully cloned by PCR. PCR showed that PA0057 gene was amplified when the extracted plasmid from rEf as template; the relative molecular mass (Mr) of the expressed PA0057-GST fusion protein was approximately 58 ku, detected by SDS-PAGE. The amount of the expressed protein was 18% 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-PA0057 vaccine group, blank vector group and Ef control group were $(0.297 \pm 0.011) \times 10^8$ 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 a significant difference compared with the two control groups ($P < 0.01$). **Conclusion** The rEf-PA0057 vaccine is successfully constructed. It may induce mice to produce a humoral response against challenge with *Pseudomonas aeruginosa*.

Key words *Enterococcus faecium*; *Pseudomonas aeruginosa*; PA0057; vaccine; humoral immunity

Fund programs National Natural Science Foundation of China (Nos. 30671835, 30200239)

Corresponding author Li Wengui, E-mail: cqliwengui@163.com