

## 研究报告



## 48 株爱德华氏菌糖酵解持家酶的胞外分泌

周翔宇 吴海珍\*

生物反应器工程国家重点实验室 应用生物学系 华东理工大学 上海 200237

**摘要:**【背景】病原菌的糖酵解持家酶能分泌到胞外或定位在细胞膜表面,在病原菌的侵染和细胞粘附方面发挥着重要作用,爱德华氏菌是重要的鱼类致病菌,研究其糖酵解持家酶的胞外分泌有助于该病原的致病机制研究和疫苗开发。【目的】探究爱德华氏菌中糖酵解持家酶的胞外分泌。【方法】通过 ELISA 方法考察 48 种不同来源的爱德华氏菌中 5 种糖酵解持家酶的胞外分泌。【结果】48 种不同来源的爱德华氏菌中糖酵解持家酶蛋白均能分泌到胞外。【结论】爱德华氏菌中糖酵解持家酶的胞外分泌是普遍现象。

**关键词:** 爱德华氏菌, 糖酵解持家酶, 胞外分泌, ELISA

## Extracellular secretion of glycolytic housekeeping enzymes in 48 strains of *Edwardsiella*

ZHOU Xiang-Yu WU Hai-Zhen\*

State Key Laboratory of Bioreactor Engineering, School of Biotechnology, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China

**Abstract:** [Background] The glycolytic housekeeping enzyme can be secreted to the extracellular matrix or located on the surface of the cell membrane, which plays an important role in the infection and cell adhesion of pathogen. The study of the secretion of glycolytic housekeeping enzymes in *Edwardsiella*, which is an important fish pathogen, is benefit to its pathogenesis and vaccine development. [Objective] To explore the secretion of housekeeping enzymes in glycolysis of *Edwardsiella*. [Methods] With ELISA, five housekeeping enzymes in the extracellular proteins from 48 different strains of *Edwardsiella* was investigated. [Results] Five glycolytic enzymes are widespread in the extracellular protein of 48 strains of *Edwardsiella*. [Conclusion] Extracellular secretion of glycolytic enzymes in *Edwardsiella* is a common phenomenon.

**Keywords:** *Edwardsiella*, Glycolytic housekeeping enzyme, Extracellular secretion, ELISA

糖酵解酶普遍存在于生物体内,参与基础代谢,不同物种间同源度高。众多研究表明,病原菌的糖酵解途径中多种酶蛋白均为兼职功能蛋白

(Moonlight protein)<sup>[1-2]</sup>,除了参与糖代谢相关过程,还能定位在细胞膜表面或分泌到胞外,与病原菌的毒力相关,并具有一定的免疫原性。3-磷酸甘油醛

**Foundation items:** National Natural Science Foundation of China (31872608, 31372550)

\*Corresponding author: Tel: 86-21-64252507; E-mail: wuhzh@ecust.edu.cn

Received: 18-07-2018; Accepted: 05-11-2018; Published online: 08-11-2018

基金项目: 国家自然科学基金(31872608, 31372550)

\*通信作者: Tel: 021-64252507; E-mail: wuhzh@ecust.edu.cn

收稿日期: 2018-07-18; 接受日期: 2018-11-05; 网络首发日期: 2018-11-08

脱氢酶(Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)是糖酵解途径中关键酶之一,在胞质中将催化 3-磷酸甘油醛生成 1,3-二磷酸甘油酸。在众多病原中均发现该酶蛋白能定位于细胞表面或者分泌到细胞外基质,在多房棘球绦虫(*Echinococcus multilocularis*)、盘尾丝虫(*Onchocerca volvulus*)、乳房链球菌(*Streptococcus uberis*)、肺炎链球菌(*S. pneumoniae*)、金黄色葡萄球菌(*S. aureus*)、牛支原体(*Mycoplasma bovis*)、炭疽芽孢杆菌(*Bacillus anthracis*)、牛布氏杆菌(*Brucella abortus*)、猪附红细胞体(*Mycoplasma suis*)、哈氏弧菌(*V. harveyi*)、迟钝爱德华氏菌(*Edwardsiella tarda*)和海豚链球菌(*S. iniae*)等在内的病原中均具有良好的免疫原性<sup>[3]</sup>,可用于疫苗的开发。

果糖 1,6-二磷酸醛缩酶(Fructose-1,6-bisphosphate aldolases, FBA)同 GAPDH 一样,也是糖酵解途径中的关键酶之一,在胞质中将二磷酸果糖分解成磷酸二羟丙酮和三磷酸甘油醛。众多研究也发现该蛋白具有良好的免疫原性,例如,盘尾丝虫的 FBA 重组表达免疫小鼠后,幼虫攻毒实验表明免疫组相比对照组幼虫存活率降低了 50%<sup>[4]</sup>;曼氏血吸虫的 FBA 重组表达后免疫小鼠,攻毒实验表明免疫组的相对免疫保护率达 57%<sup>[5]</sup>;肺炎链球菌的 FBA 重组表达后免疫小鼠,对照组小鼠攻毒后 5 d 全部死亡,而免疫组小鼠在攻毒后 21 d 死亡率仅为 36%<sup>[6]</sup>。

