



敲除 *aceE* 基因对猪链球菌丙酮酸代谢的影响

毛晨龙, 樊擎莹, 左静, 薛冰倩, 李金朋, 李静, 张小玲, 汪洋*

河南科技大学动物科技学院, 洛阳市畜禽分子病原与免疫学重点实验室, 河南 洛阳 471003

毛晨龙, 樊擎莹, 左静, 薛冰倩, 李金朋, 李静, 张小玲, 汪洋. 敲除 *aceE* 基因对猪链球菌丙酮酸代谢的影响. 微生物学报, 2022, 62(4): 1416–1424.

Mao Chenlong, Fan Qingying, Zuo Jing, Xue Bingqian, Li Jinpeng, Li Jing, Zhang Xiaoling, Wang Yang. Effect of *aceE* gene knockout on pyruvate metabolism of *Streptococcus suis*. Acta Microbiologica Sinica, 2022, 62(4): 1416–1424.

摘要:【目的】探究缺失编码丙酮酸脱氢酶蛋白的 *aceE* 基因对猪链球菌生长特性、三羧酸循环和丙酮酸代谢的影响。【方法】通过测量菌液的 OD_{600} 值, 绘制野生型菌株与 *aceE* 基因缺失突变株的生长曲线; 利用试剂盒测定三羧酸循环和丙酮酸代谢旁路中乙酰 CoA、琥珀酸 CoA、延胡索酸、草酰乙酸、丙酮酸、乳酸和 ATP 的含量, 通过荧光定量 qRT-PCR 确定柠檬酸合酶基因、苹果酸脱氢酶基因、琥珀酸脱氢酶基因、异柠檬酸脱氢酶基因、丙酮酸脱羧酶基因、乳酸脱氢酶基因、乙醇脱氢酶基因和乙醛脱氢酶基因的表达水平。【结果】与野生株相比, 菌株 $\Delta aceE$ 在平台期 OD_{600} 值下降; 添加 1 g/L 乙酸盐能够显著提升菌株 $\Delta aceE$ 平台期 OD_{600} 值。菌株 $\Delta aceE$ 的丙酮酸含量上升, ATP 含量下降; 三羧酸循环代谢中乙酰 CoA、琥珀酸 CoA、延胡索酸含量降低; 柠檬酸合酶基因和苹果酸脱氢酶基因表达水平上升, 琥珀酸脱氢酶基因和异柠檬酸脱氢酶基因表达水平下调; 在丙酮酸代谢旁路中丙酮酸脱羧酶基因、乳酸脱氢酶基因、乙醇脱氢酶基因和乙醛脱氢酶基因表达水平上升。【结论】结果显示, 菌株 $\Delta aceE$ 三羧酸循环活性降低, 虽然能够通过 PDH 旁路将部分丙酮酸分解为乙酸盐, 进一步转化为乙酰 CoA 进入三羧酸循环, 但 ATP 含量仍未恢复至野生株水平, 这为进一步研究代谢改变与细菌表型的关系提供了理论基础。

关键词: *aceE* 基因; 猪链球菌; 丙酮酸代谢; 生长特性

基金项目: 国家自然科学基金(32172852, 31902309)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (32172852, 31902309)

*Corresponding author. Tel/Fax: +86-379-64282431; E-mail: wangyocan@163.com

Received: 16 June 2021; Revised: 25 October 2021; Published online: 6 January 2022

Effect of *aceE* gene knockout on pyruvate metabolism of *Streptococcus suis*

MAO Chenlong, FAN Qingying, ZUO Jing, XUE Bingqian, LI Jinpeng, LI Jing, ZHANG Xiaoling, WANG Yang*

Luoyang Key Laboratory of Animal Molecular Pathogens and Immunology, College of Animal Science and Technology, Henan University of Science and Technology, Luoyang 471003, Henan, China

Abstract: [Objective] To explore the effect of the knockout of *aceE* gene which encodes pyruvate dehydrogenase on the growth characteristics, tricarboxylic acid cycle, and pyruvate metabolism of *Streptococcus suis*. [Methods] The growth curves of the wild-type strain and strain $\Delta aceE$ were established with the OD_{600} values of the bacterial liquids. The content of acetyl CoA, succinate CoA, fumarate, oxaloacetate, pyruvate, lactate, and ATP in the tricarboxylic acid cycle and the pyruvate metabolism bypass was measured. Quantitative RT-PCR was employed to determine the gene expression levels of citrate synthase, malate dehydrogenase, succinate dehydrogenase, isocitrate dehydrogenase, pyruvate decarboxylase, lactate dehydrogenase, alcohol dehydrogenase, and acetaldehyde dehydrogenase. [Results] Compared with the wild-type strain, strain $\Delta aceE$ showed decreasing OD_{600} value during the platform phase. The OD_{600} value of strain $\Delta aceE$ in the plateau phase significantly increased after the addition of 1 g/L acetate. Compared with the wild-type strain, strain $\Delta aceE$ showed increased content of pyruvate while decreased content of ATP, acetyl CoA, succinate CoA, and fumarate. Moreover, it showed up-regulated expression levels of citrate synthase and malate dehydrogenase, while down-regulated expression levels of succinate dehydrogenase and isocitrate dehydrogenase. For the proteins involved in pyruvate metabolism bypass, pyruvate decarboxylase, lactate dehydrogenase, alcohol dehydrogenase, and acetaldehyde dehydrogenase presented up-regulated gene expression levels in strain $\Delta aceE$. [Conclusion] Strain $\Delta aceE$ has reduced activity of tricarboxylic acid cycle. Although part of pyruvate can be decomposed into acetate through the pyruvate dehydrogenase bypass and further converted into acetyl CoA to enter the tricarboxylic acid cycle, the ATP content has not been restored to the wild-type strain level. This study provides a theoretical basis for further research on the relationship between metabolic changes and bacterial phenotypes.

