



鸭疫里氏杆菌 *B739_RS00825* 基因缺失株抗血红素毒性和氧化应激损伤以及定殖能力分析

郭方^{1,2,3#}, 邱媛媛^{1,2,3#}, 程安春^{1,2,3}, 刘马峰^{1,2,3*}

1 四川农业大学动物医学院 预防兽医研究所, 四川 成都 611130

2 四川农业大学动物医学院 禽病防治中心, 四川 成都 611130

3 动物疫病与人类健康四川省重点实验室, 四川 成都 611130

郭方, 邱媛媛, 程安春, 刘马峰. 鸭疫里氏杆菌 *B739_RS00825* 基因缺失株抗血红素毒性和氧化应激损伤以及定殖能力分析[J]. 微生物学报, 2023, 63(3): 1141-1151.

GUO Fang, QIU Yuanyuan, CHENG Anchun, LIU Mafeng. *B739_RS00825*-deleted strain of *Riemerella anatipestifer* CH-1: heme detoxication, oxidative stress resistance, and colonization[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2023, 63(3): 1141-1151.

摘要:【目的】血红素可作为细菌重要的铁离子来源, 然而转运过多的血红素也会对细菌造成毒性。细菌通过调节、外排、螯合等多种方式减轻血红素毒性作用。鸭疫里氏杆菌(*Riemerella anatipestifer*, RA)是一种感染鸭及其他禽类的革兰氏阴性病原菌。前期研究表明, 该菌编码血红素转运系统, 且能够从血红蛋白获取血红素, 然而该菌是否编码血红素解毒蛋白未知。本研究以编码一氧化氮合成酶的基因 *B739_RS00825* 为研究对象, 分析其在抗血红素毒性和氧化应激损伤以及定殖能力中的功能。【方法】构建 *B739_RS00825* 缺失株, 并通过测定生长曲线、细菌存活率、毒力及定殖等试验方法鉴定其在抗血红素毒性、抗氧化应激损伤、宿主致病中的功能。【结果】与 RA CH-1 相比, RA CH-1Δ*B739_RS00825* 在添加过量血红素的培养基中生长不受影响; 然而与 RA CH-1Δ*fur* 相比, RA CH-1Δ*fur*Δ*B739_RS00825* 在含血红素培养基中的生长明显受到抑制且对 H₂O₂ 的抵抗力降低; *B739_RS00825* 基因在氧化应激条件下及 *fur* 缺失株中明显上调; 与 RA CH-1 相比, RA CH-1Δ*B739_RS00825* 在雏鸭的毒力和定殖能力无明显减弱。【结论】*B739_RS00825* 基因参与了该菌抗血红素毒性和抗氧化应激反应的功能, 且受铁摄取调节子(ferric uptake regulator, Fur)调控。然而, *B739_RS00825* 基因并未参与该菌在宿主体内的定殖。

关键词: 鸭疫里氏杆菌(RA); 血红素毒性; 氧化应激

资助项目: 国家自然科学基金(32172851); 四川省科技计划应用基础研究项目(2020YJ0344)

This work was supported by the National Nature Science Foundation of China (32172851) and the Applied and Fundamental Research Project of Science and Technology Program in Sichuan Province (2020YJ0344).

[#]These authors contributed equally to this work.

*Corresponding author. Tel: +86-28-62891176, E-mail: liumafengra@163.com

Received: 2022-07-18; Accepted: 2022-09-21; Published online: 2022-09-30

***B739_RS00825*-deleted strain of *Riemerella anatipestifer* CH-1: heme detoxication, oxidative stress resistance, and colonization**

GUO Fang^{1,2,3#}, QIU Yuanyuan^{1,2,3#}, CHENG Anchun^{1,2,3}, LIU Mafeng^{1,2,3*}

1 Institute of Preventive Veterinary Medicine, College of Veterinary Medicine, Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, Sichuan, China

2 Avian Disease Research Center, College of Veterinary Medicine, Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, Sichuan, China

3 Key Laboratory of Animal Disease and Human Health of Sichuan Province, Chengdu 611130, Sichuan, China

Abstract: [Objective] The heme of host is an important iron source for pathogenic bacteria. However, excessive heme can cause damage to bacteria. Bacteria can reduce the heme toxicity through regulation, efflux, and chelation. *Riemerella anatipestifer* is a Gram-negative bacterium that infects ducks and other birds. The available studies have demonstrated that *R. anatipestifer* encodes a heme transport system to obtain heme from host hemoglobin. However, we are not clear whether this bacterium encodes heme detoxification protein or not. In this study, we analyzed the roles of *B739_RS00825* encoding nitric oxide synthase in heme detoxification, oxidative stress resistance, and host colonization. **[Methods]** We constructed the *B739_RS00825*-deleted strain and studied its roles in heme detoxification, oxidative stress resistance, and host colonization through establishing the growth curve and determining the survival rate under H₂O₂ stress, the lethality to ducklings, and the colonization ability in ducklings. **[Results]** Compared with that of *R. anatipestifer* CH-1, the growth of CH-1Δ*B739_RS00825* in the medium supplemented with excessive heme was not affected. However, compared with CH-1Δ*fur*, CH-1Δ*fur*Δ*B739_RS00825* showed significantly inhibited growth in the medium containing excess heme and weakened resistance to H₂O₂. The transcription of *B739_RS00825* was significantly upregulated under oxidative stress and in CH-1Δ*fur*. Compared with CH-1, CH-1Δ*B739_RS00825* did not show attenuated lethality or colonization in ducklings. **[Conclusion]** Gene *B739_RS00825* was involved in the heme detoxification and oxidative stress resistance of *R. anatipestifer* and it was regulated by ferric uptake regulator (Fur). However, the gene was not involved in the lethality or colonization of *R. anatipestifer* in ducklings.

