

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2019.09.010

食品级乳酸乳球菌 pNZ8149-luc 质粒的构建及表达 *

易国辉 姚孟霞 张菁芸 陈锦萍 何小稳 彭江龙[△]

(海南医学院科学实验中心 海南 海口 571199)

摘要 目的:构建能够稳定表达萤火虫荧光素酶报告基因(luc)的乳酸乳球菌(*Lactococcus lactis*, *L.lactis*)食品级表达系统,以便后续研究对目的基因进行示踪。**方法:**从 pGL4.10 质粒中 PCR 扩增萤火虫荧光素酶报告基因,测序,克隆至载体 pNZ8149,构建 pNZ8149-luc 表达质粒;电击转化宿主乳酸乳球菌 NZ3900,采用乳糖筛选法获得重组的乳酸乳球菌,Nisin 诱导,采用微孔板发光检测仪检测荧光素酶的存在,Western Blot 检测目标蛋白 luc 的表达。**结果:**PCR 扩增的荧光素酶报告基因成功克隆至 pNZ8149 质粒,并电击转化宿主乳酸乳球菌 NZ3900,得到乳酸乳球菌表达系统 NZ3900/pNZ8149-luc。Nisin 诱导后,检测到荧光素酶随诱导时间的延长活性逐渐增强,时间超过 24 h 之后荧光素酶活性逐渐下降。Western Blot 检测到目标蛋白 luc 在胞内表达。**结论:**成功构建了 pNZ8149-luc 表达载体,并能够在乳酸乳球菌体内稳定表达。

关键词:乳酸乳球菌;食品级;荧光素酶;基因表达

中图分类号:R-33;Q786 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2019)09-1649-04

Construction and Expression of a Plasmid pNZ8149-luc in Food-Grade *Lactococcus Lactis**

YI Guo-hui, YAO Meng-xia, ZHANG Jing-yun, CHEN Jin-ping, HE Xiao-wen, PENG Jiang-long[△]

(Public Research Laboratory, Hainan Medical University, Haikou, Hainan, 571199, China)

ABSTRACT Objective: A food-grade expression system for *Lactococcus lactis* was constructed to stably express the firefly luciferase reporter gene for subsequent study of the target gene. **Methods:** The luciferase reporter gene was amplified by PCR from pGL4.10 plasmid, sequenced and cloned into vector pNZ8149. The expression plasmid pNZ8149-luc was constructed, which was transformed into the host *L.lactis* NZ3900 by electric shock. Recombinant *L.lactis* was obtained by lactose screening and induced through using Nisin. The presence of luciferase was detected by microplate fluorescence detector and the expression of Luc was detected by Western Blot. **Results:** The luciferase reporter gene was successfully cloned into the pNZ8149 plasmid that was transformed into the host *L.lactis* NZ3900 to obtain the *L.lactis* expression system NZ3900/pNZ8149-luc. After induction by Nisin, the activity of luciferase increased gradually with the prolongation of induction time, and decreased gradually after 24 hours. Western Blot detected intracellular expression of the target protein luc. **Conclusion:** The pNZ8149-luc expression vector has been successfully constructed and can be expressed stably in *L. lactis*.

Key words: *Lactococcus lactis*; Food-grade; Luciferase; Gene expression

Chinese Library Classification(CLC): R-33; Q786 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2019)09-1649-04

前言

乳酸乳球菌是乳酸菌(*Lactic acid bacteria*, LAB)属中最重要的一个种,被公认为是食品级的安全微生物(Generally regarded as safe, GRAS)。继 2001 年完成了乳酸乳球菌全基因组序列测定后,近年来,关于乳酸乳球菌的分子生物学研究取得了重大进展,特别是以乳酸乳球菌作为活载体口服疫苗,已有多种外源功能蛋白在重组乳酸乳球菌中成功表达^[1-6]。荧光素酶(luciferase, luc)是生物体内催化荧光素或脂肪醛氧化发光的一类酶的总称,根据来源不同分为细菌荧光素酶和萤火虫荧光素酶。luc 基因表达翻译后的萤火虫荧光素酶不需修饰即具有活