糖酵解途径中的磷酸丙糖异构酶(Triose phosphate isomerase, TPI),催化丙糖磷酸甘油醛转化形成二羟丙酮磷酸甘油醛,在马来丝虫(*Brugia malayi*)被证明是一个潜在的免疫靶点<sup>[7]</sup>。磷酸甘油酸激酶(Phosphoglycerate kinase, PGK)催化 1,3-二磷酸甘油酸转化为 3-磷酸甘油酸,在真菌白色念珠菌(*Candida albicans*)中被证实是一种新型的抗原蛋白<sup>[8]</sup>。烯醇化酶(Enolase, ENO)催化 2-磷酸-D-甘油酸生成磷酸烯醇式丙酮酸,远缘链球菌(*S. sobrinus*)的 ENO 在侵染过程中能抑制宿主细胞的特异性免疫反应<sup>[9]</sup>,其重组蛋白具有良好的免疫保护力<sup>[10]</sup>。

我们的研究还发现,来源于迟钝爱德华氏菌(现命名为杀鱼爱德华氏菌)的 GAPDH<sup>[11-12]</sup>、FBA<sup>[13]</sup>、PGK 和 ENO<sup>[14]</sup>均具有良好的免疫保护作用,重组蛋白免疫大菱鲆后,免疫鱼体的抗血清和嗜水气单胞菌、鳃弧菌、溶藻弧菌和哈氏弧菌均呈阳性反应,表明糖酵解持家酶蛋白具有较好的广谱性,可用于多种病原的免疫防治<sup>[14]</sup>。

爱德华氏菌是重要的经济鱼类致病菌,已经在包括大菱鲆、牙鲆罗非鱼等多种鱼类中引起了病害,给水产养殖业造成了巨大损失。前期研究中,我们针对来源于杀鱼爱德华氏菌的多个糖酵解持家酶重组蛋白进行了免疫保护分析,基于它们良好的免疫保护作用,本文针对 48 株爱德华氏菌(*Edwardsiella* sp.)的胞外蛋白的含量进行了定量分析,以研究其胞外分泌的含量与病原菌的毒力及种属等是否存在一定的相关性,为后续糖酵解持家酶作为疫苗开发的新靶点奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 菌株、质粒与培养基

48 株不同来源的爱德华氏菌均为本实验室保藏菌株,如表 1 所示。部分毒株感染宿主引起的死亡率(Mortality)的分析由本实验王亚敏博士等完成<sup>[15]</sup>,死亡率越高表示该毒株的毒力越强。大肠杆菌(*Escherichia coli*)感受态细胞 DH5 $\alpha$  和 BL21(DE3),天根生化科技(北京)有限公司。pMD 19-T Simple Vector,宝生物工程(大连)有限公司,pET-28a(+),Novagen 公司。LB 培养基(g/L): NaCl 10.0、胰蛋白胨 10.0 (Oxoid,赛默飞世尔科技有限公司)、酵母提取物(Oxoid) 5.0,固体培养基加入琼脂粉(上海捷倍思基因技术有限公司) 17.5,用去离子水配置,1 $\times 10^5$  Pa 灭菌 20 min,用于爱德华氏菌和大肠杆菌的培养。DHL 固体培养基(g/L): DHL 培养基粉末 64.6 (上海盛思生化科技有限公司),用去离子水配置,微波炉加热至沸腾 3 次,用于爱德华氏菌的筛查培养。

表 1 48 株不同来源爱德华氏菌

Table 1 48 strains of *Edwardsiella* from different origins

菌株 Strains	宿主 Host	来源 Origin	死亡率 Mortality (%)
<i>E. anguillarum</i> ET081126R	American eel	Fujian, China	100
<i>E. anguillarum</i> BYK00685	Unknown	Jiangxi, China	—
<i>E. anguillarum</i> BYK00691	Unknown	Jiangxi, China	—
<i>E. anguillarum</i> ET070829	Marbled eel	Fujian, China	—
<i>E. anguillarum</i> ET080729	Marbled eel	Fujian, China	73.7
<i>E. anguillarum</i> ET080813	Japanese eel	Fujian, China	46.2
<i>E. anguillarum</i> ET080814	Japanese eel	Fujian, China	—
<i>E. piscicida</i> BYK00679	Olive Flounder	Anhui, China	52.4
<i>E. piscicida</i> BYK00680	Unknown	Anhui, China	—
<i>E. piscicida</i> CGH9	African catfish	India	—
<i>E. piscicida</i> CGK1	African catfish	India	—
<i>E. piscicida</i> CW7	Mediterranean Turbot	Shandong, China	—
<i>E. piscicida</i> EIB2	Olive Flounder	Shandong, China	—
<i>E. piscicida</i> EIB11	Olive Flounder	Shandong, China	—
<i>E. piscicida</i> EIB12	Olive Flounder	Shandong, China	—
<i>E. piscicida</i> EIB17	Olive Flounder	Shandong, China	—
<i>E. piscicida</i> EIB18	Olive Flounder	Shandong, China	—
<i>E. piscicida</i> TX-1	Olive Flounder	Shandong, China	40.0
<i>E. piscicida</i> TX-42	Olive Flounder	Shandong, China	—
<i>E. piscicida</i> EIB05-1	Olive Flounder	Shandong, China	92.8
<i>E. piscicida</i> EIB103	Mediterranean Turbot	Shandong, China	—
<i>E. piscicida</i> EIB107	Mediterranean Turbot	Shandong, China	—
<i>E. piscicida</i> EIB15	Mediterranean Turbot	Shandong, China	—
<i>E. piscicida</i> EIB202	Mediterranean Turbot	Shandong, China	59.7
<i>E. piscicida</i> EIB203	Mediterranean Turbot	Shandong, China	—
<i>E. piscicida</i> EIB306	Mediterranean Turbot	Shandong, China	—
<i>E. piscicida</i> EIB307	Mediterranean Turbot	Shandong, China	—
<i>E. piscicida</i> ET-Mo	Mediterranean Turbot	Shandong, China	35.1
<i>E. piscicida</i> ET-Wang	Mediterranean Turbot	Shandong, China	—
<i>E. piscicida</i> WY28	Mediterranean Turbot	Shandong, China	52.6
<i>E. piscicida</i> WY37	Mediterranean Turbot	Shandong, China	—
<i>E. piscicida</i> LTB4	Mediterranean Turbot	Shandong, China	94.1
<i>E. piscicida</i> ET080805	Marbled eel	Fujian, China	—
<i>E. piscicida</i> ETG	Korean catfish	South Korean	—
<i>E. piscicida</i> L-49231	Turbot	Liaoning, China	32.4
<i>E. piscicida</i> PB46	<i>Pangas catfish</i>	India	—
<i>E. piscicida</i> PPD130/91	<i>Serpae tetra</i>	Singapore	77.6
<i>E. tarda</i> ATCC15947	Human feces	Kentucky, USA	13.5
<i>E. tarda</i> ATCC23692	Human feces	USA	5.42
<i>E. tarda</i> DT	Oscar fish	Guangdong, China	2.94
<i>E. tarda</i> ET13	Human feces	USA	—
<i>E. tarda</i> ET14	Human feces	USA	—
<i>E. tarda</i> ET19	Human feces	USA	—
<i>E. tarda</i> ET20	Human feces	USA	—
<i>E. tarda</i> ET7	Human feces	USA	—
<i>E. tarda</i> TL1m	Unknown	Zhejiang, China	—
<i>E. tarda</i> TL5m	Unknown	Zhejiang, China	—
HLY1	Unknown	Unknown	—
LN091124	Unknown	Unknown	—

