

DOI:10.13350/j.cjpb.220907

• 论著 •

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*

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 400016)

【摘要】 目的 构建粪肠球菌(Efs)为载体的细粒棘球绦虫重组 Efs-Eg95-EgA31 疫苗,并研究其表达效率。方法 采用电穿孔技术将重组质粒 pGEX-Eg95-EgA31 转化粪肠球菌 ATCC47077 株,构建 rEfs-Eg95-EgA31 疫苗,抽提质粒进行 PCR 扩增鉴定;经 IPTG 诱导后进行 10% SDS-PAGE 和 Western blot 等分析和鉴定表达产物。结果 以从 rEfs 抽提的质粒为模板进行 PCR 可扩增出约 1 016 bp 的 Eg95-EgA31 融合基因片段,SDS-PAGE 显示表达产物为 62.5 ku 的重组蛋白,表达蛋白约占菌体总蛋白的 11%;Western blot 表明重组蛋白能被细粒棘球绦虫感染的鼠血清识别。结论 成功构建了细粒棘球绦虫 rEfs-Eg95-EgA31 疫苗,表达的融合蛋白具有特异的抗原性。

【关键词】 粪肠球菌;细粒棘球绦虫;Eg95;EgA31;疫苗

【中图分类号】 R383.33

【文献标识码】 A

【文章编号】 1673-5234(2022)09-1025-05

[Journal of Pathogen Biology. 2022 Sep.;17(9): 1025-1029.]

Construction, identification and expression of *Enterococcus faecalis*-based recombinant Efs-Eg95-EgA31 vaccine of *Echinococcus granulosus*

LI Wen-gui, OU Xing-kun, HE Ai-lin (Institute of Infections and Parasitic Diseases, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

【Abstract】 **Objective** To construct an *Enterococcus faecalis*-based recombinant Efs-Eg95-EgA31 vaccine of *Echinococcus granulosus* and observe its expression efficiency. **Methods** The recombinant plasmid pGEX-Eg95-EgA31 was electroporated into *Enterococcus faecalis* (Efs) ATCC47077 strain to construct rEfs-Eg95-EgA31 vaccine, the plasmid was extracted from rEfs for PCR identification. The rEfs vaccine was expressed through IPTG induction, and the recombinant protein was verified by 10% SDS-PAGE and Western blotting. **Results** PCR showed that 1016bp Eg95-EgA31 fusion gene was amplified when the extracted plasmid from rEfs as template; 10% SDS-PAGE confirmed the Mr of the expressed GST-Eg95-EgA31 was about 62.5 ku, the expressed efficiency was approximately 11%; Western blotting demonstrated that the expressed protein could be recognized by sera from mice infected with hydatid cyst. **Conclusions** The rEfs-Eg95-EgA31 vaccine was constructed in success, and the expression protein was provided with special antigenicity.

【Key words】 *Enterococcus faecalis*; *Echinococcus granulosus*; Eg95; EgA31; vaccine

***细粒棘球绦虫(*Echinococcus granulosus*, Eg)的续绦期幼虫引起的囊型棘球蚴病(cystic echinococcosis, CE)是一种危害严重的人兽共患寄生虫病,亟待研制疫苗防治该病。Lightowers 等^[1-2]研究发现 Eg95 和 EgA31 是有效的疫苗候选分子,叶艳菊等^[3]将转 Eg95-EgA31 融合基因的苜蓿接种小鼠可产生一个 T_H1 型的细胞免疫应答,CD4⁺ T 细胞亚群、IgG、IgG2b 和 IgE 在疫苗诱导的保护力中起重要作用。

粪肠球菌(*Enterococcus faecalis*, Efs)是一种常见的益生菌群,常作为微生态制剂进行使用^[4],是一种有希望的疫苗载体。pVE-phoZ/pcroRS 和 pMV158-MobM 是 2 种较好的大肠埃希菌-肠球菌穿梭表达载体,这为构建重组肠球菌提供了有利的工具^[5-6]。本研究在已构建 pGEX-Eg95-EgA31 的基础上^[7],将其电

穿孔转化 Efs, 构建 rEfs-Eg95-EgA31 疫苗,从而为 Eg 疫苗的研制提供有用的材料。

材料与方法

1 材料

1.1 菌株和质粒 粪肠球菌 ATCC47077 株由重庆医科大学附属第一医院检验科严立教授赠送, BL21 (pGEX-1λT) 和 BL21 (pGEX-Eg95-EgA31) 重组菌株由本所构建和保存。

