

[文章编号] 1671-587X(2024)04-0970-08

DOI:10.13481/j.1671-587X.202404011

基于泛基因组学和消减蛋白质组学技术筛选金黄色葡萄球菌 新型抗菌靶点及其药物的分子对接分析

谭锦莉^{1,2}, 黄丹^{1,2}, 廖婧阳^{1,2}, 朱刘冲^{1,2}, 刘文彬^{1,2}

(1. 广东药科大学基础医学院病原生物学教研室, 广东 广州 510006; 2. 广东省生物活性药物研究
重点实验室, 广东 广州 510006)

[摘要] **目的:** 应用泛基因组学和消减蛋白质组学技术从金黄色葡萄球菌基因组中筛选新抗菌靶点, 为抗金黄色葡萄球菌药物的研发奠定基础。**方法:** 在美国国家生物技术信息中心 (NCBI) 数据库中以金黄色葡萄球菌为关键词检索全基因组测序数据, 收集 50 个测序级别为 Complete 的菌株基因组数据。采用 BPGA 工具对基因组数据进行泛基因组分析获得金黄色葡萄球菌核心基因, 采用消减蛋白质组学技术从中筛选获得潜在抗菌靶点, 以潜在抗菌靶点为受体, 采用 LibDock 软件从美国食品药品监督管理局 (FDA) 批准的药物库中筛选潜在的抗金黄色葡萄球菌药物, 并采用分子对接技术分析药物和靶点的结合能力。**结果:** 50 个金黄色葡萄球菌基因组中共有 14 379 个基因家族, 其中 1 620 个为核心基因。消减蛋白质组学分析, 酪氨酸自激酶 1335 为潜在的抗金黄色葡萄球菌靶点。采用 LibDock 软件筛选出巴龙霉素、替诺福韦二吡啶酯和阿德福韦等 9 个化合物可能针对该靶点蛋白发挥抗金黄色葡萄球菌作用, 分子对接结果显示靶点与化合物结合力良好。**结论:** 酪氨酸自激酶可能是一种抗金黄色葡萄球菌潜在的靶点。

[关键词] 金黄色葡萄球菌; 泛基因组; 分子对接; 消减蛋白质组

[中图分类号] R378.1; Q811.4 **[文献标志码]** A

Molecular docking analysis on screening of novel antibacterial targets and their drugs of *Staphylococcus aureus* based on pan-genomics and subtractive proteomics techniques

TAN Jinli^{1,2}, HUANG Dan^{1,2}, LIAO Jingyang^{1,2}, ZHU Liuchong^{1,2}, LIU Wenbin^{1,2}

(1. Department of Pathogenic Biology, School of Basic Medical Sciences, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China; 2. Guangdong Provincial Key Laboratory of Pharmaceutical Bioactive Substances, Guangzhou 510006, China)

ABSTRACT Objective: To use pan-genomics and subtractive proteomics techniques to screen the new antibacterial targets from the *Staphylococcus aureus* genome, and to lay the foundation for the development of anti-*Staphylococcus aureus* drugs. **Methods:** The genome sequencing data of 50 strains with sequencing level Complete were collected by searching the whole genome sequencing data in the National Center for Biotechnology Information (NCBI) Database with *Staphylococcus aureus* as the keyword; BPGA tool was

[收稿日期] 2023-06-12

[基金项目] 广东省卫健委医学科学技术研究基金项目 (A2022069); 广东省中医药局科研项目 (2022A010010); 广东省广州市科技局科技计划项目 (202201010357)

[作者简介] 谭锦莉 (1995—), 女, 广东省广州市人, 在读硕士研究生, 主要从事病原生物学方面的研究。

[通信作者] 刘文彬, 助理研究员, 硕士研究生导师 (E-mail: 408011126@163.com)

used to conduct the pan-genomics analysis on the genomic data to obtain the core genes of *Staphylococcus aureus*; subtractive proteomics technique was used to screen the potential antibacterial targets from the core genes. These potential antibacterial targets were used as the receptors; LibDock software was used to screen the potential anti-*Staphylococcus aureus* drugs from the US Food and Drug Administration (FDA)-approved drug library; molecular docking technology was used to analyze the binding abilities of the drugs and targets. **Results:** There were 14 379 gene families in the 50 *Staphylococcus aureus* genomes, of which 1 620 were the core genes. The subtractive proteomics analysis results showed that tyrosine autokinase 1335 was the potential anti-*Staphylococcus aureus* target. LibDock software screened out nine compounds, including balofloxacin, tenofovir disoproxil fumarate, and adefovir, that may exert anti-*Staphylococcus aureus* effects on this target protein. The molecular docking results showed there was good binding abilities between the targets and the compounds. **Conclusion:** Tyrosine autokinase may be the potential target for anti-*Staphylococcus aureus*.