Keywords: *aceE*; *Streptococcus suis*; pyruvate metabolism; growth characteristics

猪链球菌 (*Streptococcus suis*) 是一种在世界范围内广泛存在的人畜共患病原体, 能够引起猪的脑膜炎、关节炎、肺炎和败血症等疾病。它可通过伤口或黏膜传染人, 严重可引起人的死亡^[1]。丙酮酸脱氢酶复合体 (pyruvate dehydrogenase complex, PDHC) 广泛存在于微生物、植物及动物体中, 催化丙酮酸

不可逆氧化脱羧转化生成乙酰辅酶 A, 同时将 NAD^+ 还原为 NADH, 使碳源的无氧分解和有氧分解连接起来, 在呼吸链能量代谢中起着重要的作用^[2]。*aceE* 基因编码的丙酮酸脱氢酶 (pyruvate dehydrogenase, PDH) 是 PDHC 的重要组成部分, 当敲除 *aceE* 后, PDHC 失去将丙酮酸转化为乙酰 CoA 的能力, 中心代谢途径因为

没有足量的乙酰 CoA 供应而出现障碍^[3]。丙酮酸是糖代谢的关键中间体, 根据生长条件, 丙酮酸可以转化为乙酰辅酶 A, 成为 TCA 循环的底物, 也可以脱羧并还原为乙醇或者乳酸, 在能量代谢中起着重要作用^[4]。在谷氨酸棒杆菌中, *aceE* 的突变导致了菌株 L-丙氨酸、L-丝氨酸和 L-缬氨酸产量增高^[5]。在酿酒酵母中, 缺失编码 PDHCE1 亚基的 *PDA1* 基因, 酿酒酵母的 PDHC 活性完全丧失, 但丙酮酸向乙酰辅酶 A 的转化仍然通过 PDH 旁路途径进行, 该旁路通过丙酮酸脱羧酶、乙醛脱氢酶和乙酰辅酶 A 合成酶的协同作用催化丙酮酸转化为乙酰辅酶 A, 保障菌体的正常生长^[6]。在大肠杆菌中, PDHC 失活后, 菌体不能正常生长, 但在培养基中加入乙酸盐能在一定程度上弥补菌株在生长上的缺陷^[3]; 在耻垢分枝杆菌中, PDHC 失活菌株在 1% 葡萄糖培养基中生长缓慢, 但在 1% 乙酸盐培养基中能够正常生长^[7]。我们前期研究发现 *aceE* 基因参与细菌分裂期间 Z 环的形成而导致菌体细胞链增长^[8], 缺失 *aceE* 基因能降低细菌的毒力及减少菌体在各组织中的分布^[9], 但目前 *aceE* 基因缺失对猪链球菌代谢功能的影响还未见报道, 本研究分别对野生株 HA9801、*aceE* 基因缺失株 $\Delta aceE$ 和互补株 $C\Delta aceE$ 的生长特性、三羧酸循环活性和丙酮酸代谢旁路活性进行测定。

1 材料与方法

1.1 试验菌株

野生菌株 HA9801 是 1998 年从江苏省淮安县感染猪中分离出的强毒株^[10]; *aceE* 基因缺失株($\Delta aceE$)、互补株($C\Delta aceE$)为本实验室构建^[8]。

1.2 试验试剂

代谢产物含量测定试剂盒与 ATP 含量测试盒均购自南京建成生物工程研究所。用于荧光

定量的特异性引物购自生工生物工程(上海)股份有限公司。

1.3 猪链球菌生长曲线的绘制

分别挑取猪链球菌野生菌株、 $\Delta aceE$ 和 $C\Delta aceE$ 单菌落于 TSB 液体培养基中, 37 °C、180 r/min 培养至 10⁶ CFU/mL 后, 按 1:100 的比例转接于 TSB 液体培养基和添加 1 g/L 乙酸盐的 TSB 液体培养基中, 每隔 1 h 取适当菌液, 于 OD₆₀₀ 处测定吸光度, 每个组分别做 3 个重复, 绘制 OD₆₀₀ 生长曲线。

1.4 猪链球菌菌体丙酮酸含量的测定

分别挑取猪链球菌野生菌株、 $\Delta aceE$ 和 $C\Delta aceE$ 单菌落于 5 mL TSB 液体培养基中, 180 r/min 培养过夜, 第 2 天按 1:100 的比例转接于 5 mL TSB 液体培养基中, 分别于转接后 3、6、9、12、15 h 收集菌液, 经超声波(输出功率 100 W)破碎 2 min 后, 按丙酮酸含量测定试剂盒说明书对菌体丙酮酸含量进行测定。

