



ZntR 调控副溶血弧菌锌稳态、氧化应激抗性和毒力

王梦娴, 翟怡梦, 邱军, 徐正中, 陈祥, 郑成坤*, 焦新安*

扬州大学 生物科学与技术学院, 江苏 扬州 225009

王梦娴, 翟怡梦, 邱军, 徐正中, 陈祥, 郑成坤, 焦新安. ZntR 调控副溶血弧菌锌稳态、氧化应激抗性和毒力[J]. 微生物学报, 2024, 64(12): 4774-4788.

WANG Mengxian, ZHAI Yimeng, QIU Jun, XU Zhengzhong, CHEN Xiang, ZHENG Chengkun, JIAO Xin'an. ZntR modulates zinc homeostasis, oxidative stress resistance, and virulence of *Vibrio parahaemolyticus*[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2024, 64(12): 4774-4788.

摘要:【目的】探究金属调节因子 ZntR 对副溶血弧菌金属稳态的调控作用, 明确其对细菌氧化应激抗性和毒力的影响。【方法】采用生长曲线分析和菌体内金属含量测定方法, 探究 ZntR 对副溶血弧菌金属稳态的调控作用; 通过生长曲线分析探究 ZntR 对副溶血弧菌氧化应激抗性的影响; 利用斑马鱼竞争感染试验评估 ZntR 对副溶血弧菌毒力的影响; 通过转录组测序鉴定 ZntR 调控的基因。【结果】*zntR* 基因缺失株($\Delta zntR$) 在锌、镍过量和铁限制条件下表现出生长缺陷, 其生长缺陷均与锌稳态紊乱有关; 在 $\Delta zntR$ 中超表达 *zntA* 促进其在锌、镍过量和铁限制条件下的生长; 在锌过量的情况下, $\Delta zntR$ 对 H_2O_2 诱导氧化应激的抗性减弱; 在斑马鱼竞争感染试验中, $\Delta zntR$ 的毒力下降; 转录组测序结果显示, ZntR 调控一些毒力相关基因的表达。【结论】ZntR 调控副溶血弧菌锌稳态, 并促进细菌氧化应激抗性和毒力。

关键词: ZntR; 副溶血弧菌; 锌稳态; 氧化应激抗性; 毒力

资助项目: 国家自然科学基金(31802210); 江苏高校优势学科建设工程项目(PAPD)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (31802210) and the Priority Academic Program Development of Jiangsu Higher Education Institutions (PAPD).

*Corresponding authors. E-mail: ZHENG Chengkun: zhengchengkun@yzu.edu.cn; JIAO Xin'an: jiao@yzu.edu.cn

Received: 2024-04-30; Accepted: 2024-09-24; Published online: 2024-09-26

ZntR modulates zinc homeostasis, oxidative stress resistance, and virulence of *Vibrio parahaemolyticus*

WANG Mengxian, ZHAI Yimeng, QIU Jun, XU Zhengzhong, CHEN Xiang, ZHENG Chengkun*, JIAO Xin'an*

College of Bioscience and Biotechnology, Yangzhou University, Yangzhou 225009, Jiangsu, China

Abstract: [Objective] To explore the regulatory role of the metalloregulator ZntR in metal homeostasis and clarify the effects of ZntR on the oxidative stress resistance and virulence of *Vibrio parahaemolyticus*. [Methods] Growth curve analysis and intracellular metal content quantification were performed to investigate the regulatory effect of ZntR on the metal homeostasis in *V. parahaemolyticus*. The effects of ZntR on the oxidative stress resistance and virulence of *V. parahaemolyticus* were explored by the growth curve analysis and the competitive infection assay in the zebrafish model, respectively. The genes regulated by ZntR were identified by RNA sequencing. [Results] The *zntR*-deleted strain ($\Delta zntR$) exhibited growth defects under zinc, nickel excess and iron restriction conditions, and the growth defects were related to zinc homeostasis disturbance. The overexpression of *zntA* in $\Delta zntR$ promoted the growth under zinc, nickel excess and iron restriction conditions. In the case of zinc excess, $\Delta zntR$ demonstrated weakened resistance to H₂O₂-induced oxidative stress. The virulence of $\Delta zntR$ was attenuated in a competitive infection assay in the zebrafish model. RNA sequencing revealed that ZntR regulated the expression of several virulence genes. [Conclusion] ZntR modulates zinc homeostasis and improves oxidative stress resistance and virulence of *V. parahaemolyticus*.

Keywords: ZntR; *Vibrio parahaemolyticus*; zinc homeostasis; oxidative stress resistance; virulence

副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)是一种革兰氏阴性、弯曲、杆状的嗜盐细菌,广泛分布于温带和热带的海洋及沿海水域中^[1-2]。近年来,副溶血弧菌也广泛地从淡水食品中被分离出来^[3]。1950年,日本首次报道了由副溶血弧菌引起的食物中毒事件,造成272人发病,其中20人死亡;后来,副溶血弧菌成为全球范围内海产品导致食物中毒的首要致病因子^[4]。人主要通过食用生的或未煮熟的被副溶血弧菌污染的食物感染,引起急性肠胃炎,临床症状包括腹痛、腹泻、恶心、呕吐和发烧等;患有并发病(例如糖尿病、肝病和酒精中毒)的病人感染

后可能会发展为败血症^[5]。在极少数情况下,副溶血弧菌也会引起伤口感染^[1]。在美国,副溶血弧菌每年导致约50 000例感染^[2]。在日本,20%–30%的食物中毒病例是由副溶血弧菌导致的^[4]。在我国,副溶血弧菌是食品中最常见的病原菌之一,也是感染性腹泻的首要致病因子^[6-7]。此外,副溶血弧菌能导致多种水产动物弧菌病,如对虾急性肝胰腺坏死综合征等,给全球水产养殖业造成巨大的经济损失^[8]。

金属,例如铁、锰、锌、铜、钴和镍,是微生物必需的营养元素。许多酶需要利用金属作为辅因子来发挥催化活性,此外,金属是一些

蛋白的结构组分^[9-10]。尽管金属对微生物的生存至关重要，过量的金属却具有毒性作用；金属毒性通常与金属蛋白的金属错配有关，即原本依赖于某种金属的蛋白，结合了其他的金属，进而导致其功能受到影响^[11]。例如，在肺炎链球菌中细胞外的锌通过竞争性结合 PsaA (锰透性酶)抑制锰摄取^[12]。亚铁离子也能通过芬顿反应产生活性氧，造成细胞损伤^[13]。为了对抗入侵的病原菌，脊椎动物宿主进化了被称为“营养免疫”的机制，即限制病原菌利用金属，或者对病原菌施加金属毒性^[14-15]。相应地，细菌进化了复杂的机制来对抗宿主施加的营养免疫；例如，通过金属调节因子感应金属信号进而调控金属摄取系统或者金属外排系统的表达来维持菌体内金属稳态^[16-17]。越来越多的证据表明，金属稳态与病原菌的生理和致病性密切相关^[18-20]。

金属对副溶血弧菌的影响仅被初步探究。早期的一项研究显示，存在于溶解红细胞中的铁能增强副溶血弧菌对小鼠的毒力^[21]。钙和铁被报道能调控副溶血弧菌的集群运动和三型分泌^[22]。副溶血弧菌通过水平基因转移获得的

znuA 被报道与锌摄取和毒力有关^[23]。最近，DmeRF 系统被证实与副溶血弧菌应答钴毒性有关，其中 DmeF 是钴的外排泵，DmeR 通过感应钴信号调控 *dmeF* 基因的表达^[24]。受 Zur 调控的锌结合蛋白 ZrgA 有助于副溶血弧菌摄取锌^[25]。前期研究发现，ZntA 与副溶血弧菌维持锌、镉稳态有关，并促进细菌氧化应激抗性和毒力；ZntA 受金属调节因子 ZntR 正调控^[26]。然而，ZntR 对副溶血弧菌金属稳态、氧化应激抗性和毒力的影响仍然未知。