KEYWORDS *Staphylococcus aureus*; Pan-genome; Molecular docking; Subtractive proteome

金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 是一种革兰阳性病原菌, 是人类感染中最常见的病原菌, 可引起局部的化脓感染、肺炎、败血症和脓毒症等^[1]。由于金黄色葡萄球菌的生物膜形成及其自身多重耐药性等特点, 导致常规抗菌药物抗菌作用不佳^[2], 迫切需要开发新型抗金黄色葡萄球菌药物。药物靶点是新药开发的基础, 通过实验筛选抗菌药物靶点周期长且费用昂贵, 如何加快药物靶点的筛选有助于加速新型抗菌药物的研发。泛基因组是指包含同一物种不同个体的所有基因组, 包括核心基因、附属基因和独特基因^[3]。核心基因参与对物种生存和繁殖等至关重要的基本生物学功能, 如细胞呼吸及DNA复制、转录和翻译等^[4], 因此从核心基因中筛选药物靶点具有极大的潜力。IRFAN等^[5]研究显示: 从产吡啶黄杆菌的核心基因中筛选出的D-丙氨酰-D-丙氨酸羧肽酶可能是一种潜在的抗菌靶点。BASHARAT等^[6]研究显示: 采用泛基因组分析发现的2, 3, 4, 5-tetrahydro-pyridine-2-carboxylate N-succinyltransferase可能是针对恙虫病东方体的药物靶点。本研究将泛基因组技术和消减蛋白质组技术相结合, 从金黄色葡萄球菌核心基因组中筛选抗菌靶点, 并采用分子对接技术从数据库中筛选针对该靶点的药物, 以期抗金黄色葡萄球菌靶点和药物的开发提供新的思路。

1 资料与方法

1.1 基因组数据下载

从美国国家生物技术信息中心 (National Center for Biotechnology Information, NCBI) 数据库 (2023年3月2日, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/>) 中检索金黄色葡萄球菌全基因组数据, 选择50个最新上传且测序级别为Complete的菌株数据进行下载分析。所有基因组登录号如下:

GCA_024612055.1, GCA_025259685.1,
GCA_024399375.1, GCA_020177155.3,
GCA_024296825.1, GCA_026547005.1,
GCA_026547185.1, GCA_026547075.1,
GCA_026547055.1, GCA_026547095.1,
GCA_026547005.1, GCA_026547145.1,
GCA_026546985.1, GCA_026547035.1,
GCA_025232045.1, GCA_022832835.1,
GCA_023373745.1, GCA_024172245.1,
GCA_027943925.1, GCA_027943905.1,
GCA_020702615.2, GCA_023170045.1,
GCA_025643635.1, GCA_025559005.1,
GCA_025559325.1, GCA_025559605.1,
GCA_025561585.1, GCA_025559685.1,
GCA_025559725.1, GCA_025559745.1,
GCA_025561605.1, GCA_025561625.1,
GCA_025560825.1, GCA_025561645.1,
GCA_027942275.1, GCA_027942255.1,
GCA_026167725.1, GCA_027920385.1,
GCA_026636215.1, GCA_026625925.1,
GCA_028743615.1, GCA_000756205.1,
GCA_028596145.1, GCA_028596165.1,
GCA_026636235.1, GCA_020906975.2,
GCA_028596045.1, GCA_024741575.1,
GCA_024741455.1, GCA_024741615.1,
GCA_024741555.1。

1.2 金黄色葡萄球菌的泛基因组分析

采用BPGA软件进行金黄色葡萄球菌的泛基因组分析^[7]。利用USEARCH软件以50%序列同源为截断值,构建金黄色葡萄球菌核心基因组;利用MUSCLE软件对核心基因进行串联比对,采用Gunplot软件绘制泛基因组与核心基因组点图;通过Neighbor-Joining法构建系统发育树,并用Mega-X软件可视化;使用同源蛋白簇(Clusters of Orthologous Groups of Proteins, COG)数据库对所有核心基因、附属基因和独特基因进行功能分析。与核心基因组相关的蛋白质序列用于随后的药物靶点筛选。

1.3 金黄色葡萄球菌消减蛋白质组学筛选

1.3.1 核心基因的非人同源(non-human, NH)基因、必需基因和毒力因子(virulent factor, VF)基因筛选 首先对核心基因进行NH基因、必需基因和VF基因筛选。下载人基因组数据,采用NCBI BLASTp工具进行本地比对,核心基因中E-value $>1 \times 10^{-3}$ 的基因为NH基因;核心基因输入必需基因数据库(Database of Essential Gene, DEG)(<https://tubic.org/deg/public/index.php>),以截断值E-value $<10^{-4}$ 和bit score >100 筛选获得必需基因^[8];核心基因输入毒力因子数据库(Virulence Factors Database, VFDB)(<http://www.mgc.ac.cn/cgi-bin/VFs/v5/main.cgi>),以截断值E-value $<10^{-4}$ 筛选获得VF基因^[9]。

1.3.2 蛋白质理化性质预测 根据编码蛋白质的理化性质进行筛选。采用Protparam工具(<https://web.expasy.org/protparam/>)预测蛋白质的理化性质,包括氨基酸数、相对分子质量、等电点(isoelectric point, pI)和总平均亲水性(grand average of hydropathicity, GRAVY)等^[10]。采用CELLO软件(<http://cello.life.nctu.edu.tw/>)预测蛋白质的亚细胞定位^[11]。排除氨基酸数目 <100 、相对分子质量 $>110\ 000$ 、GRAVY数值为正、低脂肪指数和非细胞膜定位的蛋白。

