

DOI:10.13350/j.cjpb.220809

· 论著 ·

细粒棘球绦虫丙酮酸激酶生物信息学及系统发育分析*

周婧^{1,2}, 颜明智^{1,2}, 吕国栋^{1,2}, 马桂芝^{1**}

(1. 新疆医科大学药学院, 新疆乌鲁木齐 830054; 2. 新疆医科大学第一附属医院, 临床医学研究院, 省部共建中亚高发病成因与防治国家重点实验室)

【摘要】 **目的** 运用生物信息学方法分析细粒棘球绦虫(*Echinococcus granulosus sensu lato*, Eg)丙酮酸激酶(Pyruvate kinase, PK)基因序列的结构与功能。 **方法** 通过 NCBI 蛋白数据库获取 EgPK 基因序列, 利用 ProtParam、ProtScale、SignalP 5.0、TMHMM、Motif Scan、ProtComp 9.0、CDD 数据库、SOPMA、DNASTar、Swiss-Model Verify 3D、DNAMAN、VMD 和 MEGA 等工具预测分析 EgPK 基因的相关生物学信息, 并构建系统进化树, 进行系统发育分析。 **结果** 生物信息学预测 EgPK 具有亲水性, 分子量 62.056 22 ku, 无信号肽裂解位点, 无跨膜区域。该蛋白含有 3 个 N-糖基化位点, 6 个酪蛋白激酶 II 磷酸化位点, 6 个 N-肉豆蔻酰化位点, 9 个蛋白激酶 C 磷酸化位点。3D 结构分析与序列比对显示, EgPK 的桶状结构域和盖结构域之间存在特征性催化位点以及丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸磷酸化位点。EgPK 基因序列与多房棘球绦虫 PK 基因相似性为 94.67%, 与人的 PK 基因相似性为 54.77%, EgPK 与多房棘球绦虫 PK 蛋白亲缘关系较近, 与人、小鼠、家兔等哺乳动物亲缘关系较远。 **结论** EgPK 具有 PK 的特征性结构域, 可能参与细粒棘球绦虫能量代谢相关活动。RNDFKEDT 为 EgPK 的特征性活性位点, 可作为开发抗囊型棘球绦虫病的药物的候选靶点。

【关键词】 细粒棘球绦虫; 丙酮酸激酶; 生物信息学**【中图分类号】** R383.33**【文献标识码】** A**【文章编号】** 1673-5234(2022)08-0912-05

[Journal of Pathogen Biology. 2022 Aug.; 17(8):912-916, 923.]

Bioinformatics analysis of *Echinococcus granulosus sensu lato* pyruvate kinase and establish its phylogenetic treeZHOU Jing^{1,2}, YAN Ming-zhi^{1,2}, LV Guo-dong^{1,2}, MA Gui-zhi¹ (1. College of Pharmacy, Xinjiang Medical University, Urumqi 830054, China; 2. State Key Laboratory of Pathogenesis, Prevention, and Treatment of Central Asian High Incidence Diseases, Clinical Medical Research Institute, First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University)

【Abstract】 **Objective** To analyze the structure and function of the pyruvate kinase gene sequence of *E. granulosus sensu lato* by bioinformatics method. **Methods** The sequence of EgPK gene was obtained from NCBI protein database, ProtParam, ProtScale, SignalP 5.0, TMHMM, Motif Scan, ProtComp 9.0, CDD database, SOPMA, DNASTAR, Swiss-Model Verify 3D, DNAMAN, VMD, and MEGA were used to predict and analyze the biological information of EgPK gene. **Results** Bioinformatics predicted that EgPK was hydrophilic with a relative molecular weight of 62.056 22 ku, no signal peptide cleavage site and no transmembrane region, the protein contained 3 N-glycosylation sites, 6 casein kinase II phosphorylation sites, 6 N-nutmeg acylation sites, and 9 protein kinase C phosphorylation sites. The 3D structural analysis and sequence alignment showed that there were characteristic catalytic sites and serine, threonine and tyrosine phosphorylation sites between the barrel-like domain and the cap domain of EgPK. The sequence of the EgPK gene was 94.67% similar to *E. multilocularis* and 54.77% similar to humans, it is closely related to *E. multilocularis*, but far from the evolutionary relationship with humans, mice, rabbits, and other mammals. **Conclusion** EgPK has the characteristic domain of PK and may be involved in energy metabolism of *E. granulosus*. RNDFKEDT is a characteristic active site of EgPK, which can be used as a candidate target to develop drugs against cystic echinococcosis.