1.1.2 主要试剂和仪器

分子克隆中所用到的 *Pfu* 和 *Taq* DNA 聚合酶、DNA Marker、Loading Buffer、细菌基因组抽提试剂盒、质粒抽提试剂盒、DNA 纯化回收试剂盒、Bradford 蛋白浓度测定试剂盒、TMB 底物等，天根生化科技(北京)有限公司；抗生素，INALCO 公司；限制性内切酶，NEB 公司；DMEM 培养基、胰蛋白酶和胎牛血清(FBS)，Thermo Fisher Scientific 公司；SDS-PAGE 相关试剂和牛血清白蛋白，生工生物工程(上海)股份有限公司；蛋白 Marker，Tanon 公司；Anti-FBA、Anti-GAPDH、Anti-TPI、Anti-PGK、Anti-ENO 兔源定制抗体，上海吉尔生化公司；常规羊抗兔二抗、羊抗鼠二抗和 ECL 化学发光检测 Kit，康为世纪生物科技有限公司；PBST 和 PBSTB，上海哈灵生物科技有限公司。

镍柱，GE Healthcare 公司；MasterCycler pro 梯度 PCR 仪，艾本德中国有限公司；核酸定量仪，赛默飞世尔科技有限公司；多功能酶标仪，伯乐生命科学产品(上海)有限公司。

1.1.3 引物合成与测序

引物合成由上海捷瑞生物工程有限公司完成，测序工作由苏州金唯智生物科技有限公司完成，引

物列表见表 2。

1.2 方法

1.2.1 杀鱼爱德华氏菌 EIB202 糖酵解酶重组表达载体的构建

本研究克隆表达了 5 种糖酵解酶蛋白编码基因：FBA、GAPDH、TPI、PGK 和 ENO。

利用细菌基因组提取试剂盒提取 EIB202 基因组，测定浓度，按比例稀释到 100 ng/μL，作为 PCR 的模板。按照如下体系和条件进行 PCR 扩增。PCR 反应体系(50 μL)：正、反向引物(5 μmol/L)各 1 μL，模板(100 ng/L) 1 μL，2×*Pfu* Mix 25 μL，ddH<sub>2</sub>O 22 μL。PCR 反应条件：95 °C 5 min；95 °C 30 s，按照引物 *T<sub>m</sub>* 值设定，退火 30 s；72 °C，按照目的片段长度设定(大约 1 min/kb)，35 个循环；72 °C 7 min；4 °C 10 min。PCR 产物通过琼脂糖凝胶电泳分离并利用 DNA 回收试剂盒进行目的片段回收。回收后的片段在 16 °C 下与 pMD 19-T Simple Vector 连接 3 h 后，热激法转化至 DH5α 感受态细胞中，37 °C 培养 12–16 h。挑选阳性克隆 37 °C、190 r/min 培养，利用质粒抽提试剂盒提取重组质粒和 pET-28a(+)质粒，将二者分别进行双酶切(*Bam*H I/*Xho* I)并电泳，割胶回收后得到有相同粘性末端的载体与外源 DNA 片段，利用 DNA 连接酶将二者连接构成重组

