

专论与综述



布鲁氏菌 LS 蛋白(BLS)研究进展

孙佳丽^{1,2} 彭小微¹ 孙石静¹ 袁维峰³ 丁家波^{*1}

1 中国兽医药品监察所国家动物布鲁氏菌病参考实验室 北京 100081

2 吉林农业大学动物科学技术学院 吉林 长春 130118

3 中国农业科学院北京畜牧兽医研究所 北京 100193

摘要: LS 蛋白(2,4-二氧四氢蝶啶合成酶)广泛存在于动物、植物和微生物中,是催化核黄素生物合成的重要合成酶之一。该酶最显著的特征之一是其在不同物种中具有空间结构差异。布鲁氏菌 LS 蛋白(BLS)是布鲁氏菌的一种优势抗原,是由两个五聚体组成的结构稳定的十聚体。BLS 是光滑型和粗糙型布鲁氏菌所共有的抗原,用于布鲁氏菌病的诊断可提高其敏感性;BLS 可以激发抗原特异性细胞应答产生 IFN- γ , 从而对宿主产生保护力,是一种理想的布鲁氏菌病亚单位疫苗的候选蛋白。本文综述了 BLS 的结构特性及应用研究进展,旨在为 BLS 的深入研究和开发应用提供参考。

关键词: 布鲁氏菌, BLS, 疫苗, 应用

Research progress in *Brucella* lumazine synthase (BLS)SUN Jia-Li^{1,2} PENG Xiao-Wei¹ SUN Shi-Jing¹ YUAN Wei-Feng³ DING Jia-Bo^{*1}

1 National Reference Laboratory for Animal Brucellosis, China Institute of Veterinary Drug Control, Beijing 100081, China

2 College of Animal Science and Technology, Jilin Agricultural University, Changchun, Jilin 130118, China

3 Institute of Animal Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China

Abstract: Lumazine synthase (LS) is widely distributed in animals, plants and microbes, and is one of the important synthesizing enzymes that catalyze the biosynthesis of riboflavin. One of the most remarkable characteristics of LS is that it has different spatial structures in different species. *Brucella* lumazine synthase (BLS), which has a stable structure of decamer consisting of two pentamers, is a dominant antigen of *Brucella*. BLS is a common antigen existing in both smooth type and rough type *Brucella*, and it can improve the sensitivity of diagnostic assays for Brucellosis; BLS is capable of stimulating antigen-specific cellular responses, resulting in production of IFN- γ , which consequently provides protection for the host. Therefore, BLS is an ideal candidate protein for development of subunit vaccine against Brucellosis. In this paper, the structural features of BLS protein and its application are reviewed, aiming at providing reference for in-depth studies and application of BLS.

Keywords: *Brucella*, *Brucella* lumazine synthase (BLS), Vaccine, Application

Foundation items: National Key Research and Development Program of China (2017YFD0500905, 2016YFD0500902)

***Corresponding author:** Tel: 86-10-62155327; E-mail: dingjiabo@126.com

Received: 31-08-2018; **Accepted:** 29-12-2018; **Published online:** 20-02-2019

基金项目: 国家重点研发计划(2017YFD0500905, 2016YFD0500902)

***通信作者:** Tel: 010-62155327; E-mail: dingjiabo@126.com

收稿日期: 2018-08-31; **接受日期:** 2018-12-29; **网络首发日期:** 2019-02-20

布鲁氏菌是一种革兰氏阴性胞内寄生菌,主要感染牛、羊、猪等家畜和多种野生动物。布鲁氏菌感染后主要引起雌性动物流产和雄性动物不育等症状,感染人则会导致波浪热、虚弱、乏力、关节疼痛等症状,严重者会影响劳动能力和生育能力。人类主要是通过接触感染的动物或者摄入被污染的食物以及实验室接触等方式感染。1993年 Goldbaum 等从牛型布鲁氏菌中提取出一种 18 kD 的胞质蛋白^[1],之后证明其是一种 2,4-二氧四氢蝶啶合成酶(Lumazine synthase, LS),即布鲁氏菌 LS 蛋白(BLS)^[2]。目前对 BLS 的研究多集中在其结构与功能的关系上。本文就布鲁氏菌 BLS 的研究进展作一综述,以期对 BLS 后续的研究和应用提供参考。

