

DOI:10.13350/j.cjpb.230502

• 论著 •

维氏气单胞菌 TolC 蛋白的生物信息学分析*

李佳霓, 李娟娟, 马香, 唐燕琼, 刘柱, 李宏**

(海南大学生命科学学院, 海南海口 570228)

【摘要】 目的 利用生物信息学技术预测和分析维氏气单胞菌 TolC 蛋白的生物学特性、结构、功能及进化关系, 为研究其致病机制以及开发新的疫苗和新的药物靶点提供参考。方法 从 NCBI 蛋白质数据库中获得 TolC 序列, 使用 ProtParam、ProtScale、SignalP5.0、TMHMM2.0、PSORTb、NetPhos3.1、CD-search、SPOMA、SWISS-MODEL、ABCpred、IEDB 等生物信息学工具分析和预测 TolC 蛋白的理化性质、亲疏水性、跨膜区域、信号肽、保守结构域、亚细胞定位、磷酸化位点、二级和三级结构、B 细胞抗原表位和互作蛋白。利用 MEGA5.2 构建系统进化树, 分析不同细菌间 TolC 蛋白的进化关系。结果 TolC 蛋白由 439 个氨基酸组成, 分子式为 $C_{2112}H_{3414}N_{600}O_{689}S_5$, 是稳定的亲水性蛋白。该蛋白亚细胞定位于细胞外, 无跨膜结构域, 有信号肽 SP(Sec/SPI), 含有 52 个磷酸化位点和多个 B 细胞抗原表位。蛋白的主要二级结构为 α -螺旋, 三级结构为同源三聚体。TolC 蛋白具有外膜通道蛋白的保守结构域, 与 B565_1337、macB 等多药外排泵相关蛋白有互作关系。进化分析显示维氏气单胞菌 TolC 蛋白与嗜水气单胞菌 TolC 蛋白遗传进化关系最近。结论 维氏气单胞菌 TolC 蛋白作为多药外排泵的外膜通道蛋白, 与细菌致病和耐药性密切相关。该蛋白具有多个 B 细胞抗原表位, 是潜在的药物靶点和疫苗候选蛋白。

【关键词】 维氏气单胞菌; 外膜通道蛋白; TolC; 生物信息学

【中图分类号】 R378

【文献标识码】 A

【文章编号】 1673-5234(2023)05-0502-06

[Journal of Pathogen Biology. 2023 May;18(5):502-507.]

Bioinformatics analysis of *Aeromonas veronii* TolC protein

LI Jiani, LI Juanjuan, MA Xiang, TANG Yanqiong, LIU Zhu, LI Hong (School of Life Sciences, Hainan University, Haikou, Hainan 570228, China)

【Abstract】 **Objective** To predict and analyze the biological characteristics, structure, function and evolutionary relationship of *Aeromonas veronii* TolC protein by bioinformatics technology, so as to provide reference for studying its pathogenic mechanism and developing new vaccines and new drug targets. **Methods** The sequence of TolC protein was obtained from NCBI protein database. ProtParam, ProtScale, SignalP5.0, TMHMM2.0, PSORTb, NetPhos3.1, CD-search, SPOMA, SWISS-MODEL, ABCpred and IEDB were used to predict and analyze physicochemical properties, hydrophilicity, signal peptide, transmembrane domain, subcellular localization, phosphorylation sites, conserved domain, secondary structure, tertiary structure, B cell epitope and interacting proteins for TolC protein of *A. veronii*. MEGA5.2 was used to construct a phylogenetic tree to analyze the evolutionary relationship of TolC proteins among different bacteria. **Results** TolC protein consisted of 439 amino acids, the molecular formula was $C_{2112}H_{3414}N_{600}O_{689}S_5$, and it was a stable hydrophilic protein. The protein was localized outside the cell, had signal peptide SP (Sec/SPI) but no transmembrane structural domain, and contained 52 phosphorylation sites as well as multiple B cell antigenic epitopes. Its secondary structure was mainly α -helix, and the tertiary structure showed that it was homotrimer. TolC protein had the conserved domain of outer membrane channel protein and interacted with multiple drug efflux pump-related proteins such as B565_1337 and macB. Evolutionary analysis revealed that TolC protein of *A. veronii* was the closest to TolC protein of *A. hydrophila*. **Conclusion** As an outer membrane channel protein of multi-drug efflux pump, TolC protein is closely related to bacterial pathogenesis and drug resistance. The protein has multiple B cell antigenic epitopes, which can be used as a potential drug target and vaccine candidate protein.

