



鸭疫里默氏杆菌九型分泌系统(T9SS)分泌蛋白 B739_0093 的功能鉴定

江茵^{1,2,3,4#}, 罗睿心^{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

江茵, 罗睿心, 程安春, 刘马峰. 鸭疫里默氏杆菌九型分泌系统(T9SS)分泌蛋白 B739_0093 的功能鉴定[J]. 微生物学报, 2024, 64(7): 2407-2418.

JIANG Yin, LUO Ruixin, CHENG Anchun, LIU Mafeng. Roles of B739_0093 as a protein secreted by type IX secretion system (T9SS) in *Riemerella anatipestifer*[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2024, 64(7): 2407-2418.

摘要:【目的】鸭疫里默氏杆菌是引起鸭浆膜炎的一种革兰氏阴性病原菌, 该菌编码的九型分泌系统(type IX secretion system, T9SS)参与滑动、致病等过程。前期研究结果表明, 鸭疫里默氏杆菌 CH-1 株 B739_0093 基因在限铁培养条件明显上调。序列分析表明, B739_0093 编码蛋白含有一个 T9SS 分泌蛋白保守的 C 端结构域, 然而其具体功能未知。本研究旨在鉴定该基因编码蛋白是否被 T9SS 分泌, 以及在该菌致病中的作用。【方法】用荧光定量 PCR 检测 B739_0093 是否被铁离子和铁转运调节子(ferric uptake regulator, Fur)调控; 用大肠杆菌表达重组 B739_0093 截短蛋白制备多克隆抗体, 通过 Western blotting 检测是否由 T9SS 分泌; 构建 B739_0093 基因缺失株, 通过毒力和定植试验鉴定 B739_0093 在鸭疫里默氏杆菌致病中的功能。【结果】荧光定量 PCR 结果表明, B739_0093 基因在铁离子限制性培养基明显上调, 此调控是由调控蛋白 Fur 介导的; Western blotting 结果显示, B739_0093 基因编码蛋白在亲本株 RA CH-1 主要定位在分泌物中, 而在 T9SS 缺失株定位在菌体且不能在分泌物被检测到; 与亲本株 RA CH-1 相比, RA CH-1ΔB739_0093 对雏鸭的致病力减弱, 在雏鸭各组织器官的定植能力明显降低。【结论】B739_0093 基因编码蛋白是由鸭疫里默

资助项目: 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 Natural Science Foundation of China (32273003) and the Natural Science Foundation of Sichuan Province (2024NSFSC0034).

#These authors contributed equally to this work.

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

Received: 2023-12-14; Accepted: 2024-05-08; Published online: 2024-05-28

氏杆菌 T9SS 分泌的, 其表达受铁离子及 Fur 调控, 并且参与了该菌的致病。

关键词: 鸭疫里默氏杆菌; 九型分泌系统; 毒力

Roles of B739_0093 as a protein secreted by type IX secretion system (T9SS) in *Riemerella anatipestifer*

JIANG Yin^{1,2,3,4#}, LUO Ruixin^{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* (RA) is a Gram-negative pathogen that can cause duck serositis. The type IX secretion system (T9SS) of this bacterium is involved in sliding and pathogenic processes. The previous study showed that the expression of *B739_0093* in *R. anatipestifer* CH-1 was significantly up-regulated under the iron-limited condition. The sequence analysis showed that the protein encoded by *B739_0093* contained a conserved C-terminal domain of the proteins secreted by T9SS, while its function remained unknown. This study aims to identify whether the protein encoded by *B739_0093* is secreted by T9SS and the role of this protein in the pathogenesis of this bacterium. [Methods] qPCR was conducted to determine whether the transcription of *B739_0093* was regulated by iron and the ferric uptake regulator (Fur). The recombinant truncated *B739_0093* protein was expressed in *Escherichia coli*, and the polyclonal antibody was prepared. Western blotting was employed to detect whether the protein was secreted by T9SS. Furthermore, we deleted *B739_0093* from RA CH-1 and identified the role of *B739_0093* in the pathogenicity of *R. anatipestifer* by virulence and colonization tests in ducklings. [Results] The expression of *B739_0093* was significantly up-regulated in the iron-restricted medium, which was mediated by Fur. Western blotting results showed that the protein encoded by *B739_0093* was localized in the secretion of the parent strain RA CH-1, while it was localized in the bacterial lysate and not detected in the secretion of the T9SS-deleted strain. Compared with the parent strain RA CH-1, RA CH-1 Δ *B739_0093* demonstrated attenuated pathogenicity and reduced colonization ability in various tissues and organs of ducklings. [Conclusion] The protein encoded by *B739_0093* is secreted by T9SS and involved in the pathogenicity of *R. anatipestifer*, and its expression is regulated by iron and Fur.

Keywords: *Riemerella anatipestifer*; type IX secretion system (T9SS); virulence

细菌的分泌系统(secretion systems)是一种能够将细菌蛋白质分泌到胞外的特殊装置。截至目前,已经确定了 8 种不同的分泌系统^[1]。九型分泌系统(type IX secretion system, T9SS)最早被发现在牙龈卟啉单胞菌(*Porphyromonas gingivalis*)中,通过组学分析发现一些蛋白质的组成成分与已知的分泌系统无序列相似性,由此被鉴定为一种新型的分泌系统;T9SS 至少由 19 种蛋白质组分组成^[2-3],其功能大多是未知的。在已知的研究中, PorU 作为清除 C 端结构域的肽酶, PorZ 协助稳定 PorU 的定位, PorV 作为穿梭体运送蛋白质; PorK 和 PorN 参与质周通道的组成, PorL 通过传递质子提供能量^[3]。T9SS 产生的分泌蛋白含有 N 端信号肽和保守的 C 端结构域(C-terminal domain, CTD),前者协助蛋白被 Sec 系统识别并穿越细胞膜,后者发出信号定位外膜转座子促进蛋白分泌至胞外,分泌完成后其 N 端和 C 端部分会被相应的酶降解或切割^[4],分泌蛋白大多为各种效应蛋白,如蛋白酶、黏附素、纤维素酶、几丁质和表面层蛋白,因此 T9SS 能参与细菌的滑动和蛋白质分泌,以及病原体的毒力因子分泌^[2-3]。例如牙龈卟啉单胞菌的毒力依赖于 T9SS 分泌的牙龈蛋白酶(RgpA、RgpB 和 Kgp),它们对于破坏宿主免疫系统以及获取营养物质和血红素至关重要^[5]。约氏黄杆菌(*Flavobacterium johnsoniae*)的 T9SS 中与滑动相关基因的缺失会影响 ChiA 和 SprB 的分泌,从而影响细菌的侵袭力^[6]。福赛斯坦纳菌(*Tannerella forsythia*)中 T9SS 的缺失,使其无法进行表面层蛋白的组装和糖基化^[7]。

鸭疫里默氏杆菌(*Riemerella anatipestifer*, RA)是属于拟杆菌门威克斯菌科的革兰氏阴性菌,易感染幼龄时期的鸭、鹅等禽类,会引起纤维素性心包炎、脑膜炎等临床表现甚至导致

死亡,这是影响我国鸭养殖业健康发展的重要病原菌^[8]。目前,已有大量研究表明鸭疫里默氏杆菌编码 T9SS,并且参与该菌的毒力。例如在 RA Yb2 菌株中缺失 GldM 或 GldK 会导致细菌的滑动、蛋白质分泌以及侵袭能力受损^[9-10];在 RA Yb2 中 T9SS 分泌蛋白金属磷酸酯酶(metallophosphoesterase, MPPE)参与细菌毒力^[11], SspA 通过水解明胶、纤维蛋白原和杆菌肽 LL-37 介导细菌毒力^[12];在 RA YM 菌株中, SprA 和 SprT 蛋白参与降解细菌明胶和毒力^[13-14]。铁离子是鸭疫里默氏杆菌生存所必需的营养物质,该菌铁摄取基因由铁转运调节子(ferric uptake regulator, Fur)调节;当胞内游离铁充足时, Fur 蛋白与铁摄取基因的启动子区结合,抑制其转录;相反,当胞内铁缺乏时, Fur 蛋白从铁摄取基因启动子区解离,导致铁摄取基因的转录增加^[15]。前期研究发现, RA CH-1 株的 B739_0093 基因在铁限制性条件下出现明显的转录上调现象^[16],蛋白序列分析表明 B739_0093 含有一个 T9SS 分泌蛋白保守的 CTD,推测其为 T9SS 分泌蛋白。本研究旨在探究 B739_0093 基因编码的蛋白与 T9SS 的关系,其表达是否受铁离子及 Fur 的调控,是否参与鸭疫里默氏杆菌的致病。

1 材料与方法

1.1 菌株、质粒及试剂

菌株 RA CH-1、大肠杆菌(*Escherichia coli*) Rosetta 及质粒 pOBS、pET32a、pLMF03 均由本实验室保存; RA CH-1 Δ B739_0093 由本研究构建;菌株 RA CH-1 Δ T9SS 和 RA CH-1 Δ fur 由本实验室构建、保存^[15,17]。

细菌总 RNA 提取试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司; SYBR Green I 嵌合荧光法专用试剂购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司^[18];

完全佐剂及不完全弗氏佐剂购自 Sigma-Aldrich 公司; ECL 化学发光试剂盒购自 Bio-Rad 公司; 抗生素购自大连美仑生物技术有限公司[使用浓度: 卡那霉素(50 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、头孢西丁(1 $\mu\text{g}/\text{mL}$)]。

1.2 引物设计及合成

研究使用的基因序列来自 NCBI 数据库, 引物序列由深圳华大基因股份有限公司合成, 见表 1。RA CH-1 *Cfx*、*SacB*、16S rRNA 基因和 *RecA* 荧光定量的引物信息详见参考文献[18]。

1.3 实验动物

BALB/c 小鼠购自成都达硕实验动物有限公司, 1 日龄雏鸭购自成都克里莫育种有限公司, 饲养于四川农业大学成都校区实验动物房。动物实验福利伦理审查同意书编号: 20210036, 20220072。

1.4 荧光定量 PCR

将 RA CH-1 分别于胰酪大豆胨液体培养基 (trypticase soy broth, TSB)、TSB+80 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 铁离子螯合剂乙二胺二邻苯基乙酸(ethylenediamine dihydrogen phosphate, EDDHA)、TSB+80 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 乙二胺二邻苯基乙酸+1 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 硝酸铁[$\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$]、

TSB+80 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 乙二胺二邻苯基乙酸+10 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 硝酸铁条件中, 37 $^\circ\text{C}$ 、180 r/min 培养 3 h 至对数期(OD_{600} 约为 1.0–1.5); 将 RA CH-1 Δfur 和 RA CH-1 Δfur pLMF03::*fur* 于 37 $^\circ\text{C}$ 恒温摇床 180 r/min 振荡培养至对数期 (OD_{600} 约为 1.0–1.5)。根据参考文献[18]提取总 RNA、反转录并进行荧光定量。

1.5 表达菌的构建、诱导表达及纯化

以 RA CH-1 基因组为模板, 使用引物 *B739_0093_T* P1/P2 (表 1) 扩增 *B739_0093_T* 截短片段, 纯化回收 DNA 后, 通过双酶切(*Nde* I 和 *Kpn* I)、连接和转化, 将截短片段克隆至表达质粒 pET32a 中得到重组质粒 pET32a::*B739_0093_T*, 将重组质粒转入表达菌 *E. coli* Rosetta。将表达菌 *E. coli* Rosetta pET32a::*B739_0093_T* 培养至对数期 (OD_{600} 约为 0.6–0.8), 再加入 0.5 mmol/L IPTG 诱导 2 h, 收集菌体。根据参考文献[19]对蛋白进行纯化。

表达菌 Rosetta pET32a::*B739_1871_T* 的构建、诱导表达及纯化的操作步骤与 Rosetta pET32a::*B739_0093_T* 一致。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

Primer name	Primer sequence (5'→3')	Restriction enzyme site (underline)
<i>B739_0093</i> upP1	CCGCTCGAGCGGGCATTACGGTGCAGACTGTCC	<i>Xho</i> I
<i>B739_0093</i> upP2	GTGGACATAGTACCGCCGCTAATTTCCCCATC	
<i>B739_0093</i> downP1	GATGGGGAAATTAGCGGCGGTACTATGTCCAC	
<i>B739_0093</i> downP2	GACTAGTCGGAGCGGCATTTATTGCGGGG	<i>Spe</i> I
<i>B739_0093</i> P1	AACTGCAGAACCAATGCATTGGCTTTATCTATTTTACAATTAGTAAGCAA	<i>Pst</i> I
	CTGCAGAACCAATGCATTGGCTTTATCTAT	
<i>B739_0093</i> P2	GCTCTAGAGCTTATTGTTTATGATTTTGG	<i>Xba</i> I
<i>B739_0093_T</i> P1	GGAATTCATATGCAAAATGTGACATTCCTGA	<i>Nde</i> I
<i>B739_0093_T</i> P2	GGGGTACCCTTAGTGGTGGTGGTGGTGATAAAGCGTTACATCATC	<i>Kpn</i> I
	GCTTG	
<i>B739_1871_T</i> P1	GGAATTCATATGATGAAAAAATTAATACTACTATTG	<i>Nde</i> I
<i>B739_1871_T</i> P2	CCGCTCGAGTTAGTGGTGGTGGTGGTGAGCAATATCTGATTTACTTG	<i>Xho</i> I
<i>B739_0093</i> qRTP1	CAGACGGTAGATGTTTCAGG	
<i>B739_0093</i> qRTP2	CCTAGAACTCTGCTACATTGG	

1.6 多克隆抗体的制备

取 50 μg 蛋白与等体积的完全弗氏佐剂进行乳化后, 通过背部皮下注射对小鼠进行免疫, 每隔 7 d 进行一次免疫, 一共免疫 3 次, 后两次乳化选用不完全弗氏佐剂。三免结束后每隔 7 d 对小鼠进行眼缘静脉取血, 重复 3 次, 收集血清。

1.7 菌株 RA CH-1 Δ B739_0093 和 RA CH-1 Δ B739_0093 pLMF03::B739_0093 的构建

RA CH-1 Δ B739_0093 无痕缺失株采用自杀质粒 pOBS 的方法构建^[20]。具体步骤如下: 以 RA CH-1 基因组为模板分别扩增 B739_0093 基因的上、下游片段, 用融合 PCR 方法得到 B739_0093 up-down, 并将其克隆至自杀质粒 pOBS 中。转入 S17-1 后, 通过接合转移再转入 RA CH-1 中, 通过抗性筛选得到 RA CH-1 pOBS::B739_0093 up-down 菌株。随后将其培养至对数期后涂布于含有 12.5% 蔗糖的血平板进行反向筛选, 构建 RA CH-1 Δ B739_0093 菌株。

回补株的构建: 以 RA CH-1 基因组为模板扩增 B739_0093 基因片段, 克隆至回补质粒 pLMF03 中, 将重组质粒转入 S17-1, 通过接合转移转入 RA CH-1 Δ B739_0093 中, 构建回补株 RA CH-1 Δ B739_0093 pLMF03::B739_0093。

1.8 生长曲线的测定

菌株的生长曲线测定实验参考文献[21]进行操作。记录菌株在 TSB 及 TSB+100 $\mu\text{mol/L}$ 乙二胺二邻苯基乙酸条件中 12 h 的 OD_{600} 值, 并绘制成生长曲线, 实验重复 3 次。

1.9 蛋白质印迹(Western blotting)检测

为对比 B739_0093 和 B739_1871 编码蛋白分别在 RA CH-1 和 RA CH-1 Δ T9SS 中的定位情况, 将上述菌体在 20 mL TSB+80 $\mu\text{mol/L}$ 乙二胺二邻苯基乙酸中培养至对数期, 各取 120 μL 菌液经离心得到的菌体, 用 1 \times 蛋白 buffer 重悬,

并于沸水中水浴 10 min 制成全菌蛋白样。剩余的菌液按照文献[22]提取分泌蛋白, 并将蛋白溶于 60 μL 1 \times 蛋白 buffer 中制成分泌蛋白样。根据参考文献[23]进行 Western blotting。

1.10 RA CH-1 Δ B739_0093 的毒力评估和雏鸭体内定殖能力测定

菌株的毒力评估及在雏鸭体内的定殖实验参照文献[24]进行。计算攻毒 7 d 内的致死率与攻毒 48 h 后每克组织的载菌量。

1.11 RA CH-1 Δ B739_0093 的血清杀菌实验

血清杀菌实验参照文献[25]进行。取培养至对数期的菌株经离心后, 用 1 mL PBS 调整 OD_{600} 为 1.0, 每种菌株各取 100 μL 分为 2 组, 分别添加等体积 PBS 或用 PBS 稀释的 30% 非灭活鸭血清, 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温孵育 1 h。取 50 μL 通过连续稀释后涂布于 TSA 板上, 统计活菌数并计算存活率, 实验重复 3 次。

1.12 实验数据处理

采用软件 GraphPad Prism 8 中的 *t* 检验对实验数据进行统计学分析, 误差条表示 3 次重复实验结果的标准误差, 并使用 *P* 值表示数据的统计学显著性。

2 结果与分析

2.1 B739_0093 转录受铁离子和 Fur 调控

前期转录组测序结果表明, B739_0093 在铁限制性培养基转录上调^[16]。本研究进一步通过荧光定量 PCR 方法测定了 B739_0093 基因是否受铁离子调控, 以及是否该调控是由调节蛋白 Fur 所介导。如图 1A 所示, 与 TSB 培养条件相比, 在限铁培养基(TSB+80 $\mu\text{mol/L}$ 乙二胺二邻苯基乙酸)中, B739_0093 基因转录显著上调; 而在限铁培养条件中额外加入铁离子后, B739_0093 基因转录开始下调, 随着铁离子含量增加, 下调倍数增大。如图 1B 所示, 与亲本

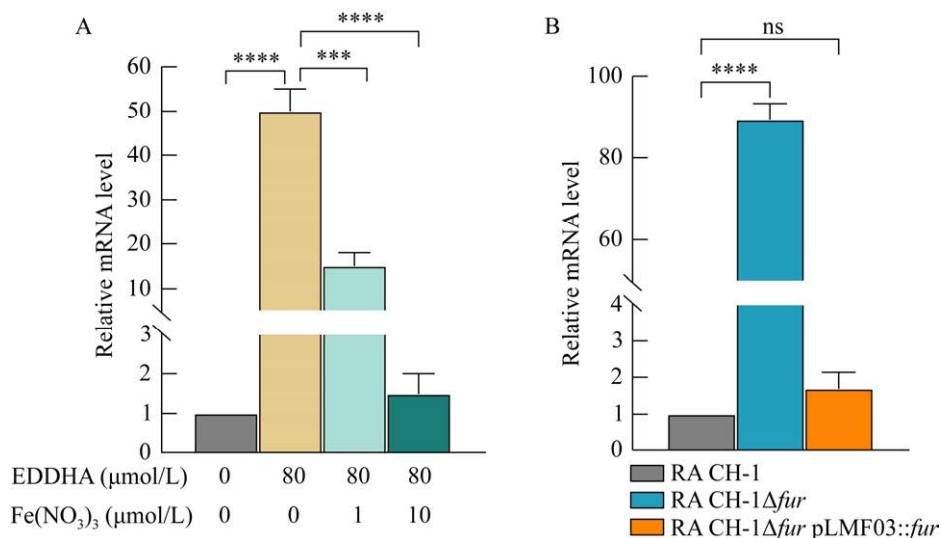


图 1 *B739_0093* 基因在铁离子丰富条件、铁离子缺乏条件及 *fur* 缺失株的相对转录水平

Figure 1 The relative transcription level of *B739_0093* gene under iron-rich condition, iron-limited condition and *fur* mutant strain. A: The relative transcription levels of *B739_0093* gene in RA CH-1 in TSB, TSB+80 μmol/L EDDHA, TSB+80 μmol/L EDDHA+1 μmol/L Fe(NO₃)₃, TSB+80 μmol/L EDDHA+10 μmol/L Fe(NO₃)₃, respectively. B: The relative transcript levels of the *B739_0093* gene in RA CH-1, RA CH-1 Δfur and RA CH-1 Δfur pLMF03::*fur*, respectively. ***: $P < 0.001$; ****: $P < 0.0001$; ns represents not significant.

株相比, *B739_0093* 基因在 *fur* 缺失株中明显上调, 在回补株中转录水平恢复至亲本株水平。以上结果表明 *B739_0093* 基因的转录受铁离子调控, 并且由调节蛋白 Fur 介导。

2.2 Rosetta pET32a::*B739_0093*_T 蛋白的诱导表达、纯化及多克隆抗体的制备

为了后续研究 *B739_0093* 蛋白定位, 本研究构建了 *B739_0093* 截短蛋白表达菌 *E. coli* Rosetta pET32a::*B739_0093*_T, 检测重组蛋白的表达情况。结果如图 2A 所示, 与空载表达菌相比, 重组表达菌在 34 kDa 位置出现蛋白表达条带, 表达蛋白以包涵体的形式出现; 进一步对重组蛋白进行纯化, 结果如图 2B 所示, 与表达菌中表达的蛋白条带大小相符, 表明重组 *B739_0093* 截短蛋白纯化成功。用该蛋白免疫小鼠后, 制备出抗 *B739_0093* 截短蛋白多克隆抗体。

2.3 *B739_0093* 基因缺失株及回补株的构建

序列分析表明, *B739_0093* 基因编码一个

典型的 T9SS 分泌蛋白。为研究该基因编码蛋白的功能, 本研究在 RA CH-1 株中构建 *B739_0093* 基因缺失株及回补株。通过接合转移的方式将重组质粒 pOBS::*B739_0093* up-down 转入 RA CH-1 中, 经抗性筛选对长出的克隆进行 PCR 鉴定。如图 3A 所示, 通过 PCR 能够扩增出 *Cfx*、*SacB* 和 16S rRNA 基因片段, 表明菌株 RA CH-1 pOBS::*B739_0093* up-down 构建成功。下一步将上述菌株用含蔗糖培养基进行反向筛选, 对长出的克隆进行 PCR 鉴定。如图 3B 所示, PCR 扩增出 *B739_0093* up-down 片段, 而不能扩增出 *Cfx* 和 *SacB* 基因, 表明 RA CH-1 $\Delta B739_0093$ 无痕缺失株构建成功。

通过接合转移将质粒 pLMF03::*B739_0093* 转入 RA CH-1 $\Delta B739_0093$ 中, 经抗性筛选对长出的克隆进行 PCR 鉴定。如图 3C 所示, PCR 能够扩增出 *B739_0093* 和 16S rRNA 基因片段, 表明回补株构建成功。

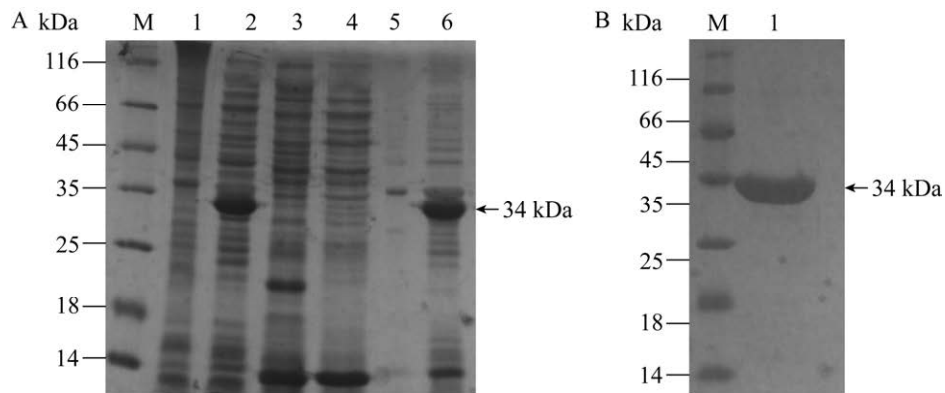


图 2 *B739_0093_T* 的诱导表达和纯化

Figure 2 The expression of recombinant *B739_0093_T* in *Escherichia coli* Rosetta and the purification. A: The expression of recombinant *B739_0093_T* protein. Lane M: Protein marker; Lane 1: Cell lysate of Rosetta pET32a; Lane 2: Cell lysate of Rosetta pET32a::*B739_0093_T*; Lane 3: Soluble cell lysate of Rosetta pET32a; Lane 4: Soluble cell lysate of Rosetta pET32a::*B739_0093_T*; Lane 5: Insoluble cell lysate of Rosetta pET32a; Lane 6: Insoluble cell lysate of Rosetta pET32a::*B739_0093_T*; B: The purification of recombinant *B739_0093_T* protein. Lane M: Protein marker; Lane 1: Recombinant *B739_0093_T* purified protein.

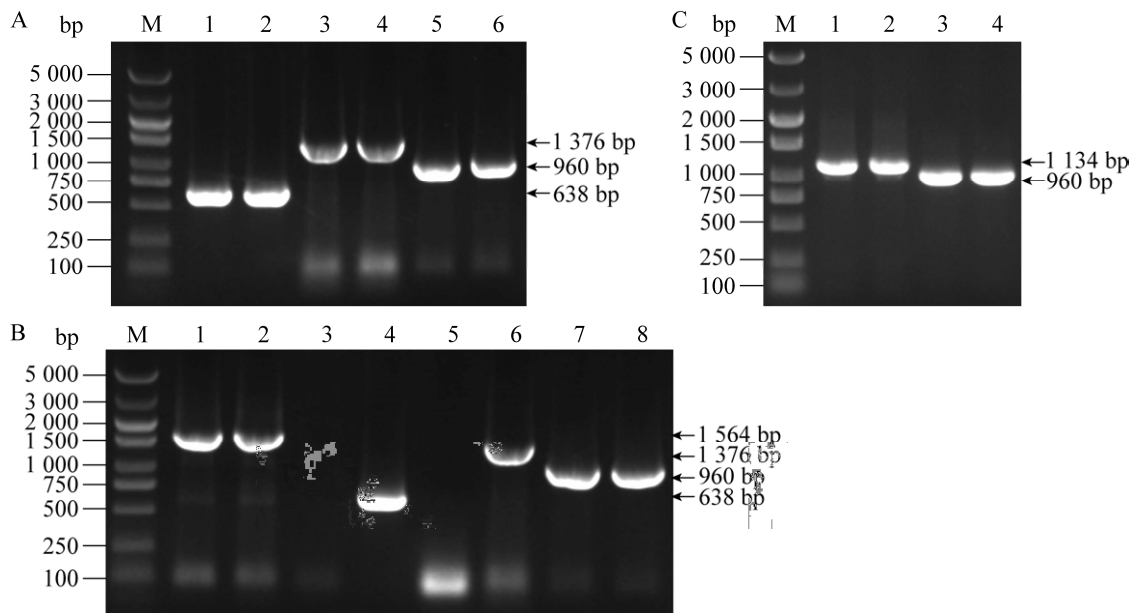


图 3 PCR 鉴定 *B739_0093* 基因缺失株及回补株凝胶电泳图

Figure 3 The identification of *B739_0093* gene deletion strain and the complementation strain. A: The construction of RA CH-1 pOBS::*B739_0093* up-down was identified by PCR. Lane M: DNA marker; Lane 1, 3, 5: *Cfx*, *SacB*, 16S rRNA gene fragments were amplified from RA CH-1 pOBS::*B739_0093* up-down; Lane 2, 4, 6: *Cfx*, *SacB*, 16S rRNA gene positive control. B: The construction of RA CH-1Δ*B739_0093* was identified by PCR. Lane 1, 3, 5, 7: *B739_0093* up-down, *Cfx*, *SacB*, 16S rRNA gene fragments were amplified from RA CH-1Δ*B739_0093*; Lane 2, 4, 6, 8: *B739_0093* up-down, *Cfx*, *SacB*, 16S rRNA gene fragments were amplified from RA CH-1 pOBS::*B739_0093* up-down. C: The construction of RA CH-1Δ*B739_0093* pLMF03::*B739_0093* was identified by PCR. Lane 1, 3: *B739_0093*, 16S rRNA gene fragments were amplified from RA CH-1Δ*B739_0093* pLMF03::*B739_0093*; Lane 2, 4: *B739_0093*, 16S rRNA gene positive control.

2.4 B739_0093 蛋白由 T9SS 分泌

为探究 B739_0093 蛋白是否由 T9SS 分泌系统分泌,本研究分别通过 Western blotting 鉴定了 B739_0093 分别在 RA CH-1 和 RA CH-1 Δ T9SS 中的定位,用胞浆蛋白 RecA 作为阴性对照,用已知鸭疫里默氏杆菌 T9SS 分泌蛋白 B739_1871 作为阳性对照^[11]。如图 4 所示,在亲本株 RA CH-1 菌体蛋白中, B739_1871 不能被检测到, RecA 可以被检测到, B739_0093 可以被隐约检测到,推测是未来得及分泌出菌体的蛋白(泳道 1)。在亲本株 RA CH-1 的分泌蛋白中, B739_1871 和 B739_0093 均可以被检测到,而 RecA 不能被检测到(泳道 2);在 T9SS 缺失株 RA CH-1 Δ T9SS 的菌体蛋白, B739_1871 不能被检测到, RecA 和 B739_0093 均可以被检测到,推测是 T9SS 缺失后, B739_0093 不能被分泌,所以在菌体中积累(泳道 3)。在 T9SS 缺失株 RA CH-1 Δ T9SS 的分泌蛋白中, B739_1871、RecA、B739_0093 均不能被检测到(泳道 4)。重组的 B739_1871、RecA、B739_0093 蛋白均可以被检测到(泳道 5)。综上所述, B739_0093 蛋白由 T9SS 系统分泌。

2.5 B739_0093 基因缺失对 RA CH-1 在铁限制条件下的生长无影响

为鉴定 B739_0093 是否参与铁离子的利用,本研究检测了亲本株、B739_0093 缺失株(CH-1 Δ B739_0093)和回补株(RA CH-1 Δ B739_0093^c)在普通及铁限制性条件下的生长情况。如图 5 所示,与亲本株相比, B739_0093 基因缺失株在普通培养基和铁限制性培养基的生长均无影响。

2.6 B739_0093 基因参与鸭疫里默氏杆菌的毒力与定殖

T9SS 参与毒力因子的分泌,本研究进一步测定了 B739_0093 是否参与了鸭疫里默氏杆菌的毒力作用。用等剂量的亲本株和 B739_0093 基因缺失株感染 3 日龄雏鸭,每组 10 只,并统计攻毒后 7 d 的致死率。如图 6A 所示,与亲本株相比, B739_0093 缺失株对雏鸭的致死率减弱,在回补 B739_0093 基因后恢复至亲本株水平。为进一步研究 B739_0093 基因缺失株毒力减弱是否与定殖能力减弱有关,本研究进一步测定了亲本株与 B739_0093 缺失株攻毒雏鸭

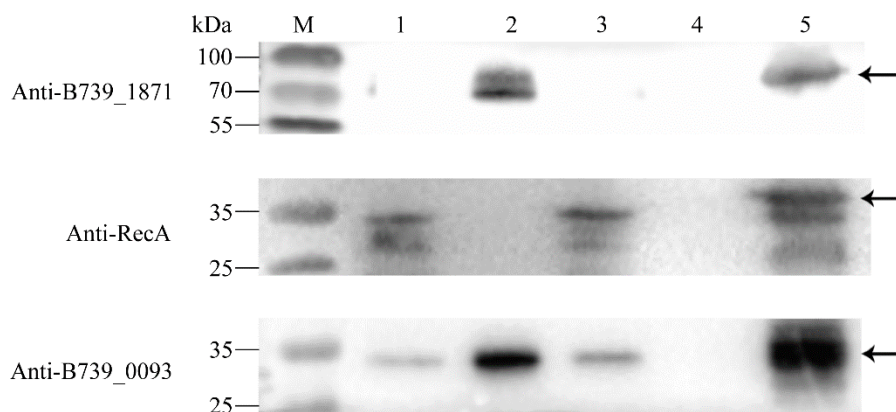


图 4 B739_0093 蛋白在 RA CH-1 和 RA CH-1 Δ T9SS 的定位

Figure 4 The localization of B739_0093 protein in RA CH-1 and RA CH-1 Δ T9SS. Lane M: Protein marker; Lane 1, 2: The whole cell lysate and secretory protein of RA CH-1; Lane 3, 4: The whole cell lysate and secretory protein of RA CH-1 Δ T9SS; Lane 5: Recombinant B739_1871_T protein, recombinant RecA protein and recombinant B739_0093_T protein (marked by the arrows respectively).

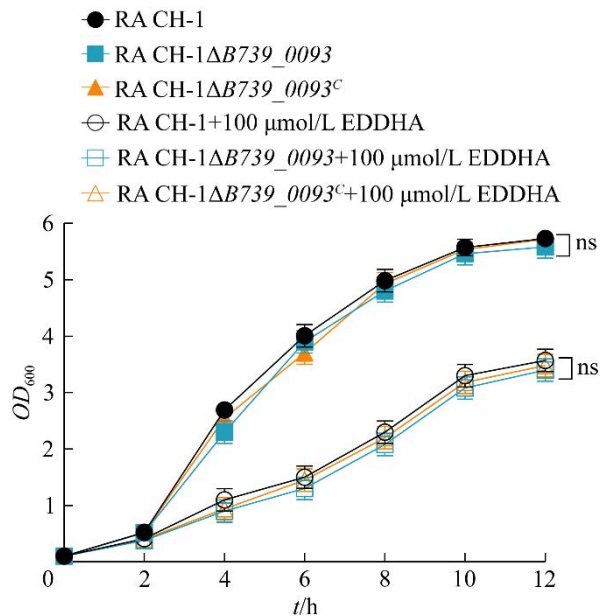


图 5 亲本株、*B739_0093* 基因缺失株及回补株在不同培养条件下的生长曲线

Figure 5 The growth curves of RA CH-1, RA CH-1Δ*B739_0093* and RA CH-1Δ*B739_0093*^C in different conditions. The strain was cultured in 20 mL TSB or TSB+100 μmol/L EDDHA medium at 37 °C from *OD*₆₀₀ of 0.1, and the *OD*₆₀₀ value was measured every 2 h, and the growth of 12 h was recorded. ns represents no significant difference.

48 h 后, 各组织器官中的细菌载量, 结果如图 6B 所示, 与亲本株相比, *B739_0093* 缺失株组各脏器的平均载菌量都明显下降, 在回补 *B739_0093* 基因后恢复至亲本株水平。结果表明, *B739_0093* 在鸭疫里默氏杆菌致病中发挥了重要作用。

2.7 *B739_0093* 基因缺失后对非灭活血清敏感性无变化

定殖结果表明 *B739_0093* 基因缺失株在血液中的载菌量明显下降, 本研究进一步通过非灭活血清杀菌试验检测 *B739_0093* 是否参与了对非灭活血清的抵抗, 结果如图 7 所示, 与亲本株相比, *B739_0093* 基因缺失株对非灭活血清的敏感性无明显差异。

3 讨论与结论

细菌 T9SS 通过分泌毒力、营养和滑动所需的蛋白质, 确保细菌适应并存活于不同的环境中^[26]。大量研究表明 T9SS 参与细菌毒力因子的分泌^[27]。在鸭疫里默氏杆菌中 T9SS 的组分蛋白和分泌产物也被发现参与细菌毒力^[9-14], 然而分泌蛋白未被完全鉴定。在前期研究中, 铁限制性条件的转录组测序发现, RA CH-1 株的 *B739_0093* 基因出现明显的转录上调^[16], 在 NCBI 数据库 *B739_0093* 被注释为假定蛋白, 通过蛋白序列比对发现其含有一个 T9SS 分泌蛋白保守的 C 端结构域, 本研究鉴定了是否 *B739_0093* 为 T9SS 分泌蛋白, 是否与该菌铁离子的利用相关, 以及是否参与了该菌的毒力和定殖。

本研究通过荧光定量 PCR 的方式比较了亲本株在富铁和限铁条件下 *B739_0093* 基因的转录水平, 结果显示限铁条件下 *B739_0093* 基因显著上调, 而额外添加铁离子后转录水平下调, 并且铁离子含量越高, 下调倍数越大。在革兰氏阴性菌中, 大多数受铁离子调控的基因都是通过调节蛋白 Fur 来介导^[28]。在铁离子丰富条件下, 铁离子与 Fur 形成 Holo-Fur 并结合在铁离子转运基因的启动子区域, 从而抑制铁转运相关基因的表达; 当铁离子缺乏时, 铁离子从 Fur 蛋白解离形成 Apo-Fur 并从铁离子转运基因的启动子区域解离, 从而促进铁转运相关基因的表达^[15]。本研究的结果与这一机制相吻合, 显示 *B739_0093* 基因在 *fur* 缺失株中明显上调, 表明该基因受铁离子的调控是由 Fur 介导。由于 *B739_0093* 基因受铁离子调控, 本研究推测 *B739_0093* 参与铁离子的利用。然而, 通过对比亲本株和 *B739_0093* 基因在铁离子限制性培养基的生长曲线, 并未发现在缺铁条件下 *B739_0093* 影响了该菌的生长。*B739_0093* 基因为何受铁离子调控以及 *B739_0093* 与铁离子利用的关系需要在将来的研究中进一步探究。

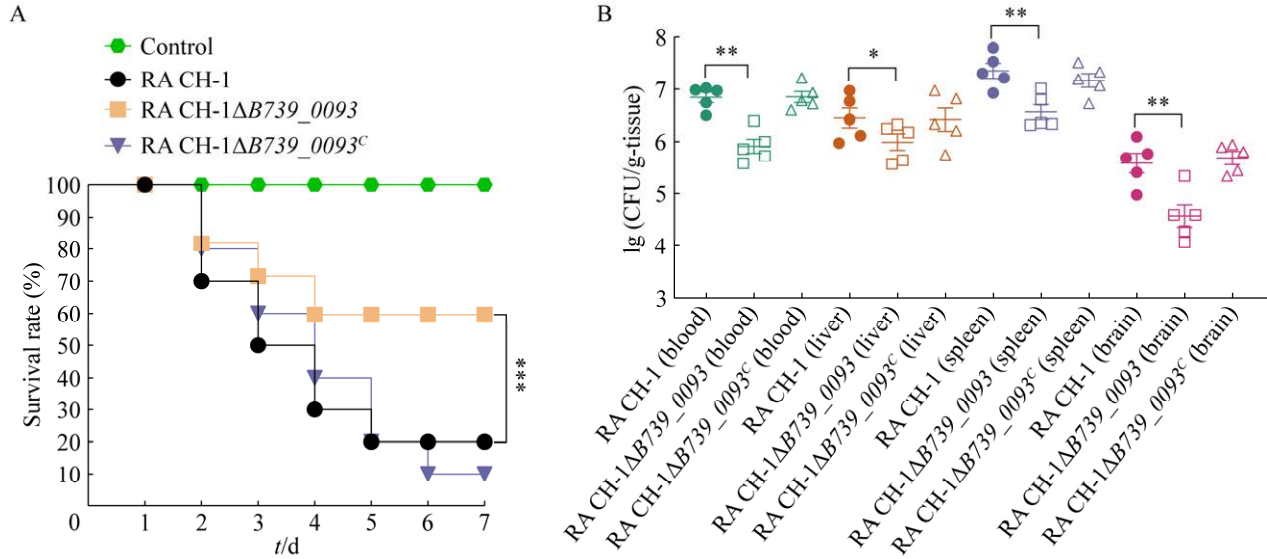


图 6 亲本株和 *B739_0093* 缺失株及回补株对雏鸭的致死率及其在雏鸭体内的定殖情况

Figure 6 Survival rate and colonization of ducklings infected with RA CH-1 and RA CH-1Δ*B739_0093*. A: Survival of ducklings infected with 10^9 CFU of RA CH-1, RA CH-1 Δ*B739_0093*, and RA CH-1 Δ*B739_0093*^C, respectively. B: The bacterial load of RA CH-1 (solid circular symbol), RA CH-1 Δ*B739_0093* (hollow square symbol), and RA CH-1 Δ*B739_0093*^C (hollow triangle symbol) in different tissues of ducklings at 48 h after infection. *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$.

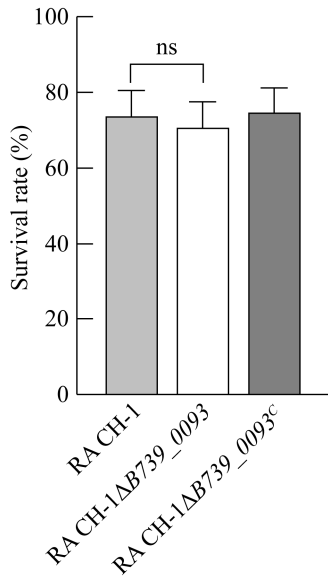


图 7 亲本株、*B739_0093* 基因缺失株及回补株在 30%非灭活鸭血清中的存活率

Figure 7 Survival rate of RA CH-1, RA CH-1Δ*B739_0093*, and RA CH-1Δ*B739_0093*^C in 30% non-inactivated duck serum. ns represents no significant difference.

由于该蛋白序列含有一个 T9SS 分泌蛋白保守的 C 端结构域, 推测 *B739_0093* 蛋白为 T9SS 分泌。由于该蛋白的全长蛋白未能在大肠杆菌表达, 本研究构建了截短蛋白 *B739_0093_T* (不含 C 端保守切割区域) 的表达菌, 并制备鼠源多克隆抗体。通过比对 *B739_0093* 蛋白分别在 RA CH-1 和 RA CH-1Δ*T9SS* 的定位来判定 *B739_0093* 蛋白是否由 T9SS 分泌。本研究选取了在鸭疫里默氏杆菌中已被证实的 T9SS 分泌蛋白 Metallophosphoesterase, 通过 NCBI 进行序列分析, 在 RA CH-1 中找到相似度为 98% 的同源蛋白 *B739_1871*^[11]。 *B739_1871* 蛋白并未在菌体和 T9SS 缺失株的分泌蛋白中被检测到, 证明其为 T9SS 分泌蛋白。而 *B739_0093* 在菌体蛋白中有少量的存在, 这种现象可解释为细菌蛋白的合成、转运、分泌是一个动态的过程, 检测到的蛋白为尚未来得及分泌的蛋白。 *B739_0093* 可以在亲本株的分泌蛋白中被检测

到, 而在 T9SS 缺失株的分泌蛋白中未被检测到, 因此说明该蛋白由 T9SS 分泌。

T9SS 参与毒力因子的分泌, 由于 B739_0093 蛋白是由 T9SS 分泌, 本研究进一步评价了 B739_0093 基因缺失后对雏鸭的致病和定殖能力的影响。结果表明, B739_0093 是鸭疫里默氏杆菌的一种毒力因子。

综上所述, 本研究鉴定了鸭疫里默氏杆菌 CH-1 中 B739_0093 基因编码蛋白由 T9SS 分泌, 其表达受铁离子及 Fur 调控, 并且参与了鸭疫里默氏杆菌的致病, 为进一步揭示该菌的致病机制奠定了基础。

参考文献

- [1] PENA RT, BLASCO L, AMBROA A, GONZÁLEZ-PEDRAJO B, FERNÁNDEZ-GARCÍA L, LÓPEZ M, BLERIOT I, BOU G, GARCÍA-CONTRERAS R, WOOD TK, TOMÁS M. Relationship between quorum sensing and secretion systems[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2019, 10: 1100.
- [2] LASICA AM, KSIAZEK M, MADEJ M, POTEPA J. The type IX secretion system (T9SS): highlights and recent insights into its structure and function[J]. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2017, 7: 215.
- [3] MCBRIDE MJ. *Bacteroidetes* gliding motility and the type IX secretion system[J]. *Microbiology Spectrum*, 2019, 7(1). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.ame-0005-2018>.
- [4] GORASIA DG, VEITH PD, REYNOLDS EC. The type IX secretion system: advances in structure, function and organisation[J]. *Microorganisms*, 2020, 8(8): 1173.
- [5] de DIEGO I, KSIAZEK M, MIZGALSKA D, KONERU L, GOLIK P, SZMIGIELSKI B, NOWAK M, NOWAKOWSKA Z, POTEPA B, HOUSTON JA, ENGHILD JJ, THØGERSEN IB, GAO JL, KWAN AH, TREWHELLA J, DUBIN G, GOMIS-RÜTH FX, NGUYEN KA, POTEPA J. The outer-membrane export signal of *Porphyromonas gingivalis* type IX secretion system (T9SS) is a conserved C-terminal β -sandwich domain[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 23123.
- [6] JOHNSTON JJ, SHRIVASTAVA A, MCBRIDE MJ. Untangling *Flavobacterium johnsoniae* gliding motility and protein secretion[J]. *Journal of Bacteriology*, 2017, 200(2): e00362-17.
- [7] TOMEK MB, NEUMANN L, NIMETH I, KOERDT A, ANDESNER P, MESSNER P, MACH L, POTEPA JS, SCHÄFFER C. The S-layer proteins of *Tannerella forsythia* are secreted via a type IX secretion system that is decoupled from protein O-glycosylation[J]. *Molecular Oral Microbiology*, 2014, 29(6): 307-320.
- [8] 刘马峰, 田琇, 程安春. 鸭疫里默氏杆菌毒力及耐药机制研究进展[J]. *微生物学报*, 2019, 59(7): 1222-1231.
- [9] LIU MF, TIAN X, CHENG AC. Research advances in the virulence and antibiotics resistance mechanism of *Riemerella anatipestifer*[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2019, 59(7): 1222-1231 (in Chinese).
- [10] CHEN ZC, WANG XL, REN XM, HAN WL, MALHI KK, DING C, YU SQ. *Riemerella anatipestifer* GldM is required for bacterial gliding motility, protein secretion, and virulence[J]. *Veterinary Research*, 2019, 50(1): 43.
- [11] MALHI KK, WANG XL, CHEN ZC, DING C, YU SQ. *Riemerella anatipestifer* gene AS87_08785 encodes a functional component, GldK, of the type IX secretion system[J]. *Veterinary Microbiology*, 2019, 231: 93-99.
- [12] NIU PF, CHEN ZC, REN XM, HAN WL, DONG HY, SHEN RY, DING C, ZHU SY, YU SQ. A *Riemerella anatipestifer* metallophosphoesterase that displays phosphatase activity and is associated with virulence[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2021, 87(11): e00086-21.
- [13] CHEN ZC, NIU PF, REN XM, HAN WL, SHEN RY, ZHU M, YU Y, DING C, YU SQ. *Riemerella anatipestifer* T9SS effector SspA functions in bacterial virulence and defending natural host immunity[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2022, 88(11): e0240921.
- [14] HU D, GUO YQ, GUO J, WANG Y, PAN Z, XIAO YC, WANG XL, HU SS, LIU M, LI ZL, BI DR, ZHOU ZT. Deletion of the *Riemerella anatipestifer* type IX secretion system gene *sprA* results in differential expression of outer membrane proteins and virulence[J]. *Avian Pathology: Journal of the W.V.P.A.*, 2019, 48(3): 191-203.
- [15] GUO YQ, HU D, GUO J, WANG T, XIAO YC, WANG XL, LI SW, LIU M, LI ZL, BI DR, ZHOU ZT. *Riemerella anatipestifer* type IX secretion system is required for virulence and gelatinase secretion[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2017, 8: 2553.
- [16] 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.
- [16] LIU MF, HUANG M, ZHU DK, WANG MS, JIA RY, CHEN S, SUN KF, YANG Q, WU Y, BIVILLE F, CHENG AC. Identifying the genes responsible for iron-limited condition in *Riemerella anatipestifer* CH-1 through RNA-seq-based analysis[J]. *BioMed Research International*, 2017, 2017: 8682057.
- [17] YUAN H, HUANG L, WANG MS, JIA RY, CHEN S, LIU MF, ZHAO XX, YANG Q, WU Y, ZHANG SQ, LIU YY, ZHANG L, YU YL, YOU Y, CHEN XY, ZHU DK, CHENG AC. Role of the *gldK* gene in the virulence of *Riemerella anatipestifer*[J]. *Poultry Science*, 2019, 98(6): 2414-2421.
- [18] 郭方, 邱媛媛, 程安春, 刘马峰. 鸭疫里氏杆菌 B739_RS00825 基因缺失株抗血红素毒性和氧化应激损伤以及定殖能力分析[J]. *微生物学报*, 2023, 63(3): 1141-1151.
- GUO F, QIU YY, CHENG AC, LIU MF. B739_RS00825-deleted strain of *Riemerella anatipestifer* CH-1: heme detoxication, oxidative stress resistance, and colonization[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2023, 63(3): 1141-1151 (in Chinese).
- [19] HUANG L, TIAN X, LIU MF, WANG MS, BIVILLE F, CHENG AC, ZHU DK, JIA RY, CHEN S, ZHAO XX, YANG Q, WU Y, ZHANG SQ, HUANG J, TIAN B, YU YL, LIU YY, ZHANG L, PAN LC, REHMAN MU, CHEN XY. DprA is essential for natural competence in *Riemerella anatipestifer* and has a conserved evolutionary mechanism[J]. *Frontiers in Genetics*, 2019, 10: 429.
- [20] 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.
- [21] LIU MF, HUANG M, SHUI Y, BIVILLE F, ZHU DK, WANG MS, JIA RY, CHEN S, SUN KF, ZHAO XX, YANG Q, WU Y, CHEN XY, CHENG AC. Roles of B739_I343 in iron acquisition and pathogenesis in *Riemerella anatipestifer* CH-1 and evaluation of the RA-CH-1ΔB739_I343 mutant as an attenuated vaccine[J]. *PLoS One*, 2018, 13(5): e0197310.
- [22] 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.
- [23] 廖何斌, 刘马峰, 程安春. 鸭疫里默氏杆菌 RecA 作为一种内参蛋白的评价[J]. *中国生物工程杂志*, 2015, 35(6): 26-31.
- LIAO HB, LIU MF, CHENG AC. The assessment of Rec A acted as an internal reference protein in *R. anatipestifer*[J]. *China Biotechnology*, 2015, 35(6): 26-31 (in Chinese).
- [24] WANG MY, ZHANG PY, ZHU DK, WANG MS, JIA RY, CHEN S, SUN KF, YANG Q, WU Y, CHEN XY, BIVILLE F, CHENG AC, LIU MF. Identification of the ferric iron utilization gene B739_I208 and its role in the virulence of *R. anatipestifer* CH-1[J]. *Veterinary Microbiology*, 2017, 201: 162-169.
- [25] CHEN QY, GUO F, HUANG L, WANG MY, SHI CF, ZHANG ST, YAO YZ, WANG MS, ZHU DK, JIA RY, CHEN S, ZHAO XX, YANG Q, WU Y, ZHANG SQ, TIAN B, HUANG J, OU XM, GAO Q, SUN D, et al. Functional characterization of a TerC family protein of *Riemerella anatipestifer* in manganese detoxification and virulence[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2024, 90(1): e0135023.
- [26] SATO K, NAITO M, YUKITAKE H, HIRAKAWA H, SHOJI M, McBRIDE MJ, RHODES RG, NAKAYAMA K. A protein secretion system linked to bacteroidete gliding motility and pathogenesis[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2010, 107(1): 276-281.
- [27] BENEDYK M, MARCZYK A, CHRUSCICKA B. Type IX secretion system is pivotal for expression of gingipain-associated virulence of *Porphyromonas gingivalis*[J]. *Molecular Oral Microbiology*, 2019, 34(6): 237-244.
- [28] 刘珈均, 程安春, 刘马峰. 铁摄取调节子在细菌铁离子代谢中的调节及其机制[J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2018, 34(6): 595-603.
- LIU JJ, CHENG AC, LIU MF. Regulation and mechanisms of the ferric uptake regulator (*fur*) in the bacterial iron metabolism[J]. *Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 2018, 34(6): 595-603 (in Chinese).