

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2024.07.004

· 基础研究 ·

## ENO1 蛋白及其相关活性位点缺失突变蛋白在昆虫杆状病毒表达系统中的表达与鉴定

代鹏钰<sup>a</sup>, 杨蕊<sup>a</sup>, 章婷婷<sup>a</sup>, 马昕芸<sup>a</sup>, 刘会玲<sup>b</sup> (甘肃中医药大学 a. 第一临床医学院 妇科二; b. 甘肃省人民医院 妇科二, 甘肃 兰州 730000)

**[摘要]** **目的:** 利用昆虫杆状病毒表达系统(昆虫BEVS)表达糖酵解酶 $\alpha$ -烯醇化酶(ENO1)及其3种酶活性位点缺失突变的 ENO1 蛋白 ENO1-M1、ENO1-M2 和 ENO1-M3, 为后续宫颈癌的代谢治疗研究奠定基础。**方法:** 利用分子克隆技术将优化后 ENO1 序列插入 pFastBac<sup>TM</sup>1 载体, 获得含有目的基因的重组质粒 pFastBac-ENO1。分别缺失 ENO1 发挥糖酵解酶功能的3个活性位点, 进行优化后将其插入 pFastBac<sup>TM</sup>1 载体, 获得3个活性位点缺失的重组质粒 pFastBac-M1、pFastBac-M2 和 pFastBac-M3。通过转座、转染后获得重组杆状病毒 rBV-ENO1、rBV-M1、rBV-M2 和 rBV-M3, 利用 WB 法对目的蛋白的表达及特异性进行检测。**结果:** 成功扩增重组杆粒 rBacmid-ENO1、rBacmid-M1、rBacmid-M2 和 rBacmid-M3, 获得大小约 2 000 bp 的基因片段, 与预期大小相符。昆虫 BEVS 可表达 ENO1 蛋白及其3个酶活性位点缺失的重组蛋白 ENO1-M1、ENO1-M2 和 ENO1-M3, 其分子量约为 52 000, 与预期相符。WB 法鉴定这些蛋白能与特异性标签 His-tag 发生反应。**结论:** 通过昆虫 BEVS 成功表达目的蛋白 ENO1 及其酶活性位点缺失蛋白 ENO1-M1、ENO1-M2 和 ENO1-M3, 这些蛋白具有反应原性, 为后续测定这些蛋白与 ENO1 单抗亲和力创造了条件。

**[关键词]**  $\alpha$ -烯醇化酶; 昆虫杆状病毒表达系统; 蛋白表达; 酶活性位点缺失

**[中图分类号]** Q556; R730.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385x(2024)07-0669-06

## Expression and characterization of ENO1 protein and its associated active site deletion mutant proteins in a baculovirus expression vector system

DAI Pengyu<sup>a</sup>, YANG Rui<sup>a</sup>, ZHANG Tingting<sup>a</sup>, MA Xinyun<sup>a</sup>, LIU Huiling<sup>b</sup> (a. Gynecology II, First Clinical Medical College; b. Gynecology II, Gansu Provincial Hospital, Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou 730000, Gansu, China)

**[Abstract]** **Objective:** To express the glycolytic enzyme  $\alpha$ -enolase (ENO1) and its three enzyme active site deletion mutant ENO1 proteins (ENO-M1, pFastBac-M2, ENO1-M3) using a baculovirus expression vector system (insect BEVS), laying the groundwork for the subsequent study of metabolic therapy for cervical cancers. **Methods:** Molecule cloning was used to insert optimized ENO1 gene sequence into the pFastBac<sup>TM</sup>1 vector to obtain the recombinant plasmid pFastBac-ENO1 with target genes. Three active sites essential for ENO1's glycolytic function were deleted, and the corresponding optimized sequences were inserted into the pFastBac<sup>TM</sup>1 vector to generate the recombinant plasmids with three active site deletion, namely pFastBac-M1, pFastBac-M2 and pFastBac-M3. Recombinant baculoviruses rBV-ENO1, rBV-M1, rBV-M2 and rBV-M3 were subsequently obtained through transposition and transfection. The expression and specificity of the target proteins were examined using WB assay. **Results:** Recombinant bacilli rBacmid-ENO1, rBacmid-M1, rBacmid-M2 and rBacmid-M3 were successfully amplified, obtaining a gene fragment of about 2 000 bp in size, which was consistent with the expected size. The insect BEVS could express the ENO1 protein and its recombinant proteins (ENO1-M1, ENO1-M2, ENO1-M3) with three enzyme active site deletions, each with a molecular weight of approximately 52 000, as expected. WB analysis confirmed that these proteins reacted with the specific His-tag antibody. **Conclusion:** The insect BEV successfully expresses the target protein and its proteins with enzyme active site deletions, namely ENO1-M1, ENO1-M2 and ENO1-M3. This protein's reactivity establishes the foundation for subsequent determination of the affinity of these proteins, and ENO1 monoclonal antibody.

