



# 铜绿假单胞菌 *fur* 基因缺失突变株的构建及其表型分析

马鑫<sup>1,2</sup>, 李雯雯<sup>1,2</sup>, 肖维<sup>1</sup>, 成娟丽<sup>1,2\*</sup>, 林金水<sup>1,2\*</sup>

1 延安大学生命科学学院 陕西省红枣重点实验室, 陕西 延安 716000

2 延安柯龙尼生物科技有限公司, 陕西 延安 716000

马鑫, 李雯雯, 肖维, 成娟丽, 林金水. 铜绿假单胞菌 *fur* 基因缺失突变株的构建及其表型分析[J]. 微生物学报, 2024, 64(3): 917-937.

MA Xin, LI Wenwen, XIAO Wei, CHENG Juanli, LIN Jinshui. Construction and phenotypic characterization of *fur*-deleted mutant of *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2024, 64(3): 917-937.

**摘要:** 铁摄取调节蛋白(ferric uptake regulator, Fur)是控制铜绿假单胞菌铁代谢和毒力的关键调节因子。许多课题组尝试构建铜绿假单胞菌 *fur* 的缺失突变株均失败, 因此铜绿假单胞菌的 *fur* 一直被认为是必需基因, 这导致其生物学功能一直未得到全面的解析。【目的】构建铜绿假单胞菌 *fur* 的缺失突变株, 并对该突变株的表型进行分析。【方法】以铜绿假单胞菌 PAO1 为亲本菌株, 通过同源重组的方法构建 *fur* 缺失突变株, 研究该基因对铜绿假单胞菌生长、铁载体生物合成、抗氧胁迫能力、鞭毛形成、生物被膜形成和毒力等的影响。同时, 通过遗传分析对 *fur* 缺失突变株生长缺陷表型的原因进行探究。【结果】本研究成功构建了铜绿假单胞菌 *fur* 基因的缺失突变株, 发现缺失突变 *fur* 极大地限制了铜绿假单胞菌的生长能力, 并降低了该菌对限铁环境的生长适应性, 但不影响该菌对高铁环境的生长适应性。铜绿假单胞菌  $\Delta fur$  的这种生长缺陷表型是细胞生长增殖变慢造成的, 而不是诱导细胞死亡引起的。然而, 其他异源的 *fur* 基因能完全互补  $\Delta fur$  的这种生长缺陷表型, 暗示铜绿假单胞菌的 Fur 蛋白在功能上不存在独特性。尽管 Fur 与毒素-抗毒素

资助项目: 国家自然科学基金(32070103, 31860012, 32360015); 陕西省秦创原“科学家+工程师”队伍建设项目(2023KXJ-019); 陕西省“特支计划”区域发展人才项目(2020-44); 陕西省普通高等学校青年杰出人才支持计划项目(2018-111); 陕西高校青年创新团队(2022-943); 陕西省大学生创新创业训练计划项目(S202210719132); 延安大学科研计划项目(2023HBZ-001, 2023CGZH-007)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (32070103, 31860012, 32360015), the Qinchuang Yuan ‘Scientist+Engineer’ Team Construction Project of Shaanxi Province (2023KXJ-019), the Regional Development Talent Project of the ‘Special Support Plan’ of Shaanxi Province (2020-44), the Outstanding Young Talent Support Plan Project of the Higher Education Institutions of Shaanxi Province (2018-111), the Youth Innovation Team of Shaanxi Universities (2022-943), the Shaanxi University Student Innovation and Entrepreneurship Training Program (S202210719132), and the Research Project of Yan’an University (2023HBZ-001, 2023CGZH-007).

\*Corresponding authors. E-mail: CHENG Juanli, chengjl-1981@163.com; LIN Jinshui, linjinshui@yau.edu.cn

Received: 2023-10-12; Accepted: 2023-12-06; Published online: 2023-12-14

系统 PacTA 存在功能关联性, 但是铜绿假单胞菌  $\Delta fur$  的这种生长缺陷表型却与 PacT 毒素无关。除了影响铜绿假单胞菌的生长表型, 缺失突变 *fur* 还使铜绿假单胞菌丧失了对铁载体生物合成的抑制作用, 导致该菌对  $H_2O_2$  更敏感并丧失了鞭毛的形成能力, 同时降低了该菌对大蜡螟幼虫的毒力。此外, 缺失突变 *fur* 还显著提升了铜绿假单胞菌的胞内环二鸟苷酸(cyclic diguanylate, c-di-GMP)水平, 从而诱导 *pelF* 和 *pslA* 基因的表达, 进而促进铜绿假单胞菌生物被膜的形成。【结论】*fur* 是可以缺失的非必需基因, 在铜绿假单胞菌的正常生长、铁载体生物合成、抗氧胁迫能力、鞭毛形成、生物被膜形成和毒力等方面都发挥着十分重要的作用, 这为针对铜绿假单胞菌的疫苗和抗菌药物开发奠定了基础。

**关键词:** 铜绿假单胞菌; 铁摄取调节蛋白; 缺失突变; 表型分析; 环二鸟苷酸(c-di-GMP); 鞭毛; 毒力

## Construction and phenotypic characterization of *fur*-deleted mutant of *Pseudomonas aeruginosa*

MA Xin<sup>1,2</sup>, LI Wenwen<sup>1,2</sup>, XIAO Wei<sup>1</sup>, CHENG Juanli<sup>1,2\*</sup>, LIN Jinshui<sup>1,2\*</sup>

1 Shaanxi Key Laboratory of Chinese Jujube, School of Life Sciences, Yan'an University, Yan'an 716000, Shaanxi, China

2 Yan'an Colony Biological Technology Co., Ltd., Yan'an 716000, Shaanxi, China

**Abstract:** Ferric uptake regulator (Fur) is a key regulatory factor of iron metabolism and virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. Many research groups have failed to construct the *fur*-deleted mutant of *P. aeruginosa*, so *fur* has always been considered to be an essential gene in *P. aeruginosa*, and the knowledge of its biological function is limited. **[Objective]** This study aims to construct a *fur*-deleted mutant of *P. aeruginosa* and analyze its phenotypes. **[Methods]** With *P. aeruginosa* PAO1 as the parental strain, the *fur*-deleted mutant was constructed by homologous recombination. After that, we studied the effects of *fur* on the growth, siderophore biosynthesis, resistance to oxygen stress, flagella formation, biofilm formation, and virulence of *P. aeruginosa*. In addition, we explored the cause of the growth defect phenotype of the *fur*-deleted mutant by genetic analysis. **[Results]** The *fur*-deleted mutant of *P. aeruginosa* was successfully constructed. The deletion of *fur* greatly limited the growth of *P. aeruginosa* and reduced the growth adaptability of *P. aeruginosa* to the iron-limited environment, while it did not affect the growth adaptability of *P. aeruginosa* to the iron-rich environment. This growth defect phenotype of  $\Delta fur$  was caused by the slow cell growth and proliferation, rather than by cell death. Interestingly, heterologous *fur* could completely complement the growth defect phenotype of  $\Delta fur$ , suggesting that the Fur of *P. aeruginosa* was not functionally unique. Although there was a functional relationship between Fur and the toxin-antitoxin system PacTA, the growth defect phenotype of *P. aeruginosa*  $\Delta fur$  was not associated with PacT toxin. In addition to affecting the growth phenotype of *P. aeruginosa*, the deletion of *fur* also made *P. aeruginosa* lose the inhibitory effect on siderophore biosynthesis and the ability to form flagella and have increased

sensitivity to  $H_2O_2$  and reduced virulence to *Galleria mellonella* larvae. Moreover, the deletion of *fur* increased the intracellular cyclic diguanylate (c-di-GMP) level of *P. aeruginosa* to induce the expression of *pelF* and *pslA*, thereby promoting the biofilm formation of *P. aeruginosa*. **[Conclusion]** *fur* is a non-essential gene that can be deleted and plays a crucial role in the normal growth, siderophore biosynthesis, resistance to oxygen stress, flagellum formation, biofilm formation, and virulence of *P. aeruginosa*, which lays a foundation for the development of vaccines and agents against *P. aeruginosa*.

**Keywords:** *Pseudomonas aeruginosa*; ferric uptake regulator (Fur); deletion mutation; phenotypic characterization; cyclic diguanylate (c-di-GMP); flagellum; virulence

铁是所有生物进行正常生命活动的必需金属营养元素。对于微生物而言,铁是许多生理代谢过程如呼吸、三羧酸循环、应激反应等所需酶的金属辅因子<sup>[1]</sup>。铁含量过少或过多都会对微生物产生有害影响,胞内铁过少导致微生物因缺乏部分酶促反应的关键金属辅因子而死亡;胞内铁过量时,过多的  $Fe^{2+}$  通过芬顿反应(Fenton reaction)产生大量有害的活性氧(reactive oxygen species, ROS),如超氧化物、羟基自由基和过氧化氢等<sup>[2-3]</sup>,这些 ROS 会造成胞内生物大分子的损伤。因此微生物必须严格调控胞内铁离子的浓度以维持胞内铁稳态<sup>[4]</sup>。

为了维持胞内铁稳态,细菌进化出复杂的调控策略来应对细胞内外环境铁含量的变化<sup>[5]</sup>。铁摄取调节蛋白(ferric uptake regulator, Fur)是细菌中调控铁摄取和代谢的一种保守蛋白,是细菌维持铁稳态最重要的调控因子<sup>[6-8]</sup>。Fur 通过抑制或者激活基因的转录调节与铁吸收、利用和存储等相关基因的表达,以维持胞内铁离子浓度的稳态<sup>[6-9]</sup>。Fur 最常见的调节机制是在铁充足的条件下以  $Fe^{2+}$  作为共阻遏物,以二聚体形式特异结合靶基因启动子上富含 A/T 的回文序列盒(又称 Fur box),从而阻止 RNA 聚合酶的结合,进而抑制靶基因的转录<sup>[6-9]</sup>。尽管 Fur 在维持细菌胞内铁稳态方面起着至关重要的作用,但大多数细菌中的 *fur* 已被成功敲除并获得了相应的基

因缺失突变株<sup>[5,10-12]</sup>。这些突变株显示出多样化和物种专一性的表型,包括铁吸收系统和/或毒力因子的组成型表达,对酸、血清或氧化胁迫等的抗性受损,以及运动性和/或生物被膜形成缺陷等<sup>[5,12-18]</sup>。

从宿主体内有效吸收并获得铁对病原细菌的毒力发挥至关重要,因为宿主通过将铁扣押在胞内的蛋白(如血红蛋白、细胞色素或铁蛋白)中,或通过糖蛋白、转铁蛋白和乳铁蛋白螯合胞外  $Fe^{3+}$  而主动限制宿主体内铁的可获得性,从而增加了病原细菌在宿主体内吸收铁的难度<sup>[6-7,9]</sup>。因此缺失突变 *fur* 不仅破坏了细菌的胞内铁稳态,还可显著影响细菌的致病性<sup>[7,9]</sup>,然而,一般情况下缺失突变 *fur* 对细菌生长的影响却很小<sup>[7,9]</sup>。仅极少数细菌的 *fur* 被认为是必需基因,比如结核分枝杆菌和铜绿假单胞菌<sup>[19-21]</sup>。铜绿假单胞菌是人类的一种重要条件致病菌,可引起多种人类疾病,包括菌血症、泌尿系统感染、呼吸系统感染、烧伤感染和其他严重的感染,同时由于存在严重抗生素耐药性,它在 2017 年世界卫生组织发布的首份急需新型抗生素的重点病原体清单中位列首位<sup>[22-23]</sup>。铜绿假单胞菌极易形成生物被膜(biofilm),导致其相关感染难以根除<sup>[22]</sup>。通过转录组分析、Fur-DNA pull-down 实验及对整个基因组中 Fur 结合位点(Fur 盒)的生物信息学预测分析,结果表明铜绿假单胞菌的许多基因受到

Fur 调控<sup>[5, 24-27]</sup>。Fur 可以直接或间接地抑制许多铁吸收相关基因和毒力基因的转录,包括内源性铁载体脓青素(pyoverdine, PVD)和螯铁蛋白(pyochelin, PCH)的生物合成、转运相关基因,血红素吸收相关基因,外源铁载体的转运相关基因,以及外毒素 A 和胞外蛋白酶 PrpL 等毒力因子的编码基因<sup>[24-27]</sup>。此外,铜绿假单胞菌的 Fur 还通过抑制 2 个小 RNA (PrrF1 和 PrrF2)的转录,间接地正调节铁储存蛋白、一些参与碳分解代谢和呼吸的酶,以及 ROS 清除酶等的表达<sup>[5, 28]</sup>。这些结果表明 Fur 是控制铜绿假单胞菌代谢和毒力的一个关键调节子。

