2025, 65(10): 4528-4536
CSTR: 32112.14.j.AMS.20250214
DOI: 10.13343/j.cnki.wsxb.20250214

微生物学报
Acta Microbiologica Sinica
http://journals.im.ac.cn/actamicrocn

Research Article 研究报告

副鸡禽杆菌 *TonB* 转座子插入突变株的生物学特性

范冰冰[1,2]，邵艳[2]，张权[2]，黎璐璐[2]，路静雯[3]，卢淑淇[2]，徐维维[2]，孙卫东[1*]，蒋蔚[2*]

1 南京农业大学 动物医学院，江苏 南京
2 中国农业科学院上海兽医研究所，上海
3 上海健康医学院，上海

范冰冰, 邵艳, 张权, 黎璐璐, 路静雯, 卢淑淇, 徐维维, 孙卫东, 蒋蔚. 副鸡禽杆菌 *TonB* 转座子插入突变株的生物学特性[J]. 微生物学报, 2025, 65(10): 4528-4536.
FAN Bingbing, SHAO Yan, ZHANG Quan, LI Lulu, LU Jingwen, LU Shuqi, XU Weiwei, SUN Weidong, JIANG Wei. Biological characteristics of the transposon insertion mutant of *TonB* in *Avibacterium paragallinarum*[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2025, 65(10): 4528-4536.

摘　要：【目的】探究生物被膜形成能力减弱的转座子插入突变株对副鸡禽杆菌生物学特性的调控作用。【方法】以野生株 JZIC-005 和转座子突变株 Tn-1504 (从突变库中筛选获得，生物被膜形成能力减弱)为研究对象，进行插入位点鉴定及生物学特性分析。【结果】PCR 验证显示转座子特异性插入副鸡禽杆菌 *TonB* 基因中。与野生株相比，突变株 Tn-1504 的增殖能力未发生显著改变(P>0.05)，但对 DF-1 细胞的黏附率降低 46.57%，侵袭率下降 77.61%，细胞毒性减弱 34.97%。上述表型差异均具有统计学意义(P<0.01)。【结论】本研究证实 *TonB* 基因失活可特异性削弱副鸡禽杆菌的宿主黏附、侵袭及毒性特征，为解析该病原致病机制及抗毒力策略开发提供了关键靶点。

关键词：副鸡禽杆菌；转座子；生物学特性；TonB

资助项目：国家重点研发计划(2023YFD1800602)；国家自然科学基金(32473039)
This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2023YFD1800602) and the National Natural Science Foundation of China (32473039).
*Corresponding authors. E-mail: JIANG Wei, jiangweijw99@163.com; SUN Weidong, swd100@njau.edu.cn
Received: 2025-03-18; Accepted: 2025-04-10; Published online: 2025-05-09

Biological characteristics of the transposon insertion mutant of *TonB* in *Avibacterium paragallinarum*

FAN Bingbing[1,2], SHAO Yan[2], ZHANG Quan[2], LI Lulu[2], LU Jingwen[3], LU Shuqi[2], XU Weiwei[2], SUN Weidong[1*], JIANG Wei[2*]

1 College of Veterinary Medicine, Nanjing Agricultural University, Nanjing, Jiangsu, China
2 Shanghai Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Shanghai, China
3 Shanghai University of Medicine & Health Sciences, Shanghai, China

Abstract: [Objective] To elucidate the virulence-associated biological characteristics of a transposon insertion mutant with impaired biofilm formation of *Avibacterium paragallinarum*. **[Methods]** The wild-type strain JZIC-005 and a biofilm-deficient mutant Tn-1504 (from a pre-established transposon mutant library) were selected for determination of insertion sites biological characterization. **[Results]** PCR results demonstrated site-specific transposon integration into *TonB* of *A*. *paragallinarum*. While mutant Tn-1504 exhibited no growth defects compared with the wild-type strain (P>0.05), it demonstrated reductions of 46.57% in adhesion to DF-1 cells and 77.61% in cellular invasion. Cytotoxicity assays revealed a 34.97% reduction of Tn-1504 in inducing host cell damage. All of the above phenotypic differences were statistically significant (P< 0.01). **[Conclusion]** We demonstrate that inactivation of *TonB* specifically impairs the adhesion, invasion, and virulence characteristics of *A*. *paragallinarum*, providing a key target for analyzing the pathogenic mechanism and developing anti-virulence strategies for this pathogen.

