

研究报告

## 迟缓爱德华氏菌中甘油醛-3-磷酸脱氢酶的胞外分泌调控

邓佳<sup>2</sup> 吴海珍<sup>1,2\*</sup>

(1. 生物反应器工程国家重点实验室 上海 200237)

(2. 华东理工大学生物工程学院 上海 200237)

**摘要:**【目的】迟缓爱德华氏菌甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)是糖酵解途径中关键酶之一,前期研究证实是一种广谱性抗原,可作为水产养殖细菌病免疫防治中疫苗的开发靶点。本文探究迟缓爱德华氏菌甘油醛-3-磷酸脱氢酶的胞外分泌机制。【方法】通过 Western blot 和 ELISA 方法考察迟缓爱德华氏菌经典分泌系统缺失株 GAPDH 胞外分泌情况;使用 ELISA 方法对迟缓爱德华氏菌突变体文库的 GAPDH 胞外分泌进行了大规模筛查,并结合 qRT-PCR 对筛查得到的插入失活株进行了表达分析。【结果】经典分泌系统与 GAPDH 的胞外分泌存在一定相关性。突变体文库的大规模筛查得到两株 GAPDH 分泌量明显增加的插入失活株 *ΔesrA* 和 *ΔesrC*,这两个基因的失活会导致 GAPDH 的胞外分泌量显著上调。【结论】迟缓爱德华氏菌 GAPDH 的胞外分泌受 EsrA 和 EsrC 负调控。

**关键词:** 迟缓爱德华氏菌, GAPDH, 胞外分泌, 突变体文库

## Regulation of GAPDH secretion in *Edwardsiella tarda*

DENG Jia<sup>2</sup> WU Hai-Zhen<sup>1,2\*</sup>

(1. State Key Laboratory of Bioreactor Engineering, Shanghai 200237, China)

(2. East China University of Science and Technology School of Biotechnology, Shanghai 200237, China)

**Abstract:** [Objective] As one of the key enzymes of the glycolysis in *E. tarda*, GAPDH was previously identified to be a broad-spectrum antigen and could be used as the target of bacterial vaccine design in aquaculture. We explore the mechanism of secretion of GAPDH in *E. tarda*. [Methods] Secretion of GAPDH in *E. tarda* EIB202 and mutants of several secretory pathways were analyzed by Western blot and ELISA. The levels of GAPDH in the supernatants of mutant library were analyzed through high-throughput screening. Quantitative real-time PCR was used to compare the mRNA expressions of mutants obtained from screening. [Results] Secretion of GAPDH in *E. tarda* is associated with classical secretion systems. Through high-throughput screening, two mutants *ΔesrA* and *ΔesrC* were found to have higher levels of GAPDH in the supernatants. Lacking of these two genes lead to significant up-regulation of secretion of GAPDH. [Conclusion] EsrA and EsrC

**Foundation item:** National Natural Science Foundation of China (No. 31372550)

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

Received: April 01, 2017; Accepted: May 27, 2017; Published online (www.cnki.net): June 27, 2017  
基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 31372550)

\*通讯作者: Tel: 86-21-64252507; E-mail: wuhzh@ecust.edu.cn

收稿日期: 2017-04-01; 接受日期: 2017-05-27; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2017-06-27

both played a negative regulation role in GAPDH secretion.

**Keywords:** *Edwardsiella tarda*, GAPDH, Extracellular secretion, Mutant library

GAPDH (Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase)是糖酵解途径中关键酶之一,其在原核细胞中定位于胞内行使糖代谢功能,在真核细胞中大部分定位于胞质中,少量定位于细胞核和线粒体中。在真核细胞中各种压力条件下,GAPDH 可以进行亚细胞的重新分布,从而具有了新的生物学功能特性。真核细胞中的 GAPDH 具有多种功能:在胞质中能促进微管集束和肌动蛋白的聚合<sup>[1]</sup>,在线粒体中诱导细胞的凋亡<sup>[2]</sup>,在细胞核中参与 DNA 的修复<sup>[3]</sup>,等等。近年来病原菌中 GAPDH 的胞外定位及在致病机制中的作用和其他功能也正被研究者们逐渐认识。

1992年,Pancholi等完成了A群链球菌(Group A *Streptococcus*)表面的蛋白分离,首次发现细菌表面有 GAPDH 的定位<sup>[4]</sup>。2003年,Seifert等证实B群链球菌(Group B *Streptococcus*)的细胞表面存在 GAPDH,同时发现其可与血纤维蛋白溶酶原、肌动蛋白、纤维蛋白原相互作用,有利于病原菌对宿主细胞的粘附和感染<sup>[5]</sup>。同年,Bergmann等证实了肺炎链球菌(*Streptococcus pneumoniae*)的表面存在 GAPDH,而且能与血纤维蛋白溶酶原相互作用,促进致病菌的感染<sup>[6]</sup>。2006年,Terao等发现生脓链球菌(*Pyogenic streptococcus*)表面的 GAPDH 可以酶解宿主的 C5a 以逃避中性粒细胞捕获<sup>[7]</sup>。2007年,Egea等发现在 EPEC (*Enteropathogenic Escherichia coli*)和 EHEC (*Enterohemorrhagic Escherichia coli*)中,GAPDH 不仅存在于细胞膜表面,还可分泌到胞外,但非致病性大肠杆菌中 GAPDH 不分泌到胞外<sup>[8]</sup>。

