

鼠伤寒沙门氏菌 回复突变试验中 通过吸光度值 测定菌液浓度的 方法研究

周 谔^{1,2}, 李 睿^{1,2}, 朱鸿雁^{1,2},
张志超^{1,2}, 方 静^{1,2}, 唐黎明^{1,2,*}

(1. 上海市食品药品检验所, 上海 201203;
2. 化妆品监测评价重点实验室, 上海 201203)

An optical density method for determining bacterial concentrations in the *Salmonella* *typhimurium* reverse mutation assay

ZHOU Su^{1,2}, LI Rui^{1,2}, ZHU Hongyan^{1,2},
ZHANG Zhichao^{1,2}, FANG Jing^{1,2}, TANG Liming^{1,2,*}
(1. Shanghai Institute for Food and Drug Control, Shanghai 201203;
2. National Medical Products Administration Key Laboratory for
Monitoring and Evaluation of Cosmetics, Shanghai 201203, China)

【摘要】目的：研究鼠伤寒沙门氏菌回复突变试验(Ames 试验)中菌液浓度和吸光度值 $[D(\lambda)]$ 值， λ 为波长数值]的关系，开发通过吸光度值测定菌液浓度的方法。**方法：**选取 Ames 试验中常用的营养缺陷型鼠伤寒沙门氏菌 TA102 作为试验菌株，严格控制菌液扩增条件，对比分析 540 和 600 nm 波长下菌液的吸光度值的高低以确定最佳测定波长，对比分析菌株扩增 0、2、4、6、8、10、12、14 h 后的菌液浓度以确定最佳扩增时间。在最佳测定波长和最佳扩增时间下，测定菌液吸光度值，并通过平板菌落计数法测定菌液浓度，获得菌液浓度和吸光度值的回归方程。**结果：**菌株 TA102 的最佳测定波长为 540 nm，最佳培养条件为 37 ℃、100 r/min、10 h，菌液浓度和 $D(540)$ 值的直线回归方程为 $y=4\times 10^9x$ [方程中 x 为 $D(540)$ 值； y 为菌液浓度，单位为个/mL]。**结论：**应用上述菌液浓度和 $D(540)$ 值的直线回归方程，可通过测定 $D(540)$ 值实时控制菌液达到要求浓度，从而确保试验菌液的质量。

【关键词】 Ames 试验；鼠伤寒沙门氏菌；菌液浓度；吸光度值

中图分类号：R991 文献标志码：A 文章编号：1004-616X(2020)01-0062-05 doi: 10.3969/j.issn.1004-616x.2020.01.012

【ABSTRACT】 OBJECTIVE: Relationships between bacterial concentrations and optical density $[D(\lambda)]$, λ is the wavelength value] in the *Salmonella typhimurium* reverse mutation assay (Ames test) was investigated and a method for the determination of bacterial concentrations using optical density was developed. **METHODS:** TA102, a frequently-used auxotrophic *Salmonella typhimurium* in the Ames test, was selected as the test strain. The amplification conditions of the bacterial solution were strictly controlled. The wavelength of 540 and 600 nm were compared to choose the optimal wavelength for the determination of optical density, and the time of 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12 and 14 hours were compared to choose the optimal times for amplification. Under the optimal wavelength and amplification time, the optical density of the bacterial solution was measured, and the bacterial concentration was obtained by plate colony-counting method. Then the regression equation between the bacterial concentration and the optical density was obtained. **RESULTS:** The optimal wavelength of strain TA102 was 540 nm, and the optimal culture condition was 100 r/min at 37 ℃ for 10 hours. The linear regression equation between the bacterial concentration and $D(540)$ value was $y=4\times 10^9x$ (in the equation, x was $D(540)$ value; y was bacterial concentration with the unit of /mL). **CONCLUSION:** Through the linear regression equation between the bacterial concentration and $D(540)$ value, real-time control of the bacterial solution to reach the required concentration was achieved by measuring $D(540)$ value, so as to ensure the quality of bacterial solution.