Keywords: *Avibacterium paragallinarum*; transposon; biological characteristics; TonB

副鸡禽杆菌(*Avibacterium paragallinarum*, Apg)属于巴氏杆菌科禽杆菌属，为革兰氏阴性短杆菌，是鸡传染性鼻炎(infectious coryza, IC)的病原体[1]。该病可导致肉鸡生长迟滞、蛋鸡产蛋率下降，造成严重经济损失。目前已鉴定Apg存在A、B、C三种血清型[2]，且不同血清型间交叉保护作用微弱。值得注意的是，我国近年IC发病率持续攀升，且流行血清型呈现动态变迁特征，显著增加了疫苗防控难度。尽管抗生素仍是养殖场的主要防控手段，但Apg耐药性的广泛出现已严重制约其应用效能。

生物被膜是细菌抵御环境胁迫的关键生存策略，由胞外多糖基质包裹的微生物聚集体构成，其三维结构包含蛋白质、DNA等多种组分[3]。这种特殊存在形态不仅阻碍抗生素渗透、降低细菌对抗菌药物的敏感性，还通过介导免疫逃逸机制促进持续性感染[4]。因此，解析生物被膜形成机制对突破现有防治瓶颈具有重要意义。

TonB蛋白是革兰氏阴性菌铁摄取系统的核心组分，通过质子动力势偶联驱动铁载体-受体复合物的跨膜转运[5]。众多革兰氏阴性致病菌通过TonB系统特异性摄取宿主铁离子等必需营养物质，从而在营养限制性环境中建立感染[6]。值得关注的是，生物被膜的形成涉及胞外多糖(exopoly saccharides, EPS)、菌毛和鞭毛的协同作用：铁离子可通过激活*pel*/*psl*等生物被膜相关基因促进EPS分泌，而铁限制环境则通过Fur调控子介导的全局性调控抑制胞外聚合物合成，最终导致被膜结构稳定性下降[7-8]。

转座子作为天然基因转移载体，其转座特

性为构建随机突变库提供了重要技术路径[9]。通过筛选表型变异株鉴定毒力/生物被膜相关基因已成为病原体致病机制研究的经典策略。例如，贺云霞等[10]通过 EZ-Tn5 转座子文库筛选副猪嗜血杆菌减毒株，系统阐明其毒力调控网络；Guo 等[11]从 Apg 突变库中鉴定出 17 个生物被膜相关基因，揭示了关键致病因子的作用机制。然而，目前针对 Apg 生物被膜形成基因的系统研究仍显不足。基于此，本研究选取前期构建的转座子突变库中筛选获得的生物被膜缺陷株，系统解析其生物学特性，以期为 Apg 防控提供创新理论依据。

1 材料与方法

1.1 菌株、质粒及主要试剂

副鸡禽杆菌血清 A 型 JZIC-005 株和转座子插入突变株 Tn-1504 均由本实验室保存；大肠杆菌 S17-1λpir (pEVS170)由美国佐治亚大学 Eric V. Stabb 教授惠赠，此大肠杆菌中携带的质粒 pEVS170 中含 mini-Tn5 转座子序列。

胰蛋白胨大豆肉汤(TSB)培养基、DMEM 培养基、CytoTox96®细胞毒性检测试剂盒，上海秋爽生物科技有限公司；普通鸡血清、Fetal Bovine Serum Gold 胎牛血清(特级)，上海彩朵生物技术有限公司；氧化型辅酶 I，生工生物工程(上海)股份有限公司；琼脂糖凝胶 DNA/PCR 产物小量回收试剂盒，上海蝉藤生物技术有限公司。

1.2 引物设计与合成

根据 NCBI 数据库中质粒 pEVS170 (GenBank 登录号为 MH370733.1)的基因序列，使用 Premier 5.0 和 SnapGene 软件设计突变株的鉴定引物，以及根据《鸡传染性鼻炎检疫技术规范》(SN/T 1556—2020)设计副鸡禽杆菌鉴定引物[12]，由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。引物序列见表 1。

1.3 突变株中转座子插入位点的鉴定

参考张小芸[13]的方法，确定突变株中转座子插入基因组中的位置。挑取生物被膜形成能力减弱的突变株 Tn-1504 的单克隆菌落，用水煮法提取其基因组，然后用 Apg-F 和 Apg-R 引物 PCR 检测副鸡禽杆菌的特异性基因 *HagA*。PCR 反应体系(20 μL)：2×*Taq* Master Mix 10 μL，上、下游引物(10 μmol/L)各 1 μL，DNA 模板 2 μL，ddH_2O 6 μL。PCR 反应条件：95 ℃预变性 5 min；95 ℃变性 30 s，55 ℃退火 30 s，72 ℃延伸 31 s，共 30 个循环；72 ℃终延伸 10 min。用 Erm-F 和 Erm-R 引物 PCR 检测转座子上 Erm 基因。PCR 反应体系(20 μL)：2×*Taq* Master Mix 10 μL，上、下游引物(10 μmol/L)各 1 μL，DNA 模板 2 μL，ddH_2O 6 μL。PCR 反应条件：95 ℃预变性 5 min；95 ℃变性 30 s，55 ℃退火 30 s，72 ℃延伸 29 s，共 30 个循环；72 ℃终延伸 10 min。然后采用热不对称 PCR (TAIL-PCR)法和 BLAST (https://blast.ncbi.nlm.nih. gov/Blast.cgi)来鉴定转座子 mini-Tn5 插入基因组中的位置，具体操作参考文献[13]完成。