【Key words】 *Echinococcus granulosus sensu lato*; pyruvate kinase; bioinformatics

** 囊型棘球绦虫病(cystic echinococcosis, CE)又称囊型包虫病,是由细粒棘球绦虫(*Echinococcus granulosus*, Eg)幼虫引起的一种人兽共患寄生性传染病^[1]。目前 CE 的临床治疗手段主要包括手术治疗、穿刺治疗和药物治疗。但手术治疗和穿刺治疗后的复发率及并发症发生率较高^[2]。阿苯达唑和甲苯达唑等苯并

* **【基金项目】** 国家自然科学基金项目(No. 81760369; 82060373; 82060371); 省部共建中亚高发病成因与防治国家重点实验室开放课题(No. SKL-HIDCA-2021-YG1; SKL-HIDCA-2020-BC3)。

** **【通讯作者】** 马桂芝, E-mail: maguizhi000@126.com

【作者简介】 周婧(1998-), 女, 新疆昌吉州人, 在读硕士。研究方向: 新药研发。E-mail: 1714167742@qq.com

咪唑衍生物是目前仅有的两种获准用于治疗人类 CE 的药物^[3], 该类药物肠道生物利用度低并具有肝毒性^[4], 且超过 20%~40% 的 CE 病例未能通过苯并咪唑类药物治愈^[5], 因此亟需研发新的靶点药物用于 CE 的治疗。

Eg 具有有氧和无氧呼吸系统, 但在有氧或无氧条件下观察到的糖原利用率无显著差别, 这表明其主要依赖糖酵解来产生能量和中间体^[6]。因此, 靶向干预 Eg 的糖酵解途径干扰虫体能量代谢, 减少 ATP 合成从而抑制其活性是治疗 CE 的一种有效策略^[7]。丙酮酸激酶(Pyruvate kinase, PK) 是一种具有相同亚基的四聚体蛋白, 参与寄生虫葡萄糖分解代谢, 是催化糖酵解最后一步反应的关键酶。Chen 等^[8]报道大鼠抗重组华支睾吸虫 PK 血清在体内和体外均能抑制 *C. sinensis* 成虫的活性。Zhong 等^[9]研究发现抗锥虫药物苏拉明能抑制恶性疟原虫 PK 活性, 调节其糖酵解通量并抑制 ATP 的产生, 最终抑制寄生虫活性。以上研究表明 PK 是一个潜在的抗寄生虫药物靶点, 然而目前关于 EgPK 结构及其潜在的功能尚不明确, EgPK 在 Eg 生长发育和糖酵解代谢等生物学过程中的作用机制仍不十分清楚。

本实验拟利用生物信息学技术对 EgPK 蛋白理化性质、空间结构、抗原表位及功能进行预测, 并进行系统发育分析, 探究 EgPK 在 Eg 生长发育和糖酵解代谢中的生物学功能。

内容与方法

1 序列获取

从 NCBI 的蛋白质数据库 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/>) 获得 Eg (GenBank: CDS17986.1), 多房棘球绦虫 (GenBank: CDS43052.1), 智人 (GenBank: AAA60104.1)、小鼠 (GenBank: BAA23642.1), 牛血吸虫 (GenBank: RTG81326.1), 卫氏并殖吸虫 (GenBank: KAA3677113.1), 日本血吸虫 (GenBank: TNN05954.1), 大片吸虫 (GenBank: TPP56892.1), 布氏姜片吸虫 (GenBank: KAA0198261.1), 华支睾吸虫 (GenBank: GAA54498.1) 的 PK 基因序列。

2 EgPK 的生物信息学分析

利用 ProtParam (<https://web.expasy.org/prot-param/>) 对 Eg 及其模式生物 PK 的分子质量、等电点、不稳定性指数等生理生化特性进行预测^[10]; 利用 ProtScale 预测 EgPK 的亲水性^[11]; 利用 SignalP 5.0 预测 EgPK 信号肽^[12]; 利用 TMHMM 预测分析 EgPK 的跨膜区域^[13]; 利用 Motif Scan 和 NetPhos 3.1 Server 在线服务软件分析 EgPK 翻译后修饰位点;

通过 Conserved Domain Database (CDD) 数据库分析 EgPK 的结构域; 利用 SOPMA 分析 EgPK 二级结构^[14]; 利用 DNASTar 分析 EgPK 的柔性区、表面可及区和抗原指数; 利用 Immune Epitope Database (IEDB) 在线预测软件预测 EgPK 的 B 细胞抗原表位和 T 细胞抗原表位; 利用 Swiss-Model (qas) 对 EgPK 和 HsPK 序列进行同源建模^[15]; 使用 Verify 3D 对 EgPK 的 3D 模型进行评估; 利用 Visual Merchandising (VMD) 可视化软件 (Version 1.9.4a53) 呈现 EgPK 和 HsPK 的 3D 结构中氨基酸结合位点; 使用 DNAMAN 软件 (Version 5.2.2) 对 EgPK 及其同源基因进行多序列比对分析; 利用 MEGA 软件 (Version 7.0.26) 建立系统进化树, 进行系统发育分析。

结果

1 EgPK 生理生化特征

EgPK 化学式为 $C_{2712}H_{4391}N_{787}O_{819}S_{29}$, 包含氨基酸数 563 个, 分子质量 62.056 22 ku, 原子总数 8 738, 等电点 6.96, 带负电荷的残基总数 (Asp+Glu) 为 67, 带正电荷的残基总数 (Arg+Lys) 为 66。脂肪指数为 93.52, 不稳定指数 37.56, 为稳定型蛋白质, 包含多个亲水性区域, 亲水性平均值 (GRAVY) 为 -0.125, 属于亲水性蛋白。