【KEY WORDS】 Ames test; *Salmonella typhimurium*; bacterial concentration; optical density

鼠伤寒沙门氏菌回复突变试验，也称作 Ames 试验，是一个广泛应用的通过细菌检测化合物突变性的试验，由 Bruce Ames 教授于 1970 年建立^[1]。Ames 试验，通常使用营养缺陷型的鼠伤寒沙门氏菌

收稿日期：2019-07-18；修订日期：2020-01-04
基金项目：国家药典委员会课题(遗传毒性杂质风险评估关键技术研究)
作者信息：周 谔，E-mail: hello-world-zhou@163.com。*通信作者，唐黎明，E-mail: tangliming@smda.sh.cn

(*Salmonella typhimurium*)。它可以检测 90% 的化学致癌物和非致癌物^[2]。由于此试验方便、快捷、检出率高, 因此已被各大实验室广泛应用。

Ames 试验中最主要的试验材料就是过夜培养的菌液, 菌液的浓度、活性对试验的结果影响很大。诸多试验规范和参考文献中列出了对菌液浓度的要求为活菌数 $(1\sim2)\times10^9$ 个/mL^[2-3], 虽然作出了这项规定, 但如何获得此浓度的菌液仍是一个问题, 有规范标示 37 ℃、100 r/min 培养 10 h 或 37 ℃静置 16 h 即可达到这一浓度^[4-5], 但是却没有任何试验证明, 且不同实验室菌液扩增的体系不同、旋转培养箱的型号不同也会导致不同的结果, 即使按上述条件操作也未必能获得上述浓度的菌液。由于菌液的浓度在一定的范围内和其吸光度值 $[D(\lambda)]$ 值, λ 为波长数值呈正比, 因此本试验中, 拟寻找出通过吸光度值测定鼠伤寒沙门氏菌回复突变试验中菌液浓度的方法。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种 营养缺陷型鼠伤寒沙门氏菌 TA102 购于美国 Moltox 公司。

1.1.2 试剂 2 号营养肉汤培养基购于英国 Oxoid 公司, 琼脂粉购于美国 BD 公司, 0.9% 生理盐水购于华裕(无锡)制药有限公司, L-组氨酸和 D-生物素购于美国 Sigma 公司。

1.1.3 仪器 LA2-6AX 生物安全柜购于新加坡 ESCO 公司, BD240 恒温培养箱购于德国 Binder 公司, Vortex-Genie2 漩涡混合器购于美国 Scientific Industries 公司, INNOVA 40R 恒温培养摇床购于德国 Eppendorf 公司, 数显恒温金属浴购于美国 Boekel 公司, CKX41SF 倒置显微镜购于德国 Leica 公司, Spectra Max Plus384 酶标分析仪购于美国 Molecular Devices 公司。

1.2 方法

1.2.1 测定波长的确定 取培养过夜的营养肉汤和菌液, 按每孔 100 μ L 加入 96 孔板, 每个样本加 8 个复孔, 用酶标仪测定 540 和 600 nm 波长下菌液的吸光度值, 选取吸光度值较大的波长数值。

1.2.2 菌液扩增时间 取顶层琼脂 500 mL, 加热融化后, 加入 50 mL 组氨酸-生物素, 混匀, 按每管 2 mL 分装, 再每管加入 0.5 mL PBS, 备用。

从-80 ℃冰箱中取出冻存的菌液, 37 ℃融化后, 按每 25 μ L 菌液加入 5 mL 营养肉汤培养基的比例扩增, 放入旋转培养箱, 于 37 ℃、100 r/min 条件下培

养, 选取接种后 0、2、4、6、8、10、12、14 h 共 8 个时间点, 取出菌液, 按每孔 100 μ L 加入 96 孔板, 每个时间点加 8 个复孔, 同时将培养相同时间的营养肉汤培养基作为本底对照, 用酶标仪于 540 nm 波长下测定 $D(540)$ 值。

