



鸭疫里氏杆菌 *hemH* 基因功能初步鉴定及其缺失株的转录组学分析

王梦莹^{1,2,3}, 刘马峰^{1,2,3*}, 程安春^{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 四川农业大学动物疫病与人类健康四川省重点实验室, 四川 成都 611130

王梦莹, 刘马峰, 程安春. 鸭疫里氏杆菌 *hemH* 基因功能初步鉴定及其缺失株的转录组学分析[J]. 微生物学报, 2023, 63(8): 3083-3095.

WANG Mengying, LIU Mafeng, CHENG Anchun. Functional identification of *hemH* and transcriptomic analysis of *hemH* mutant of *Riemerella anatipestifer*[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2023, 63(8): 3083-3095.

摘要: 血红素是绝大多数细菌生长繁殖所必需的一种营养物质, 其参与了细菌多种重要的生理过程。细菌可以通过自身合成和从外界摄取 2 种方式获得血红素。然而过多的血红素对细菌是有毒性的, 细菌则会利用外排、螯合和降解等多种方式减轻血红素毒性。鸭疫里氏杆菌(*Riemerella anatipestifer*, RA)是一种感染禽类的革兰氏阴性菌, 前期研究表明该菌可通过转运的方式从外界环境摄取血红素。然而, 是否该菌也可以自身合成血红素未知。基因组分析发现鸭疫里氏杆菌 ATCC 11845 菌株中的基因 *RA0C_RS08070* 编码铁螯合酶(ferrochelatase) HemH, 是参与将铁插入卟啉中心, 形成血红素的关键酶。*hemH* 缺失后会导致铁离子和卟啉的积累, 对细菌造成毒性。【目的】为鉴定 HemH 在合成血红素中的功能及查找参与鸭疫里氏杆菌铁离子和卟啉解毒相关基因。【方法】本研究构建了 RA ATCC 11845 Δ *hemH* 缺失株, 并检测亲本株和 *hemH* 缺失株在 GCB 以及 GCB 添加血红蛋白液体培养基中的生长情况; 随后对亲本株和 *hemH* 缺失株进行转录组测序并进行比较分析。【结果】RA ATCC 11845 Δ *hemH* 缺失株不能在 GCB 培养基中生长, 而在 GCB 培养基补充血红蛋白后生长良好。转录组测序及比较分析发现, 与亲本株相比, *hemH* 缺失株中有 354 个显著差异表达基因(differentially expressed genes, DEGs)。基因本体论(gene ontology, GO)功能富集分析发现差异表达基因主要富集在催化活性、生物调节和代谢过程等途径, 京都基因和基因组百科全书(Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)通路富集分析发现差异表达基因主要富集在氨基酸代谢、氧化磷酸化和三羧酸循环(tricarboxylic

资助项目: 国家自然科学基金(32072825, 32273003); 四川省自然科学基金(2022NSFSC0007)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (32072825, 32273003) and the Natural Science Foundation of Sichuan Province (2022NSFSC0007).

*Corresponding authors. E-mail: LIU Mafeng, liumafengra@163.com; CHENG Anchun, chenganchun@vip.163.com

Received: 2022-11-23; Accepted: 2023-03-03; Published online: 2023-03-09

acid cycle, TCA cycle)等途径。【结论】HemH 参与了血红素的合成, *hemH* 缺失后导致大量的基因表达改变来适应代谢的改变, 为进一步研究鸭疫里氏杆菌的 HemH 的功能奠定基础。

关键词: 鸭疫里氏杆菌; 血红素; *hemH*

Functional identification of *hemH* and transcriptomic analysis of *hemH* mutant of *Riemerella anatipestifer*

WANG Mengying^{1,2,3}, LIU Mafeng^{1,2,3*}, CHENG Anchun^{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, Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, Sichuan, China

Abstract: Heme is an essential nutrient for the growth and proliferation of most bacteria since it is involved in a variety of physiological processes. Bacteria can obtain heme through biosynthesis and acquisition from the host. However, excessive heme is toxic, and bacteria can alleviate heme toxicity by efflux, sequestration, and degradation. *Riemerella anatipestifer* (RA), a Gram-negative bacterium that infects birds, can transport heme from hemoglobin. However, whether RA can synthesize heme remains unknown. The genome analysis revealed that the gene *RA0C_RS08070* of RA ATCC 11845 strain encodes the ferrochelatase HemH, which is a key enzyme that participates in the insertion of iron into porphyrin center to form heme. The loss of *hemH* leads to the accumulation of iron and porphyrin, causing toxicity to bacteria. **[Objective]** To identify the role of HemH in the synthesis of heme and identify the genes involved in the detoxification of iron and porphyrin in RA. **[Methods]** In this study, $\Delta hemH$, the *hemH*-deleted mutant of RA ATCC 11845, was constructed, and the growth curves of the parental strain and $\Delta hemH$ in the GCB liquid medium and the GCB liquid medium supplemented with hemoglobin (Hb) were established. Further, the transcriptomes of the parental strain and $\Delta hemH$ were sequenced and analyzed. **[Results]** RA ATCC 11845 $\Delta hemH$ did not grow in the GCB medium, while it grew well in the GCB medium supplemented with Hb. Transcriptome analysis revealed 354 differentially expressed genes (DEGs) between $\Delta hemH$ and the parental strain. Gene ontology (GO) functional annotation showed that the DEGs were mainly involved in catalytic activity, biological regulation, and metabolic processes. Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) pathway enrichment analysis showed that the DEGs were mainly enriched in amino acid metabolism, oxidative phosphorylation, and tricarboxylic acid cycle (TCA cycle). **[Conclusion]** HemH is involved in heme synthesis, and the mutant with the deletion of *hemH* changed the expression of the genes to adapt to the disorder of metabolism. This study lays a foundation for further studying the role of HemH in RA.

Keywords: *Riemerella anatipestifer*; heme; *hemH*

血红素是大多数细菌生命活动所必需的一种营养物质。由卟啉和铁组成的血红素,在宿主体内主要以血红蛋白的形式存在,是最丰富的铁储存库,也是病原菌主要的铁离子来源^[1]。尽管血红素对细菌很重要,但摄取过量的血红素对细菌是有毒性的,血红素本身及其代谢物铁、卟啉环等均是有害的,会导致细胞膜损伤、膜蛋白和脂质氧化,以及DNA的损伤等^[2-3]。因此,细菌会通过调节血红素的合成或摄取,以及外排、螯合和降解血红素,以控制血红素含量,降低血红素毒性^[3]。

