

鸡 NLRX1 受体基因的原核表达及抗体制备

刘雪兰, 寇家倩, 周梦琴, 丁 泠, 谭烁佳, 朱 祥

(安徽农业大学动物科技学院, 合肥 230036)

摘 要: NLRX1 (NLR family member X1) 是一种调控天然免疫应答的重要模式识别受体。首先应用 PCR 方法分别对鸡 *NLRX1* 基因的编码区和 N 端 1~492 bp 截短序列进行 PCR 扩增并克隆到原核表达载体 pET-32a(+), 以 IPTG 诱导重组菌表达, 获得了重组 NLRX1 蛋白和 N 端截短表达蛋白 (rNLRX1-part)。其次将纯化的截短重组蛋白 rNLRX1-part 免疫新西兰兔, 以间接酶联免疫吸附实验 (ELISA) 检测制备的抗体效价为 1 : 512 000。应用 Western blot 方法分析显示, 该抗体不仅可特异性结合原核表达 NLRX1 蛋白也可有效识别鸡 DF-1 细胞中过表达 NLRX1 蛋白。

关键词: 鸡 NLRX1; 蛋白表达与纯化; 多克隆抗体制备; 特异性

中图分类号: S831.2; S852.4

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X (2020)02-0167-06

Prokaryotic expression of chicken NOD-like receptor X1 and preparation of its antibody

LIU Xuelan, KOU Jiaqian, ZHOU Mengqin, DING Ling, TAN Shuojia, ZHU Xiang

(School of Animal Science and Technology, Anhui Agricultural University, Hefei 230036)

Abstract: NLR family member X1 (NLRX1) is an important pattern recognition receptor that regulates innate immune response. In this study, coding region sequence and 1-492 bp N-terminal truncated sequence of chicken NLRX1 gene were firstly cloned by PCR and inserted into prokaryotic expression pET-32a (+) vector. Expression of the recombinant NLRX1 protein and N-terminal truncated protein (rNLRX1-part) were induced by isopropyl β -D-Thiogalactoside (IPTG). Moreover, the recombinant rNLRX1-part protein was purified and immunized a New Zealand rabbit. The titer of anti-NLRX1 polyclonal antibody prepared by indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was 1 : 512 000. The Western-blotting analysis showed the prepared antibody could not only specifically react with NLRX1 protein from prokaryotic expression but can effectively detect NLRX1 over-expression in chicken DF-1 cells.

Key words: chicken NLRX1; expression; polyclonal antibody; specificity

天然免疫是动物机体最古老的抗感染防御系统, 通过特殊的模式识别受体 (pattern-recognition receptors, PRRs) 感知病原体相关分子模式 (pathogen-associated molecular patterns, PAMPs), 识别入侵的病原体^[1]并被迅速激活, 从而形成防御病原体入侵的第一道防线^[2]。天然免疫 PRRs 家族中成员不仅表达于细胞膜上, 如 Toll 样受体 (toll-like receptors), 也可形成于细胞质内, 如 NOD-like receptors (NLRs)^[3-4], 有效监视入侵病原体。

NLRX1 (NLR family member X1) 是胞浆识别受体 NLRs 家族中定位线粒体的唯一成员^[5], 其在细胞中的分布特征与线粒体的能量代谢具有密切关

系^[6]。NLRX1 在调节免疫和识别病原微生物以及诱导机体产生适应性免疫应答方面具有重要作用^[7]。研究表明, NLRX1 可负向调控维甲酸诱导基因 I 样受体 (RIG-I like receptors, RLRs) 受体家族中 RIG-I 介导的抗病毒免疫应答, 通过与线粒体上的 MAVS (mitochondrial antiviral-signaling) 结合并阻断其与 RIG-I 相互作用^[8-9]。此外, NLRX1 负调控感染诱发的炎症反应^[10-11]。NLRX1 缺失或功能降低会导致炎症反应增加^[12], 而过度炎症反应则对机体有害。此外, NLRX1 还具有促进活性氧 (ROS) 生成、细胞凋亡和细胞自噬等重要作用^[13-15]。多种疾病如肿瘤、HIV 等病毒感染以及代谢综合征等, 与 NLRX1 密

收稿日期: 2019-05-14

基金项目: 国家级大学生创新项目(201610364060;201810364019)和安徽省高等学校自然科学重点项目(KJ2018A0136)共同资助。

共同第一作者: 刘雪兰, 博士, 副教授。E-mail: liuxuelan203@163.com; 寇家倩, 本科生。E-mail: 2182266753@qq.com

