

DOI:10.13350/j.cjpb.220908

• 论著 •

曼氏迭宫绦虫异柠檬酸脱氢酶的基因克隆、蛋白表达及其在裂头蚴阶段的转录水平检测分析*

梁鹏¹, 张园元², 符瑞佳^{1,3}, 王大勇³, 梁培^{1,3**}

(1. 海南医学院热带病转化医学教育部重点实验室, 海南海口 571199; 2. 广州金域医学检验中心; 3. 海南大学生命科学与药学院生物技术与分子药理学实验室)

【摘要】 目的 利用生物信息学方法识别和分析曼氏迭宫绦虫异柠檬酸脱氢酶(*SmNAD-IDH*)核苷酸序列及生物学特征;克隆该基因并诱导蛋白表达,分析其在裂头蚴阶段的转录水平。方法 利用生物信息学在线分析工具对*SmNAD-IDH*基因的核苷酸序列进行识别,预测分析氨基酸序列的理化性质。分别以曼氏迭宫绦虫裂头蚴 cDNA、孕节 cDNA 和成节 cDNA 作为模板 PCR 扩增目的基因,扩增产物与表达载体 pET-30a 重组后转化至 BL21 细胞中诱导蛋白表达。利用 real time PCR 技术分析裂头蚴阶段三羧酸循环中 3 个关键代谢酶的转录水平。结果 BLASTx 分析*SmNAD-IDH*基因全长 1 095 bp,编码蛋白由 356 个氨基酸组成。该基因与其他寄生虫同源基因核苷酸序列一致性 > 70%,与人类同源基因核苷酸序列一致性为 51%。该蛋白的理论等电点为 6.84,分子质量为 40 ku,并且氨基酸序列中无信号肽和跨膜区,为脂溶性稳定的胞内蛋白。*SmNAD-IDH*在裂头蚴、成节、孕节中均有表达,在裂头蚴阶段三羧酸循环中的关键酶柠檬酸合成酶、酮戊二酸脱氢酶、*SmNAD-IDH*均有转录,以*SmNAD-IDH*的转录水平较高。结论 成功重组*SmNAD-IDH*基因并诱导*SmNAD-IDH*蛋白表达,该蛋白对于曼氏迭宫绦虫,尤其是裂头蚴,是具有潜在研究价值的重要代谢酶。

【关键词】 曼氏迭宫绦虫; *SmNAD-IDH*; 基因克隆; 蛋白表达; 转录水平

【中图分类号】 R383.3

【文献标识码】 A

【文章编号】 1673-5234(2022)09-1030-05

[*Journal of Pathogen Biology*. 2022 Sep.;17(9): 1030-1034.]

Gene cloning, protein expression and transcription analysis at sparganum development stage of isocitrate dehydrogenase from *Spirometra mansoni*

LIANG Peng¹, ZHANG Yuan-yuan², FU Rui-jia^{1,3}, WANG Da-yong³, LIANG Pei^{1,3} (1. School of Tropical and Laboratory Medicine, Hainan Medical University, Hainan, Haikou, China 571199; 2. Guangzhou King-Med Diagnostics Group Co.; 3. Laboratory of Biotechnology and Molecular Pharmacology, School of Life and Pharmaceutical Sciences, Hainan University)***

【Abstract】 **Objective** To identify the nucleotide sequence and biological characteristics of isocitrate dehydrogenase (*SmNAD-IDH*) from *Spirometra mansoni* by bioinformatics methods, clone the *SmNAD-IDH* gene, induce its protein expression and analyze its transcription level in sparganum stage. **Methods** The nucleotide sequence of *SmNAD-IDH* was identified and predicted its physicochemical properties by using bioinformatics tools. The target genes were amplified by PCR using cDNA of sparganum, mature proglottid, gravid proglottid, as templates. The amplified product was recombined with expression vector pET-30a and transformed into BL21 cells to induce protein expression. In addition, real-time PCR was used to analyze the transcription levels of three key metabolic enzymes in the tricarboxylic acid cycle (TCA) of sparganum. **Results** The total length of nucleotide sequence of *SmNAD-IDH* gene was 1095 bp, and the protein was composed of 356 amino acids by BLASTx. The identities of nucleotide sequence of *SmNAD-IDH* gene were more than 70% consistent with homologous genes of other parasites and 51% consistent with homologous genes of human. The theoretical isoelectric point of the protein molecule is 6.84 and the theoretical molecular weight is 40 ku. There is no signal peptide and no transmembrane region in the amino acid sequence of *SmNAD-IDH*. It is a stable intracellular protein molecule with lipid solubility. *SmNAD-IDH* is expressed in the different development stages of sparganum, mature proglottid, gravid proglottid. Furthermore, the key enzymes of the tricarboxylic acid cycle, such as citrate synthase, ketoglutarate de-