1.5 猪链球菌菌体其他代谢产物含量的测定

如 1.4 所述收集菌液, 按照各代谢产物试剂盒说明书对菌体代谢产物乳酸、ATP、乙酰 CoA、琥珀酸 CoA、延胡索酸和草酰乙酸的含量进行测定。

1.6 RNA 提取和荧光定量 RT-PCR

使用 TRIzol (赛默飞世尔科技公司)法提取总 RNA。用 cDNA 合成试剂盒(赛默飞世尔科技公司)进行逆转录。选择 16S rRNA 基因作为内参基因(表 1), 逆转录条件是 42 °C 15 min, 85 °C 5 min。荧光定量 RT-PCR 用于定量分析柠檬酸合酶基因(*cs*)、苹果酸脱氢酶基因(*mdh*)、琥珀酸脱氢酶基因(*icdh*)、异柠檬酸脱氢酶基因(*sdh*)、丙酮酸脱羧酶基因(*pdc*)、乳酸脱氢酶基因(*ldh*)、乙醇脱氢酶基因(*adh*)和乙醛脱氢酶基因(*aldh*)等代谢相关基因的 mRNA 表达水平。

表 1 用于 qRT-PCR 分析的引物

Table 1 Primers used for the qRT-PCR analysis

Genes	Primer sequences (5'→3')
<i>sdh-1</i>	TTGAGTTGACCGGTCGTAGC
<i>sdh-2</i>	GTGGCACAGACTAAGCCCAT
<i>mdh-1</i>	GCTGCAGGAGACCGTAAAGT
<i>mdh-2</i>	AATGCGCTCATGTGATTGC
<i>cs-1</i>	GAGATGGCGCGTGATTGAC
<i>cs-2</i>	CCTAAGTAGGAAGAGCGCGG
<i>icdh-1</i>	GCTCTTTCAGCGGACTTGG
<i>icdh-2</i>	GGAGATGGTATTGGCAGGGAT
<i>ldh-1</i>	CAACA GGGTT AGCAG CAACA
<i>ldh-2</i>	ATGCT CATGA CGCAG ACTTG
<i>pdh-1</i>	TTGCGTCGTTATGTAGAG
<i>pdh-2</i>	ACAAATGGGTTCCCCGTC
<i>adh-1</i>	CGACTTTCAGGCTGGTCACA
<i>adh-2</i>	GAAGTTCGTCCTCGAAGC
<i>aldh-1</i>	GGTCCATACCTGTATCCG
<i>aldh-2</i>	CAAGATTCCTTACGCTCA

用于 qRT-PCR 的特异性引物见表 1, 反应条件为 95 °C 10 min; 95 °C 15 s, 60 °C 1 min, 40 个循环。熔解曲线分析 95 °C 15 s, 60 °C 1 min, 95 °C 15 s, 60 °C 15 s。

1.7 统计分析

使用 GraphPad 软件进行数据统计分析, 用单向方差分析(ANOVA)分析代谢产物含量数据, qRT-PCR 结果数据分析采用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 法^[11]。所有数据表示为平均值±SD, $P < 0.05$ 具有统计学意义且表示差异显著。

2 结果与分析

2.1 *aceE* 基因缺失及乙酸盐对猪链球菌生长特性的影响

前期研究发现, 野生株、 $\Delta aceE$ 和 $C\Delta aceE$ 在细菌生长相同时间点的活菌数无显著差异^[8]。 OD_{600} 生长曲线显示, 与野生菌株相比, $\Delta aceE$ 对数生长期延迟 1 h, 平台期 OD_{600} 值显著下降 ($P < 0.05$), $C\Delta aceE$ 与野生株无显著差异 ($P > 0.05$); 在添加 1 g/L 乙酸盐情况下, 野生株对数生长期

提前, 平台期 OD_{600} 值无显著变化 ($P > 0.05$); $\Delta aceE$ 平台期 OD_{600} 值显著上升 ($P < 0.05$) (图 1)。

2.2 *aceE* 基因缺失对三羧酸循环代谢产物含量的影响

缺失株 $\Delta aceE$ 和野生株转接后 3、6、9、12、15 h 收集菌液, 经超声破碎后对菌体乙酰 CoA、琥珀酸 CoA、延胡索酸、草酰乙酸含量进行测定。与野生菌株相比, $\Delta aceE$ 菌株的乙酰 CoA 含量和琥珀酸 CoA 含量下降, 差异极显著 ($P < 0.01$); 延胡索酸含量下降, 差异显著 ($P < 0.05$); 草酰乙酸含量上升, 差异极显著 ($P < 0.01$); 互补株与野生株无显著差异 ($P > 0.05$) (图 2)。

2.3 *aceE* 基因缺失对三羧酸循环代谢相关基因表达的影响

当缺失 *aceE* 基因后, 猪链球菌柠檬酸合酶基因(*cs*)表达水平上升, 且差异显著 ($P < 0.05$); 苹果酸脱氢酶基因(*mdh*)表达水平上升, 差异极显著 ($P < 0.01$); 琥珀酸脱氢酶基因(*sdh*)表达水平下降, 差异显著 ($P < 0.05$); 异柠檬酸脱氢酶基因(*icdh*)表达水平下降, 差异极显著 ($P < 0.01$)。互补株与野生株无显著差异 ($P > 0.05$) (图 3)。

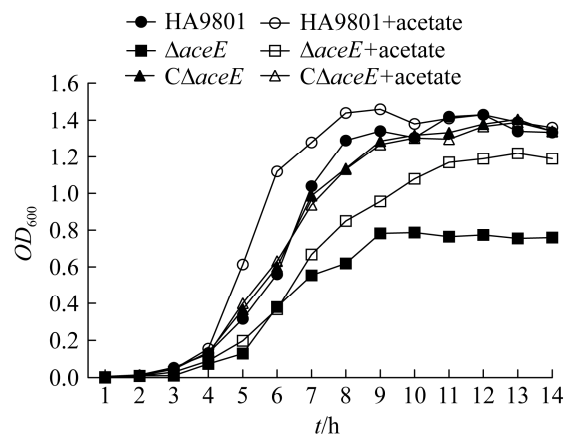


图 1 添加 1 g/L 乙酸盐对猪链球菌 HA9801、 $\Delta aceE$ 和 $C\Delta aceE$ 生长的影响

Figure 1 Effects of 1 g/L acetate on the growth of *Streptococcus suis* HA9801, $\Delta aceE$ and $C\Delta aceE$.