Keywords: *Riemerella anatipestifer* (RA); heme toxicity; oxidative stress

铁离子是绝大多数细菌生存所必需的营养物质之一。在体外有氧环境，大多数的铁主要以不溶性的 Fe₂O₃ 或 Fe(OH)₃ 等形式存在。在无氧或还原性条件下，铁主要以二价铁离子的可溶性形式存在^[1]。在宿主体内，绝大多数的铁

离子以血红素的形式储存在血红蛋白等血红素结合蛋白中，其余铁离子以转铁蛋白，乳铁蛋白的形式储存于血清、乳汁当中^[2]。细菌为获取铁源，进化出了多种铁离子摄取机制，如铁载体(siderophore)依赖的铁离子摄取机制、血

红素摄取系统等,来满足细菌对铁的需求^[3]。然而,摄取过多的铁离子和血红素都会对细菌造成氧化应激损伤。所以,细菌同时会通过调节、外排、螯合等机制来对抗铁离子或血红素毒性^[4],例如:细菌编码铁摄取调节子(ferric uptake regulator, Fur)蛋白来调节铁离子和血红素的摄取,当胞内铁离子浓度降低时,转运铁和血红素的基因上调表达,促进铁和血红素转运;当胞内铁离子浓度升高时,转运铁和血红素的基因表达下调,抑制铁离子和血红素的转运^[5]。

鸭疫里氏杆菌(*Riemerella anatipestifer*, RA)是一种主要感染鸭及其他禽类的革兰氏阴性菌,其中雏鸭最为易感,该病引起的浆膜炎、心包炎、肝周炎等临床症状极易造成雏鸭死亡,这对我国养鸭业造成了巨大的经济损失^[6]。鸭疫里氏杆菌的生长及致病需要铁离子的参与,其可以通过鸭血清、鸭血红蛋白等多种途径获取铁源^[7]。前期研究结果表明,鸭疫里氏杆菌编码 TonB 复合物及 TonB 依赖性的受体能够从鸭血红蛋白获取血红素^[8-10],此外,该菌编码 Fur 调节蛋白来调节铁和血红素的转运,以维持胞内铁稳态^[11]。然而,鸭疫里氏杆菌是否编码抗血红素毒性的蛋白未知,因此,本研究鉴定了 *B739_RS00825* 基因在鸭疫里氏杆菌 CH-1 抗血红素毒性的功能和作用,并且评价了其是否参与宿主的致病。

1 材料与方法

1.1 菌株及试剂

菌株 RA CH-1 由本实验室保存; RA CH-1 Δfur 在前期研究中构建^[10],本实验室保存; RA CH-1 $\Delta B739_RS00825$, RA CH-1 $\Delta fur\Delta B739_RS00825$ 本研究构建;分子生物学试剂,如 DNA 纯化回收试剂盒,质粒小提试剂盒等购自北京天根生化科技有限公司;荧光定量 PCR 试剂盒

购自南京诺唯赞生物科技有限公司;培养基购自北京索莱宝科技有限公司。

1.2 引物设计与合成

本研究所使用基因序列来自 NCBI 数据库,引物序列由华大基因有限公司合成(表 1)。

1.3 实验动物

实验动物购买于成都克里莫公司,购买后饲养于四川农业大学成都校区动物房。动物实验方法经四川农业大学动物福利委员会审阅和批准。

1.4 菌株 RA CH-1 $\Delta B739_RS00825$ 和 RA CH-1 $\Delta fur\Delta B739_RS00825$ 构建

RA CH-1 $\Delta B739_RS00825$ 无痕缺失株采用自然转化的方法构建^[12]。具体步骤如下:通过 PCR 分别扩增 *B739_RS00825* 基因上下游片段,并将其克隆至质粒 pBAD24::*cfx-SacB*,构建质粒 pBAD24::*B739_RS00825 up-cfx-SacB-B739_RS00825 down*。使用引物 *B739_RS00825 up* P1 和 *B739_RS00825 down* P2 从质粒扩增 DNA 片段 *B739_RS00825 up-cfx-SacB-B739_RS00825 down*,纯化回收后进行第一次自然转化,用含头孢西丁(1 $\mu\text{g/mL}$)抗性的血平板筛选第一次同源重组菌株,并命名为 RA CH-1 $\Delta B739_RS00825::cfx-SacB$;用引物 *B739_RS00825 fusion up* 和 *B739_RS00825 fusion down* 分别扩增 *B739_RS00825* 基因上游片段和下游片段,并将其通过 PCR 的方式融合为 *B739_RS00825 up-down*。通过自然转化的方式将融合片段转入菌株 RA CH-1 $\Delta B739_RS00825::cfx-SacB$ 中,用含有 12.5%蔗糖的血平板进行反向筛选。使用引物 *B739_RS00825 up* P1/*B739_RS00825 down* P2、*cfx* P1/P2 和 *SacB* P1/P2 进行鉴定,并将鉴定正确菌株命名为 RA CH-1 $\Delta B739_RS00825$ 。

在 RA CH-1 $\Delta B739_RS00825$ 菌株的基础上通过自然转化的方式来构建 RA CH-1 $\Delta fur\Delta B739_RS00825$ 。具体步骤如下:用引物 *fur up* P1/*fur*