1 BLS 的结构及其特点

2,4-二氧四氢蝶啶合成酶广泛存在于动植物及微生物中,为催化核黄素生物合成途径倒数第二步的酶。这种酶最显著的特征之一是在不同物种中具有空间结构差异:其分为五聚体结构和二十面体结构,它们由几乎相同的结构单体单元组成。五聚体结构由 5 个 18 kD 单体组成,每个单体与相邻单体充分接触。二十面体结构由 60 个 LS 单体组成,它们排列成 12 个五聚体,具有二十面体 532 对称性的衣壳。目前研究过的所有 LS 的活性位点都位于五聚模块中相邻亚基之间的界面处^[3-4]。

布鲁氏菌属中具有 LS 酶活性的蛋白有 2 个,分别为 RibH1 和 RibH2。流产布鲁氏菌染色体 I 上 *ribH1* 基因编码产物的结构为上面提到的五聚体,因此推测 *ribH1* 是布鲁氏菌属中的功能性 LS。位于染色体 II 上的 *ribH2* 基因编码的蛋白,其空间结构不同于上面提到的五聚体结构和二十面体结构,催化活性较低,是一种毒性因子^[5-8]。它的空间结构是由 2 个稳定的五聚体结构组成的十聚体,由 10 个 18 kD 的小亚基紧密结合而成。由于十聚体结构高度稳定,使其热稳定性增高,

化学性质更加稳定,这一特性赋予它超强的免疫力^[4]。而且,它可以在不同的条件下可逆地展开和重新折叠。其 10 个 N-末端有暴露性和灵活性,因此可在其 N 端插入外源肽或蛋白质而不破坏其折叠^[9]。本文所综述的即为 *ribH2* 基因编码的 BLS 蛋白。

2 BLS 的应用

2.1 用于布鲁氏菌病的诊断

由于病原学方法的敏感性较低,通常首选血清学试验来进行人和动物布鲁氏菌病的诊断。根据脂多糖(Lipopolysaccharides, LPS)分子的完整性,将布鲁氏菌分为粗糙型和光滑型。传统血清学技术(即凝集试验)的一个主要缺陷是,用于诊断由光滑型布鲁氏菌引起感染的优势抗原不适于诊断粗糙型所引起的感染,反之亦然。因此,研究布鲁氏菌共有的抗原对于诊断具有重要的意义。近年来已经研究了许多这样的抗原,BLS 即为其中一种。Cassataro 等^[10]分别包被布鲁氏菌 CP24、BLS 以及 CP24 和 BLS 两种蛋白,建立 ELISA 方法对分别由光滑型和粗糙型的布鲁氏菌感染的人和犬的血清进行检测。结果显示,包被 CP24 和 BLS 的 ELISA 方法比单独包被 CP24 或 BLS 更加敏感,并且与包被细胞质蛋白的 ELISA 方法一样敏感。这与文献^[11-12]报道的结合 BLS 抗原可以用于布鲁氏菌病的诊断结果是一致的。鉴于 LS 蛋白在动植物和微生物中广泛存在,我们对牛种布鲁氏菌 2308 的 BLS 的氨基酸序列进行了同源比对,结果表明该蛋白与人苍白杆菌、多种根瘤菌和农杆菌的 LS 蛋白具有较高的一致性(Identities>60%)。因此,布鲁氏菌的 LS 作为诊断抗原时是否会与其他病原的 LS 蛋白产生的抗体发生交叉反应,仍需进一步实验确定。

2.2 用于布鲁氏菌病亚单位疫苗的研发

2.2.1 利用 BLS 的免疫原性制备亚单位疫苗

免疫 BLS 可以激发机体抗原特异性细胞应答产生 IFN- γ ,从而对宿主产生保护力。因此 BLS

是一种比较理想的布鲁氏菌病亚单位疫苗的候选者^[13]。Velikovsky 等将携带 BLS 基因的质粒 DNA (pcDNA-BLS)注射到 BALB/c 小鼠中,可刺激机体产生抗体和 Th1 细胞介导的免疫应答,并能有效地对抗布鲁氏菌的攻击,而将外源重组表达的 BLS (rBLS)免疫小鼠只表现较强的体液免疫而缺乏特异性细胞反应,因此无法保护小鼠免受布鲁氏菌的攻击^[14]。如将 rBLS 连同佐剂 (IFA、AI 和 MPA)一起免疫小鼠后,均可诱导脾细胞产生高水平的 IL-2、IFN- γ 、IL-4 和 IL-10,并可抵御布鲁氏菌的感染,而这种作用与使用的佐剂类别无关^[13]。