切相关^[16-19]。

尽管哺乳动物甚至鱼类 NLRX1 功能的相关阐述已相对清楚^[20-21]，但有关禽类尤其是鸡 NLRX1 生物学特性和功能方面尚处在探索阶段。本研究在实验室首次克隆鸡 NLRX1 全长 cDNA 基础上，通过构建 chNLRX1 的原核表达载体，获得 chNLRX1 全蛋白和截短表达蛋白，并以其截短表达蛋白制备兔源多克隆抗体并应用于检测鸡成纤维细胞系 DF-1 中过表达 chNLRX1，为进一步深入研究鸡 NLRX1 生物学功能奠定基础。

1 材料与方法

1.1 载体与试剂

pET-32a(+)原核表达载体、pEGFP-NLRX1 真核表达重组质粒、鸡成纤维细胞系 DF-1 细胞由本实验室保存；限制性内切酶 *Sal* I、*Eco*R I、*Kpn* I 和 DNA Ligation Kit 以及 *E.coli* Rosetta 和 DH5 α 感受态细胞购自宝生物工程（大连）有限责任公司；高保真酶 FastPfu Fly PCR SuperMix 和 EasySee Western Marker 购于北京全式金生物公司；Protein G Resin Kit 和抗内参 GAPDH 抗体购自南京金斯瑞生物科技有限公司；PVDF 膜购于 Millipore 公司；DNA

凝胶提取试剂盒购于 Axygen Scientific Inc；抗 His 标签的鼠源一抗、HRP-羊抗鼠 IgG、HRP-羊抗兔 IgG 购自北京中杉金桥生物技术有限公司；弗氏佐剂购自西格玛奥德里奇（上海）贸易有限公司；转染试剂 LipoFiter3.0 购自汉恒生物科技（上海）有限公司；超敏 ECL 化学发光底物液购自武汉博士德生物工程有限公司。

1.2 NLRX1 原核表达重组质粒的构建及诱导表达

运用 DNASTar 软件对 *NLRX1* 基因编码区和 N 端基因序列预测编码的抗原表位进行分析，以本实验室构建的 pEGFP-NLRX1 重组质粒为模板，设计引物（见表 1）通过 PCR 方法分别扩增 *NLRX1* 基因 N 端 1~492 bp 截短片段（命名为 NLRX1₁₋₄₉₂）和完整 ORF 序列（NLRX1）。PCR 扩增条件：96℃ 5 min；96℃ 30 s，60℃ 1.5 min，72℃ 15 s，共 30 个循环。回收扩增产物并纯化，NLRX1₁₋₄₉₂ 与 pET-32a(+)原核表达载体分别经 *Eco*R I、*Sal* I 双酶切，NLRX1 与 pET-32a(+)原核表达载体分别经 *Kpn* I、*Sal* I 双酶切，切胶回收后连接、转化 *E.coli* Rosetta 感受态细胞，经菌液 PCR 和双酶切鉴定将阳性克隆分别命名为 NLRX1/pET-32a 和 NLRX1₁₋₄₉₂/pET-32a 重组质粒。

表 1 用于构建 chNLRX1 原核表达质粒的引物

Table 1 Primers for constructing the recombinant NLRX1 prokaryotic expression plasmids.

名称 Name	引物序列 (5'-3') Prime sequences(5'-3')
NLRX11-492/pET-32a-F	CCGGAATTCATGTCCTGGGCCATGCAG (<i>Eco</i> R I)
NLRX11-492/pET-32a-R	ACGCGTTCGACTTACTGGAGGCTGATGACCTG(<i>Sal</i> I)
NLRX1/pET-32a-F	GGGGTACCATGTCCTGGGCCATGCAGTGC(<i>Kpn</i> I)
NLRX1/pET-32a-R	ACGCGTTCGACTCAAAGGGTCCCATGCTGGAG(<i>Sal</i> I)

挑取重组菌单菌落接种 2 mL Amp+ LB 液体培养基中，37℃，200 r·min⁻¹ 培养 12 h，按 1:100 接种到 4 mL 的 Amp+LB 液体培养基中继续震荡培养 4 h，加 1.0 mmol·L⁻¹ IPTG 诱导培养 4 h，离心收集细菌，加 PBS 重悬后经沸水煮 10 min，离心后取适量上清液进行 SDS-PAGE 电泳鉴定 NLRX1 重组截短蛋白（rNLRX1-part）和全蛋白（rNLRX1）的表达情况。

