



鸭疫里默氏杆菌 CH-1 株 37 °C 和 42 °C 的转录组测序及比较分析

汪思懿^{1,2,3,4#}, 郭方^{1,2,3,4#}, 程安春^{1,2,3,4}, 刘马峰^{1,2,3,4*}

- 1 西南动物疫病防控技术教育部工程研究中心, 四川 成都 611130
- 2 四川省动物疫病防控国际联合研究中心, 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
- 4 四川农业大学动物医学院 禽病防治研究中心, 四川 成都 611130

汪思懿, 郭方, 程安春, 刘马峰. 鸭疫里默氏杆菌 CH-1 株 37 °C 和 42 °C 的转录组测序及比较分析[J]. 微生物学报, 2024, 64(7): 2368-2380.

WANG Siyi, GUO Fang, CHENG Anchun, LIU Mafeng. Transcriptome sequencing and comparison of *Riemerella anatipestifer* CH-1 at 37 °C and 42 °C[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2024, 64(7): 2368-2380.

摘要:【目的】鸭疫里默氏杆菌(*Riemerella anatipestifer*)是一种感染鸭的革兰氏阴性菌, 给养鸭业造成较大经济损失。由于鸭体内温度为 42 °C, 当鸭疫里默氏杆菌感染鸭后必然会调节自身基因表达来适应鸭体内温度。为鉴定鸭疫里默氏杆菌 CH-1 株感染鸭的适应性机制, 本研究测定和比较了鸭疫里默氏杆菌 CH-1 株在 37 °C 和 42 °C 下的转录组。【方法】将鸭疫里默氏杆菌 RA-CH-1 株在 37 °C 培养至对数生长期后, 分别在 37 °C 和 42 °C 热应激 1 h, 收集菌体, 提取总 RNA。利用转录组测序(RNA-seq)技术获得 RA-CH-1 在 37 °C 和 42 °C 下的转录组原始数据, 筛选得到差异表达基因, 通过基因本体论(gene ontology, GO)数据库和京都基因与基因组百科全书(Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)数据库对差异表达基因进行富集分析。选取 *dnaK* 作为热应激反应基因进行功能初步鉴定。【结果】共筛选获得 234 个显著差异表达基因, 其中 169 个基因显著上调, 65 个基因显著下调。显著差异表达基因通过 GO 富集分析主要富集在核苷代谢过程、糖基化合物代谢过程和核心 RNA 聚合酶结合转录因子活性等; 显著差异表达基因通过 KEGG 富集分析主要富集在氧化磷酸化、核糖体和细菌分泌系统等通路。与 37 °C 条件下生长能力比较, *dnaK* 缺失后导致鸭疫里

资助项目: 国家重点研发计划(2023YFD1800200); 国家自然科学基金(32273003); 四川省自然科学基金(2024NSFSC0034)
This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2023YFD1800200), the National Natural Science Foundation of China (32273003), and the Natural Science Foundation of Sichuan Province (2024NSFSC0034).

[#]These authors contributed equally to this work.

*Corresponding author. E-mail: liumafengra@163.com

Received: 2023-12-07; Accepted: 2024-04-07; Published online: 2024-04-17

默氏杆菌在 42 °C 条件下生长能力受损。【结论】RA-CH-1 在 37 °C 和 42 °C 下生长不受影响, 通过热休克反应相关蛋白等因子表达上调或下调来应对温度升高后的应激状况。

关键词: 鸭疫里默氏杆菌; 转录组; 温度

Transcriptome sequencing and comparison of *Riemerella anatipestifer* CH-1 at 37 °C and 42 °C

WANG Siyi^{1,2,3,4#}, GUO Fang^{1,2,3,4#}, CHENG Anchun^{1,2,3,4}, LIU Mafeng^{1,2,3,4*}

1 Engineering Research Center of Southwest Animal Disease Prevention and Control Technology, Ministry of Education, Chengdu 611130, Sichuan, China

2 International Joint Research Center for Animal Disease Prevention and Control of Sichuan Province, Chengdu 611130, Sichuan, China

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

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

Abstract: [Objective] *Riemerella anatipestifer* is a Gram-negative bacterium infecting ducks, causing serious economic losses to the duck industry. After infection, *R. anatipestifer* regulates gene expression to adapt to the 42 °C body temperature of ducks. To identify the adaptation mechanism of *R. anatipestifer* CH-1 in ducks, we sequenced and compared the transcriptomes of *R. anatipestifer* CH-1 at 37 °C and 42 °C. **[Methods]** *R. anatipestifer* CH-1 was cultured to the exponential growth phase at 37 °C and then subjected to heat stress at 37 °C and 42 °C, respectively, for 1 h. The cells were then collected for the extraction of total RNA. The raw transcriptome data of the bacteria cultured at 37 °C and 42 °C were obtained by transcriptome sequencing, and differentially expressed genes (DEGs) were screened. Gene ontology (GO) and Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) enrichment analyses were carried out for the DEGs. The gene *dnaK* involved in the response to heat stress was selected for preliminary functional identification. **[Results]** A total of 234 DEGs were screened out, including 169 genes with up-regulated expression and 65 genes with down-regulated expression. The GO enrichment analysis showed that the DEGs were mainly enriched in the nucleotide metabolic process, glycosyl compound metabolic process, and core RNA polymerase binding transcription factor activity. The KEGG enrichment analysis indicated that the DEGs were mainly involved in oxidative phosphorylation, ribosomes, and bacterial secretion systems. The deletion of *dnaK* impaired the growth of *R. anatipestifer* CH-1 at 42 °C, compared with that at 37 °C. **[Conclusion]** Compared with that at 37 °C, the growth of *R. anatipestifer* CH-1 was not affected at 42 °C. The strain up-regulated or down-regulated the expression of heat shock response proteins and other factors to cope with heat stress.

Keywords: *Riemerella anatipestifer*; transcriptome; temperature

鸭疫里默氏杆菌(*Riemerella anatipestifer*, RA)是一种细小短杆状革兰氏阴性菌,属于威克氏菌科(*Weeksellaceae*)里氏杆菌属(*Riemerella*)^[1],该菌主要感染鸭、鹅等禽类,血清型复杂,至少有 21 种不同的血清型已被鉴定,各血清型之间无交叉保护作用,在我国以血清 1 型和 2 型最为普遍^[2]。本研究中所使用的野生型菌株 RA-CH-1 为血清 1 型的代表菌株^[3]。另外,该菌具有多重耐药的特点^[4],对四环素、替加环素、氯霉素、红霉素、多黏菌素 B、氨基西林、卡那霉素、环丙沙星、甲氧西林、头孢吡肟等 30 种药物均具有耐药性^[5-8];就单个菌株而言,可对多达 7 类抗生素耐药^[7]。在临床上很难找到该菌的敏感药物。因此,单一血清型疫苗和药物很难达到理想防控效果,从细菌生理学角度出发寻找新的靶点是未来发展方向之一。