2.2.2 利用 BLS 作为载体制备亚单位疫苗

BLS 具有高度稳定的十聚体结构,有很好的免疫原性。这种特征类似于大肠杆菌不耐热肠毒素 (EtxB)和霍乱毒素 (CtxB)的 β 亚基的特征^[3]。这两种毒素在体内组装成异常稳定的同型五聚体复合物,在多种蛋白质变性条件下仍可保持四级结构^[3]。这种极强的稳定性以及 EtxB 和 CtxB 五聚体的固有免疫原性使它们作为疫苗运载工具成为可能。值得注意的是, BLS 的热稳定性优于 EtxB (T_m 值为 84 °C)和 CtxB (T_m 值为 75 °C)^[3]。因此, BLS 是一种很有价值的抗原以及表位聚合物载体,是开发亚单位疫苗的潜在候选蛋白,可以和布鲁氏菌蛋白一起制作亚单位疫苗。目前研究比较多的是布鲁氏菌 rOmp31-BLS 蛋白疫苗和布鲁氏菌 BLS-L7/L12 重组亚单位疫苗。

单生苗等^[15]发现重组 Omp31-BLS 免疫家兔后可增强 Omp31 的免疫原性,刺激家兔产生比单独免疫 Omp31 蛋白更高的抗体滴度。此外,还有一部分研究也证明了 Omp31-BLS 重组蛋白作为布鲁氏菌病疫苗的可能性^[16-18]。

周丽丽^[19]制备了 BLS、L7/L12、BLS-L7/L12 重组蛋白疫苗和重组 DNA 疫苗,以及减毒沙门氏菌为载体的 BLS-L7/L12 重组蛋白疫苗和重组 DNA 疫苗,分别免疫 BALB/c 小鼠,ELISA 测定抗体水平结果显示,各实验组均能诱导产生特异

性抗体。布鲁氏菌 544A 强毒株对免疫 BALB/c 小鼠攻毒试验证明,所构建的疫苗株都具有一定的免疫保护性,双价疫苗优于单价疫苗,DNA 疫苗优于蛋白疫苗,减毒沙门氏菌活载体双价基因疫苗略优于 DNA 疫苗。此研究证实了布鲁氏菌 L7/L12 和 BLS 都有一定的免疫原性和免疫保护性,BLS-L7/L12 双价融合疫苗免疫原性比单价疫苗好,说明 BLS 可加强 L7/L12 的免疫刺激作用。还有研究以布鲁氏菌 L7/L12-BLS 融合蛋白为抗原免疫家兔,诱导产生了高水平的 IgG,也证明了 L7/L12-BLS 融合蛋白具有免疫保护力^[20]。

2.3 用于其他病原疫苗的研究

BLS 不仅可以用于制备布鲁氏菌病亚单位疫苗,还可以用于制备其他细菌病、病毒病或者寄生虫疾病的亚单位疫苗。

2.3.1 细菌疫苗的研究

目前以 BLS 作为载体的细菌疫苗研究较多的主要是产志贺毒素大肠杆菌疫苗,所选用的抗原一般为志贺毒素 2 的 B 亚基 (Stx2B)。

一些研究表明,在交配前用以 BLS 为载体构建的新型免疫原 BLS-Stx2B 免疫 BALB/c 雌性小鼠,免疫后在雌鼠的乳汁、雌鼠和幼鼠的血清和粪便提取物中,Stx2B 的抗体效价都较高,且幼鼠在产后 8-90 d 内可抵抗致死剂量的 Stx2 注射^[21-22]。另外,断奶期幼鼠对口服产生 Stx2 的 EHEC 菌株攻毒具有抵抗力,并且没有产生与 Stx2 毒性相关的任何症状^[22]。Martorelli 等^[23]和 Mejias 等^[24]分别用 BLS-Stx2B 免疫 4 月龄犊牛和小鼠,均诱导产生了特异性抗体。这些研究证明了 BLS-Stx2B 作为疫苗的可行性。