然而,与其他细菌不同,研究人员尝试构建铜绿假单胞菌的 *fur* 缺失突变株均失败,这导致大家都认为 *fur* 是该细菌的必需基因<sup>[5-6, 19-20, 29]</sup>。因此,以往对铜绿假单胞菌 *fur* 的功能研究主要采取两种策略:一种是使用基因组上的 *fur* 发生点突变的菌株进行表型特征分析<sup>[19, 30]</sup>,另一种是对构建的 *fur* 条件突变株进行表型特征分析<sup>[5-6]</sup>。该条件突变株先在基因组上不影响铜绿假单胞菌正常生理代谢的 *attB* 位点插入以 P<sub>BAD</sub> 为启动子的 *fur*,然后在阿拉伯糖诱导表达 *fur* 的情况下,敲除基因组上原来的 *fur*,从而形成 Fur 受诱导表达的条件突变株  $\Delta fur/attB::P_{BAD}\text{-}fur$ 。然而,对这两种突变菌株的表型分析结果却存在差异,这可能与上述两种突变株都没有完全缺失 *fur* 有关。因此,这种基于 *fur* 非缺失突变株的遗传分析结果可能难以揭示 Fur 真实的生物学功能。

本研究成功构建了铜绿假单胞菌的 *fur* 缺失突变株,并基于该突变株解析了 *fur* 的功能。表型分析结果显示, *fur* 在铜绿假单胞菌的正常生长、铁载体生物合成、抗氧胁迫能力、鞭毛形成、生物被膜形成和毒力等方面都发挥着十分重要的作用,这为针对铜绿假单胞菌的疫苗和抗菌药物开发奠定了基础。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 菌株及质粒

本研究使用的菌株及质粒信息详见表 1。

### 1.2 引物信息

本研究使用的引物信息详见表 2。

### 1.3 主要试剂和仪器

酵母提取物、胰蛋白胨、胰蛋白胨大豆汤(tryptone soya broth)、琼脂糖,OXOID 公司;琼脂粉、酸水解酪蛋白、抗生素,北京索莱宝科技有限公司;限制性内切酶, TaKaRa 公司; DNA 聚合酶,北京全式金生物技术有限公司; T4 DNA 连接酶, NEB 公司; o-硝基苯基- $\beta$ -D-半乳糖苷(o-nitrophenyl- $\beta$ -D-galactoside, ONPG),西格玛奥德里奇(上海)贸易有限公司。

### 1.4 培养基及培养条件

LB 培养基(g/L): NaCl 10, 酵母提取物 5, 胰蛋白胨 10, 琼脂粉 15, pH 7.0。

TSB 培养基(g/L): tryptone soya broth 30, 琼脂粉 15, pH 7.0。

MM 培养基(限铁培养基) (g/L)<sup>[39]</sup>: K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 6.0, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 3.0, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1.0, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.2, 琥珀酸 4.0, 琼脂粉 15.0, pH 7.0。

CAA 培养基(限铁培养基) (g/L)<sup>[40]</sup>: 酸水解酪蛋白 5.0, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.441 1, MgSO<sub>4</sub> 0.246 5, 琼脂粉 15.0, pH 7.0。

抗生素使用情况如下:大肠杆菌(卡那霉素, 30  $\mu$ g/mL;氯霉素, 30  $\mu$ g/mL;四环素, 20  $\mu$ g/mL;庆大霉素, 10  $\mu$ g/mL), 铜绿假单胞菌(卡那霉素, 30  $\mu$ g/mL;氯霉素, 30  $\mu$ g/mL;庆大霉素, 100  $\mu$ g/mL;四环素, 固体培养 200  $\mu$ g/mL, 液体培养 100  $\mu$ g/mL)。

铜绿假单胞菌、大肠杆菌以及在此基础上构建的各种菌株均在 37  $^{\circ}$ C、220 r/min 条件下培养。

表 1 菌株和质粒信息表

Table 1 List of strains and plasmids used in this study

Strains and plasmids	Description	Sources
Strains		
<i>Pseudomonas eruginosa</i>		
PAO1 (ATCC 15692)	Wild type	Laboratory collection
$\Delta fur$	Mutant of knockout <i>fur</i> in PAO1	This study
$\Delta pvdA$	Mutant of knockout <i>pvdA</i> in PAO1	[31]
$\Delta pacT$	Mutant of knockout <i>pacT</i> in PAO1	This study
$\Delta pacT\Delta fur$	<i>pacT/fur</i> double deletion mutant in PAO1	This study
<i>Escherichia coli</i>		
TG1	F'[traD36 proAB <sup>+</sup> <i>lac</i> I <sup>q</sup> <i>lacZ</i> $\Delta$ M15], supE, thi-1, $\Delta(lac-proAB)$ , $\Delta(mcrB-hsdSM)5$ , (rK <sup>-</sup> mK <sup>-</sup> )	Laboratory collection
S17-1	RP4-2(Km::Tn7, Tc::Mu-1), pro-82, LAMpir, recA1, endA1, thiE1, hsdR17, creC510	Laboratory collection
Plasmids		
pK18 <i>mobsacB</i>	Km <sup>r</sup> ; <i>sacB</i> -based gene replacement vector	[32]
p34s-Gm	Amp <sup>r</sup> ; Gm resistant cassette carrying vector	[33]
pK18- $\Delta fur$ -Gm	Km <sup>r</sup> ; Gm <sup>r</sup> ; $\Delta fur::Gm$ in pK18 <i>mobsacB</i>	This study
pK18- $\Delta pacT$ -Gm	Km <sup>r</sup> ; Gm <sup>r</sup> ; $\Delta pacT::Gm$ in pK18 <i>mobsacB</i>	This study
pME6032	Broad-host-range vector, Tc <sup>r</sup>	[34]
pME6032- <i>fur</i>	<i>fur</i> was cloned into pME6032	This study
pME6032-Ps <i>fur</i>	P <i>sfur</i> was cloned into pME6032	This study
pME6032-Ec <i>fur</i>	Ec <i>fur</i> was cloned into pME6032	This study
pME6032- <i>pacA</i>	<i>pacA</i> was cloned into pME6032	This study
pBBR1MCS-5	Broad-host-range vector, Gm <sup>r</sup>	[35]
pBBR1MCS-5- <i>fur</i>	<i>fur</i> was cloned into pBBR1MCS-5	This study
pMini-CTX:: <i>lacZ</i>	$\Omega$ -FRT-attP-MCS, <i>ori</i> , <i>int</i> , <i>oriT</i> , Tc <sup>r</sup>	[36]
pMini-CTX-PpelF:: <i>lacZ</i>	PpelF promoter was cloned into pMini-CTX:: <i>lacZ</i>	This study
pMini-CTX-PpslA:: <i>lacZ</i>	PpslA promoter was cloned into pMini-CTX:: <i>lacZ</i>	This study
pMini-CTX-PcdrA:: <i>lacZ</i>	PcdrA promoter was cloned into pMini-CTX:: <i>lacZ</i>	This study
pMini-CTX-PfptA:: <i>lacZ</i>	PfptA promoter was cloned into pMini-CTX:: <i>lacZ</i>	This study
pMini-CTX-PpchD:: <i>lacZ</i>	PpchD promoter was cloned into pMini-CTX:: <i>lacZ</i>	[37]
pBBR- <i>gfp-mut3</i>	pBBR1MCS-5 containing P <sub>A1/04/03</sub> - <i>gfp-mut3</i> -To-T1	[38]

Tc: Tetracycline; Gm: Gentamicin; Km: Kanamycin; Amp: Ampicillin.

### 1.5 突变株构建方法

基因敲除方法参考文献[37]并加以修改。以铜绿假单胞菌基因组 DNA 为模板, 用两对引物 (*fur* up F/*fur* up R 和 *fur* low F/*fur* low R) 分别 PCR 扩增 *fur* 的上游和下游的 DNA 片段; 通过重叠延伸 PCR 将 *fur* up 和 *fur* low 连接起来, 构

建基因敲除盒  $\Delta fur$ ; 将基因敲除盒  $\Delta fur$  用 *EcoR* I/*Bam*H I 进行双酶切, 纯化后将其连接到自杀载体 pK18*mobsacB*, 得到重组载体 pK18*mobsacB*- $\Delta fur$ 。将来自 p34s-Gm 的庆大霉素抗性基因通过 *Hind* III 位点插入 pK18*mobsacB*- $\Delta fur$ , 得到重组自杀质粒 pK18- $\Delta fur$ -Gm。将质粒 pK18- $\Delta fur$ -Gm

表 2 引物信息表

Table 2 List of primers used in this study

Primers	Sequences (5'→3')
<i>fur</i> up F	GATCGAATTCGCGGAAATGAAAAAGCCC
<i>fur</i> up R	GCACCAGATTCAGGGTCACTTAAGGCC
<i>fur</i> low F	AGTGACCCTGAATCTGGTGCTCTACGTG
<i>fur</i> low R	GTACGGATCCGCATTACCAGGAAGAAGC
<i>pacT</i> up F	GATCGAATTC <del>CCG</del> AAGACGATGGTGAAC
<i>pacT</i> up R	CGGTGATGCTTGCAGGGTGATCGGTAGC
<i>pacT</i> low F	TCACCCTGCAAGCATCACCGACCACGAATG
<i>pacT</i> low R	GCAA <del>GGATCC</del> GAAGACCCGGGCAAAATG
<i>fur</i> (pME6032) F	CTGAGAATTCATGGTTGAAAATAGCGAAC
<i>fur</i> (pME6032) R	TGAC <del>AGATCT</del> CTACTTCTTCTTGCGCAC
<i>Psfur</i> (pME6032) F	GATCGAGCTCTACCTGCATTAAGAGAAG
<i>Psfur</i> (pME6032) R	CTAGCTCGAGTGGTTTACGCCTTTTTG
<i>Ecfur</i> (pME6032) F	GATCGAATTCATGACTGATAACAATACC
<i>Ecfur</i> (pME6032) R	CATGCCATGGTTTCAGGCTGGCTTATTTG
<i>pacA</i> (pME6032) F	GATCGAATTCGTGCCGGACGAGACGAGC
<i>pacA</i> (pME6032) R	AGCT <del>AGATCT</del> TTATTCGTAGATCGTCAAG
<i>fur</i> (pBBR1MCS-5) F	CTAGCTCGAGTCCGGGATACTGCGAAAC
<i>fur</i> (pBBR1MCS-5) R	ATCAGGATCCCTACTTCTTCTTGCGCAC
<i>pelF</i> F	CAGTGGTACCTGCTCCAGGCTGTGTTG
<i>pelF</i> R	GTCAGGATCCGAGGTGCGCCGCTTCGAG
<i>pslA</i> F	CAGTGGTACCATGGCGATGATGTACCAG
<i>pslA</i> R	GTCAGGATCCACCAGGAAGTACTCGATG
<i>cdrA</i> F	CTAGCTCGAGGGCTGGCGGCATGCAGTTG
<i>cdrA</i> R	ATCGAAGCTTGGCGAACATGAGGGTGCTG
<i>fptA</i> F	TGACGGTACCGCGTTGCCTGGAACCTGC
<i>fptA</i> R	AGCTAAGCTTCACCATGTCCGGCAGTTC
<i>pchD</i> F	CTCGGGTACCGCGGCTGTCCAGGGCTTC
<i>pchD</i> R	CTCGAAGCTTGTCTGGTCTCCTGCCAGTG

The underline represents the enzyme cleavage site.

转化大肠杆菌 S17-1 后与铜绿假单胞菌 PAO1 在 LB 平板上 37 °C 接合 48 h。用 LB 培养基悬浮接合后的菌苔，适当稀释后涂布于含有庆大霉素 (100 µg/mL) 和氯霉素 (30 µg/mL) 的 LB 双抗平板。长出的菌落经 PCR 验证后得到单交换体。将单交换体接种于新鲜无抗性的 LB 培养基中，培养过夜，适当稀释后涂布于含有卡那霉素 (30 µg/mL) 和 12% 蔗糖的 LB 平板，37 °C 培养 10 d 后，平板上除了优先形成的巨大菌落外，还存在后长起来的微小菌落，对后长出的微小菌落经 PCR 检测、抗性验证和测序后，即得到 *fur* 的缺失突变株。使用同样的方法得到铜绿假单胞菌的其他基因缺失突变株。

## 1.6 扫描电子显微镜分析

将生长至  $OD_{600}$  为 0.5–0.8 的细菌 (5 500 r/min 离心 5 min) 收集菌体，用无菌预冷的 PBS 洗 2 次，再次离心并弃上清。用适量的 2.5% 戊二醛固定过夜 (4 °C 保存)。离心收集菌体后再用 PBS 洗 3 次，每次 15 min。随后使用系列梯度酒精 (30%、50%、70%、80%、90%、95% 和 100%) 脱水，每种浓度酒精脱水 1 次，每次 10–20 min，再用 100% 酒精彻底脱水 1–2 次，接下来用醋酸异戊酯替换 2 次，每次 20 min。样品依次进行干燥 (Quorum Technologies) 和喷金 (日立科学仪器 (北京) 有限公司)，最后使用 SU 8100 扫描电子显微镜 (日立科学仪器 (北京) 有限公司) 观察。