分别以终浓度为 0.1、0.25、0.5、0.75、1.0 mmol·L⁻¹ 的 IPTG 对重组菌进行诱导，收集菌体蛋白，用预冷的 PBS 重悬菌体，-80℃冻融 3 次，冰浴中超声破碎菌体 30 min，于 4℃以 12 000 r·min⁻¹ 离心 3 min，分别取沉淀和上清经 SDS-PAGE 电泳检测分析 IPTG 最佳诱导浓度及表达形式。

1.3 截短 NLRX1 重组蛋白的大量诱导与蛋白纯化

为了获取制备抗 NLRX1 多克隆抗体的免疫原，

以 IPTG 最佳诱导浓度对 NLRX1₁₋₄₉₂/pET-32a 阳性克隆菌进行大量诱导，4℃离心收集菌体经超声处理获取上清进行 SDS-PAGE 凝胶电泳，于 0.25 mol·L⁻¹ KCl 溶液中进行显色，切取含目的蛋白的凝胶条装入 DNA 凝胶提取试剂盒中的一次性离心柱，12 000 r·min⁻¹ 离心 5 min，收集液体即可获得重组截短蛋白 rNLRX1-part。

1.4 兔源抗 NLRX1 抗体的制备

将纯化后的 rNLRX1-part 蛋白与完全弗氏佐剂混合并充分乳化，通过颈背部皮下多点注射体重 2.0 kg 左右新西兰兔，免疫剂量为 1.0 mg·mL⁻¹。首免后 2 周和 4 周，再将纯化后的 rNLRX1-part 蛋白与不完全弗氏佐剂混合并充分乳化，分别进行第 2 次和第 3 次免疫。三免后第 7 天心脏采血并分离血清，以免疫前血清作为阴性对照，通过间接 ELISA 方法检测

抗体水平, 以待检样品 OD_{450} 值 > 阴性对照 OD 值的 2.1 倍的血清最高稀释度判断抗体效价。通过 Protein G 琼脂糖凝胶柱纯化抗体, -80°C 保存备用。

1.5 原核表达 NLRX1 重组蛋白的反应原性

将原核表达重组截短蛋白 rNLRX1-part 和全蛋白 rNLRX1 经 SDS-PAGE 电泳转印至 PVDF 膜上, 以 5% 脱脂乳室温封闭 1 h, 用 TBST 溶液洗膜 3 次, 加入抗 His 标签的鼠源单克隆抗体 (1:200) 和兔抗 NLRX1 多克隆抗体 (1:1 000) 于 4°C 过夜孵育, 再次以 TBST 洗膜 3 次。分别以 HRP-羊抗鼠 IgG、HRP-羊抗兔 IgG 酶标抗体室温孵育 1 h, 洗膜 3 次后加入增强型 HRP-DAB 显色试剂进行显色检测。

1.6 真核细胞转染 NLRX1 与 Western blot 检测

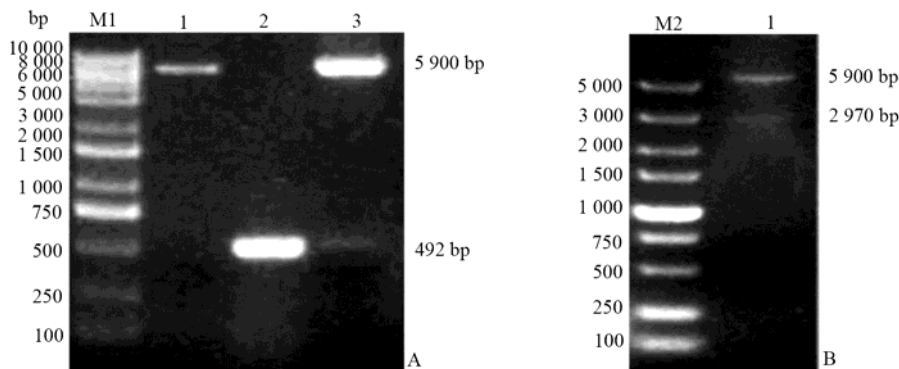
复苏鸡成纤维细胞 DF-1, 转染前一天以每孔 1×10^5 个细胞铺于 24 孔板, 当细胞融合率约 70% 时, 分别以 $0.8 \mu\text{g}$ 质粒混合 $1.6 \mu\text{L}$ LipoFiter 3.0 转染试剂, 按照转染试剂说明书将 pEGFP-NLRX1 重组质粒和对照质粒 pEGFP-C1 转染细胞, 36 h 后通过倒置荧光显微镜观察细胞中 GFP-NLRX1 表达。然后加入 RIPA 裂解液获得细胞总蛋白, 应用 1:

800 倍稀释的兔源 anti-NLRX1 抗体和鼠抗 GAPDH (1:200) 为一抗, 通过 Western blot 检测蛋白的表达。

2 结果与分析

2.1 NLRX1 原核表达载体的鉴定

以本实验室构建的 pEGFP-NLRX1 重组质粒为模板, 设计引物 (见表 1) 通过 PCR 扩增分别获得 NLRX1 基因 N 端 1~492 bp 截短片段 (NLRX1₁₋₄₉₂) 和编码区 NLRX1 序列, 连接原核表达载体 pET-32a (+), 转化大肠杆菌 *E.coli* Rosetta 感受态细胞中, 经 PCR 扩增和双酶切验证重组质粒。结果显示, 通过 PCR 扩增可检测到 NLRX1₁₋₄₉₂/pET-32a 重组质粒中含有与预测 492 bp 大小相符的目的基因 (图 1A), 双酶切鉴定显示了 NLRX1₁₋₄₉₂/pET-32a 和 NLRX1/pET-32a 重组质粒分别含有与大小与目的序列相一致的 492 bp (图 1A) 和 2 970 bp (图 1B) 预期片段。结果表明原核表达重组质粒 NLRX1₁₋₄₉₂/pET-32a 和 NLRX1/pET-32a 构建成功。



A: NLRX1₁₋₄₉₂/pET-32a 重组载体的鉴定结果。M1:DNA 分子标准 DL10 000; 泳道 1:pET-32a 双酶切鉴定; 2: PCR 扩增片段; 3: *EcoR* I、*Sal* I 双酶切鉴定。B. NLRX1/pET-32a 重组载体的鉴定结果。M2:DNA 分子标准 DL5 000; 泳道 1: *Kpn* I、*Sal* I 双酶切鉴定

A: Identification of chNLRX1₁₋₄₉₂/pET-32a recombinant. M1: DNA marker DL10 000; Lane 1: double enzyme digestion; 2: PCR amplified fragment; 3: *EcoR* I and *Sal* I double digestion. B: Identification of NLRX1/pET-32a recombinant. M2: DNA marker DL5 000; Lane 1: *Kpn* I and *Sal* I double enzyme digestion

图 1 原核表达 NLRX1 重组质粒的 PCR 扩增和双酶切鉴定

Figure 1 Identification of prokaryotic chNLRX1 recombinant plasmid by PCR and double digestion

2.2 NLRX1 融合蛋白的表达及鉴定

过夜培养 NLRX1₁₋₄₉₂/pET-32a 和 NLRX1/pET-32a 重组菌, 以 $1.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ IPTG 诱导后应用 SDS-PAGE 电泳检测蛋白表达。结果如图 2A 显示, 在约 129.8 kDa 和 34.9 kDa 位置出现与 NLRX1 的全蛋白表达 rNLRX1 和截短表达蛋白 rNLRX1-part 预期大小一致的目的带, 表明 NLRX1 在大肠杆菌中成功获得了表达。以浓度为 $0.1 \sim 1.25 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$

IPTG 分别对重组菌进行诱导, 收集菌体经超声破碎后以 SDS-PAGE 电泳检测, 当 IPTG 诱导浓度为 $0.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时可获得较高浓度的 rNLRX1-part (图 2B) 和 rNLRX1 重组蛋白 (图 2C)。表达形式鉴定结果显示, rNLRX1-part 主要为可溶性表达。