* **【基金项目】** 国家自然科学基金项目(No. 81560332);海南省科协青年科技英才学术创新计划项目(No. QCXM201918);海南省高校科学研究项目(No. SJK180005)。

** **【通讯作者】** 梁培, E-mail: hy0211052@hainmc.edu.cn

【作者简介】 梁鹏(1995-),男,海南琼海人,专科。主要研究方向:医学检验。E-mail:1225208795@qq.com

hydrogenase and *Sm*NAD-IDH, are transcribed in the sparganum development stage, and the transcription level of *Sm*NAD-IDH is higher. **Conclusion** The *Sm*NAD-IDH gene was successfully recombined and its protein was induced to express. The *Sm*NAD-IDH protein is an important metabolic enzyme with potential research value for *Spirometra mansoni*, especially for sparganum.

【Key words】 *Spirometra mansoni*; NAD-IDH; gene cloning; protein expression; transcriptional level analysis

曼氏迭宫绦虫(*Spirometra mansoni*)生活史中需要3个宿主,第一中间宿主是剑水蚤,第二中间宿主为蛙,终宿主要是犬类和猫类^[1]。鸟类、蛇类、猪等动物也可作为转续宿主,而人既可作为第二中间宿主、转续宿主,还可以是终宿主^[2]。与曼氏迭宫绦虫成虫相比较,裂头蚴感染人类导致的危害程度更大,主要原因是裂头蚴有很强的移行能力,移行至皮下、内脏、眼部、脑部等重要部位时引起严重并发症,如在眼部可导致白内障甚至失明,脑部浸润可导致抽搐和瘫痪,甚至死亡^[3-5]。在世界范围内均有曼氏裂头蚴病的病例报道,但主要集中在东南亚地区,我国多见于南方地区,其他中部地区病例报道也逐年增多。据不完全统计,全世界有2 000多例的裂头蚴病病例报道,我国占了70%左右^[6]。人可通过喝生水误食剑水蚤感染裂头蚴,也可因食用生的或半生的青蛙肉或是蛇肉而感染裂头蚴,或用感染裂头蚴的蛙肉或是蛇肉贴在创口治疗疾病而导致感染^[7]。

三羧酸循环是需氧生物体内普遍存在的代谢途径,三羧酸循环是三大营养素,如糖类、脂类、氨基酸的最终代谢通路,也是糖类、脂类、氨基酸代谢的枢纽^[8]。在三羧酸循环中,异柠檬酸脱氢酶(Isocitrate Dehydrogenase, NAD-IDH)主要催化异柠檬酸生成 α -酮戊二酸, NAD-IDH的催化反应是不可逆的,酶的活性一旦失活,对整个物质循环途径都会造成影响^[9]。近年来,在其他寄生虫中也有有关NAD-IDH的研究报道^[10-11],但尚未见关于裂头蚴NAD-IDH的研究报道。裂头蚴主要寄生于青蛙肌肉中并吸取营养。青蛙肌肉中主要含有糖原、氨基酸、葡萄糖等营养物质。目前,在相关曼氏裂头蚴参与糖酵解途径中烯醇酶的研究中发现裂头蚴阶段低葡萄糖更加有利于虫体的生长^[12]。裂头蚴生存中可能利用了该途径产生的能量, NAD-IDH作为此途径中的关键酶分子,在其中可能发挥重要作用。本研究通过对NAD-IDH基因的分子克隆、蛋白表达及其在裂头蚴阶段的转录水平检测分析,为NAD-IDH作为潜在的药物靶点研究奠定基础。

材料与方 法

1 材料

1.1 文库和基因序列 曼氏迭宫绦虫成虫基因组文库由海南医学院病原生物学教研室吕刚等构建,

NAD-IDH全长基因核苷酸序列从文库中调取。

1.2 表达载体质粒和菌株 原核表达载体pET-30a(+)为Kan抗性的全长5 422 bp,含有两个His标签位于其序列两端,由中山大学寄生虫学教研室提供。菌株*E. coli* DH5 α 和BL21(DE3)购于天根生化科技(北京)有限公司。