1.4 生长曲线的测定

取新鲜培养的野生株和突变株菌液，分别按 1:10 的比例接种于含有 50 mL TSB 液体培养

表1 转座子插入鉴定的相关引物

Table 1 Primers related to transposon insertion identification

引物 Primers name	引物序列 Primer sequences (5′→3′)	PCR产物长度 Lenth of PCR products (bp)
Erm-F	GACGATATTCTCGATTGACC	484
Erm-R	TTAACGACGAAACTGGCTAA	
Apg-F	TGAGGGTAGTCTTGCACGCGAAT	510
Apg-R	CAAGGTATCGATCGTCTCTCTACT	

基的锥形瓶中，37 ℃、180 r/min 振荡培养。之后每 1 h 从锥形瓶中吸取 1 次样品，测定突变株 Tn-1504 和野生型菌株 JZIC-005 在不同培养时间的 OD_{600} 值，记录培养时间及相对应的 OD_{600} 值。以菌液 OD_{600} 值为纵坐标，以培养时间(t/h)为横坐标，绘制相应菌株的生长曲线。

1.5 细胞黏附试验

参照 Han 等[14]的方法进行试验。将 DF-1 细胞用含有 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基培养至 T75 细胞瓶中，待细胞长至 70%−90% 左右，用胰酶消化 DF-1 细胞吹匀铺于 24 孔细胞培养板中，置于 37 ℃、5% CO_2 培养箱中培养长至单层细胞。弃上清培养基，用 PBS 洗 3 次。将各菌株培养至对数生长期(OD_{600} 约为 0.2)，以 100:1 的感染复数(multiplicity of infection, MOI)对野生株和突变株进行稀释，加入 24 孔细胞培养板中并设置 3 个重复，置于 37 ℃、5% CO_2 培养箱中培养 2 h，弃上清，用 PBS 洗 3 次，向每孔加入 1 mL 0.5% 的 Triton X-100，反复吹打以使细胞充分裂解，将收集的 Triton X-100 稀释至 10^{-2} 后涂布于 TSA 培养基，置于 37 ℃、5% CO_2 培养箱中培养 18−24 h 后进行活菌计数。

1.6 细胞入侵试验

参考 Han 等[14]的方法进行试验。将 DF-1 细胞用 DMEM 完全培养基培养至 T75 细胞瓶中，待细胞长至 70%−90% 左右，用胰酶消化吹匀铺于 24 孔细胞培养板中，置于 37 ℃、5% CO_2 培养箱中培养长至单层细胞。弃上清培养基，用 PBS 洗 3 次。将各菌株培养至对数生长期，以感染率 MOI=100:1 对野生株和突变株进行稀释，加入 24 孔细胞培养板中，每个菌株设置 3 个重复，置于 37 ℃、5% CO_2 培养箱中培养 2 h，弃上清，用 PBS 洗 3 次，加入 500 μL 的 25 μg/mL 的庆大霉素抗生素孵育 1 h。向每孔加入 1 mL 0.5% 的 Triton X-100，反复吹打以使细胞充分裂解，将收集的 Triton X-100 倍比稀释后涂布于 TSA 培养基，置于 37 ℃、5% CO_2 培养箱中培养 18−24 h 后进行活菌计数。

1.7 细胞毒性试验

参考 Yu 等[15]的方法进行细胞毒性测定。将生长状况良好的 DF-1 细胞均匀铺于 96 孔细胞板中，置于 37 ℃、5% CO_2 培养箱中培养长至单层细胞。按照感染率 MOI=1 000:1 稀释各菌液，试验孔的每菌重复 4 个孔。为使细菌与细胞充分接触，将 96 孔细胞培养板在放入细胞培养箱中培养前进行 1 000 r/min 离心 5 min，而后孵育 4 h。靶细胞最大裂解孔在收上清前 45 min 加入靶细胞裂解液。按照 CytoTox96®细胞毒性检测试剂盒说明书检测细胞上清液中乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)的含量，以反映不同菌株对 DF-1 细胞毒性作用。

