

研究报告

沙眼衣原体 GlgA 蛋白表达和分泌的调控机制

孙豫辉^Δ 彭波^Δ 刘安元 栾秀丽 米彦安 陈丽丽 陆春雪*

(南华大学医学院病原生物学研究所 特殊病原体防控湖南省重点实验室 湖南 衡阳 421001)

摘要:【背景】沙眼衣原体(*Chlamydia trachomatis*, Ct)的分泌蛋白在 Ct 与宿主细胞的相互作用、感染发育周期及致病过程中发挥着至关重要的作用。GlgA 蛋白是课题组前期研究发现的一种新的 Ct 分泌蛋白,其表达和分泌的具体机制及作用还不清楚。【目的】寻找调控 Ct GlgA 蛋白表达和分泌的分子机制,为后续 Ct 致病机制研究提供实验基础和新思路。【方法】采用 SignalP 4.1 软件对 GlgA 蛋白 N 端进行信号肽预测分析,并用细菌分泌蛋白特异性阻断剂 C16 和 C1 化合物分别或同时处理 Ct 感染的 HeLa 细胞,观察阻断 II 型、III 型分泌途径对 GlgA 蛋白分泌的影响;经新生霉素处理、噬斑筛选及穿梭质粒转染技术,构建 Ct 质粒缺失株和缺失互补株,并鉴定质粒编码基因在两种菌株的缺失及表达情况;间接免疫荧光法观察质粒缺失对 GlgA 表达和分泌的影响。【结果】GlgA 蛋白 N 端无信号肽序列,细菌 II 型、III 型分泌途径特异性阻断剂 C16 和 C1 化合物不能阻断 GlgA 的胞浆分泌;Ct 质粒缺失株 CTD1 的质粒编码基因 *pgp7* 丢失,且质粒编码蛋白 Pgp3 及基因组编码蛋白 GlgA 的表达和分泌现象均消失;Ct 缺失互补株 CTD1-pGFP::SW2 重新获得 *pgp7* 基因,并恢复 Pgp3 蛋白和 GlgA 的表达和分泌。【结论】初步证实 Ct 糖原合酶 GlgA 蛋白的表达和分泌不依赖细菌 II 型和 III 型分泌途径,而且与衣原体质粒密切相关。

关键词: 沙眼衣原体,糖原合酶 GlgA,分泌蛋白,质粒缺失株

Foundation items: National Natural Science Foundation of China (81471969, 81202374, 81572011); Hunan Provincial Key Laboratory for Special Pathogens Prevention and Control (2014-5); Hunan Provincial Cooperative Innovation Center for Molecular Target New Drug Study (2015-8)

^ΔThese authors equally contributed to this work

*Corresponding author: Tel: 86-734-8282907; E-mail: lcxpb@aliyun.com

Received: April 22, 2017; **Accepted:** August 30, 2017; **Published online** (www.cnki.net): August 30, 2017

基金项目: 国家自然科学基金(81471969, 81202374, 81572011); 湖南省重点实验室特殊病原体防控项目(2014-5); 湖南省高等学校“分子靶标新药研究”协同创新中心资助项目(2015-8)

^Δ对本文贡献相同

*通信作者: Tel: 86-734-8282907; E-mail: lcxpb@aliyun.com

收稿日期: 2017-04-22; **接受日期:** 2017-08-30; **网络首发日期**(www.cnki.net): 2017-08-30

Regulatory mechanism of *Chlamydia trachomatis* GlgA protein expression and secretion

SUN Yu-Hui[△] PENG Bo[△] LIU An-Yuan LUAN Xiu-Li MI Yan-An
CHEN Li-Li LU Chun-Xue*

(Pathogenic Biology Institute, School of Medicine, University of South China, Hunan Provincial Key Laboratory for Special Pathogens Prevention and Control, Hengyang, Hunan 421001, China)

Abstract: [Background] The secreted proteins of *Chlamydia trachomatis* play important roles in chlamydia interaction with host cell, development cycle and pathogenesis. Our previously study have found that *C. trachomatis* glycogen synthase (GlgA) to be a newly chlamydia secreted protein, however, the secretion mechanism and the roles of GlgA in chlamydial pathogenesis is still unknown. [Objective] We studied regulatory mechanism of *C. trachomatis* GlgA protein expression and secretion, to provide experimental basis for studying chlamydia pathogenic mechanism. [Methods] SignalP 4.1 software was amplified to predict GlgA protein N terminal signal peptide. *C. trachomatis* infected HeLa cells were treated individually with C16 compounds, C1 compounds, or their combination to observe the effect of blocking type II or type III secretion system on GlgA secretion. Novobiocin treatment, plaque-forming assay, as well as shuttle plasmid transformation technique were used to construct either plasmid-free or plasmid-compensate *C. trachomatis* strains, then the strains were further identified by detecting both the plasmid encoding gene and protein. Indirect immunofluorescence assay was done to evaluate the effects of the plasmid deletion on GlgA protein expression and secretion. [Results] The full length GlgA is predicted to contain no putative signal peptide at its N terminus. Neither C16 nor C1 compounds inhibited GlgA secretion into the cytosol of chlamydia-infected cells. The plasmid-encoded gene *pgp7*, the plasmid-encoded protein Pgp3, the genome-encoded protein GlgA were all detected in the cultures infected with either wild type serovar D or CTD1-pGFP::SW2 transformant but not the plasmid-free CTD1 organisms. [Conclusion] The expression and secretion of GlgA protein is not dependent on bacteria type II or III secretion system, but closely related to the plasmid of *C. trachomatis*.