因 GAPDH 是一种保守的持家酶,并能够定位到细胞膜表面或分泌到胞外,其作为疫苗设计的靶点也日益被研究者们所关注。例如,研究发现白色念珠菌 (*Candida albicans*)<sup>[9]</sup>、曼氏血吸虫 (*Schistosoma mansoni*)<sup>[10]</sup> 和无乳链球菌 (*Streptococcus agalactiae*)<sup>[11]</sup> 等的 GAPDH 均具有良好的免疫原性。2005年,Liu等发现迟缓爱德华氏

菌的 GAPDH 氨基酸序列与志贺氏菌(*Shigella flexneri*)、沙门氏菌(*Salmonella enterica*)和大肠杆菌(*Escherichia coli*)的相似性高达 80%,而且在牙鲆(Japanese flounder)上具有良好的免疫保护作用<sup>[12]</sup>。2012年我们课题组<sup>[13-14]</sup>对水产养殖动物病害中常见的6种革兰氏阴性致病菌迟缓爱德华氏菌、鲶爱德华氏菌(*Edwardsiella ictaluri*)、嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)、鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*)、溶藻弧菌(*Vibrio alginolyticus*)和哈维氏弧菌(*Vibrio harveyi*)的 GAPDH 进行了克隆和亚定位研究,发现其多能分泌到胞外,以斑马鱼为实验动物的免疫保护作用分析发现,重组的 GAPDH 具有较强的交叉免疫保护效率(60%以上),免疫大菱鲆(Turbot)后其表现出了良好的免疫原性,免疫鱼体的抗血清和多种病原呈阳性反应,表明抗原 GAPDH 具有较好的广谱性,可作为水产养殖动物多病原免疫防治中疫苗的开发靶点。2015年,Alves等基于小鼠动物实验,从免疫学、毒理学及疫苗稳定性等多方面分析认为 B 群链球菌的重组 GAPDH 亚疫苗是安全和可靠的<sup>[15]</sup>。

尽管病原菌中 GAPDH 多种功能的研究报道较多,但有关它是如何定位到细菌表面或分泌到胞外的研究报道甚少。目前仅 2012年 Oliveira等用电镜观察到 GAPDH 存在于 B 群链球菌表面的同时,发现该蛋白是通过菌体裂解的方式进入胞外后才重新定位到细胞表面<sup>[16]</sup>;同年 Aguilera等则发现在肠致病性大肠杆菌 EPEC 中,GAPDH 是通过 III 型分泌系统分泌到胞外,且分泌过程需要分子伴侣的帮助<sup>[17]</sup>。迟缓爱德华氏菌是一种重要的经济鱼类致病菌,对其致病性的机制研究以及针对该病原菌的疫苗开发非常重要。本文利用实验室前期构建的几个毒力相关的分泌系统的缺失株,以及一个全基因突变体文库,对迟缓爱德华氏菌 GAPDH 的胞外分泌进行了研究,以期找到迟缓爱德华氏菌 GAPDH 的胞外分泌途径及其调控方式。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 实验材料

**1.1.1 实验菌株:** 迟缓爱德华氏菌 EIB202, 2006 年山东渔场发病的大菱鲆中分离得到的强毒株。ΔpEIB202 为消除了含四型分泌系统(T4SS)的毒性大质粒(43.7 kb)的 EIB202 突变株; ΔT3SS 为 EIB202 的 T3SS 缺失株, ΔT6SS 为 EIB202 的 T6SS 缺失株, ΔT3SS+ΔT6SS 为三型和六型分泌系统双缺失株; Defined transposon mutant library of *E. tarda* 为菌株 ΔpEIB202 的转座子插入失活突变体文库, 共包含 2 757 株突变株, 突变基因覆盖率达 57.6%。上述菌株均为课题组前期工作获得。

**1.1.2 主要试剂和仪器及培养基:** RNA 抽提试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司; FastStart Universal SYBR Green Master (ROX)购自罗氏诊断产品(上海)有限公司; 逆转录试剂盒购自宝生物工程(大连)有限公司; 实验中所用一抗为识别 EIB202 中 GAPDH 的多克隆抗体, 由吉尔生化(上海)有限公司定制; 二抗羊抗兔 IgG-HRP 购自圣克鲁斯生物技术(上海)公司; RNA 聚合酶抗体购自 Santa Cruz 公司; GAPDH 蛋白抗体制备自吉尔生化公司; 显色底物 TMB 购自天根生化科技(北京)有限公司; DMEM、化学发光显色底物 ECL 购自赛默飞世尔科技有限公司。TE 缓冲液购自上海捷瑞生物工程有限公司; PBST 缓冲液(g/L): NaCl 8.00, KCl 0.20, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.42, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.27, Tween-20 0.50 mL; PBSTB 缓冲液: PBST 中加入 10.00 g/L 的白蛋白(BSA)。其他试剂均为分析纯, 购自生物工程(上海)股份有限公司。

ABI 7500 荧光定量 PCR 仪购自 Life Technology 公司; 核酸定量仪 NanoDrop ND-1000 SpectroPhotometer 购自赛默飞世尔科技有限公司。

LB 液体培养基(g/L): 蛋白胨 10.0、酵母抽提物 5.0、NaCl 10.0, 在 103.5 kPa 下灭菌 20 min, 备用。LB 固体培养基: 在 LB 液体培养基中加入 1.5%琼脂粉。DMEM 培养基: 称取 13.5 g DMEM

粉末, 定容至 1.0 L, 边搅拌溶解边加入 3.7 g NaHCO<sub>3</sub> 粉末, 至培养基澄清后用 0.22 μm 滤膜过滤除菌, 备用。

### 1.2 实验方法

**1.2.1 菌株培养:** 活化: 菌株划线于 DHL 平板, 30 °C 倒置培养 24 h; 一级培养: 单克隆挑入 10 mL LB 培养基, 30 °C、200 r/min 振荡培养 12–16 h; 二级培养 按 1%的接种量将上述一级培养物接入 50 mL DMEM 培养基中, 30 °C 恒温培养箱中静置培养。