1.8 数据分析

利用 GraphPad Prism 9.5.0 软件进行统计学分析，数据采用 t-检验的方法分析菌株之间的平均差异。P<0.05 表示差异显著，P<0.01 表示差异极显著。

2 结果与分析

2.1 转座子插入 JZIC-005 株基因组中位置的鉴定

挑取生物被膜形成能力减弱的突变株 Tn-1504 的单克隆菌落，提取其基因组，通过 PCR 检测转座子是否插入以及转座子插入基因组中的位置。结果显示，突变株 Tn-1504 单克隆菌落经 PCR 检测扩增出了大小为 510 bp 左右的条带(图 1A)，符合副鸡禽杆菌 *HagA* 基因的大小，且也扩增出了大小为 484 bp 左右的条带(图 1B)，符合红霉素基因的大小。这表明转座子成功插入副鸡禽杆菌基因组中。热不对称 PCR 后将产物送至生工生物工程(上海)股份有限公司测序，测序结果经 NCBI 比对显示，突变株 Tn-1504 中转座子 mini-Tn5 插入副鸡禽杆菌的 *TonB* 基因中(图 1C)。

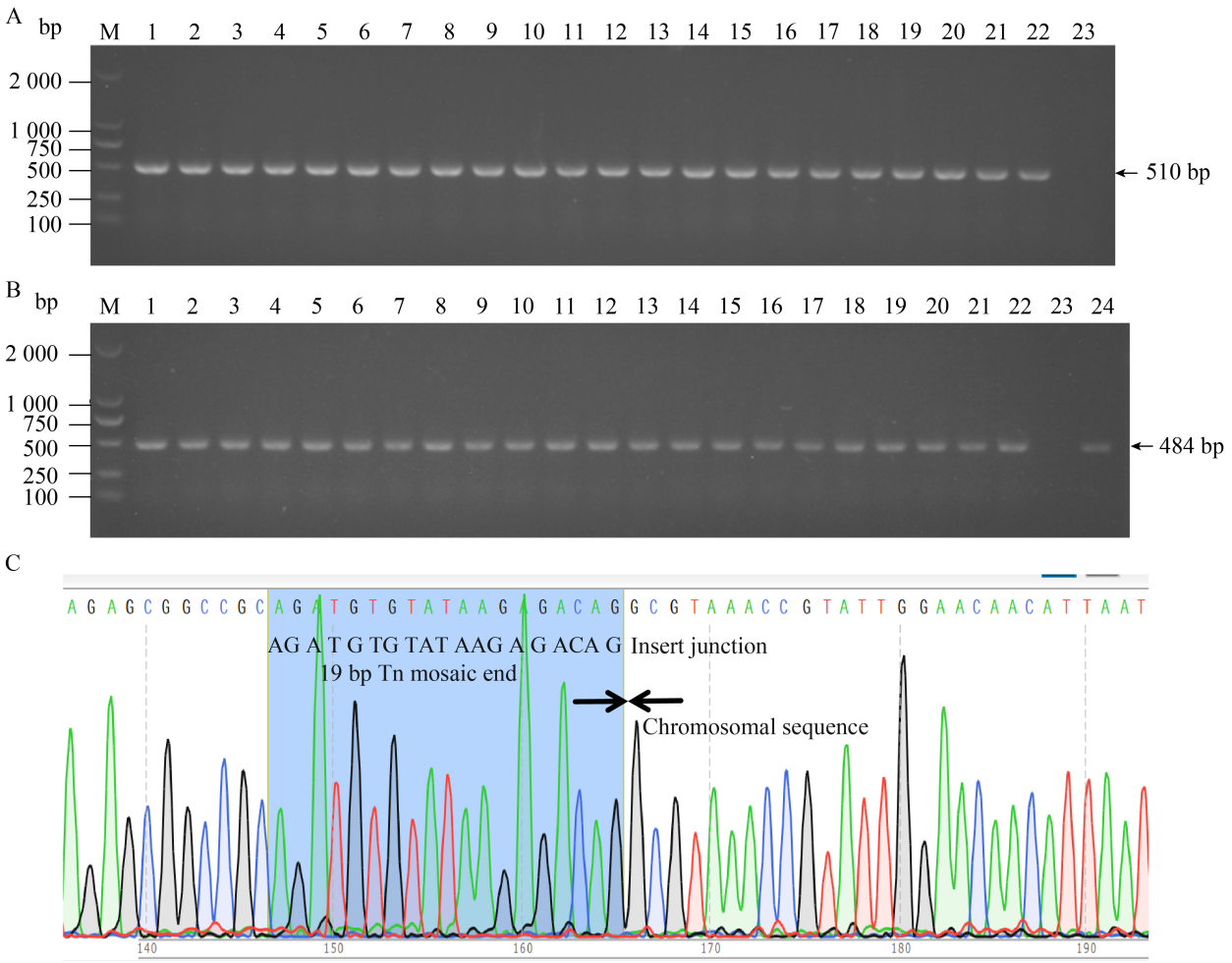

图1　转座子突变株及其插入位点的鉴定。A：副鸡禽杆菌*HagA*基因的PCR鉴定(泳道M：DNA相对分子量标准；泳道1−22：突变株Tn-1504的单克隆菌落；泳道23：阴性对照)；B：转座子Tn5中的红霉素基因的PCR鉴定(泳道M：DNA相对分子量标准；泳道1−22：突变株Tn-1504的单克隆菌落；泳道23：阴性对照；泳道24：阳性对照)；C：转座子插入位点测序结果(蓝色底纹的是转座子末端的19个碱基对，右边是插入的基因组序列，中间连接处是转座子插入位点)。

Figure 1　Identification of transposon mutant strains and insertion sites. A: PCR identification of the *HagA* gene of *Avibacterium paragallinarum* (Lane M: DNA marker; Lanes 1−22: Monoclonal colonies of mutant strain Tn-1504; Lane 23: Negative control); B: PCR identification of the erythromycin gene in transposon Tn5 (Lane M: DNA marker; Lanes 1−22: Monoclonal colonies of mutant strain Tn-1504; Lane 23: Negative control; Lane 