1.3 主要试剂 PCR mix, DNA标志物DL2000和DL15000,质粒提取试剂盒, DNA琼脂回收试剂盒及GoldView核酸染料均购自北京天根生化科技有限公司; T4-DNA ligase, 限制性内切酶BamHI、HindIII及蛋白分子质量标准购自美国Thermo Fisher Scientific公司; Yeast extract, Tryptone和Trise-Base购于OXOID(英国)公司; 总RNA提取试剂盒购于Qiagen(德国)公司; Taq DNA聚合酶和SYBR Premix EX Taq购于宝生物工程(大连)有限公司。

2 方法

2.1 NAD-IDH基因全长序列的识别 从曼氏迭宫绦虫成虫基因组文库中调取NAD-IDH基因序列,通过ORF Finder在线软件对该序列进行开放阅读框进行预测,通过NCBI网站中的(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)BLASTx程序进行NAD-IDH核苷酸序列与GenBank中的同源核苷酸序列进行比对分析。

2.2 NAD-IDH的生物信息学分析 利用在线软件ExPasy中的ProtParam预测分析NAD-IDH蛋白的理化性质,包括氨基酸组成、等电点、分子量以及在酵母或细菌体内的半衰期等;利用在线网站(<http://www.cbs.dtu.dk/services/>)中的Signal Peptide进行信号肽预测,利用Secretome 2.0a Server进行蛋白非经典途径分泌预测,利用TMHMM预测蛋白氨基酸序列中是否具有跨膜区。

2.3 NAD-IDH基因扩增

2.3.1 引物设计与合成 通过曼氏迭宫绦虫成虫基因组文库调取基因序列,并通过ORF finder确定开放阅读框,利用引物设计软件包(Primer 5.0和DNA club)设计全长基因扩增的特异性引物。上游引物:5'-GAGGATCCATGTTTTTCGAGGCTAGCG-3'(下划线部分为BamHI酶切位点);下游引物:5'-GTA-AGCTTGTGGGCCCTTTTCAAT-3'(下划线部分为HindIII酶切位点)。引物由华大基因有限公司合成。

2.3.2 NAD-IDH 全长基因扩增 从野生青蛙肌肉中分离曼氏迭宫绦虫裂头蚴,曼氏迭从人工感染的猫中分离宫绦虫成虫,利用 RNA 提取试剂盒提取成虫成节、成虫孕节及裂头蚴总 RNA,利用逆转录试剂盒合成 cDNA。以上述 cDNA 作为模板,利用相应特异性引物 PCR 扩增 NAD-IDH 基因全长序列。PCR 反应体系(50 μl):PCR Mix(Taq 聚合酶混合物)25.0 μl,上、下游引物各 2.0 μl,cDNA 模板 2.0 μl,去离子水 19.0 μl。PCR 扩增程序:94 °C 5 min;94 °C 45 s,52 °C 50 s,72 °C 60 s,共 30 个循环;72 °C 10 min。

2.3.3 PCR 产物的纯化回收和 PLB vector 重组质粒的构建 利用 1%琼脂糖凝胶和 DNA 胶纯化试剂盒纯化回收 NAD-IDH 基因 PCR 产物,按照试剂盒说明操作。将回收的目的基因产物与 PLB vector 克隆载体连接,将目的基因进行平端化处理后连接产物转化至大肠埃希菌 DH5α 感受态细胞中,再转至琼脂平板培养基(含 0.1%氨苄青霉素)37 °C 培养 12 h。从平板上挑取生长良好的克隆菌落培养的进行菌液 PCR 验证,阳性者经二次培养后利用质粒提取试剂盒提取重组质粒,交由上海生物生工技术有限公司作测序鉴定。