**1.2.2 Western blot 法检测胞外 GAPDH:** 二级培养物 4 °C、5 000×g 离心 15 min, 上清用 10 kD 超滤管浓缩至 200–300 μL。取 15 μL 进行 SDS-PAGE 电泳, 并转印至 PVDF 膜上, BSA 于 37 °C 静置封闭 2 h, 一抗在 37 °C 孵育 3 h, 二抗在 37 °C 孵育 1 h, 全过程以 PBST 洗涤, 最后以 ECL 显色。

**1.2.3 ELISA 法检测胞外 GAPDH:** 取 1 mL 二级培养物于 4 °C、5 000×g 离心 10 min, 上清再次离心, 取第二次离心的上清液 100 μL, 4 °C 过夜包板; 200 μL BSA 37 °C 封闭 2 h, 100 μL 一抗 37 °C 孵育 3 h, 100 μL 二抗 37 °C 孵育 1 h, 全过程以 PBST 洗涤, 最后以 100 μL TMB 底物于 37 °C 下显色, 并用酶标仪检测 OD<sub>450</sub>。

**1.2.4 突变体文库菌株胞外 GAPDH 分泌量的初筛:** 一级培养: 取出菌种库中的保种板, 用无菌接种针沾取少量菌种保存液, 接入 96 深孔板中, 其中每孔含 800 μL LB 培养基, 用透明封口膜封紧, 30 °C、200 r/min 振荡培养 12–14 h; 二级培养: 以 1%的接种量将一级培养物接入 96 深孔板中, 其中每孔含 800 μL DMEM 培养基, 用无菌的八层纱布扎紧孔板口, 置于 30 °C 恒温静置培养 24 h; 二级培养物的 96 深孔板于 4 °C、5 000×g 离心 15 min, 取 100 μL 上清液包板, 进行胞外 GAPDH 分泌量的 ELISA 检测。

**1.2.5 定量 PCR (qRT-PCR)检测基因的转录水平:** 1.2.1 中不同时间点取二级培养物 1–3 mL, 4 °C、5 000×g 离心 15 min, 菌体沉淀按各试剂盒说明书

进行 RNA 提取、逆转录 cDNA 以及 qRT-PCR 分析。分析引物为：*gap-F* : 5'-CCGTGTTACCGCTGAAAGAG-3' ; *gap-R* : 5'-GGTTTACGCCATAACG AAC-3' ; *esrA-F* : 5'-GAGAACGGTGAGAATACG-3' ; *esrA-R* : 5'-GAGAAGTCCAGCAGGTTA-3' ; *esrC-F* : 5'-TACTCGAAACCACCTCTA-3' ; *esrC-R* : 5'-CTC GGTGACTGACTAAAG-3'。内参基因为 16S rRNA 基因，以  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  方法分析各基因相对表达量。

## 2 结果与分析

### 2.1 经典分泌途径对 GAPDH 分泌的影响

课题组前期构建了 3 种经典分泌途径相关的 EIB202 缺失株，包括 T4SS 缺失株  $\Delta pEIB202$ 、 $\Delta T3SS$ 、 $\Delta T6SS$  和  $\Delta T3SS/\Delta T6SS$ ，考察了它们在 DMEM 静置培养条件下胞外 GAPDH 的分泌情况。以 GAPDH 抗体为一抗进行的 Western blot 检测表明，各缺失株胞外仍能检测到 GAPDH 分泌；而以 RNA 聚合酶抗体为一抗进行的 Western blot 结果显示，各菌株胞外均没有 RNA 聚合酶的存在(图 1A)，这表明胞外 GAPDH 的存在不是由各缺失株通透性改变或者细胞裂解后导致内含物释放所致，的确是各缺失株自身分泌的结果。进一步的 ELISA 分析发现，各缺失株胞外 GAPDH 的分泌量均明显减少(图 1B)。这些结果暗示着 GAPDH 并非由 T3SS、T4SS 或 T6SS 单一分泌途径分泌到胞外。

因在 Western blot 检测中 T3SS 缺失后胞外 GAPDH 的分泌量略显增加，进一步多次重复了 Western blot 和 ELISA 实验，检测各缺失株胞外 GAPDH 分泌量的情况，发现 Western blot 检测因超滤浓缩胞外蛋白，结果会存在一定的波动性，而 ELISA 检测各生物重复的结果基本一致，因此后续实验均以此方法进行分析。