**[Key words]** enolase 1 (ENO1); baculovirus expression vector system (BEVS); protein expression; loss of enzyme activity sites

[Chin J Cancer Biother, 2024, 31(7): 669-674. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2024.07.004]

**[基金项目]** 国家自然科学基金(No. 82260557)

**[作者简介]** 代鹏钰(1997—), 硕士生, 主要从事妇科肿瘤的治疗研究。E-mail: 1975530548@qq.com

**[通信作者]** 刘会玲, E-mail: Liuhuilingss@163.com

$\alpha$ -烯醇化酶(enolase 1, ENO1)又称2-磷酸-D-甘油酸水解酶,其主要作用是在糖酵解途径中作为糖酵解酶双向催化2-磷酸甘油酸转化为磷酸烯醇丙酮酸<sup>[1]</sup>。作为一种蛋白酶,ENO1广泛存在于各种生物体中,与多种疾病密切相关。研究<sup>[2]</sup>证实,ENO1在肺癌、乳腺癌、宫颈癌等多种类型肿瘤组织中呈高表达趋势。ENO1在疾病中的作用主要取决于其免疫原性、DNA结合能力和纤溶酶(原)受体功能,这些功能主要受其三维结构、表面性质和酶活性的影响。ENO1是由 $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ 亚基组成的二聚体,其编码基因全长约18 kb,由12个外显子和11个内含子组成,其蛋白二级结构由21个 $\alpha$ -螺旋、13个 $\beta$ -折叠和4个无规卷曲组成。ENO1主要位于染色体区域1p36,这是人类恶性肿瘤中经常重排或缺失的区域<sup>[3]</sup>。有研究<sup>[4]</sup>证实,在模拟晶体结构中,人ENO1的活性位点包括L1(残基36~43)、L2(残基156~162)和L3(残基262~270)、Glu292、ASP317、ASP244和Ser39上的两个镁离子及水分子,两个镁离子分别与Glu292、Asp317、Asp244和Ser39结合,它们是ENO1的关键活性位点残基。但关于ENO1发挥糖酵解酶活性的位点及其在空间中的结构研究目前尚未见报道。昆虫杆状病毒表达系统(baculovirus expression vector system, BEVS)是以杆状病毒作为外源基因载体,以昆虫细胞或昆虫作为受体进行基因组自我扩增和目的蛋白表达的工具<sup>[5]</sup>。昆虫BEVS相较于原核、真核表达系统具有一定的优势,其可以同时表达多个蛋白,对蛋白进行翻译后修饰,使结构更接近于天然蛋白<sup>[6]</sup>。本研究拟通过优化ENO1基因及其酶活性位点缺失的ENO1蛋白,利用昆虫BEVS克隆和表达ENO1蛋白及其活性位点缺失的3个蛋白ENO1-M1、ENO1-M2和ENO1-M3,进而为后续深入研究这些蛋白质结晶及其结构和功能奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 质粒、菌种、细胞及主要试剂

密码子优化、含目的基因的重组质粒均由华大基因公司合成, DH10Bac™ *E. coli* 感受态细胞、ExpiSf9™ 昆虫细胞由本实验室保存。

质粒提取试剂盒购自美国Omega Bio-Tek公司, 氨苄青霉素购自美国Sigma-Aldrich公司, 四环素、卡那霉素、庆大霉素、X-gal购自索莱宝科技有限公司, ExpiSf9™ CD培养基、杆粒提取试剂盒、ExpiFactmine™ Sf转染试剂、ExpiSf™ 增强剂购自赛默飞科技有限公司。

### 1.2 重组质粒构建

参照人ENO1基因序列(GeneBank: NM\_001428)