Keywords: *Chlamydia trachomatis*, Glycogen synthase GlgA, Secreted protein, Plasmid-free organisms

沙眼衣原体(*Chlamydia trachomatis*, Ct)是严格胞内寄生、有独特二相性发育周期的特殊细菌, Ct 感染致病与其真核细胞内存活及增殖密切相关^[1]。Ct 有 19 个血清型, 其中 A-C 型主要感染眼结膜上皮细胞, 引起沙眼并可并发倒睫、失明; D-K 型主要感染泌尿生殖道上皮细胞, 引起盆腔炎、附睾炎, 严重情况下还可阻塞输卵管, 导致不孕或异位妊娠; L1-L3 型主要侵犯淋巴组织, 导致性病淋巴肉芽肿^[2-3]。尽管各型衣原体感染致病的确切机制还不清楚, 但分泌蛋白在 Ct 的黏附、侵入、增殖、释放等各环节均有表达和分布, 与 Ct 致病密切相关^[4]。

Ct 基因组包含有染色体和质粒编码基因。1998 年, Stephens 等首次发布 Ct 全基因组测序结果, 证实衣原体基因组具有编码糖原分解和合成代谢的全部基因(共 6 种), 这些基因均分布在衣原体染色体^[5]。为分析 Ct 的糖原代谢机制, 本课题组前期对该类基因的编码产物进行定位分析, 结果发现 6 种蛋白中有 5 种定位于衣原体包涵体, 仅糖原合酶 CT798 (Glycogen synthase, GlgA)蛋白表达后既可定位于包涵体, 又可分泌到宿主细胞胞浆, 而且其胞浆分泌现象在 Ct 各血清型中均保守存在; 此外, Ct 生殖道感染可诱导感染者血清中出现高滴度的 GlgA 抗体^[6-7]。GlgA 的保守分泌特性及强免疫

原性,提示其在 Ct 的感染致病机制中发挥重要作用,研究 GlgA 的表达和分泌的调控机制,可能为衣原体发育周期阻滞药物、致病机制等研究提供实验基础和新思路。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株、主要试剂和仪器

沙眼衣原体血清型 D 型标准株(D/UW-3/CX)、HeLa229 细胞、McCoy 细胞由本室传代保存;pGFP::SW2 衣原体穿梭质粒由美国德州大学圣安东尼奥健康科学研究中心(UTHSCSA)钟光明教授惠赠。C1 化合物 [N'-(3,5-dibromo-2-hydroxybenzylidene)-4-nitrobenzohydrazide]和 C16 化合物(Arylomycin)购自美国 ChemBridge 公司;针对沙眼衣原体 GlgA、CPAF、Pgp3、CT621 等蛋白的单克隆抗体和鼠抗衣原体原体(Elementary body, EB)多抗均为本室制备;Cy2、Cy3 标记的二抗及 Hoechst 荧光染料购自美国 Sigma 公司。6 孔和 24 孔细胞培养板,美国 Corning 公司。荧光显微镜,株式会社日立制作所;超速离心机,美国 Beckman 公司。

1.1.2 培养基

DMEM 常规细胞培养基^[6]及衣原体噬斑筛选琼脂糖培养基^[8]。

1.2 方法

1.2.1 GlgA 蛋白 N 端信号肽分析

从 STDGEN Databases (<http://stdgen.northwestern.edu/>)获取沙眼衣原体糖原合酶 GlgA 蛋白的氨基酸序列,采用 SignalP 4.1 服务器(<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)对该蛋白的氨基酸序列进行 N 端信号肽分析。

1.2.2 C16 和 C1 化合物对 GlgA 蛋白分泌的影响

HeLa 细胞常规体外传代培养并转种 24 孔细胞培养板,待细胞生长至 80%融合率时,加入 1:4 000 稀释的 Ct D 型标准株(野生株),8 h 后弃感染液,分别加入含有 10 $\mu\text{mol/L}$ C16 化合物,或 50 $\mu\text{mol/L}$ C1 化合物,或同时含有 10 $\mu\text{mol/L}$ C16 和 50 $\mu\text{mol/L}$