### 1.7 生长曲线的测定

将各菌株接种于液体 TSB 培养基, 培养过夜后按 1:100 转接至新鲜的液体 TSB 培养基中, 继续培养至稳定期, 取 1 mL 的菌液, 5 500 r/min 离心 5 min 收集菌体, 用 MM 培养基洗 2 次并重新悬浮, 然后转接到新鲜的液体 MM 培养基 (或者将未洗的稳定期菌液直接转接到新鲜的液体 TSB 培养基) 中并调节起始  $OD_{600}$  为 0.05, 37 °C、220 r/min 振荡培养, 每 2 h 间隔取样测  $OD_{600}$ , 绘制生长曲线。培养基中根据需要添加适量的抗生素、IPTG、铁螯合剂和  $FeCl_3$  等。

### 1.8 铁载体产生能力的检测

铁载体产生能力检测参考文献[37]并加以修改。将各菌株接种于液体 TSB 培养基中, 培养过夜后转接至新鲜的液体 TSB 培养基中, 继续培养至稳定期, 取 1 mL 的菌液, 5 500 r/min 离心 5 min 收集菌体, 用新鲜液体 CAA 或 LB 培养基清洗 2 次后, 再用 CAA 或 LB 培养基重新悬浮并将重悬菌液分别稀释 100 倍, 备用。向 100 mL 融化的 CAA 或 LB 固体培养基中添加 10 mL 配制好的铬天青 S (chromeazurol S, CAS) 溶液, 分别制成铁载体检测平板 CAA-CAS 和 LB-CAS。吸取上述处理好的各菌液 3  $\mu$ L 滴在 CAS 板上, 37 °C 培养 2–3 d 后拍照记录并测量橙色扩散圈的直径。培养基中根据需要添加适量的抗生素、IPTG 等。

CAS 溶液的配制: 称取 60.5 mg 铬天青 S 粉末溶解于 50 mL 去离子水中得到溶液 A; 用 10 mmol/L HCl 配制 10 mL 的 1 mmol/L  $FeCl_3$  溶液为溶液 B; 称取 72.9 mg 的十六烷基三甲基溴化铵 (hexadecyl trimethyl ammonium bromide, CTAB) 粉末溶解于 40 mL 的去离子水中, 得到溶液 C。将溶液 A 加入到溶液 B 后混匀, 再将溶液 C 缓慢加入到 AB 混合液中, 混匀后灭菌得到 CAS 溶液。

### 1.9 脓青素(pyoverdine, PVD)含量检测

PVD 含量的检测参考文献[37]并加以修改。在液体 TSB 培养基中过夜培养的各菌株菌液, 按 1:100 转接到新鲜的液体 TSB 培养基中, 继续培养至稳定期, 测定菌液的  $OD_{600}$ , 12 000 r/min 离心 5 min 收集上清液并用 100 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0) 适当稀释后, 测定稀释液的  $OD_{405}$ , PVD 含量的结果表示为  $OD_{405}/OD_{600}$ 。实验以  $\Delta pvdA$  作为阴性对照菌株。

### 1.10 *lacZ* 染色体转录融合报告菌株的构建

*lacZ* 染色体转录融合报告菌株的构建方法参考文献[37]并加以修改。以 PCH 的合成基因 *pchD* 为例, 为了构建其 *lacZ* 报告基因转录融合重组载体, 用引物 *pchD* F/*pchD* R 扩增 *pchD* 基因上游 684 bp 的启动子序列。PCR 产物通过 *Kpn* I 和 *Hind* III 酶切位点直接克隆到 pMini-CTX::*lacZ* 载体上, 得到 pMini-CTX-P*pchD*::*lacZ* 重组载体。将重组载体转化入大肠杆菌 S17-1 后, 分别与 PAO1 和  $\Delta fur$  在 TSB 平板上 37 °C 接合 48 h。用 TSB 培养基悬浮接合后的菌苔, 适当稀释后涂布于含有卡那霉素 (30  $\mu$ g/mL) 和四环素 (200  $\mu$ g/mL) 的 TSB 双抗平板, 37 °C 培养 3 d 后得到 PAO1 和  $\Delta fur$  的 *pchD* 启动子转录融合菌株。

随后, 用引物 *fur* (pBBR1MCS-5) F/*fur* (pBBR1MCS-5) R 扩增 *fur* 序列。PCR 产物通过 *Xho* I 和 *Bam*H I 酶切位点直接克隆到 pBBR1MCS-5 载体上, 得到重组载体 pBBR1MCS-5-*fur*。将 pBBR1MCS-5 转化入 PAO1 和  $\Delta fur$  中, 同时将 pBBR1MCS-5-*fur* 转化入  $\Delta fur$  中, 用含有卡那霉素 (30  $\mu$ g/mL)、庆大霉素 (100  $\mu$ g/mL) 和四环素 (200  $\mu$ g/mL) 的 TSB 三抗平板筛选得到最终的转录融合菌株。同时, 使用同样的方法得到铜绿假单胞菌的其他基因的启动子转录融合菌株。

### 1.11 $\beta$ -半乳糖苷酶酶活检测

$\beta$ -半乳糖苷酶酶活检测方法参考文献[41]并加以修改。吸取 20–100  $\mu\text{L}$  培养至对数期的菌液, 向菌液中依次加入 420  $\mu\text{L}$  的 Z buffer (60 mmol/L  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 、40 mmol/L  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 、10 mmol/L  $\text{KCl}$ 、1 mmol/L  $\text{MgSO}_4$ 、pH 7.0, 0.2%  $\beta$ -巯基乙醇)、20  $\mu\text{L}$  氯仿和 10  $\mu\text{L}$  0.1% 十二烷基硫酸钠 (sodium lauryl sulfate, SDS)。混合液快速混合 20 s 后, 在 30  $^\circ\text{C}$  孵育 1 h。孵育后, 向混合液中加入 100  $\mu\text{L}$  浓度为 4 mg/mL 的 ONPG 进行反应。通过加入 250  $\mu\text{L}$  的 1 mol/L  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  终止反应, 并记录反应时间。最后, 将混合液 14 000 $\times g$  离心 3 min 后检测混合液的  $OD_{420}$  和  $OD_{550}$ , 然后以米勒单位 (Miller units, MU) 计算  $\beta$ -半乳糖苷酶活性 (公式 1)。

$$\text{MU} = 1\ 000 \times (OD_{420} - 1.75 \times OD_{550}) / [OD_{600} \times \text{体积}(\text{mL}) \times \text{反应时间}(\text{min})] \quad (1)$$

### 1.12 生物被膜试验

生物被膜培养方法参考文献[37]并加以修改。用新鲜 TSB 培养基将生长至稳定期的菌液稀释 100 倍后, 吸取 100  $\mu\text{L}$  细胞悬浮液转移至 96 孔 PVC 板的每个孔中, 在 37  $^\circ\text{C}$  培养 24 h, 每个处理设 8 个重复。培养 24 h 后, 除去 TSB 培养基, 并用磷酸盐缓冲液 (phosphate buffered salt, PBS) 洗 2 次。室温干燥后, 加入 0.1% 结晶紫对黏附的细胞染色 10 min, 再用 PBS 洗 2 次。最后用 4 mL 95% 乙醇洗提与细胞结合的结晶紫, 并检测洗提液的  $OD_{570}$ 。通过 8 个孔的值计算每个样本的平均值和标准偏差。

### 1.13 激光共聚焦扫描显微镜 (laser confocal scanning microscopy, LSCM) 观察生物被膜

利用 LSCM 观察生物被膜的方法参照文献[42]并加以修改。将 pBBR-*gfp-mut3* 载体 (绿色荧光蛋白表达载体) 转入大肠杆菌 S17-1 后, 分别与 PAO1 (pME6032)、 $\Delta fur$  (pME6032) 和  $\Delta fur$

(pME6032-*fur*) 在 TSB 平板上 37  $^\circ\text{C}$  接合 48 h。用 TSB 培养基悬浮接合后的菌苔适当稀释后, 涂布于含有卡那霉素 (30  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )、庆大霉素 (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 和四环素 (200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 的 TSB 三抗平板筛选得到带有绿色荧光蛋白 (green fluorescent protein, GFP) 标记的各菌株。

将无菌的玻璃盖玻片浸没于装有 5 mL TSB 培养基的平皿中。按照 1:100 接种量, 在平皿中转接培养至稳定期的带有 GFP 绿色荧光蛋白标记的各菌株; 37  $^\circ\text{C}$ 、100 r/min 振荡培养 72 h 后, 取出盖玻片使用 PBS 冲洗 2 次, 以除去非黏附细胞和培养基, 空气中干燥, 即可得到带有绿色荧光蛋白的各菌株的生物被膜; 在激光共聚焦扫描显微镜下观察生物被膜的形成情况。以非 GFP 标记的 PAO1 (pME6032) 菌株作为空白对照 (blank control)。

### 1.14 c-di-GMP 含量检测

细胞内的环二鸟苷酸 (cyclic diguanylate, c-di-GMP) 含量的检测方法参考文献[11]并作调整。将各菌株接种于液体 TSB 培养基, 培养至稳定期后再次转接至新的 5 mL 液体 TSB 培养基中, 37  $^\circ\text{C}$ 、220 r/min 培养。待生长至  $OD_{600}$  为 0.6–0.8 后, 吸取 2 mL 菌液并 10 000 $\times g$  离心 5 min。菌体用冰浴的 PBS 洗 2 次后悬浮在 2 mL 冰浴的 PBS 中。悬浮液在 100  $^\circ\text{C}$  孵育 5 min 后, 在冰水浴中超声破碎细胞。10 000 $\times g$  离心 5 min 后, 收集细胞裂解上清液, 将剩下的菌体沉淀重新悬浮在 2 mL 冰浴的 PBS 中, 用同样的步骤再次提取 2 次, 合并细胞裂解上清液。将细胞裂解上清液冷冻干燥浓缩至 500  $\mu\text{L}$ 。用 c-di-GMP 酶联免疫试剂盒 (武汉默沙克生物科技有限公司) 测定细胞裂解上清液中 c-di-GMP 含量, 单位为 pmol/L。使用酶标仪 (伯腾微量检测板) 测定细胞裂解上清液的蛋白浓度, 单位为 mg/mL。最后, 用蛋白浓度对 c-di-GMP 含量做均一化处理,



得到细胞内 c-di-GMP 的含量值, 单位为 pmol/mg protein。

### 1.15 氧化剂胁迫试验

将各菌株接种于液体 TSB 培养基, 培养至稳定期后转接至新的液体 TSB 培养基中。待生长至对数期, 5 500 r/min 离心 5 min 收集菌体, 用无菌 PBS 洗 2 次并调整细菌起始浓度为  $5 \times 10^7$  CFU/mL。每个菌做 5 个处理(分别加入  $H_2O_2$  使工作浓度依次为 0、1、5、10、100 mmol/L), 每个处理重复 3 次。氧化胁迫 1 h 后, 将不同浓度  $H_2O_2$  处理后的菌液连续 10 倍稀释, 每个稀释度取 3  $\mu$ L 滴在 TSB 平板上, 37  $^{\circ}$ C 培养 2 d 后进行菌落计数并计算存活率。

### 1.16 大蜡螟幼虫感染试验

大蜡螟幼虫感染试验参考文献[31]并加以修改。将各菌株接种于液体 TSB 培养基, 培养至稳定期后转接至新的液体 TSB 培养基。吸取 1 mL 生长至  $OD_{600}$  为 0.7 的各菌液, 5 500 r/min 离心 5 min 收集菌体并用无菌的 0.85% NaCl 洗 2 次; 用无菌的 0.85% NaCl 悬浮菌体并稀释至  $2 \times 10^7$  CFU/mL 备用。将大蜡螟幼虫(5 龄第 3 天)置于冰上 5 min, 使其处于麻醉状态, 使用微量

注射器在大蜡螟幼虫尾部第 3 节处注射 5  $\mu$ L 细菌稀释液, 以注射 0.85% 的 NaCl 溶液为对照。每组注射 50 只大蜡螟幼虫, 置于室温黑暗培养, 每 12 h 记录一次大蜡螟幼虫存活数, 采用 Kaplan-Meier 法绘制生存曲线, 并用 Mantel-Cox 对数秩检验对结果进行统计分析。

### 1.17 统计分析

每组实验设 3 个生物学重复, 数据用平均值  $\pm$  标准偏差表示。通过 GraphPad Prism version 7.00 软件分析结果并作图, 采用双尾非配对 Student's *t* 检验进行显著性分析,  $P < 0.05$  表示具有统计学意义。

## 2 结果与分析

### 2.1 铜绿假单胞菌 *fur* 缺失突变株的构建

本研究按照方法 1.5 成功构建了铜绿假单胞菌 *fur* 的缺失突变株  $\Delta fur$ 。图 1 为分别用引物 *fur* (pME6032) F/*fur* (pME6032) R (泳道 1 和 2), 引物 *fur* up F/*fur* low R (泳道 3 和 4) 对野生菌 PAO1 和  $\Delta fur$  的 PCR 鉴定结果, 并经测序验证确认获得了  $\Delta fur$ , 说明铜绿假单胞菌的 *fur* 是可以缺失的非必需基因。

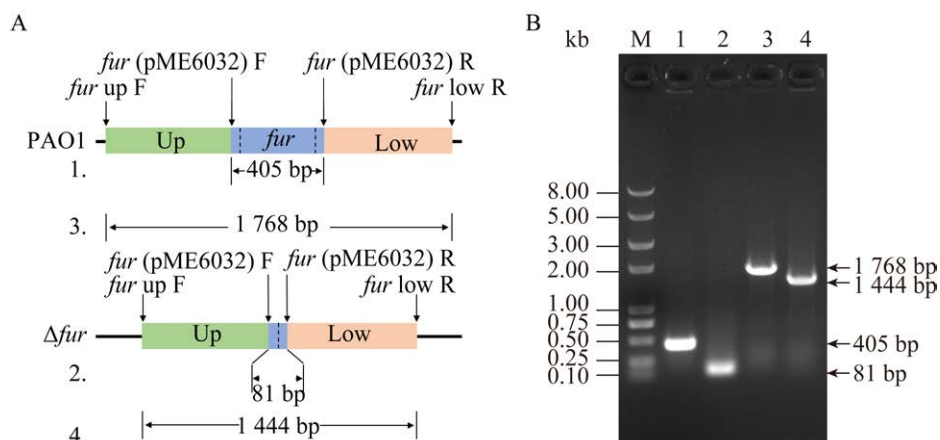


图 1  $\Delta fur$  的 PCR 鉴定结果

Figure 1 Characterization of the  $\Delta fur$  mutation by PCR. A: Parts 1 and 3 show the map of the wild type allele, whereas parts 2 and 4 show the map of the  $\Delta fur$  mutant. B: The PCR analysis of genomic DNA from the two strains. M: Marker. Lane 1, 2: The size of the *fur* gene sequences of PAO1 and  $\Delta fur$ , respectively. Lane 3, 4: The sequence sizes of the *fur* genes upstream and downstream of PAO1 and  $\Delta fur$ , respectively.