2.3.4 重组表达质粒的构建 将鉴定正确的 PLB 重组质粒和表达载体 pET-30a(+)分别用限制性内切酶 BamHI 和 HindIII 进行双酶切。酶切体系:酶各加 2 μl,缓冲液 4 μl,去离子水 22 μl,重组质粒或 PET-30a 载体各 10 μl。酶切体系置 37 °C 反应 1 h。酶切产物经 1%琼脂糖凝胶电泳后切胶回收,按照 DNA 纯化试剂盒说明操作。纯化的目的基因酶切产物和 PET-30a 质粒酶切产物在 T4-DNA ligase 作用下连接。连接反应体系:目的基因酶切产物 2.75 μl,表达载体酶切产物 5.4 μl,T4-DNA ligase 1 μl,连接缓冲液 2 μl,加去离子水至 20 μl。连接体系置 4 °C 反应过夜。连接产物利用热休克法转化至 200 μl 大肠埃希菌 DH5α 感受态细胞中,再将大肠埃希菌接种在含卡那霉素的琼脂平板上,37 °C 恒温箱孵育 12 h,挑去阳性克隆菌进行摇菌培养后作测序鉴定。

2.3.5 重组蛋白的诱导表达 将重组质粒通过热休克转化至大肠埃希菌 BL21 表达菌后接种于琼脂平板进行培养。次日挑取阳性克隆,经液体培养基培养后进行菌液 PCR 鉴定。将菌液接种于 5 ml 培养基试管中,以 250 r/min、37 °C 培养 4 h,按照 1:1 000 比例加入 IPTG 进行小量诱导。收集菌液,12 000 r/min 离心,取沉淀进行 12% SDS-PAGE 电泳分析,确定最佳诱导时间。根据最佳诱导时间进行大量诱导,收集菌体,在冰浴上超声破碎,4 °C、12 000 r/min 离心 10 min,分别取上清和沉淀进行 12% SDS-PAGE 电泳分析。

2.3.6 裂头蚴三羧酸循环途径中关键酶的转录水平 从感染裂头蚴的青蛙肌肉中分离裂头蚴,利用 RNA 提取试剂盒提取总 RNA,逆转录合成 cDNA,以相应基因引物(表 1)进行扩增,以不加模板作为空白对照。反应体系:SYBR Premix Ex Taq (2×) 10.0 μl,上、下游引物各 0.2 μl (10 pmol/L),cDNA 2.0 μl,ddH₂O 7.6 μl。反应程序:95 °C 30 s;95 °C 5 s,60 °C 20 s,95 °C 15 s,60 °C 1 min,95 °C 15 s。每个反应均设 3 个复孔,并重复 3 次取均值。记录 CT 值,利用 2^{-ΔΔCT} 法计算柠檬酸合成酶、酮戊二酸脱氢酶、NAD-IDH 在裂头蚴阶段的转录水平。

表 1 PCR 引物
Table 1 Primers Sequences

基因名称 Genes name	引物序列(5'-3') Primer Sequences
柠檬酸合成酶基因	GTTCTGGTTCGGACACGC GCACTGGGCGACAATCTTCA
酮戊二酸脱氢酶基因	ATCAAGGTTCTGCCTTCCC ATGGCGTCTGTGCGGTTT
NAD-IDH 基因	TCAGTCTTTATGCCAATGTGCG GCCGAGTATTCACCCTCTGTA
Actin	CATCTACGAGGGTTACGCACTG GCTCATCTCTGCTCAAAGTCC

结 果

1 NAD-IDH 基因全长序列的识别

利用 ORF-finder 和 BLAST 序列比对工具对 NAD-IDH 核苷酸序列进行比对,全长 1 095 bp,编码 365 个氨基酸。比对结果中,一致性最高的是埃及血吸虫 IDH(75.52%,GenBank NO. XM_012938423.2),与绦虫属中的细粒棘球绦虫 IDH 核苷酸序列一致性为 71.19%(GenBank NO. XM_024499258.1),与人类 IDH 氨基酸序列一致性为 51%(GenBank NO. AAC50455.1)。

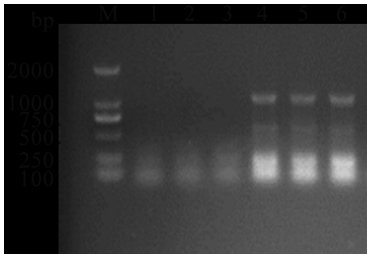
2 生物信息学分析

通过 ProtParam 蛋白理化参数分析工具预测,NAD-IDH 的氨基酸序列编码 365 个氨基酸,等电点(pI)为 6.84,理论分子质量为 39.89 ku。预测该蛋白在哺乳动物网织红细胞体外表达半衰期为 30 h,在酵母菌体内表达半衰期>20 h,在大肠埃希菌体内表达半衰期>10 h。蛋白的不稳定指数为 32.92(小于阈值 40),稳定性较好。脂溶系数为 94.05,预测为脂溶性蛋白。预测 NAD-IDH 的氨基酸序列中不含有信号肽,且不能通过蛋白非经典途径分泌。TMHMM 预测该蛋白序列中无跨膜区。