1.4 靶点蛋白的分子对接

1.4.1 靶点蛋白的同源建模 靶点蛋白采用SWISS-MODEL软件(<https://swissmodel.expasy.org/>)进行同源建模^[12]。选择覆盖率最大的蛋白作为模板,蛋白质模型合理性采用Ramachandran plot、GMQ和QMEANDisCo Global进行评价^[13]。

1.4.2 靶点蛋白与数据库化合物分子对接 采用BIOVIA Discovery Studio 2019软件进行分子对接筛选。从ZINC数据库批量下载经美国食品药品监督管理局(Food and Drug Administration, FDA)批准的892个天然药物分子作为配体,以靶点蛋白为受体,配体和受体经过预处理后,采用DeepSite软件(<https://www.playmolecule.com/>)预测受体活性位点,对接大小为10,采用LibDock软件进行批量分子对接。选取LibDock评分(LibDock Score)最高的9个化合物进行受体-配体非键作用分析^[14]。

2 结果

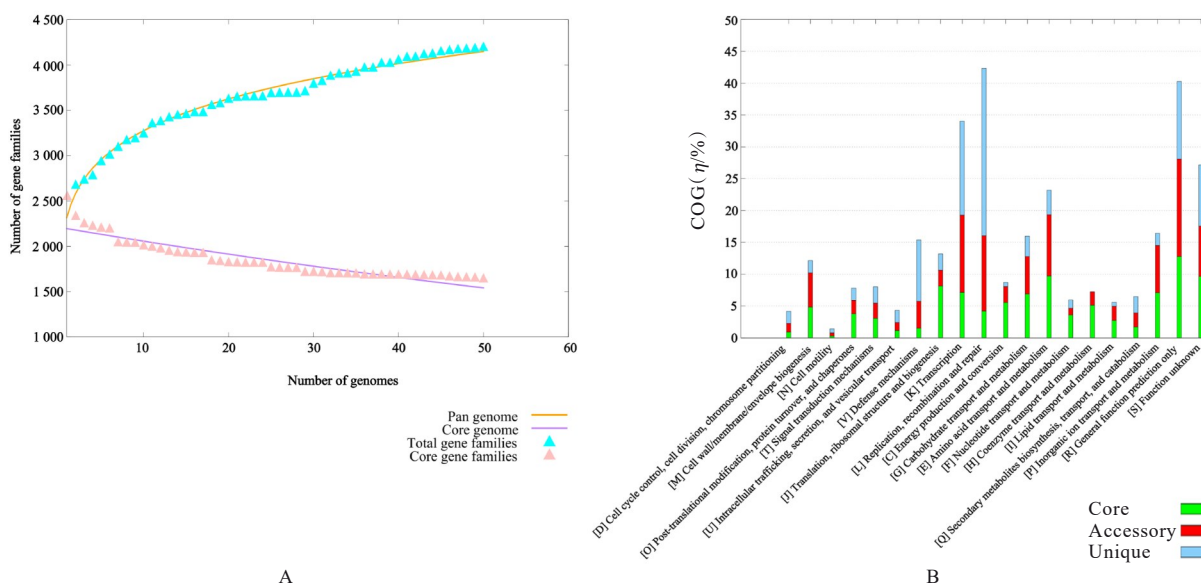
2.1 金黄色葡萄球菌泛基因组分析

泛基因组分析显示:50个金黄色葡萄球菌基因组共有14 379个基因家族,其中1 620个为核心基因。绘制Pan-core plot点图,拟合曲线方程: $f(x)=2\ 334.61 X^{0.147013}$,金黄色葡萄球菌的泛基因组b值=0.147 013,表明金黄色葡萄球菌的基因库虽然在持续发生变化,但是趋于稳定。金黄色葡萄球菌R3-8菌株的附属基因最多($n=1\ 035$),金黄色葡萄球菌Alexandria 2020-19菌株的附属基因最少($n=740$)。COG功能注释显示:核心基因组主要涉及氨基酸的运输、代谢和翻译及核糖体结构、生物发生和DNA转录等功能基因,辅助基因组主要涉及DNA转录、复制、重组、修复及氨基酸转运和代谢等功能基因,独特基因组主要涉及DNA复制、重组、修复、转录和防御机制等功能基因。见图1。

2.2 消减蛋白质组筛选药物靶点

对泛基因组进行分别NH基因、必需基因和VF基因进行筛选,结果显示:1 620个核心基因中含有VF基因25个、必需基因1 193个和NH基因1 124个,三者取交集获得8个潜在药物靶点。见图2。

对潜在的药物靶点进行了理化性质筛选,结果见表1。Gene576、Gene474和Gene66定位于细胞外基质上, Gene474相对分子质量大于100 000, Gene2511氨基酸数目少于100个, Gene2511和Gene2294的GRAVY值为正数,故上述基因均被剔除。Gene1335具有较低的pI数值,因此选择其作为抗菌药物靶点。Gene1335含有230个氨基酸,相对分子质量为25 250,可用于编码酪氨酸自激酶。



A: Pan-core plot of *Staphylococcus aureus* genomes; B: COG distribution of core genes.