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

Primer	Primer sequences (5'→3')	Restriction enzyme site (underline)
<i>B739_RS00825</i> up P1	CTAGCTAGCTAGTGTACAATACGCCAGTCCAGAACTTGTAG	<i>Nhe</i> I
<i>B739_RS00825</i> up P2	GGGGTACCCCGGCTAAACCCAAGTGTAGATAACG	<i>Kpn</i> I
<i>B739_RS00825</i> down P1	ACGCGTCGACGAAACCGCTATCAACAACCTATTCTG	<i>Sal</i> I
<i>B739_RS00825</i> down P2	ACATGCATGCATGTATGAGGTAGGCGGTATATTTGG	<i>Sph</i> I
<i>B739_RS00825</i> fusion up P1	TTTAGCATTAGGACTAGGGCTTATCCAGAA	
<i>B739_RS00825</i> fusion up P2	TAGTTGTTGATAGCGGTTTCGGCTAAACCCAAG TGTAAGATAACG	
<i>B739_RS00825</i> fusion down P1	CGTTATCTACACTTGGGTTTAGCCGAAACCGCTATCAACAAC TATTCTG	
<i>B739_RS00825</i> fusion down P2	GTAAAGGCTTCGGGTGTACCTACCTTTTTTA	
<i>fur</i> up P1	CACTGATTGCAGACGGAGTAATAACAC	
<i>fur</i> down P2	CTGGAAAAATCTTTTTCTTTGTTTACC	
<i>fur</i> identify P1	GCCTGAACGCTATACTATATTAG	
<i>fur</i> identify P2	TATGACCGTAGAAATAAAGCG	
q <i>B739_RS00825</i> qRTP1	AATGAACCACTACACCACCT	
q <i>B739_RS00825</i> qRTP2	TTATAGAGCCAAATCCCACGA	
<i>cfx</i> P1	CGGGGTACCTGACCCCGAAGCAGGGTTATGC	
<i>cfx</i> P2	GCTCTAGAGCAAAGCAAGTGCAGTTTAAGATTTTACTG	
<i>SacB</i> P1	GCTCTAGACAATGAACATCAAAAAGTTTGC	
<i>SacB</i> P2	ACGCGTCGACTTATTTGTTAACTGTAAATTGTCC	

down P2 从菌株 RA CH-1 $\Delta fur::spc$ 扩增片段 *fur up-spc-fur down*。将 DNA 片段 *fur up-spc-fur down* 通过自然转化的方式转入 RA CH-1 $\Delta B739_RS00825$ 涂布于含壮观霉素(spectinomycin, Spc) (80 $\mu\text{g}/\text{mL}$)的血平板进行筛选,用引物为 *fur* up P1/*fur* down P2 和 *fur* identify P1/P2 进行鉴定,将鉴定正确的菌株命名为 RA CH-1 $\Delta fur\Delta B739_RS00825$ 。

1.5 血红素敏感性实验

比较 RA CH-1 和 RA CH-1 $\Delta B739_RS00825$ 菌株分别在 GCB (gonorrhoeae-culture broth) [1.5% proteose peptone (Oxoid 公司)、0.4% K_2HPO_4 (Sigma 公司)、0.1% KH_2PO_4 (Sigma 公司)、0.5% NaCl (Sigma 公司)、40% glucose (Sigma 公司)、1% L-glutamine (Sigma 公司)、0.002% thiamine pyrophosphate (Sigma 公司)、

0.5% $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$ (Sigma 公司)]及 GCB+35 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 血红素液体培养基中的生长情况,同时比较 RA CH-1 $\Delta fur\Delta B739_RS00825$ 和 RA CH-1 Δfur 在 GCB+10 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 血红素液体培养基中的生长情况。具体步骤如下:将菌株复苏于血平板,待长出单克隆后将其接种至 4 mL GCB 液体培养基中培养过夜。次日,将菌液接种至 20 mL GCB 或 GCB 加血红素培养基,起始 OD_{600} 值为 0.1,菌液置于 37 $^\circ\text{C}$ 摇床培养,每 2 h 测量一次 OD_{600} 值,实验重复 3 次。以时间为横坐标,菌液 OD_{600} 值为纵坐标,绘制细菌的生长曲线。

1.6 H_2O_2 敏感性实验

H_2O_2 敏感性实验方法参照文献[12]进行。具体步骤如下:将菌株复苏于血平板并培养过夜。待长出单克隆后,再接种至 4 mL GCB 液体培养基中过夜培养。次日,将菌液接种于 GCB

液体培养基中, 起始 OD_{600} 值为 0.1, 摇菌至生长对数期。收集菌体后, 用 PBS 重悬、洗涤并调整至 $OD_{600}=0.5$ 。用 5 mmol/L H_2O_2 处理 30 min 后, 稀释涂板计数。用未处理组作为对照, 实验重复 3 次。

1.7 荧光定量 PCR

将菌株在 GCB 培养基培养至对数生长期, 收集菌体。用细菌总 RNA 抽提试剂盒[天根生化科技(北京)有限公司]提取总 RNA, 用反转录试剂盒(南京诺唯赞生物科技有限公司)将 1 μ g RNA 反转录为 cDNA 样品。荧光定量 PCR 采用上述 cDNA 作为模板, 经 SYBR Green I 嵌合荧光法专用试剂(南京诺唯赞生物科技有限公司)的反应体系和反应程序进行, 得到各样品目标基因的 C_t 值, 运用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算 *B739_RS00825* 基因的相对表达水平, 编码 16S rRNA 的基因作为内参基因^[13]。

1.8 雏鸭体内定殖能力测定

菌株在雏鸭体内的定殖实验参照文献进行操作^[14]。具体实验过程为: 将菌株培养至对数生长期, 通过离心方式收集菌体, 用 PBS 洗涤并调整至 OD_{600} 值为 2.5 OD/mL , 即得到 5×10^9 CFU/mL (鸭疫里氏杆菌 OD_{600} 值与菌落数对应关系为: 1 $OD \approx 2 \times 10^9$ CFU)。将 3 日龄雏鸭随机分成 2 组, 每组鸭子通过腿部肌肉注射 10^9 CFU。雏鸭攻毒 24 h 后, 每组随机选取 6 只雏鸭, 采集血液、肝脏、脾脏和脑等组织, 将组织匀浆、梯度稀释后涂布于含卡那霉素和多黏菌素的血平板(鸭疫里氏杆菌对这 2 种抗生素具有天然抗性)上长出来的细菌数量, 计算出雏鸭每克组织含有的载菌量。

1.9 实验数据处理

所有实验数据采用软件 GraphPad Prism 8 进行统计学分析, 通过 T 检验确定数据的统计学显著性。*代表 $P < 0.05$, **代表 $P < 0.01$, ***代表 $P < 0.001$, ****代表 $P < 0.0001$ 。