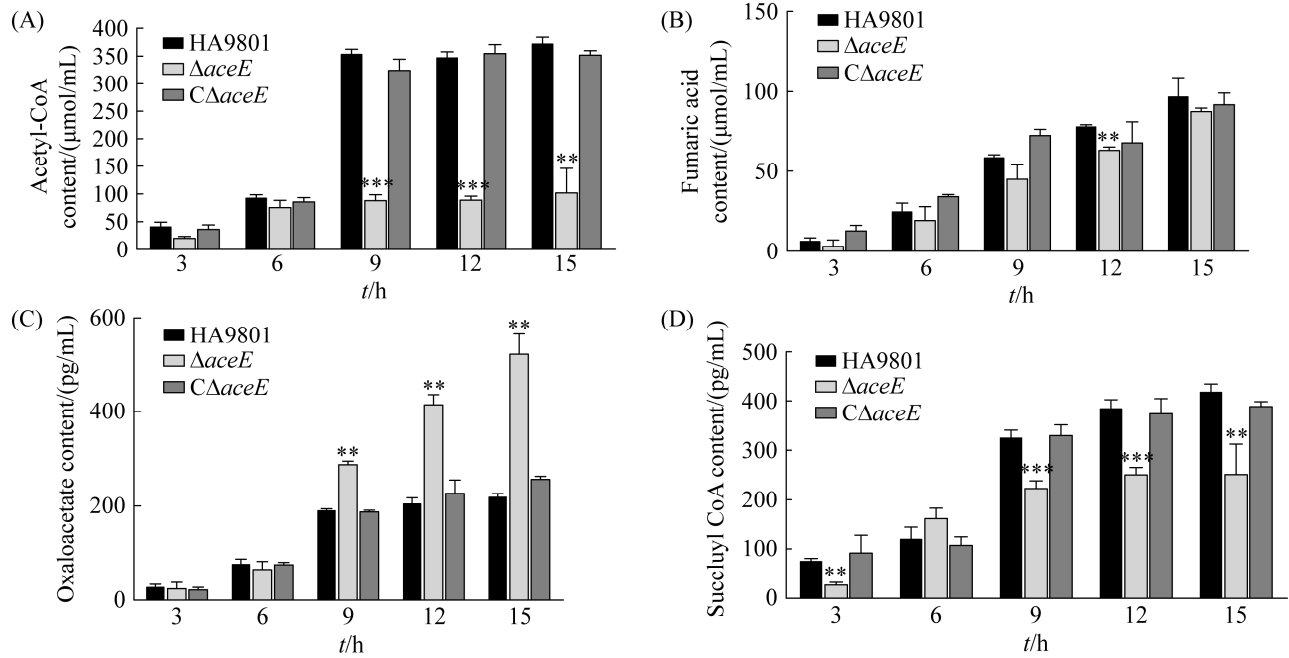


图 2 三羧酸循环代谢产物乙酰 CoA (A)、延胡索酸(B)、草酰乙酸(C)和琥珀酸 CoA (D)含量

Figure 2 Assay results of acetyl-CoA (A), fumaric acid (B), oxaloacetic acid (C) and succinyl CoA (D) metabolites of the TCA cycle. **: $P < 0.05$; ***: $P < 0.01$.