细菌在生长繁殖过程中经常会遇到各种应激刺激,如热应激、氧化应激、酸/碱应激等。细菌通过调节基因的表达来适应环境的改变。环境温度低于鸭体内温度时,鸭疫里默氏杆菌感染鸭后必然会出现热应激反应。当细菌处于热应激环境下,其毒力及抵御宿主杀伤的能力会明显降低^[9]。变形链球菌通过增强糖酵解等代谢途径来额外获取更多的能量,使其保持毒力以应对这种不利环境^[10]。此外,大肠杆菌能够通过多种调控网络和途径响应不同的应激刺激,并通过多种生物学过程及代谢通路参与抵抗热应激对细菌造成的损伤^[11]。

为揭示鸭疫里默氏杆菌感染鸭后抵抗热应激的机制,本研究测定了该菌在 37 °C 和 42 °C 两种温度条件下的转录组,对不同温度下基因表达水平的差异进行了分析。以热应激反应基因 *dnaK* 为例,证明了其在热应激抵抗中的作用。本研究为鸭疫里默氏杆菌生存和致病机制提供参考,进一步可以为防治该菌感染提供新思路。

1 材料与方 法

1.1 菌种及培养方法

鸭疫里默氏杆菌 CH-1 株(RA-CH-1)和 RA-CH-1 Δ *dnaK* 由四川农业大学动物医学院禽病防治中心冻存(-80 °C)。使用时将少量冻存的菌种接种至血琼脂培养基上,于 37 °C 培养箱培养过夜。

1.2 RA-CH-1 生长曲线的测定

将复苏于血琼脂平板的 RA-CH-1 接种在胰酪大豆胨液体(tryptone soya broth, TSB)培养基(OXOID 公司)中,置于空气摇床 37 °C、180 r/min 培养过夜。次日,测定过夜菌液的 OD_{600} 值,将菌液分别接种于 2 管新的 20 mL TSB 培养基中,从 OD_{600} 为 0.1 开始培养。菌液分别置于 37 °C 和 42 °C 的空气摇床中,180 r/min 培养。期间每 2 h 测定一次 OD_{600} 值,共培养 12 h。使用 GraphPad Prism 软件记录并整理数据。

1.3 37 °C 和 42 °C 下 RA-CH-1 总 RNA 的提取

将 RA-CH-1 接种于 20 mL TSB 培养基中,置于空气摇床 37 °C、180 r/min 培养至对数期(OD_{600} 为 1.0-1.5)。取 3 mL 菌液于 5 mL EP 管中,分别置于 37 °C 和 42 °C 水浴锅中培养 1 h,然后室温下 7 000 r/min 离心 5 min 收集菌体,使用 RNAsimple Total RNA Kit [天根生化科技(北京)有限公司],参照使用说明的方法分别提取不同条件下菌体的总 RNA。

1.4 转录组测序(RNA-seq)

RNA 的检测、文库构建及测序均由北京诺禾致源科技股份有限公司进行。总 RNA 经检测合格后,去除样本中的核糖体 RNA (ribosomal RNA, rRNA),获得 mRNA。随后加入 fragmentation buffer 将得到的 mRNA 随机打断成短片段,按照链特异性建库的方式建库。库检合格后,把

不同文库按照有效浓度及目标下机数据量的需求 pooling 后进行 Illumina 测序。测序片段被高通量测序仪测得的图像数据经 CASAVA 碱基识别转化为原始测序序列(sequenced reads), 也被称为 raw data 或 raw reads, 结果以 fastq 文件格式存储, 其中包含测序序列(reads)的序列信息以及其对应的测序质量信息。原始的测序数据经过数据过滤、测序错误率检查、G+C 含量分布检查, 获得后续分析使用的 clean reads。

1.5 差异表达基因的筛选及分析

用 Bowtie 2 将过滤后的测序序列进行基因组定位分析, 根据基因比对在参考基因组上的位置信息, 从而统计每个基因从起始到终止范围内覆盖的 reads 数。然后计算各样本所有基因的表达值(expected number of fragments per kilobase of transcript sequence per millions base pairs sequenced, FPKM), 以此对测序数据进行定量分析。得到各组表达数据后, 进行统计学分析, 筛选样本在不同条件下表达水平显著差异的基因。首先使用 edge R 软件对原始的 read count 进行标准化, 然后使用负二项分布模型进行假设检验概率(P -value)的计算, 最后进行多重假设检验校正, 得到 P_{adj} 值。差异表达基因筛选的阈值为 $|\log_2(\text{fold change})| > 1$, P_{adj} 值 < 0.05 。

1.6 差异基因的富集分析

基因本体论(gene ontology, GO)是描述基因功能的综合性数据库, 可分为生物过程(biological process)、细胞组成(cellular component)和分子功能(molecular function) 3 个部分。因此, 对筛选出的差异表达基因进行 GO 功能富集。

京都基因与基因组百科全书(Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)是整合了基因组、化学和系统功能信息的综合性数据库, 它可以从分子水平信息理解生物系统(如细胞、生物体和生态系统)的高级功能和效用。

因此, 对筛选出的差异表达基因进行 KEGG 通路富集。

1.7 qRT-PCR 验证 RNA-seq 结果

从差异表达基因中分别选取上调和下调最显著的 10 个基因, 在 NCBI 数据库中查询选取基因的序列, 利用 PerlPrimer 软件设计出 qRT-PCR 引物, 引物序列如表 1 所示。按照方法 1.3 提取 37 °C 和 42 °C 下 RA-CH-1 的总 RNA, 然后将其反转录为 cDNA 模板。qRT-PCR 检测所选基因的相对表达水平。

1.8 蛋白质印迹(Western blotting)检测

将 RA-CH-1 接种于 20 mL TSB 培养基中, 置于空气摇床 37 °C、180 r/min 培养至对数期(OD_{600} 为 1.0–1.5)。取 3 mL 菌液于 5 mL EP 管中, 分别在 37 °C 和 42 °C 水浴锅中静置培养 1 h, 随后 4 °C、12 000 r/min 离心 20 min 收集菌体, 将菌体用 1×loading buffer 重悬后煮沸 10 min 备用。将全菌样进行 SDS-PAGE, 将样品转到 PVDF 膜上后置于 4 °C 冰箱封闭过夜。将封闭后的膜用 TBST 洗涤 3 次, 每次 10 min。在使用 DnaK 多克隆抗体和 RecA 多克隆抗体分别进行孵育过夜后, 将膜取出, 并使用 TBST 洗涤 3 次, 每次 10 min。用羊抗鼠二抗进行孵育后, 使用增强型化学发光试剂(enhanced chemiluminescence, ECL)显色观察不同温度下 DnaK 蛋白的表达情况。

1.9 数据处理

采用 GraphPad Prism 8 进行数据处理和统计学分析。通过 Student's t -test 检验统计学显著性, $P < 0.05$ 即为具有统计学差异。