24: Positive control); C: Transposon insertion site sequencing results (The 19 bp at the end of the transposon with blue background, the inserted genomic sequence is on the right, and the junction in the middle is the transposon insertion site).

2.2　生长曲线

为了评价 *TonB* 转座子插入突变株是否影响副鸡禽杆菌的生长速率，对野生株 JZIC-005 和突变株 Tn-1504 进行了连续 15 h 的 OD_{600} 值记录，并绘制其生长曲线。结果如图 2 所示，突变株 Tn-1504 的生长速度与野生菌株相比无明显

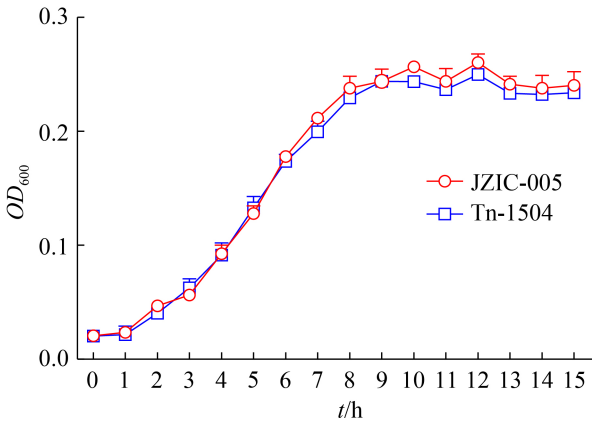

图2 野生株JZIC-005、突变株Tn-1504的生长曲线

Figure 2 Growth curves of wild strain JZIC-005 and mutant strain Tn-1504.

差异(P>0.05)。这表明转座子插入 *TonB* 基因后不影响副鸡禽杆菌的生长特性。

2.3 转座子插入 *TonB* 基因后对细胞黏附的影响

为了探索转座子插入 *TonB* 基因后是否影响副鸡禽杆菌对细胞的黏附性，测定了野生株 JZIC-005 和突变株 Tn-1504 对 DF-1 细胞的黏附数。如图 3 所示，JZIC-005 株与 Tn-1504 株对 DF-1 细胞的细菌黏附平均数分别为 10.2×10^4 CFU/孔和 5.45×10^4 CFU/孔。与野生株相比突变株 Tn-1504 对 DF-1 细胞的黏附率降低 46.57%，显著低于野生株(P<0.01)。这表明转座子插入 *TonB* 基因后影响副鸡禽杆菌的黏附能力。

2.4 转座子插入 *TonB* 基因后对细胞入侵的影响

为了探索转座子插入 *TonB* 基因后是否影响副鸡禽杆菌对细胞的入侵作用，测定了野生株 JZIC-005 和突变株 Tn-1504 对 DF-1 细胞的入侵数。如图 4 所示，JZIC-005 株与 Tn-1504 株对 DF-1 细胞的细菌入侵平均数分别为 335 CFU/孔和 75 CFU/孔。与野生株相比突变株 Tn-1504 对 DF-1 细胞的侵袭率下降 77.61%，显著低于野生株(P<0.01)。这表明转座子插入 *TonB* 基因后减弱了副鸡禽杆菌对细胞的入侵能力。