2.3.2 病毒疫苗的研究

以 BLS 为载体的病毒疫苗研究较多的主要是轮状病毒疫苗,人类甲型流感疫苗也有研究。

Bellido 等^[25]将 C 486 牛轮状病毒 (BRV) VP8 核心蛋白 (VP8d)与 BLS 融合免疫仔鼠,希望能够增强机体对 BRV VP8 的免疫应答,结果表明,BLS-VP8 免疫仔鼠对 C 486 BRV 攻击有 97.5%-100%

的保护作用。作者推测可能是因为 BLS 支架是一种有效的抗原传递系统,它使得 BLS-VP8d 嵌合蛋白折叠良好、稳定,从而增强机体对 BRV 的抗体应答。还有研究将 BLS-VP8d 在烟草叶绿体中表达,该融合蛋白在植物发育的所有阶段保持可溶性和稳定表达,即使在衰老或冻干的叶中也是如此,从新鲜和冻干的叶中提取的未纯化的可溶性蛋白能够在产蛋母鸡模型中诱导特异性中和 IgY 抗体^[26]。这项工作提示 BLS 作为一种基于植物的高度免疫原性注射剂甚至口服 VP8 亚单位疫苗是可行的。

Alvarez 等^[27]将人类甲型流感病毒株中蛋白基质 2 (M2e)的外显子结构域的 4 个串联拷贝与 BLS 融合,并用其免疫小鼠刺激产生了明显的体液免疫反应,用流感病毒攻击小鼠的存活率为 100%,这为流感疫苗的研制提供了新的思路。

2.3.3 寄生虫疫苗的研究

Fragoso 等^[28]和 Cruz-Revilla 等^[29]分别将猪带绦虫保护肽 GK-1 和 KETc 1 与 BLS 融合制成亚单位疫苗口服免疫小鼠,都取得了很好的免疫效果,这为寄生虫口服疫苗的研制打下了基础。

2.4 抗肿瘤相关研究

BLS 抗肿瘤作用的相关研究目前正处于初级阶段。有文献表明,BLS 信号通过 Toll 样受体 4 (TLR4)增加共刺激分子水平和促炎细胞因子的分泌,引起特异性 CD8 淋巴细胞的快速增殖和活化^[30]。由于目前许多能够加强免疫反应的生物因子具有毒性作用,所以能够促使树突细胞的激活,加强 Th1 类型的免疫反应和抗原呈递,诱导抗原特异性细胞毒性的 TLR 激动剂在肿瘤疫苗研究中发挥着重要作用。而 BLS 的这种特性表明,其可以作为抗肿瘤疫苗一个有效的佐剂成分。

Rossi 等^[31]在一项研究中评估了 BLS 作为预防性疫苗和治疗药物的有效性。在评估其作为预防性疫苗的有效性实验中,用 BLS 或 BLS-OVA 免疫 C57BL/6 小鼠,35 d 后皮下接种 B16-OVA 黑色素瘤。可以发现,BLS 或 BLS-OVA 对肿瘤的生

长有明显的抑制作用,50%免疫 BLS 最高剂量组的小鼠没有可见的肿瘤而 TLR4 缺乏的小鼠没有观察到这种效应。治疗实验中小鼠接种 B16 细胞 2 d 后注射 BLS 或 BLS-OVA,两种治疗方法都能显著延缓肿瘤细胞生长,提高存活率。此外,治疗实验中 BLS 和 BLS-OVA 刺激也对 TLR4 缺陷小鼠有效。为了研究 BLS 对肿瘤细胞是否有直接影响,在体外使用一定剂量的 BLS 对 B16 细胞进行预孵育处理,48 h 后将细胞接种小鼠,结果显示 120 d 后小鼠存活率增高,肿瘤细胞的生长受到抑制。在将 B16 细胞与 BLS 体外预孵育之前,将 TLR4/MD2 单克隆抗体添加到细胞培养物中,结果表明 BLS 产生的抗肿瘤作用被抑制,证明了 BLS 通过 TLR4 抑制体内肿瘤细胞的生长。上述实验为肿瘤治疗提供了新的思路。