【Key words】 *Aeromonas veronii*; outer membrane channel protein; TolC; bioinformatics

***维氏气单胞菌(*Aeromonas veronii*)是一种广泛存在于地下水、湖泊、河流等淡水环境中的革兰阴性短杆菌,具有较强的环境适应能力,被认为是鱼类、陆生生物和人类的重要病原菌^[1]。作为一种人-畜-鱼共患病原菌,维氏气单胞菌可引起鱼类的皮肤溃疡和出血

* **【基金项目】** 国家自然科学基金项目(No. 32060153);海南省自然科学基金项目(No. 322RC589)。

** **【通讯作者】** 李宏, E-mail: lihongbio@hainanu.edu.cn

【作者简介】 李佳霓(1998-),女,江西九江人,在读硕士。研究方向:生物信息。E-mail: lijianiwork@163.com

性败血症等疾病^[2-3],给水产养殖行业的发展带来巨大阻碍,同时也可引起多种人类疾病,从轻度腹泻到危及生命的坏死性筋膜炎和败血症等^[4],严重威胁着人类的健康。

外膜蛋白(outer membrane proteins, OMPs)是革兰阴性菌外膜中的主要成分,在细菌粘附、侵袭以及毒素的分泌等细菌致病过程中起着十分重要的作用,是维氏气单胞菌主要的毒力因子之一^[5]。此外,外膜蛋白是许多革兰阴性菌的主要表面抗原,易被免疫系统识别而引起免疫反应,具有良好的交叉保护性和免疫原性。作为革兰阴性菌的外膜通道蛋白, TolC 可与不同的内膜蛋白和周质蛋白复合物组成外排泵,介导多种底物转运至胞外的外排过程,包括抗生素的外排、毒力因子的分泌等,是导致革兰阴性菌产生毒力和多药耐药性的重要因素^[6]。

目前,针对维氏气单胞菌流行性、耐药性以及致病性的相关研究报道逐年增多,但关于 TolC 的作用机制还不明确。本研究选取维氏气单胞菌 TolC 蛋白为对象,通过生物信息学软件分析其生物学特性、结构、功能及进化关系,旨在探究 TolC 蛋白在维氏气单胞菌致病机制中的作用,为寻找候选疫苗抗原和药物靶点提供理论参考。

材料与方法

1 TolC 蛋白数据来源

从 NCBI 蛋白质数据库 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/>) 中获取来自 10 种不同细菌的 TolC 蛋白质序列(表 1),包括 4 种气单胞菌和其他 6 种病原菌。其中,维氏气单胞菌 TolC 蛋白是主要研究对象,其余蛋白质序列用于进行系统发育分析。

表 1 10 种细菌的 TolC 蛋白序列信息

Table 1 TolC protein sequence information for 10 bacterial species

菌株 Strain	登录号 GenBank ID
维氏气单胞菌(<i>A. veronii</i>)	WP_150389753.1
嗜水气单胞菌(<i>A. hydrophila</i>)	WP_224481158.1
豚鼠气单胞菌(<i>A. caviae</i>)	WP_041212294.1
杀鲑气单胞菌(<i>A. salmonicida</i>)	WP_169046853.1
大肠埃希菌(<i>E. coli</i>)	NP_417507.2
肠道沙门菌(<i>S. enterica</i>)	WP_218452972.1
鼠伤寒沙门菌(<i>S. typhimurium</i>)	NP_462101.3
土拉弗朗西斯菌(<i>F. tularensis</i>)	WP_003037818.1
霍乱弧菌(<i>V. cholerae</i>)	WP_219208563.1
肺炎克雷伯菌(<i>K. pneumoniae</i>)	WP_023286877.1

2 TolC 蛋白的生物信息学分析

使用 ExPASy 数据库的 ProtParam 和 ProtScale 工具分析 TolC 蛋白的基本理化性质和亲疏水性,包括分子质量、等电点、脂肪系数等。使用 SignalP5.0、

TMHMM2.0 和 PSORTb 分别对蛋白质进行信号肽分析、跨膜结构域分析和亚细胞定位。使用 NetPhos3.1 和 NCBI 数据库的 CD-search 工具寻找蛋白质磷酸化位点和保守结构域。使用 SPOMA 和 SWISS-MODEL 分别预测蛋白质的二级结构和三级结构。通过在线软件 ABCpred 和免疫表位数据库 IEDB 共同预测蛋白质的 B 细胞抗原表位。使用 MEGA5.2 软件对来自 10 种不同病原菌的 TolC 蛋白进行多序列比对,并选择最大似然法(maximum likelihood)构建系统发育树。利用 STRING 数据库预测与 TolC 相互作用的蛋白质。