性,因此广泛应用于多个科学研究中,如在细胞内蛋白质互作、肿瘤、标记细胞活体成像及活体单细胞实时检测基因表达研究等^[7-12]。目前,在重组乳酸乳球菌表达外源功能蛋白的前期研究中,未见对外源功能蛋白在生物活体内进行示踪的报道,因此本研究将萤火虫荧光素酶报告基因克隆至表达载体 pNZ8149 中,构建荧光素酶表达质粒 pNZ8149-luc,并电击转化乳酸乳球菌 NZ3900,得到荧光素酶乳酸乳球菌表达系统 NZ3900/pNZ8149-luc,测定了荧光素酶能够在乳酸乳球菌体内稳定表达,为后续研究目的基因在生物活体内的表达情况奠定了基础。

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81360456)

作者简介:易国辉(1982-),硕士,助理研究员,主要研究方向:口服疫苗研发,电话:0898-66892235, E-mail: guohuiyi6@163.com

[△] 通讯作者:彭江龙,硕士,教授,主要研究方向:口服疫苗研发,电话:0898-66892235, E-mail: 359031034@qq.com

(收稿日期:2018-11-05 接受日期:2018-11-26)

1 材料与方 法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒 大肠杆菌 (*Escherichia coli*, *E.coli*) TOP10 感受态细胞、质粒 pMD19T 购自大连 TaKaRa 公司, *L.lactis* NZ3900、pNZ8149 购自荷兰 NIZO 食品研究所, pGL4.10 质粒购自 Promega。

1.1.2 培养基和生长条件 M17 培养基、LB 液体培养基和 LB 固体培养基购于青岛海博生物科技有限公司; G/L-M17 培养基: M17 培养基 +0.5% 葡萄糖 / 乳糖; 乳糖筛选培养基: M17 培养基 +0.5% 乳糖 +0.04 g/L 溴甲酚紫 +20 g/L 琼脂; *E.coli* TOP10 用 LB 培养基, 37℃ 振荡培养; 乳酸乳球菌用 M17 及改良的培养基, 30℃ 静止培养。

1.1.3 试剂和仪器 限制性内切酶 *Nco* I、*Xba* I、*Pfu* DNA 聚合酶、T4 连接酶、质粒小提试剂盒、DNA 胶回收纯化试剂盒购自大连 TaKaRa 公司; 荧光素酶检测试剂盒购自 Promega; 乳酸链球菌素 (Nisin) 购自 Sigma 公司。Gene Pulser Xcell 电穿孔系统、电击杯购自美国 BIO-RAD; PCR 扩增仪购自杭州博日; ModulusTM96 微孔板发光检测仪购自赛默飞公司; Allegra 21R 台式高速冷冻离心机购自美国 BECKMAN 公司。

1.2 方法

1.2.1 荧光素酶基因的克隆 根据 GenBank 报道的 *luc* 基因序列设计引物 F: 5'-CATGCCATGGCTATGGAAGATGCCAAAACA-3' (*Nco* I), R: 5'-CTAGTCTAGATTACACGGCGATCTTGCCGCCCTT-3' (*Xba* I), 以 pGL4.10 质粒为模板, PCR 扩增 *luc* 基因, 反应条件: 94℃ 预变性 5 min, 94℃, 30 s、55℃ 退火, 30 s、72℃, 90 s (35 个循环), 72℃ 延伸 5 min。PCR 产物预期长度约为 1675 bp, PCR 产物回收纯化后连接 pMD19T, 测序。

1.2.2 表达质粒 pNZ8149-*luc* 的构建及转化 *L.lactis* NZ3900 制备 *L.lactis* NZ3900 转化感受态细胞^[13], 将测序正确的片段经 *Nco* I 和 *Xba* I 双酶切, 与同样双酶切的 pNZ8149 质粒连接, 连接产物与 pNZ8149 质粒分别电击转化 *L.lactis* NZ3900 感受态细胞, 于乳糖培养基上筛选阳性克隆菌落, 提取质粒, 根据 GenBank 报道 pNZ8149 的序列设计引物 (8149F: 5'-AG-CATAATAACGGCTCTGAT-3'; 8149R: 5'-CCACGCTACGC-TCAAGG-3'), PCR 鉴定。