Fur 直接或间接地抑制许多铁摄取相关基因的表达，包括铁载体的生物合成相关基因<sup>[25,27]</sup>。因此本研究分析了缺失突变 *fur* 对铜绿假单胞菌铁载体合成的影响。结果显示，在固体富铁 LB 培养基上，*fur* 的缺失显著提高了铜绿假单胞菌总的铁载体产量；互补 *fur* 后，总的铁载体产量恢复至野生菌 PAO1 水平(图 2A、2B)，而在固体限铁 CAA 培养基上，野生菌 PAO1、 $\Delta fur$  及其互补菌株之间总的铁载体产量无显著差异(图

2C、2D)。接着，本研究进一步分析了缺失突变 *fur* 分别对铜绿假单胞菌铁载体 PVD 和 PCH 产量的影响。结果如图 3 所示。在液体富铁 TSB 培养基中，PAO1 和  $\Delta fur$  互补菌株与 PVD 缺陷型菌株  $\Delta pvdA$  类似，产生低水平的 PVD，而缺失突变 *fur* 则显著促进铜绿假单胞菌 PVD 的合成， $\Delta fur$  的 PVD 产量相较于 PAO1 提升了 5 倍(图 3A)。相反地，在液体限铁 CAA 培养基中， $\Delta fur$  和 PAO1 的 PVD 产量没有显著差异(图 3B)，但  $\Delta fur$

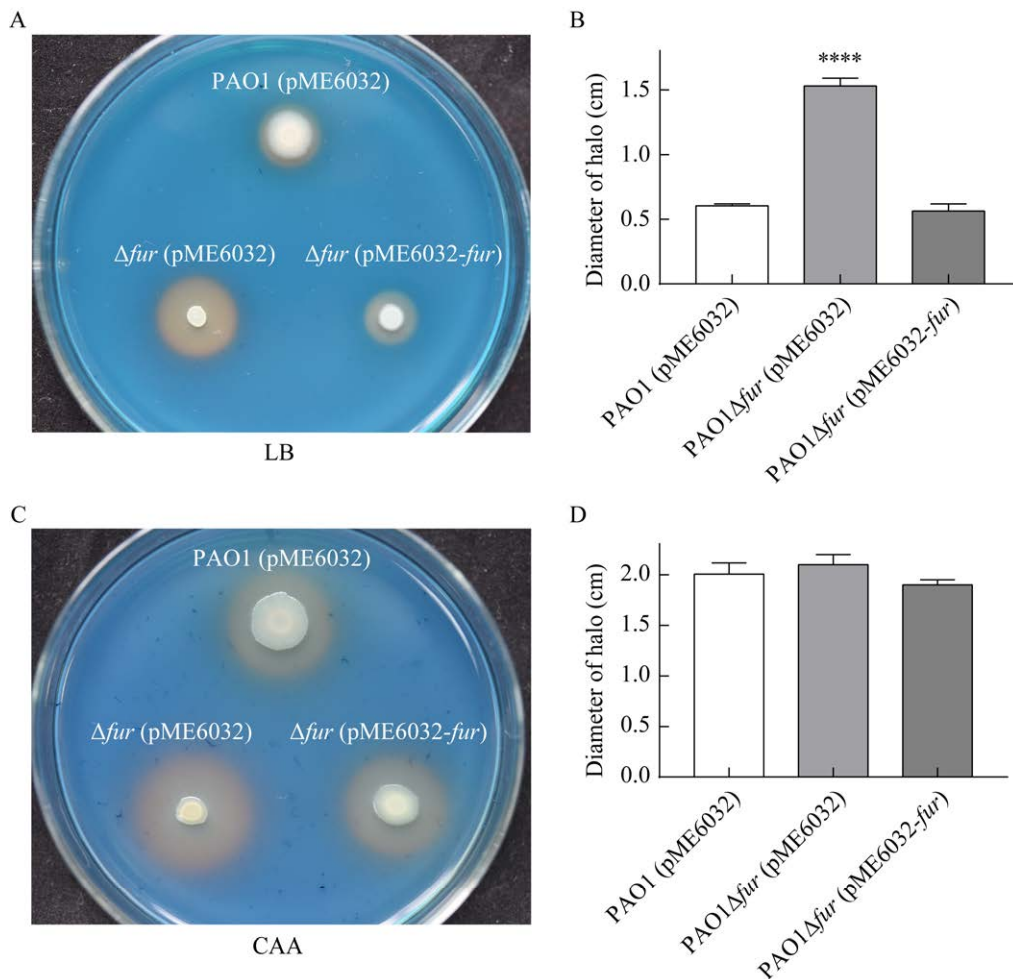


图 2 *fur* 缺失影响铜绿假单胞菌总铁载体的产生

Figure 2 Deletion of *fur* affects *Pseudomonas aeruginosa* total siderophore production. A and B: Comparison of the colored halos around wild type (top),  $\Delta fur$  (bottom left) and its complementary strain (bottom right) colonies in LB agar. \*\*\*\*:  $P < 0.0001$ . C and D: Comparison of the colored halos around wild type (top),  $\Delta fur$  (bottom left) and its complementary strain (bottom right) colonies in CAA agar.

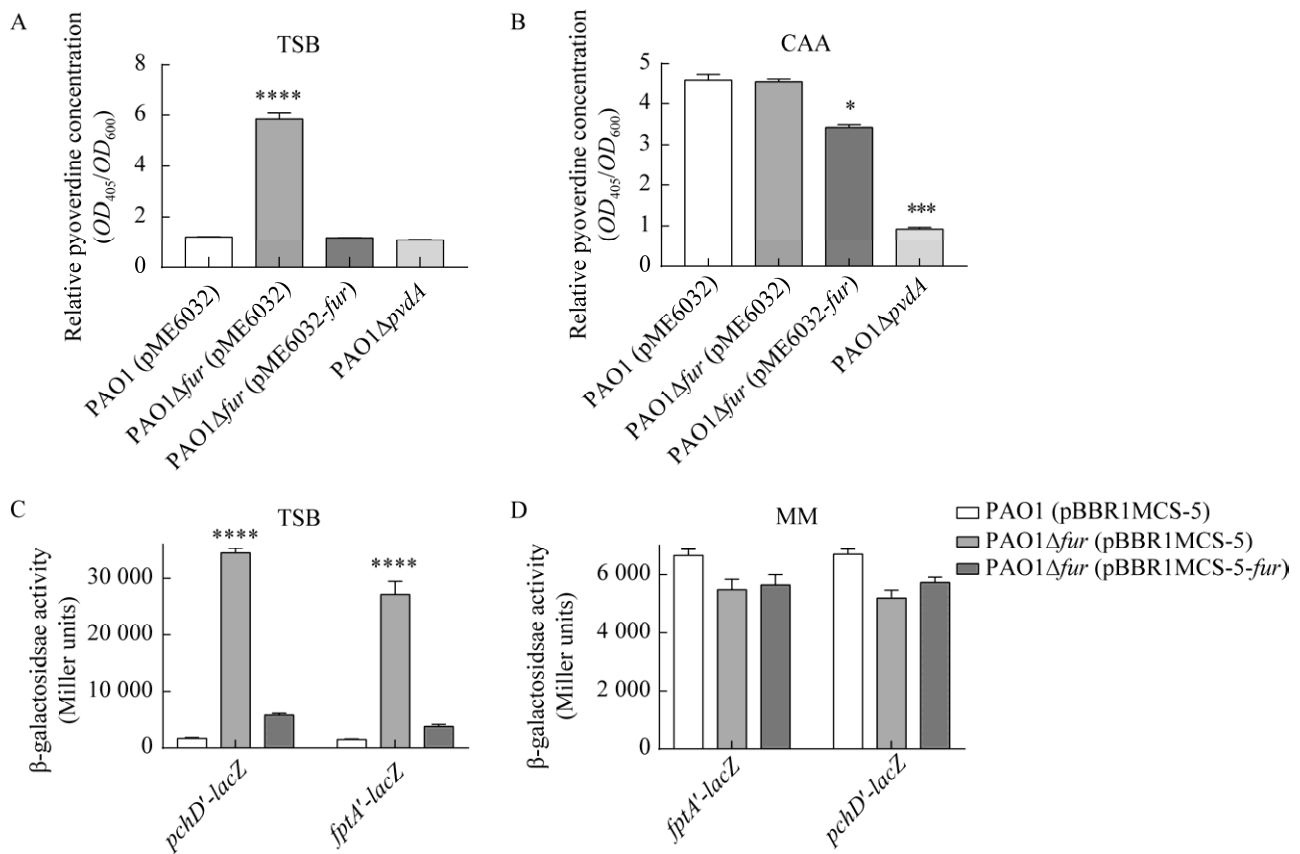


图3 *fur* 缺失影响铜绿假单胞菌铁载体 PVD 和 PCH 的产生

Figure 3 Deletion of *fur* affects *Pseudomonas aeruginosa* siderophore PVD and PCH production. A and B: Relative levels of extracellular PVD in each culture supernatants were determined spectrophotometrically in TSB and CAA broth. Values are presented as the mean of three independent assays. The  $\Delta pvdA$  strain was used as a negative control. \*:  $P < 0.05$ ; \*\*\*:  $P < 0.001$ ; \*\*\*\*:  $P < 0.0001$ . C and D: PAO1,  $\Delta fur$  and its complementary strain were cultured in TSB and MM broth, levels of PCH-related genes transcription in each strain cells were monitored using the *fptA'*-*lacZ* and *pchD'*-*lacZ* transcriptional fusions, respectively. The graphs show the mean and standard deviation of two experiments performed in five replicates each time. \*\*\*\*:  $P < 0.0001$ .