结果

1 TolC 蛋白基本理化性质

TolC 蛋白由 439 个氨基酸组成,数量最多的氨基酸为亮氨酸(Leu),占 11.8%。蛋白分子式为 $C_{2112}H_{3414}N_{600}O_{689}S_5$,相对分子质量为 48.39625×10^3 ,理论等电点为 5.49,在 280 nm 处的消光系数为 34 840。该蛋白携带的正电荷残基总数为 48,负电荷残基总数为 55。蛋白总平均亲水性(GRAVY)为 -0.435,属于亲水性蛋白。蛋白质脂肪系数为 92.94,不稳定系数为 35.48(<40),为稳定蛋白。

使用 ProtScale 分析 TolC 蛋白的亲疏水性。氨基酸分值小于 0 表明具有亲水性,分值大于 0 表明具有疏水性。分析显示,该蛋白质第 76 位氨基酸亲水性最强,第 10 位氨基酸疏水性最强(图 1)。TolC 蛋白的整个多肽链大部分位于亲水性区域,表现为亲水性较强,是亲水性蛋白,与蛋白质理化分析结果一致。

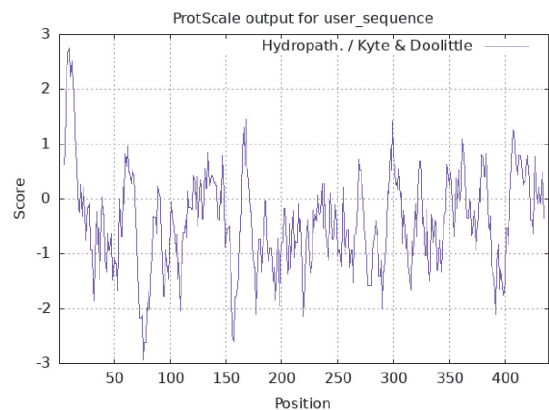


图 1 TolC 蛋白亲疏水性分析

Fig. 1 Hydrophobicity analysis of TolC protein

2 TolC 蛋白的信号肽和跨膜结构域预测及亚细胞定位

SignalP5.0 分析(图 2)显示, TolC 蛋白第 20-21 位氨基酸之间有一个裂解位点 AHA-EN, 概率为 99.26%, 预测为信号肽 SP(Sec/SPI) 的概率为

99.77%，说明该蛋白极有可能产生信号肽。由 TMHMM2.0 预测(图 3)显示,该蛋白在跨膜区(transmembrane)和膜内区(inside)的概率极低,在膜外区(outside)的概率接近于 1,说明 TolC 蛋白无跨膜结构域且整体位于膜外区。亚细胞定位显示 TolC 蛋白在细胞外(Extracellular)的位置得分最高,得分为 9.98,表明该蛋白定位在细胞外,符合 TolC 作为外膜通道蛋白的功能特征。

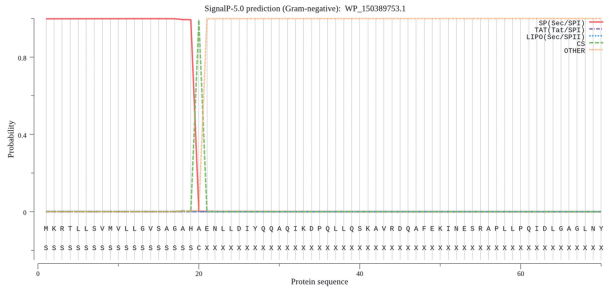


图 2 TolC 蛋白信号肽预测
Fig. 2 Signal peptide prediction of TolC protein

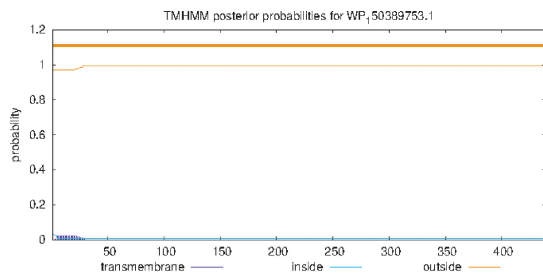
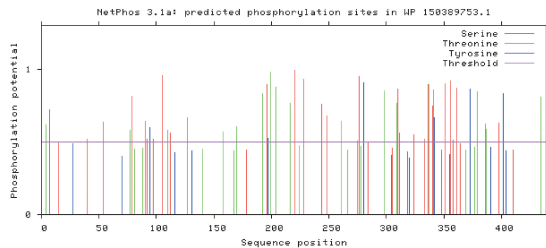