1.2.3 *L.lactis* NZ3900/pNZ8149-*luc* 表达荧光素酶活性的发光检测 挑取验证好的阳性克隆菌落接种于 L-M17 培养基, 30℃ 过夜培养, 次日按 1:25 接种于新的 L-M17 培养基中, 至 OD600 约为 0.4 时取出 1 mL 为未诱导样品, 然后加入 Nisin (终浓度 10 ng/mL) 诱导, 在 3 h、9 h、24 h、48 h、72 h、96 h 取出 1 mL 诱导培养物, 10000 r/min 室温离心 2 min, 收集菌体, 磷酸盐缓冲液洗涤 3 次, 然后加入适量磷酸盐缓冲液重悬菌体, 超声破碎, 制备乳酸乳球菌上清和菌体蛋白样品。取上述上清液用于测定荧光素酶值, 每个样品测定时, 取样品 100 μL, 加入 100 μL 荧光素酶检测试剂, 用枪打匀后测定 RLU (Relative light unit), 根据得到的数值来比较样品间目的报告基因的激活程度。

1.2.4 荧光素酶的 Western Blot 检测 取上述制备好的菌体蛋白样本, 进行蛋白 SDS-PAGE 电泳, 转膜, 利用 1:10000 稀

释的荧光素酶兔源血清作为一抗、1:5000 稀释的辣根过氧化物酶标记羊抗兔 Ig G 作为二抗进行 Western blot, 用 ECL 显影并拍照保存。

2 结果

2.1 报告基因 *luc* 的扩增与鉴定

以 pGL4.10 质粒为模板, *luc* 基因经 PCR 扩增及琼脂糖电泳检测, 所得产物片段 1600 bp 左右符合预期大小。PCR 产物纯化连接 pMD19T, *Nco* I、*Xba* I 双酶切鉴定片段大小一致 (图 1), 测序, 结果经比对与预期序列完全一致 (图 2)。

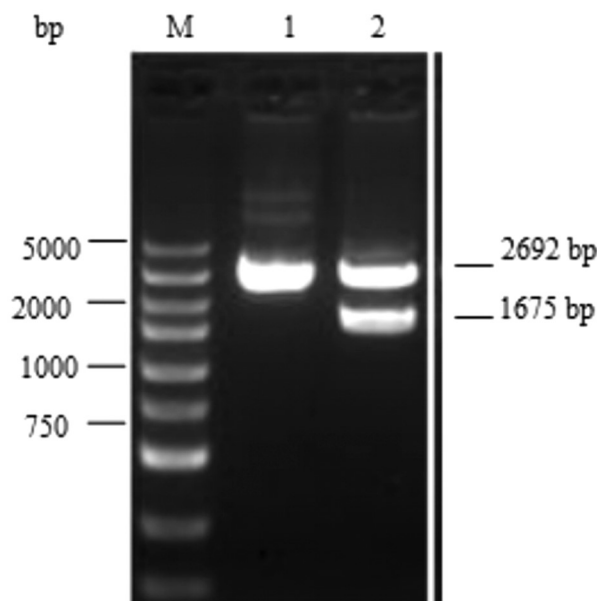


图 1 pMD19T-*luc* 酶切鉴定

Fig.1 pMD19T-*luc* enzyme digestion

Note: M: Marker; 1: plasmid before enzyme digestion; 2: plasmid after enzyme digestion.

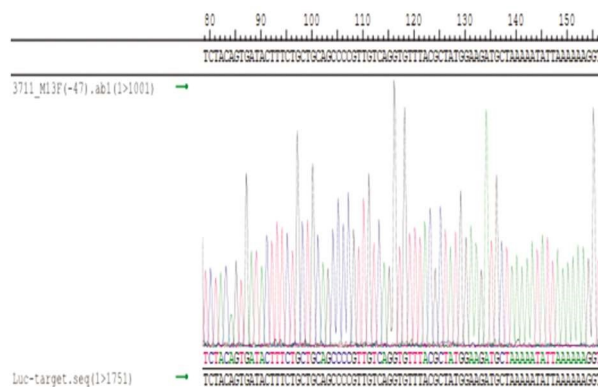


图 2 测序结果部分序列比对

Fig.2 Partial sequence of sequencing analysis blast

2.2 重组质粒 pNZ8149-*luc* 的构建和鉴定

将测序准确的 pMD19T-*luc* 质粒经 *Nco* I + *Xba* I 双酶切回收纯化 *luc* 片段, 然后与同样双酶切的载体 pNZ8149 连接, 转化乳酸乳球菌, 经乳糖筛选得到阳性克隆菌 (图 3, 培养基为紫红色, 重组的乳酸乳球菌产酸变为黄色), 提取质粒, PCR 鉴定 (图 4), 结果表明 *luc* 基因片段正确插入到表达质粒 pNZ8149 中。