C1 化合物的 DMEM 培养基继续培养细胞 36 h;多聚甲醛固定、皂甙透化细胞后,以免抗包涵体膜蛋白 IncA 和鼠抗衣原体蛋白(GlgA 或 CT621 或 CPAF)为一抗进行双染色,Cy2 绿色荧光标记的羊抗兔、Cy3 红色荧光标记的羊抗鼠为二抗,以 Hoechst 蓝色荧光为 DNA 染料,间接免疫荧光法观察 GlgA 蛋白在宿主细胞的表达及定位情况;计数各种处理因素下衣原体蛋白的胞浆分泌率。

1.2.3 沙眼衣原体 Ct D 型质粒缺失株的构建及鉴定

Ct D 型体外感染 6 孔板 McCoy 细胞,2 h 后弃感染液,用含 100 $\mu\text{g/mL}$ 新生霉素、2 $\mu\text{g/mL}$ 放线菌酮的 DMEM 培养基继续培养 42 h;收获细胞、制备细胞裂解液再次感染 McCoy 细胞,4 h 后弃培养液,加入 2 mL/孔琼脂糖培养基,待凝固后,再补充 4 mL/孔 DMEM,37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 5-7 d;倒置显微镜下挑取清晰、孤立的噬斑,制备噬斑裂解液,取 30 μL 裂解液作为 PCR 模板,分别扩增衣原体质粒编码基因 *pgp7* (P1-CCGGAATTCATGGGCTCGATGGCTTTCCA, P2-TTTTCCTTTTGC GGCCGCTCACAATATTGTGGGTGTTTGT)和染色体编码基因 CT798 (P1-CCGGAATTCATGAAAATTATTCACACAGCTAT, P2-CCGCTCGAGTTTGT TTTATAAATTTCTAAATATTTAT);另取 30 μL 感染 HeLa 细胞,以免抗 EB 和鼠抗 Pgp3 为一抗进行双染色,间接免疫荧光法鉴定衣原体有无质粒丢失;取缺失株的噬斑裂解液重复噬斑形成实验 2 次,获得纯种并纯化 EB, -80 $^{\circ}\text{C}$ 备用。

1.2.4 沙眼衣原体 Ct D 型质粒缺失互补株的构建及鉴定

在 180 μL CaCl_2 缓冲液中,加入 10 μL 质粒缺失株 EB 和 10 μL pGFP::SW2 质粒,室温孵育 45 min 后,再加入 200 μL CaCl_2 重悬的 McCoy 细胞,20 min 后将上述混合物 70 μL /孔转种 6 孔细胞板,常规 DMEM 培养基^[6]培养 48 h 后,荧光显微镜下观察;用记号笔在 6 孔板底部标记发绿色荧光的克隆,小心刮取细胞至 200 μL 含有玻璃珠的 SPG 缓冲液,

振荡玻璃珠制备细胞裂解液感染 24 孔板 HeLa 细胞, 用含 10 U/mL 青霉素 G 的 DMEM 培养基筛选培养 48 h, 镜下仍发绿色荧光的克隆, 再用青霉素 G 反复筛选两轮; 刮取绿色荧光区域细胞, 裂解后感染 McCoy 细胞, 按 1.2.3 所述噬斑实验方法制备缺失互补株纯种, 鉴定 *pgp7* 和 CT798 基因的缺失及 *Pgp3* 的表达情况, 纯化互补株 EB, -80°C 备用。

1.2.5 沙眼衣原体质粒缺失对 GlgA 蛋白分泌的影响

取 Ct D 型野生株、质粒缺失株及缺失互补株分别感染 24 孔板 HeLa 细胞单层, 感染 2 h 后用普通 DMEM 培养基继续培养细胞 42 h, 一部分感染细胞以兔抗 EB 和鼠抗 GlgA (或鼠抗 CPAF) 为一抗进行双染色, 间接免疫荧光法检测 GlgA、CPAF 蛋白的表达和定位, 并计数其胞浆分泌率; 另一部分细胞用 5% 碘染液室温染色 50 min, 显微镜观察糖原合成情况。

2 结果与分析

2.1 GlgA 蛋白 N 端无信号肽序列

采用 SignalP 4.1 信号肽预测服务器对 GlgA 蛋白 N 端(1-70 氨基酸残基)序列进行神经网络法(Neural network, NN)分析, 结果显示 C、S、Y 值以及 1-31 号氨基酸的平均 S 值均在 0.1 附近, 各指标最大值显著低于 0.570, SP (Signal peptide) 分析结论为“No”, 说明 GlgA 蛋白无 N 端信号肽序列。