根据昆虫细胞密码子偏好性进行优化后,在C端添加gp67信号肽(ATGGTAAGAGCTATTGTTTATATGTGCTTTTGGGGCGGCGGCATTCTGCCTTGCG),在N端添加gs连接器(gs linker)、His标签(His-tag),在基因两侧引入BamH I、HindIII酶切位点,利用AlphaFold<sup>2</sup>软件进行蛋白质的三维结构模拟,再利用PyMOL2.2.5软件进行可视化分析;设计后的序列由华大基因科技有限公司克隆至pFastBac™1载体上,构建重组质粒pFastBac-ENO1。同时,根据ENO1发挥糖酵解功能的3个酶活性位点(PSGASTGI、GSHAGNK和SPDDPSRY),通过分别移除其相对应的碱基序列(36~43,156~162,262~270)分别缺失这3个位点,构建3个酶活位点缺失的ENO1重组质粒,分别命名为pFastBac-M1、pFastBac-M2和pFastBac-M3。

### 1.3 重组杆粒提取与鉴定

将构建好的重组质粒pFastBac-ENO1于42℃热刺激45 s转化到DH10Bac™ *E. coli* 感受态细胞内,冰上静置2 min后加入900  $\mu$ L的Luria-Bertani(LB)液体培养基,在37℃、摇床(225 r/min)上振荡培养4 h。取100  $\mu$ L菌液均匀涂布于含有四环素(10  $\mu$ g/mL)、硫酸卡那霉素(50  $\mu$ g/mL)、庆大霉素(7  $\mu$ g/mL)、IPTG(40  $\mu$ g/mL)和X-gal(100  $\mu$ g/mL)的蓝白斑筛选LB平板上,37℃下先正置30 min,后倒置培养48 h以上。挑选白斑,加入2 mL含三抗(硫酸卡那霉素50  $\mu$ g/mL、庆大霉素7  $\mu$ g/mL、四环素10  $\mu$ g/mL)LB培养基中,在37℃、摇床(225 r/min)上振荡培养过夜。取100  $\mu$ L菌液再次涂布于蓝白斑筛选平板,37℃倒置培养48 h以上。挑取再次验证后的白色菌落于含有50  $\mu$ g/mL卡那霉素、7  $\mu$ g/mL庆大霉素、10  $\mu$ g/mL四环素的5 mL LB液体培养基中,在37℃、摇床(225 r/min)上培养12 h后,使用杆状病毒穿梭载体bacmid小量抽提试剂盒提取重组杆粒rbacmid,使用ENO1正向引物(CGCGGATCCATGGTAAGC)与pUC/M13反向引物(AGCGGATAACAATTTCACACAGG)进行PCR鉴定,用1%琼脂糖凝胶电泳验证。将鉴定好的菌株提取杆粒并命名为rBacmid-ENO1。用同样的方法制备其余3个缺失突变的重组杆粒,分别命名为rBacmid-M1、rBacmid-M2和rBacmid-M3。

### 1.4 重组杆状病毒的制备

#### 1.4.1 P0代杆状病毒的制备

将对数生长期的昆虫细胞ExpiSf9™以 $6 \times 10^5$ 个/mL的密度(存活率 $\geq 95\%$ )加入125 mL摇瓶中,27℃下培养3~4 d,待其密度达 $5 \times 10^6$ 个/mL(存活率 $\geq 90\%$ ),使用ExpiFactmine转染试剂(将30 mL ExpiFactmine转染试剂加入1 mL减少血清的Opti-MEM™培养基稀释血清培

培养基中)将 12.5  $\mu\text{g}$  rBacmid-ENO1 转染昆虫细胞 ExpiSf<sup>TM</sup>, 继续在 27 °C、摇床(125 r/min)上振荡培养, 观察细胞病变情况。96 h 后收上清液, 为第 0 代重组杆状病毒 P0。继续以  $1 \times 10^6$  个/mL 的密度(存活率  $\geq 90\%$ )将处于对数生长期的细胞加入 500 mL 摇瓶中 27 °C、摇床(125 r/min)上振荡培养, 待其密度达  $5 \times 10^6$  活细胞/mL(存活率  $\geq 90\%$ ), 将 P0 代杆状病毒用 ExpiSf<sup>TM</sup> CD 培养基按 1:10 的比例进行稀释后, 取 100  $\mu\text{L}$  感染细胞。