本研究利用生长曲线、电感耦合等离子体质谱(inductively coupled plasma mass spectrometry, ICP-MS)、斑马鱼竞争感染试验等探究了副溶血弧菌 ZntR 调节因子的功能。本研究成果有助于副溶血弧菌锌稳态和毒力相关机制的阐明。

1 材料与方法

1.1 材料

本研究用到的菌株和质粒见表 1，引物见表 2。副溶血弧菌 RIMD 2210633^[27]及其衍生菌株用胰蛋白胨大豆琼脂(tryptic soy agar, TSA;

表 1 本研究所用的菌株和质粒

Table 1 Bacterial strains and plasmids used in this study

菌株或质粒 Strains or plasmids	相关特征 Relevant characteristics	来源或参考文献 Source or reference
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>		
RIMD 2210633	Clinical isolate, Carb ^R	[27]
$\Delta zntR$	<i>zntR</i> deletion mutant of RIMD 2210633	[26]
C $\Delta zntR$	Complementation strain of $\Delta zntR$	[26]
$\Delta zntR/pMMB207$	$\Delta zntR$ harbouring pMMB207	This study
$\Delta zntR/pMMB207-zntA$	$\Delta zntR$ harbouring pMMB207- <i>zntA</i>	This study
<i>Escherichia coli</i>		
DH5 α λ pir	Cloning host for recombinant vector	Laboratory collection
S17-1 λ pir	Conjugal donor for recombinant vector	Laboratory collection
Plasmids		
pMMB207	Wide-host-range low-copy-number vector; Cm ^R	[28]
pMMB207- <i>zntA</i>	pMMB207 containing <i>zntA</i> and an additional ribosome-binding site	[26]

Carb^R: Carbenicillin resistant; Cm^R: Chloramphenicol resistant.

表 2 本研究所用的引物

Table 2 Primers used in this study

引物名称	引物序列	产物大小
Primers name	Primer sequences (5'→3')	Amplicon size (bp)
pMMB207-F	CACTGCATAATTCGTGTCGC	249 plus the size of insert fragment
pMMB207-R	CTTCTCTCATCCGCCAAAAC	
QzntA-F	ACCAGCGTCTCAGCTTCAACC	149
QzntA-R	CGCCTTCTTCATGCTCAACAG	
QgyrB-F	GGTGGTATTCAAGCGTTCGTTTC	116
QgyrB-R	TGCATTGCCACTTCTACCGAG	
zntR-out-F	CGATTGAACACCTCATTTCG	837 for RIMD 2210633 and 505 for $\Delta zntR$
zntR-out-R	GATGGCGCGTATTCTAACC	

BD 公司)或胰蛋白胨大豆肉汤(tryptic soy broth, TSB; BD 公司)于 37 °C 温箱或摇床(220 r/min)中培养。大肠杆菌用 LB 培养基(Oxoid 公司)于 37 °C 温箱或摇床(220 r/min)中培养。锌螯合剂 N,N,N',N'-四(2-吡啶甲基)乙二胺[N,N,N',N'-tetrakis(2-pyridylmethyl) ethylenediamine, TPEN, Sigma-Aldrich 公司]用于降低培养基中的锌浓度。铁螯合剂 2,2'-联吡啶(2,2'-dipyridyl, Sigma-Aldrich 公司)用于制备铁限制培养基。必要时向培养基中添加羧苄青霉素(50 µg/mL)、氯霉素(10 µg/mL)或异丙基-β-D-硫代半乳糖苷(IPTG, 1 mmol/L)。

1.2 $\Delta zntR/pMMB207$ 和 $\Delta zntR/pMMB207-zntA$ 菌株构建

将 pMMB207 和 pMMB207-*zntA* 质粒分别转化至大肠杆菌 S17-1 λ pir 中, 再接合至 $\Delta zntR$ 中。通过羧苄青霉素和氯霉素抗性筛选得到 $\Delta zntR/pMMB207$ 和 $\Delta zntR/pMMB207-zntA$, 并进行 PCR 验证。PCR 反应体系: 2×Rapid Taq Master Mix 10 µL, 引物 pMMB207-F 和 pMMB207-R (10 µmol/L)各 1 µL, 模板 1 µL, H₂O 7 µL。PCR 反应条件: 95 °C 3 min; 95 °C 15 s, 55 °C 15 s, 72 °C 1 min, 30 个循环; 72 °C 1 min; 16 °C 保存。

1.3 生长曲线分析

将金属盐(FeSO₄、MnSO₄、ZnSO₄、CuSO₄、

CoSO₄ 和 NiSO₄)的母液按照比例分别添加至 TSB 中制备金属过量的培养基; 将 TPEN 和 2,2'-dipyridyl 的母液按照比例添加至 TSB 中分别制备锌限制和铁限制培养基。将副溶血弧菌各菌株培养至指数生长期(*OD*₆₀₀ 约为 1.5–2.0)。随后按照 1:100 的比例转接至添加指定试剂的 TSB 中。将菌液分装至 96 孔细胞培养板中, 每孔 200 µL, 设置 3 个重复。将培养板转移至 37 °C、120 r/min 的摇床培养 7 h。每隔 1 h 取出培养板用酶标仪测定 *OD*₅₉₅ 值。由于亚铁极易氧化为三价铁, FeSO₄ 母液现用现配, 且在添加 Fe²⁺的培养基中额外添加 1 g/L 的柠檬酸钠(trisodium citrate dihydrate, TCD), 以减少铁的沉淀^[29]。

1.4 菌体内金属含量测定

将副溶血弧菌野生株(WT)、 $\Delta zntR$ 和 C $\Delta zntR$ 于 37 °C、220 r/min 培养过夜。再按照 1:100 的比例转接至添加 25 µmol/L Zn²⁺、1 mmol/L Ni²⁺或 100 µmol/L 2,2'-dipyridyl 的 TSB 中, 继续培养 6 h。10 000 r/min 离心 10 min 收集菌体, 用含 0.25 mmol/L 乙二胺四乙酸(EDTA)的 PBS 洗 3 遍去除细菌表面的金属, 再用 PBS 洗 3 遍去除 EDTA。菌体于 110 °C 烘干后称重, 加入 200 µL 66% 硝酸, 于 70 °C 硝解 48 h。向样品中加入 6.4 mL 去离子水将硝酸稀释至 2%, 稀释后的样品送至扬州大学测试中心用电感耦

合等离子体质谱仪 Elan DRC-e (PerkinElmer 公司)测定菌体内金属含量, 具体步骤和参数设置参考仪器使用说明书。

1.5 斑马鱼竞争感染试验

本试验经扬州大学实验动物福利伦理委员会批准(202307019)。将副溶血弧菌 WT 和 $\Delta zntR$ 培养过夜, 6 000 r/min 离心 5 min 收集菌体, 用 PBS 将其稀释至 1×10^9 CFU/mL。将 WT 和 $\Delta zntR$ 按照 1:1 的比例混合, 混合前分别进行平板计数, 确定混合菌液中 $\Delta zntR$:WT 的实际比值。取 8 只斑马鱼(3–4 月龄), 用 0.1% 的 3-乙氧酰基苯胺甲磺酸盐(Sigma-Aldrich 公司)麻醉后分别肌内注射 5 μ L 混合菌液。24 h 后, 用 3-乙氧酰基苯胺甲磺酸盐将斑马鱼麻醉后处死, 采集注射部位的肌肉组织, 加入 1 mL PBS, 用组织破碎仪匀浆, 然后稀释, 涂板, 于 37 $^{\circ}$ C 培养过夜。每只斑马鱼随机挑取 90–100 个单菌落作为模板, 进行 PCR 鉴定, 确定样品中 $\Delta zntR$:WT 的比值。PCR 反应体系: 2 \times Rapid Taq Master Mix 10 μ L, 引物 *zntR*-out-F 和 *zntR*-out-R (10 μ mol/L)各 1 μ L, 模板 1 μ L, H₂O 7 μ L。PCR 反应条件: 95 $^{\circ}$ C 3 min; 95 $^{\circ}$ C 15 s, 55 $^{\circ}$ C 15 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 1 min; 16 $^{\circ}$ C 保存。PCR 结束后进行琼脂糖凝胶电泳检测, WT 条带大小为 837 bp, $\Delta zntR$ 条带大小为 505 bp。竞争指数(competitive index, CI)定义为样品中 $\Delta zntR$:WT 的比值/混合菌液中 $\Delta zntR$:WT 的实际比值。