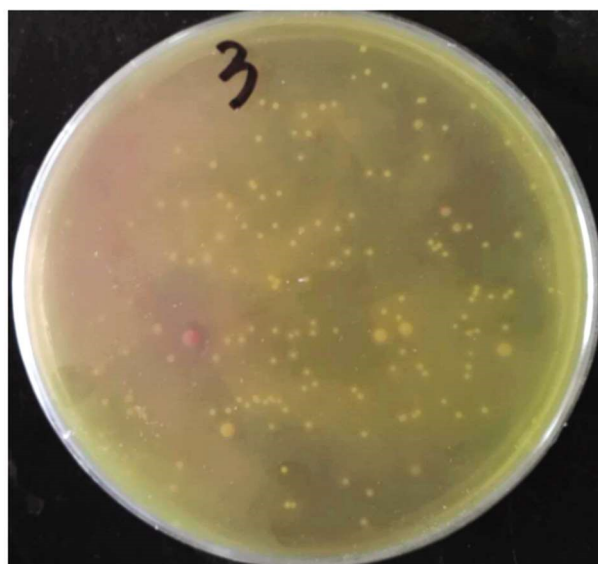


图3 重组乳酸乳球菌在乳糖筛选培养基上利用乳糖的表型图

Fig.3 Phenotype map of Recombinant lactococcus lactis used lactose in lactose screening medium

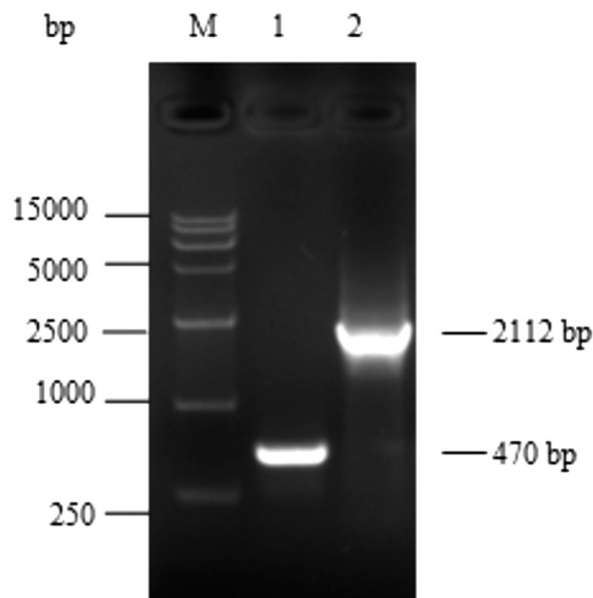


图4 重组质粒 pNZ8149-luc PCR 鉴定

Fig.4 Recombinant plasmid pNZ8149-luc PCR

Note: M: Marker; 1: plasmid pNZ8149 PCR product; 2: plasmid pNZ8149-luc PCR product.

2.3 luc 基因在重组乳酸乳球菌中的诱导表达与鉴定

用 NZ3900/pNZ8149-luc 重组菌与 NZ3900/pNZ8149 空质粒对照菌的破碎上清测荧光素酶值 (表 1), 结果表明, 随着 Nisin 诱导时间的延长, 目的蛋白的荧光素酶活性逐渐增强, 到时间超过 24 h 之后目的蛋白的荧光素酶活性逐渐下降。菌体

蛋白经 SDS-PAGE 电泳后进行 Western Blot 检测 (图 5), 结果显示, 重组乳酸乳球菌诱导表达的荧光素酶与荧光素酶兔源多克隆抗体有免疫反应, 出现与预期结果相一致的单一杂交带 (61 KD), 证明 luc 基因在乳酸乳球菌体内稳定表达。