互补菌株相较于 PAO1 的 PVD 产量显著降低, 这可能是用质粒互补导致基因表达剂量差异造成的。通过 *lacZ* 转录融合检测 PCH 合成相关基因 *pchD* 和 *fptA* 的表达情况来分析各菌株 PCH 的产生情况。结果显示在液体富铁 TSB 培养基中, 与 PAO1 和  $\Delta fur$  互补菌株相比,  $\Delta fur$  的 *pchD* 与 *fptA* 的表达量显著提升(图 3C); 而在液体限铁 MM 培养基中,  $\Delta fur$  的 *pchD* 与 *fptA* 的表达

量与 PAO1 和  $\Delta fur$  互补菌株的没有显著差异(图 3D)。这些结果说明缺失 *fur* 使铜绿假单胞菌失去了在高铁条件下对铁载体生物合成的抑制作用。这也进一步从表型上证明了本研究成功构建了 *fur* 缺失突变株。

## 2.2 缺失突变 *fur* 对铜绿假单胞菌生长的影响

本研究对 *fur* 缺失突变株的生长表型进行了

分析,结果如图4所示。在富铁 TSB 培养基和限铁 MM 培养基中相比野生菌 PAO1, 缺失突变 *fur* 极显著地影响了铜绿假单胞菌的生长, 用 *fur* 互补可以恢复  $\Delta fur$  的生长缺陷表型至野生菌水平, 说明 *fur* 是铜绿假单胞菌正常生长所必需的(图 4A、4B)。在 MM 培养基中添加 50  $\mu\text{mol/L}$   $\text{FeCl}_3$  对 PAO1、 $\Delta fur$  及其互补菌株的生长具有相似的促进作用(图 4C)。然而, 当在 MM 培养基中添加 250  $\mu\text{mol/L}$  的 2,2'-联吡啶时, 相比于 PAO1,  $\Delta fur$  出现延时生长现象(图 4D), 而当添加 2,2'-联吡啶的浓度提高到 500  $\mu\text{mol/L}$  时, 相比于 PAO1,  $\Delta fur$  的生长被完全抑制(图 4E), 说明 *fur* 突变导致铜绿假单胞菌对限铁环境的生长

适应性降低。在添加 2,2'-联吡啶的 MM 培养基中, 互补 *fur* 不能有效恢复  $\Delta fur$  菌株的生长(图 4E), 这可能是由于限铁条件影响了 pME6032 质粒的功能。

胞内过多的二价铁会与  $\text{H}_2\text{O}_2$  发生芬顿反应, 产生对细菌有害的活性氧。考虑到 *fur* 缺失突变影响了铜绿假单胞菌的胞内铁稳态, 因此本研究分析了铜绿假单胞菌对  $\text{H}_2\text{O}_2$  的敏感性是否受 *fur* 缺失突变的影响。结果如图 4F 所示, PAO1、 $\Delta fur$  及其互补菌株的存活率都随着  $\text{H}_2\text{O}_2$  浓度增加而降低, 但相比 PAO1 和  $\Delta fur$  互补菌株,  $\Delta fur$  对  $\text{H}_2\text{O}_2$  的敏感性显著上升, 说明 *fur* 在铜绿假单胞菌抵抗  $\text{H}_2\text{O}_2$  的过程中发挥着重要作用。

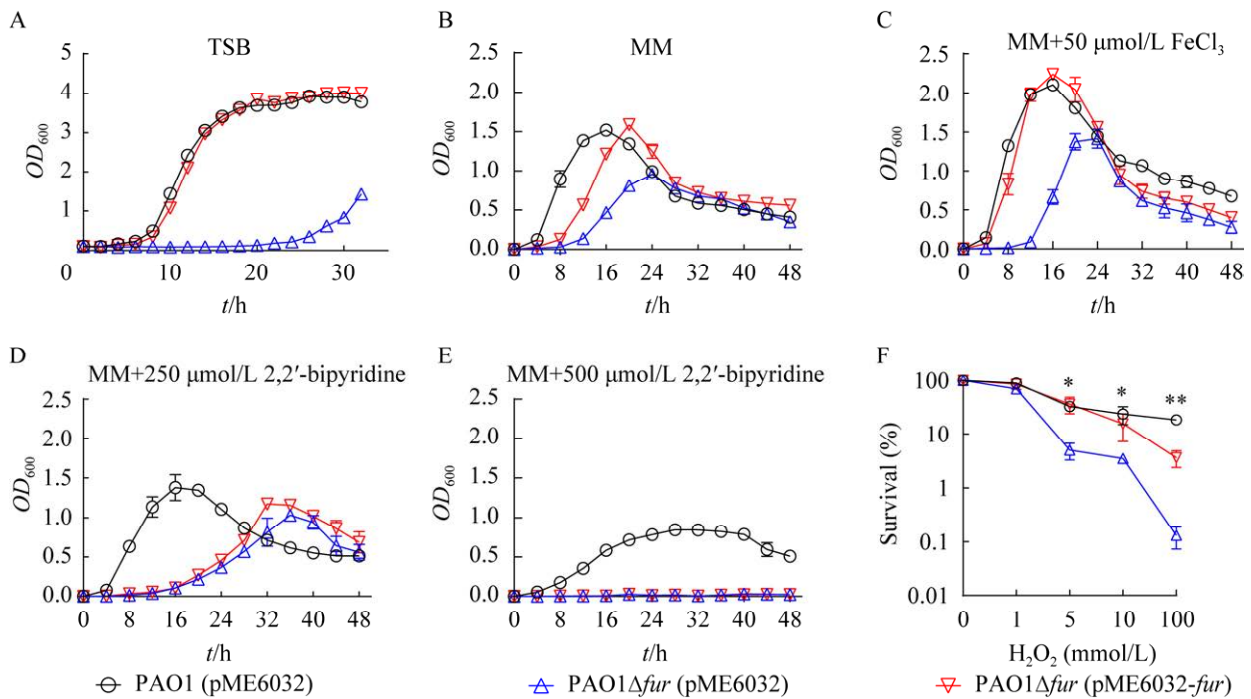


图 4 *fur* 缺失影响铜绿假单胞菌的生长

Figure 4 Deletion of *fur* affects the growth of *Pseudomonas aeruginosa*. A–E: Growth curves of PAO1,  $\Delta fur$  and its complementary strain in liquid medium TSB, MM, MM+50  $\mu\text{mol/L}$   $\text{FeCl}_3$ , MM+250  $\mu\text{mol/L}$  2,2'-bipyridine and MM+500  $\mu\text{mol/L}$  2,2'-bipyridine, respectively. F: Survival curves of PAO1,  $\Delta fur$  and its complementary strain under  $\text{H}_2\text{O}_2$  stress. \*:  $P < 0.05$ , \*\*:  $P < 0.01$ . All the data are representative of a minimum of three independent experiments. Error bars represent the standard deviations.

为了区分导致  $\Delta fur$  的生长缺陷表型是细胞生长增殖减缓, 还是诱导细胞死亡引起的。本研究将培养至稳定期的菌液调至同样的浓度, 然后连续 10 倍稀释后滴在 LB 平板上, 观察菌落的生长情况, 结果如图 5 所示。尽管  $\Delta fur$  在固体培养基上形成较小的菌落且生长速度显著低于 PAO1 和  $\Delta fur$  互补菌株, 但是三者之间 CFU 的数量并没有显著差异, 说明  $\Delta fur$  的生长缺陷表型是细胞生长增殖变慢造成的, 而不是诱导细胞死亡引起的。此外, 外源添加 50  $\mu\text{mol/L}$   $\text{FeCl}_3$  到固体培养基中并不会影响  $\Delta fur$  的生长, 提示高铁环境不会抑制  $fur$  缺失突变株在固体培养条件下的生长, 这与液体培养的结果一样, 说明缺失突变  $fur$  不影响铜绿假单胞菌对高铁环境的生长适应性。

### 2.3 异源 $fur$ 对铜绿假单胞菌 $fur$ 缺失突变株的遗传互补分析

为了探究铜绿假单胞菌的 Fur 蛋白在功能

上是否存在独特性, 本研究分别用丁香假单胞菌番茄致病变种 DC3000 的  $fur$  基因  $Psfur$  和大肠杆菌 MG1655 的  $fur$  基因  $Ecfur$  对铜绿假单胞菌的  $fur$  缺失突变株  $\Delta fur$  进行遗传互补分析。结果显示与铜绿假单胞菌野生  $fur$  的功能一样, 异源性的  $Psfur$  和  $Ecfur$  均能完全恢复  $\Delta fur$  的生长缺陷表型至野生菌水平(图 6), 说明铜绿假单胞菌的 Fur 蛋白可以被其他异源的 Fur 蛋白替代, 在功能上不存在独特性。

### 2.4 毒素基因 $pacT$ 不是造成 $\Delta fur$ 生长缺陷表型的原因

铜绿假单胞菌的 Fur 蛋白可以被其他细菌的 Fur 蛋白所替代, 暗示  $fur$  缺失突变株的生长缺陷表型可能是由铜绿假单胞菌中某些受 Fur 蛋白调控的专有途径来直接介导, 而不是 Fur 本身引起的。最近有文献报道, 铜绿假单胞菌的 Fur 与其毒素-抗毒素系统 PacTA 存在功能关联性, Fur 蛋白与毒素蛋白 PacT 直接互动并相

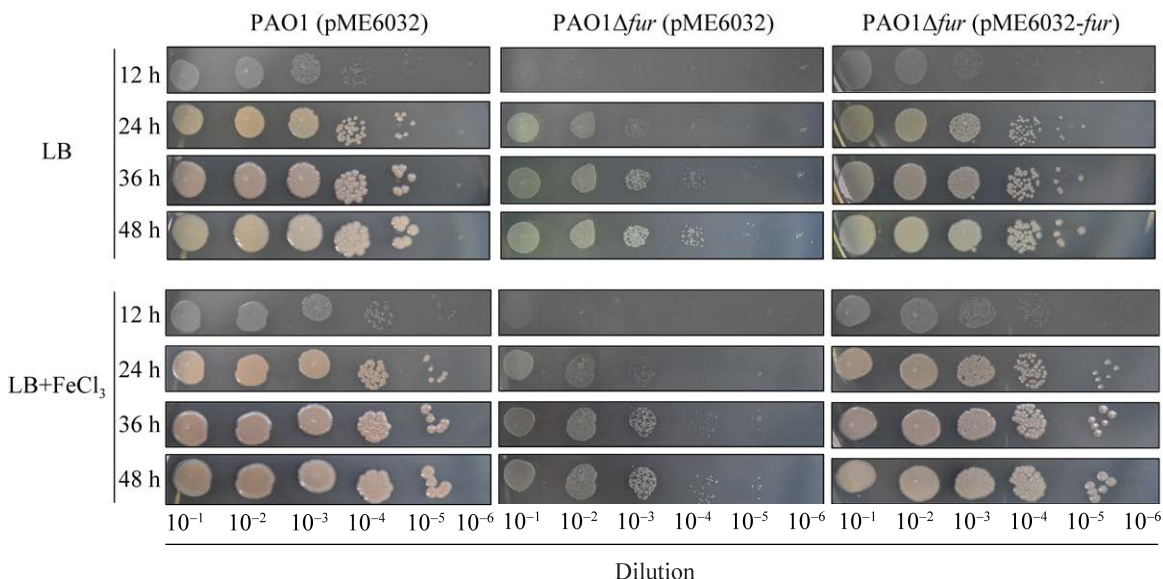


图 5  $fur$  缺失降低了铜绿假单胞菌的生长增殖速度

Figure 5 Deletion of  $fur$  reduces the growth and proliferation rate of *Pseudomonas aeruginosa*. The bacteria solution cultured to the stationary phase was adjusted to the same concentration, and then continuously diluted by ten times, 3  $\mu\text{L}$  diluent was dropped on LB plate and LB+50  $\mu\text{mol/L}$   $\text{FeCl}_3$  plate respectively, and cultured at 37  $^{\circ}\text{C}$  for 48 h. All the data are representative of a minimum of three independent experiments.

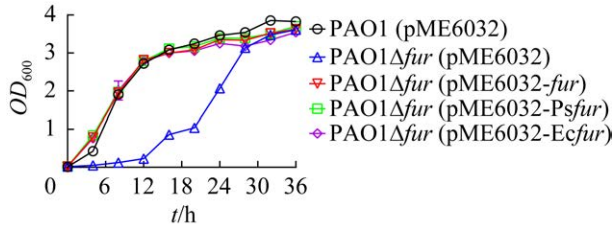


图 6 异源 *fur* 对铜绿假单胞菌 *fur* 缺失突变株的遗传互补分析

Figure 6 Genetic complementation analysis of *fur* deletion mutant by the heterogenous *fur* genes. The growth curves of the strains in TSB medium. All the data are representative of a minimum of three independent experiments. Error bars represent the standard deviations. *Psfur* is the *fur* gene of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000, and *Ecfur* is the *fur* gene of *Escherichia coli* MG1655.

互影响各自的功能<sup>[43]</sup>。为了验证 *fur* 缺失突变株的生长缺陷表型是否是 PacT 毒素造成的，本研究比较了野生菌 PAO1、 $\Delta fur$ 、 $\Delta pacT$  和  $\Delta pacT\Delta fur$  等各菌株之间的生长差异情况。结果如图 7A 所示，与 PAO1 和  $\Delta pacT$  相比， $\Delta pacT\Delta fur$  表现出和  $\Delta fur$  相同的生长缺陷表型，说明进一步缺失突变 *pacT* 不能恢复  $\Delta fur$  的

生长缺陷表型。此外，本研究还在 *fur* 缺失突变株中过表达了 PacT 的抗毒素基因 *pacA*，结果显示过表达 *pacA* 也不能恢复  $\Delta fur$  的生长缺陷表型 (图 7B)。这些结果说明 *fur* 缺失突变株的生长缺陷表型与 PacT 毒素无关。

## 2.5 缺失突变 *fur* 促进铜绿假单胞菌生物被膜的形成

环境中的铁可以作为一种信号调节铜绿假单胞菌生物被膜的发育<sup>[6]</sup>。为了研究缺失突变 *fur* 对铜绿假单胞菌生物被膜形成的影响，本研究通过方法 1.12 和方法 1.13 检测了 *fur* 缺失前后铜绿假单胞菌生物被膜的形成情况，结果如图 8 所示。缺失突变 *fur* 显著增强了铜绿假单胞菌在 96 孔板上的生物被膜形成能力，其生物被膜形成量达到野生菌的 2.6 倍，用 *fur* 互补可恢复  $\Delta fur$  的生物被膜形成量至野生菌水平 (图 8A)。同样的，在激光共聚焦扫描显微镜下可以观察到，与野生菌和  $\Delta fur$  互补菌株相比， $\Delta fur$  菌株能在盖玻片上形成更厚的生物被膜 (图 8B)。这些结果说明缺失突变 *fur* 显著增强了铜绿假单胞菌生物被膜的形成能力。