2 结果与分析

2.1 RA CH-1 Δ *B739_RS00825* 和 RA CH-1 Δ *fur* Δ *B739_RS00825* 构建

B739_RS00825 基因在鸭疫里氏杆菌基因组中被注释为一氧化氮合成酶基因, 然而其编码蛋白与大肠杆菌一氧化氮合成酶的同源性较低 (24.33%)。为研究该基因编码蛋白的功能, 本研究首先在鸭疫里氏杆菌 CH-1 菌株中对其进行了缺失。第一次自然转化用 *B739_RS00825 up-cfx-SacB-B739_RS00825 down* 片段作为底物 DNA, RA CH-1 作为受体菌, 在含头孢西丁抗性的平板上筛选。结果如图 1A 所示, 通过 PCR 能扩增出 *B739_RS00825 up-cfx-cfx-SacB-SaB-B739_RS00825 down* 片段, 说明第一次同源重组成功且位置正确。第二次自然转化用 *B739_RS00825 up-down* 作为底物 DNA, RA CH-1 Δ *B739_RS00825::cfx-SacB* 为受体菌株, 在含 12.5% 蔗糖的血平板上进行反向筛选。结果如图 1B 所示, 通过 PCR 能扩增出 *B739_RS00825 up-down* 片段, 而不能扩增出 *cfx-SacB* 片段。这表明 RA CH-1 Δ *B739_RS00825* 无痕缺失株构建成功。

将 *fur up-SpcR-fur down* 片段通过自然转化的方式转入菌株 RA CH-1 Δ *B739_RS00825*, 在含有壮观霉素抗性的平板上筛选重组菌株。结果如图 1C 所示, 通过 PCR 能够扩增出 *fur up-SpcR-fur down* 片段而不能扩增出 *fur* 基因。这说明 RA CH-1 Δ *fur* Δ *B739_RS00825* 构建成功。

2.2 *B739_RS00825* 基因参与了抗血红素毒性

游离的血红素具有毒性, 本研究通过测定各菌株在 GCB 液体培养基及 GCB 液体培养基添加血红素的生长状态来判定菌株对血红素的抵抗力。结果如图 2A 所示, 与亲本株相比, RA CH-1 Δ *B739_RS00825* 在 GCB 及含 35 μ mol/L 血

红素 GCB 培养基中的生长曲线均无明显差异。鸭疫里氏杆菌血红素的转运受 Fur 蛋白的调控,在铁离子丰富条件下,Fur 蛋白抑制血红素转运基因的转录^[11]。考虑到此因素,本研究进一步比较了 RA CH-1 Δfur 与 RA CH-1 $\Delta fur\Delta B739_RS00825$ 在 GCB 及含 10 $\mu\text{mol/L}$ 血红素 GCB 培养基中的生长曲线有无明显差异。结果如图 2B 所示,与 RA CH-1 Δfur 相比,RA CH-1 $\Delta fur\Delta B739_RS00825$ 在 GCB 培养基对数生长期生长缓慢。本研究进一步比较了 RA CH-1 Δfur 与 RA CH-1 $\Delta fur\Delta B739_RS00825$ 对血红素的抵抗能力,结果如图 2B 所示,当加入 10 $\mu\text{mol/L}$ 血红素后对

RA CH-1 Δfur 在 GCB 中的生长无任何影响。然而,与在 GCB 中的生长相比,加入 10 $\mu\text{mol/L}$ 血红素后 RA CH-1 $\Delta fur\Delta B739_RS00825$ 的生长明显受到了抑制。此结果表明, $B739_RS00825$ 基因参与了血红素毒性抵抗作用。

2.3 $B739_RS00825$ 基因参与了对 H_2O_2 抵抗

对细菌造成氧化应激反应损伤是血红素毒性的机制之一^[15]。因 $B739_RS00825$ 基因参与了血红素毒性抵抗作用,本研究进一步推测 $B739_RS00825$ 基因参与了对 H_2O_2 的抵抗作用。为了验证此假说,本研究比较了不同菌株在 H_2O_2 中的存活率。结果如图 3A 所示,与亲本