图 1 50 株金黄色葡萄球菌的泛基因组分析

Fig. 1 Pan-genomic analysis on 50 strains of *Staphylococcus aureus*

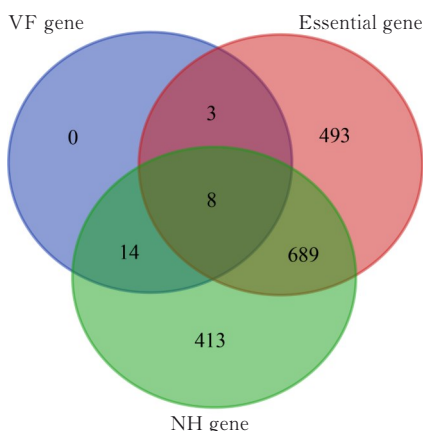


图 2 NH 基因、必需基因和 VF 基因的韦恩图

Fig. 2 Venn diagram of NH genes, essential genes, and VF genes

2.3 酪氨酸自激酶 1335 的同源建模

选择同源性 98.70% 的酪氨酸激酶 (tyrosine kinase, TK) (PDB ID: 2ved. 1. A) 为模板, 进行同源建模。二级结构数据显示: 酪氨酸自激酶 1335 含有 5 个 α 螺旋, 7 个 β 折叠, 1 个跨膜螺旋 (transmembrane helices, TMH)。蛋白的 GMQ 评分为 0.92 分, QMEANDisCo Global 评分为 (0.88 \pm 0.05) 分, Ramachandran plot 中显示 Ramachandran favoured 占 93.78%, Ramachandran outliers 占 1.78%, Rotamer outliers 占 4.29%, 表明酪氨酸自激酶 1335 蛋白结构合理, 可用于下一

步的分子对接。见图 3。

2.4 酪氨酸自激酶 1335 与药物的分子对接筛选

以酪氨酸自激酶 1335 为受体, 对 892 个来自 FDA 验证的天然化合物进行分子对接筛选, 892 个化合物生成 2 135 个构象, 分子对接产生 157 355 个对接结果。巴龙霉素、替诺福韦二吡啶酯和阿德福韦等 9 个化合物具有最高分数, LibDock Score 均大于 140 (表 2)。LibDock Score \geq 90 表明配体与受体具有较强的亲和力, 使得配体更容易结合^[19]。巴龙霉素、环丙沙星、去铁胺和甲氨蝶呤 4 个化合物具有抗菌活性, 而巴龙霉素和环丙沙星具有抗金黄色葡萄球菌活性。

酪氨酸自激酶 1335 与化合物的 2D 相互作用分析见图 4 和 5。药物与靶点之间的稳定性主要来源于化合物与受体活性位点之间形成氢键和疏水相互作用。酪氨酸自激酶 1335 与 9 个化合物均能产生较多的氢键和疏水相互作用。巴龙霉素的氧原子与酪氨酸自激酶 1335 的 Ser1056、Lys1055、Lys1082、Ala1053、Arg1212 和 Thr1057 残基形成 6 个常规氢键相互作用, 此外还与 Pro1160、Gly1054、Asn1211、Lys220 和 Phe221 残基形成 5 个碳氢键。

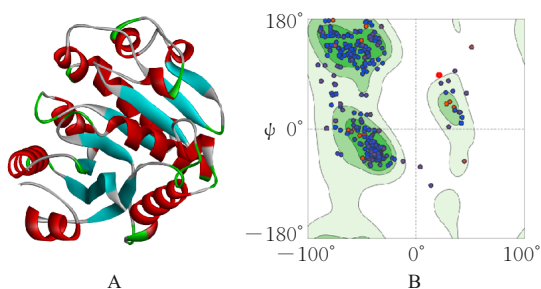
3 讨论

伴随抗生素的大量使用, 金黄色葡萄球菌对于针对传统抗菌靶点药物的耐药性不断增强。为了寻

表1 潜在药物靶点的理化性质

Tab. 1 Physicochemical properties of potential drug targets

Gene ID	Protein	Amino acid number	Molecular weight($\times 10^3$)	pI	Aliphatic index	GRA-VY	Cell localization
Gene576	Thermonuclease family protein	228	25.15	9.2	81.32	-0.350	Extracellular
Gene474	Bifunctional autolysin	1 260	137.88	9.6	67.98	-0.621	Extracellular
Gene1335	Tyrosine autokinase	230	25.25	5.45	88.61	-0.247	Cytoplasmic membrane
Gene1015	Type 8 capsular polysaccharide synthesis protein	185	21.06	9.28	103.73	-0.104	Cytoplasmic membrane
Gene2511	Delta-haemolysin precursor	45	5.14	9.03	142.89	0.827	Unknown
Gene2085	Manganese-dependent protein-tyrosine phosphatase	255	28.92	7.83	101.33	-0.252	Cytoplasmic
Gene2294	Capsular polysaccharide type 5/8 biosynthesis protein CapA	222	24.85	9.2	118.02	0.087	Cytoplasmic membrane
Gene66	Thermonuclease family protein	177	20.33	9.68	77.01	-0.691	Extracellular



A: Three-dimensional structure; B: Ramachandran plot.