2 EgPK 信号肽与跨膜区域

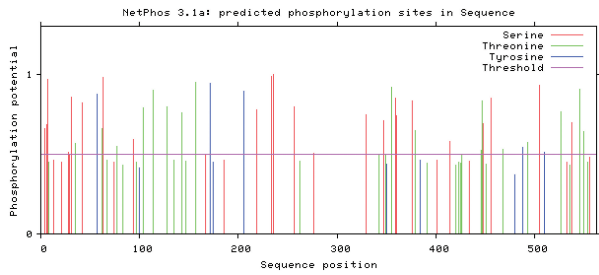
预测 EgPK 的信号肽 Sec/SPI 为 0.0009, 无信号肽裂解位点, 也不存在跨膜区域。

3 EgPK 的翻译后修饰位点和亚细胞定位

通过 Motif Scan 和 NetPhos 3.1 Server 预测翻译后修饰位点, EgPK 蛋白中具有 3 个 N-糖基化位点 (分别位于 61-64、92-95、261-264 位氨基酸), 6 个酪蛋白激酶 II 磷酸化位点 (分别位于 35-38、42-45、234-237、355-358、546-549、554-557 位氨基酸), 6 个 N-肉豆蔻酰化位点 (分别位于 27-32、85-90、136-141、214-219、303-308、532-537 位氨基酸), 9 个蛋白激酶 C 磷酸化位点 (分别位于 104-106、114-116、219-221、236-238、349-351、379-381、434-436、448-450、538-540 位氨基酸), 33 个丝氨酸磷酸化位点, 34 个苏氨酸磷酸化位点, 10 个酪氨酸磷酸化位点 (图 1)。ProtCompv. 9.0 预测 EgPK 定位分布部位是细胞质。

4 EgPK 结构域

EgPK 具有 PK 样超家族结构域 (图 2), 位于 59-542 位氨基酸区段, 包括桶状结构域和盖结构域, 分别位于 59-409 和 424-542 位氨基酸。序列中包含特征性活性位点 RNDFKEDT, 出现在 90-341 位氨基酸区段, 负责相互转换烯醇式丙酮酸和丙酮酸。



注:红色表示丝氨酸磷酸化位点;绿色表示苏氨酸磷酸化位点;蓝色表示酪氨酸磷酸化位点;粉色横线表示阈值。

图1 EgPK蛋白的磷酸化位点预测

Notes: Red Indicates Serine phosphorylation sites; Green Indicates Threonine phosphorylation sites; blue indicates tyrosine phosphorylation sites; and Pink Horizontal Lines indicate thresholds.

Fig. 1 analysis of phosphorylation sites of EgPK protein

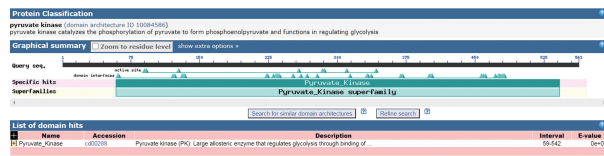


图2 EgPK蛋白的结构域预测

Fig. 2 EgPK protein domain prediction

5 EgPK的二级结构和细胞表位

SOPMA 软件预测 EgPK 蛋白的序列长度为 563,其中 α 螺旋占 34.64%, β 折叠占 20.60%, β 转角占 8.88%,无规则卷曲占 35.88%。利用 DNASTAR 软件对 EgPK 的柔性区、表面可及区和抗原指数进行预测分析(图 3),其主要的细胞抗原表位在 5-59、72-80、98-103、114-118、160-168、179-184、216-228、230、233-242、263-27、270-271、273-274、289-296、353-354、380-384、404-421、490-502、512-518、529-536、547-559 位氨基酸。利用 IEDB 在预测软件预测其 B 细胞抗原表位,结果见表 1。

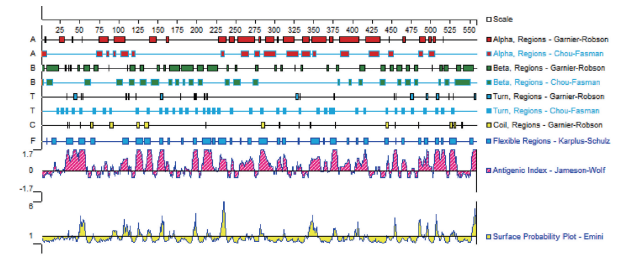
6 EgPK 的 3D 结构

通过 Swiss-Model 服务器构建的 EgPK 3D 结构与模板序列同源性为 59.73%,GMQE 得分为 0.80。使用 Verify 3D 对 EgPK 的 3D 模型进行评估,超过 80%的氨基酸 3D/-1D 值 ≥ 0.2 ,表明 EgPK 的同源性建模成功。利用 VMD 可视化软件呈现 EgPK 和 HsPK 的 3D 结构中的氨基酸结合位点,结果见图 4。

7 EgPK 与 EgPK 同源基因的多重序列比对

通过 DNAMAN 软件的比对分析,EgPK 与 EgPK 同源基因 (GenBank ID: CDS43052. 1、AAA60104. 1、BAA23642. 1、RTG81326. 1、KAA3677113. 1、TNN05954. 1、TPP56892. 1、KAA0198261. 1、GAA54498. 1)的序列相似性依此为 94.67%、54.77%、51.18%、65.49%、64.32%、61.28%、64.56%、63.94%、59.33%,与多房棘球绦虫