#### 1.4.2 P1 代杆状病毒的制备

在 27 °C 下培养 96 h 后收集上清液, 即为第 1 代重组杆状病毒 P1。将获得的杆状病毒命名为 rBV-ENO1, 用于后续目的蛋白表达。用同样的方法分别制备缺失突变的重组杆状病毒并命名为 rBV-M1、rBV-M2 和 rBV-M3。同时, 设置未转染的昆虫细胞 ExpiSf<sup>TM</sup> 作为空白对照。

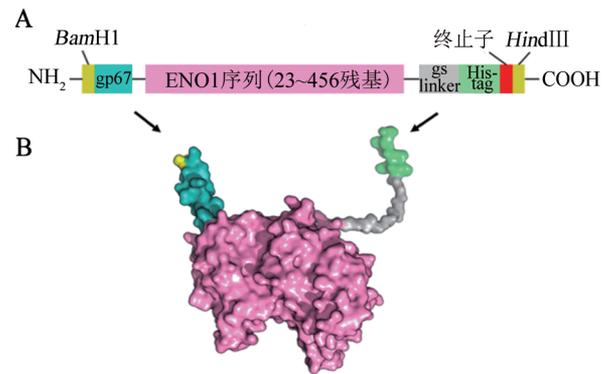
#### 1.5 WB 法检测重组蛋白的表达

按 1:100 稀释后的 P1 代杆状病毒感染密度为  $5 \times 10^6$  个/mL 的昆虫细胞 ExpiSf<sup>TM</sup>(存活率  $\geq 90\%$ ), 在 27 °C、摇床(125 r/min)上振荡培养 72 h,  $72 \times g$  离心 20 min 后收获 ENO1 及其 3 个位点缺失蛋白分泌表达培养上清, 用 0.22  $\mu\text{m}$  滤膜过滤后放置于 -60 °C 保存。同时, 设置未转染病毒的空白对照。提取后的蛋白用 BAC 蛋白测定试剂盒测定蛋白浓度, 样品经 10% SDS-PAGE 分离后, 将蛋白质样品转移至 PVDF 膜, 在 5% 脱脂奶粉中封闭 2 h, 加入 1:5 000 稀释的抗 His 抗体, 在 4 °C 冰箱中过夜。洗膜后, 加入 1:5 000 稀释的 HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG 中在室温下反应 2 h, 采用超灵敏化学发光成像仪显影。

## 2 结果

### 2.1 ENO1 三维结构模拟与重组质粒构建

为了表达可溶性蛋白 ENO1, 重新设计生成重组质粒 pFastBac1-gp67-ENO1-gs linker-His-tag(图 1A)。基于 ENO1 核酸序列获得氨基酸序列, 通过分析发现 ENO1 结构域的预测结构折叠成团, 没有分散现象, 说明预测结果较好(图 1B)。

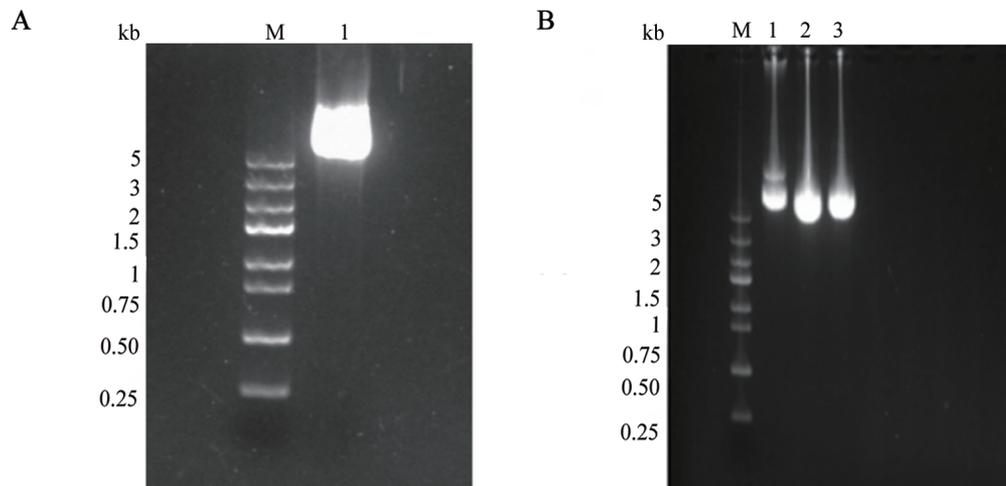


A: pFastBac1-gp67-ENO1-gs linker-His-tag 三维结构对应的序列示意图; B: 预测获取的目标蛋白 ENO1 的三维结构图(黄色表示酶切位点, 蓝绿色表示 gp67 信号肽, 粉红色表示 ENO1 结构域, 灰色表示 gs 连接器, 绿色表示 His 标签)。