表 2 引物设计

Table 2 Primers used in this study

引物 Primers	基因 Gene	引物序列 Primer sequence (5'→3')
M13-F	—	CGCCAGGGTTTTCCAGTCACGAC
M13-R	—	CAGGAAACAGCTATGACC
T7	—	TAATACGACTCACTATAGGG
T7-Ter	—	TGCTAGTTATTGCTCAGCGG
fba-F	<i>fba</i>	CGCGGATCCATGTCTAAAATCTTTGACTTT
fba-R		CCGCTCGAGCAGCACGTCGATGCAG
gapdh-F	<i>gapdh</i>	GTGGGATCCATGACTATCAAAGTAGGTAT
gapdh-R		TGCTCTCGAGCTTAGAGATGTGTGC
tpi-F	<i>tpi</i>	CGCGGATCCATGCGTCAACC44AGTTAT
tpi-R		CCGCTCGAGTTAGGCTTTAGCGGCAGCGG
pgk-F	<i>pgk</i>	CGCGGATCCATGTCCAAAATCGTTAAAGTC
pgk-R		CCGCTCGAGTTACTGCTTGGCGCGCTCTTC
eno-F	<i>eno</i>	CGCGGATCCATGTCCAAAATCGTTAAAGTC
eno-R		CCGCTCGAGTTAATGCTGGCCTTTCACTTCTT

质粒。将重组质粒转化至 BL21(DE3)感受态细胞中,挑取单克隆运用 T7 引物进行菌落 PCR 验证,将阳性克隆送苏州金唯智生物科技有限公司测序。

### 1.2.2 糖酵解酶蛋白的重组表达与纯化

将测序准确的菌株在 37 °C、190 r/min 培养 2 h 后,加 IPTG 诱导(终浓度 1 mmol/L)表达 3 h。4 °C、5 000×g 离心 10 min 收菌, Binding buffer (咪唑 20 mmol/L, pH 7.4)洗涤 2 遍后经超声破碎取上清,镍柱亲和层析纯化,并进行 SDS-PAGE 分析。

### 1.2.3 多克隆抗体制备

将 1.2.2 纯化后的 5 种重组蛋白送上海吉尔生化公司进行多克隆抗体的制备。

### 1.2.4 不同来源爱德华氏菌的胞外分泌情况

多克隆抗体制备成功后,利用 ELISA 的方法对不同来源爱德华氏菌的胞外蛋白中糖酵解酶含量进行定量分析。

爱德华氏菌培养:首先进行活化培养,48 株菌均先吸取 100 μL 保种管中的菌液涂布于 DHL 平板上,30 °C 培养 24 h。然后进行一级和二级培养,其中一级用 LB 培养基,30 °C、190 r/min 培养 14 h,二级种按 1%接种量用 DMEM 培养基在 30 °C 下静置培养 24 h。一级和二级培养均使用容积为 50 mL 的锥形瓶进行培养。

胞外蛋白的提取:菌体二级培养完成后取等菌体量的培养菌液(约 1 mL)至 Eppendorf 管中,5 000×g 离心 20 min。吸取 800 μL 上清至新 Eppendorf 管中,再次 5 000×g 离心 20 min,上清液即为胞外蛋白组分。

酶联免疫吸附试验(ELISA):在酶标板的孔中加入 200 μL 胞外蛋白(n=3),DMEM 为空白对照,4 °C 包被过夜;倒掉包被液,PBST 洗涤 3 次;每孔加入 200 μL PBSTB,37 °C 封闭 2 h;倒掉封闭液,PBST 洗涤 3 次;按 1:1 000 的比例将一抗稀释在 PBSTB 中,每孔中加入 100 μL 一抗稀释液,37 °C 孵育 3 h;倒掉一抗,PBST 洗涤 5 次;按照二抗说明书上的比例将其稀释在 PBSTB 中,每孔中加入 100 μL 二抗稀释液,37 °C 孵育 3 h;倒掉二抗,PBST 洗涤 5 次;每孔加入 100 μL TMB 底物,37 °C 避光放置 10 min;每孔加入 50 μL 2 mol/L 硫酸终止,在酶标仪中检测  $OD_{450}$ 。

## 2 结果与分析

### 2.1 5 种糖酵解酶重组表达载体的构建

按照 1.2.1 构建重组表达质粒,转化至大肠杆菌 BL21(DE3)后,挑选单克隆,利用 T7 引物进行菌落 PCR 验证,结果如图 1 所示。由于 T7 promoter