图3 酪氨酸自激酶1335的同源建模

Fig. 3 Homologous modeling of tyrosine autokinase 1335

找新的抗菌靶点,本研究对金黄色葡萄球菌的基因组依次进行了泛基因组和消减蛋白质组学的筛选。核心基因作为抗菌药物靶点具有2个明显优势:核心基因主要参与生物体的基本生物学功能,也是生物体生存所必需的基因。核心基因是所有个体中共存的基因,具有高度保守性,针对核心基因开发的药物更不容易产生耐药性^[20]。本研究结果显示:

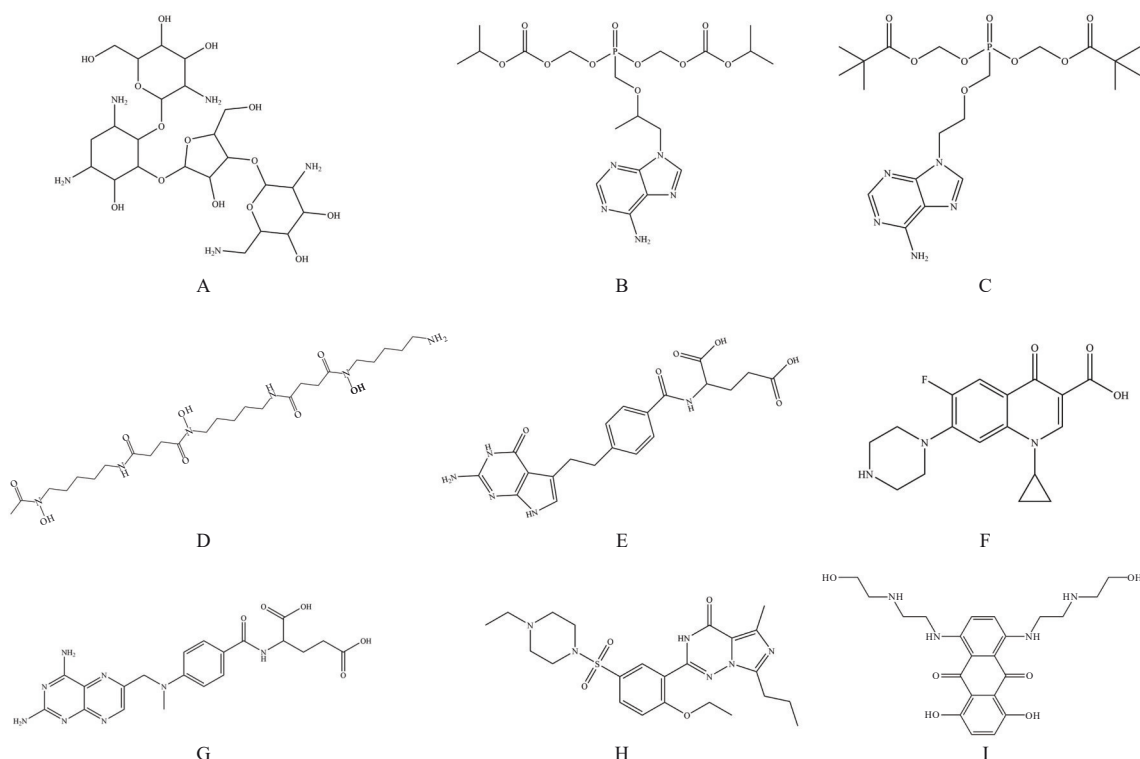
金黄色葡萄球菌中含有1 620个核心基因组,主要涉及氨基酸运输、代谢、翻译及核糖体结构、生物发生和DNA转录等功能。

在进一步研究中,对核心基因进行消减蛋白组学筛选。抗菌药物靶点与人类蛋白同源可能会增加药物产生不良反应的风险,因此本研究中排除了人同源蛋白。必需基因和VF基因是发现抗菌药物的2种主要靶点^[21]。必需基因控制生物体生存所需的基本功能,对生物体的生存和正常功能至关重要。VF是使病原体在宿主生物中引起疾病的特定分子^[22]。研究^[23-26]表明:药物靶点应该符合某些理化特征,如低相对分子质量蛋白($<110\ 000$)更容易被药物所识别,是一种合适的药物靶点;靶蛋白主要分布于细胞膜上;过小的蛋白(<100 个氨基酸)一般被认为是不重要的;GRAVY值为负值表明蛋白亲水性好;高脂肪族指数说明蛋白热稳定性好。通过筛选,最终发现一个最优靶点蛋白Gene1335,该蛋白是一种酪氨酸自激酶。

表2 酪氨酸自激酶1335与9个化合物的分子对接评分

Tab. 2 Molecular docking scores of tyrosine autokinase 1335 and 9 compounds

Compound ID	Compound name	LibDock score	Biological activity
ZINC000060183170	Paromomycin	168.972	Antibacterial ^[15]
ZINC000003929022	Tenofovir Disoproxil	164.924	—
ZINC000003930376	Adefovir dipivoxil	157.219	—
ZINC000003830635	Deferoxamine	153.865	Antibacterial ^[16]
ZINC000001540998	Pemetrexed	152.596	—
ZINC000008214483	Ciprofloxacin	151.885	Antibacterial ^[17]
ZINC000001529323	Methotrexate	151.268	Antibacterial ^[18]
ZINC000018324776	Vardenafil	147.649	Decrease antibacterial activity
ZINC000003794794	Mitoxantrone	144.891	—



A: Paromomycin; B: Tenofovir disoproxil; C: Adefovir dipivoxil; D: Deferoxamine; E: Pemetrexed; F: Ciprofloxacin; G: Methotrexate; H: Methotrexate; I: Mitoxantrone.