图 1 ENO1 三维结构预测和构造设计

### 2.2 成功构建重组穿梭质粒

将构建的重组质粒 pFastBac-ENO1、pFastBac-M1、pFastBac-M2、pFastBac-M3 分别经 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定, 可见 6 000 bp 左右目的片段(图 2), 与预期相符, 表明重组穿梭质粒构建成功。



A: 重组质粒 pFastBac-ENO1 的鉴定(M: DNA marker; 1: 重组质粒 pFastBac-ENO1); B: 重组质粒 pFastBac-M1、pFastBac-M2 和 pFastBac-M3 的鉴定(M: DNA marker; 1: 位点 1 缺失突变重组质粒 pFastBac-M1; 2: 位点 2 缺失突变重组质粒 pFastBac-M2; 3: 位点 3 缺失突变重组质粒 pFastBac-M3)。

图 2 重组质粒 pFastBac-ENO1 和 pFastBac-M1、pFastBac-M2 和 pFastBac-M3 的鉴定结果

### 2.3 成功构建重组杆粒

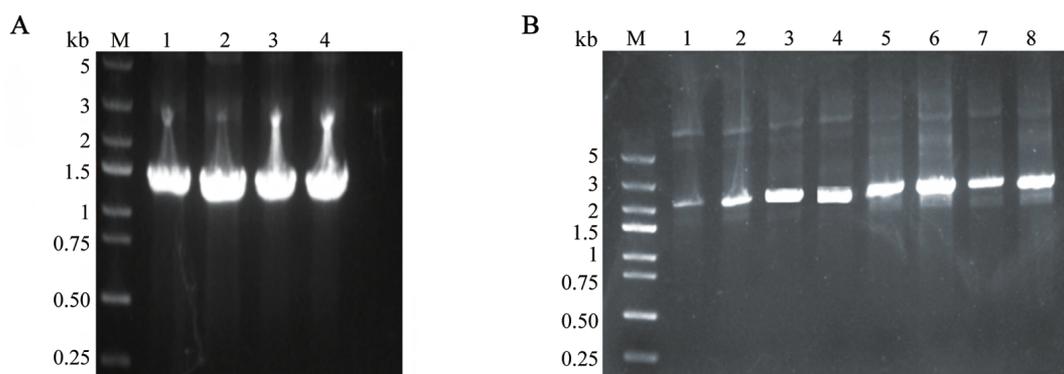
重组质粒 pFastBac-ENO1、pFastBac-M1、pFastBac-M2 和 pFastBac-M3 转染入 DH10Bac 感受态细胞进行转座,经两次蓝白斑筛选。挑取白色菌斑,PCR 验证结果显示,扩增出片段大小分别为 1 440、1 416、1 419 和 1 416 bp,与目的片段大小一致(图 3A)。选取验证正确的白色菌落震荡培养过夜后,用小提杆粒试剂盒 BAC/PAC DNA Kit 提取重组杆粒 rBacmid-ENO1、rBacmid-M1、rBacmid-M2、rBacmid-M3 经通用引物 M13 进行 PCR 鉴定。结果如图 3B 所示,对于发生转座的阳性质粒,重组质粒 PCR 后产物分别为 2 560、2 536、2 539 和 2 536 bp,结果符合预期,表明挑取白色菌落转座成功。

### 2.4 重组杆粒 rBacmid-ENO1 成功转染入 Expisp9™ 昆虫细胞

按照上述条件连续传代 2 次后,显微镜观察发现,与未转染 Expisp9™ 细胞相比,阳性细胞表现为肿胀、变大、变圆的形态,培养液中出现细胞片段(图 4)。结果表明,成功获得 P0、P1 代重组杆状病毒。