(GenBank;CDS43052. 1)相似性为 94.67%,与人、小鼠等其他物种的相似性为 51.18~65.49%(图 5)。



注:第 1、3、5、7 行为 Gramier-Robson 方法预测的 EgPK 二级结构(红色代表 Alpha 螺旋,绿色代表 Beta 折叠,蓝色代表转弯,黄色代表随机线圈),第 2、4、6 行为 Chou-Fasman 方法预测的 EgPK 二级结构(红色代表 Alpha 螺旋,绿色代表 Beta 折叠,蓝色代表转弯,无随机线圈预测),第 8 行为 Karplus-Schulz 法预测的 EgPK 柔性区,第 9 行为 Jameson-Wolf 指数法预测的 EgPK 抗原指数,第 10 行为 Emini 法预测的 EgPK 表面可及性区。

图3 EgPK二级结构及细胞表位预测

Notes: The secondary structure of EgPK protein was analyzed by Gramier-Robson and Chou-Fasman methods. Lines 1, 3, 5, and 7 are the Gramier-Robson method. Red Represents the Alpha Helix, green represents the Beta fold, blue represents the turn, and yellow represents the random coil prediction. Line 8 indicates the flexible region of the EGPK predicted by the Karplus-Schulz method, line 9 indicates the Antigen index of the EGPK predicted by the Jameson-Wolf index method, and line 10 indicates the surface accessibility region predicted by the EMINI method.

Fig. 3 prediction of EgPK cell epitopes

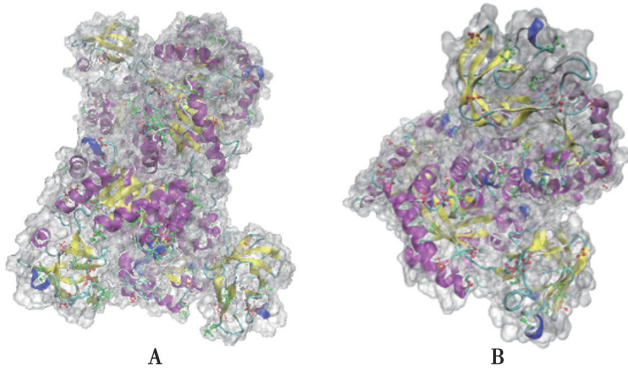
表 1 EgPK B 细胞抗原表位
Table 1 EgPK B Cell Antigen Epitope

| 序号 NO. | 起始位点 Start | 结束位点 End | 长度 Length |
|--------|------------|----------|-----------|
| 1 | 5 | 59 | 55 |
| 2 | 72 | 80 | 9 |
| 3 | 98 | 103 | 6 |
| 4 | 114 | 118 | 5 |
| 5 | 160 | 168 | 9 |
| 6 | 179 | 184 | 6 |
| 7 | 216 | 228 | 13 |
| 8 | 230 | 230 | 1 |
| 9 | 233 | 242 | 10 |
| 10 | 263 | 267 | 5 |
| 11 | 270 | 271 | 2 |
| 12 | 273 | 274 | 2 |
| 13 | 289 | 296 | 8 |
| 14 | 353 | 354 | 2 |
| 15 | 380 | 384 | 5 |
| 16 | 404 | 421 | 18 |
| 17 | 490 | 502 | 13 |
| 18 | 512 | 518 | 7 |
| 19 | 529 | 536 | 8 |
| 20 | 547 | 559 | 13 |

8 EgPK 的系统进化关系

通过 MEGA(7.0.26) 软件,利用 Neighbor-Joining 法^[16]构建 PK 系统进化树,分析不同种属 PK 之间的系统发育关系,结果如图 6。PK 分为多个不同的分

支, EgPK 蛋白与多房棘球绦虫 PK 蛋白 (GenBank: CDS43052. 1) 同属一个分支, 大肠埃希菌 (GenBank: KOZ27309. 1)、果蝇 (GenBank: NP_524448. 3) PK 蛋白形成一个分支, 日本血吸虫 (GenBank: TNN05954. 1)、牛血吸虫 (GenBank: RTG81326. 1)、华支睾吸虫 (GenBank: GAA54498. 1)、卫氏并殖吸虫 (GenBank: KAA3677113. 1)、布氏姜片吸虫 (GenBank: KAA0198261. 1) PK 蛋白形成一个分支。EgPK 蛋白与智人、小鼠、鸡和家兔的 PK 蛋白发育系统形成不同分支, 亲缘关系较远。



A EgPK 蛋白表面 B HsPK 蛋白表面 注: 结构中红色表示丝氨酸结合位点, 绿色表示苏氨酸结合位点; 紫色和蓝色为 α 螺旋; 黄色为 β 折叠; 青色为 β 转角。

图 4 EgPK 的三级结构

Notes: Red Indicates the serine binding site, and green indicates the threonine binding site; the Alpha Helix (purple and blue); the Beta fold (yellow); and the Beta Corner (Cyan)