表 1 NZ3900/pNZ8149-luc 与 NZ3900/pNZ8149 的荧光素酶值

Table 1 The luciferase values of NZ3900/ pnz8149-luc and NZ3900/pNZ8149

RLU	0 h	3 h	9 h	24 h	48 h	72 h	96 h
NZ3900/pNZ8149-luc	512.113	735.227	1134.26	3358.65	1075.36	618.719	563.716
NZ3900/pNZ8149	28.5	33.7	22.6	24.7	29.6	29.8	31

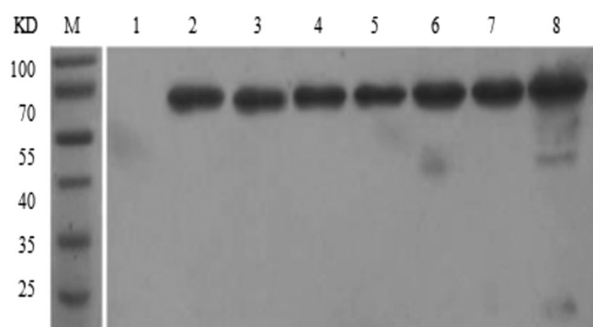


图5 Western Blot 检测荧光素酶

Fig.5 Western Blot analysis of luciferase

Note: M: mark; 1: Before induction; 2: 3, 9, 24, 48, 72 and 96 h Induction.

3 讨论

乳酸乳球菌属于食品级的益生菌, 具有免疫原性低、不致病和不产生脂多糖等有毒物质, 因此对人体不具有感染风险和毒性, 安全可靠^[14-17]。近年来, 随着乳酸乳球菌全基因组测序的完成和基因工程研究的不断深入, 针对乳酸乳球菌表达系统进行了很好的遗传改造, 包过耐酸, 内源性质粒的去除和选择性

标记等, 使其以安全级的乳酸乳球菌作为活载体疫苗表达外源目的蛋白广泛应用于生物医药和畜牧兽医业^[18-21]。在对乳酸乳球菌的遗传改造中, 选择性标记的筛选极其重要, 传统的乳酸乳球菌表达载体是以抗生素抗性基因 (红霉素、氯霉素等) 作为筛选标记, 由于抗生素抗性基因能够转移到环境中或人和动物体内, 存在一定的安全隐患, 为了防止抗生素抗性基因转移所引起的危害, 最有效的办法是选择安全食品级的选择性标记来代替抗生素抗性基因。目前国内外报道常用的食品级选择标记有营养缺陷性标记、细菌素等抗性标记及糖类利用标记等^[22-24]。食品级的乳酸乳球菌表达系统, 其诱导剂也应该是食品级的, 目前常用的诱导剂有 Nisin、糖类、pH 及盐等, Nisin 是乳酸乳球菌乳酸亚种产生的一种小肽, 叫乳链菌肽, 它是基因 nisI 所编码的一种脂蛋白, 为防御 Nisin 对自身毒害而产生的, 它对革兰氏阳性菌有强烈的抑制作用, 是广泛应用的一种天然防腐剂^[25]。体外表达蛋白首先要考虑的要素是高效表达, 如何高效表达提高蛋白产量, 可以在诱导表达条件上对诱导剂浓度、培养温度、诱导时间等进行筛选优化, 如诱导剂浓度方面, 培养基中添加的诱导剂 Nisin 在 0.5-25.0 ng/mL 内与蛋白表达量呈正相关, 但随着 Nisin 浓度的升高, 其抑制细菌生长的能力逐渐增

强,蛋白表达量相应降低^[26]。当表达系统中的表达载体、受体菌、诱导物及选择标记均为食品级时,其活菌作为制剂就可以直接应用于食品及药物,免去了蛋白提取过程中的复杂工艺,既简单安全又经济。本研究使用的 NZ3900/pNZ8149 表达系统是一个商品化广泛应用的乳酸菌食品级高效诱导表达系统,它是以乳糖为选择性标记,Nisin 为诱导剂的食品级表达系统。