图 3 TolC 蛋白跨膜结构域预测
Fig. 3 Transmembrane region prediction of TolC protein

3 TolC 蛋白的磷酸化位点和保守结构域

使用 NetPhos3.1 预测 TolC 蛋白的磷酸化位点,当阈值为 0.5 时,预测该蛋白共有 52 个磷酸化位点(图 4),包括 18 个苏氨酸(Threonine),28 个丝氨酸(Serine)和 6 个酪氨酸(Tyrosine)。使用 NCBI 的 CD-search 工具预测 TolC 蛋白含有一个保守结构域(图 5),属于外膜通道蛋白家族。



注:红色为丝氨酸磷酸化位点;绿色为苏氨酸磷酸化位点;蓝色为酪氨酸磷酸化位点;紫色线为阈值。

图 4 TolC 蛋白磷酸化位点预测

Notes: Red indicates Serine phosphorylation sites; Green indicates Threonine phosphorylation sites; Blue indicates Tyrosine phosphorylation. The purple line indicates threshold value.

Fig. 4 Phosphorylation site prediction of TolC protein

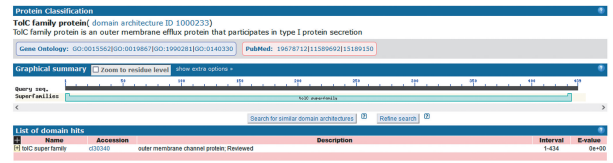
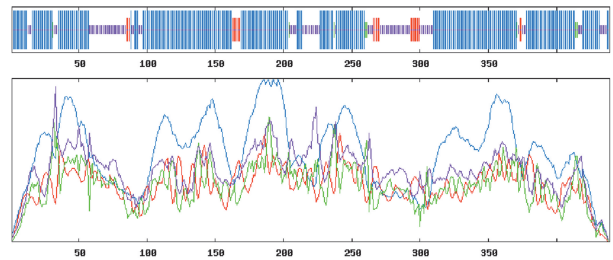


图 5 TolC 蛋白保守结构域
Fig. 5 Conserved domain of TolC protein

4 TolC 蛋白的二、三级结构

使用 SPOMA 软件对 TolC 蛋白二级结构进行预测分析,该蛋白主要由 α -螺旋(Alpha helix),延伸链(Extended strand), β -转角(Beta turn)和无规则卷曲(Random coil)构成(图 6)。其中 α -螺旋 303 个,占 69.02%;延伸链 23 个,占 5.24%; β -转角 8 个,占 1.82%;无规则卷曲 105 个,占 23.92%。



注:蓝色区域代表 α -螺旋;红色区域代表延伸链;绿色区域代表 β -转角;紫色区域代表无规则卷曲。

图 6 TolC 蛋白二级结构预测

Notes: Blue regions indicates α -helix; Red regions indicates extended strand; Green regions indicates β -turn; Purple regions indicates random coil.

Fig. 6 Secondary structure prediction of TolC protein

使用 SWISS-MODEL 对 TolC 蛋白三级结构进行同源建模。GMQE 值可以简单评估预测模型的质量,其值越接近 1 表明建模质量越好。图 7 为 TolC 蛋白三级结构的同源构建结果,匹配到模板 2vde. 1. A 的 GMQE 值为 0.76, QMEANDisCo Global 得分为 0.74 ± 0.05 ,与模板的序列一致性为 48.62%,覆盖值为 0.99,该模板来自大肠埃希菌多药外排泵 TolC 外膜组分开放状态的晶体结构,建模显示该蛋白为同源三聚体。

5 TolC 蛋白折 B 细胞抗原表位

结合 ABCpred 和 IEDB 对 TolC 蛋白 B 细胞抗原表位分析。以 0.5 为阈值,ABCpred 预测有 25 个可能的 B 细胞抗原表位,选择得分最高的前 10 条(表 2),结合 IEDB 的预测工具对 TolC 蛋白 B 细胞抗原表位分析的结果,得到的优势 B 细胞抗原表位有:45-60、153-168、171-196、205-217、349-361、370-379、388-392。

6 TolC 蛋白系统发育分析

通过构建系统发育进化树,可以分析各物种之间的进化关系。本研究使用 MEGA5.2 构建 TolC 蛋白

的系统发育树,选择的算法为最大似然法,结果如图8。维氏气单胞菌 TolC 蛋白与同属于气单胞菌属的嗜水气单胞菌、豚鼠气单胞菌和杀鲑气单胞菌的 TolC 蛋白具有较近的遗传进化关系,其中与嗜水气单胞菌在同一分支上,两者亲缘关系最近;与大肠埃希菌、肠道沙门菌、鼠伤寒沙门菌、土拉弗朗西斯菌和肺炎克雷伯菌形成不同的分支,亲缘关系较远。