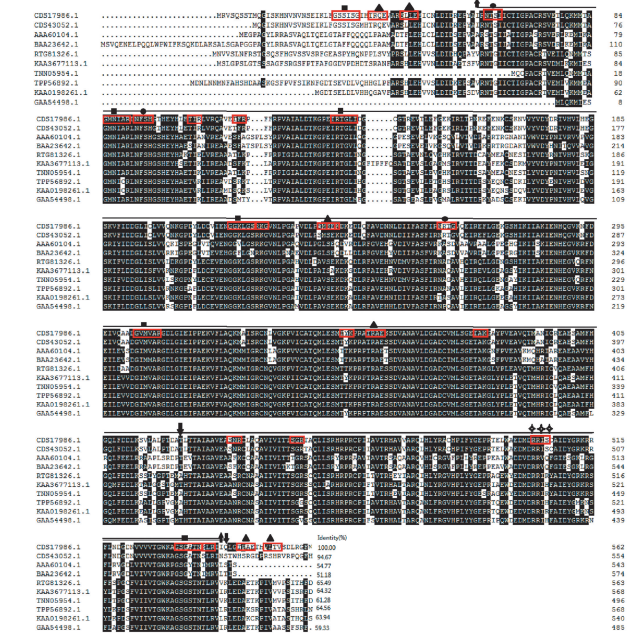
Fig. 4 Tertiary structure

讨论

由于 CE 目前药物治疗方式存在一定缺点, 亟需开发新的抗包虫病药物, 而筛选新的药物靶点并针对其开发靶向药物是抗寄生虫药物开发的一种重要方式^[17]。近年来, 生物信息学被广泛用于药物靶点预测, 通过分析预测蛋白质结构, 为探究小分子化合物与蛋白质之间的相互作用奠定了良好基础。PK 在寄生虫能量代谢中的关键作用, 成为药物和疫苗开发的热点。由于生物信息学技术可以极大地提高药物靶点筛选效率, 利用生物信息学的技术手段针对 EgPK 的蛋白结构和功能进行预测分析, 有助于开发新型的针对 CE 可行的防治疫苗或靶点药物研究。

PK 是哺乳动物和寄生虫体内葡萄糖代谢中必不可少的调节糖酵解酶, 已经证明可作为针对锥虫^[18]和利什曼原虫^[19]的潜在药物靶标。目前, 来自布氏锥虫、弓形虫^[20]和恶性疟原虫^[21]的 PK 的特征记录证明了 PK 在寄生虫生长发育中的重要作用。Xiao 等^[22]研究发现 Eg 中存在较高的 PK 活性, 提示 PK 可能在 Eg 生长发育过程中有重要作用。本研究采用生物信息学方法预测分析 EgPK 的理化性质和空间结构, 结

果表明 EgPK 是一种结构复杂的蛋白。预测翻译后修饰位点, 该蛋白具有多个磷酸化位点, 而作为催化糖酵解系统中 ATP 分解代谢产生的关键酶, EgPK 的磷酸化不仅可以调节其蛋白质活性和功能, 还会影响细粒棘球绦虫能量代谢, 提示 EgPK 在 Eg 生长发育中扮演重要角色。



注: 红色方框表示结合位点区域; 两个 \downarrow 之间的横线表示丙酮酸酶 α/β 结构域。◆表示和 cGMP-依赖性蛋白激酶磷酸化位点; 两个 \uparrow 之间的横线表示 PK 样超家族结构域; ▲表示酪蛋白激酶 II 磷酸化位点; ■表示 N-肉豆蔻酰化位点; ●表示 N-糖基化位点。细粒棘球绦虫 (CDS17986. 1); 多房棘球绦虫 (CDS43052. 1); 智人 (AAA60104. 1); 小鼠 (BAA23642. 1); 牛血吸虫 (RTG81326. 1); 卫氏并殖吸虫 (KAA3677113. 1); 日本血吸虫 (TNN05954. 1); 大片吸虫 (TPP56892. 1); 布氏姜片吸虫 (KAA0198261. 1); 华支睾吸虫 (GAA54498. 1)。

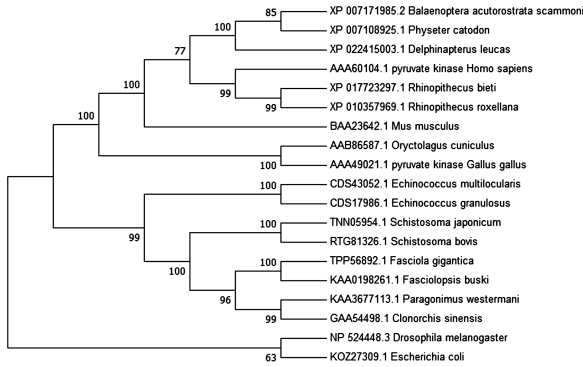
图 5 EgPK 与 EgPK 同源基因多重序列比对

Notes: The red box in the Multiple sequence alignment results shows the binding site area; the horizontal lines between the two represent the pyruvate α -a domain; the two represent the cGMP dependent protein kinase phosphorylation site; The cross-lines between the 20-year-olds represent the PK-like superfamily domains, the Casein Kinase II phosphorylation site, the n-myristic acylation site, and the n-glycosylation site *E. granulosus* (CDS17986. 1), *E. Multilocularis* (CDS43052. 1), *Homo Sapiens* (AAA60104. 1), *Mus musculus* (BAA23642. 1), *Schistosoma Bovis* (RTG81326. 1), *Paragonimus Westermani* (KAA3677113. 1), *Schistosoma japonicum* (TNN05954. 1), *Fasciola gigantica* (TPP56892. 1), *Fasciolopsis Buski* (KAA0198261. 1. 1), *Clonorchis sinensis* (GA54498. 1).