1.6 RNA 提取、实时荧光定量 PCR (RT-qPCR)和转录组测序

将副溶血弧菌 WT、 $\Delta zntR$ 和 $C\Delta zntR$ 培养至 OD_{600} 约为 0.6–0.8, 每个细菌培养物分为三等份, 分别添加 0.5 mmol/L ZnSO₄、1 mmol/L NiSO₄ 和 125 μ mol/L 2,2'-dipyridyl, 继续培养 15 min。用 RNA 提取试剂盒(上海普洛麦格生物

产品有限公司)提取细菌总 RNA, 具体步骤参考试剂盒说明书。通过琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 完整性, 用 NanoDrop 200 测定 RNA 浓度。用 HiScript II Q RT SuperMix for qPCR (+gDNA wiper)将 RNA 反转录为 cDNA。以 cDNA 为模板, 用 ChamQ SYBR qPCR Master Mix 进行 RT-qPCR, 反应体系和条件参考试剂盒说明书。以 *gyrB* 基因为内参, 用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法^[30]计算 *zntA* 基因的相对表达水平。

在另一个实验中, 将副溶血弧菌 WT 和 $\Delta zntR$ 培养至 OD_{600} 约为 0.6–0.8, 用 RNA 提取试剂盒提取细菌总 RNA。RNA 样品经检测合格后送至生工生物工程(上海)股份有限公司, 按照参考文献[25]中描述的步骤进行转录组测序分析。将变化倍数大于 2 且修正后 *P* 值(*Q* 值)小于 0.05 的基因定义为差异表达基因。转录组数据已提交至 NCBI GEO 数据库, 登录号为 GSE268232。

1.7 数据统计及分析

用 GraphPad Prism 5 软件分析实验数据。用单因素方差分析及 Bonferroni 事后检验分析金属含量数据; 用双尾配对 *t* 检验分析竞争感染实验数据。**表示 $P < 0.01$; ***表示 $P < 0.001$ 。

2 结果与分析

2.1 *zntR* 基因缺失影响副溶血弧菌在锌和镍过量条件下的生长

通过生长曲线比较了副溶血弧菌 WT、 $\Delta zntR$ 和 $C\Delta zntR$ 在添加各种金属条件下的生长情况。如图 1A 所示, 在不额外添加金属的条件下, 3 个菌株的生长曲线几乎一致。当添加 25 μ mol/L 的 Zn²⁺ 时, $\Delta zntR$ 表现出轻微的生长抑制(图 1B); 当把 Zn²⁺ 的浓度提高到 100 μ mol/L 时, $\Delta zntR$ 表现出明显的生长抑制(图 1C)。当添加 Ni²⁺ 时, $\Delta zntR$ 也表现出生长抑制, 且抑制的程度与 Ni²⁺ 的浓度呈正相关(图 1D、1E)。尽管单独添加 25 μ mol/L Zn²⁺ 或

1 mmol/L Ni^{2+} 对 $\Delta zntR$ 生长的影响很小, 同时添加这 2 种金属导致 $\Delta zntR$ 生长受到严重抑制(图 1F)。此外, 在添加过量 Fe^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Cu^{2+} 或 Co^{2+} 的条件

下, 3 个菌株的生长曲线也几乎一致(图 2)。以上结果表明, $ZntR$ 有利于维持副溶血弧菌在 Zn^{2+} 和 Ni^{2+} 过量条件下的生长。

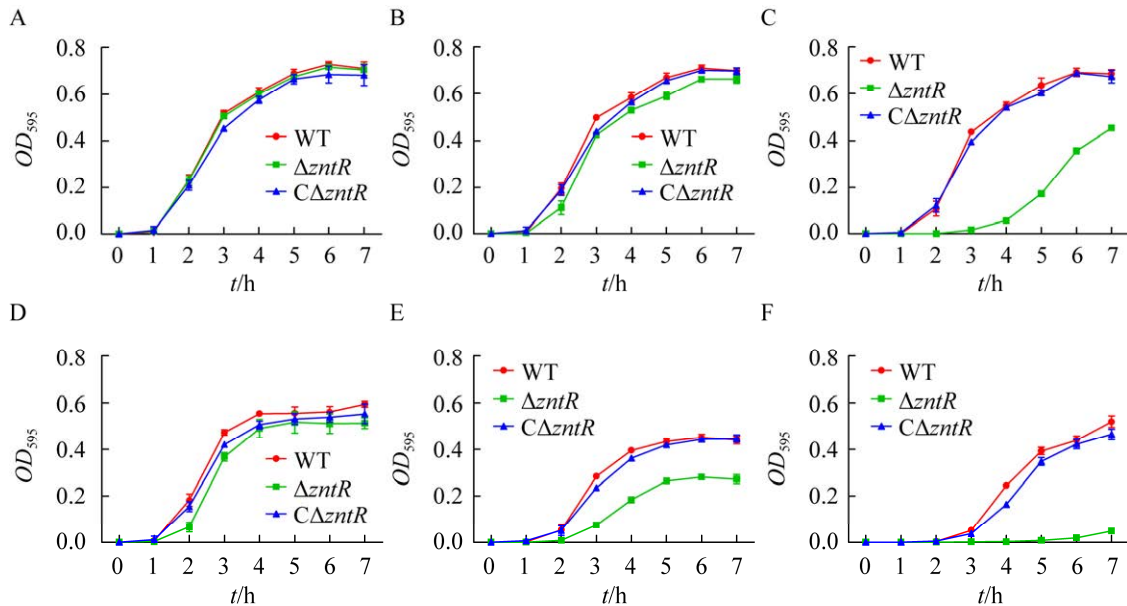


图 1 副溶血弧菌各菌株在添加锌和镍条件下的生长曲线

Figure 1 Growth curves of *Vibrio parahaemolyticus* strains in medium supplemented with Zn^{2+} and Ni^{2+} . A: H_2O (the solvent of each metal salt). B: 25 $\mu\text{mol/L}$ ZnSO_4 . C: 100 $\mu\text{mol/L}$ ZnSO_4 . D: 1 mmol/L NiSO_4 . E: 1.5 mmol/L NiSO_4 . F: 25 $\mu\text{mol/L}$ ZnSO_4 +1 mmol/L NiSO_4 .