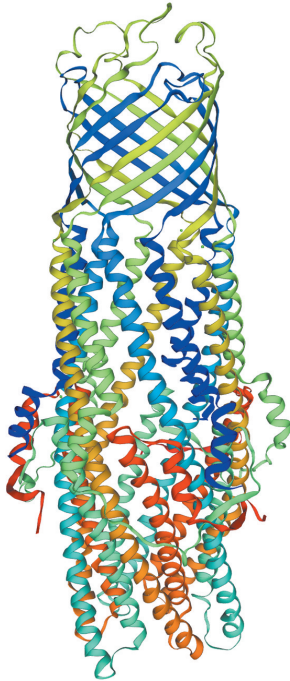


图7 TolC 蛋白三级结构预测
Fig. 7 Tertiary structure prediction of TolC protein

表2 ABCpred B 细胞抗原表位预测
Table 2 ABCpred B cell antigenic epitope prediction

等级 Rank	起始位点 Start position	序列 Sequence	得分 Score
1	153	RQLEQTQQRFEVGLTA	0.93
2	280	YKLDSIPGGNDNQANI	0.88
3	45	DQAFEKINESRAPLLP	0.87
3	349	IGSVRAYSQSVVSADS	0.87
4	365	ALKATEAGYEVGTRTI	0.86
5	377	TRTIVDVLDRKLYE	0.85
5	181	QALADEINAENTLDNS	0.85
6	171	DVHEAEASRDQALADE	0.84
7	202	ELTGVDHRNLDILNTD	0.83
7	123	LMVRTAKAYFDVLKAM	0.83

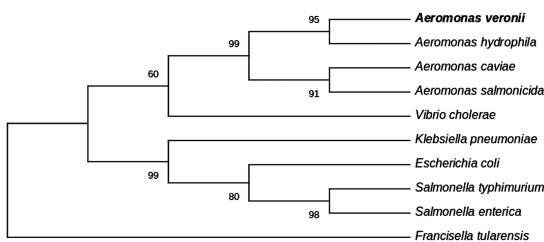


图8 TolC 蛋白系统进化树
Fig. 8 Phylogenetic tree of TolC protein

7 TolC 互作蛋白预测

STRING 数据库包含大量物种的蛋白质-蛋白质相互作用信息,通过该数据库预测维氏气单胞菌 TolC 的蛋白互作网络如图9。与 TolC 蛋白存在相互作用的前10个蛋白质分别是 B565_1337、B565_2747、B565_2768、B565_2798、macB、B565_2746、B565_1310、B565_0019、B565_0020 和 B565_1309,这些蛋白与 TolC 蛋白的互作得分均大于 0.95,互作关系可信度高。其中 B565_1337、B565_2798、B565_1310 这三个蛋白都是多药外排系统的膜融合蛋白;B565_2747 是耐药-结瘤-细胞分裂 (Resistance-nodulation-cell division, RND) 家族外排转运蛋白的 mfp 亚基,属于膜融合蛋白 (MFP) 家族;B565_2768 是大环内酯特异性外排系统的膜融合蛋白;macB 蛋白是大环内酯转运系统 ATP 结合/透性酶蛋白,属于 MacAB-TolC 外排系统的一部分;B565_0019 是 RND 多药外排泵的转运蛋白;B565_0020 是 RND 转运蛋白 hae1 家族的 mfp 亚基,属于膜融合蛋白家族。互作蛋白 GO 功能富集结果表明, TolC 主要参与抗生素应答 (GO: 0046677)、异型物质运输 (GO:0042908)、细胞外排 (GO:0140352) 等生物学过程。根据上述 TolC 互作蛋白预测结果可以看出, TolC 作为外膜通道蛋白可与膜融合蛋白和内膜转运蛋白组成不同的外排泵,包括 RND 家族外排泵、MacAB-TolC 外排泵等,从而介导一系列化合物的外排过程。

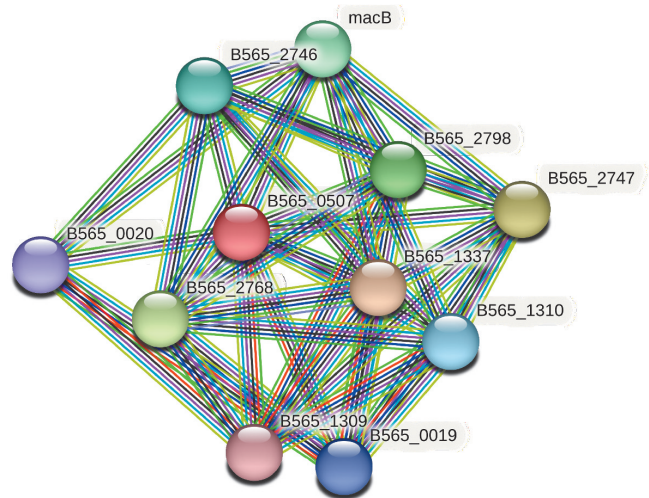


图9 TolC 蛋白参与的互作网络
Fig. 9 Protein-protein interaction network involving in TolC protein