Fig. 5 EgPK and Multiple sequence alignment

PK 在生物体内通常以四聚体或二聚体形式存在, 四聚体结构是一种活性形式, 对磷酸烯醇式丙酮酸 (PEP) 具有高结合亲和力。通过结构域和二级结构分析发现, EgPK 作为具有相同亚基的四聚体蛋白, 具有 PK 样超家族特征结构域, 即桶状结构域 (α/β 结构域) 和盖结构域, 其中桶状结构域包含多种螺旋结构, 这些螺旋在催化和变构调节中起主要作用^[23]。来自桶状结构域和盖结构域的氨基酸有助于形成活性位点。

EgPK 活性位点包括两个带正电荷的残基(1 个 Arg, 1 个 Lys)和 4 个带负电荷的残基(1 个 Asn, 2 个 Asp, 1 个 Glu 残基)。这些残基与底物和金属离子结合, 从而会影响其酶活化, 提示可针对 EgPK 活性位点开发特异性药物通过影响 EgPK 酶活性进而影响 Eg 能量代谢。



注:牛血吸虫(RTG81326.1);卫氏并殖吸虫(KAA3677113.1);日本血吸虫(TNN05954.1);大片吸虫(TPP56892.1)、布氏姜片吸虫(KAA0198261.1);华支睾吸虫(GAA54498.1);猫头鹰(XP_007108925.1);果蝇(NP_524448.3);翠雀(XP_022415003.1);大肠埃希菌(KOZ27309.1);家兔(AAB86587.1);鸡(AAA49021.1);智人(AAA60104.1);小鼠(BAA23642.1);多房棘球绦虫(CDS43052.1);细粒棘球绦虫(CDS17986.1);金丝猴(XP_010357969.1);犀牛(XP_017723297.1);平纹夜蛾(XP_007171985.2)。

图6 EgPK 系统进化树

Notes: *Schistosoma Bovis* (RTG81326.1), *Paragonimus Westermani* (KAA3677113.1), *Schistosoma japonicum* (TNN05954.1), *Fasciola flavescens* (TPP56892.1), *Fasciolopsis Buski* (KAA0198261.1), *Clonorchis sinensis* (GAA54498.1), *Otus sunia stictonotus* (XP_007108925.1), *Drosophila melanogaster* (NP_524448.3), *Delphinium chefoense* (XP_022415003.1), *Escherichia coli* (KOZ27309.1), *Oryctolagus cuniculus* (AAB86587.1), *Gallus gallus* (AAA49021.1), *Homo Sapiens* (AAA60104.1), *Mus musculus* (BAA23642.1), *E. Multilocularis* (CDS43052.1), *E. granulosus* (CDS17986.1), *Golden Monkey* (XP_010357969.1), *Rhinoceros* (XP_017723297.1), *Noctuid* (XP_007171985.2).

Fig. 6 EgPK phylogenetic tree

多重序列比对分析显示 EgPK 第 418 位亮氨酸(L)取代了常见赖氨酸(K), 由于在大多数 PK 中 418 位的赖氨酸被认为参与激活因子果糖-1、6-二磷酸的 6-磷酸部分的结合^[18], 而 EgPK 的特异性取代位点提示该位点可成为设计选择性抑制剂的靶点, 对于开发高效的抗包虫药物具有重要意义。

细胞抗原表位预测结果显示 EgPK 具有 20 个 B 细胞抗原表位, 因此可针对这些抗原表位制备特异性抗体, 为研发特异性抗包虫抗体药物或生物技术药物相关免疫原性检测奠定基础。

本研究采用生物信息学方法对 EgPK 的蛋白结构与理化性质进行了分析与预测, 结果表明 EgPK 可能参与细粒棘球绦虫能量代谢相关活动, 因此可针对 EgPK 开发设计针对寄生虫 PK 的特异性抗包虫药物, 为治疗干预 CE 提供新的靶标蛋白。

【参考文献】

[1] Moghadaszadeh M, Khayyati M, Spotin A, et al. Scolicidal and apoptotic activities of 5-hydroxy-1,4-naphthoquinone as a potent agent against *Echinococcus granulosus* protoscolices[J]. *Pharmaceuticals (Basel)*, 2021, 14(7):623.

[2] Wen H, Vuitton L, Tuxun T, et al. Echinococcosis: Advances in the 21st Century[J]. *Clin Microbiol Rev*, 2019, 32(2): e00075-18.