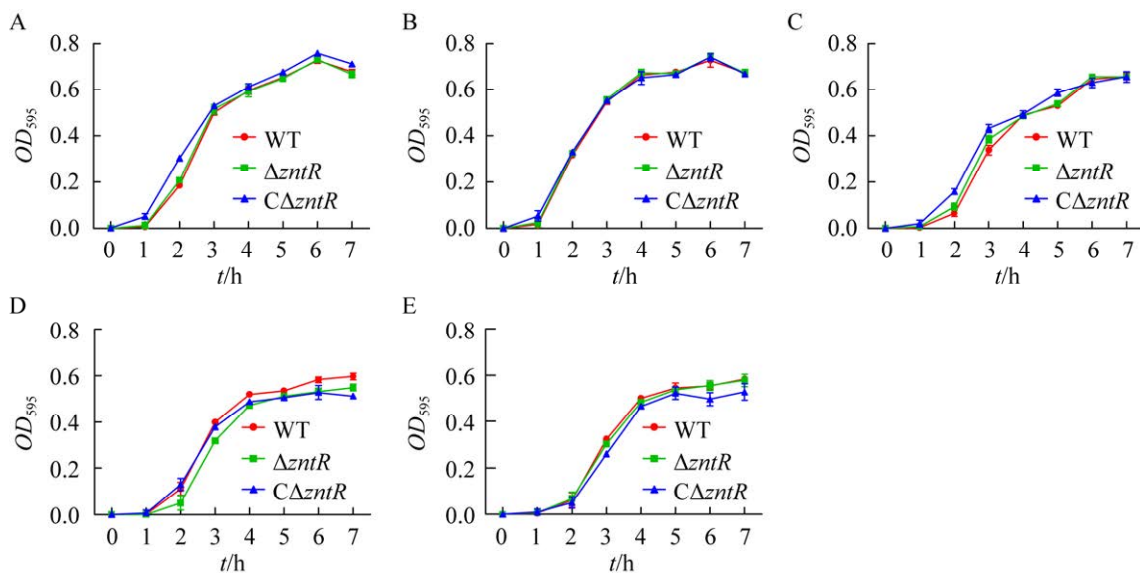


图 2 副溶血弧菌各菌株在添加过量亚铁、锰、铜和钴条件下的生长曲线

Figure 2 Growth curves of *Vibrio parahaemolyticus* strains in medium supplemented with excess Fe^{2+} , Mn^{2+} , Cu^{2+} and Co^{2+} . A: 1 g/L TCD. B: 2 mmol/L FeSO_4 +1 g/L TCD. C: 2 mmol/L MnSO_4 . D: 2 mmol/L CuSO_4 . E: 250 $\mu\text{mol/L}$ CoSO_4 . TCD was supplemented to the medium to alleviate Fe precipitation.

2.2 *zntR* 基因缺失影响副溶血弧菌在铁限制条件下的生长

通过生长曲线比较了副溶血弧菌 WT、 $\Delta zntR$ 和 $C\Delta zntR$ 在铁限制条件下的生长情况。在不添加 2,2'-dipyridyl 的条件下, 3 个菌株的生长曲线几乎一致(图 3A)。当添加低浓度 2,2'-dipyridyl (75 $\mu\text{mol/L}$) 时, 3 个菌株的生长曲线也几乎一致(图 3B)。将 2,2'-dipyridyl 的浓度提高到 100 $\mu\text{mol/L}$ 时, $\Delta zntR$ 表现出生长抑制(图 3C)。此外, 在添加 125 $\mu\text{mol/L}$ 2,2'-dipyridyl 的条件下, 3 个菌株的生长均受到明显抑制, 但 $\Delta zntR$ 的抑制程度更严重, OD_{595} 值几乎不增加(图 3D)。以上结果表明, *ZntR* 有利于维持副溶血弧菌在铁限制条件下的生长。

2.3 $\Delta zntR$ 在锌、镍过量和铁限制条件下的生长缺陷与菌体内锌稳态紊乱有关

为了探究 $\Delta zntR$ 在锌、镍过量和铁限制条件下表现出生长缺陷的原因, 通过 ICP-MS 测

定了副溶血弧菌 WT、 $\Delta zntR$ 和 $C\Delta zntR$ 在相应条件下的菌体内金属含量。在添加 25 $\mu\text{mol/L}$ Zn^{2+} 的条件下, $\Delta zntR$ 菌体内积累的锌含量显著高于 WT 和 $C\Delta zntR$ (图 4A), 说明 $\Delta zntR$ 在锌过量条件下的生长缺陷与菌体内锌稳态紊乱有关。在添加 1 mmol/L Ni^{2+} 的条件下, $\Delta zntR$ 菌体内积累的镍含量显著低于 WT 和 $C\Delta zntR$ (图 4B), 而积累的锌含量却显著高于 WT 和 $C\Delta zntR$ (图 4C), 说明 $\Delta zntR$ 在镍过量条件下的生长缺陷也与菌体内锌稳态紊乱有关。同样地, 在添加 100 $\mu\text{mol/L}$ 2,2'-dipyridyl 的条件下, $\Delta zntR$ 菌体内积累的锌含量显著高于 WT 和 $C\Delta zntR$ (图 4D)。

通过生长曲线进一步评估了锌对 $\Delta zntR$ 在镍过量和铁限制条件下生长的影响。在二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)预处理的培养基中, 添加 1.5 mmol/L Ni^{2+} 导致 $\Delta zntR$ 表现出明显的生长抑制(图 5A)。而在 TPEN 预处理的培养基中添加 1.5 mmol/L Ni^{2+} , $\Delta zntR$ 的生长曲线与

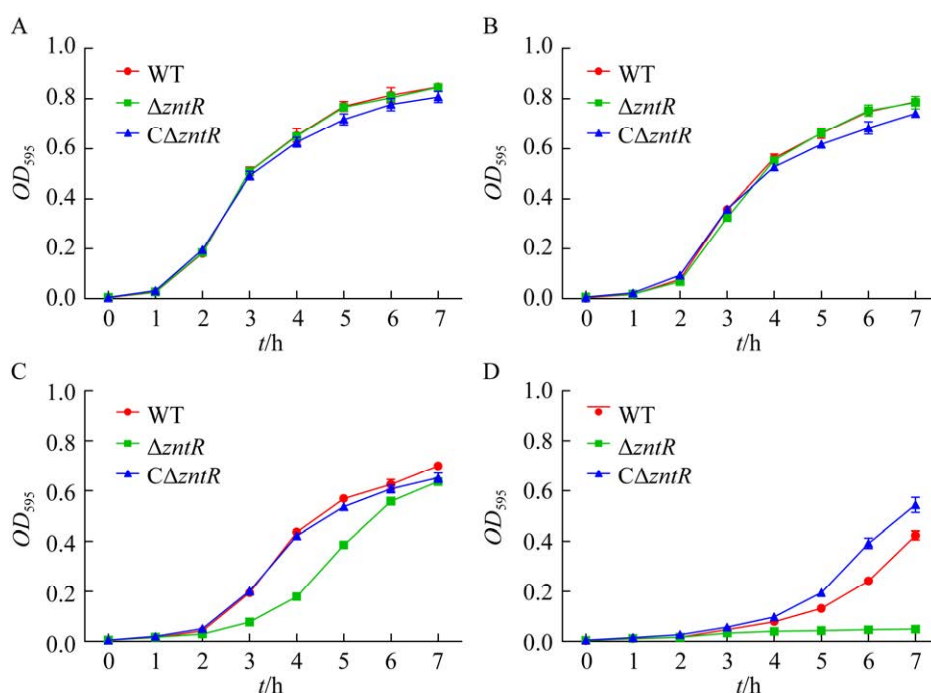


图 3 副溶血弧菌各菌株在铁限制条件下的生长曲线

Figure 3 Growth curves of *Vibrio parahaemolyticus* strains under iron restriction conditions. A: Absolute ethanol (the solvent of 2,2'-dipyridyl). B: 75 $\mu\text{mol/L}$ 2,2'-dipyridyl. C: 100 $\mu\text{mol/L}$ 2,2'-dipyridyl. D: 125 $\mu\text{mol/L}$ 2,2'-dipyridyl.