细菌合成血红素的途径称为C5途径^[4-6],首先由谷氨酰-tRNA还原酶(glutamyl-tRNA reductase, GtrR)将谷氨酰-tRNA转化为不稳定的谷氨酸-1-半醛(glutamic acid-1-di-dehyde, GSA),随后由谷氨酸-1-半醛 2,1-氨基变位酶(glutamate-1-semialdehyde 2,1-amino mutase, GsaM)形成共通前体 δ -氨基乙酰丙酸(δ -aminolevulinic acid, ALA)^[3-4]。2个ALA分子被胆色素原合酶(bilinopigment synthase, PbgS)不对称地缩合产生单吡咯胆色素原(monopyrrole cholepigmentogen, PBG)^[4],羟甲基胆素合成酶(hydroxymethylbiliary synthetase, HmbS)将4个PBG分子连续连接,产生线性四吡咯羟甲基胆素^[7-8],尿卟啉原III合成酶(uroporphyrinogen III synthetase, UroS)催化环的转化和连接,形成尿卟啉原III^[4],尿卟啉原III脱羧酶(uroporphyrinogen III decarboxylase, UroD)将尿卟啉原III脱羧形成粪卟啉原III^[9]。在这一步,革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌的合成血红素途径分支为2种途径,分别为粪卟啉依赖分支途径和原卟啉依赖分支途径。

在革兰氏阴性菌中的原卟啉依赖分支途径,粪卟啉原III由依赖氧的粪卟啉原脱羧酶(facoporphyrinogen decarboxylase, CgdC)和不依赖于氧的粪卟啉原脱氢酶(coproporphyrinogen dehydrogenase, CgdH)催化形成原卟啉原IX^[9-11],随后由依赖氧的原卟啉原氧化酶

(protoporphyrinogen oxidase, PgoX)、不依赖氧的原卟啉原氧化酶(protoporphyrinogen oxidase, PgdH1)和存在于大部分革兰氏阴性菌中的原卟啉原氧化酶(protoporphyrinogen oxidase, PgdH2)催化形成原卟啉IX^[12-16],最后由原卟啉铁螯合酶(protoporphyrin iron chelase, PpfC,也称为HemH)将铁插入原卟啉IX中央形成血红素^[17]。

鸭疫里氏杆菌(*Riemerella anatipestifer*, RA)是最新被归类于威克斯菌科、里氏杆菌属的革兰氏阴性菌^[18],感染雏鸭等禽类,造成肝周炎、心包炎等,目前为止已鉴定至少有21种血清型,且各血清型之间并无交叉保护作用,给养鸭业造成了较大经济损失^[19]。鸭疫里氏杆菌的生长需要血红素来维持,该菌编码有血红素转运系统及血红素代谢系统,依赖于TonB复合物以及TonB受体从鸭血红蛋白中获得血红素^[20-23];依赖于Fur调节蛋白以调控铁和血红素的转运,从而保持铁稳态^[24]。但该菌是否也能合成血红素及血红素解毒机制未知。基因组分析发现,鸭疫里氏杆菌ATCC 11845株中的基因RA0C_RS08070编码一种铁螯合酶HemH,该酶主要作用是将铁与卟啉结合而产生血红素,参与了血红素合成过程的最后一步。本研究鉴定了HemH参与血红素利用的功能,并对hemH缺失株进行转录组学检测及分析。

1 材料与方法

1.1 菌株及试剂

菌株RA ATCC 11845由本实验室保存;RA ATCC 11845 Δ hemH、RA ATCC 11845 Δ hemH pLMF03::hemH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;培养基购自北京索莱宝科技有限公司。

1.2 引物的设计与合成

本研究所使用基因序列来自NCBI数据库,引物序列由深圳华大基因股份有限公司合成(表1)。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

Primer	Sequence (5'→3')
<i>hemH</i> upP1	ATTCTATCGTCTAAGTTGGTTTCCGTATTTTTGCAGTTCC
<i>hemH</i> upP2	TCGTAAGACTGGAAAGTGGTAGTTTTGTTTTAGCGTGATT
<i>hemH</i> ermP1	AATCACGCTAAAACAAAACACTACCCTTTCCAGTCTTACGA
<i>hemH</i> ermP2	TCTAAGGTTTCTAAACAGTCCGACTTTGAACTACGAAGGA
<i>hemH</i> downP1	TCCTTCGTAGTTCAAAGTCGGACTGTTTAGAAACCTTAGA
<i>hemH</i> downP2	TTATCAAGCATTCTTGTATTACAGACCTTTCCGGAGCTAAC
<i>hemH</i> compP1	CATGCCATGGATGTCAAAAAAAGGGATATTATTAG
<i>hemH</i> compP2	<u>GACTAGT</u> TTAGCTTAAATAGAAAATTTTTTAATTC
<i>erm</i> P1	ACCACTTTCCAGTCTTACGA
<i>erm</i> P2	CGACTTTGAACTACGAAGGA
<i>RA0C_RS04880</i> qPCR1	TCTGATGTTTCTCCTGATTTCGT
<i>RA0C_RS04880</i> qPCR2	CACATACCGCAAATACCCTC
<i>RA0C_RS09500</i> qPCR1	AAATCCCTATCCTACAAGCCT
<i>RA0C_RS09500</i> qPCR2	AGCGGATAAATCTTGTGCAG
<i>RA0C_RS02395</i> qPCR1	ATTGATGCGAGTGATATGATGG
<i>RA0C_RS02395</i> qPCR2	CAGGGTATTGGAAAGAGTAGGT
<i>RA0C_RS04320</i> qPCR1	GGCTATCAAGATGTTGCTGAC
<i>RA0C_RS04320</i> qPCR2	CCTCCATTACAATCTGCCCA
<i>RA0C_RS03255</i> qPCR1	ATATTCCACCAGCACCTAGAG
<i>RA0C_RS03255</i> qPCR2	TCATCAGAAAGACCAGACGA
<i>RA0C_RS07980</i> qPCR1	CACTAGGTGCTACCCCTAACCATAA
<i>RA0C_RS07980</i> qPCR2	TGTTCTACGCATTTGTTTCCGTC
<i>RA0C_RS01505</i> qPCR1	TCGCTGTACTTAGGCATCAC
<i>RA0C_RS01505</i> qPCR2	TCCAAATAACGAACATCTTCGG
<i>RA0C_RS06075</i> qPCR1	CGTATCAATCAACAGAACACCT
<i>RA0C_RS06075</i> qPCR2	AAGTAAATCCTTCAGCACCGA
<i>RA0C_RS03955</i> qPCR1	CTAAAGTACGGTGGAGATGC
<i>RA0C_RS03955</i> qPCR2	TTTACCATTGCTGATGCCTG
<i>RA0C_RS04890</i> qPCR1	GAATGGTGCTAAGGCTAACTC
<i>RA0C_RS04890</i> qPCR2	CATCGCTAGGATCTCCTTCTC
<i>RA0C_RS04580</i> qPCR1	CCAGAGCAGATATTAGAAGGGT
<i>RA0C_RS04580</i> qPCR2	CCGTAGCTTTCTAACAATGCC
<i>RA0C_RS02400</i> qPCR1	GCCAACTTATCAGAAGAACCC
<i>RA0C_RS02400</i> qPCR2	CAAGTTATCAGCACCCATACC
<i>RA0C_RS02890</i> qPCR1	AAACACTTATGACCTACTCCGA
<i>RA0C_RS02890</i> qPCR2	GTTTAAATAGCGTTCAGAAGCC
<i>RA0C_RS09495</i> qPCR1	CCAGGAACAGTAAAGGTGAC
<i>RA0C_RS09495</i> qPCR2	TTTAGAGCATCACTTCTACCCA
<i>RA0C_RS02380</i> qPCR1	AAACAGTAGAGGAGAAGCCAC
<i>RA0C_RS02380</i> qPCR2	GACAACCTCAAACAATCTGACCC
<i>RA0C_RS04310</i> qPCR1	GGAGATAAAGAGGCTGAGGA
<i>RA0C_RS04310</i> qPCR2	CTCCATATTCATACCGCCAC
<i>RA0C_RS00850</i> qPCR1	CACAAGCAAGTATTAGACACGA
<i>RA0C_RS00850</i> qPCR2	GCTTCTGTTTCTTTGGATACCT
<i>RA0C_RS08180</i> qPCR1	CCATACTAAACACCATCAAGCC
<i>RA0C_RS08180</i> qPCR2	CACCACCATTGTTTCTTACGG
<i>RA0C_RS07245</i> qPCR1	CACAAGGACTAACCAATGGAG
<i>RA0C_RS07245</i> qPCR2	TGAGGACTAAATGGAGGCTG
<i>recA</i> qPCR1	TGAAACTAGGTGATGGTACG
<i>recA</i> qPCR2	CTTAGGATAACCGCTACTC