图4 9个化合物的分子结构

Fig. 4 Molecular structures of 9 compounds

酪氨酸自激酶主要参与细菌胞外多糖和荚膜多糖的生物合成, 如酪氨酸自激酶 Wzc 参与大肠杆菌 1 型荚膜多糖的组装^[27], 在洋葱伯克霍尔德氏菌中, 酪氨酸自激酶 bceD 和 bceF 参与洋葱伯克霍尔德氏菌胞外多糖和生物膜的形成^[28]。研究^[29]显示: 酪氨酸自激酶是细菌生长所必需的, 在肺炎链球菌中, 酪氨酸自激酶 UbK 基因缺陷将导致菌株表现出严重的细胞生长和细胞形态缺陷。目前尚未见酪氨酸自激酶 1335 作为抗菌药物靶点的研究报告, 本研究推测酪氨酸自激酶 1335 可能是一种潜在的抗菌靶点。

研究^[30]显示: 巴龙霉素和环丙沙星具有抗金黄色葡萄球菌活性, 巴龙霉素是一种氨基糖苷类抗生素, 环丙沙星是一种喹诺酮类抗生素, 除传统作用机制外, 巴龙霉素和环丙沙星还可通过与酪氨酸自激酶 1335 结合发挥抗金黄色葡萄球菌作用。分子对接是一种强大的计算方法, 用于预测候选药物的结合亲和力和构象^[31]。LIU 等^[32]通过分子对接筛选发现: Collismycin A 与几丁质合成酶具有最强的结合能力, 可能是 Collismycin A 发挥抗真菌作用的主要靶点。本研究以酪氨酸自激酶 1335 为受

体, 从数据库中筛选能与该靶点结合的药物, 对 LibDockScore 排名前 9 位的化合物进行了分子对接分析, 结果显示: 酪氨酸自激酶 1335 与 9 个化合物均有较强的结合能, 且能产生较多的氢键和疏水相互作用, 是潜在的抗金黄色葡萄球菌药物。

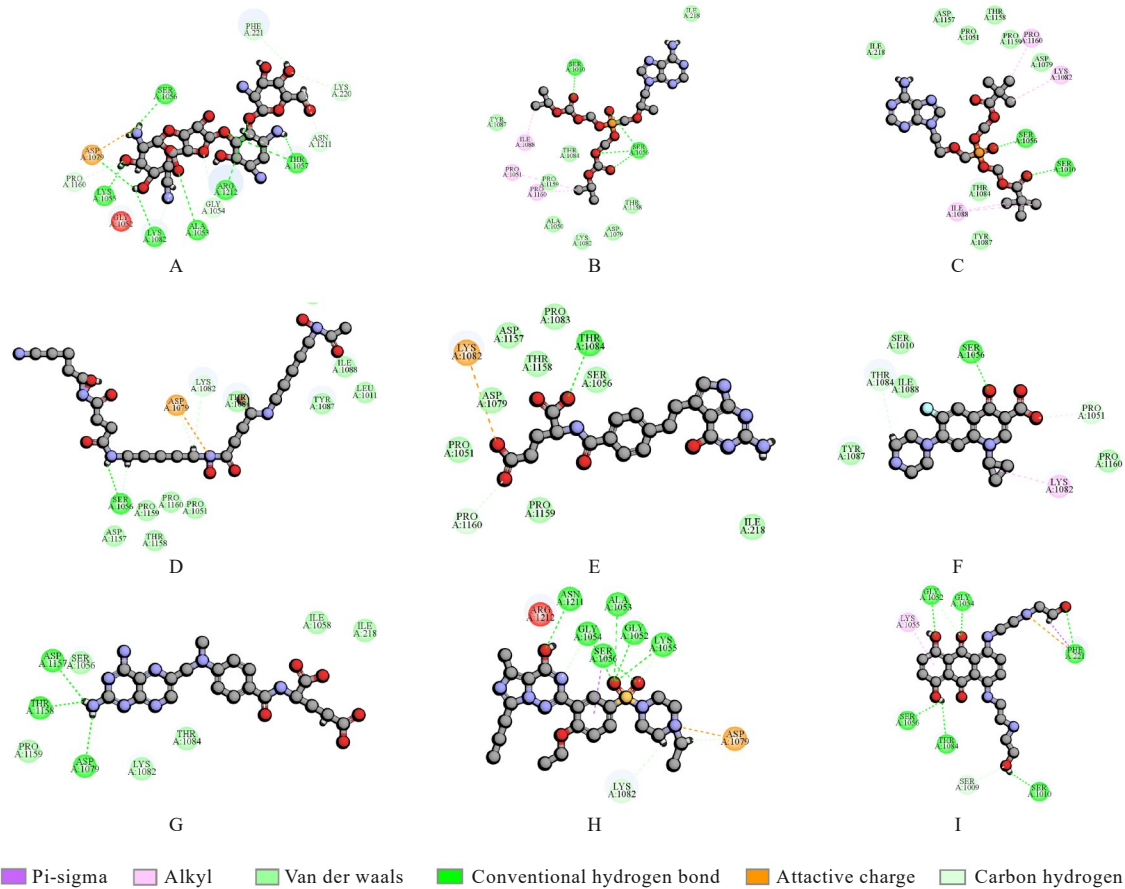
综上所述, 本研究通过泛基因组和消减蛋白质组学从金黄色葡萄球菌核心基因组中预测了一种新的抗菌药物靶点酪氨酸自激酶 1335, 并预测了潜在的抗菌药物, 在后续研究中将对预测化合物的抗菌活性进行实验验证。本研究将泛基因组学和消减蛋白质组学技术运用于抗金黄色葡萄球菌靶点的预测和开发中, 有望为相关药物的开发提供一种新思路。