2.5 转座子插入 *TonB* 基因后对细胞毒性的影响

为进一步探索转座子插入 *TonB* 基因后是否影响副鸡禽杆菌对细胞的毒性作用，测定了野生株 JZIC-005 和突变株 Tn-1504 对 DF-1 细胞的毒性。如图 5 所示，JZIC-005 株与 Tn-1504 株

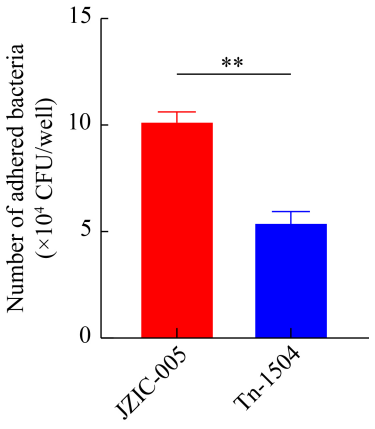

图3 JZIC-005和Tn-1504对鸡胚成纤维细胞DF-1的黏附能力

Figure 3 Adhesion capacity of JZIC-005 and Tn-1504 to chicken embryo fibroblast DF-1. **: P<0.01.

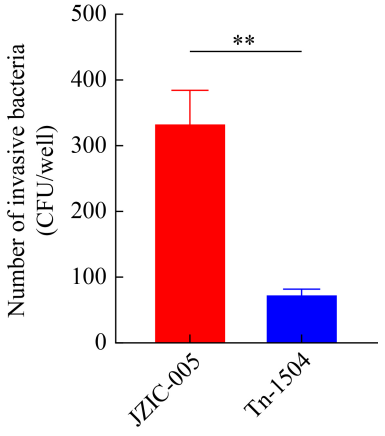

图4 JZIC-005和Tn-1504对鸡胚成纤维细胞DF-1的入侵能力

Figure 4 Invasion capacity of JZIC-005 and Tn-1504 to chicken embryo fibroblast DF-1. **: P<0.01.

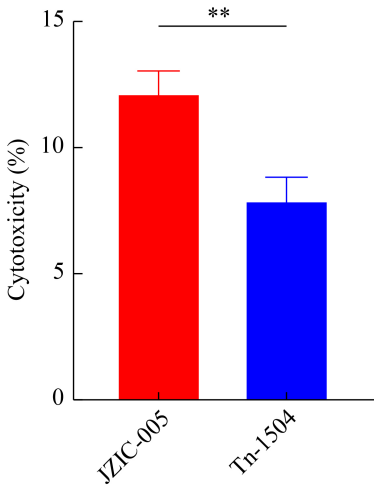

图5　JZIC-005和Tn-1504对鸡胚成纤维细胞DF-1的毒性

Figure 5　Toxicity of JZIC-005 and Tn-1504 to chicken embryo fibroblasts DF-1. **: P<0.01.

对 DF-1 细胞的平均细胞毒性分别为 12.17% 和 7.91%。与野生株相比，突变株 Tn-1504 的细胞毒性减弱 34.97%，显著低于野生株(P<0.01)。这表明转座子插入 *TonB* 基因后会引起副鸡禽杆菌毒力下降。

3　讨论与结论

鸡传染性鼻炎的流行及其防治过程中面临的挑战已对养禽业造成显著的经济损失。在本研究中，通过对前期构建的副鸡禽杆菌转座子突变库进行筛选，获得了一株生物被膜形成能力显著减弱的突变株。通过测序比对分析发现转座子插入至编码 TonB 蛋白的基因序列中。进一步的生物学特性研究表明，该突变株在生长特性方面与野生株未表现出显著差异，然而其对 DF-1 细胞的黏附与侵袭能力以及细胞毒性均呈现明显下降趋势。这些发现提示，*TonB* 基因位点的转座子插入可能通过干扰铁离子摄取系统、调控毒力因子表达网络以及影响细菌群体行为协调机制，进而重塑副鸡禽杆菌的环境适应能力与毒力调控体系。