The underline indicates restriction enzyme sites.

1.3 RA ATCC 11845 Δ hemH 的构建

RA ATCC 11845 Δ hemH 缺失株采用自然转化的方法构建^[25-27]。具体步骤如下: 通过 PCR 扩增 hemH 基因上游片段 up、下游片段 down 以及红霉素(erythromycin, Erm)抗性基因片段, 并通过融合 PCR 的方式构建 hemH up-erm-down 片段, 使用试剂盒纯化回收后与 RA ATCC 11845 进行自然转化, 并涂布于含红霉素抗性(1 μ g/mL)的血平板上进行同源重组菌株的筛选, 使用引物 hemH upP1/hemH downP2 和 erm P1/P2 进行 PCR 鉴定, 并将正确的菌株命名为 RA ATCC 11845 Δ hemH。

1.4 RA ATCC 11845 Δ hemH pLMF03::hemH 的构建

RA ATCC 11845 Δ hemH pLMF03::hemH 回补株采用接合转移的方法构建^[22]。具体步骤如下: 通过 PCR 扩增目的基因 hemH, 并克隆至质粒 pLMF03, 构建为重组质粒 pLMF03::hemH。将重组质粒转入供体菌 *Escherichia coli* S17-1, 涂布于含氨苄青霉素(100 μ g/mL)的 LB 平板上进行抗性筛选, 用引物对 hemH compP1/hemH compP2 进行 PCR 鉴定, 鉴定正确的菌株即为 *E. coli* S17-1 pLMF03::hemH。将供体菌与受体菌 RA ATCC 11845 Δ hemH 以 1:4 混合, 将混合液布于滤膜上, 将滤膜放置血平板上培养, 使用氯化镁将菌体洗下, 并涂布于含卡那霉素(50 μ g/mL)和头孢西丁(1 μ g/mL)的血平板上进行筛选, 用引物对 hemH compP1/hemH compP2 进行 PCR 鉴定, 鉴定正确的菌株即为 RA ATCC 11845 Δ hemH pLMF03::hemH。

1.5 生长曲线

比较 RA ATCC 11845 (wild type, WT)、RA ATCC 11845 Δ hemH (Δ hemH) 和 RA ATCC 11845 Δ hemH pLMF03::hemH (Δ hemH^c) 菌株分别在 Giolitti-Cantoni 肉汤(Giolitti-Cantoni broth, GCB)培养基以及 GCB 添加 10 μ mol/L 牛血红蛋白(haemoglobin, Hb)液体培养基中的生长情况。

具体步骤如下: 将菌株用血平板复苏, 刮取适量菌体至 GCB 液体培养基中, 调整 OD 为 0.1, 接至 20 mL GCB 或 GCB 添加牛血红蛋白的液体培养基中, 置于 37 $^{\circ}$ C 摇床继续培养, 每 2 h 测量一次 OD₆₀₀, 实验重复 3 次。以时间为横坐标, 菌液 OD₆₀₀ 值为纵坐标, 绘制生长曲线。

1.6 活菌数测定

将 Δ hemH 从血平板上刮至 GCB 液体培养基中, 调整 OD 为 0.1, 接至 20 mL GCB 液体培养基中, 置于 37 $^{\circ}$ C 摇床继续培养, 在第 0、8、16 h 取出 100 μ L, 10 倍梯度稀释后, 取 100 μ L 涂布于血平板上, 计活菌数, 实验重复 3 次。

1.7 转录组检测及分析

将亲本株(WT)和 Δ hemH 从血平板上刮至 GCB 液体培养基中, 调整 OD 为 1, 在 GCB 液体培养基中培养 2 h, 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, 并用 NanoDrop 2000 测定 RNA 纯度, 随后送至欧易生物公司进行质检, 质检合格后进行转录组学检测。转录组原始数据上传到 NCBI 数据库(登录号为 SRP409315)。差异表达基因筛选标准为 $P < 0.01$ 。差异表达基因分别进行基因本体论(gene ontology, GO)功能富集分析和京都基因和基因组百科全书(Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)通路富集分析。

1.8 上调和下调基因的实时荧光定量 PCR 验证

为验证转录组学数据的可靠性, 按照同样的转录组送样方法(见 2.5), 提取 WT 和 Δ hemH 的 RNA。按照反转录程序, 将 RNA 样品进行 20 μ L 体系反转录为 cDNA。分别选取转录组中上调和下调的各 10 个基因, 所使用引物序列见表 1。使用实时荧光定量 PCR (quantitative real-time PCR)检测基因表达量。

1.9 统计学分析

采用 GraphPad Prism 9.4.1 软件数据处理绘

图, 并以 t 检验(t -test)进行统计学分析, 当分析结果为 $P < 0.05$ 时表示有统计学差异。

2 结果与分析

2.1 RA ATCC 11845 Δ *hemH* 和 RA ATCC 11845 Δ *hemH* pLMF03::*hemH* 的构建

鸭疫里氏杆菌 ATCC 11845 株中的 *RA0C_RS08070* 基因被注释为铁螯合酶 HemH, 与大肠杆菌 HemH 的氨基酸同源率为 37.5%。为了研究该基因的功能, 本研究首先在鸭疫里氏杆菌 ATCC 11845 株中对该基因进行缺失株和回补株的构建。自然转化用 *hemH up-erm-down* 片段作为底物 DNA, RA ATCC 11845 作为受体菌, 在含有红霉素抗性的平板上筛选。结果如图 1 所示, 通过 PCR 能够扩增出 *hemH up-erm*、*erm-hemH down* 片段, 说明同源重组成功, 并且位置正确, 表明 RA ATCC 11845 Δ *hemH* 缺失株构建成功。

用 *E. coli* S17-1 pLMF03::*hemH* 作为供体菌, RA ATCC 11845 Δ *hemH* 作为受体菌, 以 1:4 混合并布于滤膜上, 在血平板上进行培养后用氯化镁将菌体洗下, 在含有卡那霉素和头孢西丁抗性的血平板上进行筛选。结果如图 2 所示, 通过 PCR 能够扩增出 *hemH* 片段, 表明, RA ATCC 11845 Δ *hemH* pLMF03::*hemH* 回补株构建成功。

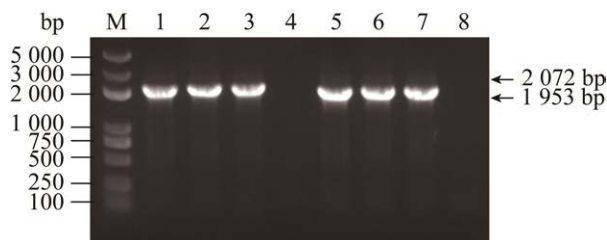


图 1 PCR 鉴定 RA ATCC 11845 Δ *hemH* 的电泳图
Figure 1 The identification of RA ATCC 11845 Δ *hemH* by PCR. M: DNA marker; Lane 1–2: The amplification of *hemH up-erm* fragment; Lane 3: Positive control; Lane 4: Negative control; Lane 5–6: The amplification of *erm-hemH down* fragment; Lane 7: Positive control; Lane 8: Negative control.