萤光素酶是自然界中能够产生生物荧光的酶的统称,其中最有代表性的是一种学名为 *Photinus pyralis* 的萤火虫体内的萤光素酶,是由单一的多肽链组成的蛋白质,而且从不同种类的萤火虫提取的萤火虫萤光素酶的相对分子质量和结构皆各异,其分子量范围在 60-64 kD。在相应的发光反应中,萤光素酶需要三磷酸腺苷、无机分子萤光素和氧气作为底物,产生激活态的氧化萤光素,并释放出光量子,产生 550-580 nm 的荧光,因此它是一种特殊类型的化学发光反应,而不依赖于有机体对光的吸收,而且在该反应中化学能转变为光能的效率很高,几乎把反应中所有的能量都被转化为光能,因此相比其他报告基因如绿色荧光蛋白、 β -半乳糖苷酶、葡萄糖醛酸酶、分泌型碱性磷酸酶报告基因具有明显优势。萤光素酶于 1956 年首次从萤火虫中提取到后被科研人员研究表明其具有灵敏度高、半衰期短、膜通透性和检测范围广等优点,因此将其作为报告基因对外源目的基因进行示踪,已广泛应用于基因表达、示踪微生物和细胞活体成像等科学研究中^[27-30]。本研究将萤光素酶基因构建到乳酸乳球菌 NZ3900/pNZ8149 表达系统中,而在利用该表达系统表达外源功能蛋白的前期研究中,未见对外源功能蛋白在生物活体内进行示踪的报道。

4 结论

本研究采用分子生物学技术将萤火虫萤光素酶报告基因成功克隆至乳酸乳球菌表达载体 pNZ8149 中,构建了萤光素酶表达质粒 pNZ8149-luc,并通过电穿孔转化法将表达质粒 pNZ8149-luc 转化宿主乳酸乳球菌 NZ3900,得到萤光素酶乳酸乳球菌表达系统 NZ3900/pNZ8149-luc,Nisin 诱导表达后经酶活性测定和 Western Blot 检测表明萤光素酶能够在乳酸乳球菌体内稳定表达,并具备活性,在后续疫苗前期研究中,将其和外源目的基因融合形成嵌合基因,可示踪外源目的基因在生物活体内的表达情况,为以乳酸乳球菌作为活载体疫苗的前期研究奠定了基础。

参考文献(References)