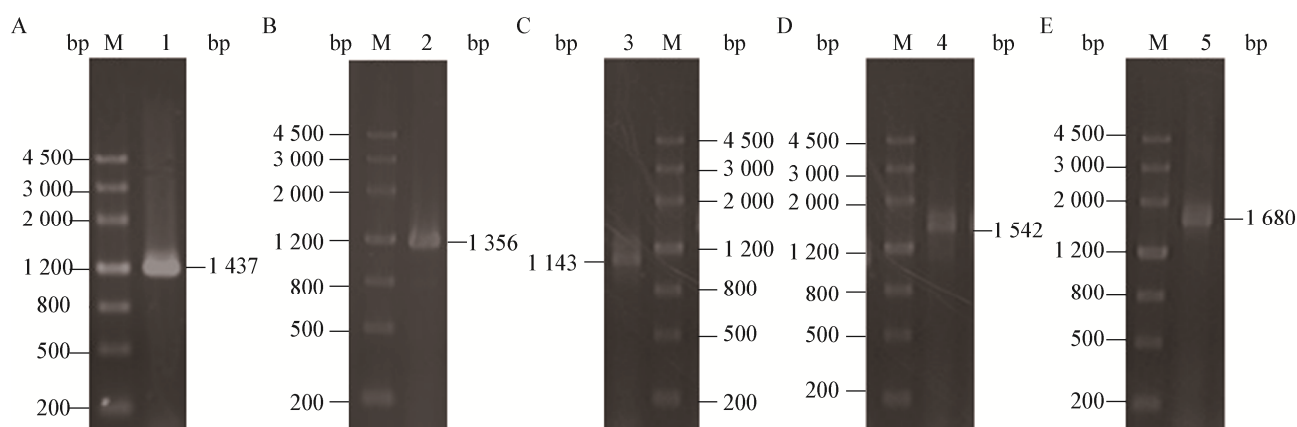


图 1 5 种糖酵解持家酶重组表达质粒的菌落 PCR 鉴定

Figure 1 Colony PCR products of five different glycolytic housekeeping enzyme recombination expressing plasmids

Note: M: 5 000 bp DNA Maker. A: FBA, 1 077 bp; B: GAPDH, 996 bp; C: TPI, 783 bp; D: PGK, 1 182 bp; E: ENO, 1 320 bp; 1: pET28a-FBA; 2: pET28a-GAPDH; 3: pET28a-TPI; 4: pET28a-PGK; 5: pET28a-ENO.

和 T7 terminator 之间还有 360 bp 的距离, 因此图 1 中所示的条带大小与目的片段 *fba* (1 077 bp)、*gapdh* (996 bp)、*tpi* (783 bp)、*pgk* (1 182 bp) 和 *eno* (1 320 bp) 一致, 说明挑选的克隆为阳性克隆。进一步经测序分析发现碱基序列与杀鱼爱德华氏菌 EIB202 基因组序列完全一致, 表明重组表达载体构建成功。

## 2.2 5 种糖酵解酶重组蛋白的表达纯化

按照 1.2.2 的方法对 5 种重组蛋白进行了表达与纯化。诱导前、诱导后和纯化后的蛋白经过 SDS-PAGE 和考马斯亮蓝染色, 结果如图 2 所示。以 FBA 为例, 第 1 泳道为 FBA 重组表达菌株在 IPTG 诱导前的全菌蛋白, 第 2 泳道为 FBA 重组表达菌株在 IPTG 诱导后的全菌蛋白, 可见在 37 kD 附近的蛋白量明显增加; 第 3 泳道为经镍柱纯化后的 FBA 重组蛋白, 其条带大小与预期大小一致。其他 4 种重组蛋白纯化后的大小也符合预期, 且蛋白条带单一, 因此获得了 5 种糖酵解酶蛋白的重组蛋白, 用于后续多克隆抗体的制备。

## 2.3 ELISA 量化分析方法的建立

将纯化后的重组蛋白送至上海吉尔生化公司制备多克隆抗体, 对得到的抗体进行稀释倍数的优

化, 用于后续利用 ELISA 定量分析不同来源爱德华氏菌胞外蛋白中的糖酵解酶含量。

优化实验中按照 1.2.4 方法进行实验, 采用 *E. piscicida* EIB202 的胞外蛋白进行包板, 多克隆抗体稀释 500、1 000 和 2 000 倍。结果如图 3 所示选定 Anti-FBA 和 Anti-GAPDH 的稀释倍数为 500 倍, Anti-TPI、Anti-PGK 和 Anti-ENO 的稀释倍数为 1 000 倍, 进行后续的 ELISA 分析。

## 2.4 爱德华氏菌胞外蛋白中糖酵解酶含量的分析

为了探究不同来源爱德华氏菌胞外蛋白中糖酵解酶的含量与其毒力、种属等是否有相关性, 提取表 1 中全部菌株的胞外蛋白后, 运用 ELISA 对其中 5 种糖酵解蛋白进行了含量分析。结果如图 4 所示, 作为胞内发挥作用的糖酵解持家酶, 在胞外蛋白中普遍存在, 推测可能发挥一些非糖酵解的功能。另一方面不同菌株间糖酵解酶蛋白在胞外的分泌量存在一定差距, 且分泌量与各毒株间的毒力并无明显相关性; 同一种属的菌株, 其胞外的分泌量较相似。而 *E. tarda* ET7 菌株的糖酵解酶蛋白的胞外分泌量则明显高于其他菌株。