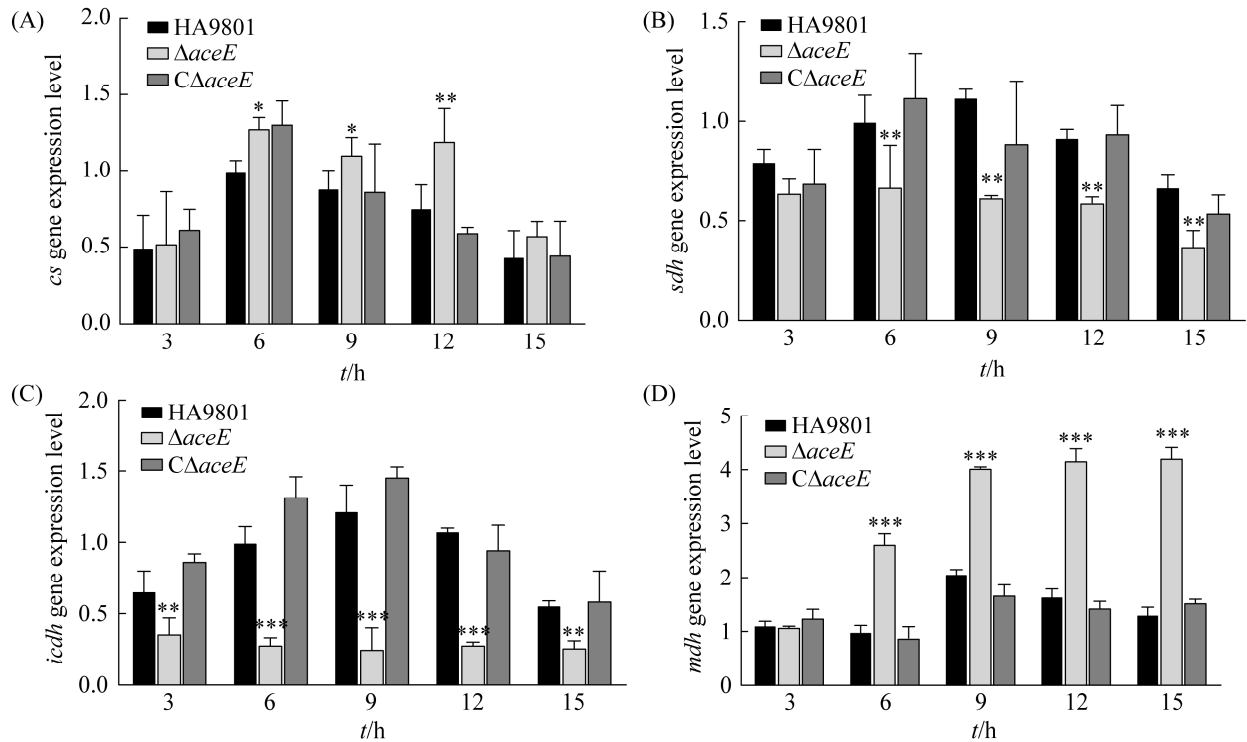


图 3 菌株 HA9801、 $\Delta aceE$ 和 $C\Delta aceE$ 的 *cs* (A)、*sdh* (B)、*icdh* (C)和 *mdh* (D)基因的表达

Figure 3 The expression of the *cs* (A), *sdh* (B), *icdh* (C) and *mdh* (D) genes of strain HA9801, $\Delta aceE$ and $C\Delta aceE$. **: $P < 0.05$; ***: $P < 0.01$.

2.4 *aceE* 基因缺失对猪链球菌丙酮酸下游代谢产物及 ATP 含量的影响

缺失株 $\Delta aceE$ 和野生株转接后 3、6、9、12、15 h 收集菌液, 经超声破碎后对菌体丙酮酸、乳酸和 ATP 含量进行测定, 与野生菌株相比, $\Delta aceE$ 菌株的丙酮酸和乳酸含量上升, 差异极显著($P < 0.01$); ATP 含量下降, 差异极显著($P < 0.01$); 与野生株相比, $C\Delta aceE$ 的丙酮酸在菌体内含量上升, 无显著差异($P > 0.05$); ATP 含量在 12 h 和 15 h 下降, 差异显著($P < 0.05$) (图 4)。

2.5 *aceE* 基因缺失对猪链球菌丙酮酸下游代谢相关基因的表达影响

当缺失 *aceE* 基因后, 猪链球菌丙酮酸脱羧酶(*pdh*)、乳酸脱氢酶(*ldh*)、乙醇脱氢酶(*adh*)和乙醛脱氢酶(*aldh*)基因的表达水平均显著上升, 差异显著($P < 0.05$); 而互补株的相关代谢基因与野生株无显著差异($P > 0.05$) (图 5)。

3 讨论

由 *aceE* 基因编码的 PDH 蛋白是 PDHC 催化丙酮酸分解为乙酰 CoA 的限速酶, 去除细菌的 *aceE* 基因后, 丙酮酸不能正常生成乙酰 CoA, 导致丙酮酸分解受到抑制而产生积累, 影响菌体的发育。在本研究中, 当 *aceE* 基因缺失后, 猪链球菌的生长特性发生变化, 在 TSB 液体培养基中, OD_{600} 生长曲线显示与野生菌株相比, 菌株 $\Delta aceE$ 对数生长期推迟, 最大 OD_{600} 值由 1.33 下降至 0.72。但前期研究发现, 活菌数生长曲线结果显示野生菌株、 $\Delta aceE$ 在相同时间点的活菌数无显著差异^[8]。 OD_{600} 值生长曲线和 CFU 生长曲线差异较大的原因可能与 *aceE* 基因缺失后菌株链长变长有关, 细菌由于链长增加而导致光密度降低, 但其活菌数量仍然不变。