同时取上述 8 个时间点的菌液, 进行平板菌落计数。取每个时间点的菌液 1 mL, 加入 9 mL 生理盐水, 混匀, 此稀释倍数为 1×10^1 倍; 再从此稀释倍数中吸取菌液 1 mL, 加入 9 mL 生理盐水, 混匀, 此稀释倍数为 1×10^2 倍; 按此 10 倍稀释的方法逐步稀释成 $1\times10^1\sim1\times10^{10}$ 倍共 10 个稀释倍数。每个稀释倍数取 0.1 mL 加入已准备好的顶层琼脂, 在振荡器上混匀, 浇入营养肉汤平板, 铺匀。每个稀释倍数重复制作 3 皿, 待冷凝后, 倒置放入培养箱, 24 h 后选取 $1\times10^1\sim1\times10^{10}$ 共 10 个个稀释倍数中平皿总菌落数在 30~300 范围内的平皿进行计数, 计算 3 皿菌落数均值, 将菌落数均值乘以稀释倍数, 得到各时间点的菌液浓度。菌液浓度的计算公式为: 菌液浓度(个/mL)=菌落数均值 $\times$ 进行菌落计数的稀释倍数 $\times10$ 。以菌液扩增时间为横坐标, 菌液浓度和 $D(540)$ 值为纵坐标, 绘制菌株生长曲线, 确定菌液最佳扩增时间。

1.2.3 菌液 $D(540)$ 值和平板菌落计数法测定菌液浓度 取顶层琼脂 500 mL, 加热融化后, 加入 50 mL 组氨酸-生物素, 混匀, 按每管 2 mL 分装, 再每管加入 0.5 mL PBS, 备用。

根据 1.2.2 中确定的最佳扩增时间扩增菌液, 取扩增好的菌液 5 mL, 加入 5 mL 营养肉汤, 混匀, 此稀释倍数为 1×2^1 倍; 再从此稀释倍数中吸取菌液 5 mL, 加入 5 mL 营养肉汤, 混匀, 此稀释倍数为 1×2^2 倍; 按此 2 倍稀释的方法逐步稀释成 $1\times2^1\sim1\times2^9$ 倍共 9 个稀释倍数; 未进行任何稀释的菌液记为 1×2^0 倍(见表 1)。

表 1 菌液 $D(540)$ 值测定和平板菌落计数时的稀释倍数

分组	稀释倍数(倍)	
	$D(540)$ 值测定	平板菌落计数
1	1×2^0	$1\times10^1\sim1\times10^{10}$
2	1×2^1	$1\times10^1\sim1\times10^{10}$
3	1×2^2	$1\times10^1\sim1\times10^{10}$
4	1×2^3	$1\times10^1\sim1\times10^{10}$
5	1×2^4	$1\times10^1\sim1\times10^{10}$
6	1×2^5	$1\times10^1\sim1\times10^{10}$
7	1×2^6	$1\times10^1\sim1\times10^{10}$
8	1×2^7	$1\times10^1\sim1\times10^{10}$
9	1×2^8	$1\times10^1\sim1\times10^{10}$
10	1×2^9	$1\times10^1\sim1\times10^{10}$



取 $1\times 2^0\sim 1\times 2^9$ 共10个稀释倍数的菌液,按每孔100 μL 加入96孔板,每个稀释倍数加8个复孔,同时将培养相同时间的营养肉汤培养基作为本底对照,测定 $D(540)$ 值。

取 $1\times 2^0\sim 1\times 2^9$ 共10个稀释倍数的菌液,按1.2.2中的方法进行平板菌落计数(见表1)。以各稀释倍数的 $D(540)$ 值为横坐标,菌液浓度为纵坐标,作散点图,求回归方程。

2 结果

2.1 吸光度值测定波长

培养过夜的营养肉汤和菌液在96孔板中分别测定了 $D(540)$ 值和 $D(600)$ 值,测得8个复孔的吸光度值见表2。在540 nm下菌液的吸光度值显著高于600 nm,因此选取吸光度值较大的540 nm进行测定。

表2 营养肉汤和菌液在不同测定波长下的吸光度值

复孔	营养肉汤		菌液	
	$D(540)$ 值	$D(600)$ 值*	$D(540)$ 值	$D(600)$ 值*
1	0.073	0.054	0.227	0.199
2	0.074	0.056	0.249	0.212
3	0.074	0.057	0.244	0.204
4	0.073	0.056	0.255	0.213
5	0.074	0.056	0.251	0.215
6	0.074	0.056	0.248	0.215
7	0.071	0.054	0.237	0.198
8	0.066	0.049	0.239	0.191