[3] Reuter S, Jensen B, Buttenschoen K, et al. Benzimidazoles in the treatment of alveolar echinococcosis: a comparative study and review of the literature[J]. *J Antimicrob Chemother*, 2000, 46(3): 451-456.

[4] Stojkovic M, Zwahlen M, Teggi A, et al. Treatment response of cystic echinococcosis to benzimidazoles: a systematic review[J]. *PLoS Negl Trop Dis*, 2009; 3(9): e524.

[5] Loos JA, Cumino AC. *In vitro* anti-echinococcal and metabolic effects of metformin involve activation of AMP-activated protein kinase in larval stages of *Echinococcus granulosus*[J]. *PLoS One*, 2015, 10(5): e0126009.

[6] Agosin M. Studies on the metabolism of *Echinococcus granulosus*. II. Some observations on the carbohydrate metabolism of hydatid cyst scolices[J]. *Exp Parasitol*, 1957, 6(6): 586-593.

[7] Xin Q, Yuan M, Li H, et al. *In vitro* and *in vivo* effects of 3-bromopyruvate against *Echinococcus metacestodes* [J]. *Vet Res*, 2019, 50(1):96.

[8] Chen T, Jiang H, Sun H, et al. Sequence analysis and characterization of pyruvate kinase from *Clonorchis sinensis*, a 53.1-kDa homopentamer, implicated immune protective efficacy against clonorchiasis[J]. *Parasit Vectors*, 2017, 10(1):557.

[9] Zhong W, Li K, Cai Q, et al. Pyruvate kinase from *Plasmodium falciparum*: Structural and kinetic insights into the allosteric mechanism[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2020, 532(3): 370-376.

[10] Wang H, Xu F, Wang X, et al. Panax ginseng Molecular discrimination of cultivar K-1 using pathogenesis-related protein 5 gene [J]. *J Ginseng Res*, 2019; 43(3): 482-487.

[11] Chen Z, Zhu Y, Sha T, et al. Brucella Design of a new multi-epitope vaccine against based on T and B cell epitopes using bioinformatics methods[J]. *Epidemiol Infect*, 2021(149): e136.

[12] Almagro Armenteros J, Tsirigos K, Sønderby C, et al. SignalP 5.0 improves signal peptide predictions using deep neural networks [J]. *Nat Biotechnol*, 2019, 37(4): 420-423.

[13] Chen Y, Yu P, Luo J, et al. Secreted protein prediction system combining CJ-SPHMM, TMHMM, and PSORT[J]. *Mammalian genome: Official J Intern Mammalian Genome Soc*, 2003, 14(12): 859-865.

[14] Wei W, Wang L, Zhou P, et al. Bioinformatic prediction and identification of immunogenic epitopes of the antigenic 14-3-3 protein of *Echinococcus multilocularis* [J]. *Acta Tropica*, 2021(220): 105955.

[15] Biasini M, Bienert S, Waterhouse A, et al. SWISS-MODEL: modelling protein tertiary and quaternary structure using evolutionary information[J]. *Nucleic acids Res*, 2014(42): W252-258.