2 结果与分析

2.1 RA-CH-1 在 42 °C 和 37 °C 下的生长曲线

为鉴定鸭疫里默氏杆菌可以适应鸭体内的温度, 首先测定了鸭疫里默氏杆菌 CH-1 株在

表 1 qRT-PCR 引物序列

Table 1 Primer sequences for qRT-PCR

Primers	Sequences (5'→3')
B739_RS03260 qRT P1	GCCAAATAACAGGAAAGCGT
B739_RS03260 qRT P2	TTCTACAGCCTCCTCAATTCC
B739_RS08415 qRT P1	TATCCCAGATACAGCGAAAGAG
B739_RS08415 qRT P2	GCCATAAAGCACTTTATCTCCT
B739_RS00030 qRT P1	AAGAGTTCAATGGATTGGCTG
B739_RS00030 qRT P2	GGAATGTCAAACACAACCCA
B739_RS02635 qRT P1	TACGCTATTAGAACAGGTGCTC
B739_RS02635 qRT P2	GGATAATCGCTCCATACTTCCT
B739_RS04910 qRT P1	ATCACAAGACTACTAGAACTGC
B739_RS04910 qRT P2	AGCTAGCTTGTTAACAATGCT
B739_RS02040 qRT P1	ACTACTCTTATTGTTTGGAGGG
B739_RS02040 qRT P2	CTTCTTCTGTTTCTGTTGAAGG
B739_RS04515 qRT P1	TCGCCTATTCTGCATAAGGT
B739_RS04515 qRT P2	GAGCATTCTCCAAGTTTCTCAC
B739_RS05930 qRT P1	TCCCTGCATTGAAGAAATTCC
B739_RS05930 qRT P2	ATCATGTTGGTAGGATAAGCAC
B739_RS04340 qRT P1	GTGGCTCAATTAGTTTACGAGG
B739_RS04340 qRT P2	TAACTTGCTTAATGCCTGCC
B739_RS09245 qRT P1	TCCTGACCATATAGAGCAAGAC
B739_RS09245 qRT P2	TACCTTCAAAGCCTTCAATCAG
B739_RS03945 qRT P1	GCCAAAGTATTACCACAGCA
B739_RS03945 qRT P2	GCATTCTTCCCAAATCTAGCA
B739_RS00425 qRT P1	ATGTAACGCTTTATCCTAACCC
B739_RS00425 qRT P2	GGTTATCATCTTTCCGTCCAC
B739_RS02860 qRT P1	GGCGGAACATAATGGTAAAGG
B739_RS02860 qRT P2	TCTGTAAACTCTACGAGGTGTG
B739_RS01115 qRT P1	GGCACAGGAATCGTAATAGG
B739_RS01115 qRT P2	CTACTTCATCTTCAATCGTGGG
B739_RS07255 qRT P1	GGCACACCTAAATACTCAGG
B739_RS07255 qRT P2	GAACTATTTACCCATGAACCCA
B739_RS01700 qRT P1	CCATCTGACTATAATCCCCT
B739_RS01700 qRT P2	CCCAAATACGCTAGTTCCT
B739_RS01110 qRT P1	GCGTACACAAACATTCTTCAG
B739_RS01110 qRT P2	GTCTTTGATGCTTCCCTCCAG
B739_RS09890 qRT P1	AACCAAATGAATGACCACC
B739_RS09890 qRT P2	AGTTGTAATCTGCCTTTCCTG
B739_RS05140 qRT P1	TGATAAGTTGAGAAAGACGC
B739_RS05140 qRT P2	CATTGATAGGAAAGTGGGCTC
B739_RS00590 qRT P1	GTTAGGCTTTATTCCACGAACC
B739_RS00590 qRT P2	CTGATTTGTTGCTCTGGGTG
recA qRT P1	TGAAACTAGGTGATGGTACG
recA qRT P2	CTTAGGATAACCGCCTACTC

37 °C和 42 °C两种温度条件下的生长曲线，结果如图 1 所示。在 37 °C和 42 °C条件下，RA-CH-1 的生长无显著差异，说明鸭疫里默氏杆菌可以通过基因表达的调节来适应鸭体内的热应激反应。

2.2 转录组测序质量评估

原始数据经过滤、测序错误率检查、G+C 含量分布检查后的测序数据质量情况如表 2 所示。

2.3 差异表达基因分析

测序数据中显著差异表达基因[$|\log_2(\text{fold change})| > 1$ 及 $P_{\text{adj}} < 0.05$]的筛选结果如图 2 所示。相对于培养温度为 37 °C下，培养温度为 42 °C下显著差异表达基因共 234 个，其中显著上调的基因共 169 个，显著下调的基因共 65 个。

2.4 差异表达基因的 GO 功能富集分析和 KEGG 通路富集分析

对获得的差异表达基因进行 GO 注释分析，共得到 726 个 GO 功能注释，经筛选后发现显著富集的有 62 个 GO 功能注释，包括生物学过程(biological process) 37 个、细胞组分(cellular component) 6 个和分子功能(molecular function)

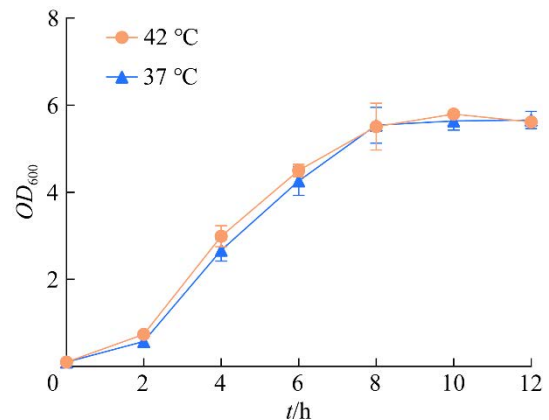


图 1 RA-CH-1 在 42 °C和 37 °C条件下的生长曲线
Figure 1 The growth curves of RA-CH-1 at 42 °C and 37 °C. Data are shown as the mean of three replicates, with the error bars representing \pm standard error.

表 2 测序数据质量情况

Table 2 Sequencing data quality

样品名称	原始读数	过滤后读数	过滤后数据碱基数	错误率	Q20	Q30	G+C 含量
Sample name	Raw reads	Clean reads	Clean bases (Gb)	Error rate (%)	(%)	(%)	G+C content (%)
CH_1_37	26 046 258	25 445 514	3.82	0.01	98.50	95.81	37.25
CH_1_42	18 048 532	17 631 106	2.64	0.01	98.50	95.85	36.51

19 个。从 GO 富集分析结果中, 选取最显著的 30 个 term 绘制柱状图, 如图 3 所示。差异基因属于生物过程分类的主要有细胞氮化合物生物合成过程(cellular nitrogen compound biosynthetic process)、杂环生物合成过程(heterocycle biosynthetic process)、含核酸酶化合物的生物合成过程(nucleobase-containing compound biosynthetic process)、基因表达调节(regulation of gene expression)、核苷代谢过程(nucleoside metabolic process)、糖基化合物代谢过程(glycosyl compound metabolic process)等; 属于细胞组分分类的主要是运输囊泡(transport vesicle); 属于分子功能分类