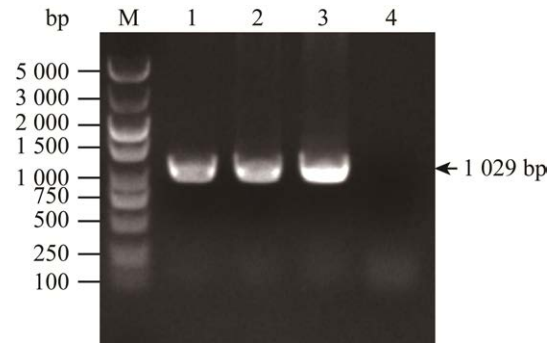


图 2 RA ATCC 11845 Δ *hemH* pLMF03::*hemH* 回补株鉴定电泳图

Figure 2 The identification of RA ATCC 11845 Δ *hemH* pLMF03::*hemH* by PCR. M: DNA marker; Lane 1–2: The amplification of *hemH* fragment; Lane 3: Positive control; Lane 4: Negative control.

2.2 HemH 参与了血红素的合成

在 GCB 培养基无外源血红素的成分^[25], 如果细菌可以在此培养基生长, 则说明细菌可以自身合成血红素。在宿主体内, 绝大多数血红素以血红蛋白的形势存在, 鸭疫里氏杆菌可以利用血红蛋白中的血红素^[22]。本研究通过测定各菌株在 GCB 液体培养基以及 GCB 液体培养基添加牛血红蛋白(Hb)的生长情况来判定 HemH 是否参与血红素的合成。结果如图 3A 所示, 亲本株 (WT) 在 GCB 培养基生长良好, 说明该菌有自身合成血红素的能力。然而, 与亲本株 (WT) 相比, Δ *hemH* 在 GCB 液体培养基中几乎不生长, 回补株 Δ *hemH*^c 的生长水平和亲本株 (WT) 一致。如图 3B 所示, 在添加了 10 μ mol/L 牛血红蛋白的 GCB 液体培养基中, 亲本株 WT、 Δ *hemH* 和 Δ *hemH*^c 的生长水平无明显差异。

为验证 Δ *hemH* 在 GCB 液体培养基中是否存活, 在培养的第 0、8、16 h 进行活菌计数, 结果如图 4 所示, 与第 0 小时的活菌数相比, 在第 8 和 16 小时的活菌数既无明显增加也无减少, 表明 Δ *hemH* 确实无法在 GCB 液体培养基中生长。综上结果表明, HemH 参与血红素的合成。

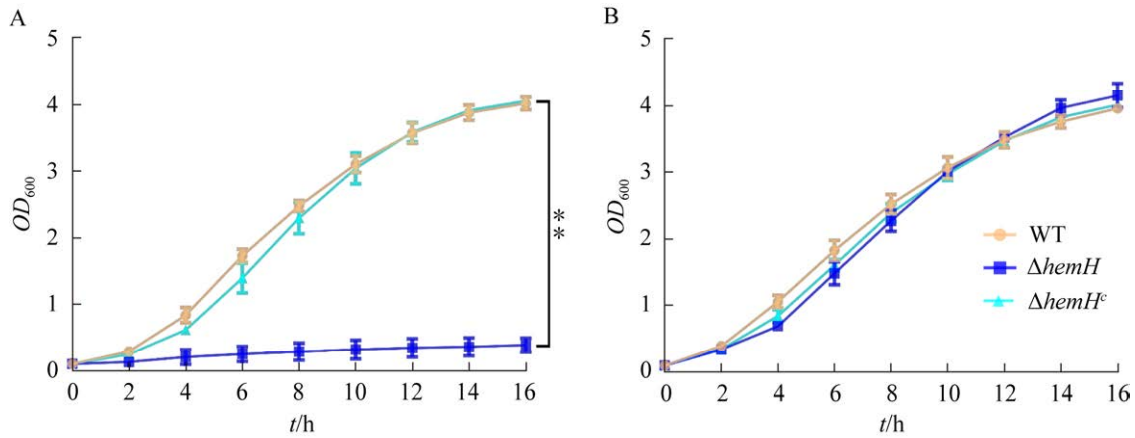


图 3 不同菌株在 GCB (A)及 GCB 含 10 μmol/L 血红蛋白液体培养基(B)中的生长曲线
 Figure 3 The growth curves for different strains in GCB (A) and GCB supplemented by 10 μmol/L Hb (B). The data represents the means±SD from three replicate experiments. **: P<0.01.

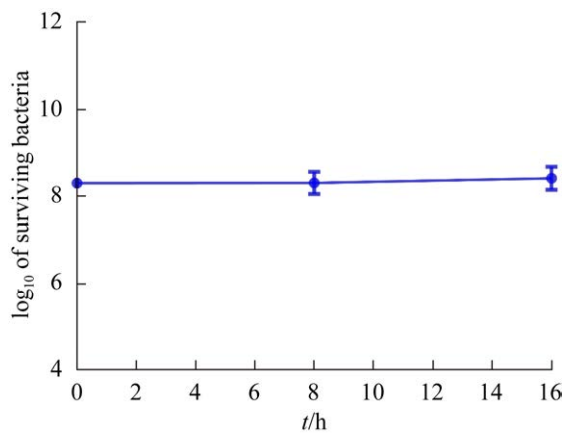


图 4 ΔhemH 在 0、8 和 16 h 的活菌数
 Figure 4 The viable count of ΔhemH at 0, 8 and 16 h. The data represents the means±SD from three replicate experiments.

