

DOI:10.13350/j.cjpb.231005

• 论著 •

# 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\*

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)介导的结核分枝杆菌重组 Efs(pGEX-ESAT-6)疫苗,对表达的融合蛋白进行检测分析。**方法** 采用电穿孔方法将重组质粒 pGEX-ESAT-6 转化粪肠球菌 ATCC47077 株,构建 rEfs(pGEX-ESAT-6)疫苗,抽提质粒进行 PCR 鉴定;经 IPTG 诱导表达后用 SDS-PAGE 和 Western blot 对表达产物进行分析和鉴定。**结果** 以从 rEfs 抽提的质粒为模板进行 PCR,扩增出约 288 bp 的 ESAT-6 基因片段,SDS-PAGE 显示表达产物为 32 ku 的融合蛋白,约占菌体总蛋白的 20%;Western blot 显示该融合蛋白能被结核病患者血清识别。**结论** 成功构建了结核分枝杆菌 rEfs(pGEX-ESAT-6)疫苗,表达的融合蛋白具有反应原性。

**【关键词】** 粪肠球菌;结核分枝杆菌;ESAT-6;疫苗

**【中图分类号】** R378.1; R378.91

**【文献标识码】** A

**【文章编号】** 1673-5234(2023)10-1137-04

[Journal of Pathogen Biology. 2023 Oct;18(10):1137-1140.]

## Construction, identification and expression of recombinant Efs(pGEX-ESAT-6) vaccine of *Mycobacterium tuberculosis* mediated by *Enterococcus faecalis*

LI Wengui, OU Xingkun, HE Ailin (Institute of Infectious and Parasitic Diseases, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

**【Abstract】** **Objective** To construct an *Enterococcus faecalis*-mediated recombinant Efs(pGEX-ESAT-6) vaccine of *Mycobacterium tuberculosis* and observe its expression efficiency. **Methods** The recombinant plasmid pGEX-ESAT-6 was electroporated into *Enterococcus faecalis* (Efs) ATCC47077 strain to construct rEfs(pGEX-ESAT-6) 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 SDS-PAGE and Western blotting. **Results** PCR showed that 288 bp ESAT-6 gene was amplified when the extracted plasmid from rEfs as template; the relative molecular mass ( $M_r$ ) of the expressed ESAT-6-GST fusion protein was approximately 32 ku by SDS-PAGE, the amount of the expressed protein was 20% of the total bacterial proteins; Western blotting demonstrated that the expressed protein could be recognized by sera from patients with tuberculosis. **Conclusion** The rEfs(pGEX-ESAT-6) vaccine was constructed in success, and the expressed fusion protein was provided with special antigenicity.

**【Key words】** *Enterococcus faecalis*; *Mycobacterium tuberculosis*; ESAT-6; vaccine

\*\*\*结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*, MTB)引起的结核病是一种人兽共患慢性传染病,可累及全身多个脏器,以肺结核最为常见。由于 MTB 耐药株的出现、HIV 合并 MTB 感染以及大规模高危人群流动,因而造成结核病的全球流行。化疗和卡介苗(BCG)接种是防治结核病的主要措施,但化疗的疗程长,费用高,毒副作用大,易产生 MTB 耐药菌。尽管 BCG 接种可显著降低儿童原发性肺结核、粟粒型肺结核和结核性脑膜炎的发病率和死亡率,但对成人的免疫效果极不稳定,保护率为 0~80% 不等,这就需要研制更理想的疫苗用于结核病的防治。

ESXA(RV3875)基因编码的 6ku 早期分泌性抗原靶(6ku early secretory antigenic target, ESAT-6)

是 MTB 通过 ESX1 系统分泌的早期蛋白。研究表明 ESAT-6 通过 NF- $\kappa$ B 和 MAPK 途径抑制巨噬细胞脂多糖诱导的 MMP-9 表达和炎症反应,降低其抗原提呈能力;通过 microRNA-30a 抑制 IL-18 介导的吞噬溶酶体的融合,从而抑制巨噬细胞的自噬,介导免疫逃避;ESAT-6 可诱导 CD4<sup>+</sup> T 细胞产生 IFN- $\gamma$ 、IL-4 和 IL-2 等细胞因子,促进机体的免疫应答,且能介导长久的免疫记忆,增强 CD8<sup>+</sup> T 细胞的 CTL 反应。将

\* **【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

ESAT-6 重组抗原加免疫佐剂接种 BALB/c 鼠可有效对抗 H37Rv 株的攻击感染<sup>[1-4]</sup>,提示 ESAT-6 抗原是一种良好的疫苗分子。

粪肠球菌(*Enterococcus faecalis*, Efs)是一种常见的益生菌,可激活免疫细胞、局部淋巴组织和全身免疫器官,是一种有希望的疫苗载体<sup>[5-6]</sup>。本研究在已构建 pGEX-ESAT-6<sup>[7]</sup>的基础上,将其电穿孔转化 Efs,构建 rEfs(pGEX-ESAT-6)疫苗,并对其表达产物进行鉴定。

## 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提供;BL21(pGEX-1λT)和 BL21(pGEX-ESAT-6)重组菌株由本所构建和保存。

**1.2 主要试剂** DNA marker 购自 Fermentas 公司;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)标记的羊抗人抗体购自北京鼎今生物科技公司;结核病患者血清由重庆医科大学附属第一医院提供,LB 培养基由本所制备保存。

### 2 方法

**2.1 引物设计与合成** 根据 GenBank ESAT-6 的 DNA 序列设计 1 对引物。P1: 5'-CGGGATCCATGACAGAGCAGCAGTG-3'(5'端引入 BamHI 位点); P2: 5'-TCTGAATTCCTATGCGAACATCCCAGTGA-3'(5'端引入 EcoRI 位点)。引物由上海生工公司合成。

**2.2 pGEX-ESAT-6 质粒的扩增** 用接种环将 BL21(pGEX-ESAT-6)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-ESAT-6。

**2.3 粪肠球菌 ATCC47077 株感受态的制备** 将 100 mL LB 培养基和 10 mL 胎牛血清加入 250 mL 的培养瓶中,然后加入粪肠球菌 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(pGEX-ESAT-6)疫苗的构建与鉴定** 取 pGEX-ESAT-6 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 LB 培养基和 100 μL 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 ESAT-6 基因。扩增体系:PCR master 25 μL,P1 2 μL,P2 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 3 min;95 °C 变性 30 s,57 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 30 s,共循环 30 次;72 °C 延伸 5 min。取 PCR 产物进行 1.2% 琼脂糖凝胶电泳鉴定。

### 2.5 rEfs(pGEX-ESAT-6)疫苗的表达与鉴定

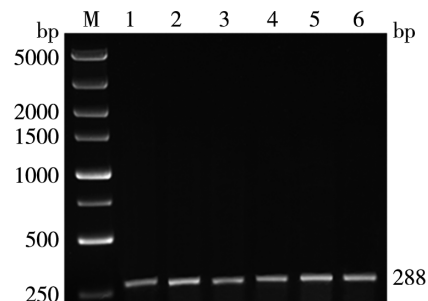
**2.5.1 rEfs 疫苗的诱导表达** 将构建的 rEfs 疫苗接种至 LB 培养基(含 50 μg/mL Amp 和 10% 胎牛血清),37 °C、200 r/min 振荡培养。当 A<sub>600</sub> 值达到 0.5~0.8 时,在培养液中加入 IPTG(终浓度 1 mmol/L)进行诱导。分别于诱导后 1、3、5、7、9、11 和 13 h 收集菌液,5 000 r/min 离心 2 min,收集菌体沉淀,煮沸裂解后进行全菌体的 10% SDS-PAGE 电泳,用凝胶成像仪进行扫描分析。

**2.5.2 rEfs 疫苗表达产物的 Western blot 鉴定** 将 IPTG 诱导的 rEfs(pGEX-ESAT-6)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 稀释的结核病患者血清)孵育 2 h,PBS 洗涤 3 次;加二抗(1:1000 稀释的 HRP 标记的羊抗人 IgG)孵育 2 h,PBS 漂洗 3 次;底物 DAB 显色后成像。

## 结 果

### 1 rEfs(pGEX-ESAT-6)疫苗的 PCR 鉴定

以提取的 pGEX-ESAT-6 质粒为模板进行 PCR 扩增,1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测扩增片段约 288 bp(图 1),与 ESAT-6 基因片段相符。



M DNA 标志物 1~6 pGEX-ESAT-6 PCR 产物

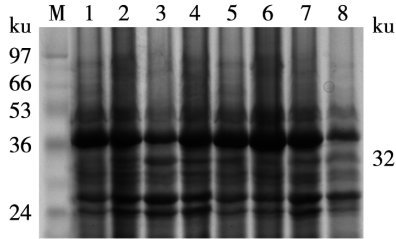
图 1 rEfs(pGEX-ESAT-6)疫苗的 PCR 鉴定

M DNA marker 1-6 PCR products of pGEX-ESAT-6

Fig. 1 PCR identification of rEfs(pGEX-ESAT-6) vaccine

## 2 rEfs(pGEX-ESAT-6)疫苗表达产物的 SDS-PAGE 分析

rEfs(pGEX-ESAT-6)疫苗加入 IPTG 诱导后,通过 SDS-PAGE 检测表达产物,结果如图 2。表达蛋白分子质量约为 32 ku,与 rEfs(pGEX-ESAT-6)疫苗表达的重组蛋白理论值 32 ku(其中 GST 为 26 ku,ESAT-6 为 6 ku)相符。IPTG 诱导 3~5 h 时蛋白表达量较高,表达蛋白约占菌体总蛋白的 20%。未诱导组不表达相应蛋白。



M 蛋白分子质量标准 1 rEfs-ESAT-6 未诱导 2~8 分别为 rEfs-ESAT-6 IPTG 诱导 1、3、5、7、9、11、13 h

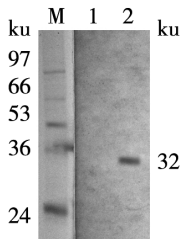
图 2 rEfs(pGEX-ESAT-6)疫苗表达产物的 SDS-PAGE 分析

M Protein marker 1 rEfs-ESAT-6 without induction 2-8 rEfs(pGEX-ESAT-6) with IPTG induction for 1, 3, 5, 7, 9, 11 and 13 h, respectively

Fig. 2 SDS-PAGE analysis of rEfs(pGEX-ESAT-6) vaccine

## 3 rEfs(pGEX-ESAT-6)疫苗表达蛋白的反应原性鉴定

Western blot 检测结果如图 3 所示,rEfs(pGEX-ESAT-6)疫苗表达的融合蛋白可被结核病人的血清特异性识别,反应条带位于 32 ku 处。空载体对照反应无条带,表明 rEfs(pGEX-ESAT-6)疫苗表达的融合蛋白具有反应原性。



M 蛋白分子质量标准 1 空载体对照 2 GST-ESAT-6 融合蛋白与相应抗体反应条带

图 3 rEfs(pGEX-ESAT-6)表达产物的 Western blot 鉴定

M Protein marker 1 Control 2 recombinant protein GST-ESAT-6

Fig. 3 Western blotting identification of fusion protein expressed in rEfs(pGEX-ESAT-6) vaccine

## 讨论

卡介苗、耻垢分支杆菌、鼠伤寒沙门菌、格式链球菌、单核细胞增生性李斯特菌、根瘤农杆菌、乳酸乳球菌、两歧双歧杆菌、流感病毒、高度减毒的牛痘病毒、腺病毒血清型 5 和慢病毒等病原体经过减毒改造后均可作为疫苗载体使用,以上述细菌和病毒为载体构建的

ESAT-6 疫苗可诱导一定程度的保护性免疫应答<sup>[8-19]</sup>。虽然大部分疫苗接种宿主可诱导有效的细胞或体液免疫应答,并部分对抗 MTB 有毒株的攻击感染,但与完全保护力的标准比较相距甚远,未达到预期水准。研究发现,重组 BCG 疫苗生长缓慢,外源基因的表达需特殊载体等;rSt 疫苗的表达产物与天然蛋白存在差异,表达水平较低;重组格式链球菌存在密码子偏爱,可引起蛋白翻译后停滞,形成截短蛋白或低水平表达外源蛋白;重组单增李斯特菌自身含有的抗生素抗性基因可能对人体有害,表达蛋白的水平较低,表达产物与天然蛋白存在较大差异;转基因植物的质量控制和认证较难,普遍不被公众认可和接受;重组乳酸菌长期低剂量口服有可能产生免疫耐受现象;重组 Bb 疫苗长期低剂量口服可导致宿主体内的正常生理菌群紊乱,破坏肠道的微生态平衡。重组流感病毒的转染效率较低,靶向性较差,表达蛋白的水平较低;重组牛痘病毒的自身蛋白及其双链 RNA 具有免疫佐剂效应,但人群普遍存在抗病毒的抗体,影响其免疫效果;重组 Ad5 常作为免疫加强疫苗使用,但早先存在的免疫可能降低其对靶抗原的免疫反应。

目前已有多种以肠球菌为载体的疫苗,如表达无乳链球菌(*Streptococcus agalactiae*)Bac 蛋白的重组 Ef-Bac-d2 疫苗,表达柔嫩艾美耳球虫(*Eimeria tenella*)AMA1 蛋白的重组 Ef-NA<sup>Δ</sup>3-1E-CWA 疫苗,表达细粒棘球绦虫(*Echinococcus granulosus*, Eg)Eg95-EgA31 融合蛋白的重组 Efs-Eg95-EgA31 疫苗及表达铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*, Pa)PopB/LasR 蛋白的重组 Ef-PopB/LasR 疫苗等<sup>[20-26]</sup>。这些疫苗的接种剂量多为  $2 \times 10^7$  CFU 或  $5 \times 10^9$  CFU,接种次数为 1 次或连续多次,接种途径包括阴道内注入和口服灌胃等,结果发现疫苗单次阴道内注入 BALB/c 鼠可产生体液免疫应答,并可对抗无乳链球菌 H36Lac 株的攻击;多次经口灌胃仔鸡或 BALB/c 鼠能诱导混合型的 TH1 和 TH2 应答,可部分对抗柔嫩艾美耳球虫卵囊的口服攻击或 PA01 有毒株的滴鼻攻击,但均未诱导完全的保护力。肠球菌是一种常见的口服益生菌,以肠球菌为载体的疫苗也应该以口服接种为最佳选择,现有的保护力结果尚不理想,因此需要探索疫苗口服接种的剂量、次数、每次接种后的间隔时间以及可否加入佐剂等,也需要摸索病原体的攻击途径、次数以及能否对抗病原体的连续或联合攻击,以进一步阐明疫苗诱导的免疫应答机制,这对于开拓这类疫苗的应用市场具有一定意义。

本研究将提取的重组质粒 pGEX-ESAT-6 电穿孔转化入 Efs 感受态,筛选培养后从 rEfs 中提取质粒,将其用作模板进行 PCR,克隆的 ESAT-6 基因片段长

度为 288 bp,表明 rEfs-ESAT-6 疫苗构建正确,为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,研究表明将小剂量的 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,所以本研究选择在 rEfs 的  $A_{600}$  值达到 0.5~0.8 时用 1 mmol/L 的 IPTG 进行诱导,经 SDS-PAGE 电泳分析表明插入的 ESAT-6 基因在 rEfs 中表达 32 ku 的 ESAT-6-GST 蛋白。借助薄层扫描显现重组菌的表达效率达 20%,ESAT-6-GST 蛋白的表达量经过 IPTG 诱导 3~5 h 后可达到较高水准;Western blot 检测显示 rEfs 表达的 ESAT-6-GST 蛋白可被肺结核患者血清识别,表明 rEfs 表达的 ESAT-6-GST 蛋白能够正确折叠,可能具有免疫原性,为 rEfs 疫苗的保护力研究奠定了基础。

#### 【参考文献】

- [1] Ha SH, Choi H, Park JY, et al. *Mycobacterium tuberculosis*-secreted protein, ESAT-6, inhibits lipopolysaccharide-induced MMP-9 expression and inflammation through NF-KB and MAPK signaling in RAW264.7 macrophage cells[J]. *Inflammation*, 2019, 43(1):54-65.
- [2] Behura A, Das M, Kumar A, et al. ESAT-6 impedes IL-18 mediated phagosome lysosome fusion via microRNA-30a upon Calcimycin treatment in *Mycobacteria* infected macrophage[J]. *Int Immunopharm*, 2021, 101:108319.
- [3] Yabaji SM, Dhamija E, Mishra AK, et al. ESAT-6 regulates autophagous response through SOD-2 and as a result induces intracellular survival of *Mycobacterium bovis* BCG[J]. *Biochim Biophys Acta Proteins Proteom*, 2020, 1868(10):140470.
- [4] Ning HH, Zhang W, Keng J, et al. Subunit vaccine ESAT-6: C-diAMP delivered by intranasal route elicits immune responses and protects against *Mycobacterium tuberculosis* infection[J]. *Front Cell Infect Microbiol*. 2021, 11:647220.
- [5] Lin DJ, Gao Y, Zhao LD, et al. *Enterococcus faecalis* lipoteichoic acid regulates macrophages autophagy via PI3K/Akt/mTOR pathway[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 498(4):1028-1036.
- [6] 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.
- [7] 谢婷,李文桂. 结核分枝杆菌重组 pGEX-ESAT-6 构建及其在大肠埃希菌 BL21(DE3)中表达效率的研究[J]. *中国病原生物学杂志*, 2008, 3(3):173-175, 177.
- [8] Liu W, Xu Y, Yan JR, et al. Ag85B synergizes with ESAT-6 to induces efficient and long-term immunity of C57BL-6 mice primed with recombinant *Bacille calmette-guerin* [J]. *Exp Ther Med*, 2017, 13(1):208-214.
- [9] Zhang H, Peng P, Miao S, et al. Recombinant *Mycobacterium smegmatis* expressing an ESAT-6-CFP10 fusion protein induces anti-mycobacterial immune responses and protects against *Mycobacteria tuberculosis* challenge in mice[J]. *Scand J Immunol*, 2010, 72(4):349-357.
- [10] Hall LJ, Clare S, Pickard D, et al. Characterization of a live *Salmonella* vaccine stably expressing the *Mycobacteria tuberculosis* Ag85B-ESAT-6 fusion[J]. *Vaccine*, 2009, 27(35):6894-6904.
- [11] Yin YL, Tian DB, Jia YY, et al. Attenuated *Listeria monocytogenes*, a *Mycobacterium tuberculosis* ESAT-6 antigen expression and delivery vector for inducing an immune response[J]. *Res Microbiol*, 2012, 163(3):540-549.
- [12] 贾平,杜先智. ESAT6 基因表达载体的构建及在戈登链球菌中的表达[J]. *微生物学通报*, 2009, 36(3):350-354.
- [13] 李君武,王珊珊,宋东,等. 玉米特异表达启动子驱动下结核 HSP65 与 ESAT6 融合基因表达载体的构建及鉴定[J]. *华北农学报*, 2009, 24(3):28-31.
- [14] 刘晶,张赞,刘洋,等. 表达结核分枝杆菌 ESAT-6-Ag85A 基因的侵入型乳酸菌免疫特性研究[J]. *中国免疫学杂志*, 2019, 35(1):10-14.
- [15] 谢婷,李文桂,曾莉蓉. 结核分枝杆菌重组 Bb-ESAT-6 疫苗的构建、鉴定和表达及其保护力[J]. *中国人兽共患病学报*, 2008, 24(4):555-561.
- [16] 张群,朱琳,唐志俊,等. 插入结核抗原基因的重组痘苗病毒对结核分枝杆菌感染恒河猴模型的免疫治疗分析[J]. *中国生物制品学杂志*, 2014, 27(12):1517-1523.
- [17] Sereinig S, Stukova M, Zabolotnyh N, et al. *Influenza virus* NS vectors expressing the *Mycobacterium tuberculosis* ESAT-6 protein induce CD4<sup>+</sup> Th1 immune response and protect animals against tuberculosis challenge[J]. *Clin Vac Immunol*, 2006, 13(8):898-904.
- [18] Espraza-Gonzalez SC, Troy A, Trout J, et al. Recombinant *Adenovirus* delivery of calreticulin-ESAT6 produces an antigen-specific immune response but no protection against a *Mycobacterium tuberculosis* challenge[J]. *Scan J Immunol*. 2012, 75(2):259-265.
- [19] Lopez J, Anna F, Authie P, et al. A lentiviral vector encoding fusion of light invariant chain and mycobacterial antigens induces protective CD4<sup>+</sup> T cell immunity [J]. *Cell Rep*. 2022, 40:111142.
- [20] Gupalova T, Leontieva G, Kramskaya T, et al. Development of experimental GBS vaccine for mucosal immunization[J]. *PLoS One*, 2018, 13(5):e0196564.
- [21] 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-IE protein[J]. *Poultry Sci*, 2020, 99(6):2967-2975.
- [22] 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.
- [23] 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.
- [24] 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.
- [25] 欧兴坤,李文桂. 粪肠球菌介导的铜绿假单胞菌重组疫苗诱导小鼠的保护力及细胞免疫应答[J]. *中国病原生物学杂志*, 2022, 17(4):430-434.
- [26] 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.