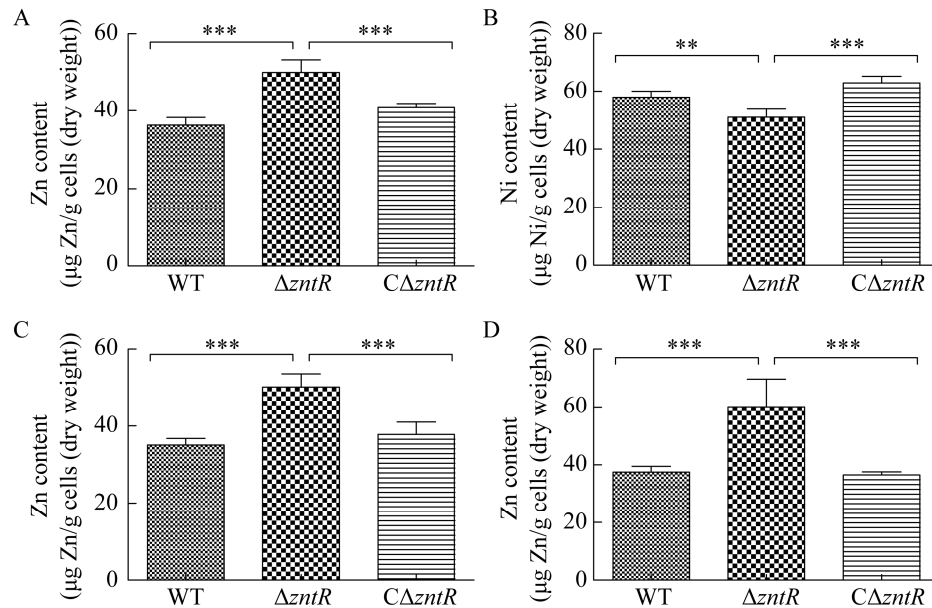


图 4 副溶血弧菌各菌株菌体内金属含量分析

Figure 4 Analysis of intracellular metal content in *Vibrio parahaemolyticus* strains. A, C, D: Intracellular Zn content of the strains grown in medium supplemented with 25 $\mu\text{mol/L}$ ZnSO_4 (A), 1 mmol/L NiSO_4 (C), and 100 $\mu\text{mol/L}$ 2,2'-dipyridyl (D), respectively. B: Intracellular Ni content of the strains grown in medium supplemented with 1 mmol/L NiSO_4 . **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$.

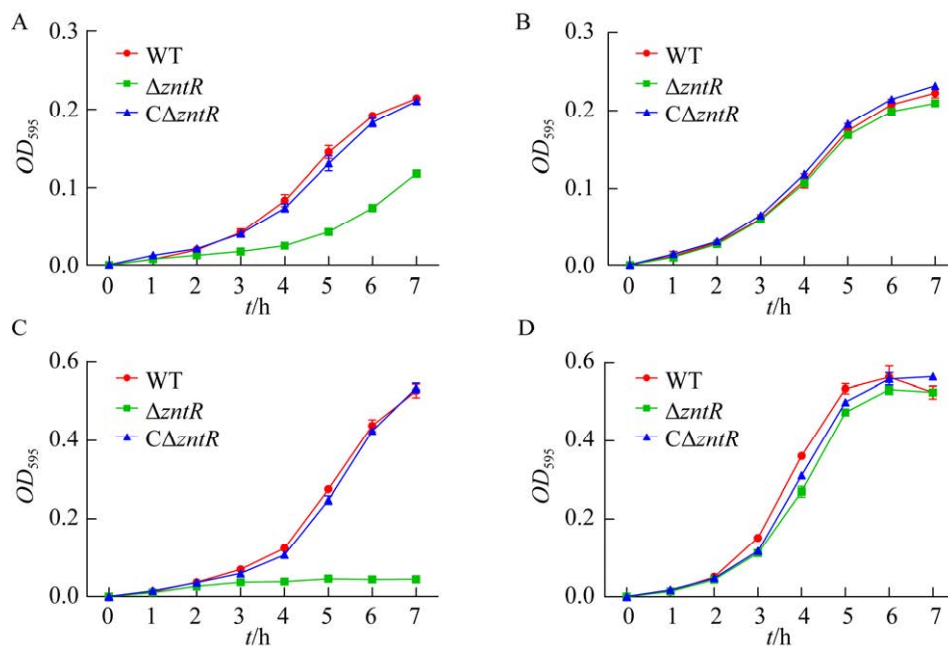


图 5 减少培养基中的锌能恢复 $\Delta zntR$ 在镍过量和铁限制条件下的生长

Figure 5 Depletion of Zn^{2+} in the medium can restore the growth of $\Delta zntR$ under Ni^{2+} excess and Fe restriction conditions. Growth curves of the strains in DMSO (the solvent of TPEN)-pretreated medium supplemented with 1.5 mmol/L NiSO_4 (A), TPEN (20 $\mu\text{mol/L}$)-pretreated medium supplemented with 1.5 mmol/L NiSO_4 (B), DMSO-pretreated medium supplemented with 125 $\mu\text{mol/L}$ 2,2'-dipyridyl (C), and TPEN (20 $\mu\text{mol/L}$)-pretreated medium supplemented with 125 $\mu\text{mol/L}$ 2,2'-dipyridyl (D).

WT 和 $C\Delta zntR$ 几乎一致(图 5B)。当在 DMSO 预处理的培养基中添加 125 $\mu\text{mol/L}$ 2,2'-dipyridyl 时, $\Delta zntR$ 呈现出严重的生长抑制现象(图 5C), 而用 TPEN 预处理培养基后再添加 125 $\mu\text{mol/L}$ 2,2'-dipyridyl 时, $\Delta zntR$ 生长能力恢复到 WT 相同的水平(图 5D)。

综上所述, ZntR 通过调节锌稳态有利于维持副溶血弧菌在锌、镍过量和铁限制条件下的生长。

2.4 在 $\Delta zntR$ 中超表达 $zntA$ 促进其在锌、镍过量和铁限制条件下的生长

研究发现, ZntR 正调控 $zntA$ 基因表达, 而 $zntA$ 与副溶血弧菌维持锌和镉稳态有关^[26]。推测 $\Delta zntR$ 在锌、镍过量和铁限制条件下的生长缺陷与 $zntA$ 下调表达有关。RT-qPCR 结果显示, 在锌、镍过量和铁限制条件下, $\Delta zntR$ 中 $zntA$ 基因的表达水平均显著低于 WT 和 $C\Delta zntR$ (图 6A)。通过生长曲线评估了在 $\Delta zntR$ 中超表达 $zntA$ 对其在锌、镍过量和铁限制条件下生长的影响。当培养基中不添加金属时, 副溶血弧菌 WT、 $\Delta zntR$ 、 $C\Delta zntR$ 、 $\Delta zntR/p\text{MMB207}$ 和 $\Delta zntR/p\text{MMB207-}zntA$ 的生长曲线几乎一致(图 7A)。当培养基中添加 100 $\mu\text{mol/L}$ Zn^{2+} 或 1.5 mmol/L Ni^{2+} 时, $\Delta zntR$ 和 $\Delta zntR/p\text{MMB207}$ 表现出明显的生长抑制, 而 $\Delta zntR/p\text{MMB207-}zntA$ 的生长曲线与 WT 和 $C\Delta zntR$ 一致(图 7B、7C)。当培养基中添加 125 $\mu\text{mol/L}$

2,2'-dipyridyl 时, $\Delta zntR$ 和 $\Delta zntR/p\text{MMB207}$ 的 OD_{595} 值几乎不增加, 而 $\Delta zntR/p\text{MMB207-}zntA$ 的生长曲线与 WT 和 $C\Delta zntR$ 一致(图 7D)。以上结果表明, 在 $\Delta zntR$ 中超表达 $zntA$ 能恢复其在锌、镍过量和铁限制条件下的生长。

2.5 $zntR$ 基因缺失影响副溶血弧菌在锌过量条件下的氧化应激抗性和毒力

通过生长曲线评估了 ZntR 对副溶血弧菌氧化应激抗性的影响。如图 8A、8B 所示, 当培养基中添加 75 $\mu\text{mol/L}$ 或 100 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 时, 副溶血弧菌 WT、 $\Delta zntR$ 和 $C\Delta zntR$ 的生长曲线几乎一致。当培养基中同时添加 75 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 和 25 $\mu\text{mol/L}$ Zn^{2+} 时, $\Delta zntR$ 表现出明显的生长抑制(图 8C)。当培养基中同时添加 100 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 和 25 $\mu\text{mol/L}$ Zn^{2+} 时, $\Delta zntR$ 的生长几乎被完全抑制(图 8D)。以上结果表明, ZntR 通过调控锌稳态促进副溶血弧菌的氧化应激抗性。

用斑马鱼竞争感染试验评估了 ZntR 对副溶血弧菌毒力的影响。副溶血弧菌 WT 和 $\Delta zntR$ 按照 1:1 的比例混合后肌内注射斑马鱼, 24 h 后采集注射部位的肌肉组织分离细菌, 通过菌落 PCR 鉴定样品中 WT 和 $\Delta zntR$ 的比例。如图 9 所示, 8 只斑马鱼的肌肉组织样品中 $\Delta zntR$ 相比 WT 的平均 CI 为 0.461, 显著小于 1。该结果表明, 相比 WT, $\Delta zntR$ 在斑马鱼肌肉组织中的增殖和扩散能力显著下降, 即其毒力下降。

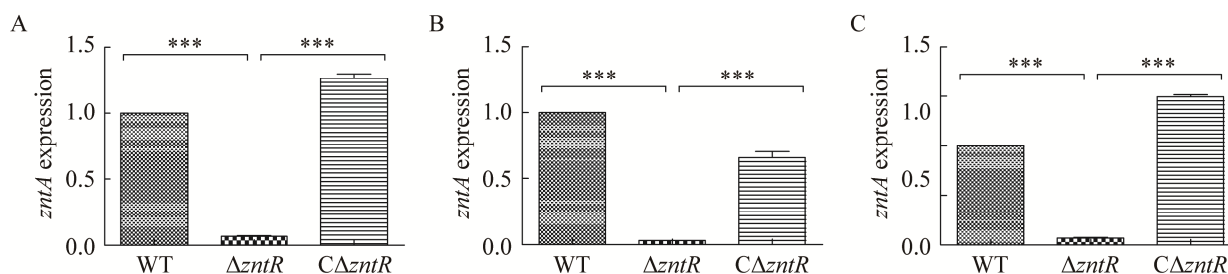


图 6 副溶血弧菌各菌株在锌、镍过量和铁限制条件下 $zntA$ 基因的表达水平

Figure 6 $zntA$ expression in *Vibrio parahaemolyticus* strains under Zn^{2+} , Ni^{2+} excess, and Fe restriction conditions. A: 0.5 mmol/L ZnSO_4 . B: 1 mmol/L NiSO_4 . C: 125 $\mu\text{mol/L}$ 2,2'-dipyridyl. ***: $P < 0.001$.

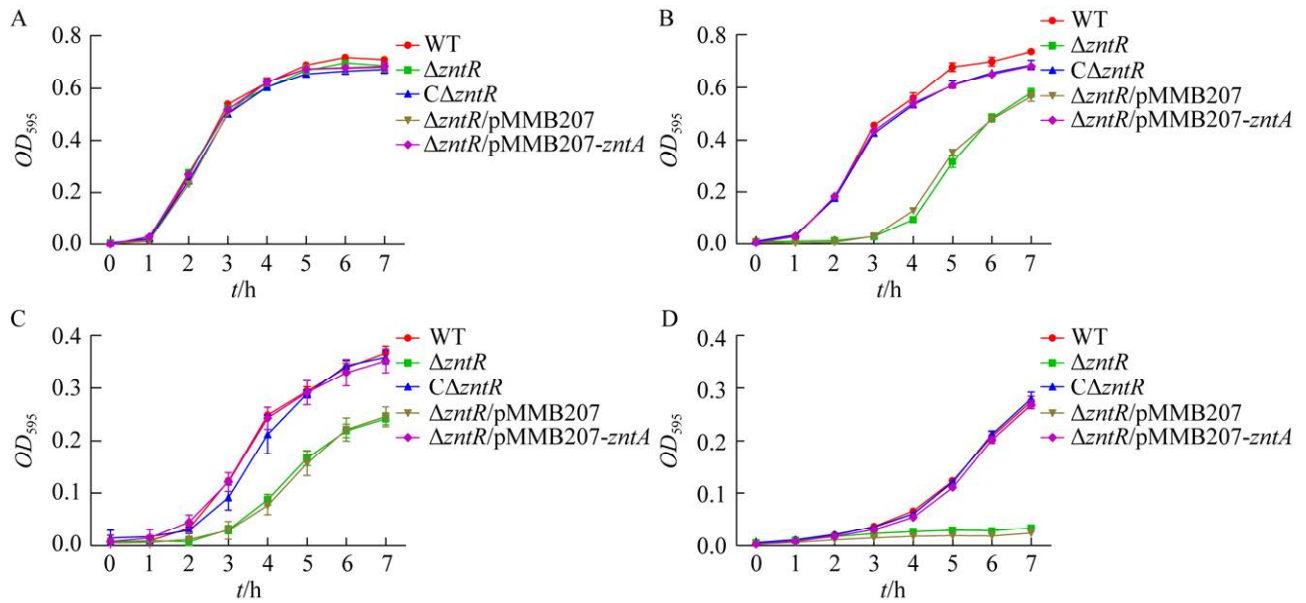


图 7 副溶血弧菌各菌株在锌、镍过量 and 铁限制条件下的生长曲线

Figure 7 Growth curves of *Vibrio parahaemolyticus* strains under excess Zn^{2+} , Ni^{2+} and Fe restriction conditions. A: H_2O . B: $100 \mu mol/L ZnSO_4$. C: $1.5 mmol/L NiSO_4$. D: $125 \mu mol/L 2,2'$ -dipyridyl.

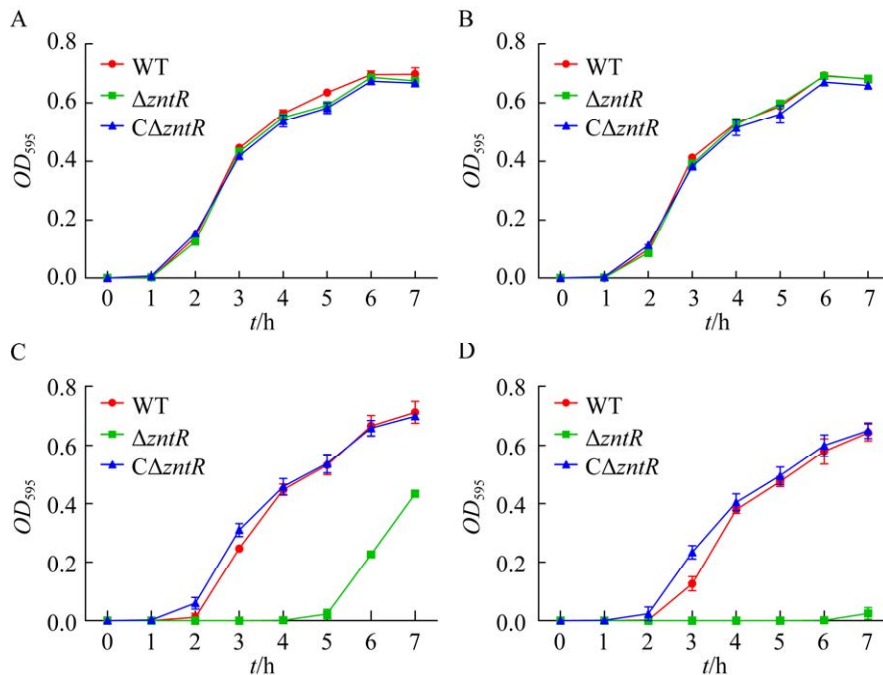


图 8 副溶血弧菌各菌株在添加 H_2O_2 或同时添加 H_2O_2 和锌条件下的生长曲线

Figure 8 Growth curves of *Vibrio parahaemolyticus* strains in medium supplemented with H_2O_2 alone or H_2O_2 plus Zn^{2+} . A: $75 \mu mol/L H_2O_2$. B: $100 \mu mol/L H_2O_2$. C: $75 \mu mol/L H_2O_2+25 \mu mol/L ZnSO_4$. D: $100 \mu mol/L H_2O_2+25 \mu mol/L ZnSO_4$.

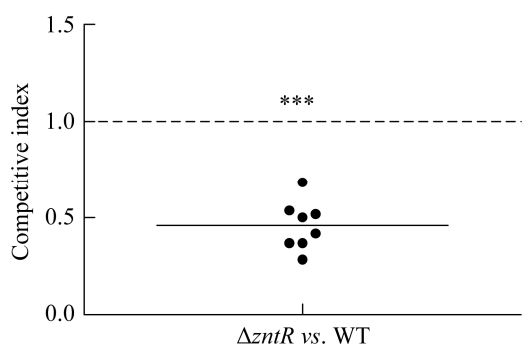


图9 $\Delta zntR$ 相比 WT 在斑马鱼肌肉感染模型中的竞争指数

Figure 9 Competitive index of $\Delta zntR$ against the WT strain during intramuscular infection in zebrafish. ***: $P < 0.001$.