讨论

细菌的多重耐药性问题是革兰阴性菌普遍存在的问题^[7],以 RND 超家族中 AcrAB-TolC 为代表的多药外排泵,不仅介导内源性和获得性多重耐药 (MDR),而且还具有其他功能,包括参与细菌的应激反应和致病性,对抗生素的开发和抗感染治疗提出了

巨大挑战^[8]。由维氏气单胞菌引发的疾病具有传染性强和发病率高特点^[9]，给渔业养殖带来危害的同时也对人类健康造成了威胁。因此，研制具有临床应用价值的抗感染药物和安全有效的疫苗显得尤为重要。

TolC 蛋白作为多重药物外排系统典型的外膜通道组分，在多种病原菌中被鉴定为重要的毒力相关因子^[10]。在对猪布鲁杆菌和霍乱弧菌的研究中发现，TolC 缺失株对动物模型的感染表现出明显的毒力减弱^[11-13]。Ferhat 等^[14]报导缺失 tolC 基因使嗜肺军团菌在感染变形虫和巨噬细胞时毒力显著降低。在鼠伤寒沙门菌中，敲除 tolC 影响Ⅲ型分泌系统的表达，使其侵袭上皮细胞的能力显著减弱^[15]。多项研究表明，TolC 蛋白作为外膜通道蛋白，在细菌致病性、耐药性、生物被膜形成以及维持细菌胞内环境稳定等方面发挥重要的作用^[16-18]。目前针对细菌多药外排泵开发的外排泵抑制剂^[19] (EPIs)，在体外试验中可降低细菌致病能力，恢复抗生素敏感性，是良好的药物靶点。此外，TolC 蛋白被证实具有良好的免疫原性。荣娜等^[20]的研究发现外膜蛋白 TolC 在嗜水气单胞菌中具有良好的免疫原性和交叉保护作用，是防治嗜水气单胞菌感染的理想疫苗选择。

本研究选取维氏气单胞菌 TolC 蛋白为对象，采用多种生物信息学软件对其进行预测和分析。结果显示，TolC 蛋白是稳定的亲水性蛋白，没有跨膜结构域，有信号肽，定位在细胞外，有一个属于外膜通道蛋白超家族的保守结构域。表明 TolC 蛋白作为细胞外膜上的通道蛋白发挥其生物学功能。

TolC 蛋白大部分位于亲水性区域，其主要的二级结构为 α -螺旋，其次是无规则卷曲。无规则卷曲常位于蛋白表面且结构松散，这种柔性结构容易发生扭曲和缠绕，有利于抗体的结合，很可能存在抗原表位。除此之外，通过对维氏气单胞菌 TolC 蛋白进行 B 细胞抗原表位分析，结果显示其存在多个优势 B 细胞抗原表位，说明维氏气单胞菌 TolC 蛋白可作为组分疫苗的候选蛋白。由最大似然法构建的系统发育进化树显示，TolC 蛋白在气单胞菌中进化保守，其中嗜水气单胞菌与维氏气单胞菌 TolC 蛋白具有最近的遗传进化关系。已有研究表明，TolC 蛋白在嗜水气单胞菌中表现出较强的免疫原性和交叉保护作用^[20]，为 TolC 蛋白作为维氏气单胞菌组分疫苗的研究提供了参考。

每一种蛋白质都有特定的结构和功能，蛋白质的高级结构往往决定其发挥的生物学功能。TolC 蛋白质三级结构同源建模显示该蛋白为同源三聚体。已有研究表明，TolC 是由三部分独立的多肽原聚体组成的三聚体^[21]，一端以 β -片层嵌于外膜，剩余部分由 α -螺旋组成伸入周质区域，螺旋结构组成空心圆柱状，中间

有一圈由多肽链弯曲盘绕形成的“赤道区”，开放状态下形成化合物穿过周质区和外膜的通道，是多药外排泵的外膜组分。蛋白互作预测显示，TolC 蛋白与多药外排泵上的转运蛋白和膜融合蛋白存在互作关系，GO 功能富集在抗生素应答、细胞外排等生物学过程中，进一步印证了 TolC 在多药外排泵的作用机制^[21]；TolC 作为外膜组分，通过与周质区的膜融合蛋白和内膜区的转运蛋白发生组装，形成一个完整的通道蛋白，从而使得底物从胞内由该通道直接转运至胞外。TolC 可与不同类型的内膜复合物相结合，从而转运不同的底物至胞外，包括抗生素、毒素蛋白、有毒代谢物等，从而导致细菌产生毒力和耐药性。本研究表明 TolC 蛋白在维氏气单胞菌毒力和耐药的形成过程中发挥关键作用，为进一步探究维氏气单胞菌毒力和耐药机制，寻找潜在药物靶点和组分疫苗提供了参考依据。