本实验室在前期工作中,利用高通量测序技术研究致病菌与宿主互作关系过程时发现,小鼠巨噬细胞在感染布鲁氏菌后,与癌症转录失调信号通路相关基因的转录水平发生显著变化,提示布鲁氏菌感染可能与肿瘤细胞的发生相关联^[32]。此后,我们使用布鲁氏菌感染 1 周前注射过黑色素瘤 B16 细胞的小鼠,发现布鲁氏菌在小鼠体内可抑制肿瘤细胞的生长(待发表资料)。为了进一步验证 BLS 是否在布鲁氏菌抗肿瘤效应中发挥主要作用,我们构建了 BLS 基因缺失株和互补株,用以比较 BLS 布鲁氏菌基因缺失株和野生株对肿瘤细胞的抑制作用。与此同时,我们构建 BLS 蛋白大肠杆菌表达载体,对 BLS 蛋白进行表达纯化,并免疫小鼠制备单克隆抗体,检测 BLS 多克隆抗体注射入小鼠体内后是否会拮抗布鲁氏菌的抗肿瘤效应(实验中进行)。

3 小结与展望

尽管基于 BLS 在布鲁氏菌病的诊断试剂和亚单位疫苗方面的研究还处于实验室研究阶段,对 BLS 抗肿瘤作用的研究才刚刚起步,但 BLS 自身由于具有极强的稳定性和较高的免疫原性等特点,