- [1] Castro CPD, Drumond MM, Batista VL, et al. Vector development timeline for mucosal vaccination and treatment of disease using *Lactococcus lactis* and design approaches of next generation food grade plasmids[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 1805
- [2] Kobierecka PA, Olech B, Książek M, et al. Cell wall anchoring of the campylobacter Antigens to *Lactococcus lactis* [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2016, 7: 165
- [3] Song AA, In LL, Lim SH, et al. A review on *Lactococcus lactis*: from food to factory[J]. *Microbial Cell Factories*, 2017, 16(1): 55-69
- [4] Wyszynska A, Kobierecka P, Bardowski J, et al. Lactic acid bacteria--20 years exploring their potential as live vectors for mucosal vaccination[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2015, 99(7): 2967-2977
- [5] Loh JMS, Lorenz N, Tsai CJ, et al. Mucosal vaccination with pili from Group A *Streptococcus* expressed on *Lactococcus lactis* generates protective immune responses[J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 7174
- [6] Yagnik B, Padh H, Desai P. Construction of a new shuttle vector for DNA delivery into mammalian cells using non-invasive *Lactococcus lactis*[J]. *Microbes & Infection*, 2016, 18(4): 237-244
- [7] Sun Xiao-hui, Tang Xu, Wang Qing-hua, et al. Fusion expression of bifunctional enzyme complex for luciferin-recycling to enhance the luminescence imaging[J]. *J Photochem Photobiol B*, 2018, 185: 66-72
- [8] Li Jing, Chen Lai-zhong, Du Lu-pei, et al. Cage the firefly luciferin!-a strategy for developing bioluminescent probes [J]. *Chemical Society Reviews*, 2012, 42(2): 662-676
- [9] Dagil YA, Sharova VS, Pinegin BV, et al. A cell-based test system for the assessment of pharmacokinetics of NOD1 and NOD2 receptor agonists[J]. *International Immunopharmacology*, 2018, 63: 94-100
- [10] Saiki P, Nakajima Y, Van Griensven LJLD, et al. Real-time monitoring of IL-6 and IL-10 reporter expression for anti-inflammation activity in live RAW 264.7 cells [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2018, 505: 885-890
- [11] 范园园, 李铁, 陈爽, 等. 用于活体成像裸鼠肺癌肿瘤模型的建立 [J]. *中国兽医学报*, 2018, 38(06): 1177-1184
- [12] 韩笑笑, 刘丽雅, 谭超月, 等. 稳定表达萤光素酶基因的 TC-1 细胞系的构建[J]. *郑州大学学报(医学版)*, 2018, 53(04): 429-432
- [13] Holo H, Nes IF. High-frequency transformation, by electroporation, of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* grown with glycine in osmotically stabilized media [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1989, 55(12): 3119-3123
- [14] Azizpour M, Hosseini SD, Jafari P, et al. *Lactococcus lactis*: a new strategy for vaccination [J]. *Avicenna J Med Biotechnol*, 2017, 9(4): 163-168
- [15] Vassaux G, Nitcher J, Jezzard S, et al. Bacterial gene therapy strategies[J]. *J Pathol*, 2006, 208(2): 290-298
- [16] Pellissery AJ, Nair UR. Lactic acid bacteria as mucosal delivery vaccine[J]. *Adv Anim Vet Sci*, 2013, 1(6): 183-187
- [17] Azevedo MD, Meijerink M, Taverne N, et al. Recombinant invasive *Lactococcus lactis* can transfer DNA vaccines either directly to dendritic cells or across an epithelial cell monolayer [J]. *Vaccine*, 2015, 33(38): 4807-4812
- [18] BermúdezHumarán LG. *Lactococcus lactis* as a live vector for mucosal delivery of therapeutic proteins [J]. *Hum Vaccin*, 2009, 5(4): 264-267
- [19] Sáez D, Fernández P, Rivera A, et al. Oral immunization of mice with recombinant *Lactococcus lactis* expressing Cu, Zn superoxide dismutase of *Brucella abortus* triggers protective immunity [J]. *Vaccine*, 2012, 30(7): 1283-1290
- [20] 彭晓燕, 张荣光, 段广才, 等. 幽门螺杆菌中性粒细胞激活蛋白在乳酸菌中的表达及免疫活性 [J]. *中国卫生检验杂志*, 2017, 27(10): 1372-1374
- [21] 王莉平, 韩先杰, 王孝彬, 等. 表达猪流行性腹泻病毒 S1 蛋白的重组乳酸乳球菌的构建及其免疫原性的研究 [J]. *中国兽医科学*, 2017, 47(09): 1118-1123
- [22] Boucher I, Parrot M, Gaudreau H, et al. Novel food-grade plasmid vector based on melibiose fermentation for the genetic engineering of *Lactococcus lactis* [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, 68(12): 6152-6161