值得注意的是，致病菌在宿主感染过程中对铁离子、血红素及维生素 B_{12} 等必需营养物质的获取是其成功定殖的关键前提[16]。本研究观察到 *TonB* 转座子插入突变株在 TSB 液体培养基中的生长速率与野生株相当，这可能表明：转座子插入并未破坏该基因维持细菌基础代谢的核心功能，或者存在其他替代性调控途径补偿了 *TonB* 基因的功能缺失。在黏附侵袭机制层面，细菌通常依赖表面黏附素(如菌毛、外膜蛋白)与铁载体系统的协同作用完成宿主识别过程。本研究中 *TonB* 转座子插入突变株黏附侵袭能力的显著降低，可能与铁离子浓度依赖性毒力因子(如 IV 型菌毛、OmpA 外膜蛋白等)的表达调控紊乱密切相关[17]。已有研究证实，TonB 依赖性受体系统不仅承担铁载体跨膜转运的生物学功能，还可直接介导病原体与宿主细胞表面的分子互作[18]。这一机制在大肠杆菌研究中得到有力佐证：*TonB3*/*TonB6* 双突变株由于无法有效识别宿主铁载体受体，完全丧失了在小鼠肠道的定殖能力[19]。此外，铁离子作为细菌毒素(如溶血素、蛋白酶等)生物合成的重要辅因子，其获取效率直接影响病原体的致病潜能。本研究中 *TonB* 突变株毒力减弱的现象与禽致病性大肠杆菌 *TonB* 基因敲除模型的研究结果高度一致[20]，其潜在机制可能涉及：*TonB* 基因失活导致细菌铁摄取系统功能障碍，引发铁限制应激反应，进而通过全局调控网络抑制铁依赖性毒力因子(如溶血素)的表达与活性，最终削弱病原体对宿主细胞的侵袭效力。

随着现代分子生物学技术的快速发展，转座子随机突变技术已成为解析病原微生物致病机制的重要工具。通过构建转座子突变库并筛选表型变异株，结合高通量测序技术，研究者可高效定位表型相关基因并阐释其功能。本研究正是基于该方法学优势，成功鉴定了 *TonB* 基因在副鸡禽杆菌致病过程中的关键调控作用。值得注意的是，该转座子突变株在保持正常生长能力的同时表现出定殖、侵袭和毒性特征的多维度衰减，这与“抗毒力策略”中削弱病原体

致病力而不影响其生存的核心理念高度契合。为进一步验证 *TonB* 基因的功能特异性，后续研究需构建精确的基因缺失株与回补株进行功能恢复试验，同时系统解析 TonB 与其他毒力调控通路(如群体感应系统、双组分信号转导系统)的交互网络，为开发靶向 TonB 系统的精准抗菌策略提供理论支撑。

综上所述，本研究明确了转座子插入 *TonB* 基因对副鸡禽杆菌致病特性的多维度影响：在维持基本生长特性的前提下，显著降低其对宿主细胞的黏附侵袭能力与毒性效应。这一发现不仅为深入解析 *TonB* 介导的致病机制提供了关键实验证据，同时为开发基于铁代谢干预和毒力因子调控的新型防控策略开辟了创新性研究方向。

作者贡献声明

范冰冰：参与设计，开展实验与数据分析，撰写和修改论文；邵艳：数据收集与监管；张权：数据分析；黎璐璐：执行调研；路静雯：验证，完成呈现；卢淑淇：提供技术支持、参与论文讨论；徐维维：审阅，参与论文讨论；孙卫东：指导研究，论文修改；蒋蔚：提供资金支持，设计、指导研究，论文修改。

作者利益冲突公开声明

作者声明不存在任何可能会影响本文所报告工作的已知经济利益或个人关系。

参考文献

[1] 武玲玲 . 鸡传染性鼻炎的临床症状与诊治进展[J]. 中国畜牧业, 2023(10): 115-116.
WU LL. Clinical symptoms and recent advances in diagnosis and treatment of infectious coryza in chickens[J]. China Animal Husbandry, 2023, (10): 115-116 (in Chinese).

[2] PAGE LA. *Haemophilus* infections in chickens. I. characteristics of 12 *Haemophilus* isolates recovered from diseased chickens[J]. American Journal of Veterinary Research, 1962, 23: 85-95.

[3] KILIC T, BALI EB. Biofilm control strategies in the light of biofilm-forming microorganisms[J]. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 2023, 39(5): 131.

[4] ARANSIOLA SA, SELVARAJ B, MADDELA NR. Bacterial biofilm formation and anti-biofilm strategies[J]. Research in Microbiology, 2024, 175(3): 104172.

[5] JASKULA JC, LETAIN TE, ROOF SK, SKARE JT, POSTLE K. Role of the TonB amino terminus in energy transduction between membranes[J]. Journal of Bacteriology, 1994, 176(8): 2326-2338.

[6] CHU BCH, PEACOCK RS, VOGEL HJ. Bioinformatic analysis of the TonB protein family[J]. Biometals, 2007, 20(3): 467-483.

[7] 宫金烁 . 维氏气单胞菌 TH0426 株 Fur 基因的缺失及其功能的初探[D]. 长春: 吉林农业大学, 2023.
GONG JS. Construction and characterization of Fur deleted mutant in *Aeromonas veronii* TH0426[D]. Changchun: Jilin Agricultural University, 2023 (in Chinese).