在大肠杆菌中, 当 *aceE* 基因缺失后, 菌株

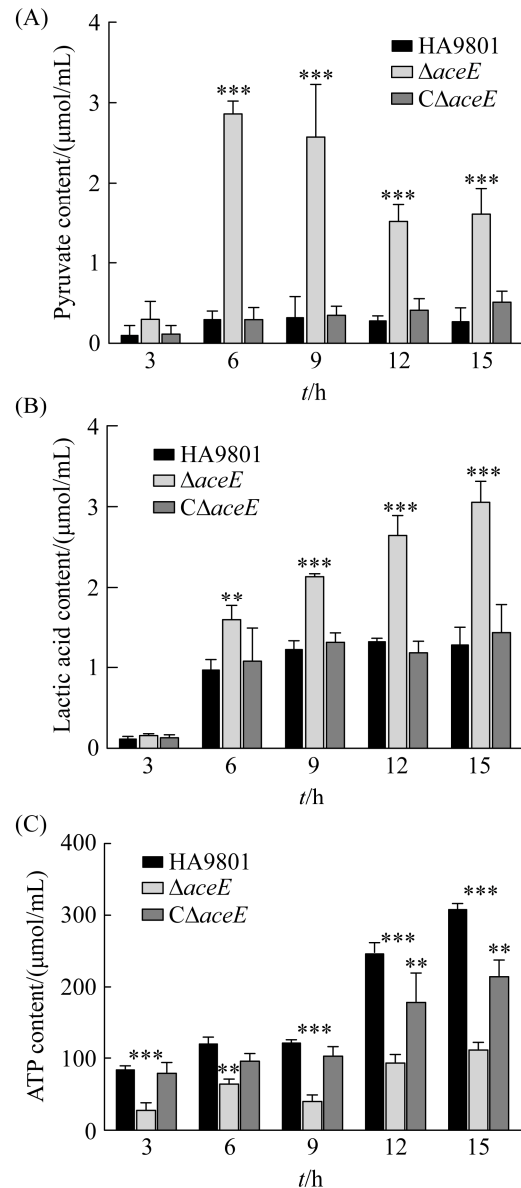


图 4 菌株 HA9801、 $\Delta aceE$ 和 $C\Delta aceE$ 菌体丙酮酸(A)、乳酸(B)和 ATP (C)含量测定结果

Figure 4 The results of determination of the content of pyruvate (A), lactic acid (B) and ATP (C) in strain HA9801, $\Delta aceE$ and $C\Delta aceE$. **: $P < 0.05$; ***: $P < 0.01$.

必须添加 KAc 才能维持生长^[3]; 在谷氨酸棒杆菌中, *aceE* 基因失活后, PDHC 不能发挥作用, 导致细菌不能在以葡萄糖作为碳源的培养基上生长^[12]; 但在耻垢分枝杆菌中^[13], PDHC 失活菌株在 1%乙酸盐培养基中能够正常生长。

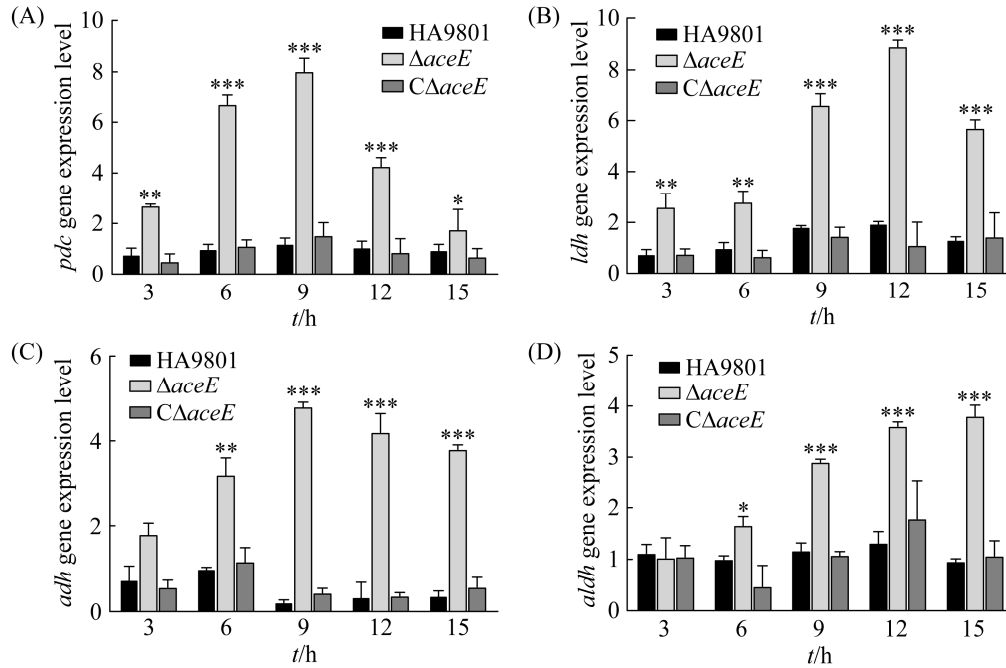


图5 菌株 HA9801、 $\Delta aceE$ 和 $C\Delta aceE$ 的 *pdc* (A)、*ldh* (B)、*adh* (C) 和 *aldh* (D) 基因的表达

Figure 5 The expression of *pdc* (A), *ldh* (B), *adh* (C) and *aldh* (D) genes of strain HA9801, $\Delta aceE$ and $C\Delta aceE$. **: $P < 0.05$; ***: $P < 0.01$.

在探索细菌生长速率影响的基础上, 我们进一步探索 *aceE* 基因缺失对菌体的丙酮酸代谢的影响。研究结果显示, 猪链球菌的丙酮酸含量在 6 h 达到最高, 9 h 到 15 h 逐渐降至稳定, 但在猪链球菌 HA9801 基因组中 PDH 比对未发现同工酶, 这提示在猪链球菌中除 PDHC 外还存在其他可能的丙酮酸代谢途径。丙酮酸代谢旁路(PDH 旁路)是丙酮酸转化为乙酰辅酶 A 的另一种途径^[3]。通过丙酮酸脱羧酶、乙醛脱氢酶和乙酰辅酶 A 合成酶的协同作用催化丙酮酸转化为乙醛、乙酸盐和乙酰 CoA, 最后进入三羧酸循环, 完成碳源的彻底分解。因此, 我们测定了在 TSB 液体培养基中添加 1 g/L 乙酸盐时, HA9801、 $\Delta aceE$ 和 $C\Delta aceE$ 菌株的生长曲线, 并进一步测定了 PDH 旁路中的相关代谢酶基因的表达情况, 结果显示, 在外源添加 1 g/L 乙酸盐时, $\Delta aceE$ 的平台期 OD_{600} 值显著