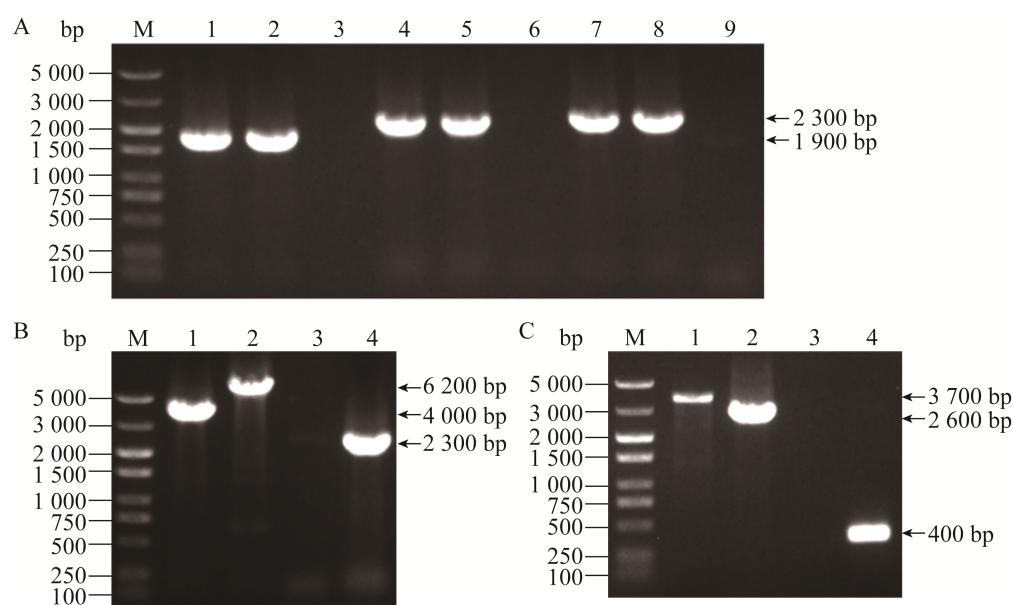


图 1 PCR 鉴定 $B739_RS00825$ 基因缺失株的凝胶电泳图

Figure 1 The gel electrophoresis pattern of $B739_RS00825$ gene mutant strain by PCR. A: The PCR identification of the strain RA CH-1 $\Delta B739_RS00825::cfx-SacB$. Lane M: DNA Marker; Lane 1: The PCR fragments $B739_RS00825$ up- cfx ; Lane 2: Positive control; Lane 3: Negative control; Lane 4: The PCR fragments $cfx-SacB$; Lane 5: Positive control; Lane 6: Negative control; 7: The PCR fragments $SaB-B739_RS00825$ down; Lane 8: Positive control; Lane 9: Negative control. B: The PCR identification of the strain RA CH-1 $\Delta B739_RS00825$. Lane 1: The PCR fragments $B739_RS00825$ up-down from RA CH-1 $\Delta B739_RS00825$; Lane 2: The PCR fragments $B739_RS00825$ up-down from RA CH-1; Lane 3: The PCR fragments $cfx-SacB$ from RA CH-1 $\Delta B739_RS00825$; Lane 4: Positive control. C: The PCR identification of the strain RA CH-1 $\Delta fur\Delta B739_RS00825$ strain. Lane 1: The PCR fragments fur up- $SpcR-fur$ down from RA CH-1 $\Delta fur\Delta B739_RS00825$; Lane 2: The PCR fragments fur up- $SpcR-fur$ down from RA CH-1; Lane 3: The PCR fragments fur from RA CH-1 $\Delta fur\Delta B739_RS00825$; Lane 4: Positive control.

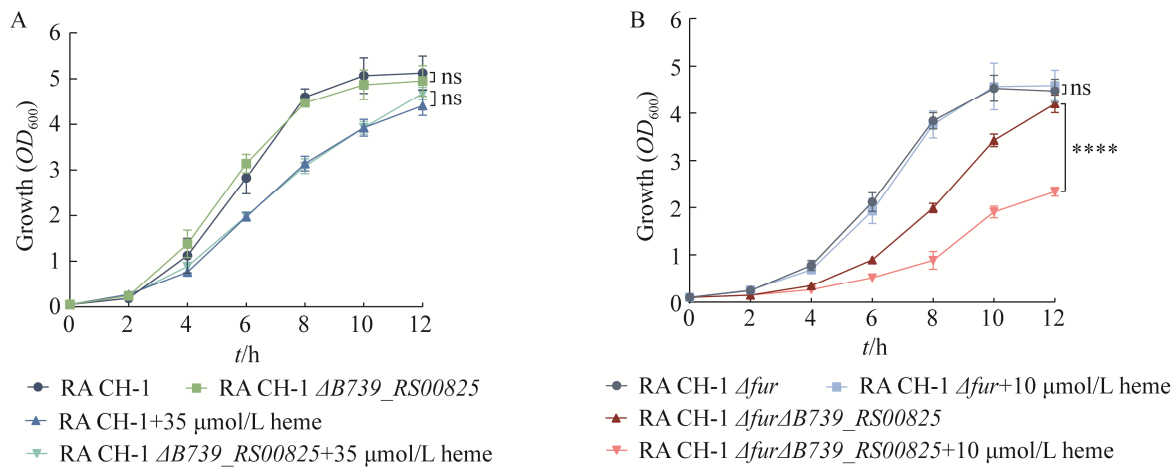


图2 不同菌株在 GCB、GCB 含血红素液体培养基中的生长曲线

Figure 2 The growth curves of different strains in GCB and GCB supplemented by heme. A: Growth curves of RA CH-1 and RA CH-1 $\Delta B739_RS00825$ in GCB and GCB supplemented with 35 $\mu\text{mol/L}$ heme. B: Growth curves of RA CH-1 Δfur and RA CH-1 $\Delta fur\Delta B739_RS00825$ in GCB and GCB supplemented with 10 $\mu\text{mol/L}$ heme. Data are shown as the mean of three replicates, with the error bars representing \pm standard error. Statistical significance was determined by Student's *t*-test (ns: No significant difference; ****: $P < 0.0001$).

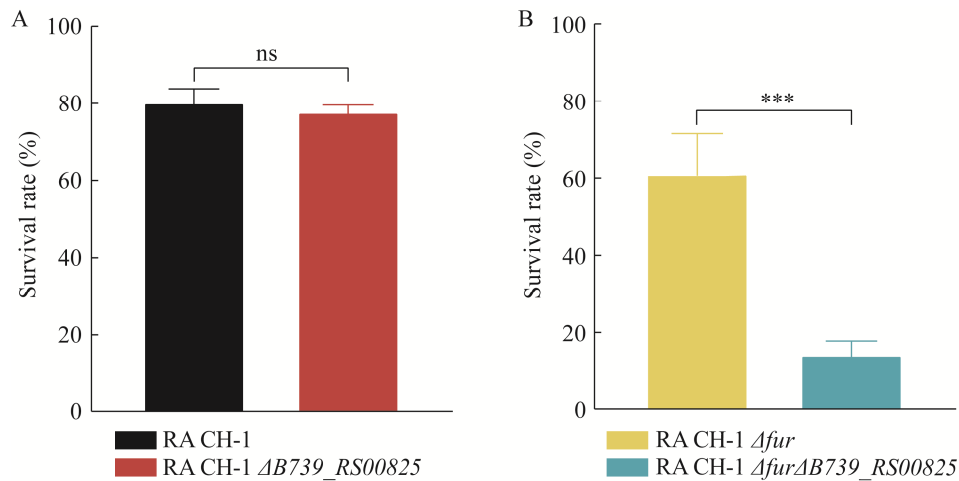


图3 不同菌株经 H_2O_2 处理后的存活率

Figure 3 The survival rate of different strains after H_2O_2 treatment. A: Survival rate of RA CH-1 and RA CH-1 $\Delta B739_RS00825$ after 5 mmol/L H_2O_2 treatment. B: Survival rate of RA CH-1 Δfur and RA CH-1 $\Delta fur\Delta B739_RS00825$ after 5 mmol/L H_2O_2 treatment. Data are shown as the mean of three replicates, with the error bars representing \pm standard error. Statistical significance was determined by Student's *t*-test (ns: No significant difference; ***: $P < 0.001$).