2.3 RA ATCC 11845ΔhemH 转录组测序及分析

HemH 是血红素合成过程最后一步所需的酶,是将铁插入卟啉中心而形成血红素的铁螯合酶^[4]。因此当 hemH 缺失时,将无法合成血红素,从而导致铁离子和卟啉的积累。而这 2 种物质的积累对细菌都是有毒性的,铁离子会与过氧化氢发生芬顿反应,产生活性氧,对细菌造成氧化应

激损伤^[28]。还原的卟啉是促氧化剂,而氧化的卟啉具有光敏性,产生单线态和活性自由基,同样会对细菌造成氧化应激损伤^[29-30]。为探究鸭疫里氏杆菌铁离子和卟啉解毒机制,本研究对亲本株 WT 和 ΔhemH 进行转录组检测及分析。

与亲本株相比,ΔhemH 有 354 个显著差异表达基因[log₂ (fold change)≥1 或≤-1],包括 199 个上调基因,155 个下调基因(图 5)。为验证转

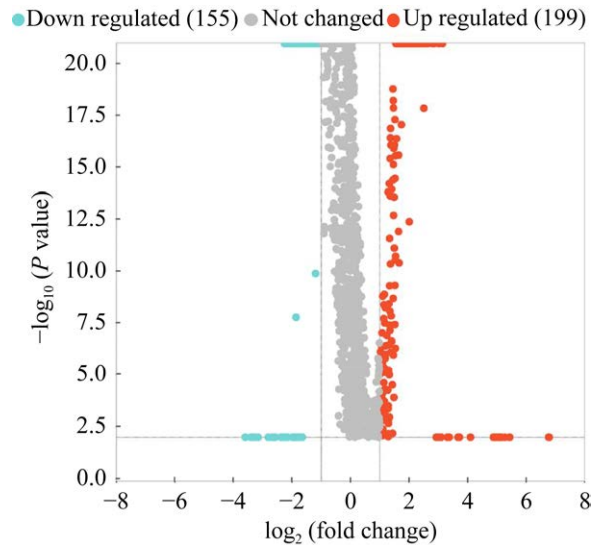


图 5 差异表达基因火山图
 Figure 5 Volcano plot of differential expression genes.

录组数据的可靠性, 随机挑选 20 个差异表达基因(10 个上调基因和 10 个下调基因), 以 *recA* 为内参基因, 用荧光定量方法进行验证, 结果表明, 荧光定量结果和转录组结果具有一致性(图 6)。对差异表达基因进行 GO 功能富集分析, 分为 3 个方面的功能, 分别是分子功能、生物过程和细胞组分。发现显著上调和下调的基因主要富集在催化活性、细胞过程、代谢过程、细胞组分、结

合、膜组分和生物调节等(图 7)。

KEGG 通路富集分析表明, 显著上调表达的基因被富集到代谢途径、次生代谢物的生物合成、不同环境的代谢、RNA 降解、色氨酸/丙氨酸/天冬氨酸/谷氨酸代谢、细胞周期、ABC 转运体、过氧化物酶、信号通路、碳代谢、抗生素生物合成、错配修复等通路(图 8A)。显著下调表达基因被富集到代谢途径、氧化磷酸化、次

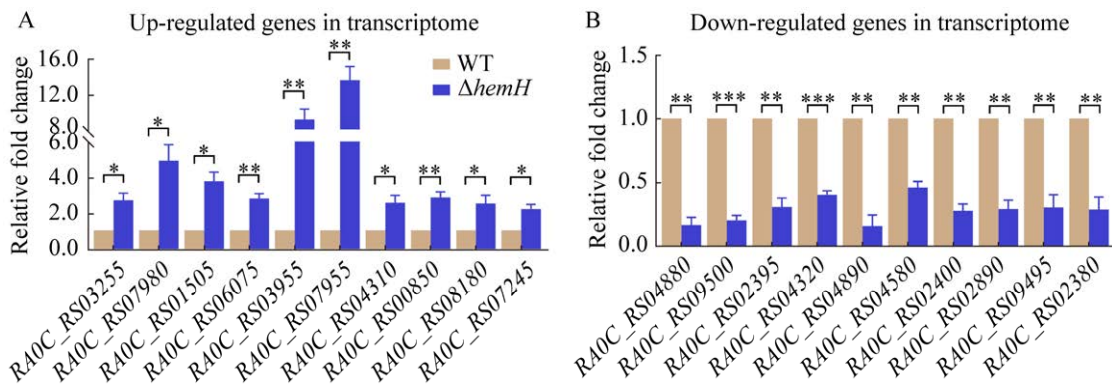


图 6 上调(A)和下调基因(B)的实时荧光定量 PCR 验证结果

Figure 6 Quantitative real-time PCR verification results of up-regulated genes (A) and down-regulated genes (B). The data represents the means \pm SD from three replicate experiments. *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$.

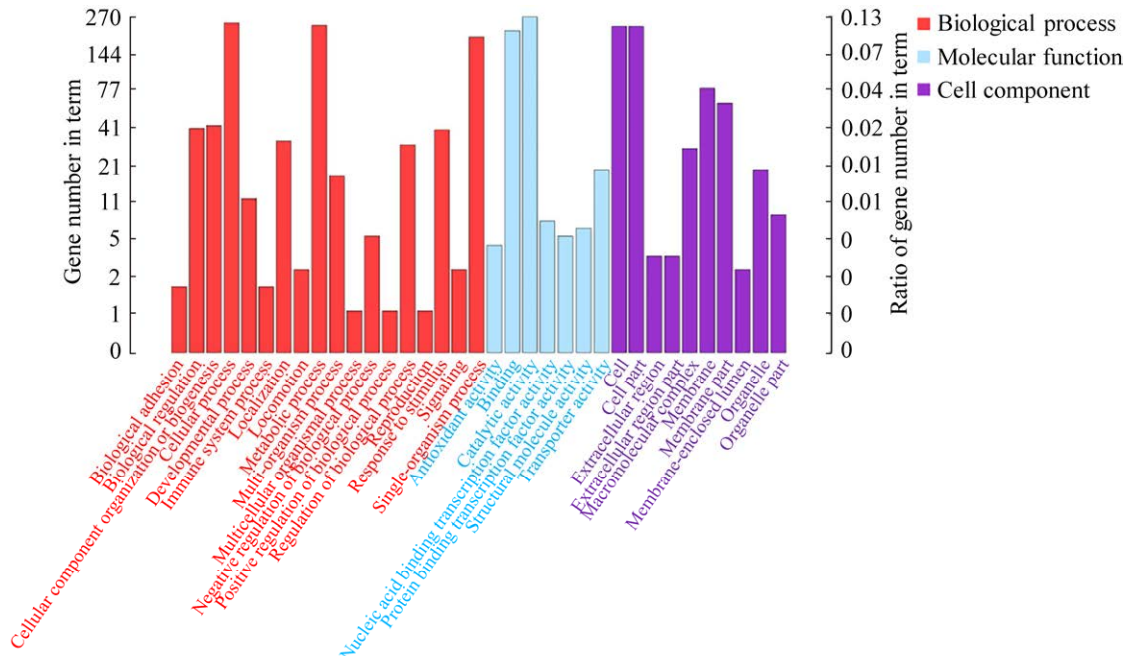


图 7 差异表达基因 GO 功能富集分析

Figure 7 GO functional enrichment analysis of differential expression genes.