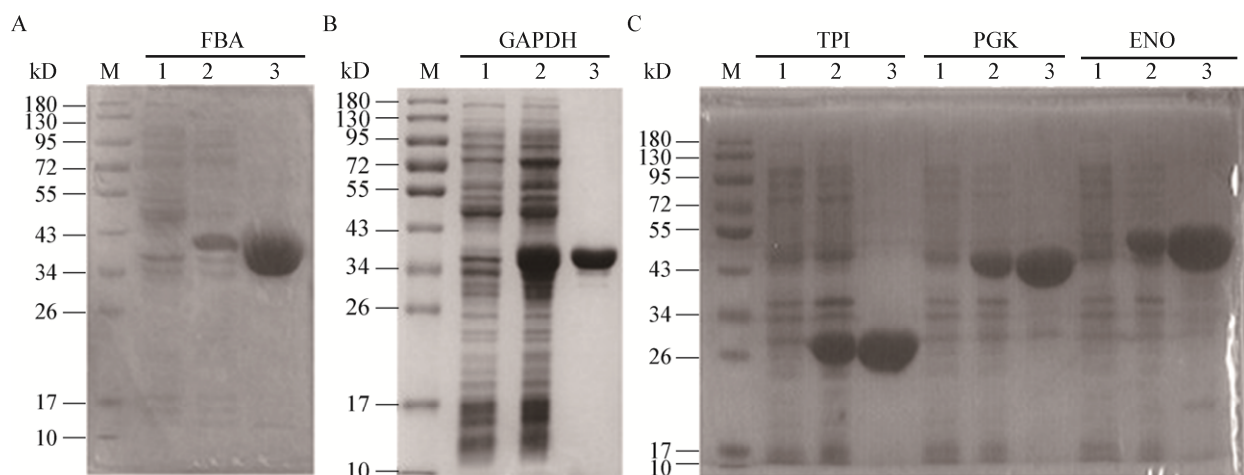


图 2 5 种糖酵解持家酶重组表达与纯化结果

Figure 2 SDS-PAGE analysis of five different recombinant proteins from *Edwardsiella piscicida* EIB202

注: A: FBA, 40 kD; B: GAPDH, 37 kD; C: TPI, 26 kD; PGK, 40 kD; ENO, 45 kD; 1: 诱导前全菌蛋白; 2: 诱导后全菌蛋白; 3:  $\text{Ni}^{2+}$ 亲和层析纯化蛋白。M: 蛋白标准分子量。

Note: A: FBA, 40 kD; B: GAPDH, 37 kD; C: TPI, 26 kD; PGK, 40 kD; ENO, 45 kD; 1-3: Whole-cell protein of recombinant proteins before induced, after induced and after purified by  $\text{Ni}^{2+}$  affinity chromatography, respectively; M: Protein Marker.



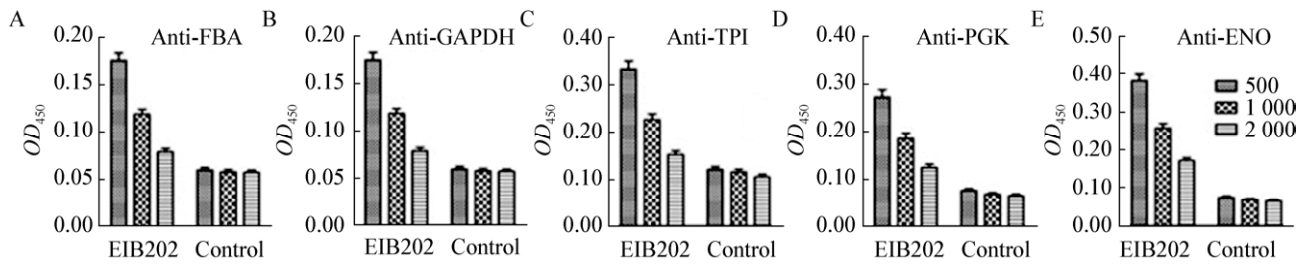


图3 基于ELISA实验的5种糖酵解酶多克隆抗体稀释倍数的优化

Figure 3 Optimization for dilution ratio of polyclonal antibodies of five glycolytic enzymes based on ELISA assay

Note: A: Anti-FBA; B: Anti-GAPDH; C: Anti-TPI; D: Anti-PGK; E: Anti-ENO.

### 3 讨论与结论

众多的研究发现糖酵解途径中 GAPDH、FBA 和 TPI 等酶蛋白具有良好的免疫原性, 其正逐渐成为疫苗设计的新靶点。对于这些持家酶蛋白的胞外分泌及在病原菌中对毒力与致病机制的研究也逐渐被人们所关注。

Terao 等发现生脓链球菌(*Pyogenic streptococcus*) 中 GAPDH 定位在细胞表面, 并与免疫逃脱密切相关<sup>[16]</sup>; Egea 等发现在大肠杆菌 EPEC 中, GAPDH 分泌到胞外的同时也存在于细胞膜表面, 而在非致病的大肠杆菌中则不分泌到胞外<sup>[17]</sup>, 且 Alves 等证

实其通过 III 型分泌系统分泌到胞外, 分泌过程需要分子伴侣的帮助<sup>[18]</sup>; Oliveira 等则发现 B 群链球菌中 GAPDH 存在于细胞表面是先通过菌体裂解的方式进入到胞外后又以一种未知的机制重新定位到细胞表面<sup>[19]</sup>; 后续的研究陆续发现该蛋白在众多链球菌属病原菌中均能定位于细胞表面或者分泌到细胞外基质环境, 与病原的粘附、内化等毒力密切相关, 在芽胞杆菌、大肠杆菌、脑膜炎奈瑟菌等病原菌的致病机制和乳杆菌免疫增益作用研究中也发现其能定位于细胞表面, 同时该蛋白也能定位于阿米巴等病原虫细胞表面<sup>[3,20]</sup>。