株相比, RA CH-1 $\Delta B739_RS00825$ 对 H_2O_2 的抵抗力无明显改变。然而, 结果如图 3B 所示, 与 RA CH-1 Δfur 相比, RA CH-1 $\Delta fur\Delta B739_RS00825$ 在 H_2O_2 中的存活率明显降低。此结果表明,

$B739_RS00825$ 基因参与了血红素毒性抵抗是通过抵抗氧化应激反应而实现的。

2.4 $B739_RS00825$ 基因转录水平测定

通过对基因表达的调控, 是细菌适应环境

的一种常规策略。因此,本研究进一步测定了影响 *B739_RS00825* 基因转录的因素。结果如图 4A 所示,经 H_2O_2 刺激后, *B739_RS00825* 基因转录并未发生明显的改变。然而,与亲本株相比, *B739_RS00825* 基因的转录在 *fur* 缺失株中明显上调(图 4B)。此结果表明, *B739_RS00825* 基因受 Fur 的调控。

2.5 RA CH-1 和 RA CH-1 $\Delta B739_RS00825$ 在雏鸭体内定殖能力测定

宿主会释放活性氧来抵抗病原菌的入侵。因 *B739_RS00825* 基因参与了对氧化应激反应的抵抗,本研究进一步探索了是否 *B739_RS00825* 基因与宿主致病相关。结果如图 5A 所示,与亲本株相比, RA CH-1 $\Delta B739_RS00825$ 对雏鸭的致死能力并未减弱。为进一步研究 *B739_RS00825* 基因缺失后是否会对菌株在雏鸭的定殖有影响,本研究进一步测定了亲本株和 RA CH-1 $\Delta B739_RS00825$ 在雏鸭各脏器的载菌量。结果如图 5B 所示,与亲本株相比, RA

CH-1 $\Delta B739_RS00825$ 在雏鸭体内的定殖没有明显地减弱。

3 讨论与结论

绝大多数细菌在生长过程中需要血红素,因为血红素参与到了细菌有氧呼吸链中的电子传递、氧气储存、信号传递等生理功能^[16]。同时,血红素作为宿主体内最大的铁离子来源可以为细菌提供生长所需的铁离子^[17]。一些细菌可以自身合成血红素,另一些细菌则需要从外界环境中获取血红素,但细菌胞内过量的血红素会对细菌造成氧化应激损伤。因此,细菌会编码抗血红素毒性的系统,其主要通过外排和螯合等作用方式来抵抗这一毒性作用^[15]。一氧化氮合成酶(nitric oxide synthase, NOS)具有抗血红素毒性的作用仅在金黄色葡萄球菌中被报道^[18]。在鸭疫里氏杆菌中, *B739_RS00825* 基因被注释为一氧化氮合成酶基因,但其在血红素代谢中的功能未知。

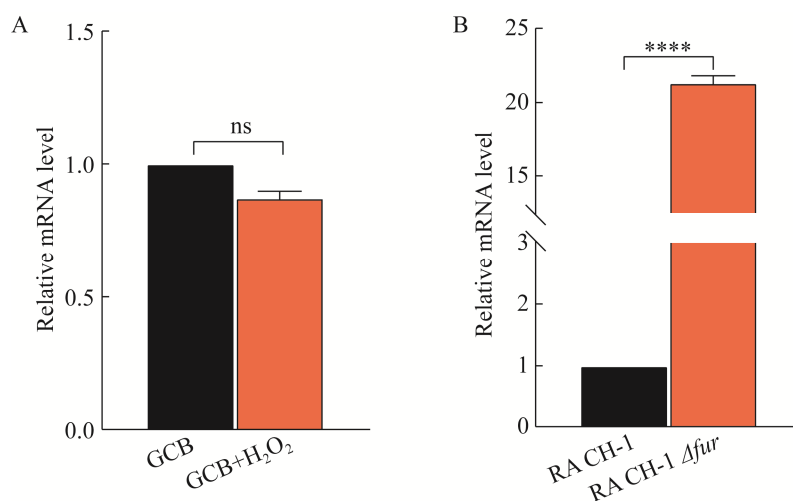


图 4 *B739_RS00825* 基因在不同条件下的相对转录水平

Figure 4 The relative transcriptional level of *B739_RS00825* gene under different conditions. A: The relative transcriptional level of *B739_RS00825* gene in RA CH-1 after treating with 20 mmol/L H_2O_2 . B: The relative transcriptional levels of *B739_RS00825* gene in RA CH-1 and RA CH-1 Δfur . Data are shown as the mean of three replicates, with the error bars representing \pm standard error. Statistical significance was determined by Student's *t*-test (ns: No significant difference; ****: $P < 0.0001$).