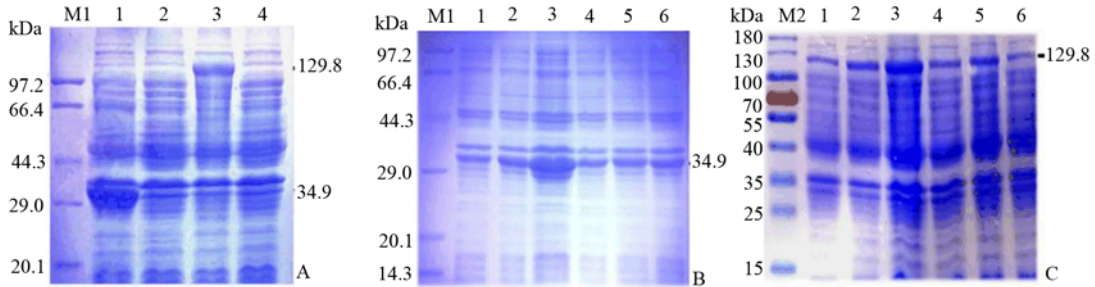
2.3 rNLRX1-part 截短蛋白的抗体制备及其反应原性

应用优化的 IPTG 浓度大量诱导 NLRX1 截短表

达的重组菌 NLRX1₁₋₄₉₂/pET-32a, 通过 SDS-PAGE 电泳和切胶纯化获得 rNLRX1-part 融合蛋白。以纯化的 rNLRX1-part 蛋白制备抗原, 经 3 次免疫新西兰兔制备抗 NLRX1 多克隆抗体, 通过间接 ELISA 方法检测血清抗体(anti-NLRX1)抗体效价为 1 : 512 000。

以抗 His 标签的单抗作为参照, 应用 anti-NLRX1 抗体通过 Western blot 方法检测经 IPTG

诱导的原核表达蛋白 rNLRX1 以及 rNLRX1-part。结果显示, 本实验制备的 anti-NLRX1 抗体可在约 129.8 kDa 和 34.9 kDa 位置处检测到相应的目的蛋白(图 3B), 与抗 His 标签单抗检测结果一致(图 3A), 表明重组蛋白能与兔源 anti-NLRX1 多克隆抗体产生特异性反应, 且具有良好的反应原性。

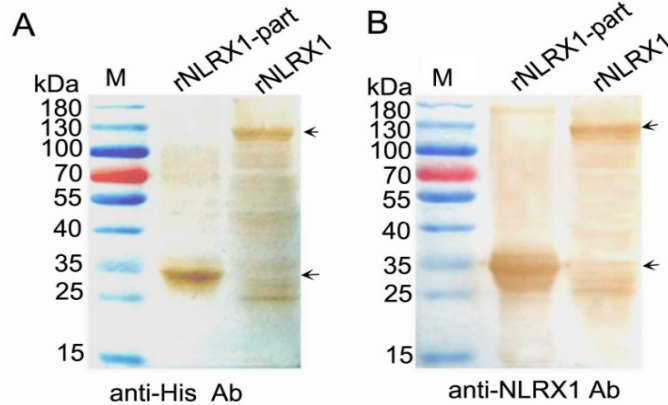


A:应用 1.0 mmol·L⁻¹ IPTG 对 NLRX1₁₋₄₉₂/pET-32a、NLRX1/pET-32a 诱导的鉴定结果。M1:蛋白标准分子量; 泳道 1、2 分别是 1.0 mmol·L⁻¹ IPTG 诱导 NLRX1₁₋₄₉₂/pET-32a 和空白对照; 泳道 3、4 分别是 1.0 mmol·L⁻¹ IPTG 诱导 NLRX1/pET-32a 和空白对照; B:不同浓度的 IPTG 诱导 NLRX1₁₋₄₉₂/pET-32a 诱导表达情况。M1:蛋白标准分子量, 泳道 1~6:分别为 0.1、0.25、0.5、0.75、1.0、1.25 mmol·L⁻¹ IPTG 的诱导效果; C:不同浓度的 IPTG 对 NLRX1/pET-32a 的诱导表达; M2:蛋白标准分子量, 泳道 1~6:与图 2B 相同浓度的 IPTG 诱导情况

A: Identification of induction about NLRX1₁₋₄₉₂/pET-32a and chNLRX1/pET-32a using 1.0 mmol·L⁻¹ IPTG. M1: protein marker; Lanes 1 and 2 were respectively showed 1.0 mmol·L⁻¹ IPTG induced NLRX1₁₋₄₉₂/pET-32a and blank control ; lanes 3 and 4 were respectively showed 1.0 mmol·L⁻¹ IPTG induced NLRX1/pET-32a and blank control respectively; B: different concentrations of IPTG induced the induction of NLRX1₁₋₄₉₂/pET-32a expression. M1: protein marker; lanes 1 to 6: 0.1, 0.25, 0.5, 0.75, 1.0 and 1.25 mmol·L⁻¹ IPTG induction effect; C: different concentrations of IPTG induced expression of NLRX1/pET-32a; M2: Protein marker; Lanes 1~6: IPTG induction at the same concentration as Figure 2B

图 2 不同浓度 IPTG 诱导 NLRX1 重组蛋白的表达

Figure 2 Expression of NLRX1 recombinant protein induced by different concentrations of IPTG



A:抗 His-tag 单抗检测 NLRX1 重组蛋白的表达; B: anti-NLRX1 抗体检测 NLRX1 重组蛋白的表达

A: NLRX1 recombinant protein were detected with anti-His tag antibody; B: NLRX1 recombinant protein were detected with our anti-NLRX1 antibody ; The antibody prepared in this experiment detects the expression of NLRX1 recombinant protein

图 3 Western blot 分析 NLRX1 原核蛋白的表达

Figure 3 Western blot analysis of prokaryotic expression of NLRX1

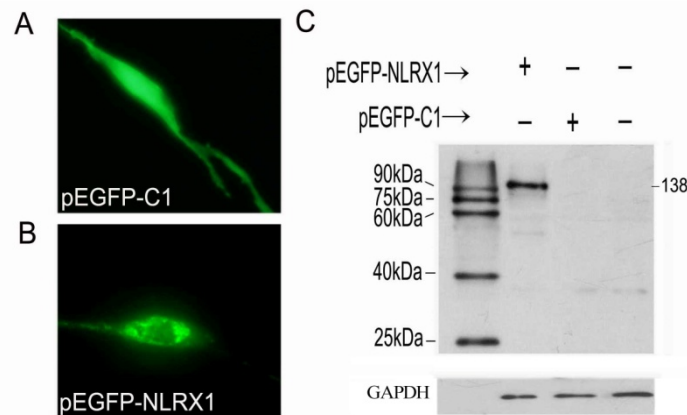
2.4 鸡 DF-1 细胞中 NLRX1 过表达与检测

将 pEGFP-NLRX1 重组质粒和对照质粒 pEGFP-C1 分别转染鸡 DF-1 细胞, 36 h 后通过倒置

荧光显微镜观察 GFP-NLRX1 重组蛋白表达, 裂解细胞收集总蛋白, 应用本实验室制备的 anti-NLRX1 抗体对 NLRX1 过表达蛋白进行 Western blot 检测。

结果显示, 与 pEGFP-C1 空载体转染的细胞中荧光呈现出弥散于整个细胞相比 (图 4 A), pEGFP-NLRX1 重组质粒转染细胞中可见明显聚集性 (图 4 B), 说明获得了 NLRX1 过表达。继而以 western blot 检测细胞中蛋白表达, 结果显示在转染

重组质粒的细胞中可以检测到 NLRX1 的表达, 而在空载体和未转染质粒的对照细胞中未检测到目的蛋白 (图 4 C)。由此说明, 本实验制备的 anti-NLRX1 抗体可以有效识别细胞中 NLRX1 蛋白的表达。



A:空载体转染 DF-1 细胞荧光观察图 B:NLRX1 转染 DF-1 细胞荧光观察图 C: western blot 检测

A: Fluorescence observation of DF-1 cells transfected with pEGFP-C1 vector. B: Fluorescence observation of NLRX1 in DF-1 cells. C: over-expression of NLRX1 was detected by western blot analysis.

图 4 鸡 DF-1 细胞中 NLRX1 蛋白过表达的检测

Figure 4 Analysis of NLRX1 protein overexpression in chicken DF-1 cells

3 讨论

宿主体内存在多种负调控机制可抑制过度免疫反应对宿主造成伤害, 以维持反应的平衡。NLRX1 在先天免疫中发挥负调节作用, 有关哺乳动物 NLRX1 调节机制的研究相对深入^[15-17,22], 而有关鸡 NLRX1 分子特性和功能方面的研究则明显滞后。本研究在首次克隆了鸡 NLRX1 全长 cDNA 序列的基础上 (另发表), 分析了鸡 NLRX1 原核表达条件及其诱导特性, 为进一步研究鸡 NLRX1 在先天免疫中作用机制等奠定基础。

外源蛋白表达水平和其生物活性受多种因素影响, 如诱导表达的条件和宿主菌等^[23-24]。因此, 在原核表达系统中表达动物来源蛋白时, 诱导温度及诱导剂浓度的选择非常重要^[25-26]。当在较高温度条件下诱导时, 因蛋白表达速度增快, 容易造成表达的蛋白不能正确折叠而形成包涵体^[27]。此外, 目的蛋白的分子量越大, 二硫键之间的配对和折叠越容易出错^[28]。本研究为了提高蛋白可溶性表达的机率, 在分析 NLRX1 抗原性基础上选取 N 端具有良好的亲水性、抗原指数以及表面可及性的 1~164 氨基酸肽段进行截短表达, 经 37°C 诱导获得了可溶性表达, 为应用亲和层析法大量纯化活性蛋白奠定基础。据报道, IPTG 对细菌有毒性, 一定范围内

IPTG 浓度会影响细菌的生长和蛋白质的表达^[29]。本研究分别以 0.1~1.25 mmol·L⁻¹ IPTG 诱导 NLRX1 融合蛋白的表达, 发现以 0.5 mmol·L⁻¹ IPTG 可诱导相对较高的 NLRX1 全蛋白和截短蛋白的表达水平。对重组蛋白进行纯化通常采用 Ni²⁺-NTA 亲和层析柱和分子筛方法^[30-31], 本研究中采用切胶后结合微量离心柱方法纯化重组蛋白, 方法简便易操作, 且取得了较好的纯化效果。

尽管较单克隆抗体而言, 多克隆抗体的特异性相对较差, 但因其具有成本低、周期短的特点, 且目前亲和层析等纯化方法比较成熟, 可提高其抗体的特异性, 因此被广泛应用^[32], 本研究应用截短蛋白 rNLRX1-part 作为抗原制备了多克隆抗体, 分别应用原核表达和真核表达的 NLRX1 蛋白与制备的抗体进行 western blot 检测, 两者相辅相成, 明确了抗 NLRX1 多克隆抗体具有良好的特异性, 为后续进行鸡 NLRX1 的生物学功能等方面的研究奠定了基础。

参考文献:

- [1] 周荣云, 何珊, 朱美芹, 等. 天然免疫 DNA 模式识别受体的抗感染研究进展[J]. 中国动物传染病学报, 2018, 26(5): 1-9.
- [2] 金伯泉. NLR: 固有免疫模式识别受体中的一个重要家族[J]. 现代免疫学, 2006, 26(3): 177-182.
- [3] 庞红艳, 刘耕陶. 固有免疫模式识别受体与药物研究