[8] GONG JS, WANG YD, JIANG YL, ZHANG D, CAI YN, SHAN XF, GONG H, DONG H. Ferric uptake regulator (*fur*) affects the pathogenicity of *Aeromonas veronii* TH0426 by regulating flagellar assembly and biofilm formation[J]. Aquaculture, 2024, 580: 740361.

[9] SCHMITZ M, QUERQUES I. DNA on the move: mechanisms, functions and applications of transposable elements[J]. FEBS Open Bio, 2024, 14(1): 13-22.

[10] 贺云霞, 徐慧, 叶飞, 孙慧玲, 王宏俊, 龚玉梅, 张莉, 黄秀芬, 张培君 . 副猪嗜血杆菌 EZ-Tn5 转座子插入突变体库的构建及减毒株的筛选[J]. 安徽农业科学, 2011, 39(13): 7820-7823, 7831.
HE YX, XU H, YE F, SUN HL, WANG HJ, GONG YM, ZHANG L, HUANG XF, ZHANG PJ. Construction of mutation library in *Haemophilus parasuis* by inserting Tn5 transposon and the screening of attenuated strain[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2011, 39(13): 7820-7823, 7831 (in Chinese).

[11] GUO MJ, WANG HN, ZHANG H, BO ZY, ZHANG CC, ZHANG XR, WU YT. Identifcation of the genes involved in biofilm formation of *Avibacterium paragallinarum* using random transposon mutagenesis[J]. Veterinary Microbiology, 2025, 302: 110410.

[12] 陶虹, 孙洁, 张彩虹 . 鸡传染性鼻炎检疫技术规范: SN/T 1556—2020[S]. 北京: 中国标准出版社, 2020.
TAO H, SUN J, ZHANG CH. Technical specification for quarantine of avian infectious coryza: SN/T 1556—2020[S]. Beijing: Standards Press of China, 2020 (in Chinese).

[13] 张小芸 . 副溶血弧菌运动性相关基因筛选及对其毒力影响的研究[D]. 上海: 中国农业科学院, 2023.
ZHANG XY. Screening and identification of motility-associated genes and analysis of their effects on its virulence of *Vibrio parahaemolyticus*[D]. Shanghai: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2023 (in Chinese).

[14] HAN XG, BAI H, LIU L, DONG HL, LIU R, SONG J, DING C, QI KZ, LIU HW, YU SQ. The *luxS* gene functions in the pathogenesis of avian pathogenic *Escherichia coli*[J]. Microbial Pathogenesis, 2013, 55: 21-27.

[15] YU HT, DING XL, SHANG LJ, ZENG XF, LIU HB, LI

N, HUANG S, WANG YM, WANG G, CAI S, CHEN MX, LEVESQUE CL, JOHNSTON LJ, QIAO SY. Protective ability of biogenic antimicrobial peptide microcin J25 against enterotoxigenic *Escherichia coli*-induced intestinal epithelial dysfunction and inflammatory responses IPEC-J2 cells[J]. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 2018, 8: 242.

[16] KEHL-FIE TE, SKAAR EP. Nutritional immunity beyond iron: a role for manganese and zinc[J]. Current Opinion in Chemical Biology, 2010, 14(2): 218-224.

[17] MOUMÈNE A, GONZALEZ-RIZZO S, LEFRANÇOIS T, VACHIÉRY N, MEYER DF. Iron starvation conditions upregulate *Ehrlichia ruminantium* type IV secretion system, *tr1* transcription factor and *map1* genes family through the master regulatory protein ErxR[J]. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 2018, 7: 535.

[18] HIGGS PI, LETAIN TE, MERRIAM KK, BURKE NS, PARK H, KANG C, POSTLE K. TonB interacts with nonreceptor proteins in the outer membrane of *Escherichia coli*[J]. Journal of Bacteriology, 2002, 184(6): 1640-1648.

[19] PARKER AC, SEALS NL, BACCANALE CL, ROCHA ER. Analysis of six *tonB* gene homologs in *Bacteroides fragilis* revealed that *tonB3* is essential for survival in experimental intestinal colonization and intra-abdominal infection[J]. Infection and Immunity, 2022, 90(1): e0046921.

[20] 孙晨明, 徐亚亚, 朱庭芳, 王梓霏, 袁华根. 禽致病性大肠杆菌 *tonB* 基因缺失株的构建及其生物学特性研究[J]. 中国家禽, 2023, 45(3): 120-124.
SUN CM, XU YY, ZHU TF, WANG ZF, YUAN HG. Study on characterization of the *tonB* mutant constructed in avian pathogenic *Escherichia coli*[J]. China Poultry, 2023, 45(3): 120-124 (in Chinese).