利益冲突声明:

所有作者声明不存在利益冲突。

作者贡献声明:

谭锦莉参与数据整理、数据分析和论文撰写, 黄丹、廖婧阳和朱刘冲参与数据整理和论文审阅, 刘文彬参与研究项目立项、实验设计和论文修改。



A: Paromomycin; B: Tenofovir disoproxil; C: Adefovir dipivoxil; D: Deferoxamine; E: Pemetrexed; F: Ciprofloxacin; G: Methotrexate; H: Vardenafil; I: Mitoxantrone.

图5 化合物与酪氨酸自激酶1335的分子对接2D图

Fig. 5 Molecular interaction 2D diagrams of compounds and tyrosine autokinase 1335

[参考文献]

- [1] CHEUNG G Y C, BAE J S, OTTO M. Pathogenicity and virulence of *Staphylococcus aureus* [J]. Virulence, 2021, 12(1): 547-569.
- [2] 刘东宁, 杨明锡, 刘歆婵, 等. 锌掺杂碳点联合蓝光照射对金黄色葡萄球菌生长及其生物膜形成的抑制作用[J]. 吉林大学学报(医学版), 2020, 46(3): 515-522, 674.
- [3] QIN P, LU H W, DU H L, et al. Pan-genome analysis of 33 genetically diverse rice accessions reveals hidden genomic variations [J]. Cell, 2021, 184(13): 3542-3558.e16.
- [4] CAPUTO A, FOURNIER P E, RAOULT D. Genome and pan-genome analysis to classify emerging bacteria[J]. Biol Direct, 2019, 14(1): 5.
- [5] IRFAN M, TARIQ M, BASHARAT Z, et al. Genomic analysis of *Chryseobacterium indologenes* and conformational dynamics of the selected DD-peptidase[J]. Res Microbiol, 2023, 174(1/2): 103990.
- [6] BASHARAT Z, AKHTAR U, KHAN K, et al. Differential analysis of *Orientia tsutsugamushi* genomes for therapeutic target identification and possible intervention through natural product inhibitor screening[J]. Comput Biol Med, 2022, 141: 105165.
- [7] ALI A, KHATOON A, MIRZA T, et al. Intensification in genetic information and acquisition of resistant genes in genome of *Acinetobacter baumannii*: a pan-genomic analysis[J]. Biomed Res Int, 2022, 2022: 3186343.
- [8] YIP S H, SHAM P C, WANG J W. Evaluation of tools for highly variable gene discovery from single-cell RNA-seq data[J]. Brief Bioinform, 2019, 20(4): 1583-1589.
- [9] LIU B, ZHENG D D, ZHOU S Y, et al. VFDB 2022: a general classification scheme for bacterial virulence factors[J]. Nucleic Acids Res, 2022, 50(D1): D912-D917.
- [10] RASHIDI S, FARAJI S N, MAMAGHANI A J, et al. Bioinformatics analysis for the purpose of designing a novel multi-epitope DNA vaccine against *Leishmania major*[J]. Sci Rep, 2022, 12(1): 18119.
- [11] RAHMAN N, MUHAMMAD I, NAYAB G E, et al.