与 $D(540)$ 值比较, * $P<0.01$ 。

2.2 菌液扩增时间

根据不同扩增时间下的 $D(540)$ 值-菌液浓度绘制曲线见图1。菌液的吸光度值基本呈现出了逐渐上升的趋势,而菌液浓度在培养2 h后迅速升高,约10 h达到最高值,随后逐渐下降,因此最佳的扩增时间为培养10 h。

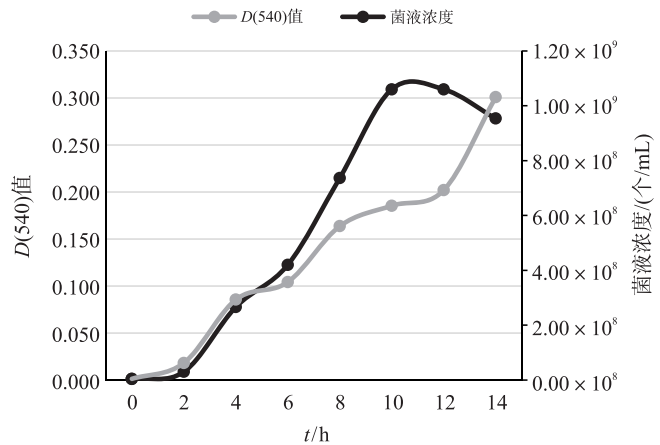


图1 不同扩增时间下的 $D(540)$ 值和菌液浓度

2.3 菌液 $D(540)$ 值和菌液浓度测定

菌液在 $1\times 2^0\sim 1\times 2^9$ 等10个稀释倍数测定了吸光度值,8个复孔的 $D(540)$ 值(扣除营养肉汤的本底值)结果见表3。

表3 菌液 $D(540)$ 值的测定

稀释倍数	$D(540)$ 值							
	1	2	3	4	5	6	7	8
1×2^0	0.191	0.191	0.198	0.195	0.188	0.201	0.196	0.193
1×2^1	0.109	0.110	0.108	0.103	0.111	0.108	0.114	0.102
1×2^2	0.059	0.051	0.057	0.057	0.055	0.059	0.060	0.055
1×2^3	0.029	0.030	0.028	0.030	0.030	0.027	0.027	0.024
1×2^4	0.016	0.016	0.018	0.016	0.016	0.016	0.017	0.013
1×2^5	0.008	0.008	0.009	0.008	0.008	0.009	0.009	0.006
1×2^6	0.007	0.007	0.006	0.005	0.006	0.006	0.006	0.002
1×2^7	0.005	0.005	0.004	0.004	0.004	0.004	0.003	-0.002
1×2^8	0.002	0.005	0.004	0.004	0.001	0.002	0.002	-0.003
1×2^9	0.001	0.003	0.002	0.002	0.001	0.003	0.001	-0.005

根据表3各复孔的 $D(540)$ 值分别计算 $1\times 2^0\sim 1\times 2^9$ 共10个稀释倍数的 $D(540)$ 均值,选取 $1\times 10^1\sim 1\times 10^{10}$ 共10个稀释倍数中平板菌落数在30~300范围内的稀释倍数计算出菌液浓度,结果见表4。

表4 菌液浓度的计算和选择

分组	测定 $D(540)$ 值的稀释倍数	$D(540)$ 均值	进行菌落计数的稀释倍数	菌落数	菌落数均值	菌液浓度/(个/mL)
1	1×2^0	0.194	1×10^6	77 82 66	75.0	7.50×10^8
2	1×2^1	0.108	1×10^6	39 40 50	43.0	4.30×10^8
3	1×2^2	0.056	1×10^5	238 219 219	225.3	2.25×10^8
4	1×2^3	0.028	1×10^5	104 113 113	110.0	1.10×10^8
5	1×2^4	0.016	1×10^5	65 57 64	62.0	6.20×10^7
6	1×2^5	0.008	1×10^4	256 240 289	261.7	2.62×10^7
7	1×2^6	0.005	1×10^4	157 162 148	155.7	1.56×10^7
8	1×2^7	0.003	1×10^4	91 85 82	86.0	8.60×10^6
9	1×2^8	0.002	1×10^4	43 41 49	44.3	4.43×10^6
10	1×2^9	0.001	1×10^3	178 203 197	192.7	1.93×10^6