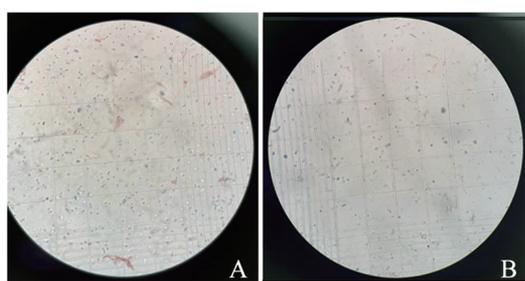
### 2.5 成功表达目的蛋白

收集病毒上清液后去除细胞碎片过滤后进行分析,WB 法检测结果(图 5)显示,在分子量 52 000 左右有特异反应性条带,表明 ENO1 蛋白及其 3 个酶活性位点缺失的重组蛋白 ENO1-M1、ENO1-M2、ENO1-M3 成功表达,具有反应原性。



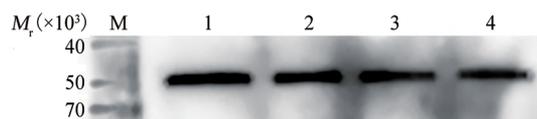
A: 菌落鉴定(M: DNA marker; 1: pFastBac-ENO1 白色菌落; 2: pFastBac-M1 白色菌落; 3: pFastBac-M2 白色菌落; 4: pFastBac-M3 白色菌落); B: 重组杆粒的鉴定(M: DNA marker; 1/2: rBacmid-ENO1; 3/4: rBacmid-M1; 5/6: rBacmid-M2; 7/8: rBacmid-M3)。

图3 菌落及重组杆粒的鉴定结果



A: 转染前细胞染色结果; B: 转染后台盼蓝染色结果。

图4 重组杆粒转染后细胞的形态变化(培养细胞悬浮液稀释 10 倍, ×20)



M: 蛋白 Marker; 1: 重组蛋白 ENO1 与抗 His-ab 的反应; 2: 重组蛋白 ENO1-M1 与抗 His-ab 的反应; 3: 重组蛋白 ENO1-M2 与抗 His-ab 的反应; 4: 重组蛋白 ENO1-M3 与抗 His-ab 的反应。

图5 重组蛋白的鉴定

## 3 讨论

研究<sup>[7-9]</sup>证实,在多种肿瘤细胞(如宫颈癌、乳腺癌、结肠直肠癌细胞)中 ENO1 呈高表达趋势, ENO1 作为糖酵解途径中的关键酶,主要定位于细胞质中,催化 2-磷酸甘油酸向磷酸烯醇式丙酮酸转化,同时产生三磷酸腺苷,在能量代谢中发挥重要作用,促进肿瘤细胞的 Warburg 效应<sup>[10]</sup>,在肿瘤发生发展中起关键作用。敲除 ENO1 基因可显著降低糖酵解水平,进而抑制肿瘤生长和增加对药物的敏感性<sup>[8]</sup>。本实验室前期通过构建携带 shRNA 的慢病毒干扰 ENO1 基因表达,与此实验结果一致,同样提示抑制 ENO1 表达可以阻断糖酵解,从而起到治疗肿瘤的作用<sup>[11]</sup>。但是, RNA 干扰技术很难应用于临床。随着生物学和分子免疫学的不断发展与更新,靶向肿瘤疗法逐渐成为抗肿瘤治疗的一种新途径<sup>[12]</sup>。所以,本实验室又通过杂交瘤技术制备并筛选出 5 种 ENO1 单克隆抗体(monoclonal antibody, mAb),其中 2 种具有较强的抗