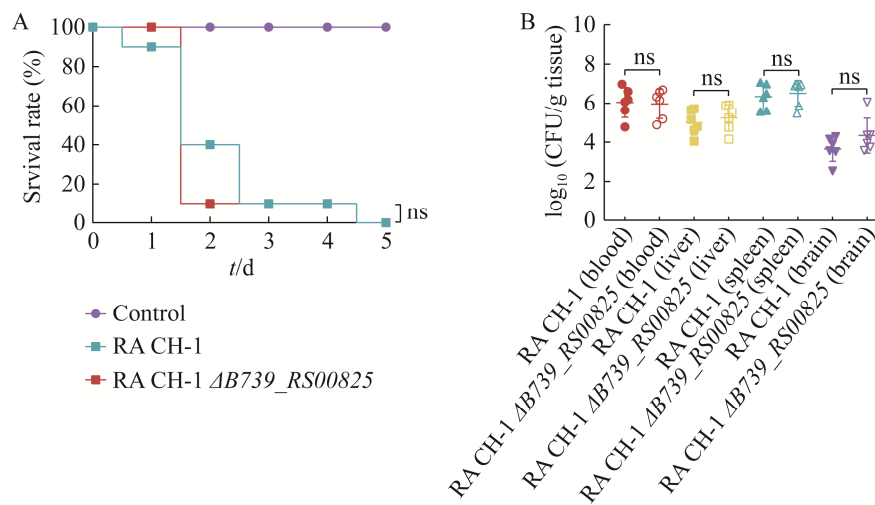


图 5 RA CH-1 和 RA CH-1 $\Delta B739_RS00825$ 对雏鸭的致死率及其在雏鸭体内的定殖情况

Figure 5 Survival rate and colonization of ducklings infected with RA CH-1 and RA CH-1 $\Delta B739_RS00825$. A: Survival of ducklings infected with 10^9 CFU of RA CH-1 and RA CH-1 $\Delta B739_RS00825$, respectively. B: The bacterial load of RA CH-1 (solid symbol) and RA CH-1 $\Delta B739_RS00825$ (hollow symbol) in different tissues of ducklings at 24 hours after infection. Statistical significance was determined by Student's *t*-test (ns: No significant difference).

本研究首先构建了 *B739_RS00825* 的基因缺失株, 并比对了与亲本株在 GCB 及 GCB 含过量血红素中的生长状况。结果表明, *B739_RS00825* 基因缺失株和亲本株在以上 2 种不同的培养基中均无明显的生长差异。在革兰氏阴性菌中, 血红素的摄取受 Fur 蛋白的调控, 当胞内铁离子充足时, Fur 蛋白会抑制铁离子和血红素摄取基因的表达。因此, 本研究推测, 即便在 GCB 培养基中加入了过量的血红素, 血红素也不会被细菌转运至胞内。为创造胞内过量的血红素环境, 本研究构建了 RA CH-1 $\Delta fur\Delta B739_RS00825$ 菌株用于后续研究。结果表明, 在 GCB+10 $\mu\text{mol/L}$ 血红素培养基中, RA CH-1 Δfur 的生长并未受到影响, 而 RA CH-1 $\Delta fur\Delta B739_RS00825$ 生长明显受到抑制, 此结果说明, *B739_RS00825* 基因参与了胞内血红素毒性的抵抗作用。

由于过量的血红素会对细菌造成氧化应激的损伤, 因此本实验进一步比较了 RA CH-1 和

RA CH-1 $\Delta B739_RS00825$, 以及 RA CH-1 Δfur 和 RA CH-1 $\Delta fur\Delta B739_RS00825$ 对 H_2O_2 的抵抗力。结果表明, 与 RA CH-1 Δfur 相比, RA CH-1 $\Delta fur\Delta B739_RS00825$ 的存活率明显降低。此结果进一步证明, *B739_RS00825* 基因是通过抵抗氧化应激损伤的机制来抵抗血红素毒性的。RA CH-1 和 RA CH-1 $\Delta B739_RS00825$ 对 H_2O_2 的敏感性无明显差异, 这可能解释为有其他多种抗 H_2O_2 的酶存在; 而在 RA CH-1 Δfur 中铁离子代谢失调, 导致对 H_2O_2 更加敏感, 此时 *B739_RS00825* 基因抵抗 H_2O_2 的功能得到体现。

为进一步研究 *B739_RS00825* 基因发挥抗血红素毒性的调控机制, 本研究利用荧光定量 PCR 实验测定了 *B739_RS00825* 基因的转录与氧化应激及 *fur* 基因的关系。结果表明, 与亲本株相比, *B739_RS00825* 基因转录水平在 *fur* 缺失株中上调 20 倍左右。然而, *B739_RS00825* 基因在 H_2O_2 刺激后转录水平并没有发生变化,

此结果更加印证了 *B739_RS00825* 基因在 Fur 功能失调的情况下发挥作用。

为抵抗细菌入侵，宿主会通过巨噬细胞产生活性氧(reactive oxygen species, ROS)等其他非特异性免疫反应对细菌造成损伤^[19]。由此可以推测，当细菌抵抗氧化应激反应的能力降低时，其对宿主的入侵和定殖能力也会降低。因此，本研究评价了 *B739_RS00825* 基因对雏鸭的致病和定殖能力的影响。然而，实验结果表明，与亲本株相比，*B739_RS00825* 基因缺失株对雏鸭的致病和定殖能力并未减弱。其原因可能为，*B739_RS00825* 基因只有在过多铁离子或血红素的情况下才会显示其抗氧化应激反应功能的重要性，而在宿主体内为一个铁离子限制性环境；另外一种可能的解释为，鸭疫里氏杆菌编码多个抗氧化应激反应的基因，*B739_RS00825* 基因在体内不起主要的作用。为研究 *B739_RS00825* 基因发挥功能的机制，本研究曾多次在大肠杆菌表达全长 *B739_RS00825* 重组蛋白，但未发现有表达。因此，未能对其蛋白功能进行进一步鉴定。推测其发挥功能的机制为，*B739_RS00825* 蛋白能够结合游离的血红素，并以血红素为辅基发挥抵抗氧化应激反应的作用。

总之，本研究首次证实了在鸭疫里氏杆菌中存在有编码抵抗血红素毒性的基因。*B739_RS00825* 基因通过抵抗氧化应激反应而发挥抗血红素毒性的功能，未来需进一步鉴定是否鸭疫里氏杆菌编码血红素外排的基因。