菌液浓度/(个/mL)=菌落数均值 $\times$ 进行菌落计数的稀释倍数 $\times 10$ 。

以 $1 \times 2^0 \sim 1 \times 2^9$ 共 10 个稀释倍数的 $D(540)$ 均值为横坐标, 菌液浓度为纵坐标, 作散点图(见图 2)。设置截距为 0 后, 添加趋势线, 可得直线回归方程 $y=4 \times 10^9 x$ ($R^2=0.999\ 6$, 方程中 x 为 $D(540)$ 值, y 为菌液浓度, 单位为个/mL)。

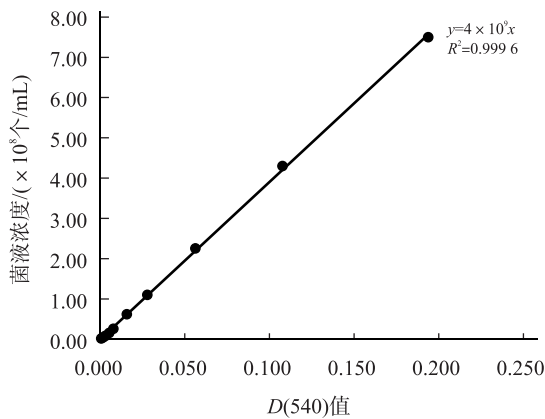


图2 $D(540)$ 值-菌液浓度图(第1次)

随后, 按照相同的方法选取了另一株冻存的菌株 TA102 进行了重复测试, 确认直线回归方程的准确性。选取 $1 \times 2^0 \sim 1 \times 2^9$ 共 10 个稀释倍数, 测得的 $D(540)$ 值和菌液浓度结果见表 5, 绘制的 $D(540)$ 值-菌液浓度图见图 3。

表5 第2次试验测定的 $D(540)$ 值和菌液浓度

分组	测定 $D(540)$ 值的稀释倍数	$D(540)$ 值	菌液浓度/(个/mL)
1	1×2^0	0.165	7.47×10^8
2	1×2^1	0.079	3.63×10^8
3	1×2^2	0.052	2.10×10^8
4	1×2^3	0.031	1.22×10^8
5	1×2^4	0.018	5.73×10^7
6	1×2^5	0.011	2.60×10^7
7	1×2^6	-0.004	1.32×10^7
8	1×2^7	0.005	7.20×10^6
9	1×2^8	0.003	3.40×10^7
10	1×2^9	0.000	2.10×10^6

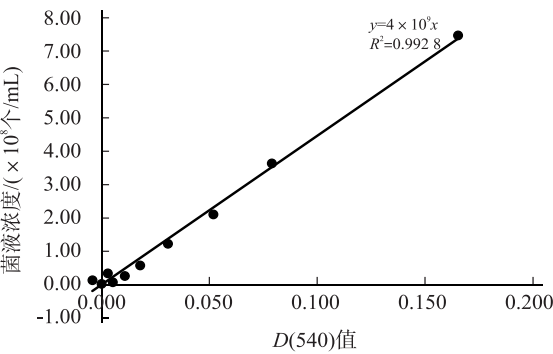


图3 $D(540)$ 值-菌液浓度图(第2次)

根据同样的方法, 可得直线回归方程 $y=4 \times 10^9 x$ ($R^2=0.992\ 8$, 方程中 x 为 $D(540)$ 值, y 为菌液浓度, 单位为个/mL)。