无疑为建立布鲁氏菌病诊断方法、研发疫苗载体甚至是治疗肿瘤性疾病提供了一种新的思路。

REFERENCES

- [1] Goldbaum FA, Leoni J, Wallach JC, et al. Characterization of an 18-kilodalton *Brucella* cytoplasmic protein which appears to be a serological marker of active infection of both human and bovine brucellosis[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 1993, 31(8): 2141-2145
- [2] Goldbaum FA, Velikovsky CA, Baldi PC, et al. The 18-kDa cytoplasmic protein of *Brucella* species—an antigen useful for diagnosis—is a lumazine synthase[J]. *Journal of Medical Microbiology*, 1999, 48(9): 833-839
- [3] Zylberman V, Craig PO, Klinke S, et al. High order quaternary arrangement confers increased structural stability to *Brucella* sp. lumazine synthase[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2004, 279(9): 8093-8101
- [4] Wu YK. Expression and antigenic study of a fusion protein originated from *Brucella* ribosomal protein L7/L12 and BLS[D]. Baotou: Master's Thesis of Inner Mongolia University of Science & Technology, 2014 (in Chinese)
吴亚坤. 布鲁氏菌核糖体蛋白 L7/L12 与 BLS 蛋白的融合表达及免疫原性研究[D]. 包头: 内蒙古科技大学硕士学位论文, 2014
- [5] Bonomi HR, Marchesini MI, Klinke S, et al. An atypical riboflavin pathway is essential for *Brucella abortus* virulence[J]. *PLoS One*, 2010, 5(2): e9435
- [6] Zylberman V, Klinke S, Haase I, et al. Evolution of vitamin B₂ biosynthesis: 6,7-Dimethyl-8-Ribityllumazine synthases of *Brucella*[J]. *Journal of Bacteriology*, 2006, 188(17): 6135-6142
- [7] Klinke S, Zylberman V, Vega DR, et al. Crystallographic studies on decameric *Brucella* spp. Lumazine synthase: a novel quaternary arrangement evolved for a new function?[J]. *Journal of Molecular Biology*, 2005, 353(1): 124-137
- [8] Braden BC, Velikovsky CA, Cauerhff AA, et al. Divergence in macromolecular assembly: X-ray crystallographic structure analysis of lumazine synthase from *Brucella abortus*[J]. *Journal of Molecular Biology*, 2000, 297(5): 1031-1036
- [9] Hiriart Y, Rossi AH, Biedma ME, et al. Characterization of structural and immunological properties of a fusion protein between flagellin from *Salmonella* and lumazine synthase from *Brucella*[J]. *Protein Science*, 2017, 26(5): 1049-1059
- [10] Cassataro J, Delpino MV, Velikovsky CA, et al. Diagnostic usefulness of antibodies against ribosome recycling factor from *Brucella melitensis* in human or canine brucellosis[J]. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 2002, 9(2): 366-369
- [11] Wanke MM, Delpino MV, Baldi PC. Comparative performance of tests using cytosolic or outer membrane antigens of *Brucella* for the serodiagnosis of canine brucellosis[J]. *Veterinary Microbiology*, 2002, 88(4): 367-375
- [12] Thepsuriyanont P, Intarapuk A, Chanket P, et al. ELISA for brucellosis detection based on three *Brucella* recombinant proteins[J]. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, 2014, 45(1): 130-141
- [13] Velikovsky CA, Goldbaum FA, Cassataro J, et al. *Brucella* lumazine synthase elicits a mixed Th1-Th2 immune response and reduces infection in mice challenged with *Brucella abortus* 544 independently of the adjuvant formulation used[J]. *Infection and Immunity*, 2003, 71(10): 5750-5755
- [14] Velikovsky CA, Cassataro J, Giambartolomei GH, et al. A DNA vaccine encoding lumazine synthase from *Brucella abortus* induces protective immunity in BALB/c mice[J]. *Infection and Immunity*, 2002, 70(5): 2507-2511
- [15] Shan SM, Wang JY, Du ZQ. The enhancement of immunostimulatory ability of antigen Omp31 by *Brucella* lumazine synthase[J]. *Science & Technology Vision*, 2014(6): 112 (in Chinese)
单生苗, 王建英, 杜志强. 布鲁菌 BLS 分子增强抗原分子 Omp31 免疫刺激能力的研究[J]. *科技视界*, 2014(6): 112
- [16] Estein SM, Fiorentino MA, Paolicchi FA, et al. The polymeric antigen BLSOmp31 confers protection against *Brucella ovis* infection in rams[J]. *Vaccine*, 2009, 27(48): 6704-6711
- [17] Cassataro J, Pasquevich KA, Estein SM, et al. A recombinant subunit vaccine based on the insertion of 27 amino acids from Omp31 to the N-terminus of BLS induced a similar degree of protection against *B. ovis* than *Rev.1* vaccination[J]. *Vaccine*, 2007, 25(22): 4437-4446
- [18] Du ZQ, Wang JY. A novel lumazine synthase molecule from *Brucella* significantly promotes the immune-stimulation effects of antigenic protein[J]. *Genetics and Molecular Research*, 2015, 14(4): 13084-13095
- [19] Zhou LL. Preliminary study on brucella BLS-L7/L12 recombinant subunit vaccine[D]. Beijing: Master's Thesis of Academy of Military Medical Sciences, 2007 (in Chinese)
周丽丽. 布鲁氏菌 BLS-L7/L12 重组亚单位疫苗的初步研究[D]. 北京: 中国人民解放军军事医学科学院硕士学位论文, 2007
- [20] Du ZQ, Li X, Wang JY. Immunogenicity analysis of a novel subunit vaccine candidate molecule—recombinant L7/L12 ribosomal protein of *Brucella suis*[J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2016, 179(8): 1445-1455
- [21] Mejias MP, Cabrera G, Fernández-Brando RJ, et al. Protection of mice against Shiga toxin 2 (Stx2)-associated damage by maternal immunization with a *Brucella* Lumazine synthase-Stx2 B subunit chimera[J]. *Infection & Immunity*, 2014, 82(4): 1491-1499
- [22] Sacerdoti F, Mejías MP, Bruballa AC, et al. Immunization with BLS-Stx2B chimera totally protects dams from early pregnancy loss induced by Shiga toxin type 2 (Stx2) and confers anti-Stx2 immunity to the offspring[J]. *Vaccine*, 2016, 34(39): 4732-4737
- [23] Martorelli L, Garbaccio S, Vilte DA, et al. Immune response in calves vaccinated with type three secretion system antigens and Shiga toxin 2B subunit of *Escherichia coli* O157:H7[J]. *PLoS One*, 2017, 12(1): e0169422
- [24] Mejias MP, Ghersi G, Craig PO, et al. Immunization with a