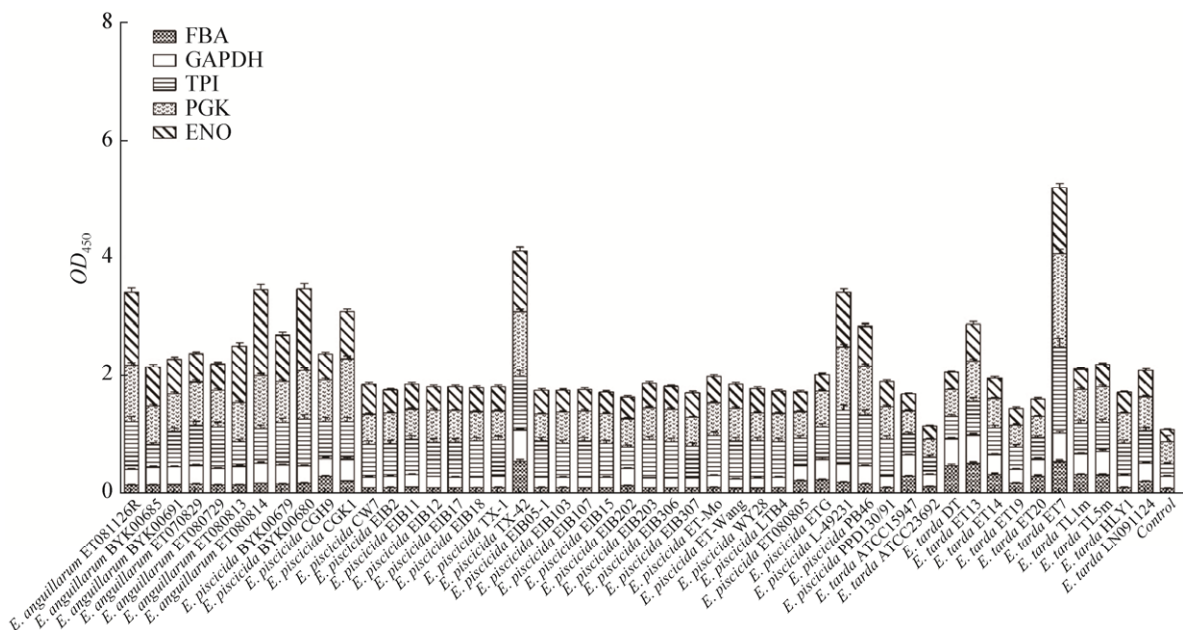


图4 48株爱德华氏菌胞外蛋白中5种糖酵解酶的含量分析

Figure 4 The  $OD_{450}$  of five glycolytic enzymes in extracellular protein of 48 different strains of *Edwardsiella*

相对于 GAPDH 胞外分泌和非糖酵解功能的深入研究, 其他持家酶蛋白的研究报道较少。其中 Tunio 等发现脑膜炎双球菌中的 FBA 虽缺少可鉴定的分泌信号, 但是其可分泌到细胞表面, 在细胞粘附方面具有重要作用<sup>[21]</sup>。Yamaguchi 等通过实验证明 TPI 存在于金黄色葡萄球菌的表面, 识别葡萄糖醛酸木糖甘露聚糖并与之绑定<sup>[22]</sup>。ENO 在嗜水气单胞菌中发现定位于细胞膜表面, 能与宿主的纤维蛋白溶酶原结合<sup>[23]</sup>; 在幼虫芽孢杆菌(*Paenibacillus larvae*)也发现其能分泌到胞外, 是感染蜜蜂幼虫过程中的重要毒力因子<sup>[24]</sup>。本工作则第一次较全面地调研了爱德华氏菌中 5 个持家酶蛋白 GAPDH、FBA、TPI、PGK 和 ENO 的胞外分泌情况, 研究中还针对 RNA 聚合酶<sup>[25]</sup>这一胞内蛋白进行了 Western blotting, 证实了这些胞外分泌不是由病原菌裂解而产生的假象。相较于目前文献报道中多个病原菌仅单个糖酵解持家酶蛋白的胞外分泌, 我们的研究发现爱德华氏菌中糖酵解持家酶蛋白分泌到胞外是普遍现象, 未来将对这些持家酶胞外分泌等非糖酵解功能进行系统深入的调研, 以期了解它们在病原菌致病机制中的作用。