3 讨论

由于培养过程中菌液浓度是一个动态变化的过程, 因此如何准确的得出所要菌液的浓度一直是一个让试验人员头疼的问题。常用的方法包括比浊法和平皿计数法, 但是浊度仪在实验室中并不普及, 而平板菌落计数法需要等 24 h 后菌落长出方可计数, 有一定的时间延迟, 故也不方便应用^[6]。由于菌液浓度和吸光度值之间存在线性关系, 故可以通过吸光度值的测定来判断菌液浓度。林静等^[7]报道了在 600 nm 测定 5 种常见致病菌的吸光度值, 段梦奇等^[8]发现 550 nm 比 600 nm 更适用于百日咳菌液的吸光度值测定, 计芬芬等^[9]比较了各种波长, 认为国内微生物定量细菌一般使用 600 nm。对于 Ames 试验中所用到的营养缺陷性鼠伤寒沙门氏菌, 有的研究人员在 540 nm 下测定吸光度值, 认为 $D(540)$ 值在 0.1~0.2 的范围内可满足试验要求^[2], 有的研究人员在 600 nm 下测定吸光度值^[10], 因此在本试验中主要选择这两个波长进行了研究, 结果发现在 540 nm 时菌液的吸光度值显著高于 600 nm, 因此选择 540 nm 测定。

Ames 试验中, 菌液的浓度对试验影响较大, 如菌液浓度太低, 则会降低试验的敏感性^[10], 如果菌液浓度太高, 则细菌的活力会下降。针对本实验室冻存的营养缺陷型鼠伤寒沙门氏菌, 通过接种后连续测定其 0~14 h 的菌液浓度和 $D(540)$ 值, 发现菌液的浓度变化基本呈现一个“S 形”曲线, 大约在培养 10 h 后达到了菌液的最大浓度, 虽然此后吸光度值仍在上升, 但是活菌数却在下降, 这是由于死亡的菌体也有一定的吸光度值所导致^[11]。因此在本试验中, 将接种物放于旋转培养箱中于 37 ℃、100 r/min 培养 10 h, 即可获得对数生长末期的菌液。

各规范和文献均要求菌液浓度为活菌的数目, 即 CFU(Colony-Forming Units)/mL, 通过平板菌落计数法折算出的菌液浓度就是 CFU/mL, 和业内要求一致。随后, 本研究通过吸光度值测定和平皿菌落计数法, 建立了菌株 TA102 菌液浓度和吸光度值的直线回归方程, 两次试验的结果均表明菌液浓度和 $D(540)$ 值之间存在良好的线性关系, 可通过直线回归方程 $y=4 \times 10^9 x$ 由 $D(540)$ 值计算获得菌液浓度。如菌液的 $D(540)$ 值(扣除营养肉汤的本底值)在 0.25~0.50 之间即可保证获得菌液的浓度在 $(1 \sim 2) \times 10^9$ 个/mL。2 次试验培养 10 h 后获



得的菌液浓度分别为 7.50×10^8 个/mL 和 7.47×10^8 个/mL, 未达到 10^9 个/mL, 但是考虑到稀释时的损耗和 2 个粘连的菌体只会生长出 1 个 CFU, 因此平板稀释法的结果往往偏低。因此, 本扩增条件完全可以满足 $(1 \sim 2) \times 10^9$ 个/mL 这个范围。

在条件相同(同一批次冻存的菌液, 相同的接种体系, 相同的仪器)时, 每次扩增出来的菌液浓度都应相近, 即 $D(540)$ 值相近, 每次只需测定菌液的 $D(540)$ 值(扣除营养肉汤的本底值)是否在 0.25~0.50 之间即可知道这次扩增的菌液浓度是否在 $(1 \sim 2) \times 10^9$ 个/mL 范围内。如 $D(540)$ 值太低, 则表明生长状态不好, 菌液浓度不足, 无法进行试验; 如 $D(540)$ 值太高, 则表明可能产生污染, 也无法进行试验。通过 TA102 菌液扩增条件的摸索和确定, 证明通过测定菌液吸光度值可对菌液浓度进行预测和质量控制, 此法科学、简单、快捷。

参考文献

[1] MARON D M, AMES B N. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test[J]. *Mutat Res*, 1983, 113(3/4): 173-215.

[2] DHAWAN A, BAJPAYEE M. Genotoxicity assessment[M]. New York, NY: Springer New York, 2019.

[3] OECD. Test No. 471: bacterial reverse mutation test[M]. OECD, 1997.

[4] 国家卫生和计划生育委员会. GB 15193.4-2014 食品安全国家标准: 细菌回复突变试验[S]. 北京: 中国标准出版社, 2014.

[5] 国家食品药品监督管理总局. 化妆品安全技术规范(2015 版)[S]. 北京: 中国标准出版社, 2015: 503-510.