的主要有内肽酶活性(endopeptidase activity)、核心 RNA 聚合酶结合转录因子活性(core RNA polymerase binding transcription factor activity)、核心 DNA 依赖性 RNA 聚合酶结合启动子特异性活性(core DNA-dependent RNA polymerase binding promoter specificity activity)、 σ 因子活性(sigma factor activity)等。

分别将差异表达上调和下调基因进行 KEGG 富集分析, 选取最显著的 20 个 KEGG 通路绘制散点图进行展示。如图 4 和图 5 所示, 图中横坐标为注释到 KEGG 通路上的差异基因数与差异基因总数的比值, 纵坐标为 KEGG 通路, 点的大小代表注释到 KEGG 通路上的基因数, 颜色从红到紫代表富集的显著性大小。将差异表达上调的 169 个基因进行 KEGG 富集分析, 发现其总计可映射于 22 个 KEGG 代谢途径中, 其中 4 个显著富集的 KEGG 代谢途径分别为核糖体(ribosome)、氧化磷酸化(oxidative phosphorylation)、细菌分泌系统(bacterial secretion system)及蛋白质外排(protein export)。

将差异表达下调的 65 个基因进行 KEGG 富集分析, 发现其总计可映射于 35 个 KEGG 代谢途径中, 其中差异表达下调基因富集于 3 条氨基酸代谢相关通路, 包括苯丙氨酸代谢(phenylalanine metabolism)、苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸生物合成(phenylalanine, tyrosine, and tryptophan biosynthesis)和半胱氨酸和蛋氨酸代谢(cysteine and methionine metabolism)。

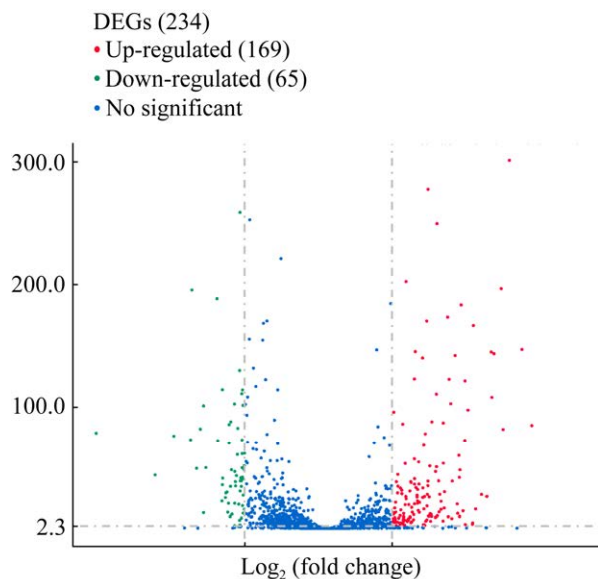


图 2 差异表达基因火山图

Figure 2 Volcano map of differentially expressed genes (DEGs).

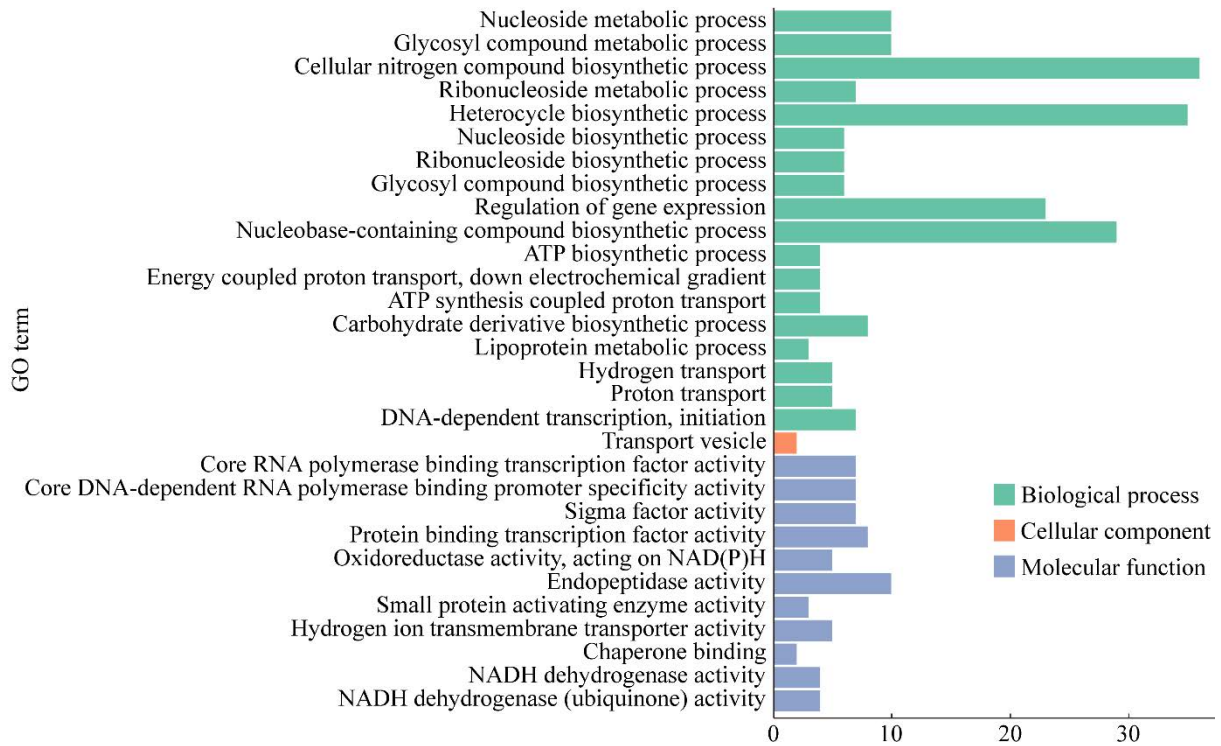


图 3 差异基因 GO 富集柱状图

Figure 3 GO enrichment analysis of DEGs.