2.2 C16 和 C1 化合物不能阻断 GlgA 蛋白的胞浆分泌

C16 化合物是一种脂肽抑制剂, 可特异性抑制原核生物的信号肽酶 I 活性, 并可阻断衣原体的 II 型分泌途径; 衣原体感染宿主细胞 8 h 后加入低剂量的 C16 化合物, 可显著影响 CPAF 蛋白的分泌, 其胞浆分泌率与二甲基亚砜(DMSO)处理组比较由 79% 下降到 13%, 而 GlgA 和 CT621 的分泌现象与 DMSO 处理组比较无明显差异; C1 化合物则是一种可以阻断衣原体及其他革兰氏阴性细菌 III

型分泌途径的小分子抑制剂; 衣原体感染宿主细胞 8 h 后加入 50 $\mu\text{mol/L}$ C1 化合物, 虽不影响 IncA 蛋白分泌到包涵体膜, 但显著降低 CT621 蛋白的胞浆分泌, 其胞浆分泌率与 DMSO 处理组比较由 62% 下降到 7%, 而 GlgA 和 CPAF 的分泌现象与 DMSO 处理组比较无明显差异; C16 和 C1 化合物联合使用可显著降低 CT621 和 CPAF 的胞浆分泌率, 但 GlgA 的分泌现象与 DMSO 对照组比较仍无明显差异(图 1)。已知衣原体 CPAF 的胞浆分泌依赖 II 型分泌途径, 而 CT621 依赖 III 型分泌途径, C16 和 C1 化合物可分别阻断 CPAF 和 CT621 的分泌, 却不影响 GlgA 蛋白的分泌, 提示 GlgA 蛋白的胞浆分泌不依赖于衣原体的 II 型和 III 型分泌途径。

2.3 沙眼衣原体质粒缺失株和缺失互补株的鉴定

采用新生霉素处理衣原体 D 型标准株(WT)感染的 McCoy 细胞, 再用琼脂糖噬斑形成实验连续三轮筛选获得 3 株质粒缺失株, 分别命名为 CTD1-3, 取 CTD1 感染的细胞裂解液作为 PCR 模板, 可扩增出衣原体的染色体编码基因 CT798 (1 422 bp), 但无质粒编码基因 *pgp7* (515 bp) 的扩增产物(图 2A); 间接免疫荧光法检测结果显示 CTD1 感染 HeLa 细胞后, 可在宿主细胞内检测到衣原体菌体(绿色荧光), 但无 *Pgp3* 蛋白(红色荧光)的表达及分泌(图 2B), *Pgp3* 蛋白由衣原体质粒编码, 提示 CTD1 株质粒成功丢失。pGFP::SW2 是带有绿色荧光蛋白 GFP、 β 内酰胺酶和衣原体质粒编码 ORFs 的穿梭质粒, 将 pGFP::SW2 质粒 CaCl_2 法转染 CTD1 细胞, 青霉素 G 抗性筛选获得的阳性克隆用作 PCR 模板, 可扩增出 CT798 和 *pgp7*; 将阳性克隆用噬斑实验纯化后感染 HeLa 细胞, 可在感染细胞内同时检测到衣原体菌体和 *Pgp3* 蛋白, 且 *Pgp3* 蛋白的表达和分泌现象与 WT 组比较无明显差异, 提示 pGFP::SW2 质粒成功转化 CTD1。