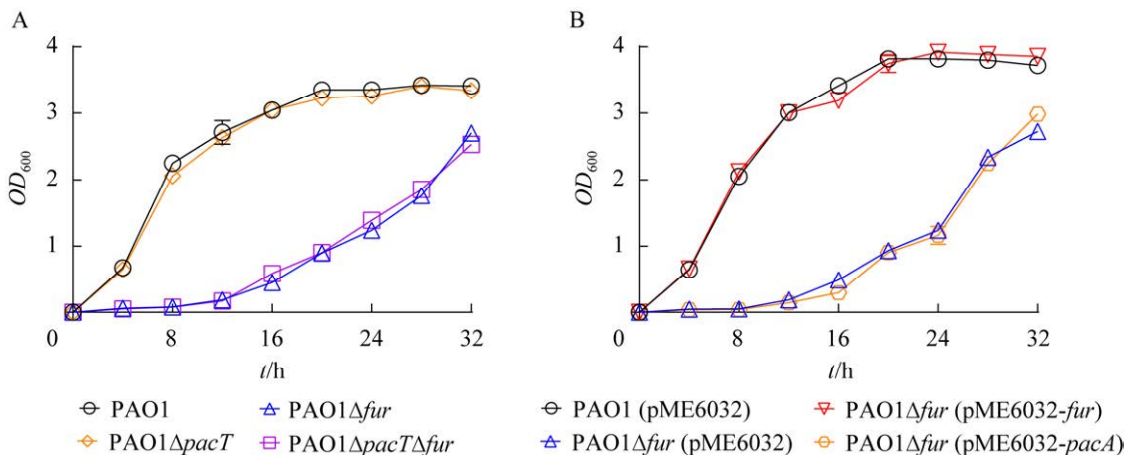


图 7 毒素/抗毒素系统 PacTA 对铜绿假单胞菌 *fur* 缺失突变株生长缺陷表型的影响

Figure 7 Effect of toxin-antitoxin system PacTA on the growth defect phenotype of  $\Delta fur$ . A: Growth curves of PAO1,  $\Delta fur$ ,  $\Delta pacT$  and  $\Delta pacT\Delta fur$  in TSB medium. B: Growth curves of PAO1,  $\Delta fur$ ,  $\Delta fur$  strain that complement *fur* and  $\Delta fur$  strain that overexpress *pacA* in TSB medium. All the data are representative of a minimum of three independent experiments. Error bars represent the standard deviations.

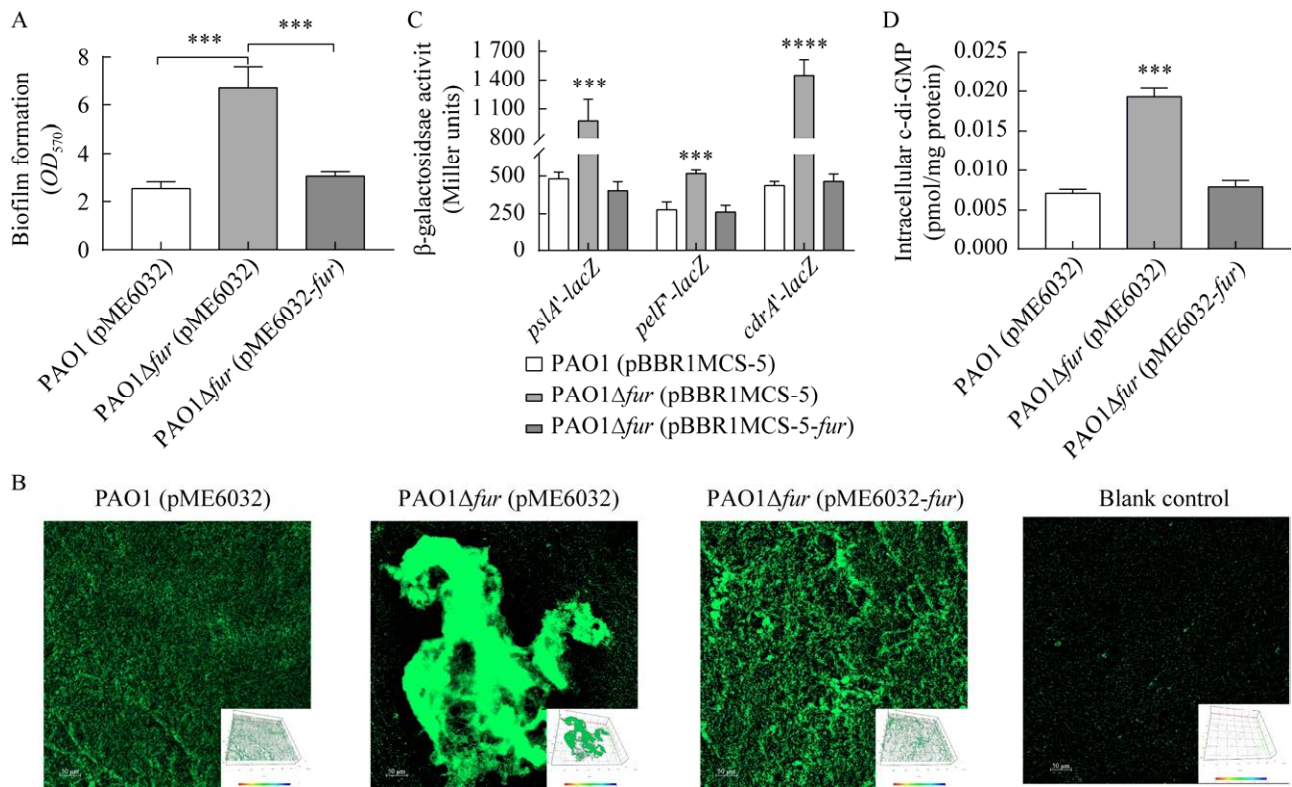


图 8 *fur* 缺失对铜绿假单胞菌生物被膜形成的影响

Figure 8 Deletion of *fur* affects the biofilm formation of *Pseudomonas aeruginosa*. A: Quantitative analysis of biofilm formation of PAO1, Δ*fur* and its complementary strain on 96-well plates. B: Biofilm imaging based on laser confocal scanning microscopy. C: The levels of biofilm-related genes transcription in each strain cells were monitored using the *pelF-lacZ*, *pslA-lacZ* and *cdrA-lacZ* transcriptional fusions, respectively. D: Determination of intracellular c-di-GMP levels in *P. aeruginosa*. All the data are representative of a minimum of three independent experiments. Error bars represent the standard deviations. \*\*\*:  $P < 0.001$ ; \*\*\*\*:  $P < 0.0001$ .

胞外多糖 Pel 和 Psl 是铜绿假单胞菌生物被膜的关键组成成分<sup>[44]</sup>。本研究进一步通过 *lacZ* 转录融合分析了缺失突变 *fur* 对铜绿假单胞菌胞外多糖相关合成基因 *pslA* 和 *pelF* 表达的影响。结果显示胞外多糖合成基因 *pslA* 和 *pelF* 在 Δ*fur* 中的表达量相比野生菌和 Δ*fur* 互补菌株提升了 1 倍多(图 8C), 说明 *fur* 显著抑制了胞外多糖合成基因 *pelF* 和 *pslA* 的表达。

作为第二信使的 c-di-GMP 是铜绿假单胞菌生物被膜形成过程中重要的正调控信号, 胞内 c-di-GMP 水平的提升会通过增强 Pel 和 Psl 胞外

多糖的合成而促进铜绿假单胞菌生物被膜的形成<sup>[45]</sup>。因此, 本研究分析了 *fur* 缺失对铜绿假单胞菌胞内 c-di-GMP 水平的影响。结果显示, 与野生菌和 Δ*fur* 互补菌株相比, 响应胞内 c-di-GMP 水平的报告基因 *cdrA* 在 Δ*fur* 中的表达显著增强(图 8C), 同时胞内 c-di-GMP 含量的检测结果也显示 Δ*fur* 的胞内 c-di-GMP 水平相较于野生菌和 Δ*fur* 互补菌株显著上升(图 8D)。这些结果说明缺失突变 *fur* 显著提升了铜绿假单胞菌的胞内 c-di-GMP 水平, 从而诱导 *pelF* 和 *pslA* 基因的表达, 进而促进铜绿假单胞菌生物被膜的形成。

## 2.6 *fur* 是铜绿假单胞菌鞭毛形成和毒力所必需的

先前研究显示空肠弯曲菌的 Fur 能在酸胁迫下上调鞭毛合成基因的表达<sup>[12]</sup>, 这暗示 Fur 可能与细菌的鞭毛合成有关。因此, 本研究用扫描电子显微镜观察了野生菌 PAO1、 $\Delta fur$  及其互补菌株的鞭毛形成情况。结果如图 9 所示, 与野生菌相比, 缺失突变 *fur* 使铜绿假单胞菌失去了鞭毛的形成能力, 而互补 *fur* 则使  $\Delta fur$  的鞭毛形成能力恢复到野生菌水平, 说明 *fur*

是铜绿假单胞菌的鞭毛形成所必需的。由于鞭毛是铜绿假单胞菌的重要毒力因子<sup>[46]</sup>, 为了探讨 *fur* 是否是铜绿假单胞菌毒力所必需的, 本研究使用大蜡螟幼虫侵染模型进一步分析了缺失突变 *fur* 对铜绿假单胞菌毒力的影响, 结果如图 10 所示。相比野生菌 PAO1, 缺失突变 *fur* 极显著地降低了铜绿假单胞菌对大蜡螟幼虫的毒力, 而互补 *fur* 使  $\Delta fur$  的毒力缺陷表型得到大部分恢复, 说明 *fur* 是铜绿假单胞菌的毒力所必需的。

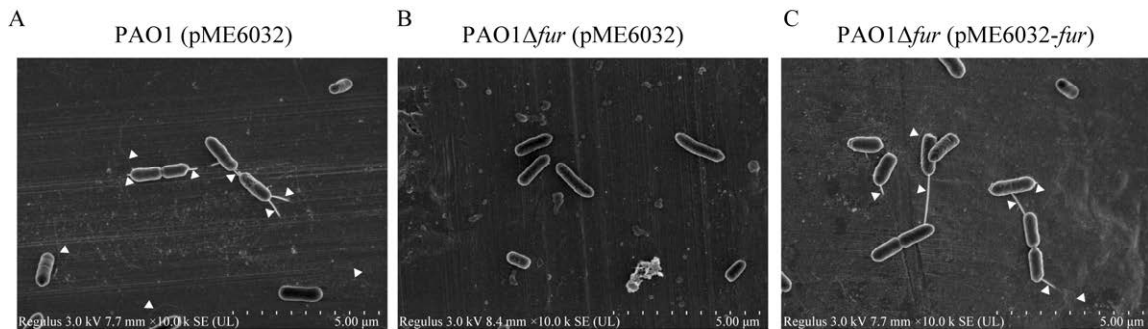


图 9 *fur* 缺失使铜绿假单胞菌丧失了鞭毛形成能力

Figure 9 Deletion of *fur* causes *Pseudomonas aeruginosa* to lose the ability to form flagella. Scanning electron microscope of the indicated strains of *P. aeruginosa* was performed. White triangles indicate flagella.

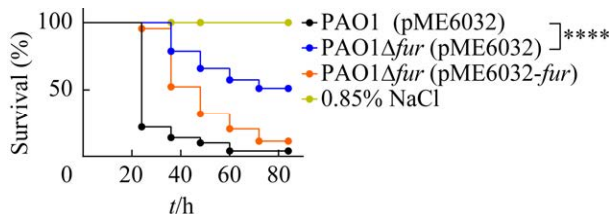


图 10 *fur* 缺失降低了铜绿假单胞菌对大蜡螟幼虫的毒力

Figure 10 Deletion of *fur* reduces the virulence of *Pseudomonas aeruginosa* to *Galleria mellonella* larvae. The bacterial culture of each strain of *P. aeruginosa* shown in the figure was injected into 50 *G. mellonella* larvae. The number of cells injected per *G. mellonella* larva was  $10^5$ , and data were collected every 12 h. The survival kinetics of *G. mellonella* larvae infected with *P. aeruginosa* is shown for each strain. \*\*\*\*:  $P < 0.0001$ .