3 PCR 扩增全长基因序列

利用特异性引物扩增 NAD-IDH 基因,扩增产物进行 1%琼脂糖凝胶电泳,目的基因片段稍大于 1 000

bp,与预期值 1 095 bp 相接近,且曼氏迭宫绦虫孕节、成节、裂头蚴均可扩增出目的片段(图 1)。



M DNA 标志物(DL2000) 1,2,3 阴性对照 4 裂头蚴 cDNA 扩增产物 5 成虫成节 cDNA 扩增产物 6 成虫孕节 cDNA 扩增产物

图 1 NAD-IDH 基因 PCR 扩增产物 1%琼脂糖凝胶电泳分析

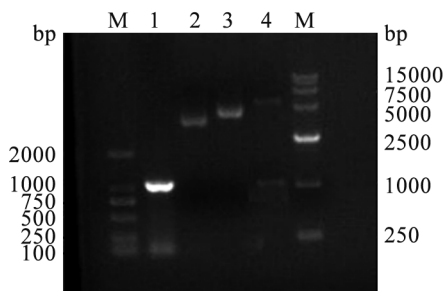
M DL2000 DNA Marker 1,2,3 The control groups 4 The amplification products used cDNA of sparganum as template 5 The amplification products used cDNA of mature proglottid as template 6 The amplification products used cDNA of gravid proglottid as template

Fig. 1 Identification of amplification products of NAD-IDH gene

4 pET-30a(+)-NAD-IDH 重组表达质粒的构建和鉴定

将鉴定正确的 PLB 重组质粒和表达载体 pET-30a(+)-NAD-IDH 重组表达质粒。将鉴定正确的 PLB 重组质粒和表达载体 pET-30a(+)-NAD-IDH 重组表达质粒。将鉴定正确的 PLB 重组质粒和表达载体 pET-30a(+)-NAD-IDH 重组表达质粒。

对重组表达质粒进行双酶切,得到 1 000 bp 和 5 400 bp 的酶切片段(图 2),重组表达质粒构建正确。



M DL2000 和 DL15000 DNA 标志物 1 NAD-IDH PCR 产物 2 pET-30a 空载质粒对照 3 重组质粒 4 重组质粒双酶切

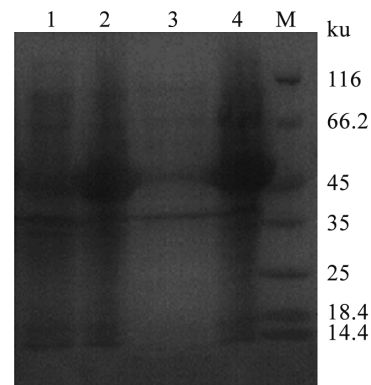
图 2 pET-30a 重组质粒的构建和酶切鉴定

M DL2000 and DL15000 DNA marker 1 NAD-IDH PCR product 2 pET-30a plasmid vector 3 The recombinant plasmid 4 The products of recombinant plasmid by double restriction enzyme digestion

Fig. 2 Construction and identification of recombinant plasmid pET-30a

5 重组蛋白的诱导表达

将重组质粒 pET-30a-NAD-IDH 转化至大肠埃希菌表达菌株 BL21, IPTG 诱导 5 h 后超声破碎菌体,分离上清和沉淀。经 12% SDS-PAGE 蛋白电泳分析,沉淀中的表达蛋白为 47 ku(含有两个 His 标签),未诱导的菌液无相应片段。上清中无该蛋白表达(图 3)。



M 蛋白质分子质量标准 1 未诱导的重组质粒对照 2 重组质粒 IPTG 诱导 5 h 3 重组菌裂解上清 4 重组菌裂解沉淀

图 3 NAD-IDH 重组蛋白表达

M Protein marker 1 Uninduced recombinant plasmid 2 The recombinant plasmid was induced by IPTG for 5 h 3 The supernatant of bacteria after induced 4 The precipitation of bacteria after induced