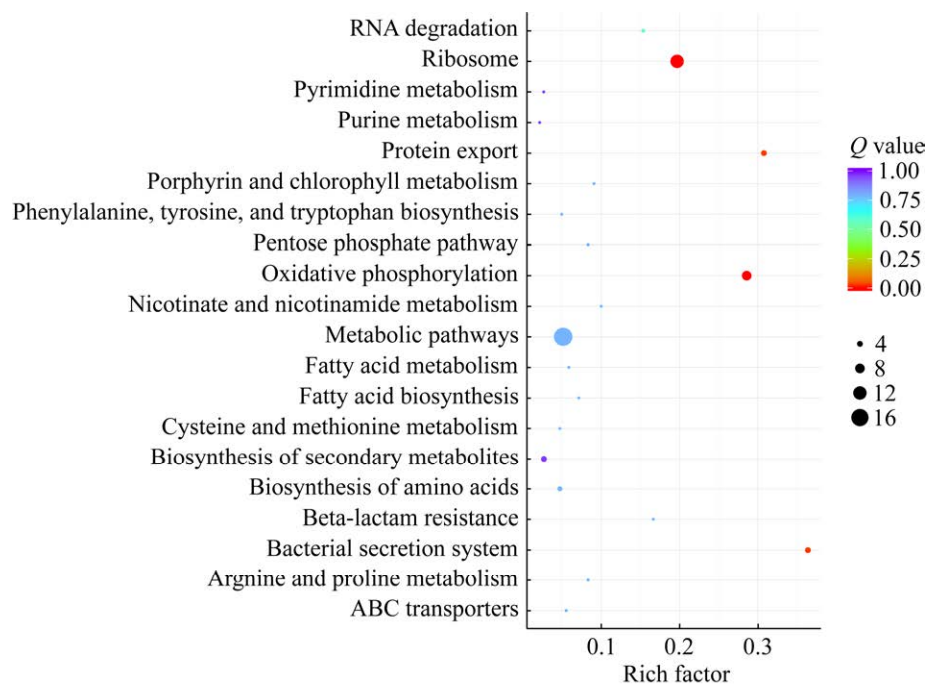


图 4 上调差异基因 KEGG 富集散点图

Figure 4 Enriched KEGG pathway scatterplot of down-regulated DEGs.

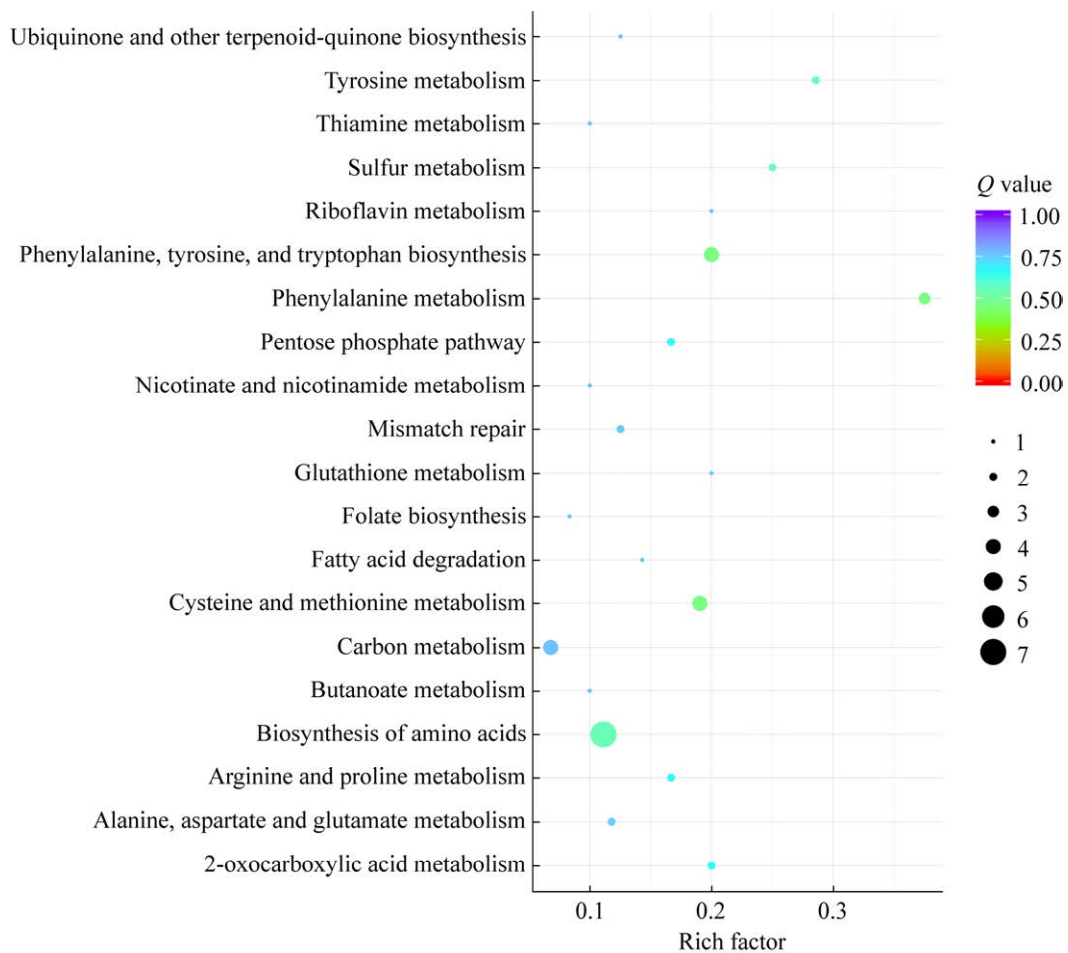


图 5 下调差异基因 KEGG 富集散点图

Figure 5 Enriched KEGG pathway scatterplot of down-regulated DEGs.

2.5 qRT-PCR 验证 RNA-seq 结果

为验证 RNA-seq 结果, 按照 1.3 中的方法提取总 RNA 后, 选取差异表达上调和下调最显著的基因各 10 个, 通过 qRT-PCR 方法定量检测各基因的相对表达水平。结果如图 6 所示, 选取基因在 37 °C 和 42 °C 表达水平与转录组结果一致。

2.6 RA-CH-1 DnaK 在 37 °C 和 42 °C 下的表达情况检测

热应激反应基因 *dnaK* 在 42 °C 转录组中显著上调, 为验证在此条件下 DnaK 蛋白表达是否也上调, 本研究通过 Western blotting 对其在不

同温度下的表达水平进行了鉴定, 结果如图 7 所示。与转录组和荧光定量结果的趋势一致, 在 42 °C 热刺激 1 h 后, DnaK 蛋白表达上调, 而内参蛋白 RecA 的表达量无明显改变。

2.7 *dnaK* 缺失后影响 RA-CH-1 在 42 °C 的生长

为进一步验证热应激反应基因对于鸭疫里默氏杆菌在鸭体内的适应起重要作用, 本研究测定了 RA-CH-1 $\Delta dnaK$ 在 37 °C 和 42 °C 条件下的生长曲线, 结果如图 8 所示。与 37 °C 条件下相比, 在 42 °C 条件下, RA-CH-1 $\Delta dnaK$ 无法生长, 说明 *dnaK* 对鸭疫里默氏杆菌应对热应激至