【参考文献】

- [1] Parte AC. LPSN-list of prokaryotic names with standing in nomenclature[J]. Nucleic Acids Res, 2014, 42(Database issue): 613-616.
- [2] Yu JH, Han JJ, Kim HJ, et al. First report of *Aeromonas veronii* infection in farmed Israeli carp *Cyprinus carpio* in Korea[J]. J Fish Pathol, 2010, 23(2):165-176.
- [3] Janda JM, Abbott SL. The genus *Aeromonas*: taxonomy, pathogenicity, and infection[J]. Clin Microbiol Rev, 2010, 23(1):35-73.
- [4] Parker JL, Shaw JG. *Aeromonas spp.* clinical microbiology and disease[J]. J Infect, 2011, 62(2):109-118.
- [5] 康元环, 张冬星, 杨滨僮, 等. 维氏气单胞菌最新研究进展[J]. 中国人兽共患病学报, 2018, 34(5):9.
- [6] Sharff A, Fanutti C, Shi J, et al. The role of the TolC family in protein transport and multidrug efflux. From stereochemical certainty to mechanistic hypothesis[J]. Eur J Biochem, 2001, 268(19):5011-5026.
- [7] Davies J, Davies D. Origins and evolution of antibiotic resistance [J]. Microbiol Mol Biol Rev, 2010, 74(3):417-433.
- [8] Li XZ, Plesiat P, Nikaido H. The challenge of efflux-mediated antibiotic resistance in Gram-negative bacteria [J]. Clin Microbiol Rev, 2015, 28(2):337-418.
- [9] 吴同全, 单晓枫, 孟庆峰, 等. 维氏气单胞菌研究进展[J]. 中国兽药杂志, 2011, 45(7):41-44.
- [10] Sun J, Deng Z, Yan A. Bacterial multidrug efflux pumps: mechanisms, physiology and pharmacological exploitations[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2014, 453(2):254-267.
- [11] Perez A, Poza M, Fernandez A, et al. Involvement of the AcrAB-TolC efflux pump in the resistance, fitness, and virulence of *Enterobacter cloacae*[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2012, 56(4):2084-2090.
- [12] Posadas DM, Martin FA, Sabio y Garcia JV, et al. The TolC homologue of *Brucella suis* is involved in resistance to antimicrobial compounds and virulence [J]. Infect Immun, 2007, 75(1):379-389.

- [13] Bina JE, Mekalanos JJ. *Vibrio cholerae* TolC is required for bile resistance and colonization[J]. Infect Immun, 2001, 69(7): 4681-4685.
- [14] Ferhat M, Atlan D, Vianney A, et al. The TolC protein of *Legionella pneumophila* plays a major role in multi-drug resistance and the early steps of host invasion[J]. PLoS One, 2009, 4(11): e7732.
- [15] Virlogeux-Payant I, Baucheron S, Pelet J, et al. TolC, but not AcrB, is involved in the invasiveness of multidrug-resistant *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* by increasing type III secretion system-1 expression[J]. Int J Med Microbiol, 2008, 298(7-8): 561-569.
- [16] Alav I, Sutton JM, Rahman KM. Role of bacterial efflux pumps in biofilm formation[J]. J Antimicrob Chemother, 2018, 73(8): 2003-2020.
- [17] Deininger KN, Horikawa A, Kitko RD, et al. A requirement of TolC and MDR efflux pumps for acid adaptation and GadAB induction in *Escherichia coli* [J]. PLoS One, 2011, 6(4): e18960.
- [18] Gil H, Platz GJ, Forestal CA, et al. Deletion of TolC orthologs in *Francisella tularensis* identifies roles in multidrug resistance and virulence[J]. PNAS, 2006, 103(34): 12897-12902.
- [19] Lamut A, Peterlin Masic L, Kikelj D, et al. Efflux pump inhibitors of clinically relevant multidrug resistant bacteria[J]. Med Res Rev, 2019, 39(6): 2460-2504.
- [20] 荣娜, 简思杰, 孙薇, 等. 鱼类致病嗜水气单胞菌外膜蛋白 TolC 的原核表达及抗原性分析[J]. 河南农业科学, 2021, 50(3): 157-164.
- [21] Hinchliffe P, Symmons MF, Hughes C, et al. Structure and operation of bacterial tripartite pumps [J]. Annu Rev Microbiol. 2013(67): 221-242.