- In-silico subtractive proteomic analysis approach for therapeutic targets in MDR salmonella enterica subsp. enterica serovar typhi str. CT18 [J]. *Curr Top Med Chem*, 2019, 19(29): 2708-2717.
- [12] SILVA M A, NASCIMENTO JÚNIOR J C D, THOMAZ D V, et al. Comparative homology of *Pleurotus ostreatus* laccase enzyme: Swiss model or Modeller? [J]. *J Biomol Struct Dyn*, 2023, 41(18): 8927-8940.
- [13] LIU W B, OU P Y, TIAN F Y, et al. Anti-*Vibrio parahaemolyticus* compounds from *Streptomyces parvus* based on Pan-genome and subtractive proteomics [J]. *Front Microbiol*, 2023, 14: 1218176.
- [14] KARAKKADPARAMBIL SANKARAN S, NAIR A S. Molecular dynamics and docking studies on potentially active natural phytochemicals for targeting SARS-CoV-2 main protease [J]. *J Biomol Struct Dyn*, 2023, 41(14): 6459-6475.
- [15] IBRAHIM A A, EL-HOUSSEINY G S, ABOSHANAB K M, et al. Paromomycin production from *Streptomyces rimosus* NRRL 2455: statistical optimization and new synergistic antibiotic combinations against multidrug resistant pathogens [J]. *BMC Microbiol*, 2019, 19(1): 18.
- [16] HARTZEN S H, FRIMODT-MØLLER N, THOMSEN V F. The antibacterial activity of a siderophore. 2. The influence of deferoxamine alone and combined with ascorbic acid on the activity of antibiotics against *Staphylococcus aureus* [J]. *APMIS*, 1991, 99(10): 879-886.
- [17] CUI K Y, YANG W F, LIU Z Y, et al. Chenodeoxycholic acid-amikacin combination enhances eradication of *Staphylococcus aureus* [J]. *Microbiol Spectr*, 2023, 11(1): e0243022.
- [18] MARHAUG G, BRATLID D, MOE P J. Effect of methotrexate on phagocytosis and killing of *Staphylococcus aureus* by human granulocytes [J]. *Scand J Infect Dis*, 1980, 12(1): 61-65.
- [19] HU Y, WU Y F, JIANG C P, et al. Investigative on the molecular mechanism of licorice flavonoids anti-melanoma by network pharmacology, 3D/2D-QSAR, molecular docking, and molecular dynamics simulation [J]. *Front Chem*, 2022, 10: 843970.
- [20] LOPATKIN A J, BENING S C, MANSON A L, et al. Clinically relevant mutations in core metabolic genes confer antibiotic resistance [J]. *Science*, 2021, 371(6531): eaba0862.
- [21] DE BACKER M D, VAN DIJCK P. Progress in functional genomics approaches to antifungal drug target discovery [J]. *Trends Microbiol*, 2003, 11(10): 470-478.
- [22] SHARMA D, SHARMA A, SINGH B, et al. Pan-proteome profiling of emerging and re-emerging zoonotic pathogen *Orientia tsutsugamushi* for getting insight into microbial pathogenesis [J]. *Microb Pathog*, 2021, 158: 105103.
- [23] RIDA T, AHMAD S, ULLAH A, et al. Pan-genome analysis of oral bacterial pathogens to predict a potential novel multi-epitopes vaccine candidate [J]. *Int J Environ Res Public Health*, 2022, 19(14): 8408.
- [24] BAKHEET T M, DOIG A J. Properties and identification of human protein drug targets [J]. *Bioinformatics*, 2009, 25(4): 451-457.
- [25] BHATTACHARYA M, HOTA A, KAR A, et al. *In silico* structural and functional modelling of Antifreeze protein (AFP) sequences of Ocean pout (*Zoarces americanus*, Bloch & Schneider 1801) [J]. *J Genet Eng Biotechnol*, 2018, 16(2): 721-730.
- [26] KHAN K, BASHARAT Z, JALAL K, et al. Identification of therapeutic targets in an emerging gastrointestinal pathogen *Campylobacter ureolyticus* and possible intervention through natural products [J]. *Antibiotics*, 2022, 11(5): 680.
- [27] WANDERLEY K, SOUSA D, SILVA G, et al. Tyrosine kinase self-phosphorylation controls exopolysaccharide biosynthesis in *Gluconacetobacter diazotrophicus* strain Pal5 [J]. *Life*, 2021, 11(11): 1231.
- [28] FERREIRA A S, LEITÃO J H, SOUSA S A, et al. Functional analysis of Burkholderia cepacia genes bceD and bceF, encoding a phosphotyrosine phosphatase and a tyrosine autokinase, respectively: role in exopolysaccharide biosynthesis and biofilm formation [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2007, 73(2): 524-534.
- [29] PELLETIER A, FRETON C, GALLAY C, et al. The tyrosine-autokinase UbK is required for proper cell growth and cell morphology of *Streptococcus pneumoniae* [J]. *Front Microbiol*, 2019, 10: 1942.
- [30] 耿月, 朱晓玥, 周小华, 等. 五氟苯基柱HPLC-PAD法测定硫酸巴龙霉素含量及有关物质 [J]. *中国药学杂志*, 2022, 57(16): 1380-1386.
- [31] 赖思含, 刘俊彤, 谭璐莹, 等. 西洋参茎叶三醇组皂苷抗缺血性脑卒中作用机制的网络药理学和分子对接分析 [J]. *吉林大学学报(医学版)*, 2023, 49(4): 913-922.
- [32] LIU W B, LI E T, LIU L Y, et al. Antifungal activity of compounds from *Gordonia* sp. WA8-44 isolated from the gut of *Periplaneta americana* and molecular docking studies [J]. *Heliyon*, 2023, 9(7): e17777.