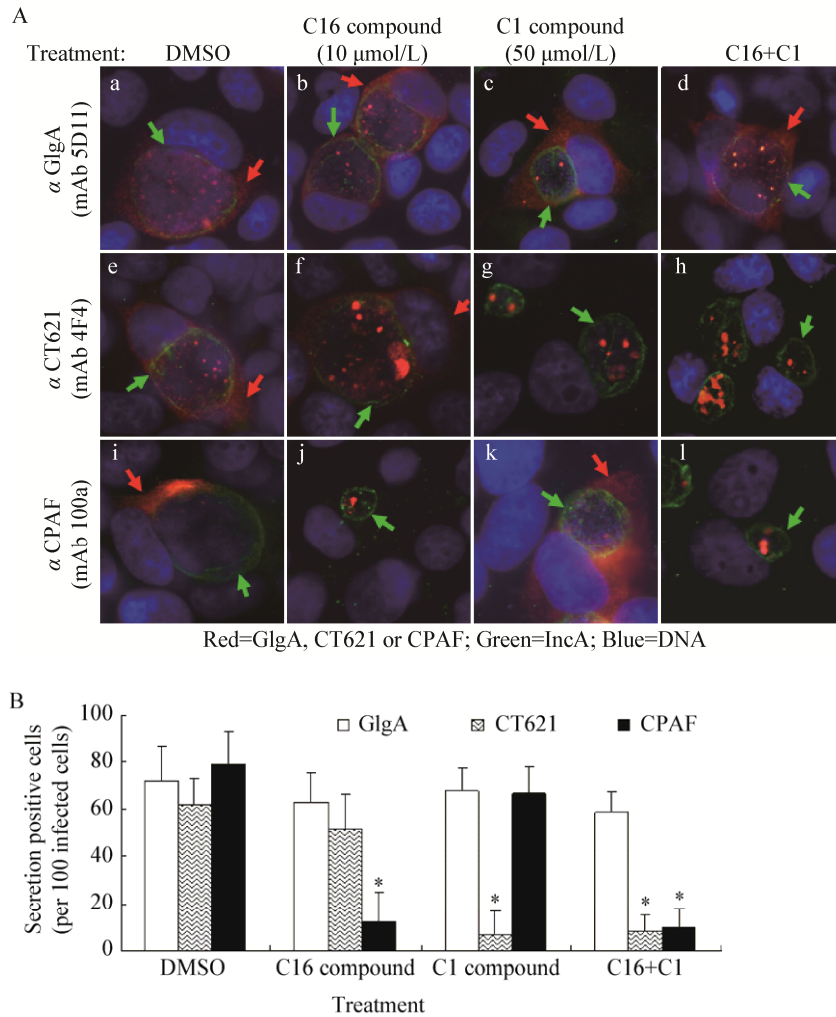


图 1 C16 和 C1 化合物对 GlgA 蛋白胞浆分泌的影响

Figure 1 Effect of C16 and C1 treatment on GlgA secretion into the cytosol of chlamydia-infected cells

注: A: 间接免疫荧光法检测 GlgA、CT621 和 CPAF 的表达及定位; B: 蛋白分泌阳性细胞占衣原体感染细胞的百分率。

Note: A: IFA (indirect immunofluorescence assay) detection of GlgA, CT621 and CPAF proteins in chlamydia infected cultures; B: The percentage of secretion-positive cells (red arrows) in total chlamydia infected cells.

2.4 沙眼衣原体质粒调控 GlgA 蛋白的表达和分泌

Ct D 型野生株 WT、质粒缺失株 CTD1 及缺失互补株 CTD1-pGFP::SW2 分别感染 HeLa 细胞, 间接免疫荧光检测结果(图 3)显示 3 组感染细胞均有包涵体形成(绿色荧光), 说明质粒缺失不影响衣原体的感染和生存。CPAF 单抗检测显示 3 组细胞均有 CPAF 的合成和分泌(红色荧光), 其胞浆分泌率分别为 78%、71%和 69%, 3 组之间无明显差异, 提示质粒缺失对 CPAF 蛋白的表达和分泌无明显影

响。GlgA 单抗检测发现 WT 感染组有 GlgA 的存在(红色荧光)、CTD1 组消失, 而 CTD1-pGFP::SW2 组可恢复 GlgA 的表达, 3 组细胞 GlgA 蛋白的胞浆分泌率分别为 71%、1%和 65%, 有显著性差异, 说明衣原体质粒调控 GlgA 蛋白的表达和分泌。此外, 碘染后 WT 感染组包涵体内可检测到糖原(棕色颗粒)、CTD1 组消失, 而 CTD1-pGFP::SW2 组又重新恢复糖原的合成, 提示 GlgA 蛋白具有糖原合酶活性, 质粒缺失造成 GlgA 蛋白的合成受阻, 其活性也随之丧失。