- [J]. 中国新药杂志, 2008, 17(5): 353-358.
- [4] 何邵平, 贺建华, 陈佳亿, 等. 固有免疫相关模式识别受体研究进展[J]. 动物营养学报, 2017, 29(11): 3844-3851.
- [5] LING A, SOARES F, CROITORU D O, et al. Post-transcriptional inhibition of luciferase reporter assays by the nod-like receptor proteins NLRX1 and NLR3[J]. *J Biol Chem*, 2012, 287(34): 28705-28716.
- [6] 毛旭明, 孙英杰, 武玮, 等. 线粒体调控先天性免疫机制研究进展[J]. 中国动物传染病学报, 2019, 27(1): 104-109.
- [7] 章旭之, 马毅. NOD 样受体在免疫耐受中的作用[J]. 中国免疫学杂志, 2017, 33(6): 930-933.
- [8] HONG M S, YOON S I, WILSON I A. Structure and functional characterization of the RNA-binding element of the NLRX1 innate immune modulator[J]. *Immunity*, 2012, 36(3): 337-347.
- [9] GHOSH R, ROY S, FRANCO S. PARP1 depletion induces RIG-I-dependent signaling in human cancer cells[J]. *PLoS One*, 2018, 13(3): e0194611.
- [10] TATTOLI I, CARNEIRO L A, JÉHANNO M, et al. NLRX1 is a mitochondrial NOD-like receptor that amplifies NF- κ B and JNK pathways by inducing reactive oxygen species production[J]. *EMBO Rep*, 2008, 9(3): 293-300.
- [11] 郁茜, 李楠. NLRX1: 过度炎症反应的负向调控因子[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2011, 18(6): 640.
- [12] SONG X J, LI W Z, XIE X C, et al. NLRX1 of black carp suppresses MAVS-mediated antiviral signaling through its NACHT domain[J]. *Dev Comp Immunol*, 2019, 96: 68-77.
- [13] THEUS M H, BRICKLER T, MEZA A L, et al. Loss of NLRX1 exacerbates neural tissue damage and NF- κ B signaling following brain injury[J]. *J Immunol*, 2017, 199(10): 3547-3558.
- [14] HUNG S C, HUANG P R, ALMEIDA-DA-SILVA C L C, et al. NLRX1 modulates differentially NLRP3 inflammasome activation and NF- κ B signaling during *Fusobacterium nucleatum* infection[J]. *Microbes Infect*, 2018, 20(9/10): 615-625.
- [15] HOLL E K, ALLEN I C, MARTINEZ J. Holding the inflammatory system in check: TLRs and NLRs[J]. *Mediat Inflamm*, 2016, 2016: 1-2.
- [16] TIAN J, JIAO X, WANG X N, et al. Novel effect of methionine enkephalin against influenza A virus infection through inhibiting TLR7-MyD88-TRAF6-NF- κ B p65 signaling pathway[J]. *Int Immunopharmacol*, 2018, 55: 38-48.
- [17] 杨倩倩, 孙高英, 曹智新, 等. NLRX1 在 C57BL/6 小鼠耳蜗毛细胞内的表达[J]. 山东大学学报(医学版), 2016, 54(1): 11-16.
- [18] 东方. TLR2 固有免疫通路基因多态性与 2 型糖尿病血管病变遗传易感性的关联研究[D]. 广州: 暨南大学, 2015.
- [19] KOBLANSKY A A, TRUAX A D, LIU R R, et al. The innate immune receptor NLRX1 functions as a tumor suppressor by reducing colon tumorigenesis and key tumor-promoting signals[J]. *Cell Rep*, 2016, 14(11): 2562-2575.
- [20] 李金蕊. 鲢鱼 NLR 家族的基因组水平研究和表达模式分析[D]. 舟山: 浙江海洋大学, 2016.
- [21] CHU P F, HE L B, LI Y Y, et al. Molecular cloning and functional characterisation of NLRX1 in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*)[J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2018, 81: 276-283.
- [22] 党赢, 王小燕, 师建平, 等. NLRX1 相关机制研究进展[J]. 陕西医学杂志, 2018, 47(9): 1222-1225.
- [23] 韩学波, 许崇波, 曾瑾. 大肠杆菌中外源基因的表达调节[J]. 生物技术通讯, 2006, 17(3): 418-420.
- [24] 卢晟晔, 王丽颖. 大肠杆菌中外源蛋白高效表达的影响因素及策略研究的新进展[J]. 中国实验诊断学, 2006, 10(9): 1100-1103.
- [25] 陈德鑫, 李雯雯, 李思斌, 等. 烟草 NteIF2 α 的原核表达、纯化及多克隆抗体制备和应用[J]. 农业生物技术学报, 2017, 25(1): 50-57.
- [26] GUPTA P, SAHAI V, BHATNAGAR R. Enhanced expression of the recombinant lethal factor of *Bacillus anthracis* by fed-batch culture[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001, 285(4): 1025-1033.
- [27] LI Z Y, LIU C P, ZHU L Q, et al. The chaperone activity of trigger factor is distinct from its isomerase activity during co-expression with adenylate kinase in *Escherichia coli*[J]. *FEBS Lett*, 2001, 506(2): 108-112.
- [28] 傅生芳, 朱传凤, 姜英, 等. 人呼吸道合胞病毒截短 F1 重组蛋白包涵体的制备、纯化和复性[J]. 微生物学免疫学进展, 2015, 43(3): 21-25.
- [29] UTHAILAK N, MAHAMAD P, CHITTAVANICH P, et al. Molecular cloning, structural modeling and the production of soluble triple-mutated diphtheria toxoid (K51E/G52E/E148K) Co-expressed with molecular chaperones in recombinant *Escherichia coli*[J]. *Mol Biotechnol*, 2017, 59(4/5): 117-127.
- [30] 郝英辰, 龙月, 郭豪, 等. 烟草 NtGCN2 的原核表达、纯化及多克隆抗体制备[J]. 农业生物技术学报, 2019, 27(1): 170-179.
- [31] 万润, 华敏, 龙立书, 等. H6N6 亚型禽流感病毒 N6 基因的原核表达与多克隆抗体制备[J]. 中国畜牧兽医, 2018, 45(11): 2989-2995.
- [32] 刘晓玲, 王振东, 孙涵甜, 等. 栉孔扇贝 Foxl2 蛋白的原核表达、纯化及多克隆抗体制备与检测[J]. 海洋渔业, 2018, 40(4): 447-453.