肿瘤活性,但由于其分子量较大很难进入细胞发挥作用,故又制备了具有肿瘤靶向性的 ENO1 mAb 纳米颗粒,将其递送至宫颈癌细胞内。体外细胞实验结果<sup>[13]</sup>表明,ENO1 mAb 能明显抑制宫颈癌 HeLa 细胞乳酸、丙酮酸等物质生成,同时抑制 HeLa 细胞增殖与迁移。发现利用 ENO1 mAb 联合谷氨酰胺抑制剂 CB-839 具有协同抑制肿瘤细胞增殖的作用<sup>[14]</sup>,由此进一步证实 ENO1 mAb 具有抑制宫颈癌细胞糖酵解途径的功能。后来,陆续制备出 ENO1 单链抗体、ENO1 嵌合抗体<sup>[15]</sup>,拟通过设计改造 ENO1 后制备出纯度、浓度更高的 ENO1,进而测定 ENO1 蛋白与这些抗体的亲和力,找到与 ENO1 蛋白亲和力更高 ENO1 mAb,从而提高治疗性抗体的药效。研究<sup>[16]</sup>发现,利用噬菌体库展示技术和生物信息学分析,发现人 ENO1 残基 257~268 氨基酸可能是引起机体免疫应答的活性表位肽,此肽段特有的空间结构有利于与纤溶酶原抗体的特异性结合。本实验向 ENO1 发挥糖酵解酶活性的 3 个结构环基因引入缺失突变,缺失突变会影响其结构,但对其空间结构影响较小,也不影响其功能。如果选用不同的残基进行突变及应用不同性质的氨基酸替代原来的氨基酸,则对蛋白能否正常表达及功能影响不一致,故本研究先采用缺失突变的方法来定位其具体活性位点环。后续实验中,将继续通过测定 ENO1 蛋白及活性位点缺失的 ENO1 蛋白与抗体亲和力,模拟其晶体结构等,寻找其具体与抗体结合的活性位点。

蛋白酶的活性位点可作为肿瘤治疗的靶点,研究具体活性位点不仅有利于研究肿瘤的发病机制,更有利于新药的研发<sup>[17]</sup>。通过靶向底物结合位点远端的结构位点设计靶向药物是近年来研究的热点<sup>[18]</sup>。变构位点的识别对于虚拟筛选可充当有效非竞争性抑制剂的小分子非常重要,而识别蛋白活性所必须的活性位点残基有助于小分子药物的筛选<sup>[19]</sup>。改变蛋白酶的关键活性位点会影响蛋白酶抑制剂的活性和特异性,这为肿瘤治疗提供了新的思路。

BEVS 是以杆状病毒作为外源基因载体,以昆虫细胞作为宿主进行基因组自我扩增和目的蛋白表达的工具<sup>[20]</sup>。昆虫 BEVS 相较于原核、酵母表达系统有很多优点,其可以表达抗原性较好、与天然蛋白功能高度相似的可溶性重组蛋白。昆虫 BEVS 还具有高表达、安全性较好的特点。因此,昆虫 BEVS 是表达蛋白的理想载体<sup>[13]</sup>。本实验通过 BEVS 表达外源基因,在 N 端插入 His 标签,利于后续目的蛋白的鉴定。将其连接至 pFast-Bac1 载体上,再通过转染昆虫细胞 Expis9<sup>TM</sup> 获得重组杆状病毒,成功表达目的蛋白,