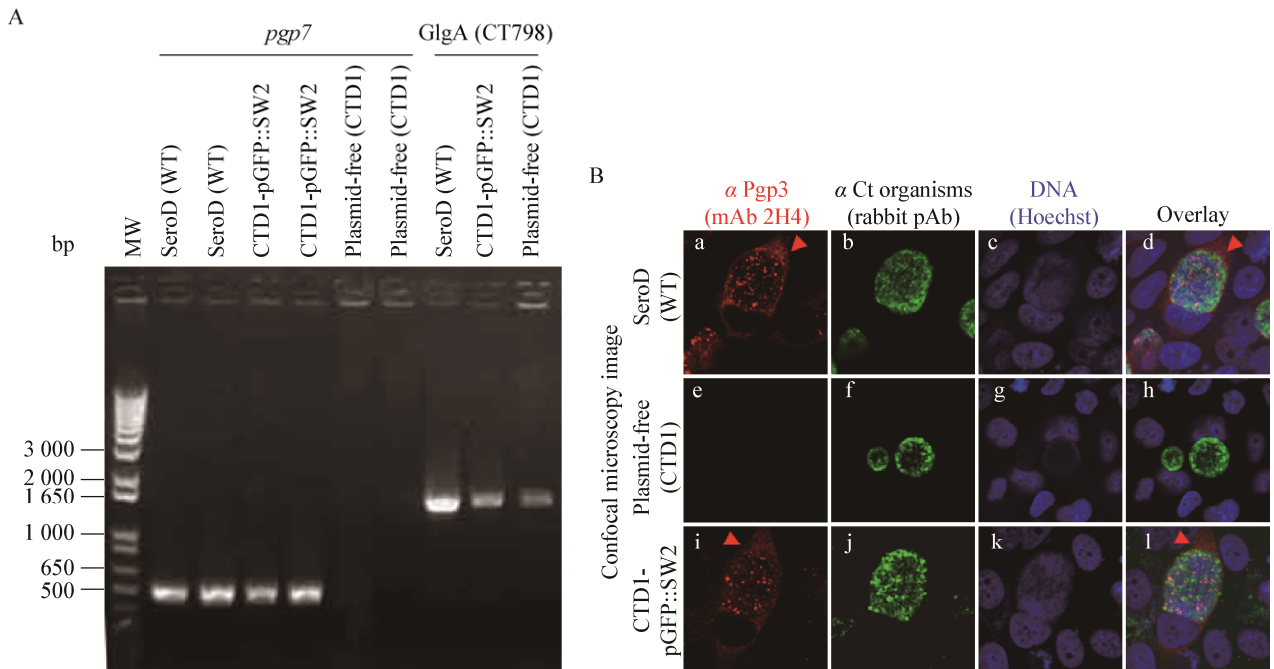


图 2 沙眼衣原体质粒缺失株和缺失互补株的鉴定

Figure 2 Identification of plasmid-free CTD1 and CTD1-pGFP::SW2 transformant

注: A: PCR 扩增质粒编码基因 *pgp7* 和染色体基因组编码基因 CT798; B: 间接免疫荧光法检测质粒编码蛋白 Pgp3 的表达。

Note: A: PCR detection of the plasmid gene *pgp7* and genome-encoded gene CT798; B: IFA detection of Pgp3 protein in chlamydia infected cultures.

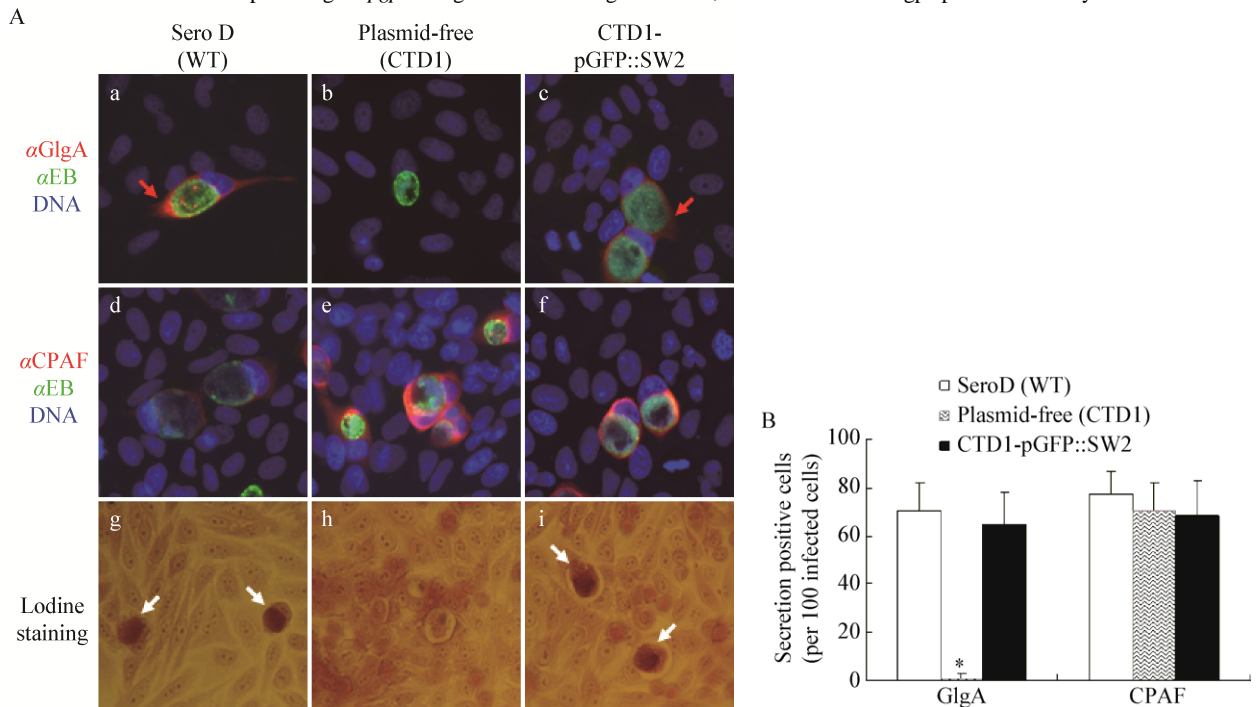


图 3 沙眼衣原体质粒缺失对 GlgA、CPAF 蛋白表达及糖原合成的影响

Figure 3 Effect of plasmid deletion on GlgA and CPAF protein expression, as well as glycogen synthesis

注: A: 间接免疫荧光法检测 GlgA、CPAF 的表达和定位, 碘染法检测糖原的合成; B: 蛋白分泌阳性细胞占衣原体感染细胞的百分率。

Note: A: IFA detection of GlgA and CPAF proteins in chlamydia infected cultures, and iodine staining detection of glycogen synthesis; B: The percentage of secretion-positive cells in total chlamydia infected cells.