### 2.2 基于突变体文库筛选 GAPDH 胞外分泌相关基因

因 3 种经典分泌途径的缺失均未能阻断 GAPDH 的胞外分泌，推测 GAPDH 的胞外分泌过

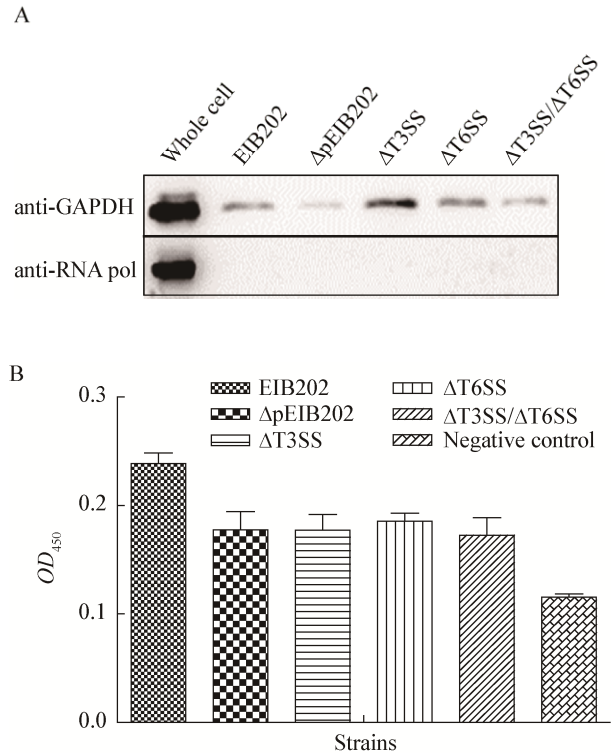


图 1 不同分泌途径缺失株胞外 GAPDH 的分泌

Figure 1 The levels of GAPDH in the supernatants of *Edwardsiella tarda* EIB202 and its mutants

注：A：Western blot 结果；B：ELISA 结果。所有结果均包含 3 次独立重复实验结果。

Note: A: Analysis with western blot; B: Analysis with ELISA. Data are representative of 3 independent experiments.

程相对复杂。因此基于课题组已经构建得到的转座子插入失活突变体文库，进行 GAPDH 胞外分泌调控相关基因的筛选。对突变体文库的各菌株进行培养后，用 ELISA 检测了其培养上清中 GAPDH 的分泌量。

经 ELISA 检测(图 2B)和 Western blot 实验排除菌体裂解导致的假阳性结果(图 2A)，共得到 14 株分泌量出现明显差异的插入失活株(表 1)。其中 7 株为 GAPDH 胞外分泌量上调株，7 株为下调株，相关基因包括：转录调控因子 *esrC*，双组分系统调控元件 *esrA*，T4 相关元件 *pilW*，T3SS 相关元件 *esaU*，T6SS 相关元件 *evpF*、*evpO* 和 *evpG* 等。

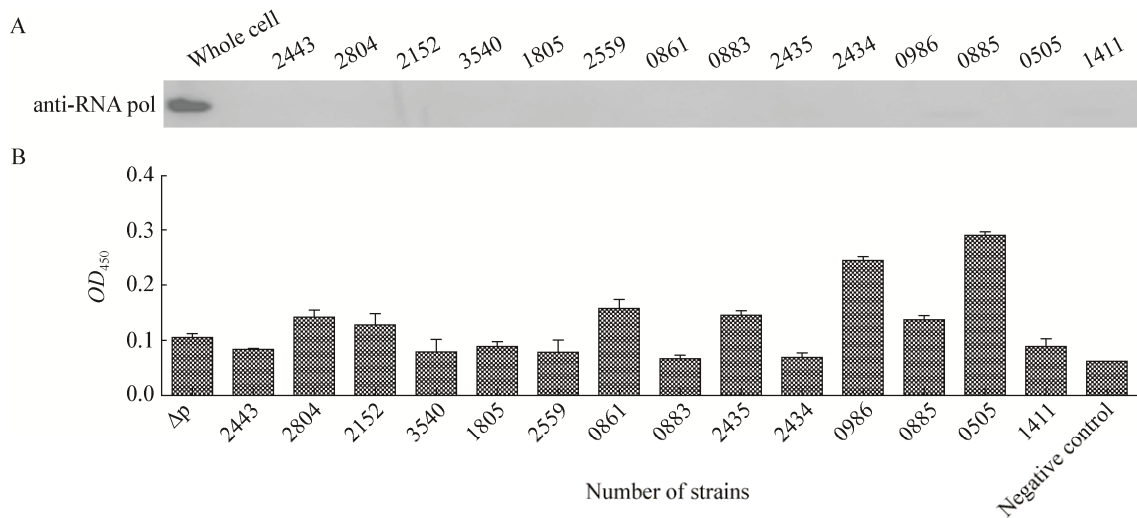


图2 突变体文库筛选结果  
Figure 2 Screening the mutant library

注：不同突变株的 Western blot (A)和 ELISA (B)结果.

Note: RNA polymerase and GAPDH in the supernatants of different mutants were analysed by Western blot (A) and ELISA (B) respectively.

表1 突变体文库筛选所得菌株  
Table 1 Strains screened from the mutant library

基因编号 Gene No.	基因名 Gene name	基因描述 Description of gene	分泌量上调(↑)/下调(↓) Up (↑) or Down (↓)-regulation of secretion
ETAE_0861	<i>esrC</i>	Transcriptional regulator EsrC	↑
ETAE_2804	<i>pilW</i>	Type IV pilus biogenesis/stability protein	↑
ETAE_0986	NULL	Major facilitator superfamily transporter	↑
ETAE_2152	<i>fliP</i>	Flagellar biosynthesis pathway protein FliP	↑
ETAE_0505	<i>yrbE</i>	Transporter	↑
ETAE_0885	<i>esrA</i>	Two-component sensor/regulator EsrA	↑
ETAE_2435	<i>evpG</i>	Type VI secretion system protein EvpG	↑
ETAE_2434	<i>evpF</i>	Type VI secretion system protein EvpF	↓
ETAE_2443	<i>evpO</i>	Type VI secretion system protein EvpO	↓
ETAE_2559	<i>modA</i>	Molybdate transporter periplasmic protein	↓
ETAE_0883	<i>esaU</i>	Type III secretion apparatus protein	↓
ETAE_3540	<i>pstA</i>	Phosphate ABC transporter permease	↓
ETAE_1411	<i>yehM</i>	Sulfate transporter	↓
ETAE_1805	<i>nlpC</i>	Lipoprotein	↓