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

** **【通讯作者(简介)】** 李文桂 (1967-), 男, 湖北郧县人, 博士, 研究员, 主要从事病原微生物的分子生物学和分子免疫学研究。E-mail: cqliwengui@163.com

1.2 主要试剂 DNA marker 购自 Fermentas; 蛋白 marker 和胎牛血清购自北京鼎国兴盛生物技术公司; 高效感受态细胞制备试剂盒、质粒提取试剂盒、高保真即用 PCR 扩增试剂盒、异丙基-β-D-硫代半乳糖苷 (IPTG)、N,N-亚甲基双丙烯酰胺、丙烯酰胺、联苯二胺 (DAB) 和考马斯亮蓝购自上海生工公司; 辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的羊抗鼠抗体购自北京鼎今生物科技有限公司; LB 培养基和细粒棘球蚴感染的鼠血清由本所制备保存。

2 方法

2.1 引物设计与合成 根据 GenBank 上登录的细粒棘球蚴 Eg95 基因序列 (AF199354) 和 EgA31 基因序列 (AF067807) 及 pGEX-1λT 载体特点自行设计两对引物, Eg95 上游引物 P1: 5'-GCGGATCCATG-GCATTCCAGTTATGTCTC-3', 下游引物 P2: 5'-GCGAATTCTCACATTACAGTGCTTTTCCTTCT-TGC-3'; EgA31 上游引物 P3: 5'-GCGGATCCAAG-GCTGAGAAACAAATAAGAGACGC-3', 下游引物 P4: 5'-GCGAATTCTCTTTTCGAGCTGTTTGAT-GATAACCT-3', 均在上、下游引物 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)。引物由上海生工公司合成。

2.2 pGEX-Eg95-EgA31 质粒的扩增 用接种环将 BL21 (pGEX-Eg95-EgA31) 重组菌接种在含 50 μg/mL 氨苄青霉素的 LB 固体培养基上, 37 °C 孵育 48~72 h; 挑取上述筛选培养基上单个菌落至含 50 μg/mL 氨苄青霉素的 LB 培养液中, 37 °C、200 r/min 振荡培养 48~72 h, 用质粒抽提试剂盒提取重组质粒 pGEX-Eg95-EgA31。

2.3 粪肠球菌 ATCC47077 株感受态的制备 将 100 mL 的 LB 培养基和 10 mL 胎牛血清加入 250 mL 的培养瓶中, 加入粪肠球菌 1 mL, 37 °C、200 r/min 振荡培养 48~72 h, 3 000 r/min 离心 10 min (离心半径 12 cm), 收集菌体沉淀。按照高效感受态细胞制备试剂盒说明书制备粪肠球菌 ATCC47077 株的感受态。

2.4 rEfs-Eg95-EgA31 疫苗的构建与鉴定 取 pGEX-Eg95-EgA31 重组质粒 20 μL 和粪肠球菌感受态 80 μL 同时加入电穿孔杯中进行电转化; 电穿孔参数: 电压 0.5~2.5 kV, 时间 5 ms, 转化次数 1~10 次; 电穿孔完毕后加入 1 mL 的 LB 培养基和 100 μL 的胎牛血清, 37 °C、150 r/min 培养 2 h, 然后接种于含氨苄青霉素 (Amp) 50 μg/mL 的平板上选择培养 48~72 h; 挑取单个菌落至 LB 培养基 (含 50 μg/mL 的 Amp 和 10% 胎牛血清) 增菌培养 3~5 d, 抽提质粒进行 PCR 鉴定; 以提取的质粒为模板, PCR 扩增 Eg95-EgA31 基因, 扩增体系: PCR master 25 μL, P1 2 μL,

P4 2 μL, 重组质粒模板 2 μL, 去离子水 19 μL, 25 μL 石蜡油密封; PCR 反应条件: 95 °C 预变性 6 min, 94 °C 变性 30 s, 57 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 2 min, 共 30 个循环; 72 °C 延伸 10 min; 取 PCR 产物 3 μL 用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳鉴定。

2.5 rEfs-Eg95-EgA31 疫苗的表达与鉴定

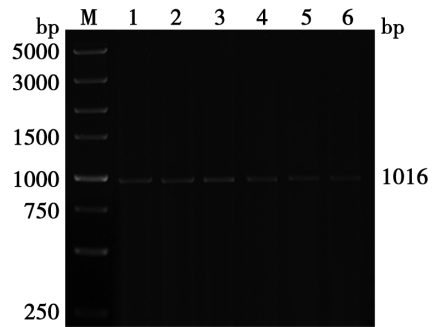
2.5.1 rEfs 疫苗的诱导表达 将构建的 rEfs 疫苗接种至 LB 培养基 (含 50 μg/mL 的 Amp 和 10% 胎牛血清), 37 °C、200 r/min 振荡培养, 当培养液的 A₆₀₀ 为 0.5~0.8 时, 加入 IPTG (终浓度 1 mmol/L) 进行诱导, 依次在作用后 1、3、5、7、9、11 和 13 h 收集 1 mL 的菌液, 5 000 r/min 离心 2 min, 收集菌体沉淀, 煮沸裂解后进行全菌体的 10% SDS-PAGE 电泳, 并用凝胶成像仪扫描分析。

2.5.2 rEfs 疫苗的 Western blot 鉴定 将 IPTG 诱导的 rEfs-Eg95-EgA31 疫苗和空载体 rEfs (pGEX-1λT) 疫苗分别进行 SDS-PAGE 电泳, 采用半干法将凝胶蛋白转至 NC 膜 (150 mA 恒流转膜 2 h)。转膜后封闭 2 h, PBS 漂洗 3 次; 加一抗 (1 : 100 稀释的细粒棘球蚴感染鼠血清) 孵育两小时, PBS 洗涤 3 次; 加二抗 (1 : 1 000 稀释的 HRP 标记的羊抗鼠 IgG) 孵育 2 h, PBS 漂洗 3 次; 底物 DAB 显色后成像。

结果

1 rEfs-Eg95-EgA31 疫苗的 PCR 鉴定

以提取的质粒为模板进行 PCR 扩增, 经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳结果见图 1, 扩增目的片段约 1 016 bp, 与 Eg95-EgA31 融合基因大小相符。



M DNA 标志物 1~6 pGEX-Eg95-EgA31 的 PCR 产物

图 1 rEfs-Eg95-EgA31 疫苗的 PCR 鉴定

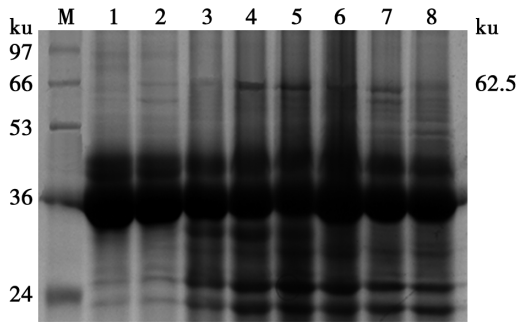
M DNA marker 1-6 PCR products of pGEX-Eg95-EgA31

Fig. 1 PCR identification of rEfs-Eg95-EgA31 vaccine

2 rEfs-Eg95-EgA31 疫苗的 SDS-PAGE 分析

重组蛋白的理论值大小为 62.5 ku (其中 GST 为 26ku, Eg95-EgA31 为 36.5ku), rEfs-Eg95-EgA31 疫苗加入 IPTG 诱导后, SDS-PAGE 检测表达产物, 结果如图 2, 出现相对分子量与 Eg95-EgA31-GST 相符的蛋白条带, 诱导时间为 5~7 h 时表达量较高, 表达

蛋白约占菌体总蛋白的 11%；未诱导组无表达。



M 蛋白 marker 1 未诱导的 rEfs-Eg95-EgA31 2~8 分别为 IPTG 诱导 1、3、5、7、9、11 和 13 h 的 rEfs 疫苗

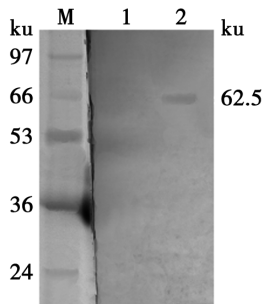
图 2 rEfs-Eg95-EgA31 疫苗表达产物的 SDS-PAGE 分析

M Protein marker 1 rEfs-Eg95-EgA31 without induction 2-8 rEfs with IPTG induction for 1, 3, 5, 7, 9, 11 and 13 h, respectively

Fig. 2 SDS-PAGE analysis of rEfs-Eg95-EgA31 vaccine

3 rEfs-Eg95-EgA31 疫苗的 Western blot 鉴定

Western blot 结果显示 rEfs-Eg95-EgA31 疫苗表达的融合蛋白可被细粒棘球蚴感染的鼠血清特异性识别,目的条带位于 62.5 ku 处,空质粒对照组无条带(图 3)。



M 蛋白 marker 1 空载体对照组 2 GST-Eg95-EgA31 融合蛋白

图 3 rEfs-Eg95-EgA31 疫苗表达产物的 Western blot 鉴定

M Protein marker 1 Control 2 recombinant protein GST-Eg95-EgA31

Fig. 3 Western blotting identification of fusion protein expressed in rEfs-Eg95-EgA31 vaccine

讨论

将 348 bp 的 Eg95 基因经 PCR 连接为 3Eg95 串联基因,将其插入 pET32 α 得 pET32 α -3Eg95,转化 BL21(DE3)菌,IPTG 诱导表达后经 SDS-PAGE 显示重组菌可表达 56 ku 的 3Eg95-His 融合蛋白;将 3Eg95-His 蛋白加弗氏佐剂皮下注射 BALB/c 鼠,在初次免疫后 2 周和 4 周加强 2 次,在初次免疫后 6 周显现血清 IgG 和 IFN- γ 升高^[8-9]。以 Eg 原头蚴的总 RNA 为模板扩增 471 bp 的 Eg95 基因,将其插入 pGEM-Teasy 得 pGEM-Eg95,与 pFASTBac1 重组得 pFASTBac1-Eg95,转化大肠埃希菌 DH10,筛选重组 Bacmid-Eg95,加苜蓿银纹夜蛾核型多角体病毒(AC-NPV)转染草地夜蛾(*Spodoptera frugiperda*)的 Sf9

细胞,筛选培养,Western blot 表明 CE 患者的血清识别重组病毒表达的 Eg95 蛋白;将 20 μ g 重组蛋白皮下注射 BALB/c 鼠,在初次注射后 2 周强化 1 次,在初次注射后 3 周显示血清 IgG 升高^[10]。再次,以 pGEM-Eg95 为模板扩增 Eg95 基因,插入 pYA3341 得 pYA3341-Eg95,电转沙门氏菌 X3770 株进行甲基化修饰后,再次电转沙门氏菌 X4550 株,筛选培养经 Western blot 鉴定 CE 患者的血清识别重组菌表达的 18ka 的 Eg95 蛋白;将 10¹⁰CFU 疫苗口服 BALB/c 鼠,在初次口服后 2 周强化 1 次,在初次口服后 6 周显现血清 IgG 升高,脾细胞显著增殖^[11-12]。这些资料提示 3Eg95-His 融合蛋白、杆状病毒表达的 Eg95 蛋白以及沙门氏菌介导的 rSt-Eg95 疫苗可诱导小鼠产生有效的免疫应答,表明 Eg95 抗原是一种有效的疫苗候选分子。

贾海英等^[12]将 EgA31 基因 5' 端(636 bp 片段)插入 pET30 α 得 pET30 α -EgA31,将其转化 BL21(DE3)菌,IPTG 诱导表达后经 SDS-PAGE 分析显示重组菌可表达 56 ku 的融合蛋白;李玉娇等^[13]推测该融合蛋白存在 4 个 T/B 细胞表位。张杰等^[14]将 1 362 bp 的 EgA31-EgY162 融合基因插入 pET30 α 得 pET30 α -EgA31-EgY162,将其转化大肠埃希菌 BL21(DE3),IPTG 诱导表达后经 SDS-PAGE 分析显示重组菌可表达 58 ku 的 EgA31-EgY162 融合蛋白;生物信息学分析提示该蛋白含有 6 个 T 细胞表位和 7 个 B 细胞表位。