Fig. 3 Expression of NAD-IDH protein

6 裂头蚴三羧酸循环途径中关键酶的转录水平

利用裂头蚴 cDNA 作为模板,进行三羧酸循环途径中 3 个关键酶的转录水平检测,结果利用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法进行计算。图 4 显示,3 个关键酶均有转录,其中转录水平最高的是 NAD-IDH,高于柠檬酸合成酶 12.9 倍,高于酮戊二酸脱氢酶 5.2 倍。

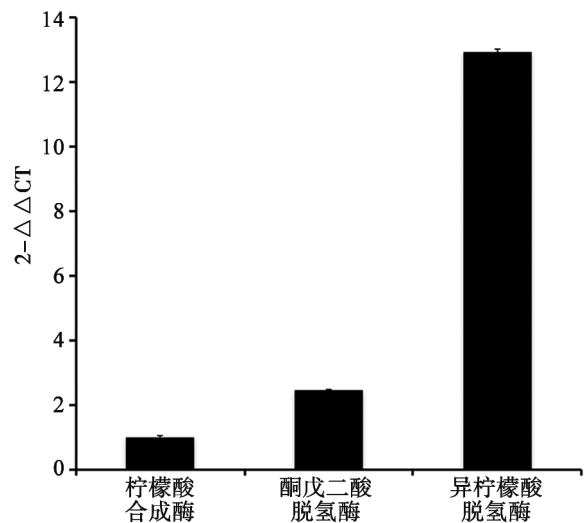


图 4 三羧酸循环中关键酶在裂头蚴阶段的转录水平分析

Fig. 4 The transcriptional level analysis of key enzymes in the TCA pathway at sparganum development stage

讨论

异柠檬酸脱氢酶主要有两种分类,分别是 NAD 和 NADP 作为辅酶,通过 NAD 或 NADP 转移 H^+ 子。NAD-IDH 的分子质量较小,在真核和原核生物细胞核中均有存在,主要发挥抗氧化作用^[13],而机体中发挥重要能量代谢作用的参与酶则是 NAD-IDH。该酶主要存在于线粒体中,被认为是三羧酸循环的重要限

速酶^[14]。

在真核生物如哺乳动物等高级生物中分离纯化的 NAD-IDH 有 α 、 β 、 γ 三类亚基以 2 : 1 : 1 的比例形成四聚体。每个四聚体都有单独的异柠檬酸、NAD、NADH、 Mn^{2+} 离子等的结合位点来发挥其活性作用， α 亚基持有催化作用，而 β 、 γ 亚基可能发挥调节作用^[15]。

本研究利用生物信息学在线分析软件进行比对，NAD-IDH 基因序列全长 1 095 bp，编码蛋白含有 365 个氨基酸。NAD-IDH 核苷酸序列与其他物种一致性最高的是埃及吸虫，与人类同源基因的核苷酸序列一致性 51%。NAD-IDH 氨基酸序列中无信号肽和跨膜区，也不能通过非经典途径分泌到胞外，因此推测该蛋白为胞内蛋白，这更有利于其参与发挥能量代谢的作用。

生物信息学预测 NAD-IDH 蛋白有良好的稳定性和脂溶性，在重组菌的超声破碎沉淀中有表达，即以包涵体的形式存在。这一预测结果与实际的蛋白表达形式一致。包涵体由于形成了高密度的折叠结构，破坏了蛋白质的溶解特性，使其丧失了生物活性，并不利于对蛋白的酶活性研究。本实验在大量诱导时采用了与小剂量诱导相同的条件，可能是导致包涵体形成的主要原因。因此，可通过优化诱导条件进行大量诱导，如使用低浓度的诱导剂，在低温条件下进行诱导，或相对调低震荡培养箱的转速等。还可通过增加氧气的供应以防止菌液 pH 降低而接近目的蛋白的等电点，导致蛋白的溶解度降低。此外，重组蛋白对于大肠埃希菌而言是异源性蛋白，原核生物缺乏修饰真核生物蛋白的酶类，导致大量蛋白的堆积，形成包涵体^[16]。