### 2.3 插入失活株 $\Delta esrA/\Delta pEIB202$ 和 $\Delta esrC/\Delta pEIB202$ 的胞外 GAPDH 分泌量分析

进一步考察了插入失活株  $\Delta esrA/\Delta pEIB202$  和  $\Delta esrC/\Delta pEIB202$  与  $\Delta pEIB202$  胞外 GAPDH 分泌量随时间变化的情况,结果见图 3。插入失活株与  $\Delta pEIB202$  的 GAPDH 胞外分泌量均在 8-10 h 达到最大,且随着培养时间的延长,胞外分泌量有所下降并逐渐降至某一相对稳定的分泌量。另一方面,

相比  $\Delta pEIB202$ ,插入失活株的 GAPDH 胞外分泌量均有所上调,其中  $\Delta esrA/\Delta pEIB202$  上调更显著;而相比于强毒株 EIB202,两插入失活株的胞外分泌量也略高。

### 2.4 插入失活株 $\Delta esrA/\Delta pEIB202$ 和 $\Delta esrC/\Delta pEIB202$ 的胞内基因转录水平分析

筛选所得的突变株均是在  $\Delta pEIB202$  基础上进行转座子插入失活的,因此在对插入失活株

*ΔesrA/ΔpEIB202* 和 *ΔesrC/ΔpEIB202* 进行基因转录水平分析时, 均以 *ΔpEIB202* 在培养 8 h 时基因的转录水平为对照组, 结果见图 4。各菌株在培养早期 *gap* 的转录水平较高, 随着细胞增殖进入稳定阶段, 胞内代谢逐渐减缓, *gap* 的转录量迅速下降。

针对不同菌株间相同培养时间的对比分析可看出, 由于 *esrA* 和 *esrC* 失活导致其蛋白无效表达, 进而对 *gap* 的转录具有一定的影响, 表现为胞内 *gap* 的转录量有所增加, 特别是在培养至 10 h 时, 其转录量显著高于 *ΔpEIB202*, 也略高于 *EIB202*, 即

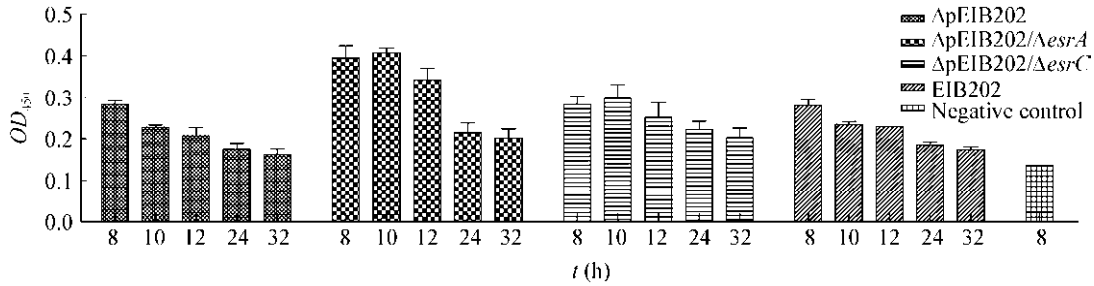


图 3 不同突变株胞外 GAPDH 分泌量随培养时间的变化情况  
Figure 3 The levels of GAPDH in the supernatants of different mutants