- reveals genes from dengue and zika viruses[J]. Front Cell Infect Microbiol, 2018(8):359.
- [9] Xia H, Wang Y, Atoni E, et al. Mosquito-associated viruses in China[J]. Virol Sin, 2018, 33(1):5-20.
- [10] Atoni E, Zhao L, Hu C, et al. A dataset of distribution and diversity of mosquito-associated viruses and their mosquito vectors in China[J]. Sci Data, 2020, 7(1):342.
- [11] 李小溪, 谭钧元, 张昕, 等. 新发和再发虫媒传染病[J]. 传染病信息, 2020, 33(5):456-461.
- [12] Wang T, Sun Y, Qiu HJ. African swine fever: an unprecedented disaster and challenge to China[J]. Infect Dis Poverty, 2018, 7(1):111.
- [13] Li Q, Guan X, Wu P, et al. Early transmission dynamics in Wuhan, China, of novel coronavirus-infected pneumonia[J]. N Engl J Med, 2020, 382(13):1199-1207.
- [14] 徐建国. 反向病原学[J]. 疾病监测, 2019, 34(7):593-598.
- [15] Xu J. Reverse microbial etiology: A research field for predicting and preventing emerging infectious diseases caused by an unknown microorganism[J]. J Biosaf Biosecur, 2019, 1(1):19-21.
- [16] 杨文旭, 杨亚明. 高通量测序技术在按蚊共生微生物研究中的应用[J]. 中国病原生物学杂志, 2021, 16(1):122-126.
- [17] 孙洪清, 肖宏, 陈良. 重视蚊媒传染病[J]. 医学研究杂志, 2016, 45(9):1-3.
- [18] Chandler JA, Lang JM, Bhatnagar S, et al. Bacterial communities of diverse *Drosophila* species; ecological context of a host-microbe model system[J]. PLoS Genet, 2011, 7(9):e1002272.
- [19] 南春燕, 马雅军, 徐建农, 等. 中华按蚊幼虫肠道细菌宏基因组的组成研究[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2013, 31(1):114-119.
- [20] 王丹丹. 中华按蚊肠道细菌分子多态性研究[D]. 武汉:华中农业大学, 2008.
- [21] Zoure AA, Sare AR, Yameogo F, et al. Bacterial communities associated with the midgut microbiota of wild *Anopheles gambiae* complex in Burkina Faso[J]. Mol Biol Rep, 2020, 47(1):211-224.
- [22] Rani A, Sharma A, Rajagopal R, et al. Bacterial diversity analysis of larvae and adult midgut microflora using culture-dependent and culture-independent methods in lab-reared and field-collected *Anopheles stephensi*-an Asian malarial vector[J]. BMC Microbiol, 2009(9):96.
- [23] 韩娜, 张琳, 张雯, 等. 长角血蜱细菌群落结构及多样性研究[J]. 中国媒介生物学及控制杂志, 2016, 27(5):426-431.
- [24] Zolnik CP, Prill RJ, Falco RC, et al. Microbiome changes through ontogeny of a tick pathogen vector[J]. Mol Ecol, 2016, 25(19):4963-4977.
- [25] 曹乐天, 王璐阳, 张艺凡, 等. 不同生活环境天鵝肠道菌群的多样性分析[J]. 野生动物学报, 2020, 41(4):989-999.
- [26] 姚明国, 江佳富, 高子厚, 等. 云南西北部地区家畜无形体感染的分子流行病学调查[J]. 中国人兽共患病学报, 2020, 36(8):678-684.
- [27] Hornok S, Sugar L, Fernandez de Mera IG, et al. Tick- and fly-borne bacteria in ungulates; the prevalence of *Anaplasma phagocytophilum*, haemoplasmas and rickettsiae in water buffalo and deer species in Central Europe, Hungary[J]. BMC Vet Res, 2018, 14(1):98.
- [28] 刘同凯, 张忠, 张瑞玲. 共生菌 *Wolbachia* 在蚊媒传染病防控方面的研究[J]. 中国病原生物学杂志, 2017, 12(11):1122-1125.
- [29] Johnson KN. The impact of *Wolbachia* on virus infection in mosquitoes[J]. Viruses, 2015, 7(11):5705-5717.
- [30] Pereira TN, Carvalho FD, Rugani JN, et al. Mayaro virus: The Potential Role of Microbiota and *Wolbachia* [J]. Pathogens, 2021, 10(5):525.
- [31] Wang S, Ghosh AK, Bongio N, et al. Fighting malaria with engineered symbiotic bacteria from vector mosquitoes[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012, 109(31):12734-12739.
- [32] Boissi re A, Tchioffo MT, Bachar D, et al. Midgut microbiota of the malaria mosquito vector *Anopheles gambiae* and interactions with *Plasmodium falciparum* infection[J]. PLoS Pathog, 2012, 8(5):e1002742.
- [33] Dong Y, Manfredini F, Dimopoulos G. Implication of the mosquito midgut microbiota in the defense against malaria parasites [J]. PLoS Pathog, 2009, 5(5):e1000423.
- [34] 王晓明, 吴焜, 陈晓光, 等. 蚊虫共生微生物群落多样性及功能的研究进展[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2017, 35(3):305-312.
- 【收稿日期】 2022-02-20 【修回日期】 2022-05-18

(上接 916 页)

- [16] 库尔班尼沙·阿马洪, 刘辉, 李锦田, 等. 细粒棘球绦虫葡萄糖转运蛋白 GLUT3 的生物信息学分析及系统发育树[J]. 中国病原生物学杂志, 2020, 15(8):910-916.
- [17] Chan M, Sim TS. Functional analysis, overexpression, and kinetic characterization of pyruvate kinase from *Plasmodium falciparum* [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2005, 326(1):188-196.
- [18] Ernest I, Callens M, Uttaro A, et al. Pyruvate kinase of *Trypanosoma brucei*; overexpression, purification, and functional characterization of wild-type and mutated enzyme[J]. Protein Expression Purification, 1998, 13(3):373-382.
- [19] Ernest I, Callens M, Opperdoes F, et al. Pyruvate kinase of *Leishmania mexicana mexicana*. Cloning and analysis of the gene, overexpression in *Escherichia coli* and characterization of the enzyme[J]. Mol Biochem Parasitol, 1994, 64(1):43-54.
- [20] Xia N, Ye S, Liang X, et al. Pyruvate Homeostasis as a Determinant of Parasite Growth and Metabolic Plasticity in *Toxoplasma gondii* [J]. mBio, 2019, 10(3):e00898-19.
- [21] Chan M, Sim T. Functional analysis, overexpression, and kinetic characterization of pyruvate kinase from *Plasmodium falciparum* [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2005, 326(1):188-196.
- [22] Xiao S, Feng J, Yao M. Effect of antihydrid drugs on carbohydrate metabolism of metacystode of *Echinococcus granulosus* [J]. Chin Med J, 1995, 108(9):682-688.
- [23] Schormann N, Hayden K, Lee P, et al. An overview of structure, function, and regulation of pyruvate kinases [J]. Protein Sci: a publication Protein Soc, 2019, 28(10):1771-1784.
- 【收稿日期】 2022-03-17 【修回日期】 2022-06-03