参考文献

- [1] RIBEIRO M, SOUSA CA, SIMÕES M. Harnessing microbial iron chelators to develop innovative therapeutic agents[J]. Journal of Advanced Research, 2022, 39: 89-101.
- [2] MARCHETTI M, de BEI O, BETTATI S, CAMPANINI B, KOVACHKA S, GIANQUINTO E, SPYRAKIS F, RONDA L. Iron metabolism at the interface between host and pathogen: from nutritional immunity to antibacterial development[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2020, 21(6): 2145.
- [3] KRAMER J, ÖZKAYA Ö, KÜMMERLI R. Bacterial siderophores in community and host interactions[J]. Nature Reviews Microbiology, 2020, 18(3): 152-163.
- [4] BRADLEY JM, SVISTUNENKO DA, WILSON MT, HEMMINGS AM, MOORE GR, le BRUN NE. Bacterial iron detoxification at the molecular level[J]. Journal of Biological Chemistry, 2020, 295(51): 17602-17623.
- [5] SEVILLA E, BES MT, PELEATO ML, FILLAT MF. Fur-like proteins: beyond the ferric uptake regulator (fur) paralogs[J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 2021, 701: 108770.
- [6] 刘马峰, 田琇, 程安春. 鸭疫里氏杆菌毒力及耐药机制研究进展[J]. 微生物学报, 2019, 59(7): 1222-1231.
- LIU MF, TIAN X, CHENG AC. Research advances in the virulence and antibiotics resistance mechanism of *Riemerella anatipestifer*[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2019, 59(7): 1222-1231 (in Chinese).
- [7] LIAO HB, CHENG XJ, ZHU DK, WANG MS, JIA RY, CHEN S, CHEN XY, BIVILLE F, LIU MF, CHENG AC. TonB energy transduction systems of *Riemerella anatipestifer* are required for iron and heme utilization[J]. PLoS One, 2015, 10(5): e0127506.
- [8] LIU M, WANG M, ZHU D, WANG M, JIA R, CHEN S, SUN K, YANG Q, WU Y, CHEN X, BIVILLE F, CHENG A. Investigation of TbfA in *Riemerella anatipestifer* using plasmid-based methods for gene over-expression and knockdown[J]. Scientific Reports, 2016, 6: 37159.
- [9] LIU M, LIU S, HUANG M, WANG Y, WANG M, TIAN X, LI L, YANG Z, WANG M, ZHU D, JIA R, CHEN S, ZHAO X, YANG Q, WU Y, ZHANG S, HUANG J, OU X, MAO S, GAO Q, et al. An exposed outer membrane heme-binding protein facilitates heme transport by a TonB-dependent receptor in *Riemerella anatipestifer*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2021, 87(15): e0036721.
- [10] LIU M, HUANG M, HUANG L, BIVILLE F, ZHU D, WANG M, JIA R, CHEN S, ZHAO X, YANG Q, WU Y, ZHANG S, HUANG J, TIAN B, CHEN X, LIU Y, ZHANG L, YU Y, PAN L, UR REHMAN M, et al. New perspectives on *Galleria mellonella* larvae as a host model using *Riemerella anatipestifer* as a proof of

- concept[J]. *Infection and Immunity*, 2019, 87(8): e00072-e00019.
- [11] HUANG M, LIU M, LIU J, ZHU D, TANG Q, JIA R, CHEN S, ZHAO X, YANG Q, WU Y, ZHANG S, HUANG J, OU X, MAO S, GAO Q, SUN D, WANG M, CHENG A. Functional characterization of Fur in iron metabolism, oxidative stress resistance and virulence of *Riemerella anatipestifer*[J]. *Veterinary Research*, 2021, 52(1): 48.
- [12] TIAN X, HUANG L, WANG M, BIVILLE F, ZHU D, JIA R, CHEN S, ZHAO X, YANG Q, WU Y, ZHANG S, HUANG J, ZHANG L, YU Y, CHENG A, LIU M. The functional identification of Dps in oxidative stress resistance and virulence of *Riemerella anatipestifer* CH-1 using a new unmarked gene deletion strategy[J]. *Veterinary Microbiology*, 2020, 247: 108730.
- [13] ZHANG L, HUANG L, HUANG M, WANG M, ZHU D, WANG M, JIA R, CHEN S, ZHAO X, YANG Q, WU Y, ZHANG S, HUANG J, OU X, MAO S, GAO Q, TIAN B, CHENG A, LIU M. Effect of nutritional determinants and TonB on the natural transformation of *Riemerella anatipestifer*[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2021, 12: 644868.
- [14] WANG M, ZHANG P, ZHU D, WANG M, JIA R, CHEN S, SUN K, YANG Q, WU Y, CHEN X, BIVILLE F, CHENG A, LIU M. Identification of the ferric iron utilization gene B739_1208 and its role in the virulence of *R. anatipestifer* CH-1[J]. *Veterinary Microbiology*, 2017, 201: 162-169.
- [15] NAKAMURA H, HISANO T, RAHMAN MM, TOSHA T, SHIROUZU M, SHIRO Y. Structural basis for heme detoxification by an ATP-binding cassette-type efflux pump in Gram-positive pathogenic bacteria[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2022, 119(27): e2123385119.
- [16] HUANG WL, WILKS A. Extracellular heme uptake and the challenge of bacterial cell membranes[J]. *Annual Review of Biochemistry*, 2017, 86: 799-823.
- [17] CHOBY JE, SKAAR EP. Heme synthesis and acquisition in bacterial pathogens[J]. *Journal of Molecular Biology*, 2016, 428(17): 3408-3428.
- [18] SURDEL MC, DUTTER BF, SULIKOWSKI GA, SKAAR EP. Bacterial nitric oxide synthase is required for the *Staphylococcus aureus* response to heme stress[J]. *ACS Infectious Diseases*, 2016, 2(8): 572-578.
- [19] IMLAY JA. Where in the world do bacteria experience oxidative stress[J]. *Environmental Microbiology*, 2019, 21(2): 521-530.