目前，许多用于治疗寄生虫的药物靶点均是针对阻断能量代谢或是葡萄糖摄取，三羧酸循环在能量代谢中发挥重要作用，曼氏迭宫绦虫中 NAD-IDH 可能帮助寄生虫利用宿主碳源、氮源为自身提供能量。在 NAD-IDH 基因全长序列扩增中，分别利用成虫的成节、孕节、裂头蚴 cDNA 作为模板进行 PCR 扩增，均能得到全长基因序列，说明该基因在上述 3 个虫体发育阶段均有转录，NAD-IDH 对于曼氏迭宫绦虫的裂头蚴阶段、成虫的成节和孕节发育阶段均是不可或缺的重要分子，在能量代谢中有重要作用。此外，利用 real time PCR 检测在裂头蚴三羧酸循环途径中的柠檬酸合成酶、酮戊二酸脱氢酶、NAD-IDH 均有转录，说明三羧酸循环途径在裂头蚴阶段是完整的，可能对于裂头蚴的能量功能发挥重要作用。其中 NAD-IDH 转录水平在 3 个关键酶基因中最高，再次证明该基因

对于裂头蚴而言极其重要。若能有效调节曼氏迭宫绦虫 NAD-IDH 的酶活性，使其能量代谢受到抑制从而影响虫体的生存，因此 NAD-IDH 可能为潜在的药物靶点。

【参考文献】

- [1] 王仁辉. 曼氏裂头蚴研究进展[J]. 地方病通报, 2005, 20(2): 83-84.
- [2] 裘明华, 裘明德. 人裂头蚴病和无头蚴病: I. 病原学的过去和现在[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2009, 27(1): 60-66.
- [3] Lo Presti A, Aguirre DT, De Andres P, et al. Cerebral sparganosis: case report and review of the European cases Review[J]. Acta Neurochir (Wien), 2015, 157(8): 1339-1343.
- [4] Khurana S, Appannanavar S, Bhatti HS, et al. Sparganosis of liver: a rare entity and review of literature. BMJ Case Rep. 2012; 2012:bcr2012006790. Published 2012 Dec 6. doi: 10.1136/bcr-2012-006790
- [5] Xie D, Wang M, Chen X, et al. A case report: 1-year follow-up of cerebral sparganosis mansonii with a stroke-like onset[J]. BMC Neurol, 2019, 19(1): 105.
- [6] 蔺西, 王中全. 我国曼氏裂头蚴病临床特征概述[J]. 中国病原生物学杂志, 2011, 6(6): 467-468.
- [7] Hong Q, Feng JP, Liu HJ, et al. Prevalence of *Spirometra mansonii* in dogs, cats, and frogs and its medical relevance in Guangzhou, China[J]. Int J Infect Dis, 2016(53): 41-45.
- [8] Akram M. Citric acid cycle and role of its intermediates in metabolism[J]. Cell Biochem Biophys, 2014, 68(3): 475-478.
- [9] Sharma H. Development of novel therapeutics targeting isocitrate dehydrogenase mutations in cancer[J]. Curr Top Med Chem, 2018, 18(6): 505-524.
- [10] Wang XY, Inaoka DK, Tomoo Shiba T, et al. Expression, purification, and crystallization of type I isocitrate dehydrogenase from *Trypanosoma brucei brucei*[J]. Protein Expr Purif, 2017(38): 56-62.
- [11] Wrenger C, Muller S. Isocitrate dehydrogenase of *Plasmodium falciparum*[J]. Eur J Biochem, 2003, 270(8): 1775-17783.
- [12] Liang P, Cui XJ, Fu RJ, et al. Identification of an enolase gene and its physiological role in *Spirometra mansonii*[J]. Parasitol Res, 2021, 120(6): 2095-2102.
- [13] Li F, He X, Ye D, et al. NADP(+)-IDH mutations promote hypsuccinylation that impairs mitochondria respiration and induces apoptosis resistance[J]. Mol Cell, 2015, 60(4): 661-675.
- [14] Sun PK, Bai TY, Ma TF, et al. Molecular mechanism of the dual regulatory roles of ATP on the $\alpha\gamma$ heterodimer of human NAD-dependent isocitrate dehydrogenase[J]. Sci Rep, 2020, 10(1): 6225.
- [15] Dange M, Colman RF. Each conserved active site tyr in the three subunits of human isocitrate dehydrogenase has a different function[J]. J Biol Chem, 2010, 285(27): 20520-20525.
- [16] 邓思. GST-SrtA 融合蛋白在大肠埃希菌中的表达、纯化及活性测定[D]. 广州: 华南理工大学, 2012.

【收稿日期】 2022-04-16 【修回日期】 2022-07-12