由于宿主 MHC 分子的多样性和细粒棘球蚴抗原结构的复杂性,宿主将针对抗原的多个表位产生免疫反应,使得单一抗原成分诱导宿主产生的保护性免疫应答效果往往较低。因此,将 Eg95 和 EgA31 基因融合可能是一种较好途径。Mazaheri 等^[15]构建了 pET28 α -Eg95, Li 等^[16]等以 pET28 α -Eg95 为模板扩增 Eg95 基因,将其插入 pET30 α -EgA31 得 pET30 α -EgA31-Eg95,然后转化大肠埃希菌 BL21(DE3),筛选培养后经 Western blot 证明患者血清识别重组菌表达 46 ku 的 EgA31-Eg95 融合蛋白。周必英等^[17-18]构建了双歧杆菌介导的 rBb-Eg95-EgA31 疫苗,将其采用皮下注射、肌肉注射、滴鼻和口服等多种途径接种 BALB/c 小鼠,在接种 8 周后用 50 个 Eg 原头节经腹腔注射进行攻击,在攻击后 25 周发现各个组的囊重减少率为 41.33%~70.67%;血清 IgG、IgG2a、IgG2b 和 IgG1 水平提升,IgG3 和 IgE 水平下降;脾细胞增殖,分泌高水平的 IFN- γ 、IL-12 和 TNF- α 等细胞因子,但 IL-10 的分泌降低;脾 CD4⁺ 和 CD8⁺ T 细胞的数目增加;脾细胞的凋亡数目降低,提示该疫苗可诱导小鼠产生一个有效的免疫应答。

pGEX-1λT 是一个广泛使用的表达载体,含有 LacP 操纵基因、LacI 调节基因、Tac 启动子和 SD 序列等元件;其中 SD 序列下游是目的基因和 GST 的融合序列,编码的 GST 融合蛋白可通过特异蛋白酶进行切除,方便了表达蛋白的回收;在 GST 基因的上游有一个强启动子 Ptac,由于 lacI 阻遏基因结合在 Ptac 启动子的操纵区,使得插入片段的表达被抑制,而异丙基硫代-β-D-半乳糖苷(IPTG)是 β-半乳糖苷酶底物的类似物,可作为 Lac 操纵子的诱导剂,IPTG 诱导表达的载体是由编码 lacI 抑制因子的 lacI 调控基因与启动子上的 lacO 操纵子共同决定;在其作用下,诱导物结合阻遏蛋白,导致其构象产生改变,与操纵序列解离、转录,从而不能与目的基因结合,进而启动结构基因的转录,较小剂量即可产生持久的诱导作用;因此,用 IPTG 诱导载体中的启动子 Ptac 可高效表达 GST 融合的目的蛋白且不改变其生物活性^[12];lacI 调节基因是一种抑制基因,与 Tac 启动子结合后,在 IPTG 诱导下启动目的基因在细胞内高水平表达;IPTG 诱导时要选择加入的最适时间和浓度,由于 IPTG 对细菌具有一定的毒副作用,前期诱导可能会加重代谢负担,导致细菌的生长受限;过高浓度的 IPTG 会形成大量包涵体,导致可溶性蛋白的表达量降低^[20-21]。

肠球菌具有较好的免疫促进和抗感染作用,肠球菌可作为疫苗的载体已^[22-23]。Gupalova 等^[24]构建了表达无乳链球菌 (*Streptococcus agalactiae*) Bac 蛋白的重组 Ef-Bac-d2 疫苗,将 2×10^8 CFU 疫苗采用口服途径接种小鼠,在初次口服后 2、3、6、7、22、23 和 24 d 重复 7 次,发现血清 IgG 在初次接种后 21~50 d 上升,在初次接种后 50 d 有明显提升,在末次接种后 14 d 通过腹腔注射将 5×10^6 CFU 无乳链球菌 H36Lac 株进行感染攻击,在攻击后 2 d 显示免疫组脾和肺的细菌负荷均下降 1 000 倍左右。Chen 等^[25]将 5×10^9 CFU 表达柔嫩艾美耳球虫 (*Eimeria tenella*) AMA1 蛋白的重组 Ef-NA^Δ3-1E-CWA 疫苗口服仔鸡,在初次口服后 5、6、7、21、22、23、37、38 和 39 d 强化 9 次,在初次口服后 54 d 提示血清 IgG 和盲肠 sIgA 的滴度提升,脾细胞产生大量 IL-2 和 INF-γ,此时采用口服途径将 2×10^4 柔嫩艾美耳球虫的卵囊进行感染攻击,在攻击后 7 d 提示免疫组的体重增加,盲肠病变减轻,减卵囊率为 38.52%。何爱琳等^[26-28]将 5×10^9 CFU 表达铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*, Pa) PopB 蛋白的重组 Ef-PopB 疫苗经口灌胃 BALB/c 鼠,在首次接种后 28 d 取 5×10^7 CFU 的 PA01 有毒株进行滴鼻攻击,在攻击后 14 d 发现疫苗组肺细菌的菌落数显著低于对照组,脾细胞增殖水平和 CD4⁺ T 细胞百分率升高,而其凋亡率下降,从疫苗