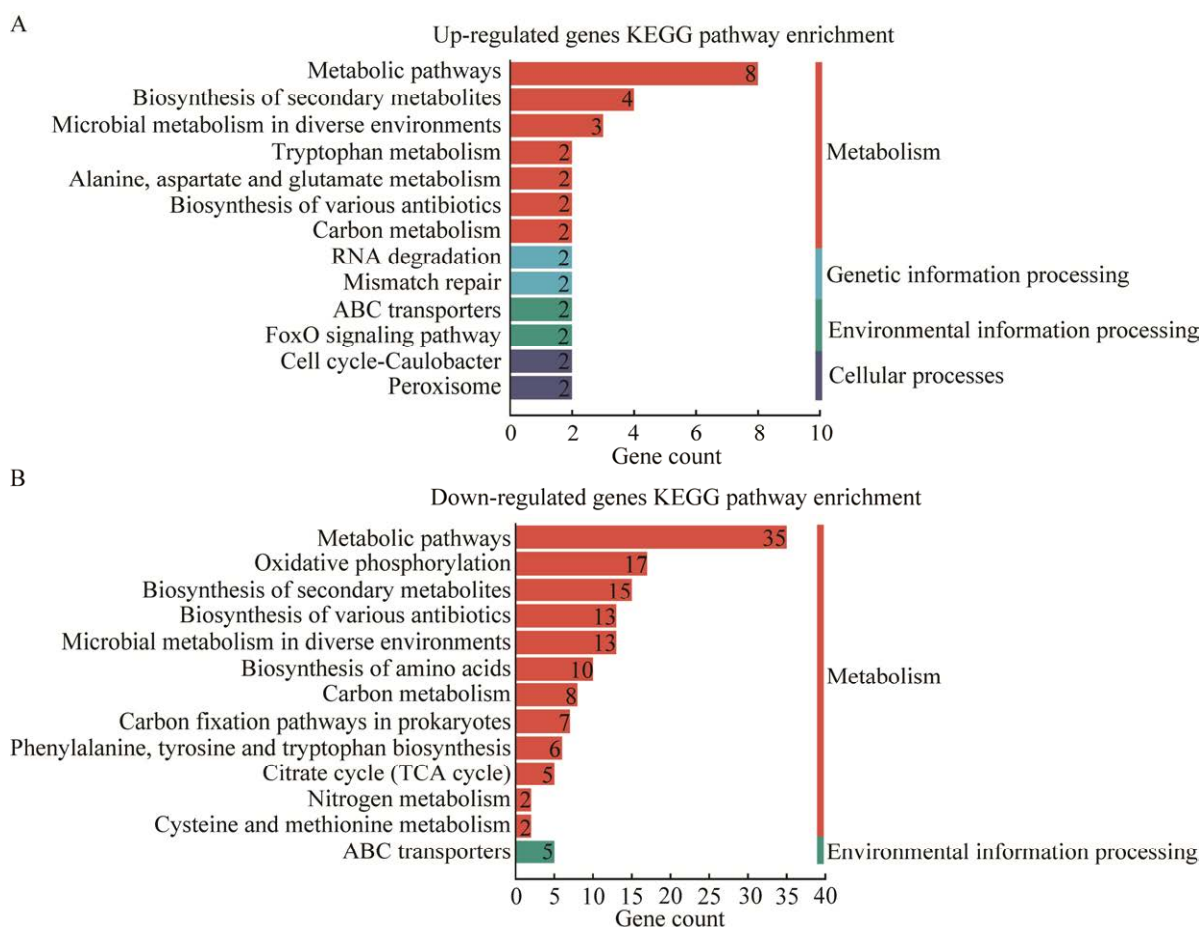


图 8 上调基因(A)和下调基因(B)的 KEGG 通路富集分析

Figure 8 KEGG pathway enrichment analysis of up-regulated genes (A) and down-regulated genes (B).

生代谢物的生物合成、抗生素生物合成、氨基酸的合成、碳代谢、碳固定途径、三羧酸循环、ABC 转运体、氮代谢、半胱氨酸和蛋氨酸代谢等通路(图 8B)。此结果说明, HemH 缺失后影响了该菌的多种代谢途径。

3 讨论与结论

绝大多数细菌需要血红素以维持各种生命活动, 包括呼吸作用和信号传递等。在脊椎动物中, 血红素是宿主中最大的铁储存库, 也是病原菌最主要的铁离子来源^[3]。细菌可以通过自身合成或者从外界摄取以满足血红素的需求, 但是过

多的血红素对细菌是有毒的, 血红素本身、血红素的代谢产物铁和卟啉等都会对细菌造成不同程度的氧化应激损伤^[3,31-33]。为了缓解血红素毒性损伤, 细菌会利用抵抗血红素的系统, 包括外排、螯合和降解^[3]。例如金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)利用双组份系统 HssRS 感应血红素, 并将信号传递给外排系统 HrtAB, HrtAB 将血红素排出^[34-35]; 艰难梭菌(*Clostridium difficile*)利用调节子 HsmR 感应血红素并激活蛋白 HsmA 以螯合血红素^[36]; 金黄色葡萄球菌利用 IsdG 和 IsdI 血红素加氧酶将胞内的血红素降解释放游离铁^[37]。

在鸭疫里氏杆菌 ATCC 11845 菌株中, *RA0C_RS08070* 基因注释为铁螯合酶 HemH, 已知 HemH 是在血红素合成的最后一步中发挥功能, 将铁与卟啉结合而形成血红素。通过序列比对分析, *hemH* 基因在鸭疫里氏杆菌中的同源性较高, 为 95.53%–99.51%。通常鸭疫里氏杆菌需要在血平板生长, 说明血红素对其生长非常重要。然而, 该菌是否也可以合成血红素未见报道。本研究首先构建了 *hemH* 基因缺失株及回补株, 并与亲本株比较了在 GCB 及 GCB 添加血红蛋白液体培养基中的生长情况。结果表明, *hemH* 基因缺失株在 GCB 液体培养基中不生长, 在 GCB 添加 10 $\mu\text{mol/L}$ 牛血红蛋白液体培养基中的恢复生长。此结果说明, HemH 参与鸭疫里氏杆菌中血红素的合成。

hemH 基因缺失后, 铁和卟啉会逐渐积累, 对细菌造成氧化应激损伤。鸭疫里氏杆菌抵抗铁离子和卟啉毒性的机制未完全被揭示。本研究进一步测定了 *hemH* 基因缺失株转录组。与亲本株相比, *hemH* 缺失株中检测到 199 个显著上调基因, 155 个显著下调基因。进行 GO 功能富集分析发现, 主要集中在代谢功能、细胞活动和生物调节等方面; 进行 KEGG 通路富集分析发现, *hemH* 缺失主要显著影响代谢途径、次生代谢产物的合成、氨基酸代谢与合成、ABC 转运系统、碳代谢、抗生素生物合成、氮代谢、信号传递、氧化磷酸化和三羧酸循环等途径。在显著上调的基因中, 包含参与抗氧化应激的 Dps (RA0C_RS07980)^[27]、过氧化氢酶(RA0C_RS07955, RA0C_RS01155)、一氧化氮合成酶(RA0C_RS09520)和血红素结合蛋白(RA0C_RS06720, RA0C_RS01500), 参与铁硫簇形成的蛋白(RA0C_RS06695), 参与保护 DNA 的 DNA 结合蛋白(RA0C_RS01785, RA0C_RS09730, RA0C_RS01850, RA0C_RS00850), 主要易化子超家族