上升, 部分恢复到野生株水平, 这表明 *aceE* 基因缺失后猪链球菌能够利用乙酸盐作为菌体生物合成的碳源。且菌株 $\Delta aceE$ 的 *pdc* 和 *adh* 表达显著上调, 同时 *aldh* 基因作为下游基因, 它的表达也显著上调。菌体在 *aceE* 基因缺失的情况下会通过 PDH 旁路将部分丙酮酸分解为乙酰 CoA。在无氧条件下, 糖酵解的产物是乳酸, 丙酮酸在乳酸脱氢酶的作用下生成乳酸, $\Delta aceE$ 菌株乳酸积累显著高于野生菌株, *aceE* 基因缺失后, 丙酮酸大量积累情况下, 一部分丙酮酸分解为乳酸。在大肠杆菌中, 敲除 *aceE* 基因后, 再敲除包括 *adhE* 和 *ldhA* 基因在内的 5 个基因, 丙酮酸积累才能达到最高值, 在单独沉默 *aceE* 基因时, 丙酮酸会通过这两个方向分解^[14], 与本研究结果相似。

猪链球菌 *aceE* 基因缺失后, 菌株能够通过 PDH 旁路分解丙酮酸进入三羧酸循环, 但 ATP

含量测定结果显示菌体的能量代谢未恢复到野生菌株的水平。作为能量代谢的枢纽, 菌体 70% 以上的能量由三羧酸循环产生^[13], ATP 含量下降提示 *aceE* 基因的缺失可能导致三羧酸循环活性下降。因此, 我们测定了三羧酸循环代谢的产物含量和关键基因表达量, 当 *aceE* 基因缺失后, 猪链球菌乙酰 CoA、琥珀酸 CoA 和延胡索酸含量下降, 草酰乙酸含量上升; *cs* 和 *mdh* 基因表达上升, *sdh* 和 *icdh* 基因表达下降。*cs* 和 *icdh* 都是三羧酸循环的限速酶^[12], *sdh* 表达情况一般也可作为评价三羧酸循环运行程度的指标^[12], 但 *cs* 表达情况与 *icdh* 和 *sdh* 情况并不相同, 这可能与草酰乙酸的积累有关, 但具体原因需要进一步研究。通过检测 *icdh* 和 *sdh* 的表达、代谢产物含量和 ATP 含量发现, *aceE* 基因缺失后, 虽然 PDH 旁路能够分解部分丙酮酸进入三羧酸循环, 但猪链球菌三羧酸循环活性并未恢复到野生株水平。Harst 等比较了谷氨酸

棒杆菌 *aceE* 缺失株和野生株的蛋白质组学, 发现 CS、ICDH 和 SDH 丰度上升, MDH 丰度下降, 谷氨酸棒杆菌在缺失 *aceE* 基因后三羧酸循环上调^[15], 这与猪链球菌结果相反。

本研究对猪链球菌 *aceE* 基因缺失前后生长特性、三羧酸循环代谢和丙酮酸代谢的变化进行了研究。当 *aceE* 基因缺失后, 猪链球菌能够通过 PDH 旁路将部分丙酮酸分解为乙酰 CoA, 但不能将菌株的 TCA 循环和 ATP 含量恢复至野生株状态(图 6)。*aceE* 基因除了在代谢中能够分解丙酮酸产生乙酰 CoA 外, 更多的功能逐渐被发现, 实验室前期研究指出, 猪链球菌 *aceE* 基因缺失能够造成菌体链长变长, 生物被膜形成能力减弱, 毒力下降^[9]。Su 等和 Allison 等的研究发现, *aceE* 基因缺失能改变细菌的氨基糖苷类抗生素耐药性^[16-17]。本文通过对野生菌株和 $\Delta aceE$ 的能量代谢进行初步研究, 为进一步研究代谢改变与细菌表型的关系提供了理论基础。

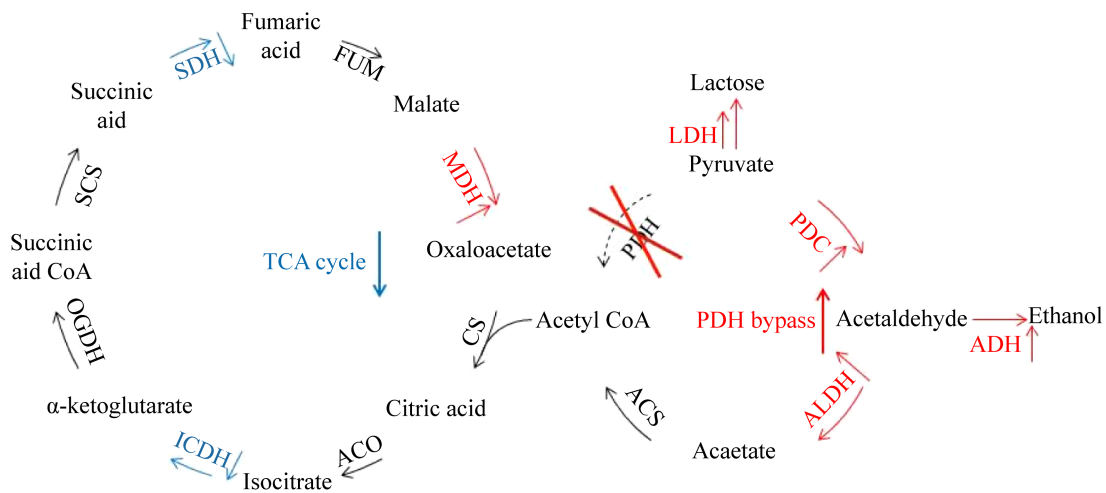


图 6 *aceE* 基因对猪链球菌丙酮酸代谢和三羧酸循环的影响

Figure 6 Effects of the *aceE* gene on pyruvate metabolism and tricarboxylic acid cycle of *Streptococcus suis*. Red arrow: pathway for up-regulation of gene expression. Blue arrow: pathway for down-regulation of gene expression. CS: citrate synthase; ACO: aconitase; ICDH: isocitrate dehydrogenase; MDH: malate dehydrogenase; OGDH: α -ketoglutarate dehydrogenase; PDH: pyruvate dehydrogenase; SCS: succinyl-CoA synthase; SDH: succinate dehydrogenase; FUM: fumarase; PDH: pyruvate dehydrogenase; PDC: pyruvate decarboxylase; LDH: lactate dehydrogenase enzymes; ALDH: alcohol dehydrogenase; ADH: acetaldehyde dehydrogenase; ACS: acetyl-CoA synthase.