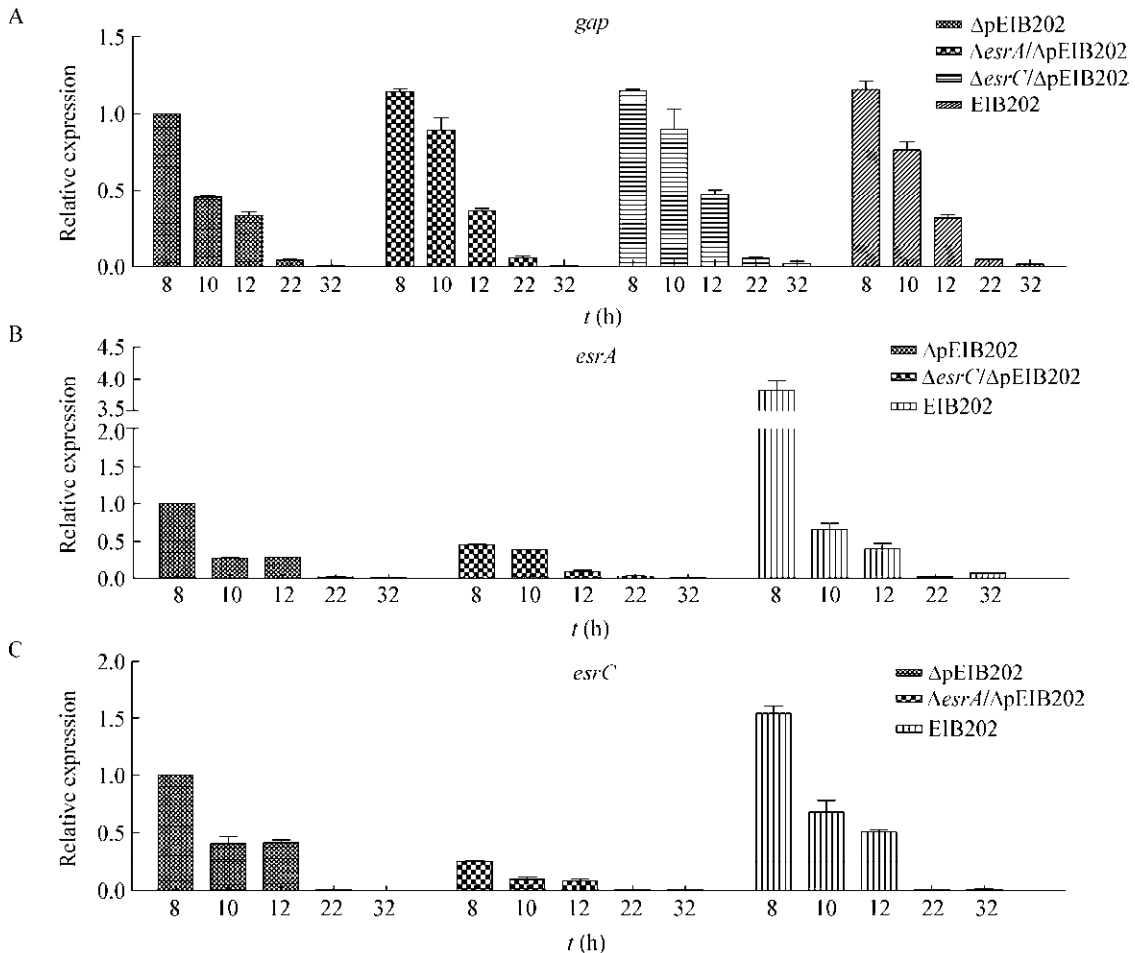


图 4 *ΔesrA/ΔpEIB202* 和 *ΔesrC/ΔpEIB202* 胞内相关基因的转录水平分析  
Figure 4 Expressions of mRNA of *gap*, *esrA* and *esrC* genes

注: 以 *ΔpEIB202* 在 8 h 时的 mRNA 表达量为参照, 其值设为 1.0。

Note: Expression of mRNA of *ΔpEIB202* at 8 h was regarded as control, whose value is 1.0.



*esrA* 和 *esrC* 的翻译产物负调控 *gap* 的转录(图 4A)。分析各菌株中 *esrA* 和 *esrC* 基因的转录情况发现, pEIB202 缺失后 *esrA* 和 *esrC* 基因的转录水平均存在下调的现象, 而 *esrA* 和 *esrC* 之间的转录水平的相互调控均呈正相关, 当一个基因失活后另一基因转录水平也明显下降(图 4B 及 C)。*gap*、*esrA* 和 *esrC* 转录的调控关系如图 5 所示。

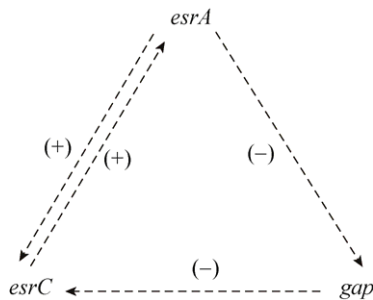


图 5 基因 *gap*、*esrA* 和 *esrC* 间潜在调控模式  
Figure 5 Regulation among genes *gap*, *esrA* and *esrC*

### 3 讨论

GAPDH 作为一个重要的看家基因, 不仅在胞内参与重要的糖酵解过程, 且还被分泌到胞外参与其他多种功能, 在病原菌与宿主间的相互识别和感染过程中起重要作用。病原微生物常常利用其多种分泌系统将效应分子和毒力蛋白分泌到胞外或直接注射到宿主细胞内, 干扰宿主的信号通路及其免疫应答反应, 从而实现其致病性<sup>[18-20]</sup>。T3SS、T4SS 和 T6SS 是病原菌重要的分泌系统, 全基因组测序显示 EIB202 携带有一套完整的 III 型和 VI 型分泌系统, 其大质粒上有一套不完整的 IV 型分泌系统。T3SS 分泌系统是一个多蛋白复合物, 其核心结构是一个针状复合物, 与细菌鞭毛结构相似, 由一个基座和一个针管组成, 穿过细菌的内膜和外膜, 其针管结构还可以刺穿宿主细胞的细胞膜, 直接将效应分子注射到宿主细胞内<sup>[21-22]</sup>; T4SS 则能形成一种多组分及多功能的跨膜通道结构, 允许 DNA 或蛋白质通过, 众多耐药性基因的水平转移均通过该系统完成<sup>[23-24]</sup>; T6SS 形成膜通道的同时存在两个胞

外组件 Hcp 和 VgrG, 通过 VgrG 形成的针头状结构完成宿主细胞的膜穿刺, 继而通过 Hcp 形成的管状结构将毒力蛋白注入宿主细胞<sup>[25-26]</sup>。本文首先分析了迟缓爱德华氏菌中 T3SS、T4SS 和 T6SS 分泌系统对 GAPDH 胞外分泌的影响, 发现这 3 个分泌系统的缺失均能导致 GAPDH 分泌量的下降。但是单一分泌系统的缺失都不能完全阻断其胞外分泌。说明 GAPDH 的胞外分泌是一个复杂的过程, 不依赖于某一单独的分泌系统, 而是受到多种因素调控。