(MFS)外排蛋白(RA0C_RS03055), ATP 结合盒超家族(ATP binds the box superfamily, ABC)转运蛋白(RA0C_RS06825, RA0C_RS04300, RA0C_RS03430), 超氧化物歧化酶(RA0C_RS08180)和 ATP 酶(RA0C_RS08525, RA0C_RS07245, RA0C_RS09940)等。有研究报道, MFS 家族蛋白和 ATP 酶参与铁或血红素的外排, 例如鼠伤寒沙门氏菌 (*Salmonella typhi*) 中的 MFS 家族外排泵 IceT 参与铁离子的外排^[38], 艰难梭菌中的 MFS 外排蛋白 HatT 参与血红素的外排^[39], 金黄色葡萄球菌中的 ATP 酶 HrtA 和通透酶 HrtB 协同血红素的外排^[35], 链球菌(*Streptococcus*)中的 ATP 酶 PmtA 参与铁离子的外排等^[40-41]。因此, 在显著上调的基因中, 就有可能参与抵抗血红素的毒性, 需要在后续研究中逐一鉴定。

在显著下调的基因中, 包含有参与呼吸作用的呼吸复合物 I 和 II 的酶(RA0C_RS04550, RA0C_RS04535, RA0C_RS04560, RA0C_RS04540, RA0C_RS04515, RA0C_RS04530, RA0C_RS04565, RA0C_RS04520, RA0C_RS04545, RA0C_RS04585, RA0C_RS04525, RA0C_RS04570, RA0C_RS04580, RA0C_RS04890, RA0C_RS04885, RA0C_RS04880)、细胞色素氧化酶(RA0C_RS07000, RA0C_RS07020, RA0C_RS07005, RA0C_RS02380)、铁硫簇修复蛋白(RA0C_RS09500)、参与三羧酸循环的酶(RA0C_RS07915)、金属转运蛋白(RA0C_RS04320, RA0C_RS05615, RA0C_RS02395)等。通过 GO 功能富集分析和 KEGG 通路富集分析发现, *hemH* 缺失后, 对代谢、三羧酸循环、信号传递和转运蛋白方面影响较大。综上所述, 当 *hemH* 缺失后, 参与呼吸作用的血红素缺乏, 导致呼吸作用显著降低, 从而影响代谢活动, 三羧酸循环等, 同时编码血红素结合的基因上调。由于铁和卟啉积累产生氧化应激损伤, 导致编码金属离子外排泵、氧化应激抵抗的基因上调。

总之, 本研究鉴定了 HemH 参与血红素的

合成, 检测及分析了亲本株, *hemH* 缺失株的转录组, 发现了 *hemH* 缺失后使得大量基因的表达显著改变, 以适应代谢的变化, 这为研究鸭疫里氏杆菌的 HemH 的功能奠定基础。

参考文献

- [1] CONTRERAS H, CHIM N, CREDALI A, GOULDING CW. Heme uptake in bacterial pathogens[J]. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2014, 19: 34-41.
- [2] ANZALDI LL, SKAAR EP. Overcoming the heme paradox: heme toxicity and tolerance in bacterial pathogens[J]. *Infection and Immunity*, 2010, 78(12): 4977-4989.
- [3] CHOBY JE, SKAAR EP. Heme synthesis and acquisition in bacterial pathogens[J]. *Journal of Molecular Biology*, 2016, 428(17): 3408-3428.
- [4] DAILEY HA, DAILEY TA, GERDES S, JAHN D, JAHN M, O'BRIAN MR, WARREN MJ. Prokaryotic heme biosynthesis: multiple pathways to a common essential product[J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR*, 2017, 81(1): e00048-e00016.
- [5] HAMZA I, DAILEY HA. One ring to rule them all: trafficking of heme and heme synthesis intermediates in the metazoans[J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2012, 1823(9): 1617-1632.
- [6] DAILEY HA, GERDES S, DAILEY TA, BURCH JS, PHILLIPS JD. Noncanonical coproporphyrin-dependent bacterial heme biosynthesis pathway that does not use protoporphyrin[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2015, 112(7): 2210-2215.
- [7] LOUIE GV, BROWNLIE PD, LAMBERT R, COOPER JB, BLUNDELL TL, WOOD SP, WARREN MJ, WOODCOCK SC, JORDAN PM. Structure of porphobilinogen deaminase reveals a flexible multidomain polymerase with a single catalytic site[J]. *Nature*, 1992, 359(6390): 33-39.
- [8] BUNG N, PRADHAN M, SRINIVASAN H, BULUSU G. Structural insights into *E. coli* porphobilinogen deaminase during synthesis and exit of 1-hydroxymethylbilane[J]. *PLoS Computational Biology*, 2014, 10(3): e1003484.
- [9] LAYER G, REICHEL T, JAHN D, HEINZ DW. Structure and function of enzymes in heme biosynthesis[J]. *Protein Science: a Publication of the Protein Society*, 2010, 19(6): 1137-1161.
- [10] CAVALLARO G, DECARIA L, ROSATO A. Genome-based analysis of heme biosynthesis and uptake in prokaryotic systems[J]. *Journal of Proteome Research*, 2008, 7(11): 4946-4954.
- [11] HEINEMANN IU, JAHN M, JAHN D. The biochemistry of heme biosynthesis[J]. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2008, 474(2): 238-251.
- [12] BOYNTON TO, DAUGHERTY LE, DAILEY TA, DAILEY HA. Identification of *Escherichia coli* HemG as a novel, menadione-dependent flavodoxin with protoporphyrinogen oxidase activity[J]. *Biochemistry*, 2009, 48(29): 6705-6711.
- [13] KOBAYASHI K, MASUDA T, TAJIMA N, WADA H, SATO N. Molecular phylogeny and intricate evolutionary history of the three isofunctional enzymes involved in the oxidation of protoporphyrinogen IX[J]. *Genome Biology and Evolution*, 2014, 6(8): 2141-2155.
- [14] PORRA RJ, FALK JE. The enzymic conversion of coproporphyrinogen 3 into protoporphyrin 9[J]. *Biochemical Journal*, 1964, 90(1): 69-75.
- [15] DAILEY HA, DAILEY TA. Protoporphyrinogen oxidase of *Myxococcus xanthus*[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1996, 271(15): 8714-8718.
- [16] DAILEY TA, DAILEY HA. Identification of an FAD superfamily containing protoporphyrinogen oxidases, monoamine oxidases, and phytoene desaturase. Expression and characterization of phytoene desaturase of *Myxococcus xanthus*[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1998, 273(22): 13658-13662.
- [17] CAMADRO JM, LABBE P. Purification and properties of ferrocyclase from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Evidence for a precursor form of the protein[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1988, 263(24): 11675-11682.
- [18] OREN A, GARRITY GM. List of new names and new combinations previously effectively, but not validly, published[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2020, 70(1): 1-5.