- chimera consisting of the B subunit of Shiga toxin type 2 and *Brucella* lumazine synthase confers total protection against Shiga toxins in mice[J]. *The Journal of Immunology*, 2013, 191(5): 2403-2411
- [25] Bellido D, Craig PO, Mozgova MV, et al. *Brucella* spp. lumazine synthase as a bovine rotavirus antigen delivery system[J]. *Vaccine*, 2009, 27(1): 136-145
- [26] Alfano EF, Lentz EM, Bellido D, et al. Expression of the multimeric and highly immunogenic *Brucella* spp. Lumazine synthase fused to bovine rotavirus VP8d as a scaffold for antigen production in tobacco chloroplasts[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2015, 6: 1170
- [27] Alvarez P, Zylberman V, Ghera G, et al. Tandem repeats of the extracellular domain of Matrix 2 influenza protein exposed in *Brucella* lumazine synthase decameric carrier molecule induce protection in mice[J]. *Vaccine*, 2013, 31(5): 806-812
- [28] Fragoso G, Esquivel-Guadarrama F, Santana MA, et al. Heterologous prime-boost oral immunization with GK-1 peptide from *Taenia crassiceps* cysticerci induces protective immunity[J]. *Clinical and Vaccine Immunology*, 2011, 18(7): 1067-1076
- [29] Cruz-Revilla C, Toledo A, Rosas G, et al. Effective protection against experimental *Taenia solium* tapeworm infection in hamsters by primo-infection and by vaccination with recombinant or synthetic heterologous antigens[J]. *Journal of Parasitology*, 2006, 92(4): 864-868
- [30] Berguer PM, Alzogaray VA, Rossi AH, et al. A polymeric protein induces specific cytotoxicity in a TLR4 dependent manner in the absence of adjuvants[J]. *PLoS One*, 2012, 7(9): e45705
- [31] Rossi AH, Farias A, Fernández JE, et al. *Brucella* spp. Lumazine synthase induces a TLR4-mediated protective response against B16 melanoma in mice[J]. *PLoS One*, 2015, 10(5): e0126827
- [32] Jiang H, Dong H, Peng XW, et al. Transcriptome analysis of gene expression profiling of infected macrophages between *Brucella suis* 1330 and live attenuated vaccine strain S2 displays mechanistic implication for regulation of virulence[J]. *Microbial Pathogenesis*, 2018, 119: 241-247

稿件书写规范

高校教改纵横栏目简介及撰稿要求

“高校教改纵横”栏目，是中国微生物学会主办的科技期刊中唯一的教学类栏目，也是中国自然科学核心期刊中为数不多的教学栏目。该栏目专为微生物学及其相关学科领域高校教师开辟，一方面为高校微生物学科的教师提供一个发表论文的平台，同时微生物关联学科的一部分确实优秀的论文也可以在此发表，是微生物学及相关领域教学研究、交流、提高的园地。

本栏目的文章有别于其他实验类研究报告，特色非常鲜明。要求作者来自教学第一线，撰写的稿件内容必须要有新意、要实用，不是泛泛地叙述教学设计与过程，而是确实有感而发，是教学工作中的创新体会，或者在教学中碰到的值得商榷的、可以与同行讨论的有价值的论题。在内容选材上应该有鲜明的特点和针对性，做到主题明确、重点突出、层次分明、语言流畅。教师的教学思路应与时俱进，注意将国内外新的科技成果和教学理念贯穿到教学之中，只有这样才能真正起到教与学的互动，促进高校生物学教学的发展，更多更好地培养出国家需要的高科技创新人才。这也是本栏目的目的所在。

同时，为了给全国生物学领域的教学工作者提供一个更广阔更高层次的交流平台，本栏目还开辟了“名课讲堂”版块，邀约相关生命科学领域，如微生物学、分子生物学、生物医学、传染病学、环境科学等的教学名师、知名科学家就教学和学生培养发表观点，推荐在教学改革、教学研究、引进先进教学手段或模式以及学生能力培养等方面有突出成绩的优秀论文，为高校教师以及硕士、博士研究生导师提供一个可资交流和学习平台，促进高校教学和人才培养水平的提高。

欢迎投稿！欢迎对本栏目多提宝贵意见！