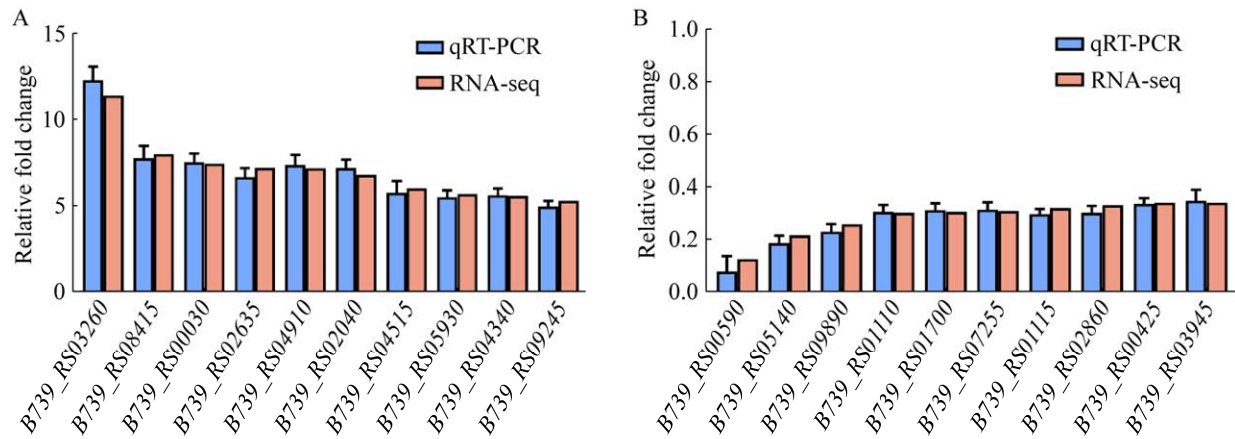


图 6 上调(A)和下调(B)差异基因 qRT-PCR 结果

Figure 6 qRT-PCR verification results of up-regulated genes (A) and down-regulated genes (B). Data are shown as the mean of three replicates, with the error bars representing \pm standard error.

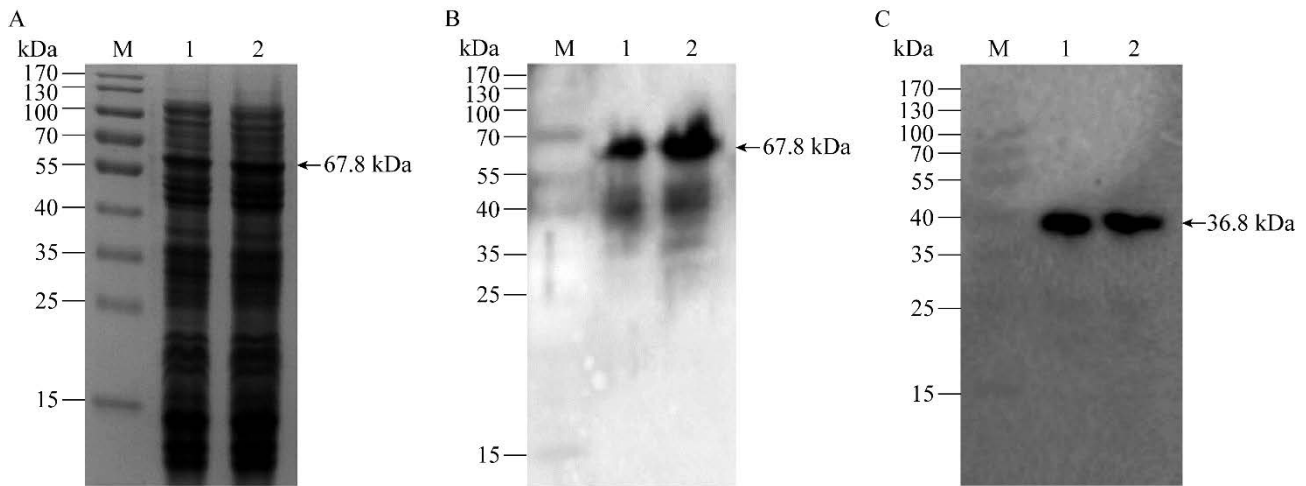


图 7 RA-CH-1 DnaK 在 37 °C 和 42 °C 下的表达情况 A: RA-CH-1 菌体蛋白在 37 °C (泳道 1) 和 42 °C (泳道 2) SDS-PAGE 结果. B: Western blotting 检测 RA-CH-1 DnaK 在 37 °C (泳道 1) 和 42 °C (泳道 2) 的表达量. C: Western blotting 检测 RA-CH-1 内参蛋白 RecA 在 37 °C (泳道 1) 和 42 °C (泳道 2) 的表达量
Figure 7 The expression levels of RA-CH-1 DnaK at 37 °C and 42 °C. A: SDS-PAGE results of RA-CH-1 at 37 °C (lane 1) and 42 °C (lane 2). B: Western blotting analysis of RA-CH-1 DnaK at 37 °C (lane 1) and 42 °C (lane 2). C: The expression levels of RA-CH-1 reference protein RecA at 37 °C (lane 1) and 42 °C (lane 2).

关重要，但是其仍可以通过调节其他基因的表达以应对在鸭体内的热应激反应。

3 讨论与结论

温度是影响细菌生存的重要因素之一，无论是环境温度的变化还是感染宿主动物后的温

度变化，细菌都需要相应的感知和防御体系来适应不同温度的变化。细菌感知并适应环境变化一般会经历以下 3 个过程：首先由传感器直接或间接地激活应激因子，随后传感器导致适当的基因组的诱导和抑制，最后在适应温度变化后通过反馈抑制关闭应激基因的表达^[12]。

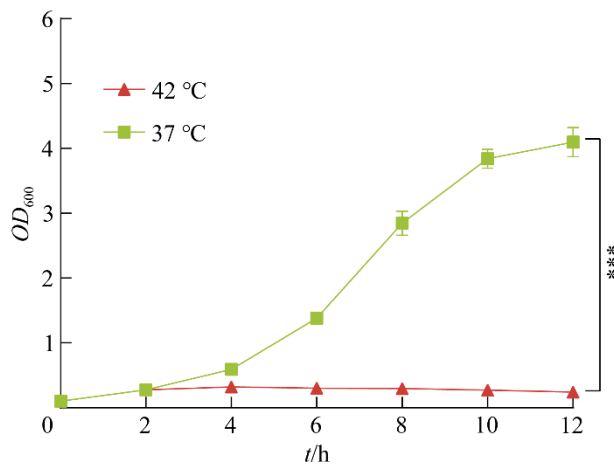


图 8 RA-CH-1 $\Delta dnaK$ 在 42 °C 和 37 °C 条件下的生长曲线

Figure 8 The growth curves of RA-CH-1 $\Delta dnaK$ at 42 °C and 37 °C. Data are shown as the mean of three replicates, with the error bars representing \pm standard error. ***: $P < 0.001$.