## 3 讨论与结论

铁摄取调节蛋白 Fur 是细菌中存在的一种全局转录调控因子, 也是维持细菌胞内铁稳态的重要调控蛋白<sup>[6-8]</sup>。尽管如此, 绝大多数细菌的 *fur* 基因是可以缺失的。然而在以往的工作当中, 研究人员尝试构建却均无法得到铜绿假单胞菌的 *fur* 缺失突变株, 为此 *fur* 也被认为是铜绿假单胞菌的必需基因<sup>[5-6,19-20,29]</sup>。因此, 以往对铜绿假单胞菌 Fur 的功能及其调控基因的研究主要使用基因组上的 *fur* 发生点突变的菌株或构建的 *fur* 条件突变株<sup>[5-6,19,30]</sup>。由于上述铜绿假单胞菌的两种突变株都没有完全缺失 *fur*, 这种遗传分析的结果可能难以揭示 Fur 真实的生物学功能。



与前人的研究结果不同,本研究成功构建了铜绿假单胞菌的 *fur* 缺失突变株,说明铜绿假单胞菌的 *fur* 是可以缺失的非必需基因。进一步的表型分析结果显示,缺失突变 *fur* 极大地限制了铜绿假单胞菌的生长能力以及对限铁环境的生长适应性。究其原因,铜绿假单胞菌  $\Delta fur$  的这种生长缺陷表型是细胞生长增殖变慢造成的,并且与毒素-抗毒素系统 PacTA 无关。然而,铜绿假单胞菌的 Fur 蛋白在功能上不存在独特性,因为其他异源的 *fur* 基因能完全互补  $\Delta fur$  的这种生长缺陷表型。此外,缺失突变 *fur* 还使铜绿假单胞菌丧失了对铁载体生物合成的抑制作用,导致该菌对  $H_2O_2$  更敏感并丧失了鞭毛的形成能力,还降低了该菌对大蜡螟幼虫的毒力。同时,缺失突变 *fur* 还显著提升了铜绿假单胞菌的胞内 c-di-GMP 水平,从而诱导 *pelF* 和 *pslA* 基因的表达,进而促进铜绿假单胞菌生物被膜的形成。

本研究的 *fur* 缺失突变株与前人描述的 *fur* 点突变株和 *fur* 条件突变株相比,有些表型是一致的。不管是点突变<sup>[30]</sup>、条件突变<sup>[5-6]</sup>、还是缺失突变(图 2-图 4), *fur* 的突变均导致铜绿假单胞菌产生更多的铁载体并对  $H_2O_2$  更敏感,同时极大影响了铜绿假单胞菌的生长,这可能也是铜绿假单胞菌 *fur* 缺失突变株难以获得的原因。然而,与铜绿假单胞菌同属的其他假单胞菌,如丁香假单胞菌、荧光假单胞菌、类产碱假单胞菌和杀香鱼假单胞菌等的 *fur* 缺失或插入突变株却容易获得,那是因为缺失突变 *fur* 对这些假单胞菌的生长表型影响不大<sup>[47-50]</sup>。这暗示 *fur* 突变株的这种生长缺陷表型是铜绿假单胞菌所特有的。可是铜绿假单胞菌的 Fur 蛋白在功能上不存在独特性,因为它可以完全被大肠杆菌或丁香假单胞菌的 Fur 蛋白所替代(图 6)。这暗示 *fur* 突变株所特有的这种生长缺陷表型可能是由铜绿假单胞菌中某些受 Fur 调控的专有途径来直接介导,而

不是 Fur 本身引起的。

本研究的 *fur* 缺失突变株与前人描述的 *fur* 点突变株和 *fur* 条件突变株相比,在表型上有一些不同。首先,国外课题组研究表明,限铁培养能显著降低野生菌 PAO1 和 *fur* 条件突变株之间的生长差异,即条件突变 *fur* 增强了铜绿假单胞菌对限铁环境的生长适应性<sup>[5]</sup>,而国内课题组的研究则显示,限铁和高铁培养均显著增加了野生菌 PAO1 和 *fur* 条件突变株之间的生长差异,即条件突变 *fur* 降低了铜绿假单胞菌对限铁和高铁环境的生长适应性<sup>[6]</sup>。与上述报道不同的是,本研究发现 *fur* 缺失导致铜绿假单胞菌对限铁环境的生长适应性降低,但并不影响其对高铁环境的生长适应性(图 4B-4E)。其次,国外课题组报道, *fur* 是铜绿假单胞菌在固体培养基上生长所必需的,添加 50  $\mu\text{mol/L}$   $\text{FeCl}_3$  完全抑制了 *fur* 条件突变株在固体培养基上的生长<sup>[5]</sup>,与该结果相反,本研究发现缺失 *fur* 后铜绿假单胞菌仍能在固体培养基上生长,只是增殖速度变慢而已,并且添加 50  $\mu\text{mol/L}$   $\text{FeCl}_3$  对 *fur* 缺失突变株的生长没有影响(图 5)。第三,国外课题组研究显示基因组上 *fur* 的点突变和条件突变均不影响铜绿假单胞菌生物被膜的形成<sup>[5,51]</sup>,而国内的课题组发现 *fur* 的条件突变使铜绿假单胞菌形成生物被膜的能力减弱<sup>[6]</sup>,与这些报道相反,本研究发现缺失突变 *fur* 显著增强了铜绿假单胞菌生物被膜的形成能力,且 Fur 蛋白通过抑制胞内 c-di-GMP 水平的提升,进而抑制 Pel 和 Psl 胞外多糖的合成,从而实现了对铜绿假单胞菌生物被膜形成的抑制作用(图 8)。第四,国外课题组报道 *fur* 的条件突变不影响铜绿假单胞菌对大蜡螟幼虫的侵染能力和毒力,暗示 Fur 不是引起大蜡螟幼虫致死感染所必需的<sup>[5]</sup>,与该报道相反,本研究发现缺失突变 *fur* 极显著地降低了铜绿假单胞菌对大蜡螟幼虫的毒力,说明 Fur 是铜绿假单胞菌对大蜡

螟幼虫的毒力所必需的(图 10)。上述表型上的差异可能是 *fur* 点突变株和 *fur* 条件突变株中有不同程度的 *fur* 残留表达引起的。

最近, 国外课题组对铜绿假单胞菌 *fur* 条件突变株的生长缺陷表型产生的机制进行了研究, 结果显示条件突变 *fur* 在固体培养基上产生的菌落生长缺陷表型是由胞内铁载体 PCH 产生的毒性作用造成的<sup>[5]</sup>。然而, 在同样条件下 PCH 却不影响 *fur* 条件突变株在液体中的生长<sup>[5]</sup>。此外, 异源表达和合成 PCH 并不能抑制丁香假单胞菌 *fur* 缺失突变株的生长<sup>[5]</sup>。因此, 铁载体 PCH 产生的毒性作用可能是 *fur* 突变导致铜绿假单胞菌生长缺陷的原因之一, 而不是全部。*fur* 突变株的这种生长缺陷表型可能还与 PCH 之外的其他机制相关联。最近, 国内课题组在铜绿假单胞菌中鉴定了一个与 Fur 有关的毒素-抗毒素系统 PacTA, 发现毒素 PacT 可以直接结合 Fur 的 DNA 结合结构域并影响 Fur 转录抑制活性而参与调控胞内的铁稳态。同时, 当 Fur 和 PacT 在大肠杆菌中共表达时, Fur 能有效地抑制 PacT 的毒素作用, 暗示 Fur 可能与 PacA 一样具有对 PacT 起拮抗作用的抗毒素功能<sup>[43]</sup>。然而, 本研究的结果显示进一步缺失突变毒素基因 *pacT* 和过表达抗毒素基因 *pacA* 均不能恢复 *fur* 缺失突变株的生长缺陷表型(图 7)。说明毒素-抗毒素系统 PacTA 不是造成铜绿假单胞菌 *fur* 缺失突变株生长缺陷表型的原因。因此, *fur* 突变导致铜绿假单胞菌生长缺陷的成因还有待于进一步的研究揭示。

相比于国外课题组的结果<sup>[5]</sup>, 本研究还发现缺失 *fur* 后使铜绿假单胞菌丧失了形成鞭毛的能力(图 9), 这得到了国内课题组研究结果的印证<sup>[6]</sup>, 因为他们发现条件突变 *fur* 严重影响了铜绿假单胞菌的 swarming 和 swimming 运动能力<sup>[6]</sup>, 而这两种运动性都依赖于鞭毛<sup>[6]</sup>。先前的研究显示, 铜绿假单胞菌的运动性受胞内 c-di-GMP 水

平的调控, 胞内高水平的 c-di-GMP 能显著抑制铜绿假单胞菌的运动性<sup>[52]</sup>, 且该功能主要通过抑制鞭毛的形成实现的<sup>[53-55]</sup>。由于缺失突变 *fur* 显著提升了铜绿假单胞菌的胞内 c-di-GMP 水平(图 8), 因此推断缺失突变 *fur* 通过提升胞内 c-di-GMP 水平, 从而抑制铜绿假单胞菌鞭毛的形成, 进而影响其运动性。综上, Fur 对铜绿假单胞菌生物被膜形成和鞭毛形成的调控都是通过影响胞内 c-di-GMP 水平实现的, 但 Fur 对胞内 c-di-GMP 水平的调节机制仍不清楚, 还有待进一步研究。

总之, 本研究揭示了 *fur* 是铜绿假单胞菌重要但可以缺失的非必需铁摄取调节基因, 在铜绿假单胞菌的正常生长、铁载体生物合成、抗氧胁迫能力、鞭毛形成、生物被膜形成和毒力等方面都发挥着十分重要的作用。正是这些独特的表型使铜绿假单胞菌 *fur* 缺失突变株具有巨大的临床应用潜力。正如我国微生物学家牟希亚教授选育的铜绿假单胞菌甘露糖敏感血凝菌毛株 (*P. aeruginosa* mannose-sensitive hemagglutinin, PA-MSHA) 已被中国国家食品药品监督管理局 (China Food and Drug Administration, CFDA) [CFDA 于 2018 年被整合为国家市场监督管理总局 (National Medical Products Administration, NMPA)] 批准用于恶性肿瘤的辅助治疗<sup>[56]</sup> 一样, 铜绿假单胞菌的 *fur* 缺失突变株也可能作为抗肿瘤辅助治疗菌株或作为抗肿瘤基因工程的底盘菌, 在细菌抗肿瘤治疗方面发挥作用。鉴于细菌 Fur 已被提出作为潜在的药物靶点以及 *fur* 突变株已被作为疫苗开发的候选菌株<sup>[29,48]</sup>, 本研究还为针对铜绿假单胞菌的抗菌药物和疫苗的开发奠定了基础。

## 参考文献

- [1] DRAKESMITH H, PRENTICE A. Viral infection and iron metabolism[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2008, 6(7): 541-552.

- [2] IMLAY JA. Cellular defenses against superoxide and hydrogen peroxide[J]. *Annual Review of Biochemistry*, 2008, 77: 755-776.
- [3] ACHARD MES, CHEN KW, SWEET MJ, WATTS RE, SCHRODER K, SCHEMBRI MA, MCEWAN AG. An antioxidant role for catecholate siderophores in *Salmonella*[J]. *Biochemical Journal*, 2013, 454(3): 543-549.
- [4] SCHALK IJ, PERRAUD Q. *Pseudomonas aeruginosa* and its multiple strategies to access iron[J]. *Environmental Microbiology*, 2023, 25(4): 811-831.
- [5] PASQUA M, VISAGGIO D, LO SCIUTO A, GENAH S, BANIN E, VISCA P, IMPERI F. Ferric uptake regulator Fur is conditionally essential in *Pseudomonas aeruginosa*[J]. *Journal of Bacteriology*, 2017, 199(22): e00472-e00477.
- [6] 王志鹏, 于海英, 马旅雁. 铜绿假单胞菌铁摄取调节子 Fur 诱导表达突变株构建及表型分析[J]. *生物工程学报*, 2021, 37(9): 3253-3267.  
WANG ZP, YU HY, MA LY. Construction and phenotypic study of *Pseudomonas aeruginosa* inducibly expressing a ferric uptake regulator[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2021, 37(9): 3253-3267 (in Chinese).
- [7] PORCHERON G, DOZOIS CM. Interplay between iron homeostasis and virulence: Fur and RyhB as major regulators of bacterial pathogenicity[J]. *Veterinary Microbiology*, 2015, 179(1/2): 2-14.
- [8] FILLAT MF. The FUR (ferric uptake regulator) superfamily: diversity and versatility of key transcriptional regulators[J]. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2014, 546: 41-52.
- [9] TROXELL B, HASSAN HM. Transcriptional regulation by ferric uptake regulator (Fur) in pathogenic bacteria[J]. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2013, 3: 59.
- [10] ZHANG FY, LI BQ, DONG HJ, CHEN M, YAO S, LI JW, ZHANG HH, LIU XG, WANG HW, SONG NN, ZHANG KD, DU N, XU SJ, GU LC. YdiV regulates *Escherichia coli* ferric uptake by manipulating the DNA-binding ability of Fur in a SlyD-dependent manner[J]. *Nucleic Acids Research*, 2020, 48(17): 9571-9588.
- [11] GAO H, MA LZ, QIN Q, QIU Y, ZHANG JY, LI J, LOU J, DIAO BW, ZHAO HQ, SHI QN, ZHANG YQ, KAN B. Fur represses *Vibrio cholerae* biofilm formation via direct regulation of *vieSAB*, *cdgD*, *vpsU*, and *vpsA-K* transcription[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2020, 11: 587159.
- [12] ASKOURA M, SARVAN S, COUTURE JF, STINTZI A. The *Campylobacter jejuni* ferric uptake regulator promotes acid survival and cross-protection against oxidative stress[J]. *Infection and Immunity*, 2016, 84(5): 1287-1300.
- [13] SANTOS RERS, BATISTA BB, da SILVA NETO JF. Ferric uptake regulator Fur coordinates siderophore production and defense against iron toxicity and oxidative stress and contributes to virulence in *Chromobacterium violaceum*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2020, 86(21): e01620-20.
- [14] PORCHERON G, HABIB R, HOULE S, CAZA M, LÉPINE F, DAIGLE F, MASSÉ E, DOZOIS CM. The small RNA RyhB contributes to siderophore production and virulence of uropathogenic *Escherichia coli*[J]. *Infection and Immunity*, 2014, 82(12): 5056-5068.
- [15] ZHU CR, NGELEKA M, POTTER AA, ALLAN BJ. Effect of *fur* mutation on acid-tolerance response and *in vivo* virulence of avian septicemic *Escherichia coli*[J]. *Canadian Journal of Microbiology*, 2002, 48(5): 458-462.
- [16] KURABAYASHI K, AGATA T, ASANO H, TOMITA H, HIRAKAWA H. Fur represses adhesion to, invasion of, and intracellular bacterial community formation within bladder epithelial cells and motility in uropathogenic *Escherichia coli*[J]. *Infection and Immunity*, 2016, 84(11): 3220-3231.
- [17] HUSAIN M, JONES-CARSON J, LIU L, SONG M, SAAH JR, TROXELL B, MENDOZA M, HASSAN H, VÁZQUEZ-TORRES A. Ferric uptake regulator-dependent antinitrosative defenses in *Salmonella enterica* serovar typhimurium pathogenesis[J]. *Infection and Immunity*, 2014, 82(1): 333-340.
- [18] AJIBOYE TO, SKIEBE E, WILHARM G. Contributions of ferric uptake regulator Fur to the sensitivity and oxidative response of *Acinetobacter baumannii* to antibiotics[J]. *Microbial Pathogenesis*, 2018, 119: 35-41.
- [19] BARTON HA, JOHNSON Z, COX CD, VASIL AI, VASIL ML. Ferric uptake regulator mutants of *Pseudomonas aeruginosa* with distinct alterations in the iron-dependent repression of exotoxin A and siderophores in aerobic and microaerobic environments[J]. *Molecular Microbiology*, 1996, 21(5): 1001-1017.
- [20] PRINCE RW, COX CD, VASIL ML. Coordinate regulation of siderophore and exotoxin A production: molecular cloning and sequencing of the *Pseudomonas aeruginosa fur* gene[J]. *Journal of Bacteriology*, 1993, 175(9): 2589-2598.
- [21] RODRIGUEZ GM, VOSKUIL MI, GOLD B, SCHOOLNIK GK, SMITH I. *ideR*, an essential gene in