参考文献

- [1] Gruszynski K, Young A, Levine SJ, Garvin JP, Brown S, Turner L, Fritzing A, Gertz RE Jr, Murphy JM, Vogt M, Beall B. *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* infections associated with Guinea pigs. *Emerging Infectious Diseases*, 2015, 21(1): 156–158.
- [2] 柳巨雄, 杨焕民. 动物生理学. 北京: 高等教育出版社, 2011.
- [3] 宋灿辉, 张伟国. 敲除 *aceE* 基因对大肠杆菌生长和丙酮酸代谢的影响. *生物加工过程*, 2013, 11(6): 15–18.
Song CH, Zhang WG. Effects of *aceE* gene knockout on growing and pyruvate biosynthesis of *E. coli*. *Chinese Journal of Bioprocess Engineering*, 2013, 11(6): 15–18. (in Chinese)
- [4] 王翔, 魏源. 丙酮酸补充与运动能力. *北京体育大学学报*, 2002, 25(2): 207–210.
Wang X, Wei Y. Pyruvate supplementation and physical performance (summary). *Journal of Beijing University of Physical Education*, 2002, 25(2): 207–210. (in Chinese)
- [5] Guo W, Chen ZW, Zhang XM, Xu GQ, Zhang XJ, Shi JS, Xu ZH. A novel *aceE* mutation leading to a better growth profile and a higher L-serine production in a high-yield L-serine-producing *Corynebacterium glutamicum* strain. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2016, 43(9): 1293–1301.
- [6] Zeeman AM, Luttk MAH, Thiele C, Van Dijken JP, Pronk JT, Steensma HY. Inactivation of the *Kluyveromyces lactis KIPDA1* gene leads to loss of pyruvate dehydrogenase activity, impairs growth on glucose and triggers aerobic alcoholic fermentation. *Microbiology: Reading, England*, 1998, 144(Pt 12): 3437–3446.
- [7] 王星. 表皮葡萄球菌和分枝杆菌生物膜相关基因的鉴定和功能研究. 复旦大学博士学位论文, 2012.
- [8] Wang Y, Wang YX, Li JP, Gong SL, Sun LY, Grenier D, Li Y. Pdh is involved in the cell division and normal septation of *Streptococcus suis*. *Microbiological Research*, 2019, 228: 126304.
- [9] Wang Y, Wang YX, Liu BB, Wang SH, Li JP, Gong SL, Sun LY, Yi L. Pdh modulate virulence through reducing stress tolerance and biofilm formation of *Streptococcus suis* serotype 2. *Virulence*, 2019, 10(1): 588–599.
- [10] 姚火春, 陈国强, 陆承平. 猪链球菌 1998 分离株病原特性鉴定. *南京农业大学学报*, 1999, 22(2): 67–70.
Yao HC, Chen GQ, Lu CP. Identification of isolates of swine *Streptococcus* in Jiangsu Province during 1998. *Journal of Nanjing Agricultural University*, 1999, 22(2): 67–70. (in Chinese)
- [11] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method. *Methods*, 2001, 25(4): 402–408.
- [12] 刘学胜, 贾全栋, 张伟国. 产丁二酸谷氨酸棒状杆菌基因缺失代谢工程菌株的构建. *微生物学通报*, 2013, 40(5): 739–748.
Liu XS, Jia QD, Zhang WG. Construction a metabolic engineering strain to produce succinic acid from *Corynebacterium glutamicum* by gene deletion mutation. *Microbiology China*, 2013, 40(5): 739–748. (in Chinese)
- [13] Chen ST, Teng TL, Wen S, Zhang TT, Huang HR. The *aceE* involves in mycolic acid synthesis and biofilm formation in *Mycobacterium smegmatis*. *BMC Microbiology*, 2020, 20(1): 259.
- [14] Akita H, Nakashima N, Hoshino T. Pyruvate production using engineered *Escherichia coli*. *AMB Express*, 2016, 6(1): 94.
- [15] Harst A, Albaum SP, Bojarzyn T, Trötschel C, Poetsch A. Proteomics of FACS-sorted heterogeneous *Corynebacterium glutamicum* populations. *Journal of Proteomics*, 2017, 160: 1–7.
- [16] Su YB, Peng B, Li H, Cheng ZX, Zhang TT, Zhu JX, Li D, Li MY, Ye JZ, Du CC, Zhang S, Zhao XL, Yang MJ, Peng XX. Pyruvate cycle increases aminoglycoside efficacy and provides respiratory energy in bacteria. *PNAS*, 2018, 115(7): E1578–E1587.
- [17] Allison KR, Brynildsen MP, Collins JJ. Metabolite-enabled eradication of bacterial persisters by aminoglycosides. *Nature*, 2011, 473(7346): 216–220.

(本文责编 李磊)