3 讨论与结论

分泌蛋白是衣原体感染过程中合成并分泌到菌体外的蛋白。已有研究证实 Ct 感染宿主细胞后可分泌多种蛋白至包涵体腔、包涵体膜、宿主胞浆、胞膜,甚至是宿主细胞外,从而与宿主蛋白或效应分子发生相互作用,促进 Ct 的存活、复制和上行感染^[4]。衣原体蛋白酶样活性因子(CPAF)是第一种被发现的 Ct 胞浆分泌蛋白,大量的研究证实 CPAF 能降解宿主转录因子 USF-1、BH3-only、补体 C3、宿主角蛋白 8 以及核周蛋白 1 等,与 Ct 免疫逃逸、抗细胞凋亡、成熟释放等密切相关^[9];由于 Ct 胞浆分泌蛋白具有重要的生物学作用,继 CPAF 之后,研究者们掀起了寻找 Ct 胞浆分泌蛋白的热潮,先后证实质粒编码蛋白 Pgp3、丝氨酸蛋白酶 HtrA、外膜蛋白 OmcB、4 种未知功能蛋白(CT621、CT622、CT795 和 CT311)及糖原合酶 GlgA 共 9 种蛋白存在胞浆分泌现象^[6,10-14]。

对细菌分泌性蛋白分泌途径的研究,有利于寻找阻断细菌致病蛋白分泌的作用靶标。2010 年,Chen 等^[15]研究发现 Ct 基因组有编码细菌 II 型和 III 型分泌途径的关键基因;CPAF 蛋白 N 端具有信号肽序列,该序列可引领 CPAF 蛋白通过 SecB 依赖的 II 型分泌途径分泌;信号肽酶抑制剂 C16 化合物可特异性阻断 CPAF 的分泌。随后,Wu 等^[14]、Qi 等^[11]和 Lei 等^[13]的研究也分别证实 Ct HtrA 蛋白及未知功能蛋白 CT795 和 CT311 的 N 端也有信号肽序列,分泌机制与 CPAF 相同。OmcB、CT621、CT622 的 N 端无信号肽序列,C16 化合物不影响它们的分泌,但细菌 III 型分泌途径的特异性阻断剂 C1 化合物可阻断其分泌^[12]。以上 7 种分泌蛋白均由衣原体基因组编码,衣原体质粒丢失不影响其表达和分泌。

Ct 各型均有一种大小约 7.5 kb 的质粒,该质粒包含 8 个开放读码框,编码 Pgp1-Pgp8 共 8 种蛋白,Ct 各型质粒丢失均不影响衣原体的生存和复制,但 Ct 致病力明显降低^[16]。Pgp3 是质粒编码的唯一种胞浆分泌蛋白,该蛋白具有强免疫原性,其分

泌现象不能被 C16 或 C1 化合物阻断;Pgp3 的表达和分泌与质粒密切相关、受质粒调控,质粒丢失则 Pgp3 的表达分泌现象也随之消失。Liu 等^[17]通过对鼠衣原体(*Chlamydia muridarum*, Cm)质粒的研究发现,质粒基因 *pgp1*、*pgp2*、*pgp6* 和 *pgp8* 是维持质粒在 Cm 内稳定存在的必要基因,而 *pgp3*、*pgp5* 和 *pgp7* 基因被荧光蛋白基因 GFP 或 mCherry 替换,不影响 Cm 的生存和发育;*pgp4* 是 Cm 重要的转录调控因子,删除质粒基因 *pgp4* 可导致质粒 *pgp3* 和基因组 TC0181 等共 7 种基因的转录表达水平显著降低。CT798 (TC0181 在 Ct 的同源物)是 Ct 基因组编码基因,课题组前期研究发现其编码产物糖原合酶 GlgA 为胞浆分泌蛋白,为探讨该蛋白的表达和分泌调控机制,本研究首先分析 GlgA 的 N 端氨基酸序列,证实没有信号肽存在;其次采用 C16 和 C1 化合物分别处理 Ct 体外感染的 HeLa 细胞,发现 C16 化合物可特异性阻断 CPAF 的分泌,C1 化合物可特异性阻断 CT621 的分泌,但两种化合物对 GlgA 的分泌均无影响;最后,考虑到 Cm 质粒可调控 TC0181 表达,Ct 质粒可能也具有调控 CT798 表达的作用。我们制备了 Ct 质粒缺失株和缺失互补株,发现 GlgA 的表达和分泌与 Ct 质粒密切相关。本研究结果与 Carlson 等^[18]报道的 Ct L2 血清型质粒可调控 20 余种基因组编码基因的表达,及 Liu 等^[17]报道的 Cm 质粒可调控 TC0181 的表达相一致,但质粒对 CT798 表达的调控是否依赖于质粒 *pgp4*,以及 *pgp4* 作用于 CT798 基因并调控其表达和分泌的具体机制还有待进一步阐明。