热休克反应是普遍存在于生物中的一种应急保护机制。包括环境温度升高和物理化学因素在内的多种应激条件可诱导合成 20 多种热休克蛋白(heat shock proteins, HSPs), 其中包括 DnaK、DnaJ、GrpE、GroEL 和 GroES 等分子伴侣蛋白、 σ 因子、蛋白酶还有其他调节性或结构性蛋白。热休克蛋白通过对新生肽链的折叠、凝集蛋白的解聚以及利用蛋白酶水解不可逆损伤的蛋白质来维持蛋白质的正常功能^[13]。基因表达的初始步骤是通过 RNA 聚合酶将 DNA 转录成信使 RNA。 σ 因子对于启动子识别和转录起始是必需的, 所有细菌都具有至少一种用于转录细胞活力所需的基因的必需 σ 因子, 并且大多数细菌具有响应于特定刺激而转录操纵子的替代 σ 因子^[14]。编码热休克蛋白的基因正转录调节依赖于专用的替代 σ 因子, 通过 σ 因子瞬时增加温度依赖性的编码热休克蛋白基因转录^[15]。

鸭疫里默氏杆菌 CH-1 株在 37 °C 和 42 °C

条件下生长情况并无显著差异, 说明鸭疫里默氏杆菌完全可以适应鸭体内的温度。通过测定 37 °C 和 42 °C 应激条件下的 RA-CH-1 转录组, 与 37 °C 相比, 42 °C 条件下有 169 个基因显著上调, 65 个基因显著下调。其中, 一系列热休克反应系统蛋白如 DnaK (*B739_RS07660*)、GrpE (*B739_RS05960*)、GroEL (*B739_RS08420*)、GroES (*B739_RS08415*)、ClpB (*B739_RS05035*) 和 σ 因子 RNA polymerase sigma-24 factor (*B739_RS07160*)、RNA polymerase sigma factor RpoD (*B739_RS05920*)、RNA polymerase subunit sigma-24 (*B739_RS03055*、*B739_RS09670*) 表达显著上调, 这提示着这些基因可能参与抵抗热应激对细菌造成损伤, 可在后续研究中逐一鉴定。编码多种酶类的基因, 如二氢叶酸合成酶 (bifunctional folylpolyglutamate synthase/dihydrofolate synthase, *B739_RS02860*)、果糖 -6- 磷酸醛缩酶 (fructose-6-phosphate aldolase, *B739_RS10205*)、邻氨基苯甲酸磷酸核糖转移酶 (anthranilate phosphoribosyltransferase, *B739_RS09155*)、烟酸磷酸核糖转移酶 (nicotinate phosphoribosyltransferase, *B739_RS02380*) 等均显著下调, 这提示温度骤然改变有可能影响了酶促反应的正常发生, 干扰细菌的生长代谢过程。

将差异表达基因进行 GO 富集分析, 差异表达基因主要参与核苷代谢过程、糖基化合物代谢过程和细胞氮化合物生物合成过程等生物学过程, 核心 RNA 聚合酶结合转录因子活性、核心 DNA 依赖性 RNA 聚合酶结合启动子特异活性和 σ 因子活性等分子功能, 这些差异表达基因绝大部分在 42 °C 表达上调。

将差异表达基因进行 KEGG 通路富集分析, 上调差异显著富集于编码核糖体亚基的基因, 如 30S ribosomal protein S6 (*B739_RS07670*)、30S ribosomal protein S12 (*B739_RS02340*)、30S ribosomal protein S15 (*B739_RS06190*)、30S

ribosomal protein S20 (*B739_RS04910*)、30S ribosomal protein S21 (*B739_RS01780*)、50S ribosomal protein L11 (*B739_RS01720*)、50S ribosomal protein L13 (*B739_RS01875*)、50S ribosomal protein L19 (*B739_RS09270*)、50S ribosomal protein L28 (*B739_RS03260*)、50S ribosomal protein L30 (*B739_RS04820*)、50S ribosomal protein L31 (*B739_RS05475*)、50S ribosomal protein L32 (*B739_RS04345*)、50S ribosomal protein L33 (*B739_RS03255*); 氧化磷酸化通路相关基因, 如 ATP synthase F0 subunit A (*B739_RS07920*)、ATP synthase F0 subunit C (*B739_RS07925*)、ATP synthase F0 subunit B (*B739_RS07930*)、ATP synthase F1 subunit delta (*B739_RS07935*)、NADH-quinone oxidoreductase subunit K (*B739_RS05725*)、NADH dehydrogenase subunit J (*B739_RS05720*)、NADH dehydrogenase subunit C (*B739_RS05685*)、ATPase (*B739_RS00715*); 细菌分泌系统相关基因, 如 preprotein translocase (*B739_RS02040*)、preprotein translocase subunit YajC (*B739_RS02145*)、preprotein translocase subunit SecA (*B739_RS02630*)、Sec-independent protein secretion pathway component (*B739_RS02035*)。下调的差异表达基因富集于苯丙氨酸代谢, 如天冬氨酸氨基转移酶 (*B739_RS03725*、*B739_RS09950*)、羟酰基辅酶 A 脱氢酶 (*B739_RS09120*); 苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸生物合成通路, 如天冬氨酸氨基转移酶 (*B739_RS03725*、*B739_RS09950*)、氨基苯甲酸磷酸核糖基转移酶 (*B739_RS09155*)、谷氨酰胺氨基转移酶 (*B739_RS09150*); 半胱氨酸和蛋氨酸代谢通路, 如半胱氨酸合酶 (*B739_RS01110*)、丝氨酸 O-乙酰转移酶 (*B739_RS01115*)、天冬氨酸氨基转移酶 (*B739_RS03725*、*B739_RS09950*),

可以发现当温度升高后, 芳香族氨基酸相关基因下调。

核糖体是一种大的核糖核蛋白颗粒, 在所有物种中都由 2 个亚基组成。在细菌中, 这 2 个亚基分别被命名为小亚基(30S)和大亚基(50S), 它们共同组成 70S 核糖体。核糖体蛋白(ribosomal protein)基因是大多数细胞类型中最高表达的基因之一。它们的产物通常是核糖体合成所必需的, 而核糖体合成是细胞生长和增殖的基石^[16]。F1Fo ATP 合成酶(ATP synthase)能够合成细胞中大部分的 ATP^[17]。分子伴侣 GroEL 和 DnaK 除了需要 GroES 和 GrpE 等分子伴侣外, 还依赖于连续的 ATP 水解来维持蛋白质处于热力学不稳定的天然状态^[18]。ATP 水解后, 分子伴侣通过核苷酸交换从 ADP 状态返回 ATP 状态, 这一过程通常由核苷酸交换因子如细菌的 GrpE 催化^[19]。在大肠杆菌中, 热休克蛋白 GrpE 的表达受 $\sigma 70$ 和 $\sigma 32$ 启动子的调控, 其 mRNA 水平在对升高温度的反应中被快速和短暂地诱导^[20]。分子伴侣 ClpB 属于 AAA+ ATP 酶的 Hsp100/Clp 亚家族, 是在感染期间可以增强宿主中细菌存活的因子之一^[21]。ClpB 具有一定的先天蛋白重塑活性, 然而它们需要 DnaK/Hsp70 伴侣系统的合作来分解和重新激活不溶性聚集蛋白^[22]。有研究报道, 在牙龈卟啉单胞菌 W83 中缺失 *clpB* 后菌株对热应激的敏感性增加, 但对 KB 细胞、人冠状动脉内皮(human coronary artery endothelial, HCAE)细胞和牙龈上皮细胞的侵袭能力显著降低, 对小鼠的毒力也下降, 说明 *clpB* 基因参与牙龈卟啉单胞菌体外细胞侵袭和体内的毒力^[23]。细菌在感染宿主时会经历温度的波动, 温度的变化可以激活热休克应激反应途径首先感知并应对环境温度的变化, 而后通知微生物病原体成功感染宿主并启动毒力