组中抽提脾细胞 DNA 可分别扩增出 453 bp 的 IL-2 基因、359 bp 的 IL-4 基因、399 bp 的 IFN-γ 基因、301 bp 的 IL-10 基因、300 bp 的 IL-12 基因和 250 bp 的 Foxp3 基因,提示该疫苗可诱导小鼠产生混合型的 Th1 和 Th2 免疫应答。这些重组肠球菌疫苗具有下述优点:肠球菌是一种益生菌,可增强机体的免疫应答;肠球菌是一种公认为安全(GRAS)的微生物,易培养,基因操作简便可靠,转化效率高,重复性好;肠球菌通过粘附素结合肠上皮细胞的粘附素受体,占位定植,与病原微生物竞争肠道表面的定植位点,与其争夺营养物质,从而抑制病原的生长;肠球菌定植肠道后,大量生长繁殖,分泌乳酸和细菌素,杀死病原微生物;肠球菌能在宿主肠道内形成生物薄膜,附着在肠道粘膜上,形成乳酸菌屏障,抵御外来毒素和病原微生物的入侵;外源基因通常整合进肠球菌的染色体基因组中,质粒的稳定性较高。肠球菌可定植肠道,发挥益生菌和外源基因的双重功能,达到一剂多用的目的;肠球菌可作为食品添加剂,制作出风味可口的品牌酸奶,极具开发价值;肠球菌对抗生素较敏感,小剂量即可杀灭该菌。

本研究将提取的重组质粒 pGEX-Eg95-EgA31 电穿孔转化 Efs 感受态,筛选培养后,从 rEfs 中抽提质粒作为模板,经 PCR 扩增出 1 016 bp 的 Eg95-EgA31 融合基因片段,提示成功构建了 rEfs-Eg95-EgA31 疫苗,这为后续的疫苗表达研究奠定了基础。IPTG 的浓度和诱导时间可影响外源蛋白的表达,推测在 Efs 对数生长的中后期进行 IPTG 诱导可增加外源蛋白的表达效率,因此,本研究选择在 rEfs 的 A₆₀₀ 值达到 0.5~0.8 时,用 1 mmol/L 的 IPTG 进行诱导,经 SDS-PAGE 显示插入的 Eg95-EgA31 融合基因在 rEfs 中表达了 62.5 ku 的 Eg95-EgA31/GST 融合蛋白,其中 GST 载体部分 26 ku, Eg95-EgA31 融合蛋白约为 36.5 ku,与预期的分子质量大小一致;经薄层扫描分析,表达的融合蛋白占菌体总蛋白的 11%,诱导 5~7 h 表达量达到较高水平;非诱导的融合蛋白未能在转化的 Efs 中得到表达,可能是表达的融合蛋白较少,导致 SDS-PAGE 检测不到;Western blot 提示 rEfs 表达的 Eg95-EgA31/GST 融合蛋白可被细粒棘球蚴感染的鼠血清特异结合,表明 rEfs 表达的融合蛋白能够正确折叠,具有特异的抗原性,为 rEfs 疫苗的研发提供理论基础。

【参考文献】

- [1] Lightowers MW, Lawrence SB, Gauci CG, et al. Vaccination against hydatidosis using a defined recombinant antigen[J]. Parasite Immunol, 1996, 18(9): 457-462.
- [2] 傅玉才,王进成,张壮志,等. 细粒棘球蚴 cDNA 克隆 EgA31 在

