

esaC 基因对迟缓爱德华氏菌的毒力及 T3SS 蛋白分泌的影响^①

李 杰^{②*} 莫照兰^{③**} 茅云翔^{***} 王 波^{***} 杨佳银^{***} 邵 林^{***}

(* 中国科学院海洋研究所实验海洋生物学重点实验室 青岛 266071)

(** 中国科学院研究生院 北京 100049)

(*** 中国海洋大学海洋生命学院 青岛 266003)

摘 要 为了确定编码迟缓爱德华氏菌(*E. tarda*)III型分泌系统(T3SS)装置蛋白的 *esaC* 基因的功能,采用基因敲除的方法构建了 *E. tarda* 野生型致病菌株 LSE40 的 *esaC* 基因无极性缺失突变株 LSE40 Δ *esaC*,该突变株缺失了 *esaC* 的 46-1452bp。Western blotting 分析表明,由于 *esaC* 的缺失,*E. tarda* T3SS 的输送器蛋白(EseB, EseC, EseD)不能分泌到细胞外,同时细菌的自凝聚现象消失;毒力检测发现,突变株 LSE40 Δ *esaC* 对蓝曼龙鱼的半数致死量比野生型菌株提高了 11.5 倍。结果表明, *esaC* 基因影响 T3SS 输送器蛋白的分泌和 *E. tarda* 的毒力。此研究确定了 *esaC* 基因作为 *E. tarda* T3SS 装置蛋白的功能,加深了对 *E. tarda* 致病机理的了解。

关键词 迟缓爱德华氏菌, *esaC* 突变株, III 型分泌系统, 毒力, 输送器蛋白

0 引 言

迟缓爱德华氏菌(*Edwardsiella tarda*, *E. tarda*)为革兰氏阴性杆菌,属于肠杆菌科(*Enterobacteriaceae*)爱德华氏菌属(*Edwardsiella*),广泛存在于各种水生环境,在鱼类、两栖类、爬行类多种动物以及包括人类在内的哺乳动物中都可发现它的存在。*E. tarda* 感染水生鱼类会引起爱德华氏菌病(edwardsiellosis),该病是影响养殖鱼类的主要疾病。因此,研究 *E. tarda* 的致病机理和寻找防治爱德华氏菌病的方法显得尤其重要。

研究发现,细菌对宿主上皮细胞的黏附和侵袭能力、在宿主细胞内的生长繁殖能力、对宿主的血清和吞噬细胞杀伤的抵抗能力^[1,2]与 *E. tarda* 的致病过程有关。一些胞外酶和毒素参与 *E. tarda* 的致病过程,相关的致病因子有溶血素、软骨素酶、皮下坏死毒素、过氧化氢酶等^[3-5]。此外,细菌的分泌系统在 *E. tarda* 的致病过程起着重要的作用^[6]。III 型分泌系统(type III secretion system, T3SS)是多种动植物病原菌所共有的重要致病因子,它由 20 个以上的基因组成,其作用是把细菌产生的效应蛋白直接运送

到宿主细胞内,导致宿主细胞功能改变,引起疾病的发生^[7]。*E. tarda* 的 T3SS 由 35 个基因组成,可编码 4 类蛋白,即装置蛋白(apparatus)、效应蛋白(effector)、伴侣蛋白(chaperone)和调节蛋白(regulator)。研究发现,一些 T3SS 基因的插入失活导致 *E. tarda* 对草鱼上皮细胞和蓝曼龙吞噬细胞的黏附和入侵能力下降,对鱼的致病力降低,表明 T3SS 在 *E. tarda* 的致病中有重要的作用^[6]。*E. tarda* T3SS 的效应蛋白 EseB、EseC 和 EseD 可分泌到细菌细胞外,相互作用形成 T3SS 的输送器(translocator)。这些蛋白的分泌受到调节蛋白 EsrB 的调控^[8],伴侣蛋白 EseC 影响 EseB 和 EseD 的分泌和稳定性^[9]。

T3SS 的装置蛋白基因编码一些结构和功能保守的蛋白,它们主要是细菌的膜蛋白,少数为细胞质的三磷酸腺苷(ATP)酶^[10]。一些研究表明,T3SS 的装置蛋白可形成输送蛋白的孔道,并提供运送蛋白的能量^[11]。T3SS 装置蛋白基因的缺失还引起细菌某些功能的改变,如在 *Salmonella enterica*,装置蛋白基因 *spiA* 的缺失会影响细菌的抗血清活力,对小鼠的毒力大大下降^[12],而在 *Yersinia pestis*,装置蛋白基因 *yscC* 的缺失不仅影响蛋白 YopM 的表达,还影响其分泌^[13]。这些研究表明 T3SS 的装置蛋白基因对

① 863 计划(2006AA100310),国家自然科学基金(30671613)和青岛市科技发展计划(08-1-7-2-HY)资助项目。

② 男,1982 年生,博士生;研究方向:海洋微生物与水产动物病害;E-mail:blowapc@163.com

③ 通讯作者,E-mail:zhimo@ms.qdio.ac.cn

(收稿日期:2008-01-30)

细菌的致病性有重要作用。目前 *E. tarda* T3SS 装置蛋白基因在细菌致病性的作用还没有被阐明。*esaC* 为 *E. tarda* T3SS 的一个装置蛋白编码基因,其功能还没有得到鉴定。为了确定 *esaC* 基因的功能,本研究构建了 *esaC* 基因的缺失突变株,对该突变株的毒力及其对 T3SS 输送器蛋白分泌的影响进行了初步的研究。

1 材料和方法

1.1 实验材料

E. tarda 菌株 LSE40 由本实验室分离、鉴定和保存。*E. tarda* 的培养用胰大豆蛋白胨培养基 (TSA 或 TSB),大肠杆菌 (*E. coli*) 的培养用 LB 培养基。培养基需要的抗生素浓度为:氯霉素 34 μ g/ml, 氯霉素 100 μ g/ml,粘菌素 12.5 μ g/ml。

自杀质粒 pRE112^[14]和 *EseB*、*EseC*、*EseD* 兔抗血清由新加坡国立大学 Dr. Leung Ka Yin 赠送。

蓝曼龙 (*Trichogaster trichopterus*) 购于青岛南山花鸟虫鱼市场,实验前暂养于水族箱中,养殖水温为 (20 $\pm$ 2) $^{\circ}$ C。

1.2 *esaC* 基因缺失突变株的构建

按照 Mo 等人^[15]的方法构建 *esaC* 基因缺失突变株。根据已报道的 *E. tarda* T3SS 的序列 (GenBank 号: AY643478),设计引物 *esaC*-for (5'-AAG-GTACCGCCGCTGTCCGTAAACTGC-3', 斜体部分为 *Kpn*I 酶切位点) 和 *esaC*-int-rev (5'-CTGCTGCTCT-TACTCTGCGTTGTACGCTCTGTTCTGATTA-3', 5' 端下划线部分碱基与 *esaC*-int-for 5' 端下划线部分碱基反向互补) 进行 PCR 扩增,得到的片段大小为 832 bp,该片段含有 *esaC* 5' 端的 45bp 及其上游片段的 787bp (含 *Kpn*I 酶切位点)。然后设计引物 *esaC*-int-for (5'-GCAGAGTAAGAGCAGCAGAACGAG-3') 和 *esaC*-rev (5'-AAGGTACCCCGCCTATGGCTCGCTGCT-3', 斜体部分为 *Kpn*I 酶切位点) 进行 PCR 扩增,得到的片段大小为 938bp,该片段含 *esaC* 基因 3' 端的 33 bp 及其下游片段的 905bp (含 *Kpn*I 酶切位点)。将上述两个 PCR 产物混合作为模板,以 *esaC*-for 和 *esaC*-rev 为引物,PCR 扩增得到 1770bp 的 DNA 片段。片段两端带有 *Kpn*I 酶切位点,并缺失了 *esaC* 基因的 46-1452 bp。经 DNA 测序,验证 *esaC* 基因缺失片段的序列正确后,以 *Kpn*I 酶切该片段,连接到蔗糖自杀载体 pRE112,转化到 *E. coli* SM10,所得阳性克隆与野生型 *E. tarda* LSE40 进行一次同源重

组。将得到的重组子在 TSB 培养 48h 进行二次同源重组,并用 PCR 确定阳性克隆,最后得到突变株 LSE40 Δ *esaC*。

1.3 Western blotting

E. tarda 野生型菌株 LSE40 和突变菌株 LSE40 Δ *esaC* 在 DMEM (Gibco)、5% CO₂ 条件下,25 $^{\circ}$ C 静止培养 24h,诱导 T3SS 蛋白的表达和分泌。用三氯乙酸-丙酮方法^[16]提取 LSE40 和 LSE40 Δ *esaC* 的胞外蛋白 (extracellular protein, ECP) 和总蛋白 (total cellular protein, TCP)。用 BCA Protein Assay Kit (Bio-Rad) 定量后,将蛋白浓度调至 0.2 μ g/ μ l。

制备丙烯酰胺凝胶进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE),浓缩胶浓度为 5%、分离胶浓度为 12%,每孔上样量 5 μ l,电泳条件为浓缩胶 8mA 30min,分离胶 12mA 2.5h。电泳结束后,凝胶转印到硝酸纤维素膜,以 *EseB*、*EseC* 和 *EseD* 的兔抗血清为一抗,以辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG 抗体为二抗,3,3'-二氨基联苯胺 (DAB) 做显色剂,进行 Western blotting^[17]。

1.4 自凝现象

以 1.3 的培养条件培养 LSE40 和 LSE40 Δ *esaC* 24h,观察试管内细菌的凝聚情况。若培养液澄清、试管底部出现菌体沉淀则确定为细菌自凝阳性;培养液浑浊、试管底部无菌体沉淀则确定为自凝阴性。

1.5 毒力检测

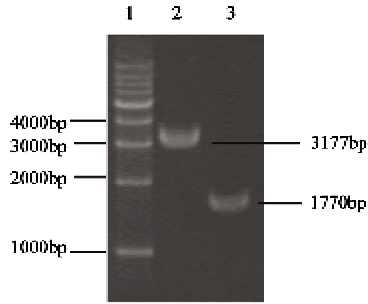
将过夜培养的 *E. tarda* LSE40 和 LSE40 Δ *esaC* 培养物,以 PBS (pH 7.2)、4000rpm 离心洗涤两次,调节 OD₅₄₀ = 0.5 (约 10⁸ cfu/ml),用 PBS 进行 10 倍系列稀释,每个稀释度分别肌肉注射蓝曼龙 10 尾,每尾 0.1ml。对照组蓝曼龙 10 尾,每尾注射 0.1ml PBS。连续观察 14 天,每天记录蓝曼龙死亡情况,根据杨茂成的方法^[18]计算半数致死量 (50% lethal dose, LD₅₀)。

2 实验结果

2.1 *esaC* 基因缺失突变株的构建

E. tarda T3SS *esaC* 基因的全长为 1485bp,本研究构建的 LSE40 Δ *esaC* 突变株缺失了 *esaC* 基因的 46-1452 bp。在野生型 *E. tarda* LSE40 中,引物对 *esaC*-for 和 *esaC*-rev 扩增的 DNA 序列长度是 3177bp,该片段包括了 *esaC* 基因及其上下游的 DNA 片段;在 LSE40 Δ *esaC* 突变株中,由于缺失了 *esaC* 基因的 46-1452bp,上述引物对扩增的 DNA 序列长度

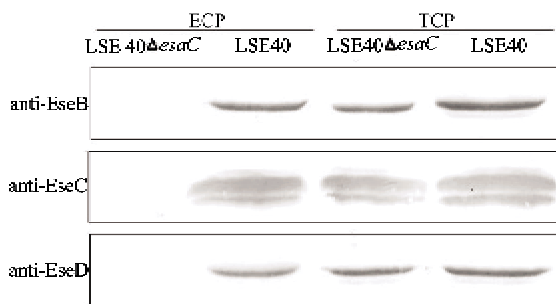
预计是 1770bp。电泳结果显示,在 *E. tarda* LSE40 和 LSE40 Δ *esaC* 获得的 PCR 产物大小分别与预期的一致(图 1)。分离 PCR 产物进行序列测定,结果证实该缺失片段与实验设计完全吻合。因此本实验获得了正确缺失的 *esaC* 突变株 LSE40 Δ *esaC*。



1. 1kb ladder Marker; 2. LSE40; 3. LSE40 Δ *esaC*
图 1 *E. tarda* 突变株 LSE40 Δ *esaC* 的 PCR 鉴定

2.2 Western blotting 结果

E. tarda LSE40 和 LSE40 Δ *esaC* 在 DMEM、5% CO₂ 诱导培养 24h 后,提取细菌的胞外蛋白(ECP)和总蛋白(TCP)进行 Western blotting 分析。结果显示,在野生型 LSE40 的 ECP 和 TCP 中,都能检测到输送器蛋白 EseB、EseC 和 EseD;而在 LSE40 Δ *esaC* 突变株中,只有 TCP 中检测到 EseB、EseC 和 EseD 蛋白,ECP 中没有检测到这三种蛋白(图 2)。结果表明,由于 *esaC* 基因的缺失,*E. tarda* T3SS 的输送器蛋白 EseB、EseC 和 EseD 不能分泌到培养基中。

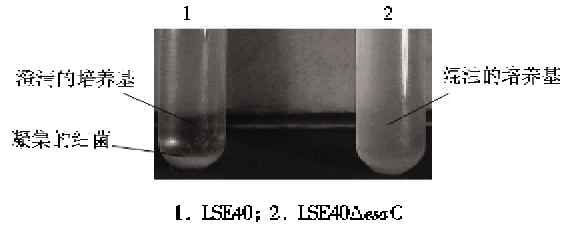


ECP: 细菌的胞外蛋白; TCP: 细菌的总蛋白; anti-EseB: 兔抗 EseB 血清; anti-EseC: 兔抗 EseC 血清; anti-EseD: 兔抗 EseD 血清
图 2 Western blotting 分析 *E. tarda* T3SS 输送器蛋白的分泌

2.3 细菌的自凝

E. tarda LSE40 和 LSE40 Δ *esaC* 在 DMEM、5% CO₂ 条件下诱导培养后 24h 后进行观察,发现培养 LSE40 细菌的试管底部有细菌沉淀,溶液部分呈澄清状态(图 3 中的 1),表明野生型 *E. tarda* 的细菌

可产生自凝;而突变株 LSE40 Δ *esaC* 细菌培养物的试管底部没有细菌沉淀,溶液部分呈混浊状态(图 3 中的 2)。结果表明,*esaC* 的缺失影响 *E. tarda* 细菌细胞的自凝。



1. LSE40; 2. LSE40 Δ *esaC*
图 3 *E. tarda* 的凝集现象

2.4 毒力实验

根据平板计数结果,OD₅₄₀ = 0.5 的 *E. tarda* LSE40 的细菌浓度为 1.34×10^8 cfu/ml, LSE40 Δ *esaC* 的细菌浓度为 1.55×10^8 cfu/ml。以系列 10 倍稀释浓度的 *E. tarda* 细菌注射蓝曼龙,各浓度组的蓝曼龙死亡数量见表 1,PBS 对照组蓝曼龙未发生死亡。根据杨茂成的方法^[18]计算 LD₅₀,得到 LSE40 的 LD₅₀ 为 1.69×10^4 cfu/尾, LSE40 Δ *esaC* 的 LD₅₀ 为 1.95×10^5 cfu/尾。结果显示,与野生型 LSE40 相比,突变株 LSE40 Δ *esaC* 的 LD₅₀增加了 11.5 倍,表明 *esaC* 基因的缺失影响 *E. tarda* 的毒力。

表 1 *E. tarda* 的半数致死量测定

菌液稀释浓度 (cfu/ml)	实验鱼数(尾)	鱼死亡数量(尾)	
		LSE40	LSE40 Δ <i>esaC</i>
10^8	10	10	10
10^7	10	10	8
10^6	10	9	5
10^5	10	4	1
10^4	10	1	0
LD ₅₀ (cfu/尾)		1.69×10^4	1.95×10^5

3 讨论

编码细菌 T3SS 装置蛋白的基因大约有 20 个左右,它们可形成跨越细菌内膜、外膜的孔道结构,并在细菌表面形成“针状”结构,该针状结构可穿过宿主细胞膜^[10,19]。通过装置蛋白形成的孔道结构和针状结构,细菌在细胞内产生的效应蛋白可从细菌内部直接进入宿主细胞内,导致宿主细胞功能的改变^[20]。因此装置蛋白在维持 T3SS 的结构和功能上有重要的作用。根据生物信息学分析,*E. tarda*

的 *esaC* 基因编码 T3SS 的一个装置蛋白,与其它细菌 T3SS 的一些装置蛋白同源,如 *E. coli* 的 *SscC*, *Y. pestis* 的 *YscC*, *Salmonella* sp. 的 *SsaC* 和 *InvG*, *Aeromonas salmonicida* 的 *AscC* 等。扫描电镜观察发现, *Salmonella* sp. 的 *InvG* 和 *Y. pestis* 的 *YscC* 在细菌外膜可以形成稳定的环状多聚体结构,该多聚体结构被认为是 T3SS 输送细菌大分子物质的通道^[21,22]。目前, *E. tarda* T3SS 的装置蛋白的结构和功能尚未鉴定和阐明。本研究通过构建 *esaC* 的基因缺失突变株,对其功能进行了初步研究。

本研究利用框内缺失(in-frame deletion)突变技术进行目的基因的定点缺失,用该法建立的基因缺失突变株为无极性基因突变株,其中目的基因的缺失不会影响上下游基因的表达,是研究细菌基因功能的有效方法。本研究建立的 LSE40Δ*esaC* 突变株将 *esaC* 基因的 46-1452bp DNA 片段定点缺失,即缺失了 *EsaC* 的 16~484 个氨基酸残基,没有破坏 *esaC* 上下游基因阅读框的序列,消除了由于基因的突变带来的极性影响。有研究表明, *yscC* 基因的缺失会影响 *Y. pestis* 胞外蛋白的分泌^[13]。EseB、EseC 和 EseD 为 *E. tarda* T3SS 的分泌蛋白,它们在细菌的表面形成 T3SS 的输送器结构^[9]。我们的研究发现, *esaC* 基因的缺失影响输送器蛋白 EseB、EseC 和 EseD 分泌到细菌细胞外,但不影响它们在细菌细胞内的表达。*EsaC* 的同源蛋白 *YscC* 可形成 T3SS“针尖”基体的上部结构,该结构的缺失将导致 T3SS 装置结构的不完整,影响效应蛋白或输送器蛋白的分泌^[22],这提示我们 *esaC* 的缺失有可能影响 *E. tarda* T3SS 孔道结构的完整性,从而影响输送器蛋白的正常分泌。

根据 Rao 等人的研究结果,野生型 *E. tarda* 在 T3SS 被诱导表达的培养条件下,细菌细胞出现自凝的表型^[23]。进一步研究发现,当 *eseB* 插入失活突变时, *E. tarda* 细菌的自凝表型完全丧失;而当 *eseC* 和 *eseD* 插入失活突变时, *E. tarda* 细菌存在部分自凝的表型;同时这些突变株的毒力均有所下降^[6],这些结果说明输送器蛋白 EseB、EseC 和 EseD 的正常表达和分泌是 *E. tarda* 细菌细胞发生自凝所必需的。本研究也获得了与上述研究一致的结果,研究显示,由于 *esaC* 基因的缺失,影响了 EseB、EseC 和 EseD 的分泌,导致 LSE40Δ*esaC* 突变株不能发生凝集,毒力下降了 10 倍以上。生物信息学分析显示 *E. tarda* 的 EseB、EseC 和 EseD 分别与肠致病性 *E. coli* (EPEC)的 EspA, EspD and EspB 同源。EspD 和

EspB 可以在宿主细胞膜形成孔道结构,而 EspA 在细菌表面形成丝状体结构,该结构可以介导细菌和宿主细胞的结合^[24]。综合上述结果和分析,我们认为 EseB 可能形成 *E. tarda* 细胞表面的丝状结构,并介导了细菌细胞的自凝;而 EseC 和 EseD 可能影响 EseB 的丝状体空间结构的形成,从而影响细胞自凝的程度。

本研究的结果表明了装置蛋白在 T3SS 蛋白的分泌和细菌毒力中有重要的作用。鉴于它们在 T3SS 的功能和细菌致病中的作用,对装置蛋白的生物合成和正确折叠、以及它们的空间结构对 T3SS 效应蛋白的分泌和稳定性影响等方面进行深入的研究,将有助于阐明 *E. tarda* 致病机制,为控制爱德华氏菌病提供可靠的理论和基础。

参考文献

- [1] Ling S H M, Wang X H, Xie L, et al. Use of green fluorescent protein (GFP) to track the invasive pathways of *Edwardsiella tarda* in the in vivo and in vitro fish models. *Microbiology*, 2000, 146(1): 7-19
- [2] Janda J M, Abbott S L, Krosche-Bystrom S, et al. Pathogenic properties of *Edwardsiella* species. *Journal of Clinical Microbiology*, 1991, 29(9): 1997-2001
- [3] Chen J D, Huang S L. Hemolysin from *Edwardsiella tarda* strain ET16 isolated from eel *Anguilla japonica* identified as a hole-forming toxin. *Fish Science*, 1996, 62(4): 638-542
- [4] Waltman W D, Shotts E B, Hsu T C. Biochemical and enzymatic characterization of *Edwardsiella tarda* from the United States and Taiwan. *Fish Pathology*, 1986, 21(1): 1-8
- [5] Srinivasa Rao P S, Yamada Y, Leung K Y. A major catalase (KatB) that is required for H₂O₂ and phagocyte-mediated killing in *Edwardsiella tarda*. *Microbiology*, 2004, 149(9): 2635-2644
- [6] Tan Y P, Zheng J, Tung S L, et al. Role of type III secretion in *Edwardsiella tarda* virulence. *Microbiology*, 2005, 151(7): 2301-2313
- [7] Grefory V P, James B D, Ferraci F. Type III export: new uses for an old pathway. *Molecular Microbiology*, 2001, 40(2): 284-293
- [8] Zheng J, Tung S L, Leung K Y. Regulation of a type III and a putative secretion system in *Edwardsiella tarda* by EsrC is under the control of a two-component system, EsrA-EsrB. *Infection and Immunity*, 2005, 73(7): 4127-4137
- [9] Zheng J, Li N, Tan Y P, et al. EsecC is a chaperone for the *Edwardsiella tarda* type III secretion system putative translocon components EseB and EseD. *Microbiology*, 2007, 153(6): 1953-1962

- [10] Hueck C J. Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 1998, 62(2): 379-433
- [11] Tampakaki A P, Fadoulglou V E, Gazi A D, et al. Conserved features of type III secretion. *Cellular Microbiology*, 2004, 6(9): 805-816
- [12] Ochman H, Soncini F C, Solomon F, et al. Identification of a pathogenicity island required for *Salmonella* survival in host cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1996, 93(15): 7800-7804
- [13] Plano G V, Starley S C. Mutations in *yscC*, *yscD*, and *yscG* prevent high-level expression and secretion of V antigen and Yops in *Yersinia pestis*. *Journal of bacteriology*, 1995, 177(13): 3843-3854
- [14] Edwards R A, Keller L H, Schifferli D M. Improved allelic exchange vectors and their use to analyze 987P fimbria gene expression. *Gene*, 1998, 207(2): 149-157
- [15] Mo Z L, Xiao P, Mao Y X, et al. Construction and characterization of a live, attenuated *esrB* mutant of *Edwardsiella tarda* and its potential as a vaccine against the haemorrhagic septicemia in turbot, *Scophthalmus maximus* (L.). *Fish & Shellfish Immunology*, 2007, 23(3): 521-530
- [16] Shimizu T, Shima K, Yoshino K, et al. Proteome and transcriptome analysis of the virulence genes regulated by the VirR/VirS system in *Clostridium perfringens*. *Journal of bacteriology*, 2002, 184(10): 2587-2594
- [17] Burnette W N. "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Analytical Biochemistry*, 1981, 112(12): 195-203
- [18] 杨茂成主编. 兽医统计学. 中国展望出版社, 1990, 232-234
- [19] Cornelis G R, Van Gijsegem F. Assembly and function of type III secretory systems. *Annual Review of Microbiology*, 2000, 54: 735-774
- [20] He S Y, Nomura K, Whittam T S. Type III protein secretion mechanism in mammalian and plant pathogens. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2004, 1694(1-3): 181-206
- [21] Koster M, W Bitter, de Cock H, et al. The outer membrane component, YscC, of the Yop secretion machinery of *Yersinia enterocolitica* forms a ring-shaped multimeric complex. *Molecular Microbiology*, 1997, 26(4): 789-797
- [22] Burghout P, van Boxtel R, Van Gelder P. Structure and electrophysiological properties of the YscC secretin from the type III secretion system of *Yersinia enterocolitica*. *Journal of bacteriology*, 2004, 186(14): 4645-4654
- [23] Srinivasa Rao P S, Yamada Y, Tan Y P, et al. Use of proteomics to identify novel virulence determinants that are required for *Edwardsiella tarda* pathogenesis. *Molecular Microbiology*, 2004, 53(2): 573-586
- [24] Shaw R K, Daniell S, Ebel F, et al. EspA filament-mediated protein translocation into red blood cells. *Cellular Microbiology*, 2001, 3(4): 213-222

Effect of *esaC* gene on *Edwardsiella tarda*'s virulence and secretion of T3SS proteins

Li Jie^{* **}, Mo Zhaolan^{**}, Mao Yunxiang^{***}, Wang Bo^{* **}, Yang Jiayin^{* **}, Shaolin^{***}

(^{*} Key Laboratory of Experimental Marine Biology, Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071)

(^{**} Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049)

(^{***} College of Marine Life Science, Ocean University of China, Qingdao 266003)

Abstract

In order to determine the function of the *esaC* gene encoding an apparatus protein of the type III secretion system (T3SS) of *Edwardsiella tarda*, the authors construct a Δ *esaC* mutant of a pathogenic *E. tarda* strain LSE40 by an in-frame deletion method. In the mutant nucleotides of 46-1452bp of *esaC* is deleted. The western blotting analysis shows that the Δ *esaC* mutant does not secrete the translocator proteins (EseB, EseC and EseD) of *E. tarda* T3SS into the culture medium. Further investigation shows that the Δ *esaC* mutant does not autoaggregate in the culture medium. The LD₅₀ (50% lethal dose) of the Δ *esaC* mutant is shown about 11.5 times higher than that of the wild-type *E. tarda* in the infection experiments of the blue gourami (*Trichogaster trichopterus*). These results indicate that *esaC* affects the secretion of T3SS translocator proteins and the virulence of *E. tarda*.

Key word: *E. tarda*, *esaC* mutant, type III secretion system (T3SS), virulence, translocator proteins