程序^[24], 但是热休克蛋白在鸭疫里默氏杆菌中是否参与毒力还需进一步研究。

总之, 本研究通过转录组测序比较分析了实验培养温度 37 °C 和鸭体温 42 °C 条件下 RA-CH-1 的基因转录水平差异, 发现相较于实验培养温度, 在鸭体温下大部分热应激反应相关基因表达显著上调, 而部分编码代谢相关酶的基因显著下调, 从而适应性地调节自身生长代谢, 这为进一步鉴定鸭疫里默氏杆菌感染宿主的致病因子和致病机制奠定了基础。

参考文献

- [1] 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.
- [2] 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).
- [3] LIU JB, CHENG AC, WANG MS, LIU MF, ZHU DK, YANG Q, WU Y, JIA RY, CHEN S, ZHAO XX, ZHANG SQ, HUANG J, OU XM, MAO S, GAO Q, WEN XJ, ZHANG L, LIU YY, YU YL, TIAN B, et al. Comparative genomics and metabolomics analysis of *Riemerella anatipestifer* strain CH-1 and CH-2[J]. *Scientific Reports*, 2021, 11: 616.
- [4] MAGIORAKOS AP, SRINIVASAN A, CAREY RB, CARMELI Y, FALAGAS ME, GISKE CG, HARBARTH S, HINDLER JF, KAHLMETER G, OLSSON-LILJEQUIST B, PATERSON DL, RICE LB, STELLING J, STRUELENS MJ, VATOPOULOS A, WEBER JT, MONNET DL. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance[J]. *Clinical Microbiology and Infection: the Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 2012, 18(3): 268-281.
- [5] ZHONG CY, CHENG AC, WANG MS, ZHU DK, LUO QH, ZHONG CD, LI L, DUAN Z. Antibiotic susceptibility of *Riemerella anatipestifer* field isolates[J]. *Avian Diseases*, 2009, 53(4): 601-607.
- [6] GYURIS É, WEHMANN E, CZEIBERT K, MAGYAR T. Antimicrobial susceptibility of *Riemerella anatipestifer* strains isolated from geese and ducks in Hungary[J]. *Acta Veterinaria Hungarica*, 2017, 65(2): 153-165.
- [7] ZHU XH, LI YL, WANG ZW, PANG ZY, SI ZS, LIU C, LU JB, CAO SL, PEI LY, LI YB. Antibiotic resistance of *Riemerella anatipestifer* and comparative analysis of antibiotic-resistance gene detection methods[J]. *Poultry Science*, 2023, 102(3): 102405.
- [8] LYU ZH, HAN SS, LI J, GUO ZY, GENG NW, LYU C, QIN LT, LI N. Epidemiological investigation and drug resistance characteristics of *Riemerella anatipestifer* strains from large-scale duck farms in Shandong Province, China from March 2020 to March 2022[J]. *Poultry Science*, 2023, 102(7): 102759.
- [9] KLANČNIK A, VUČKOVIĆ D, JAMNIK P, ABRAM M, MOŽINA SS. Stress response and virulence of heat-stressed *Campylobacter jejuni*[J]. *Microbes and Environments*, 2014, 29(4): 338-345.
- [10] LIU CC, NIU YL, ZHOU XD, ZHENG X, WANG SD, GUO Q, LI YQ, LI MY, LI JY, YANG Y, DING Y, LAMONT RJ, XU X. *Streptococcus mutans* copes with heat stress by multiple transcriptional regulons modulating virulence and energy metabolism[J]. *Scientific Reports*, 2015, 5: 12929.
- [11] ABDELWAHED EK, HUSSEIN NA, MOUSTAFA A, MONEIB NA, AZIZ RK. Gene networks and pathways involved in *Escherichia coli* response to multiple stressors[J]. *Microorganisms*, 2022, 10(9): 1793.
- [12] SCHUMANN W. Regulation of the heat shock response in bacteria[M]//Prokaryotic Chaperonins. Singapore: Springer, 2017: 21-36.
- [13] RASOULY A, RON EZ. Interplay between the heat shock response and translation in *Escherichia coli*[J]. *Research in Microbiology*, 2009, 160(4): 288-296.
- [14] CAMPBELL EA, WESTBLADE LF, DARST SA. Regulation of bacterial RNA polymerase sigma factor activity: a structural perspective[J]. *Current Opinion in Microbiology*, 2008, 11(2): 121-127.

- [15] RONCARATI D, SCARLATO V. Regulation of heat-shock genes in bacteria: from signal sensing to gene expression output[J]. *FEMS Microbiology Reviews*, 2017, 41(4): 549-574.
- [16] PETIBON C, MALIK GHULAM M, CATALA M, ABOU ELELA S. Regulation of ribosomal protein genes: an ordered anarchy[J]. *Wiley Interdisciplinary Reviews RNA*, 2021, 12(3): e1632.
- [17] KÜHLBRANDT W. Structure and mechanisms of F-type ATP synthases[J]. *Annual Review of Biochemistry*, 2019, 88: 515-549.
- [18] GOLOUBINOFF P, SASSI AS, FAUVET B, BARDUCCI A, de LOS RIOS P. Chaperones convert the energy from ATP into the nonequilibrium stabilization of native proteins[J]. *Nature Chemical Biology*, 2018, 14: 388-395.
- [19] PACKSCHIES L, THEYSSEN H, BUCHBERGER A, BUKAU B, GOODY RS, REINSTEIN J. GrpE accelerates nucleotide exchange of the molecular chaperone DnaK with an associative displacement mechanism[J]. *Biochemistry*, 1997, 36(12): 3417-3422.
- [20] HARRISON C. GrpE, a nucleotide exchange factor for DnaK[J]. *Cell Stress & Chaperones*, 2003, 8(3): 218-224.
- [21] KĘDZIERSKA-MIESZKOWSKA S, ZOLKIEWSKI M. Hsp100 molecular chaperone ClpB and its role in virulence of bacterial pathogens[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22(10): 5319.
- [22] HOSKINS JR, DOYLE SM, WICKNER S. Coupling ATP utilization to protein remodeling by ClpB, a hexameric AAA+ protein[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2009, 106(52): 22233-22238.
- [23] YUAN LH, RODRIGUES PH, BÉLANGER M, DUNN W, PROGULSKE-FOX A. The *Porphyromonas gingivalis clpB* gene is involved in cellular invasion *in vitro* and virulence *in vivo*[J]. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 2007, 51(2): 388-398.
- [24] SHAPIRO RS, COWEN LE. Thermal control of microbial development and virulence: molecular mechanisms of microbial temperature sensing[J]. *mBio*, 2012, 3(5): e00238-12.