- 大肠埃希氏菌 M15 中的表达及重组蛋白的纯化和复性[J]. 中国兽医科技, 2002, 32(1): 5-7.
- [3] 叶艳菊, 李文桂. 细粒棘球绦虫 Eg95-EgA31 融合基因首蓆疫苗诱导小鼠免疫应答的研究[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2010, 26(8): 750-753, 757.
- [4] Theilacker C, Diederich AK, Otto A, et al. *Enterococcus faecalis* glycolipids modulate lipoprotein-content of the bacterial cell membrane and host Immune response[J]. PloS One, 2015, 10(8): e0136806.
- [5] Le Jeune A, Touchet F, Zhao C, et al. Construction of a new sensitive molecular tool for the study of gene expression in *Enterococcus faecalis* [J]. J Mol Microbiol Biotechnol, 2010, 19(1): 159-168.
- [6] Ruiz-Cruz S, Solano-Collado V, Espinosa M, et al. Novel plasmid-based genetic tools for the study of promoters and terminators in *Streptococcus pneumoniae* and *Enterococcus faecalis*[J]. J Microbiol Meth, 2010, 83(1): 156-163.
- [7] 周必英, 陈雅棠, 李文桂. 细粒棘球绦虫重组质粒 pGEX-Eg95-EgA3 的构建及其在大肠埃希菌 BL21(DE3)中的表达[J]. 中国病原生物学杂志, 2009, 4(5): 350-354.
- [8] 刘丹, 贾红, 侯绍华, 等. 细粒棘球绦虫 Eg95 基因的串联表达及表达系统优化[J]. 中国畜牧兽医, 2009, 36(8): 33-37.
- [9] 贾红, 袁维峰, 李杰, 等. 细粒棘球绦虫 Eg95s 重组蛋白串联表达免疫原分析[J]. 中国人兽共患病学报, 2014, 30(8): 843-847.
- [10] 黎明, 张晓霞, 赵嘉庆, 等. 细粒棘球绦虫 95 抗原在真核昆虫表达系统中表达、纯化及免疫原性初步分析[J]. 宁夏医科大学学报, 2014, 36(9): 949-953.
- [11] 王志昇, 吴景, 林源, 等. 细粒棘球绦虫 Eg95 蛋白减毒沙门氏菌重组株的构建与免疫原性分析[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2014, 32(5): 339-343.
- [12] 贾海英, 马海梅, 丁剑冰, 等. 细粒棘球绦虫重组 pET30 α -EgA31 疫苗的构建和诱导表达[J]. 科技导报, 2009, 27(8): 55-58.
- [13] 李玉娇, 杨晶, 赵慧, 等. 细粒棘球绦虫 EgA31 重组蛋白的抗原表位分析预测[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2012, 30(1): 78-86.
- [14] 张杰, 李玉娇, 张峰波, 等. 细粒棘球绦虫多价 EgA31-EgY162 抗原序列优化分析[J]. 中国免疫学杂志, 2020, 36(1): 19-25.
- [15] Mazaheri N, Dalimi A, Pirestani M, et al. Construction and identification of a recombinant plasmid encoding *Echinococcus granulosus* oncosphere antigen (Eg95)[J]. Iran J Parasitol, 2017, 12(4): 490-497.
- [16] Li YH, Zhang FB, Althunayan MH, et al. Construction and identification of the recombinant plasmid pET30 α -EgA31-Eg95 of *Echinococcus granulosus*[J]. Exp Ther Med, 2014, 7(2): 204-208.
- [17] 周必英, 陈雅棠, 李文桂, 等. 细粒棘球绦虫重组 Bb-Eg95-EgA31 融合基因疫苗构建及鉴定[J]. 中国人兽共患病学报, 2009, 25(6): 502-506.
- [18] 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[J]. 免疫学杂志, 2010, 26(3): 232-237.
- [19] Harper S, Speicher DW. Purification of proteins fused to glutathione S-transferase[J]. Methods Mol Biol, 2011(681): 259-80.
- [20] 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.
- [21] 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.
- [22] Neuhaus K, Lamparter MC, Zolch B, et al. Probiotic *Enterococcus faecalis* symbioflor down regulates virulence genes of EHEC in vitro and decrease pathogenicity in a *Caenorhabditis elegans* model[J]. Arch Microbiol, 2017, 199(2): 203-213.
- [23] 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.
- [24] Gupalova T, Leontieva G, Kramskaya T, et al. Development of experimental GBS vaccine for mucosal immunization [J]. PloS One, 2018, 13(5): e0196564.
- [25] Chen WJ, Ma CL, Wang D, et al. Immune response and protective efficacy of recombinant *Enterococcus faecalis* displaying dendritic cell-targeting peptide fused with *Eimeria tenella* 3-1E protein[J]. Poultry Sci, 2020, 99(6): 2967-2975.
- [26] 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.
- [27] 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.
- [28] 何爱琳, 李文桂. 铜绿假单胞菌重组 Ef-PopB 疫苗诱导小鼠脾细胞因子和 Treg 变化的研究[J]. 中国病原生物学杂志, 2021, 16(3): 266-269.

【收稿日期】 2022-04-26 【修回日期】 2022-07-02