总之,本研究通过蛋白 N 端测序、分泌蛋白特异性阻断剂、构建质粒缺失株和缺失互补株,结合免疫荧光染色等技术,有力地阐明了 Ct 质粒对 GlgA 蛋白表达和分泌的调控作用,为深入研究衣原体质粒的作用、胞浆分泌蛋白的调控机制及衣原体的致病机制打下了良好的实验基础。

REFERENCES

- [1] Lucas AL, Ouellette SP, Kabeiseman EJ, et al. The trans-Golgi SNARE syntaxin 10 is required for optimal development of

- Chlamydia trachomatis*[J]. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2015, 5: 68
- [2] Ramadhani AM, Derrick T, Macleod D, et al. The relationship between active trachoma and ocular *Chlamydia trachomatis* infection before and after mass antibiotic treatment[J]. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 2016, 10(10): e0005080
- [3] Hadad R, Marks E, Kalbina I, et al. Protection against genital tract *Chlamydia trachomatis* infection following intranasal immunization with a novel recombinant MOMP VS2/4 antigen[J]. *Acta Pathologica Microbiologica et Immunologica Scandinavica*, 2016, 124(12): 1078-1086
- [4] Zhong GM. *Chlamydia trachomatis* secretion of proteases for manipulating host signaling pathways[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2011, 2: 14
- [5] Stephens RS, Kalman S, Lammel C, et al. Genome sequence of an obligate intracellular pathogen of humans: *Chlamydia trachomatis*[J]. *Science*, 1998, 282(5389): 754-759
- [6] Lu CX, Lei L, Peng B, et al. *Chlamydia trachomatis* GlgA is secreted into host cell cytoplasm[J]. *PLoS One*, 2013, 8(7): e68764
- [7] Wang J, Zhang YQ, Lu CX, et al. A genome-wide profiling of the humoral immune response to *Chlamydia trachomatis* infection reveals vaccine candidate antigens expressed in humans[J]. *Journal of Immunology*, 2010, 185(3): 1670-1680
- [8] Banks J, Eddie B, Schachter J, et al. Plaque formation by *Chlamydia* in L cells[J]. *Infection and Immunity*, 1970, 1(3): 259-262
- [9] Yang ZS, Tang LL, Shao LL, et al. The chlamydia-secreted protease CPAF promotes chlamydial survival in the mouse lower genital tract[J]. *Infection and Immunity*, 2016, 84(9): 2697-2702
- [10] Li ZY, Chen D, Zhong YM, et al. The chlamydial plasmid-encoded protein Pgp3 is secreted into the cytosol of *Chlamydia*-infected cells[J]. *Infection and Immunity*, 2008, 76(8): 3415-3428
- [11] Qi ML, Lei L, Gong SQ, et al. *Chlamydia trachomatis* secretion of an immunodominant hypothetical protein (CT795) into host cell cytoplasm[J]. *Journal of Bacteriology*, 2011, 193(10): 2498-2509
- [12] Gong SQ, Lei L, Chang XT, et al. *Chlamydia trachomatis* secretion of hypothetical protein CT622 into host cell cytoplasm via a secretion pathway that can be inhibited by the type III secretion system inhibitor compound 1[J]. *Microbiology*, 2011, 157(4): 1134-1144
- [13] Lei L, Dong XH, Li ZY, et al. Identification of a novel nuclear localization signal sequence in *Chlamydia trachomatis*-secreted hypothetical protein CT311[J]. *PLoS One*, 2013, 8(5): e64529
- [14] Wu X, Lei L, Gong SQ, et al. The chlamydial periplasmic stress response serine protease cHtrA is secreted into host cell cytosol[J]. *BMC Microbiology*, 2011, 11(87): 1-16
- [15] Chen D, Lei L, Lu CX, et al. Secretion of the chlamydial virulence factor CPAF requires the Sec-dependent pathway[J]. *Microbiology*, 2010, 156(10): 3031-3040
- [16] Kari L, Whitmire WM, Olivares-Zavaleta N, et al. A live-attenuated chlamydial vaccine protects against trachoma in nonhuman primates[J]. *The Journal of Experimental Medicine*, 2011, 208(11): 2217-2223
- [17] Liu YJ, Chen CQ, Gong SQ, et al. Transformation of *Chlamydia muridarum* reveals a role for Pgp5 in suppression of plasmid-dependent gene expression[J]. *Journal of Bacteriology*, 2014, 196(5): 989-998
- [18] Carlson JH, Whitmire WM, Crane DD, et al. The *Chlamydia trachomatis* plasmid is a transcriptional regulator of chromosomal genes and a virulence factor[J]. *Infection and Immunity*, 2008, 76(6): 2273-2283