2.6 $\Delta zntR$ 中一些毒力相关基因显著下调表达

转录组测序结果显示, 与 WT 相比, $\Delta zntR$ 中有 69 个基因显著差异表达, 其中 25 个上调表达, 44 个下调表达(图 10)。与预期一致, $zntA$ 基因的表达水平下调了 24.6 倍; 其他一些毒力相关基因, 包括 4 个编码型分泌系统 1 (T3SS1) 组分的基因、4 个编码六型分泌系统 1 (T6SS1) 组分的基因和编码触发磷酸二酯酶 A 的基因 $tpdA$, 也下调了 2.3–4.4 倍(表 3)。以上结果表明, $ZntR$ 调控一些毒力相关基因的表达。

3 讨论与结论

生长曲线分析结果显示, $\Delta zntR$ 在锌、镍过量和铁限制条件下表现出生长缺陷, 这和 $\Delta zntA$ 的表型^[26]相似。ICP-MS 结果显示, 在锌、镍过量和铁限制条件下, $\Delta zntR$ 菌体内均积累了更多的锌。说明在锌、镍过量和铁限制条件下, $\Delta zntR$ 的生长缺陷均与锌稳态紊乱有关。当用 TPEN 降低培养基中的锌浓度, $\Delta zntR$ 在镍过量和铁限制条件下的生长恢复正常, 进一步证实 $\Delta zntR$ 在该条件下的生长缺陷与锌稳态紊乱有

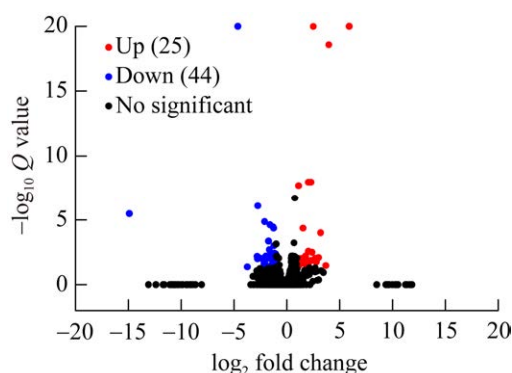


图10 与 WT 相比 $\Delta zntR$ 中的差异表达基因

Figure 10 The differentially expressed genes in $\Delta zntR$ compared to the WT strain.

表3 $\Delta zntR$ 中显著下调表达的毒力相关基因

Table 3 The virulence-related genes that are significantly downregulated in $\Delta zntR$

基因座标签	基因名称	产物	下调倍数	参考文献
Locus tag	Gene name	Product	Fold change	Reference
VP_RS04700	<i>zntA</i>	Metal-transporting ATPase	-24.6	[26]
VP_RS07995	<i>vcrG</i>	LcrG family type III secretion system chaperone VcrG	-2.7	[31]
VP_RS08025		TyeA family type III secretion system gatekeeper subunit	-2.5	[31]
VP_RS08040	<i>vscO</i>	Type III secretion system central stalk protein VscO	-2.4	[31]
VP_RS08100	<i>vecA</i>	CesT family type III secretion system chaperone VecA	-2.6	[31]
VP_RS06800		Protein kinase family protein	-4.4	[31]
VP_RS06840	<i>tssM</i>	Type VI secretion system membrane subunit TssM	-3.0	[31]
VP_RS06845		Type VI secretion system ImpA family N-terminal domain-containing protein	-3.1	[31]
VP_RS06855		FHA domain-containing protein	-3.5	[31]
VP_RS09160	<i>tpdA</i>	Trigger phosphodiesterase A	-2.3	[32]

关。实际上, 一种金属的过量经常会扰乱其他金属的稳态。例如, 在大肠杆菌中, 过量的锌会扰乱铁和铜稳态^[33]; 在肺炎克雷伯菌中, 锌稳态紊乱会影响锰和铁稳态^[34]。

前期研究结果显示, 在副溶血弧菌 $\Delta zntR$ 中, *zntA* 基因显著下调表达, 而 *zntA* 与锌稳态有关^[26], 因此探究了在 $\Delta zntR$ 中超表达 *zntA* 对其在锌、镍过量和铁限制条件下的生长。结果显示, $\Delta zntR/pMMB207-zntA$ 在锌、镍过量和铁限制条件下的生长能恢复正常, 而 $\Delta zntR/pMMB207$ 不能。说明 $\Delta zntR$ 在锌、镍过量和铁限制条件下的生长缺陷与 *zntA* 下调表达有关。

锌稳态对细菌氧化应激抗性的影响已经得到了很好的证实。在假结核耶尔森菌中, *ZntR* 与细菌在氧化应激条件下的存活有关^[35]。在变形链球菌中, 扰乱锌稳态会降低其对氧化应激的耐受性^[36]。在副溶血弧菌中, 锌外排系统 *ZntA* 促进细菌在锌过量的条件下抵抗 H_2O_2 诱导的氧化应激^[26]。然而, 在根癌农杆菌中, *zntA* 的失活反而使细菌对氧化应激的抗性增强^[37]。与副溶血弧菌 $\Delta zntA$ 的情况^[20]相似, 在单独添加 H_2O_2 的培养基中, $\Delta zntR$ 未表现出明显的生长缺陷; 然而, 当培养基中同时添加锌和 H_2O_2 , $\Delta zntR$ 的生长明显受到抑制。因此, *ZntR* 通过调控锌稳态促进副溶血弧菌抵抗氧化应激。

通常情况下, 锌稳态与细菌的毒力有关。在变形链球菌中, 用锌进行局部处理显著降低 $\Delta zccE$ (锌外排系统缺失株) 对大鼠牙齿表面的定殖效率^[36]。在慢性感染小鼠模型中, *zntR* 缺失导致流产布鲁氏菌毒力显著下降^[38]。在牛分枝杆菌中, 锌外排系统 *CtpG* 促进细菌在 THP-1 巨噬细胞和小鼠模型中的存活^[39]。斑马鱼是评估副溶血弧菌毒力的理想模型^[40-41]。竞争感染实

验被广泛用于评估细菌的毒力^[42-43]。因此, 本研究用斑马鱼竞争感染试验比较了 WT 和 $\Delta zntR$ 的毒力。结果显示, $\Delta zntR$ 的毒力显著下降。该结果与预期一致, 因为在 $\Delta zntR$ 中毒力相关基因 *zntA* 显著下调表达^[26]。除了 *zntA*, 其他一些毒力相关基因, 包括 4 个编码 T3SS1 组分的基因^[31]、4 个编码 T6SS1 组分的基因^[31]和 *tpdA*^[32]也显著下调表达。T3SS1 能将效应蛋白 *VopQ*、*VopR*、*VopS* 和 *VPA0450* 注入宿主细胞, 引起细胞毒性^[4]。T6SS1 促进副溶血弧菌黏附宿主细胞^[31]。*TpdA* 调控副溶血弧菌环二鸟苷酸(c-di-GMP)丰度、运动性和生物被膜形成^[32]。推测 *ZntR* 通过调控毒力相关基因的表达影响副溶血弧菌的毒力。需要注意的是, 并不是在所有细菌中锌稳态都与毒力有关。例如, 在绵羊布鲁氏菌中, $\Delta zntR$ 和 $\Delta zntA$ 在小鼠巨噬细胞和小鼠模型中的毒力均未下降^[44]。