[6] 董自艳, 戴翠, 马仕洪, 等. 紫外-可见分光光度法快速确定细菌菌液的浓度[J]. *中国药品标准*, 2014, 15(2): 120-121.

[7] 林静, 何佳茜, 尚翠玲, 等. 5 种常见致病菌菌液 OD 值与其活菌数相关性研究[J]. *天津农学院学报*, 2017, 24(4): 42-45.

[8] 段梦奇, 杨勇, 徐恒, 等. 光密度测定法在百日咳杆菌培养菌液浓度测定中的应用[J]. *生物技术世界*, 2014, 11(7): 121-122.

[9] 计芬芬, 蒋洁蓉, 陈伊华. 抗菌性能测试中利用 OD 值定量接种菌液浓度的研究[C]. 2016 年抗菌科学与技术论坛, 2016: 7.

[10] 管莹, 李雪梅, 米其利, 等. Ames 试验重要影响因素研究[J]. *化学与生物工程*, 2017, 34(11): 35-39.

[11] 曹国珍, 缪建顺, 张苗苗, 等. 分光光度法测定酿酒酵母细胞悬液浓度研究[J]. *中国酿造*, 2014, 33(4): 129-133.

(上接第 61 页)

[7] 赵现哲, 刘晓丹, 周平坤, 等. 辐射介导下 HeLa 细胞中 Cdc25B 与 IER5 蛋白表达的关系[J]. *癌变·畸变·突变*, 2017, 29(6): 405-410, 417.

[8] FELBERBAUM R S. The baculovirus expression vector system: a commercial manufacturing platform for viral vaccines and gene therapy vectors[J]. *Biotechnol J*, 2015, 10(5): 702-714.

[9] VAN OERS M M, PIJLMAN G P, VLAK J M. Thirty years of baculovirus-insect cell protein expression: from dark horse to mainstream technology[J]. *J Gen Virol*, 2015, 96(Pt 1): 6-23.

[10] SMITH G E, SUMMERS M D, FRASER M J. Production of human beta interferon in insect cells infected with a baculovirus expression vector[J]. *Mol Cell Biol*, 1983, 3(12): 2156-2165.

[11] 王浩, 马驰, 崔莲仙, 等. 利用两种真核昆虫表达系统表达可溶性甲型 H1N1 血凝素蛋白[J]. *中华微生物学和免疫学杂志*, 2011, 31(4): 345-349.

[12] DING K K, YANG F, JIANG H Q, et al. Overexpression of the immediate early response 5 gene increases the radiosensitivity of HeLa cells[J]. *Oncol Lett*, 2019, 18(3): 2704-2711.

[13] ISHIKAWA Y, KAWABATA S, SAKURAI H. HSF1 transcriptional activity is modulated by IER5 and PP2A/B55[J].

FEBS Lett, 2015, 589(10): 1150-1155.

[14] ASANO Y, KAWASE T, OKABE A, et al. IER5 generates a novel hypo-phosphorylated active form of HSF1 and contributes to tumorigenesis[J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 19174.

[15] KAWABATA S, ISHITA Y, ISHIKAWA Y, et al. Immediate-early response 5 (IER5) interacts with protein phosphatase 2A and regulates the phosphorylation of ribosomal protein S6 kinase and heat shock factor 1[J]. *FEBS Lett*, 2015, 589(23): 3679-3685.

[16] MANSOURI M, BERGER P. Baculovirus for gene delivery to mammalian cells: Past, present and future[J]. *Plasmid*, 2018, 98: 1-7.

[17] 张晓元, 郝荣华, 刘飞, 等. 密码子优化提高海藻糖合成酶基因在大肠杆菌中的表达水平[J]. *食品与药品*, 2019, 21(1): 1-6.

[18] 范翠英, 冯利兴, 樊金玲, 等. 重组蛋白表达系统的研究进展[J]. *生物技术*, 2012, 22(2): 76-80.

[19] GLENN G M, SMITH G, FRIES L, et al. Safety and immunogenicity of a Sf9 insect cell-derived respiratory syncytial virus fusion protein nanoparticle vaccine[J]. *Vaccine*, 2013, 31(3): 524-532.