WB 法鉴定这些蛋白具有反应原性,为后续筛选高亲和力的 ENO1 mAb 和研究 ENO1 蛋白的结构及具体的活性位点奠定了实验基础。

## [参 考 文 献]

- [1] HUPPERTZ I, PEREZ-PERRI J I, MANTAS P, *et al.* Riboregulation of Enolase 1 activity controls glycolysis and embryonic stem cell differentiation[J/OL]. *Mol Cell*, 2022, 82(14): 2666-2680.e11[2024-01-03]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35709751/>. DOI: 10.1016/j.molcel.2022.05.019.
- [2] GU Z M, XIA J L, XU H W, *et al.* NEK2 promotes aerobic glycolysis in multiple myeloma through regulating splicing of pyruvate kinase [J/OL]. *J Hematol Oncol*, 2017, 10(1): 17[2024-01-03]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28086949/>. DOI: 10.1186/s13045-017-0392-4.
- [3] LI L P, LU H, ZHANG X, *et al.* Baicalein acts against *Candida albicans* by targeting Eno1 and inhibiting glycolysis[J/OL]. *Microbiol Spectr*, 2022, 10(4): e0208522[2024-01-03]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9430770/>. DOI: 10.1128/spectrum.02085-22.
- [4] KANG H J, JUNG S K, KIM S J, *et al.* Structure of human alpha-enolase (hENO1), a multifunctional glycolytic enzyme[J]. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 2008, 64(Pt 6): 651-657. DOI: 10.1107/S0907444908008561.
- [5] BRUDER M R, AUCCOIN M G. Utility of alternative promoters for foreign gene expression using the baculovirus expression vector system[J/OL]. *Viruses*, 2022, 14(12): 2670[2024-01-03]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36560674/>. DOI: 10.3390/v14122670.
- [6] HONG M Q, LI T T, XUE W H, *et al.* Genetic engineering of baculovirus-insect cell system to improve protein production[J/OL]. *Front Bioeng Biotechnol*, 2022, 10: 994743[2024-01-03]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9530357/>. DOI: 10.3389/fbioe.2022.994743.
- [7] GOU Y F, LI F, HUO X Q, *et al.* ENO1 monoclonal antibody inhibits invasion, proliferation and clone formation of cervical cancer cells[J/OL]. *Am J Cancer Res*, 2021, 11(5): 1946-1961[2024-01-03]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8167678/>.
- [8] ZHANG J, LI H Y, MIAO L, *et al.* Silencing of ENO1 inhibits the proliferation, migration and invasion of human breast cancer cells [J]. *J BUON*, 2020, 25(2): 696-701.
- [9] GU J R, ZHONG K Q, WANG L G, *et al.* ENO1 contributes to 5-fluorouracil resistance in colorectal cancer cells via EMT pathway [J/OL]. *Front Oncol*, 2022, 12: 1013035[2024-01-03]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9813957/>. DOI: 10.3389/fonc.2022.1013035.
- [10] DINH D T D, KUHLE S, GÖRTZ L, *et al.* Expression of ENO1 is up-regulated in low-grade glioma and positively correlated with meningioma grade[J]. *Anticancer Res*, 2022, 42(5): 2319-2326. DOI: 10.21873/anticancer.15711.
- [11] 张栋栋, 刘会玲, 范维, 等. 慢病毒介导的  $\alpha$ -烯醇化酶基因沉默对宫颈癌细胞化疗药物敏感性的影响[J]. *世界科技研究与发展*, 2014, 36(4): 398-401. DOI: 10.3969/j.issn.1006-6055.2014.04.006.
- [12] RANASINGHE P, ADDISON M L, DEAR J W, *et al.* Small interfering RNA: discovery, pharmacology and clinical development-An introductory review[J]. *Br J Pharmacol*, 2023, 180(21): 2697-2720. DOI: 10.1111/bph.15972.

- [13] GOU Y F, LI F, HUO X Q, *et al.* ENO1 monoclonal antibody inhibits invasion, proliferation and clone formation of cervical cancer cells[J/OL]. *Am J Cancer Res*, 2021, 11(5): 1946-1961[2024-01-03]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8167678/>.
- [14] 裴亚萍, 苟元凤, 李菲, 等. ENO1 mAb联合谷氨酰胺酶抑制剂CB-839抗宫颈癌细胞作用[J]. *兰州大学学报(医学版)*, 2022, 48(4): 10-16. DOI: 10.13885/j.issn.1000-2812.2022.04.003.
- [15] 陈圆圆. ENO1单链抗体及人—鼠嵌合抗体的构建[D]. 兰州: 甘肃中医药大学, 2023.
- [16] 韩冬.  $\alpha$ -烯醇化酶单克隆抗体的制备及生物学特性的初步鉴定[D]. 武汉: 华中师范大学, 2015.
- [17] 张杰, 杨玺, 李游山. 蛋白酶及其抑制剂关键活性位点研究进展[J]. *生物工程学报*, 2021, 37(2): 561-579. DOI: 10.13345/j.cjb.200579.
- [18] SAMPSON C, WANG Q P, OTKUR W, *et al.* The roles of E3 ubiquitin ligases in cancer progression and targeted therapy[J/OL]. *Clin Transl Med*, 2023, 13(3): e1204[2024-01-03]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9991012/>. DOI: 10.1002/ctm2.1204.
- [19] 袁素素, 叶秀云, 鄢仁祥. 蛋白质受体的药物分子计算机辅助设计策略[J]. *生物信息学*, 2023, (6): 1-18. DOI: 10.12113/202302018.
- [20] TROMBETTA C M, MARCHI S, MONTOMOLI E. The baculovirus expression vector system: a modern technology for the future of influenza vaccine manufacturing[J]. *Expert Rev Vaccines*, 2022, 21(9): 1233-1242. DOI: 10.1080/14760584.2022.2085565.

[收稿日期] 2024-01-04

[修回日期] 2024-05-20

[本文编辑] 党瑞山