【收稿日期】 2022-12-04 【修回日期】 2023-02-26

(上接 501 页)

【参考文献】

- [1] Nachbagauer R, Feser J, Naficy A, et al. A chimeric hemagglutinin-based universal influenza virus vaccine approach induces broad and long-lasting immunity in a randomized, placebo-controlled phase I trial[J]. Nat Med, 2021, 27(1): 106-114.
- [2] Hutchinson EC. Influenza virus[J]. Trends Microbiol, 2018, 26(9): 809-810.
- [3] Smith G, Dhanasekaran V, Justin B, et al. Origins and evolutionary genomics of the 2009 swine-origin H1N1 influenza A epidemic [J]. Nature, 2009, 459(7250): 1122-1125.
- [4] Abdelrahman Z, Li M, Wang X. Comparative review of SARS-CoV-2, SARS-CoV, MERS-CoV, and influenza a respiratory viruses[J]. Front Immunol, 2020, 11: 552909.
- [5] Russell CJ, Hu M, Okda FA. Influenza hemagglutinin protein stability, activation, and pandemic risk[J]. Trends Microbiol, 2018, 26(10): 841-853.
- [6] Uyeke TM, Hui DS, Zambon M, et al. Influenza[J]. Lancet, 2022, 400(10353): 693-706.
- [7] 焦鹏涛, 范文辉, 孙业平, 等 B 型流感病毒研究进展[J]. 生物工程学报, 2018, 34(6): 821-831.
- [8] Glezen WP. Cold-adapted, live attenuated influenza vaccine[J]. Expert Rev Vaccines, 2004, 3(2): 131-139.
- [9] Hai R, Garcia-Sastre A, Swayne DE, et al. A reassortment-competent live attenuated influenza virus vaccine for protection against pandemic virus strains[J]. J Virol, 2011, 85(14): 6832-6843.
- [10] Fraser C, Donnelly CA, Cauchemez S, et al. Pandemic potential of a strain of influenza A (H1N1): early findings[J]. Science, 2009, 324(5934): 1557-1561.
- [11] Stepanova E, Krutikova E, Wong PF, et al. Safety, immunogenicity, and protective efficacy of a chimeric a/b live attenuated influenza vaccine in a mouse model [J]. Microorganisms, 2021, 9(2): 259.
- [12] Sun W, Luo T, Liu W, et al. Progress in the development of universal influenza vaccines[J]. Viruses, 2020, 12(9): 1033.
- [13] Chen J, Wang J, Zhang J, et al. Advances in development and application of influenza vaccines[J]. Front Immunol, 2021, 12: 711997.
- [14] Isakova-Sivak I, Rudenko L. Safety, immunogenicity and infectivity of new live attenuated influenza vaccines[J]. Expert Rev Vaccines, 2015, 14(10): 1313-1329.
- [15] Wang P, Zheng M, Lau SY, et al. Generation of DelNS1 influenza viruses: a strategy for optimizing live attenuated influenza vaccines[J]. mBio, 2019, 10(5): e02180-19.
- [16] Sun W, Wang Z, Sun Y, et al. Safety, immunogenicity, and protective efficacy of an H5N1 chimeric cold-adapted attenuated virus vaccine in a mouse model[J]. Viruses, 2021, 13(12): 2420.
- [17] Smith A, Rodriguez L, El Ghouayel M, et al. A live attenuated influenza vaccine elicits enhanced heterologous protection when the internal genes of the vaccine are matched to those of the challenge virus[J]. J Virol, 2020, 94(4): e01065-19.
- [18] Flandorfer A, Garcia-Sastre A, Basler CF, et al. Chimeric influenza A viruses with a functional influenza B virus neuraminidase or hemagglutinin[J]. J Virol, 2003, 77(17): 9116-9123.
- [19] Horimoto T, Takada A, Iwatsuki-Horimoto K, et al. Generation of influenza A viruses with chimeric (type A/B) hemagglutinins [J]. J Virol, 2003, 77(14): 8031-8038.
- [20] Margine I, Krammer F, Hai R, et al. Hemagglutinin stalk-based universal vaccine constructs protect against group 2 influenza A viruses[J]. J Virol, 2013, 87(19): 10435-10446.
- [21] Ermler ME, Kirkpatrick E, Sun W, et al. Chimeric hemagglutinin constructs induce broad protection against influenza B virus challenge in the mouse model[J]. J Virol, 2017, 91(12): e00286-17.

【收稿日期】 2022-12-21 【修回日期】 2023-03-15