## REFERENCES

- [1] Henderson B, Martin A. Bacterial virulence in the moonlight: multitasking bacterial moonlighting proteins are virulence determinants in infectious disease[J]. *Infection and Immunity*, 2011, 79(9): 3476-3491
- [2] Henderson B. An overview of protein moonlighting in bacterial infection[J]. *Biochemical Society Transactions*, 2014, 42(6): 1720-1727
- [3] Perez-Casal J, Potter AA. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase as a suitable vaccine candidate for protection against bacterial and parasitic diseases[J]. *Vaccine*, 2016, 34(8): 1012-1017
- [4] McCarthy JS, Wieseman M, Tropea J, et al. *Onchocerca volvulus* glycolytic enzyme fructose-1,6-bisphosphate aldolase as a target for a protective immune response in humans[J]. *Infection and Immunity*, 2002, 70(2): 851-858
- [5] Marques HH, Zouain CS, Torres CBB, et al. Protective effect and granuloma down-modulation promoted by RP44 antigen a fructose 1,6 bisphosphate aldolase of *Schistosoma mansoni*[J]. *Immunobiology*, 2008, 213(5): 437-446
- [6] Ling E, Feldman G, Portnoi M, et al. Glycolytic enzymes associated with the cell surface of *Streptococcus pneumoniae* are antigenic in humans and elicit protective immune responses in the mouse[J]. *Clinical & Experimental Immunology*, 2004, 138(2): 290-298
- [7] Hewitson JP, Rückerl D, Harcus Y, et al. The secreted triose phosphate isomerase of *Brugia malayi* is required to sustain microfilaria production *in vivo*[J]. *PLoS Pathogen*, 2014, 10(2): e1003930
- [8] Calcedo R, Ramirez-Garcia A, Abad A, et al. Phosphoglycerate kinase and fructose bisphosphate aldolase of *Candida albicans* as new antigens recognized by human salivary IgA[J]. *Revista Iberoamericana de Micologia*, 2012, 29(3): 172-174
- [9] Veiga-Malta I, Duarte M, Dinis M, et al. Enolase from *Streptococcus sobrinus* is an immunosuppressive protein[J]. *Cellular Microbiology*, 2004, 6(1): 79-88
- [10] Dinis M, Tavares D, Veiga-Malta I, et al. Oral therapeutic vaccination with *Streptococcus sobrinus* recombinant enolase confers protection against dental caries in rats[J]. *The Journal of Infectious Disease*, 2009, 199(1): 116-123
- [11] Li X, Wu H, Zhang M, et al. Secreted glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase as a broad spectrum vaccine candidate against microbial infection in aquaculture[J]. *Letters of Applied Microbiology*, 2012, 54(1): 1-9
- [12] Liang SQ, Wu HZ, Liu B, et al. Immune response of turbot (*Scophthalmus maximus* L.) to a broad spectrum vaccine candidate, recombinant glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Edwardsiella tarda*[J]. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 2012, 150(3/4): 198-205
- [13] Sun ZY, Shen BB, Wu HZ, et al. The secreted fructose 1,6-bisphosphate aldolase as a broad spectrum vaccine candidate against pathogenic bacteria in aquaculture[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2015, 46(2): 638-647
- [14] Liu XH, Sun JM, Wu HZ. Glycolysis-related proteins are broad spectrum vaccine candidates against aquacultural pathogens[J]. *Vaccine*, 2017, 35(31): 3813-3816
- [15] Wang YM, Wang QY, Xiao JF, et al. Genetic relationships of *Edwardsiella* strains isolated in China aquaculture revealed by rep-PCR genomic fingerprinting and investigation of *Edwardsiella* virulence genes[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2011, 111(6): 1337-1348
- [16] Terao Y, Yamaguchi M, Hamada S, et al. Multifunctional glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Streptococcus pyogenes* is essential for evasion from neutrophils[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2006, 281(20): 14215-14223
- [17] Egea L, Aguilera L, Giménez R, et al. Role of secreted glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in the infection mechanism of enterohemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli*: interaction of the extracellular enzyme with human plasminogen and fibrinogen[J]. *The International Journal of Biochemistry &*



Cell Biology, 2007, 39(6): 1190-1203

- [18] Alves J, Madureira P, Baltazar MT, et al. A safe and stable neonatal vaccine targeting GAPDH confers protection against Group B streptococcus infections in adult susceptible mice[J]. PLoS One, 2015, 10(12): e0144196
- [19] Oliveira L, Madureira P, Andrade EB, et al. Group B streptococcus GAPDH is released upon cell lysis, associates with bacterial surface, and induces apoptosis in murine macrophages[J]. PLoS One, 2012, 7(1): e29963
- [20] Gómez-Arreaza A, Acosta H, Quiñones W, et al. Extracellular functions of glycolytic enzymes of parasites: unpredicted use of ancient proteins[J]. Molecular and Biochemical Parasitology, 2014, 193(2): 75-81
- [21] Tunio SA, Oldfield NJ, Berry A, et al. The moonlighting protein fructose-1,6-bisphosphate aldolase of *Neisseria meningitidis*: surface localization and role in host cell adhesion[J]. Molecular Microbiology, 2010, 76(3): 605-615
- [22] Yamaguchi M, Ikeda R, Nishimura M, et al. Localization by scanning immunoelectron microscopy of triosephosphate isomerase, the molecules responsible for contact-mediated killing of *Cryptococcus*, on the surface of *Staphylococcus*[J]. Microbiology and Immunology, 2010, 54(6): 368-370
- [23] Sha J, Erova TE, Alyea RA, et al. Surface-expressed enolase contributes to the pathogenesis of clinical isolate SSU of *Aeromonas hydrophila*[J]. Journal of Bacteriology, 2009, 191(9): 3095-3107
- [24] Antúnez K, Anido M, Arredondo D, et al. *Paenibacillus larvae* enolase as a virulence factor in honeybee larvae infection[J]. Veterinary Microbiology, 2011, 147(1/2): 83-89
- [25] Deng J, Wu HZ. Regulation of GAPDH secretion in *Edwardsiella tarda*[J]. Microbiology China, 2017, 44(10): 2398-2406 (in Chinese)
- 邓佳, 吴海珍. 迟缓爱德华氏菌中甘油醛-3-磷酸脱氢酶的胞外分泌调控[J]. 微生物学通报, 2017, 44(10): 2398-2406

## 编辑部公告

### 邀请您关注《微生物学通报》公众微信号

为了更好地与读者、作者、审稿专家和编委朋友们及时沟通、方便服务,《微生物学通报》已开通公众微信服务号。作者通过微信能及时收到稿件各流程通知,第一时间了解稿件进程并及时处理;审稿专家和编委可通过微信及时收到审稿邀请,还可通过手机审稿;读者通过微信可了解《微生物学通报》文章目录,查找阅读感兴趣的文章。

#### 关注办法:

- 1、在微信公众号搜索“微生物学通报”或“wswxtb”;
- 2、用微信扫右边二维码:

