

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
54 (3) :285 - 291; 4 March 2014
ISSN 0001 - 6209; CN 11 - 1995/Q
http://journals.im.ac.cn/actamicrocn
doi: 10.13343/j.cnki.wsxb.2014.03.005

分枝杆菌 *glpX* 基因的功能

王歆玮, 任道元, 高谦, 牛辰*

复旦大学, 上海医学院教育部/卫生部医学分子病毒学重点实验室, 上海 200032

摘要: 【目的】构建耻垢分枝杆菌 (*Mycobacterium smegmatis*) *glpX* 基因敲除株, 研究其在生理代谢中的功能。【方法】利用分枝杆菌噬菌体 Che9c 重组系统构建耻垢分枝杆菌 *glpX* 基因敲除株; 比较野生株及突变株在不同碳源培养条件下的生长差异; 通过荧光实时定量 PCR, 比较野生株在以葡萄糖或油酸为唯一碳源培养下, *glpX* 基因的表达水平。【结果】*glpX* 突变株在以甘油或油酸为唯一碳源的培养基中无法生长; 野生株在以油酸为唯一碳源培养下, *glpX* 基因表达上调。【结论】*glpX* 基因编码了分枝杆菌糖异生途径必需的和非冗余的果糖 1,6-二磷酸酶 (fructose 1,6-bisphosphatase, FBPase)。

关键词: 分枝杆菌, 基因 *glpX*, 果糖 1,6-二磷酸酶, 碳源代谢, 糖异生

中图分类号: Q933 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2014) 03-0285-07

由结核分枝杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis*) 感染所引起的结核病 (Tuberculosis) 仍是严重危害人类健康的传染性疾病, 目前在全球范围内约有 1/3 的人口感染结核, 每年约 170 万人死于该病^[1]。近年来, 随着耐药 (Drug resistance) 菌株, 尤其是耐多药 (Multi-drug resistance) 和广泛耐药 (Extensively drug resistance) 菌株的出现, 结核病的防控形势日益严峻。碳源代谢被认为是结核分枝杆菌能够在宿主体内复制及持续性感染的重要决定因素之一^[2-3], 因此, 对结核分枝杆菌代谢通路的研究, 将有助于我们深入理解结核的致病过程, 并进一步指导新的抗结核药物研发。

在宿主体内, 结核分枝杆菌主要以脂肪酸作为碳源提供生长所需的能量^[2-3]。当细菌以脂肪酸作为唯一碳源时, 为了避免在三羧酸循环的氧化反应中产生 CO₂ 造成碳源的流失, 通常会通过乙醛酸途

径来进行代谢, 即由异柠檬酸直接裂解形成乙醛酸和琥珀酸, 这个过程由异柠檬酸裂解酶 (isocitratelase, ICL) 来催化完成。在结核分枝杆菌中, 由 *icl1* 和 *icl2* 两个基因编码 ICL, 研究表明, 缺失了 *icl1* 及 *icl2* 的结核分枝杆菌无法依赖脂肪酸生长; 在小鼠的感染模型中, 该突变株也被快速清除^[4]。同时, 结核分枝杆菌中的 ICL 还具有甲基异柠檬酸裂解酶的功能 (methylisocitratelase, MCL), 可催化丙酰辅酶 A 生成丙酮酸^[5-6]。奇数链脂肪酸可通过 β 氧化产生丙酰辅酶 A, 当细菌缺少甲基异柠檬酸裂解酶活性时, 无法完全代谢丙酰辅酶 A, 从而造成该毒性中间体的堆积, 因此, 结核分枝杆菌 *icl* 突变株在小鼠体内毒力减弱, 可能是糖异生和脂肪酸代谢缺陷以及丙酰辅酶 A 堆积共同作用引起的^[7]。此外, Joeli Marrero 等发现在结核分枝杆菌中 *pckA* 基因——编码糖异生过程中的第一个关键酶

基金项目: 国家自然科学基金 (81271790, 81201256); 复旦大学本科生学术研究资助计划 (FDUROP 09023)

* 通信作者。Tel: +86-21-54237195; E-mail: chniu@fudan.edu.cn

作者简介: 王歆玮 (1988 -), 女, 上海市人, 硕士研究生, 主要从事病原微生物的细菌学研究。

收稿日期: 2013-05-14; **修回日期:** 2013-10-14

磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶 (Phosphoenolpyruvate carboxykinase, PEPCK), 是细菌以脂肪酸为唯一碳源进行体外生长时所必需的, 且 $\Delta pckA$ 无法在巨噬细胞及小鼠体内生长, 而在持续性感染过程中, 一旦 $pckA$ 基因被抑制, 细菌即被快速清除^[8]。另外, Rubin 等通过随机插入突变库发现了结核分枝杆菌中, 多个与脂肪酸降解及乙醛酸途径相关的基因是细菌在宿主体内生长必需的^[9]。上述的多项研究都提示了脂肪酸代谢及糖异生通路在结核分枝杆菌致病中的关键作用。

由此, 在糖异生通路中的另一个关键酶——果糖 1, 6-二磷酸酶 (fructose 1, 6-bisphosphatase, FBPase) 引起了我们的关注。FBPase 催化 1, 6-二磷酸果糖生成 6-磷酸果糖这一不可逆反应。在大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 中, 存在两类 FBPase, I 型 FBPase 由 fbp 基因编码, 在大肠杆菌中起主要作用^[10]; II 型由 $glpX$ 基因编码, 该基因是甘油三磷酸调节子的重要组成部分, 当其突变后, 细菌不能在以甘油为唯一碳源的培养基中生长^[11]。在结核分枝杆菌 H37Rv 中, 不存在 fbp 的同源基因, 但存在 $glpX$ 的同源基因—— $Rv1099c$, 两者氨基酸序列一致性达 43%。F. Movahedzadeh 等发现在大肠杆菌 fbp 和 $glpX$ 双突变株中异源表达 $Rv1099c$ 后, 突变株在甘油上的生长能力得以回复, 并通过酶活实验验证了 $Rv1099c$ 具有 FBPase 的酶活性^[12]。此外, TraSH (Transposon Site Hybridization) 实验预测 $Rv1099c$ 是体内必需基因^[9], 提示该基因可能参与结核分枝杆菌的致病过程。但是, 对于它在结核分枝杆菌生理代谢及致病过程中的作用仍然所知有限。

由于结核分枝杆菌生长缓慢且致病性强, 虽然常规检测无需在三级生物安全 (BSL-3) 实验室操作, 但对其进行基础研究涉及大量培养时需在 BSL-3 实验室进行, 长期以来的研究进展相对缓慢。因此, 人们常以快速生长的耻垢分枝杆菌作为研究结核分枝杆菌的模式菌。通过 Blast 比对, 我们发现 $Rv1099c$ 在耻垢分枝杆菌 (*Mycobacterium smegmatis*) 中的同源基因是 MSMEG_5239, 蛋白质同源性为 86%。在本研究中, 我们利用基于分枝杆菌噬菌体 Che9c 的重组系统, 构建了耻垢分枝杆菌 $glpX$ (MSMEG_5239) 敲除突变株。我们发现耻垢分枝杆菌 $glpX$ 突变株在以甘油及脂肪酸 (油酸) 为唯一碳源培养条件下无法生长, 且野生株 $glpX$ 基因在以脂

肪酸为唯一碳源的培养基中表达上调。这些结果提示 $glpX$ 基因编码分枝杆菌糖异生途径所必需的和非冗余的 FBPase。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒: 本研究所用耻垢分枝杆菌为 mc²155, 大肠杆菌为 DH5 α 。质粒 pMD18T (购于大连 TaKaRa 公司) 用于 TA 克隆; hyg 基因片段从质粒 pHINT1 (含潮霉素 B 抗性基因, hyg) 上酶切获得; 质粒 pJV53 (含卡那霉素抗性基因, 由 University of Pittsburgh 的 Hatfull GF 教授馈赠) 用于耻垢分枝杆菌 $glpX$ 突变株构建; 质粒 pMV306 (含庆大霉素抗性基因, 由 Imperial College London 的 Young D 教授馈赠) 用于 $\Delta glpX::pMSglpX$ 互补菌株构建。

1.1.2 主要试剂和仪器: 大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5 α 、质粒小量提取试剂盒及 PCR MasterMix 均购自天根生化有限公司。SYBR[®] Premix Ex Taq 及反转录试剂盒购于 TaKaRa 公司。主要仪器包括 UV-2600 型紫外可见分光光度计 (UNICO 公司) 及 CFX96 Real-Time System (Bio-Rad 公司)。

1.2 细菌培养

大肠杆菌培养基为 LB 培养基, 37 $^{\circ}$ C 培养。耻垢分枝杆菌培养基为 7H9 (甘油/吐温 80/OADC) 液体培养基和 7H10 (甘油/OADC) 固体培养基, 或 LB 培养基, 37 $^{\circ}$ C 培养。筛选用抗生素浓度: 潮霉素 B (Hygromycin B, 大肠分枝杆菌 200 μ g/mL, 耻垢分枝杆菌 50 μ g/mL); 卡那霉素 (Kanamycin, 40 μ g/mL); 氨苄西林 (Ampicillin, 100 μ g/mL); 庆大霉素 (Gentamycin 大肠分枝杆菌 20 μ g/mL, 耻垢分枝杆菌 5 μ g/mL)。

1.3 耻垢分枝杆菌 $glpX$ 基因敲除突变株构建

本方法为基于分枝杆菌噬菌体 Che9c 重组系统的同源重组, 用于耻垢分枝杆菌基因敲除^[13-16]。

1.3.1 制备基因工程重组菌株: 将质粒 pJV53 电转化入耻垢分枝杆菌感受态细胞, 电击参数为电压 2.5 kv, 电阻 100 Ω , 电容 25 μ F, 使用 0.2 cm 电击杯。电击后, 立即加入 1 mL 7H9, 37 $^{\circ}$ C 振荡培养 2 h, 涂布于 7H10 (Kan/OADC) 抗性平板上。

1.3.2 制备重组工程菌株感受态细胞: 将新鲜菌液接种于 100 mL 的 7H9 (Kan/吐温 80/琥珀酸盐) 培养

基中, 37℃ 过夜培养至 $OD_{600} = 0.4$, 加入乙酰胺 (终浓度为 0.2%), 继续 37℃ 培养 3 h, 置于冰上 0.5 - 2 h, 4℃, 5000 × g 离心 10 min, 用 10% 甘油洗 3 次, 最后重悬于 4 mL 10% 甘油, 100 μL 每管分装, -80℃ 保存。

1.3.3 构建等位交换底物 (allelic exchange substrate, AES): 用引物 MS*glpX* KO Fw/MS*glpX* KO Rv (表 1) 扩增耻垢分枝杆菌 *glpX* 基因及其两端各约 1kb 同源臂, 纯化后, 连入 pMD18T 载体中, 连接产物转化大肠杆菌 DH5α 并抽提质粒, 经过鉴定正确后, 利用 *AgeI/BamHI* 酶切去除部分 *glpX* 基因片段, 胶回收长片段, 并将由质粒 pHINT1 上酶切获得的 *hyg* 基因片段连入其中, 将重组质粒用 *SpeI/XbaI* 酶切获得 AES 片段。

表 1. 引物名称和序列

Table 1. Primers used in this study

primer	sequence (5'→3')	restriction site
MS <i>glpX</i> KO Fw	GGACTAGTCAGGCCTTCACGAT CACCC	<i>SpeI</i>
MS <i>glpX</i> KO Rv	GCTCTAGAGACAGCAACGTGAA CGAC	<i>XbaI</i>
MS <i>glpX</i> CO Fw	GGAATTCCGGCTCATGTACATGC CGCTGG	<i>EcoRI</i>
MS <i>glpX</i> CO Rv	GCTCTAGAGTTACGGCAGGGG ATAGCCG	<i>XbaI</i>
MS <i>glpX</i> _RTFw	GGGTGAGAACGTGTTCTTCTG	
MS <i>glpX</i> _RTRv	TGGTAGGCCTCGATCATCC	
<i>sigA</i> RT Fw	GAAAAACCACCTGCTGGAAG	
<i>sigA</i> RT Rv	CGCGTAGGTGGAGAACTTGT	

1.3.4 基因敲除: 将 100 ng AES 电转化入 100 μL 基因工程重组菌株感受态细胞, 37℃ 振荡培养 4 h, 然后将转化产物涂布于 7H10 平板 (Hyg/OADC), 37℃ 培养 3 - 5 d 后, 挑取单克隆进行菌落 PCR 验证, 即得到 Δ*glpX* 突变株。

1.4 检测不同碳源条件下细菌生长情况

1.4.1 甘油: 将 WT、Δ*glpX* 及互补株 Δ*glpX*::pMS*glpX* 于 7H9 培养基中, 37℃ 培养至对数生长期, 8000 × g 离心收集菌液, 重悬于去离子水中, 重复一次, 然后取 10 μL 菌液分别涂布于含或不含 OADC 的 7H10 (含甘油) 平板上。

1.4.2 脂肪酸 (油酸): 将 WT、Δ*glpX* 及互补株 Δ*glpX*::pMS*glpX* 于 7H9 培养基中, 37℃ 培养至对数生长期, 8000 × g 离心收集菌液, 重悬于无碳 Sauton 培养基中, 重复 1 次, 然后将菌液分别转接于含有

0.5% 葡萄糖或 0.5% 脂肪酸 (油酸) 的 Sauton 培养基中, 调起始 OD_{600} 至 0.01, 37℃ 振荡培养, 期间连续测量 OD_{600} , 直至细菌进入静止期, 绘制生长曲线。

1.5 体外压力实验

1.5.1 过氧化氢 (H₂O₂): 细菌于 LB 中培养至对数生长期 ($OD_{600} \approx 1.0$), 离心收集细菌, 并用玻璃珠震荡打散成单细菌, 去离子水洗涤两次后, 调 OD_{600} 至 0.3, 以终浓度为 5 mmol/L 的 H₂O₂ 处理 1 h, 同时设置未处理对照组, 细菌进行铺板计数, 比较 WT 及突变株对 H₂O₂ 的敏感性。

1.5.2 十二烷基硫酸钠 (SDS): 将上述单细菌调 OD_{600} 至 0.1, 倍比稀释至 OD_{600} 分别为 0.01、0.001、0.0001, 分别吸取 5 μL 菌液悬滴于含有 0.01% SDS 的 LB 平板上, 风干后, 于 37℃ 静置培养 3 - 5 d, 观察菌落形态。

1.6 荧光实时定量 PCR

将 WT 分别在含 0.5% 葡萄糖或 0.5% 油酸的 7H9 (不含甘油) 培养基中培养至对数生长期, 收集菌液, 抽提 RNA 并逆转录为 cDNA, 进行荧光实时定量 PCR 反应, 以 *sigA* 作为内参, 检测 *glpX* 相对表达量, 反应过程为: 95℃ 30 s; 95℃ 5 s, 59℃ 34 s, 40 个循环。

2 结果

2.1 分枝杆菌 *GlpX* 对不同碳源的利用能力

为了研究分枝杆菌 *glpX* 基因在碳源代谢中的相关功能, 我们首先利用基于分枝杆菌噬菌体 Che9c 重组酶 gp60、gp61 的重组系统构建了耻垢分枝杆菌的 *glpX* 突变株^[13-16]。然后, 通过体外培养的方法, 比较了野生型菌株及 *glpX* 突变株在不同成分培养基中的生长情况。结果显示 (图 1), 在含有丰富培养基的固体平板上, 野生株及 *glpX* 突变株生长无差异, 而在以甘油为唯一碳源的固体平板上, 突变株的生长受到明显抑制; 此外, 在以葡萄糖为唯一碳源的液体培养基中, 野生株和 *glpX* 突变株生长曲线没有显著差异; 而在以脂肪酸为唯一碳源的培养基中, 野生株可以生长, 突变株几乎不生长。在 *glpX* 突变株中互补该蛋白, 均与野生株的生长状况相仿。上述结果表明, *glpX* 是分枝杆菌在以甘油或脂肪酸为唯一碳源进行体外生长的必需基因。

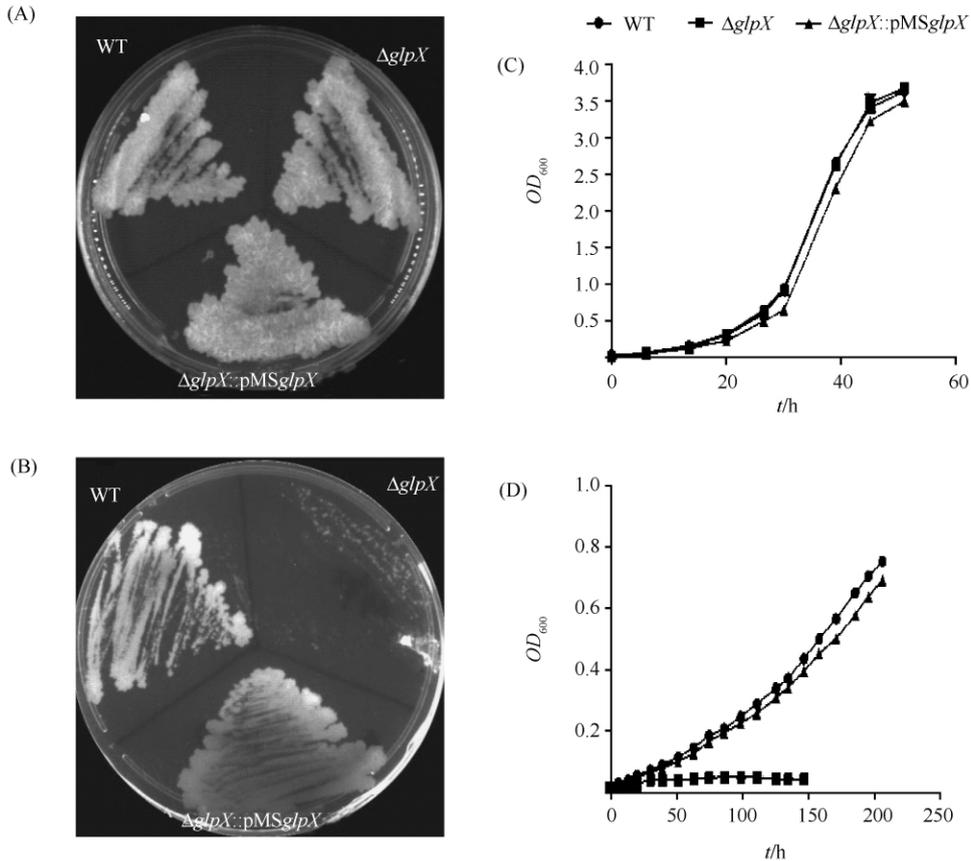


图 1. 细菌在不同碳源培养基中的生长情况

Figure 1. The growth of bacteria in medium with different carbon source. A: The growth of *M. smegmatis* wt, $\Delta glpX$ and $\Delta glpX::pMSglpX$ on 7H10 + OADC with 0.5% glycerol; B: The growth of *M. smegmatis* wt, $\Delta glpX$ and $\Delta glpX::pMSglpX$ on 7H10 with 0.5% glycerol, but without OADC; C: The growth curve of bacteria in medium with glucose as the sole carbon source; D: The growth curve of bacteria in medium with oleic acid as the sole carbon source.

2.2 分枝杆菌 *glpX* 突变株对体外环境压力的敏感性

结核分枝杆菌在侵入宿主体内后,会被以巨噬细胞为主的固有免疫细胞吞噬,并通过吞噬体和溶酶体的融合形成吞噬溶酶体来制造过诸如酸性、一氧化氮、氧化物等压力环境杀死细菌。因此我们通过体外模拟可能的环境压力,以探索 GlpX 蛋白是否在抵御这些环境压力过程中起作用。

我们首先检测了细菌在经 H_2O_2 处理后的生存能力。如图 2-B 所示, *glpX* 突变株在经 5 mmol/L H_2O_2 处理 1 h 后的生存能力较之于野生株并没有显著差异。同时,我们也检测了细菌对细胞壁裂解剂 SDS 的敏感性。如图 2-A 所示,在含或不含 SDS 的 7H10-OADC 平板上,野生型菌株和 *glpX* 突变株形成的菌落形态均没有显著差异。上述结果说明 GlpX 蛋白的失活引起的糖异生作用缺陷,可能并不

影响细菌对上述环境压力的反应能力。但需要说明的是,因为 *glpX* 突变株的生长缺陷,压力实验只能在丰富培养基中进行;因此,所得的结果只能反映在丰富培养基中的情形。

2.3 分枝杆菌 *glpX* 基因表达水平

之前,我们已通过体外培养,发现了 *glpX* 基因突变引起细菌在以脂肪酸为唯一碳源培养下的生长缺陷。此外,大量研究已表明脂肪酸是细菌在宿主体内生长的主要碳源物质。因此,为了进一步揭示 *glpX* 基因在脂肪酸代谢中的重要性,我们通过 real-time PCR 比较了在以葡萄糖或脂肪酸为唯一碳源的培养条件下, *glpX* 基因转录水平上的表达情况。结果显示(图 3),对数生长期,细菌在以脂肪酸为唯一碳源的培养条件下, *glpX* 基因表达水平较以葡萄糖为唯一碳源培养下,上调约 2.16 倍 ($P < 0.05$),提示细菌在脂肪酸代谢过程中通过上调 *glpX* 基因

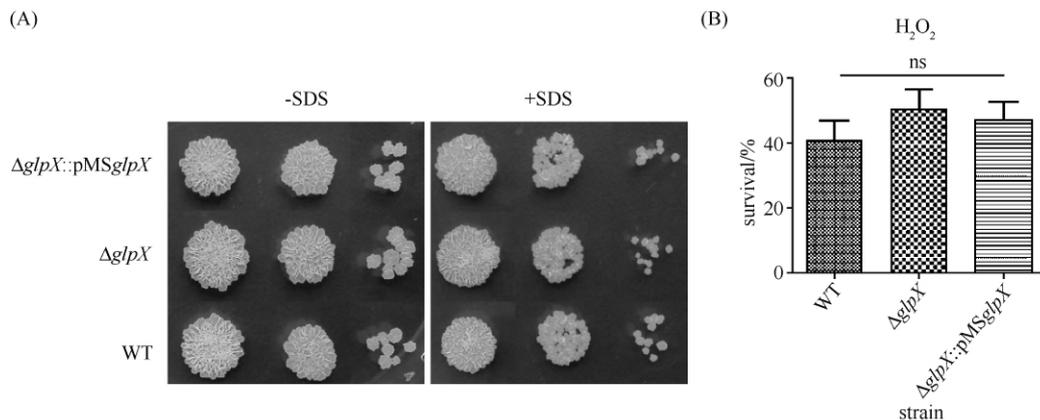


图 2. 细菌对压力环境的敏感性

Figure 2. The sensitivity of bacteria to stress in vitro. A: The growth of *M. smegmatis*wt, $\Delta glpX$ and $\Delta glpX::pMSglpX$ on 7H10 + OADC agar with or without 0.01% SDS. 5 μ L of bacteria at $OD_{600} = 0.02$, 0.002 and 0.0002 were spotted on 7H10 agar respectively. Growth was visualized after incubation for 3 – 4 days; B: Survival of *M. smegmatis*wt, $\Delta glpX$ and $\Delta glpX::pMSglpX$ after exposure to H_2O_2 . Aliquots (1 mL) of cultures at OD_{600} of 0.3 were exposed to PBS (control) or 5 mmol/L H_2O_2 for 1 h at 37°C. The cultures were serially diluted and plated onto 7H10 + OADC plates and the colonies counted after 3 – 4 days of incubation at 37°C. ns, $P > 0.05$, no significant difference.

使细菌得以更好的存活。

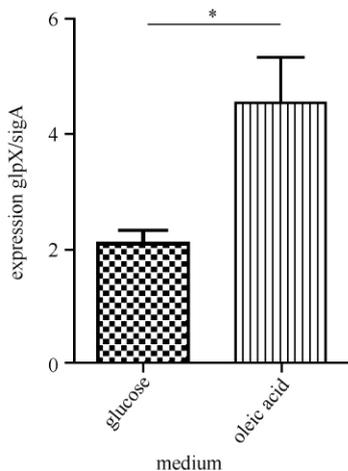


图 3. 耻垢分枝杆菌 *glpX* 基因表达水平

Figure 3. The expression of *M. smegmatis glpX*. The wild type of *M. smegmatis* was respectively cultured in 7H9 + 0.5% glucose or 7H9 + 0.5% oleic acid and incubated at 37°C until log phase. Quantitative realtime PCR analysis of *glpX* in *smegmatis* was carried out. The expression of *glpX* was normalized to the level of *sigA*. * $P < 0.05$.

3 讨论

分枝杆菌可以利用多种不同的碳源底物, 经由多条代谢途径进行碳源代谢, 包括三羧酸循环、糖异生途径、乙醛酸循环以及甲基柠檬酸循环等。针对

结核分枝杆菌异柠檬酸裂解酶 ICL 的相关研究已发现脂肪酸是结核分枝杆菌在感染过程中利用的重要碳源及能量物质。在脂肪酸代谢过程中, 细菌主要通过激活 ICL 蛋白介导的乙醛酸途径直接合成乙醛酸和琥珀酸, 然后进入糖异生通路获得细菌生长所需的糖类及能量物质^[2-3]。类似于乙醛酸途径, 对于大多数细菌来说, 在含有碳水化合物(如葡萄糖、蔗糖、淀粉)的培养基中, 糖异生作用并不是生物合成的必需通路, 但却是脂肪酸代谢所必需的。

FBPase 是除磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶 PEPCK 以外, 另一个介导糖异生途径中不可逆反应的关键酶——催化 1, 6-二磷酸果糖生成 6-磷酸果糖。分枝杆菌在以糖异生底物如脂肪酸或甘油为碳源生长过程中需要 FBPase 来提供己糖, 进而合成细胞壁的重要组成部分多聚糖及甘露糖脂质。FBPase 和肌醇单磷酸酶 IMPase 均属于糖磷酸酶超家族 (sugar phosphatase superfamily), IV 型 FBPase 同时具有两种酶的保守序列^[17]。在结核分枝杆菌中, 该超家族成员包括 *impA*、*suhB*、*impC*、*cysQ* (Rv2131c) 和 Rv1099c 基因。F. Movahedzadeh 等通过在大肠杆菌中异源表达 Rv1099c, 发现其具有 II 型 FBPase 活性^[12]; 而对 Rv2131c 的相关研究则发现其具有 IMPase 和 FBPase 双重活性, 因此被认为可能属于 IV 型 FBPase^[18]。我们的实验显示在以甘油或脂肪酸为唯一碳源的培养基中, *glpX* 突变株不能生长,

这一结果无疑说明了 *glpX* 基因编码分枝杆菌最主要的FBPase,其他基因不能补偿 *glpX* 基因的功能。

由于过去的研究发现,在耻垢分枝杆菌中,由FBPase介导的不可逆反应的下游通路上所形成的6-磷酸葡萄糖,具有依赖于Fgd的抗氧化应激作用^[19]。因此,我们猜测FBPase作为糖异生途径中形成6-磷酸葡萄糖不可或缺的关键酶,可能在抗氧化应激中也起到了一定的作用。此外,由于糖异生途径形成的多聚糖是细胞壁的重要组分,因此FBPase的失活很可能会改变细胞壁的复杂结构。有鉴于此,我们进行了H₂O₂和细胞壁裂解剂SDS的体外压力测试,但是结果显示,*glpX*缺失不影响细菌对H₂O₂及SDS的敏感性。考虑到*glpX*突变株仅在含有糖类的培养基中才能生长,因此上述实验不得不在丰富培养基中进行,这可能在很大程度上掩盖了*glpX*基因缺失引起的表型差异。

此外,对结核分枝杆菌PEPCK蛋白编码基因

*pckA*的研究发现,该基因是细菌在巨噬细胞及小鼠体内生长所必需的,并且在持续性感染过程中,一旦*pckA*基因被抑制,细菌即被快速清除^[8];同时,TraSH结果提示在*Rv1099c*可能是体内必需基因。基于上述两点,分枝杆菌*glpX*基因很可能在体内生长及持续性感染过程中都起到了重要作用。但是,由于耻垢分枝杆菌作为一种非致病性分枝杆菌,在细胞及动物模型的相关研究中具有很大的局限性,故此研究中未进行毒力检测。但在将来的工作中,我们可考虑在致病性分枝杆菌中敲除*glpX*基因,以研究其在结核菌感染宿主致病过程中的作用。

综上所述,我们通过在耻垢分枝杆菌中构建*glpX*敲除株,发现其在以甘油及脂肪酸为唯一碳源培养条件下的生长缺陷,提示由*glpX*基因编码的FBPase是分枝杆菌糖异生途径所必需的。本研究结果提示了*glpX*基因是一个潜在的抗结核药物的新靶。

参考文献

[1] Dye C, Williams BG. The population dynamics and control of tuberculosis. *Science*, 2010, 328 (5980): 856-861.

[2] Boshoff HI, Barry CE. Tuberculosis - metabolism and respiration in the absence of growth. *Nature Reviews Microbiology*, 2005, 3 (1): 70-80.

[3] Munoz-Elias EJ, McKinney JD. Carbon metabolism of intracellular bacteria. *Cellular Microbiology*, 2006, 8 (1): 10-22.

[4] Munoz-Elias EJ, McKinney JD. *Mycobacterium tuberculosis* isocitrate lyases 1 and 2 are jointly required for in vivo growth and virulence. *Nature Medicine*, 2005, 11 (6): 638-644.

[5] Gould TA, van de Langemheen H, Munoz-Elias EJ, McKinney JD, Sacchettini JC. Dual role of isocitrate lyase 1 in the glyoxylate and methylcitrate cycles in *Mycobacterium tuberculosis*. *Molecular Microbiology*, 2006, 61 (4): 940-947.

[6] Munoz-Elias EJ, Upton AM, Cherian J, McKinney JD. Role of the methylcitrate cycle in *Mycobacterium tuberculosis* metabolism, intracellular growth, and virulence. *Molecular Microbiology*, 2006, 60 (5): 1109-1122.

[7] Upton AM, McKinney JD. Role of the methylcitrate cycle in propionate metabolism and detoxification in *Mycobacterium Smegmatis*. *Microbiology*, 2007, 153 (Pt 12): 3973-3982.

[8] Marrero J, Rhee KY, Schnappinger D, Pethe K, Ehrt S. Gluconeogenic carbon flow of tricarboxylic acid cycle intermediates is critical for *Mycobacterium tuberculosis* to establish and maintain infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2010, 107 (21): 9819-9824.

[9] Sassetti CM, Rubin EJ. Genetic requirements for mycobacterial survival during infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2003, 100 (22): 12989-12994.

[10] Sedivy JM, Daldal F, Fraenkel DG. Fructose bisphosphatase of *Escherichia coli*: cloning of the structural gene (*fbp*) and preparation of a chromosomal deletion. *Journal of Bacteriology*, 1984, 158 (3): 1048-1053.

[11] Donahue JL, Bownas JL, Niehaus WG, Larson TJ. Purification and characterization of *glpX*-encoded fructose 1, 6-bisphosphatase, a new enzyme of the glycerol 3-phosphate regulon of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 2000, 182 (19): 5624-5627.

[12] Movahedzadeh F, Rison SC, Wheeler PR, Kendall SL, Larson TJ, Stoker NG. The *Mycobacterium tuberculosis* *Rv1099c* gene encodes a GlpX-like class II fructose 1,6-bisphosphatase. *Microbiology*, 2004, 150 (Pt 10): 3499-3505.

- [13] Zhao L, Xia Q, Zhao X, Wan K. Knocking TAP tag in the genome of *Mycobacterium smegmatis* mc² 155 by the recombineering system in *Mycobacterium*. *Chinese Journal of Zoonoses*, 2011, 27 (6) : 539-546. (in Chinese)
赵丽丽, 夏强, 赵秀芹, 万康林. 利用分枝杆菌的重组工程系统将 TAP 标签敲入耻垢分枝杆菌的方法研究. 中国人兽共患病学报, 2011, 27 (6) : 539-546.
- [14] van Kessel JC, Hatfull GF. Recombineering in *Mycobacterium tuberculosis*. *Nature Methods*, 2007, 4 (2) : 147-152.
- [15] van Kessel JC, Marinelli LJ, Hatfull GF. Recombineering mycobacteria and their phages. *Nature Reviews Microbiology*, 2008, 6 (11) : 851-857.
- [16] Fan X, Xie J. Recombineering based on mycobacteriophage and its application. *China Biotechnology*, 32 (9) : 101-106. (in Chinese)
樊祥宇, 谢建平. 分枝杆菌噬菌体重组系统及其应用. 中国生物工程杂志, 2012, 32 (9) : 101-106.
- [17] Rittmann D, Schaffer S, Wendisch VF, Sahm H. Fructose-1, 6-bisphosphatase from *Corynebacterium glutamicum*: expression and deletion of the *fbp* gene and biochemical characterization of the enzyme. *Archives of Microbiology*, 2003, 180 (4) : 285-292.
- [18] Gu X, Chen M, Shen H, Jiang X, Huang Y, Wang H. Rv2131c gene product: an unconventional enzyme that is both inositol monophosphatase and fructose-1, 6-bisphosphatase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2006, 339 (3) : 897-904.
- [19] Hasan MR, Rahman M, Jaques S, Purwantini E, Daniels L. Glucose 6-phosphate accumulation in mycobacteria: implications for a novel F420-dependent anti-oxidant defense system. *The Journal of Biological Chemistry*, 2010, 285 (25) : 19135-19144.

Gene function of *glpX* in mycobacterium

Xinwei Wang, Daoyuan Ren, Qian Gao, Chen Niu*

MOE & MOH Key Laboratory of Medical Molecular Virology, Shanghai Medical College, Fudan University, Shanghai 200032, China

Abstract: [Objective] To investigate the function of *glpX* gene in mycobacterial physiology and metabolism. [Methods] The *glpX* mutant of *Mycobacterium smegmatis* was constructed by using mycobacteriophage Che9c-encoded recombination system. Then the growth difference between mutant and wild type strain was compared on various carbon sources. Furthermore, we analyzed the *glpX* gene transcriptional level of wild type strain growing on glucose or oleic acid by real-time PCR. [Results] The growth of *M. smegmatis* on glycerol or oleic acid is strongly attenuated after the deletion of the *glpX* gene. The transcription of *glpX* gene is upregulated in the medium with oleic acid as the sole carbon source. [Conclusion] These results indicate that the fructose 1, 6-bisphosphatase encoded by *glpX* gene is required and nonredundant for mycobacterial gluconeogenesis.

Keywords: mycobacterium, *glpX* gene, FBPase, carbon metabolism, gluconeogenesis

(本文责编:王晋芳)