- [19] Yu H, Chen T, Zhou L, et al. Effect of Selective 5-HT₆R Agonist on Expression of 5-HT Receptor and Neurotransmitter in Vascular Dementia Rats[J]. Med Sci Monit, 2017, 23: 818-825
- [20] Iadecola C. The Pathobiology of Vascular Dementia [J]. Neuron, 2013, 80(4): 844-866
- [21] Wu L, Li Y, Yu M, et al. Notch Signaling Regulates Microglial Activation and Inflammatory Reactions in a Rat Model of Temporal Lobe Epilepsy[J]. Neurochem Res, 2018, 43(6): 1269-1282
- [22] Clayton A M, Shao Q, Paaui N D, et al. Postpartum increases in cerebral edema and inflammation in response to placental ischemia during pregnancy[J]. Brain Behav Immun, 2018, 70: 376-389
- [23] Zhang J, Takahashi H K, Liu K, et al. Anti-high mobility group box-1 monoclonal antibody protects the blood-brain barrier from ischemia-induced disruption in rats[J]. Stroke, 2011, 42(5): 1420-1428
- [24] Festoff B W, Sajja R K, van Dreden P, et al. HMGB1 and thrombin mediate the blood-brain barrier dysfunction acting as biomarkers of neuroinflammation and progression to neurodegeneration in Alzheimer's disease[J]. J Neuroinflammation, 2016, 13(1): 194
- [25] Tang D, Kang R, Zeh H J, et al. High-Mobility Group Box 1, Oxidative Stress, and Disease[J]. Antioxidants & Redox Signaling, 2011, 14(7): 1315-1335
- [26] Shi Y, Zhang L, Teng J, et al. HMGB1 mediates microglia activation via the TLR4/NF- κ B pathway in coriaria lactone induced epilepsy [J]. Mol Med Rep, 2018, 17(4): 5125-5131
- [27] Li Z, Li B, Zhu X, et al. Neuroprotective effects of anti-high-mobility group box 1 antibody in juvenile rat hippocampus after kainic acid-induced status epilepticus[J]. Neuroreport, 2013, 24(14): 785-790
- [28] Weber M D, Frank M G, Tracey K J, et al. Stress Induces the Danger-Associated Molecular Pattern HMGB-1 in the Hippocampus of Male Sprague Dawley Rats: A Priming Stimulus of Microglia and the NLRP3 Inflammasome [J]. Journal of Neuroscience, 2015, 35(1): 316-324
- [29] Weber M D, Frank M G, Sobesky J L, et al. Blocking toll-like receptor 2 and 4 signaling during a stressor prevents stress-induced priming of neuroinflammatory responses to a subsequent immune challenge [J]. Brain, Behavior, and Immunity, 2013, 32: 112-121
- [30] Maroso M, Balosso S, Ravizza T, et al. Toll-like receptor 4 and high-mobility group box-1 are involved in ictogenesis and can be targeted to reduce seizures[J]. Nature Medicine, 2010, 16(4): 413-419
- [31] Chen X, Wu S, Chen C, et al. Omega-3 polyunsaturated fatty acid supplementation attenuates microglial-induced inflammation by inhibiting the HMGB1/TLR4/NF- κ B pathway following experimental traumatic brain injury[J]. Journal of Neuroinflammation, 2017, 14(1): 143
- [32] Yang W, Li J, Shang Y, et al. HMGB1-TLR4 axis plays a regulatory role in the pathogenesis of mesial temporal lobe epilepsy in immature rat model and children via the p38MAPK signaling pathway[J]. Neurochemical Research, 2017, 42(4): 1179-1190
- [33] Urbanaviciute V, Furnrohr B G, Weber C, et al. Factors masking HMGB1 in human serum and plasma [J]. J Leukoc Biol, 2007, 81(1): 67-74
- [34] Zhang J, Takahashi H K, Liu K, et al. Anti-high mobility group box-1 monoclonal antibody protects the blood-brain barrier from ischemia-induced disruption in rats[J]. Stroke, 2011, 42(5): 1420-1428

(上接第 1652 页)

- [23] Loera-Arias MJ, Villatoro-Hernández J, Parga-Castillo MA, et al. Secretion of biologically active human interleukin 22 (IL-22) by *Lactococcus lactis*[J]. Biotechnology Letters, 2014, 36(12): 2489-2494
- [24] Wang Bo-Hua, Xu Yang, Li Yan-Ping. Use of the pyrG gene as a food-grade selection marker in *Monascus* [J]. Biotechnology Letters, 2010, 32(11): 1631-1635
- [25] Ng DTW, Sarkar CA. Nisin-inducible secretion of a biologically active single-chain insulin analog by *Lactococcus lactis* NZ9000 [J]. Biotechnology & Bioengineering, 2011, 108(8): 1987-1996
- [26] 王传文, 周宏专, 郭芳芳, 等. 表达空肠弯曲菌 CfrA 蛋白重组乳酸乳球菌的构建及其免疫效果 [J]. 微生物学报, 2016, 56(8): 1326-1334
- [27] Lehmann C, Sieg H, Lampen A, et al. Disturbance of firefly luciferase-based bioassays by different aluminum species[J]. Analytical Biochemistry, 2016, 504: 27-29
- [28] 程佳, 庞田田, 缙晶. 利用荧光素酶报告基因检测维生素 D 生物活性[J]. 药物分析杂志, 2017, 37(07): 1275-1279
- [29] Zhang Fu-quan, Perez-Martin E, Juleff N, et al. A replication-competent foot-and-mouth disease virus expressing a luciferase reporter[J]. Journal of Virological Methods, 2017, 247: 38-44
- [30] Becker JP, Clemens JR, Theile D, et al. Bortezomib and ixazomib protect firefly luciferase from degradation and can flaw respective reporter gene assays[J]. Analytical Biochemistry, 2016, 509: 124-129