另一方面, 基于转座子突变体文库筛选得到多个 GAPDH 胞外分泌量增加或下降的突变体, 包括  $\Delta esrA/\Delta pEIB202$  和  $\Delta esrC/\Delta pEIB202$ 。其中 *esrA* 是迟缓爱德华氏菌中 EsrA-EsrB 双组分系统的调节基因, 而 EsrA-EsrB 双组分系统与其致病性密切相关<sup>[27]</sup>。双组分系统是细菌内广泛存在的一种信号转导系统, 响应体外生存环境, 参与细菌的基因调控网络。病原菌利用双组分系统, 在感染宿主的不同阶段调控表达不同的毒力因子, 以促进其感染<sup>[28]</sup>。目前已发现许多病原菌的双组分系统的突变株都具有良好的减毒效果。*esrA* 存在于 T3SS 基因簇内, 其编码产物可调控多种毒力因子的表达, 包括 T3SS 和 T6SS 相关毒力因子的表达<sup>[29]</sup>; *esrC* 也存在于 T3SS 基因簇, 受到 EsrB 的调控, EsrB 可以直接结合在 *esrC* 的启动子上面, 调控 *esrC* 的表达, 而 EsrC 又能直接结合在 *esaM*、*eseJ*、*evpP* 和 *evpA* 的启动子上面, 从而进一步调控 T3SS 和 T6SS 的表达<sup>[30]</sup>。EsrA 是 EsrA-EsrB 双组分系统中的感应蛋白, 定位在细胞膜上, 响应特定的信号, 并将信号传递给受响应的调节蛋白 EsrB, 从而调节胞外的 GAPDH 的分泌, 通过检测胞外 GAPDH 随时间的变化, 可以发现胞外 GAPDH 的水平在 8 h 达到一个稳定水平, 并不再增加, 可能是膜上的 EsrA 响应了胞外 GAPDH 的水平, 将信号传递到胞内的 EsrB, EsrB 再通过 EsrC 调控 T3SS 和 T6SS 分泌系统, 使胞外的 GAPDH 维持在一个稳定的水平。但是当 *esrA* 或者 *esrC* 缺失后,

EsrA-EsrB 双组分系统不能正常调节 GAPDH 的分泌, 导致胞外 GAPDH 分泌量增加。

胞外蛋白分泌量的增加受到多方面因素的影响, 既与其分泌途径相关, 也和胞内的转录翻译水平密切相关。那么突变体  $\Delta esrA/\Delta pEIB202$  和  $\Delta esrC/\Delta pEIB202$  胞外 GAPDH 分泌量的增加是仅与 EsrA-EsrB 双组分系统介导的 T3SS 和 T6SS 分泌相关, 还是与 *esrA* 和 *esrC* 影响 *gap* 的表达, 进而影响 GAPDH 胞外分泌也相关呢? 因此进一步分析了突变体  $\Delta esrA/\Delta pEIB202$  和  $\Delta esrC/\Delta pEIB202$  中 *gap* 的转录水平, 发现 *esrA* 和 *esrC* 缺失后, 胞内 *gap* 的表达有所提高, 说明突变体  $\Delta esrA/\Delta pEIB202$  和  $\Delta esrC/\Delta pEIB202$  胞外 GAPDH 分泌量的增加不仅仅和 EsrA-EsrB 双组分系统及其调控的 T3SS 与 T6SS 分泌系统相关, 而且还和 *esrA* 和 *esrC* 缺失后导致的 *gap* 表达量提高相关。

## 参考文献

- [1] Durrieu C, Bernier-Valentin F, Rousset B. Microtubules bind glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase and modulate its enzyme activity and quaternary structure[J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 1987, 252(1): 32-40
- [2] Tarze A, Deniaud A, Le Bras M, et al. GAPDH, a novel regulator of the pro-apoptotic mitochondrial membrane permeabilization[J]. Oncogene, 2007, 26(18): 2606-2620
- [3] Hara MR, Agrawal N, Kim SF, et al. S-nitrosylated GAPDH initiates apoptotic cell death by nuclear translocation following Siah1 binding[J]. Nature Cell Biology, 2005, 7(7): 665-674
- [4] Pancholi V, Fischetti VA. A major surface protein on group A streptococci is a glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase with multiple binding activity[J]. Journal of Experimental Medicine, 1992, 176(2): 415-426
- [5] Seifert KN, McArthur WP, Bleiweis AS, et al. Characterization of group B streptococcal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: surface localization, enzymatic activity, and protein-protein interactions[J]. Canadian Journal of Microbiology, 2003, 49(5): 350-356
- [6] Bergmann S, Rohde M, Hammerschmidt S. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Streptococcus pneumoniae* is a surface-displayed plasminogen-binding protein[J]. Infection and Immunity, 2004, 72(4): 2416-2419
- [7] 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
- [8] 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
- [9] Gil-Navarro I, Gil ML, Casanova M, et al. The glycolytic enzyme glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Candida albicans* is a surface antigen[J]. Journal of Bacteriology, 1997, 179(16): 4992-4999
- [10] Argiro LL, Kohlstädt SS, Henri SS, et al. Identification of a candidate vaccine peptide on the 37 kDa *Schistosoma mansoni* GAPDH[J]. Vaccine, 2000, 18(19): 2039-2048
- [11] Madureira P, Baptista M, Vieira M, et al. *Streptococcus agalactiae* GAPDH is a virulence-associated immunomodulatory protein[J]. The Journal of Immunology, 2007, 178(3): 1379-1387
- [12] Liu Y, Oshima SI, Kurohara K, et al. Vaccine efficacy of recombinant GAPDH of *Edwardsiella tarda* against Edwardsiellosis[J]. Microbiology and Immunology, 2005, 49(7): 605-612
- [13] 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
- [14] Liang SQ, Wu HZ, Liu B, et al. The 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, 15(3/4): 198-205
- [15] 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
- [16] 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
- [17] Aguilera L, Ferreira E, Giménez R, et al. Secretion of the housekeeping protein glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase by the LEE-encoded type III secretion system in enteropathogenic *Escherichia coli*[J]. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 2012, 44(6): 955-962
- [18] Gerlach RG, Hensel M. Protein secretion systems and adhesins: the molecular armory of gram-negative pathogens[J]. International Journal of Medical Microbiology, 2007, 297(6): 401-415
- [19] Saier MH Jr. Protein secretion and membrane insertion systems in gram-negative bacteria[J]. The Journal of Membrane Biology, 2006, 214(1): 75-90
- [20] Costa TR, Felisberto-Rodrigues C, Meir A, et al. Secretion systems in Gram-negative bacteria: structural and mechanistic insights[J]. Nature Reviews Microbiology, 2015, 13(6): 343-359
- [21] Wang QY, Yang MJ, Xiao JF, et al. Genome sequence of the versatile fish pathogen *Edwardsiella tarda* provides insights into its adaptation to broad host ranges and intracellular niches. PLoS One, 2009, 17, 4(10): e7646
- [22] Garmendia J, Frankel G, Crepin VF. Enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* infections: translocation,