- [19] 程安春, 汪铭书, 陈孝跃, 朱德康, 黄城, 刘菲, 周毅, 郭宇飞, 刘兆宇, 方鹏飞. 我国鸭疫里默氏杆菌血清型调查及新血清型的发现和病原特性[J]. 中国兽医学报, 2003, 23(4): 320-323.
CHENG AC, WANG MS, CHEN XY, ZHU DK, HUANG C, LIU F, ZHOU Y, GUO YF, LIU ZY, FANG PF. Epidemiology and new serotypes of *Riemerella anatipestifer* isolated from ducks in China and studies on their pathogenic characteristics[J]. Chinese Journal of Veterinary, 2003, 23(4): 320-323 (in Chinese).
- [20] LIU MF, LIU SQ, HUANG M, WANG YL, WANG MY, TIAN X, LI L, YANG ZS, WANG MS, ZHU DK, JIA RY, CHEN S, ZHAO XX, YANG Q, WU Y, ZHANG SQ, HUANG J, OU XM, MAO S, GAO Q, et al. An exposed outer membrane hemin-binding protein facilitates hemin transport by a TonB-dependent receptor in *Riemerella anatipestifer*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2021, 87(15): e0036721.
- [21] 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 hemin utilization[J]. PLoS One, 2015, 10(5): e0127506.
- [22] LIU MF, WANG MY, ZHU DK, WANG MS, JIA RY, CHEN S, SUN KF, YANG Q, WU Y, CHEN XY, BIVILLE F, CHENG AC. Investigation of TbfA in *Riemerella anatipestifer* using plasmid-based methods for gene over-expression and knockdown[J]. Scientific Reports, 2016, 6: 37159.
- [23] LIU MF, HUANG M, HUANG L, BIVILLE F, ZHU DK, WANG MS, JIA RY, CHEN S, ZHAO XX, YANG Q, WU Y, ZHANG SQ, HUANG J, TIAN B, CHEN XY, LIU YY, ZHANG L, YU YL, PAN LC, 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.
- [24] HUANG M, LIU MF, LIU JJ, ZHU DK, TANG QY, JIA RY, CHEN S, ZHAO XX, YANG Q, WU Y, ZHANG SQ, HUANG J, OU XM, MAO S, GAO Q, SUN D, WANG MS, CHENG AC. Functional characterization of fur in iron metabolism, oxidative stress resistance and virulence of *Riemerella anatipestifer*[J]. Veterinary Research, 2021, 52(1): 48.
- [25] LIU MF, ZHANG L, HUANG L, BIVILLE F, ZHU DK, WANG MS, JIA RY, CHEN S, SUN KF, YANG Q, WU Y, CHEN XY, CHENG AC. Use of natural transformation to establish an easy knockout method in *Riemerella anatipestifer*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2017, 83(9): e00127-e00117.
- [26] LIU MF, HUANG Y, LIU JJ, BIVILLE F, ZHU DK, WANG MS, JIA RY, CHEN S, ZHAO XX, YANG Q, WU Y, ZHANG SQ, CHEN XY, LIU YY, ZHANG L, YOU Y, YU YL, CHENG AC. Multiple genetic tools for editing the genome of *Riemerella anatipestifer* using a counterselectable marker[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2018, 102(17): 7475-7488.
- [27] TIAN X, HUANG L, WANG MS, BIVILLE F, ZHU DK, JIA RY, CHEN S, ZHAO XX, YANG Q, WU Y, ZHANG SQ, HUANG J, ZHANG L, YU YL, CHENG AC, LIU MF. 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.
- [28] BRADLEY JM, SVISTUNENKO DA, WILSON MT, HEMMINGS AM, MOORE GR, Le BRUN NE. Bacterial iron detoxification at the molecular level[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2020, 295(51): 17602-17623.
- [29] NITZAN Y, WEXLER HM, FINEGOLD SM. Inactivation of anaerobic bacteria by various photosensitized porphyrins or by hemin[J]. Current Microbiology, 1994, 29(3): 125-131.
- [30] CELIS AI, CHOBY JE, KENTRO J, SKAAR EP, DuBOIS JL. Control of metabolite flux during the final steps of heme *b* biosynthesis in Gram-positive bacteria[J]. Biochemistry, 2019, 58(52): 5259-5270.
- [31] WAKEMAN CA, HAMMER ND, STAUFF DL, ATTIA AS, ANZALDI LL, DIKALOV SI, CALCUTT MW, SKAAR EP. Menaquinone biosynthesis potentiates haem toxicity in *Staphylococcus aureus*[J]. Molecular Microbiology, 2012, 86(6): 1376-1392.
- [32] VÍTEK L, OSTROW JD. Bilirubin chemistry and metabolism, harmful and protective aspects[J]. Current Pharmaceutical Design, 2009, 15(25): 2869-2883.
- [33] NIR U, LADAN H, MALIK Z, NITZAN Y. *In vivo* effects of porphyrins on bacterial DNA[J]. Journal of

- Photochemistry and Photobiology B, Biology, 1991, 11(3/4): 295-306.
- [34] STAUFF DL, TORRES VJ, SKAAR EP. Signaling and DNA-binding activities of the *Staphylococcus aureus* HssR-HssS two-component system required for heme sensing[J]. Journal of Biological Chemistry, 2007, 282(36): 26111-26121.
- [35] STAUFF DL, BAGALEY D, TORRES VJ, JOYCE R, ANDERSON KL, KUECHENMEISTER L, DUNMAN PM, SKAAR EP. *Staphylococcus aureus* HrtA is an ATPase required for protection against heme toxicity and prevention of a transcriptional heme stress response[J]. Journal of Bacteriology, 2008, 190(10): 3588-3596.
- [36] KNIPPEL RJ, WEXLER AG, MILLER JM, BEAVERS WN, WEISS A, de CRÉCY-LAGARD V, EDMONDS KA, GIEDROC DP, SKAAR EP. *Clostridioides difficile* senses and hijacks host heme for incorporation into an oxidative stress defense system[J]. Cell Host & Microbe, 2020, 28(3): 411-421.e6.
- [37] SKAAR EP, GASPAR AH, SCHNEEWIND O. IsdG and IsdI, heme-degrading enzymes in the cytoplasm of *Staphylococcus aureus*[J]. Journal of Biological Chemistry, 2004, 279(1): 436-443.
- [38] FRAWLEY ER, CROUCH ML V, BINGHAM-RAMOS LK, ROBBINS HF, WANG WL, WRIGHT GD, FANG FC. Iron and citrate export by a major facilitator superfamily pump regulates metabolism and stress resistance in *Salmonella typhimurium*[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2013, 110(29): 12054-12059.
- [39] KNIPPEL RJ, ZACKULAR JP, MOORE JL, CELIS AI, WEISS A, WASHINGTON MK, DuBOIS JL, CAPRIOLI RM, SKAAR EP. Heme sensing and detoxification by HatRT contributes to pathogenesis during *Clostridium difficile* infection[J]. PLoS Pathogens, 2018, 14(12): e1007486.
- [40] VANDERWAL AR, MAKTHAL N, PINOCHET-BARROS A, HELMANN JD, OLSEN RJ, KUMARASWAMI M. Iron efflux by PmtA is critical for oxidative stress resistance and contributes significantly to group A *Streptococcus* virulence[J]. Infection and Immunity, 2017, 85(6): e00091-e00017.
- [41] PI HL, HELMANN JD. Ferrous iron efflux systems in bacteria[J]. Metallomics, 2017, 9(7): 840-851.