- mycobacterium tuberculosis: role of IdeR in iron-dependent gene expression, iron metabolism, and oxidative stress response[J]. *Infection and Immunity*, 2002, 70(7): 3371-3381.
- [22] YIN R, CHENG JL, WANG JY, LI PX, LIN JS. Treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infectious biofilms: challenges and strategies[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2022, 13: 955286.
- [23] WANG ST, CHENG JL, NIU YT, LI PX, ZHANG XQ, LIN JS. Strategies for zinc uptake in *Pseudomonas aeruginosa* at the host-pathogen interface[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2021, 12: 741873.
- [24] LLAMAS MA, SÁNCHEZ-JIMÉNEZ A. Iron homeostasis in *Pseudomonas aeruginosa*: targeting iron acquisition and storage as an antimicrobial strategy[M]. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. Cham: Springer International Publishing, 2022: 29-68.
- [25] PALMA M, WORGALL S, QUADRI LEN. Transcriptome analysis of the *Pseudomonas aeruginosa* response to iron[J]. *Archives of Microbiology*, 2003, 180(5): 374-379.
- [26] OCHSNER UA, VASIL ML. Gene repression by the ferric uptake regulator in *Pseudomonas aeruginosa*: cycle selection of iron-regulated genes[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1996, 93(9): 4409-4414.
- [27] OCHSNER UA, WILDERMAN PJ, VASIL AI, VASIL ML. GeneChip<sup>®</sup> expression analysis of the iron starvation response in *Pseudomonas aeruginosa*: identification of novel pyoverdine biosynthesis genes[J]. *Molecular Microbiology*, 2002, 45(5): 1277-1287.
- [28] CORNELIS P, MATTHIJS S, OEFFELEN LV. Iron uptake regulation in *Pseudomonas aeruginosa*[J]. *Biometals*, 2009, 22(1): 15-22.
- [29] VISCA P, IMPERI F. An essential transcriptional regulator: the case of *Pseudomonas aeruginosa* Fur[J]. *Future Microbiology*, 2018, 13(8): 853-856.
- [30] HASSETT DJ, SOKOL PA, HOWELL ML, MA JF, SCHWEIZER HT, OCHSNER U, VASIL ML. Ferric uptake regulator (Fur) mutants of *Pseudomonas aeruginosa* demonstrate defective siderophore-mediated iron uptake, altered aerobic growth, and decreased superoxide dismutase and catalase activities[J]. *Journal of Bacteriology*, 1996, 178(14): 3996-4003.
- [31] LIN JS, ZHANG WP, CHENG JL, YANG X, ZHU KX, WANG Y, WEI GH, QIAN PY, LUO ZQ, SHEN XH. A *Pseudomonas* T6SS effector recruits PQS-containing outer membrane vesicles for iron acquisition[J]. *Nature Communications*, 2017, 8: 14888.
- [32] SCHÄFER A, TAUCH A, JÄGER W, KALINOWSKI J, THIERBACH G, PÜHLER A. Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19: selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum*[J]. *Gene*, 1994, 145(1): 69-73.
- [33] DENNIS JJ, ZYLSTRA GJ. Plasposons: modular self-cloning minitransposon derivatives for rapid genetic analysis of Gram-negative bacterial genomes[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1998, 64(7): 2710-2715.
- [34] HEEB S, BLUMER C, HAAS D. Regulatory RNA as mediator in GacA/RsmA-dependent global control of exoproduct formation in *Pseudomonas fluorescens* CHA0[J]. *Journal of Bacteriology*, 2002, 184(4): 1046-1056.
- [35] KOVACH ME, ELZER PH, HILL DS, ROBERTSON GT, FARRIS MA, ROOP RM II, PETERSON KM. Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes[J]. *Gene*, 1995, 166(1): 175-176.
- [36] BECHER A, SCHWEIZER HP. Integration-proficient *Pseudomonas aeruginosa* vectors for isolation of single-copy chromosomal *lacZ* and *lux* gene fusions[J]. *BioTechniques*, 2000, 29(5): 948-950, 952.
- [37] LIN JS, CHENG JL, CHEN KQ, GUO CH, ZHANG WP, YANG X, DING W, MA L, WANG Y, SHEN XH. The *icmF3* locus is involved in multiple adaptation-and virulence-related characteristics in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1[J]. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2015, 5: 70.
- [38] HUBER B, RIEDEL K, KÖTHE M, GIVSKOV M, MOLIN S, EBERL L. Genetic analysis of functions involved in the late stages of biofilm development in *Burkholderia cepacia* H111[J]. *Molecular Microbiology*, 2002, 46(2): 411-426.
- [39] MEYER JM, ABDALLAH MA. The fluorescent pigment of *Pseudomonas fluorescens*: biosynthesis, purification and physicochemical properties[J]. *Journal of General Microbiology*, 1978, 107(2): 319-328.
- [40] CORNELIS P, ANJIAH V, KOEDAM N, DELFOSSE P, JACQUES P, THONART P, NEIRINCKX L. Stability, frequency and multiplicity of transposon insertions in the pyoverdine region in the chromosomes of different fluorescent pseudomonads[J]. *Journal of General Microbiology*, 1992, 138(7): 1337-1343.
- [41] LIN JS, YANG JS, CHENG JL, ZHANG WP, YANG X, DING W, ZHANG H, WANG Y, SHEN XH.

- Pseudomonas aeruginosa* H3-T6SS combats H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stress by diminishing the amount of intracellular unincorporated iron in a dps-dependent manner and inhibiting the synthesis of PQS[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2023, 24(2): 1614.
- [42] 王帅涛, 牛艳婷, 张恒, 李盼欣, 张宁梅, 成娟丽, 林金水. 靶向破坏铜绿假单胞菌生物被膜的定向蛋白投放技术[J]. *微生物学报*, 2021, 61(9): 2726-2748. WANG ST, NIU YT, ZHANG H, LI PX, ZHANG NM, CHENG JL, LIN JS. An engineered bacterium for the targeted delivery of proteins to destroy *Pseudomonas aeruginosa* biofilms[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2021, 61(9): 2726-2748 (in Chinese).
- [43] SONG YJ, ZHANG SP, YE ZR, SONG YY, CHEN L, TONG AP, HE YX, BAO R. The novel type II toxin-antitoxin PacTA modulates *Pseudomonas aeruginosa* iron homeostasis by obstructing the DNA-binding activity of Fur[J]. *Nucleic Acids Research*, 2022, 50(18): 10586-10600.
- [44] BAKER P, HILL PJ, SNARR BD, ALNABELSEYA N, PESTRAK MJ, LEE MJ, JENNINGS LK, TAM J, MELNYK RA, PARSEK MR, SHEPPARD DC, WOZNAK DJ, HOWELL PL. Exopolysaccharide biosynthetic glycoside hydrolases can be utilized to disrupt and prevent *Pseudomonas aeruginosa* biofilms[J]. *Science Advances*, 2016, 2(5): e1501632.
- [45] RYBTKE MT, BORLEE BR, MURAKAMI K, IRIE Y, HENTZER M, NIELSEN TE, GIVSKOV M, PARSEK MR, TOLKER-NIELSEN T. Fluorescence-based reporter for gauging cyclic di-GMP levels in *Pseudomonas aeruginosa*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2012, 78(15): 5060-5069.
- [46] GARCIA M, MORELLO E, GARNIER J, BARRAULT C, GARNIER M, BURUCOA C, LECRON JC, SI-TAHAR M, BERNARD FX, BODET C. *Pseudomonas aeruginosa* flagellum is critical for invasion, cutaneous persistence and induction of inflammatory response of skin epidermis[J]. *Virulence*, 2018, 9(1): 1163-1175.
- [47] CHA JY, LEE JS, OH JI, CHOI JW, BAIK HS. Functional analysis of the role of Fur in the virulence of *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* 11528: Fur controls expression of genes involved in quorum-sensing[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2008, 366(2): 281-287.
- [48] Wang HR, HU YH, ZHANG WW, SUN L. Construction of an attenuated *Pseudomonas fluorescens* strain and evaluation of its potential as a cross-protective vaccine[J]. *Vaccine*, 2009, 27(30): 4047-4055.
- [49] BECERRA G, MERCHAN F, BLASCO R, IGENO MI. Characterization of a ferric uptake regulator (Fur)-mutant of the cyanotrophic bacterium *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT 5344[J]. *Journal of Biotechnology*, 2014, 190: 2-10.
- [50] HUANG LX, ZUO YF, QIN YX, ZHAO LM, LIN M, YAN QP. The zinc nutritional immunity of *Epinephelus coioides* contributes to the importance of *znuC* during *Pseudomonas plecoglossicida* infection[J]. *Frontiers in Immunology*, 2021, 12: 678699.
- [51] BANIN E, VASIL ML, GREENBERG EP. Iron and *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2005, 102(31): 11076-11081.
- [52] KUCHMA SL, DELALEZ NJ, FILKINS LM, SNAVELY EA, ARMITAGE JP, O'TOOLE GA. Cyclic di-GMP-mediated repression of swarming motility by *Pseudomonas aeruginosa* PA14 requires the MotAB stator[J]. *Journal of Bacteriology*, 2015, 197(3): 420-430.
- [53] XIN LY, ZENG YK, SHENG S, CHEA RA, LIU Q, LI HY, YANG L, XU LH, CHIAM KH, LIANG ZX. Regulation of flagellar motor switching by c-di-GMP phosphodiesterases in *Pseudomonas aeruginosa*[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2019, 294(37): 13789-13799.
- [54] STARKEY M, HICKMAN JH, MA LY, ZHANG N, LONG SD, HINZ A, PALACIOS S, MANOIL C, KIRISITS MJ, STARNER TD, WOZNAK DJ, HARWOOD CS, PARSEK MR. *Pseudomonas aeruginosa* rugose small-colony variants have adaptations that likely promote persistence in the cystic fibrosis lung[J]. *Journal of Bacteriology*, 2009, 191(11): 3492-3503.
- [55] BARAQUET C, HARWOOD CS. Cyclic diguanosine monophosphate represses bacterial flagella synthesis by interacting with the Walker A motif of the enhancer-binding protein FleQ[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2013, 110(46): 18478-18483.
- [56] 洪义东, 胡楠, 卞宝祥, 宋子琰, 吴风雷. 铜绿假单胞菌注射液抗肿瘤作用及其相关机制的研究进展[J]. *中国现代应用药学*, 2019, 36(2): 256-259. HONG YD, HU N, BIAN BX, SONG ZY, WU FL. Research advances in the mechanisms for anti-tumor effect of *Pseudomonas aeruginosa* injection[J]. *Chinese Journal of Modern Applied Pharmacy*, 2019, 36(2): 256-259 (in Chinese).