- translocation, translocation[J]. Infection and Immunity, 2005, 73(5): 2573-2585
- [23] Bi DX, Liu ML, Tai C, et al. SecReT4: a web-based bacterial type IV secretion system resource[J]. Nucleic Acids Research, 2013, 41(D1): D660-D665
- [24] Guglielmini J, Néron B, Abby SS, et al. Key components of the eight classes of type IV secretion systems involved in bacterial conjugation or protein secretion[J]. Nucleic Acids Research, 2014, 42(9): 5715-5727
- [25] Mougous JD, Cuff ME, Raunser S, et al. A virulence locus of *Pseudomonas aeruginosa* encodes a protein secretion apparatus[J]. Science, 2006, 312(5779): 1526-1530
- [26] Cianfanelli FR, Alcoforado Diniz J, Guo M, et al. VgrG and PAAR proteins define distinct versions of a functional type VI secretion system[J]. PLoS Pathogens, 2016, 12(6): e1005735
- [27] Wang X, Wang Q, Xiao J, et al. Hemolysin EthA in *Edwardsiella tarda* is essential for fish invasion in vivo and in vitro and regulated by two-component system EsrA-EsrB and nucleoid protein HhaEt[J]. Fish and Shellfish Immunology, 2010, 29(6): 1082-1091
- [28] Gotoh Y, Eguchi Y, Watanabe T, et al. Two-component signal transduction as potential drug targets in pathogenic bacteria[J]. Current Opinion Microbiology, 2010, 13(2): 232-239
- [29] Lv YZ, Xiao JF, Liu Q, et al. Systematic mutation analysis of two-component signal transduction systems reveals EsrA-EsrB and PhoP-PhoQ as the major virulence regulators in *Edwardsiella tarda*[J]. Veterinary Microbiology, 2012, 157(1/2): 190-199
- [30] Rogge ML, Thune RL. Regulation of the *Edwardsiella ictaluri* type III secretion system by pH and phosphate concentration through EsrA, EsrB, and EsrC[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2011, 77(13): 4293-4302

~~~~~  
(上接 p.2279)

## 征 稿 简 则

### 3.3 摘要写作注意事项

3.3.1 英文摘要：1) 建议使用第一人称，以此可区分研究结果是引用文献还是作者得出的；2) 建议用主动语态，被动语态表达拖拉模糊，尽量不用，这样可以避免长句，以求简单清晰；3) 建议使用过去时态，要求语法正确，句子通顺；4) 英文摘要的内容应与中文摘要一致，但可比中文摘要更详尽，写完后务必请英文较好且专业知识强的专家审阅定稿后再返回编辑部。5) 摘要中不要使用缩写语，除非是人人皆知的，如：DNA，ATP 等；6) 在英文摘要中，不要使用中文字体标点符号。

3.3.2 关键词：应明确、具体，一些模糊、笼统的词语最好不用，如基因、表达……

## 4 特别说明

### 4.1 关于测序类论文

凡涉及测定 DNA、RNA 或蛋白质序列的论文，请先通过国际基因库 EMBL (欧洲)或 GenBank (美国)或 DDBJ (日本)，申请得到国际基因库登录号 (Accession No.)后再投来。

### 4.2 关于版权

4.2.1 本刊只接受未公开发表的文章，请勿一稿两投。

4.2.2 凡在本刊通过审稿、同意刊出的文章，所有形式的(即各种文字、各种介质的)版权均属本刊编辑部所有。作者如有异议，敬请事先声明。

4.2.3 对录用的稿件编辑部有权进行文字加工，但如涉及内容的大量改动，将请作者过目同意。

4.2.4 文责自负。作者必须保证论文的真实性，因抄袭剽窃、弄虚作假等行为引发的一切后果，由作者自负。

### 4.3 审稿程序及提前发表

4.3.1 来稿刊登与否由编委会最后审定。对不录用的稿件，一般在收稿 2 个月之内通过 E-mail 说明原因，作者登陆我刊系统也可查看。稿件经过初审、终审通过后，作者根据编辑部返回的退修意见进行修改补充，然后以投稿时的用户名和密码登陆我刊系统上传修改稿，待编辑部复审后将给作者发稿件录用通知单，稿件按照投稿先后排队发表。

4.3.2 对投稿的个人和单位一视同仁。坚持文稿质量为唯一标准，对稿件采取择优先登的原则。

## 5 发表费及稿费

论文一经录用，将在发表前根据版面收取一定的发表费并酌付稿酬、赠送样刊。

## 6 联系方式

地址：北京市朝阳区北辰西路 1 号院 3 号中国科学院微生物研究所《微生物学通报》编辑部(100101)

Tel: 010-64807511; E-mail: tongbao@im.ac.cn; 网址: <http://journals.im.ac.cn/wwxtbcn>