虽然本研究证实 *ZntR* 促进副溶血弧菌在锌过量条件下的氧化应激抗性, 然而其具体机制仍然未知。推测在锌过量条件下, 一些氧化应激抗性相关的酶(如超氧化物歧化酶)因为金属错配而降低活性。例如, *VP_RS10295* 编码含铁超氧化物歧化酶, 过量的锌可能会与铁竞争结合该酶, 进而影响其活性。下一步可以探究这些酶在金属过量条件下的活性, 进而明确金属过量影响副溶血弧菌生理的机制。此外, 解析 *ZntR* 的结构, 明确 *ZntR* 结合锌的关键活性位点, 也有助于未来基于 *ZntR* 开发新型药物。

综上所述, 本研究探究了 *ZntR* 对副溶血弧菌金属稳态、氧化应激抗性和毒力的影响。结果显示, *ZntR* 通过调控锌稳态有利于维持副溶血弧菌在锌、镍过量和铁限制条件下的生长。此外, *ZntR* 促进副溶血弧菌的氧化应激抗性及其毒力。

参考文献

- [1] BAKER-AUSTIN C, OLIVER JD, ALAM M, ALI A, WALDOR MK, QADRI F, MARTINEZ-URTAZA J. *Vibrio* spp. infections[J]. *Nature Reviews Disease Primers*, 2018, 4(1): 8.
- [2] MARTINEZ-URTAZA J, BAKER-AUSTIN C. *Vibrio parahaemolyticus*[J]. *Trends in Microbiology*, 2020, 28(10): 867-868.
- [3] LI MZ, XU HY, TIAN YQ, ZHANG YK, JIAO XN, GU D. Comparative genomic analysis reveals the potential transmission of *Vibrio parahaemolyticus* from freshwater food to humans[J]. *Food Microbiology*, 2023, 113: 104277.
- [4] BROBERG CA, CALDER TJ, ORTH K. *Vibrio parahaemolyticus* cell biology and pathogenicity determinants[J]. *Microbes and Infection*, 2011, 13(12/13): 992-1001.
- [5] PAZHANI GP, CHOWDHURY G, RAMAMURTHY T. Adaptations of *Vibrio parahaemolyticus* to stress during environmental survival, host colonization, and infection[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2021, 12: 737299.
- [6] PAUDYAL N, PAN H, LIAO XY, ZHANG X, LI XL, FANG WH, YUE M. A meta-analysis of major foodborne pathogens in Chinese food commodities between 2006 and 2016[J]. *Foodborne Pathogens and Disease*, 2018, 15(4): 187-197.
- [7] LIU JK, BAI L, LI WW, HAN HH, FU P, MA XC, BI ZW, YANG XR, ZHANG XL, ZHEN SQ, DENG XL, LIU XM, GUO YC. Trends of foodborne diseases in China: lessons from laboratory-based surveillance since 2011[J]. *Frontiers of Medicine*, 2018, 12(1): 48-57.
- [8] 孙一享, 常洪军, 杨行鑫, 吴明伟, 黎洁. 水产动物副溶血弧菌病及其噬菌体防治研究进展[J]. *微生物学通报*, 2023, 50(8): 3620-3634.
- SUN YX, CHANG HJ, YANG XX, WU MW, LI J. Vibriosis caused by *Vibrio parahaemolyticus* in aquatic animals and bacteriophage therapy: a review[J]. *Microbiology China*, 2023, 50(8): 3620-3634 (in Chinese).
- [9] TURNER AG, ONG CLY, WALKER MJ, DJOKO KY, McEWAN AG. Transition metal homeostasis in *Streptococcus pyogenes* and *Streptococcus pneumoniae*[J]. *Advances in Microbial Physiology*, 2017, 70: 123-191.
- [10] BEGG SL. The role of metal ions in the virulence and viability of bacterial pathogens[J]. *Biochemical Society Transactions*, 2019, 47(1): 77-87.
- [11] CHANDRANGSU P, RENSING C, HELMANN JD. Metal homeostasis and resistance in bacteria[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2017, 15(6): 338-350.
- [12] McDEVITT CA, OGUNNIYI AD, VALKOV E, LAWRENCE MC, KOBE B, McEWAN AG, PATON JC. A molecular mechanism for bacterial susceptibility to zinc[J]. *PLoS Pathogens*, 2011, 7(11): e1002357.
- [13] HOOD MI, SKAAR EP. Nutritional immunity: transition metals at the pathogen-host interface[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2012, 10(8): 525-537.
- [14] MAKTHAL N, NGUYEN K, DO H, GAVAGAN M, CHANDRANGSU P, HELMANN JD, OLSEN RJ, KUMARASWAMI M. A critical role of zinc importer AdcABC in group A *Streptococcus*-host interactions during infection and its implications for vaccine development[J]. *eBioMedicine*, 2017, 21: 131-141.
- [15] BOTELLA H, PEYRON P, LEVILLAIN F, POINCLOUX R, POQUET Y, BRANDLI I, WANG C, TAILLEUX L, TILLEUL S, CHARRIÈRE GM, WADDELL SJ, FOTI M, LUGO-VILLARINO G, GAO Q, MARIDONNEAU-PARINI I, BUTCHER PD, CASTAGNOLI PR, GICQUEL B, de CHASTELLIER C, NEYROLLES O. Mycobacterial p(1)-type ATPases mediate resistance to zinc poisoning in human macrophages[J]. *Cell Host & Microbe*, 2011, 10(3): 248-259.
- [16] MAKTHAL N, DO H, WENDEL BM, OLSEN RJ, HELMANN JD, MUSSER JM, KUMARASWAMI M. Group A *Streptococcus* AdcR regulon participates in bacterial defense against host-mediated zinc sequestration and contributes to virulence[J]. *Infection and Immunity*, 2020, 88(8): e00097-20.
- [17] TURNER AG, ONG CLY, DJOKO KY, WEST NP, DAVIES MR, McEWAN AG, WALKER MJ. The PerR-regulated P_{1B-4}-type ATPase (PmtA) acts as a ferrous iron efflux pump in *Streptococcus pyogenes*[J]. *Infection and Immunity*, 2017, 85(6): e00140-17.
- [18] TURNER AG, ONG CLY, GILLEN CM, DAVIES MR, WEST NP, McEWAN AG, WALKER MJ. Manganese homeostasis in group A *Streptococcus* is critical for resistance to oxidative stress and virulence[J]. *mBio*, 2015, 6(2): e00278-15.

- [19] WOLSCHELDORF F, ACKART D, SHRESTHA TB, HASCALL-DOVE L, NOLAN S, LAMICHHANE G, WANG Y, BOSSMANN SH, BASARABA RJ, NIEDERWEIS M. Copper resistance is essential for virulence of *Mycobacterium tuberculosis*[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2011, 108(4): 1621-1626.
- [20] ALQUETHAMY SF, KHORVASH M, PEDERICK VG, WHITTALL JJ, PATON JC, PAULSEN IT, HASSAN KA, McDEVITT CA, EIJKELKAMP BA. The role of the CopA copper efflux system in *Acinetobacter baumannii* virulence[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2019, 20(3): 575.
- [21] KARUNASAGAR I, JOSEPH SW, TWEDT RM, HADA H, COLWELL RR. Enhancement of *Vibrio parahaemolyticus* virulence by lysed erythrocyte factor and iron[J]. Infection and Immunity, 1984, 46(1): 141-144.
- [22] GODE-POTRATZ CJ, CHODUR DM, McCARTER LL. Calcium and iron regulate swarming and type III secretion in *Vibrio parahaemolyticus*[J]. Journal of Bacteriology, 2010, 192(22): 6025-6038.
- [23] LIU M, YAN MY, LIU LZ, CHEN S. Characterization of a novel zinc transporter ZnuA acquired by *Vibrio parahaemolyticus* through horizontal gene transfer[J]. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 2013, 3: 61.
- [24] ZHAO YX, KONG MY, YANG JX, ZHAO XX, SHI YR, ZHAI YM, QIU J, ZHENG CK. The DmeRF system is involved in maintaining cobalt homeostasis in *Vibrio parahaemolyticus*[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2022, 24(1): 414.
- [25] ZHENG CK, QIU J, ZHAI YM, WEI M, ZHOU XH, JIAO XN. ZrgA contributes to zinc acquisition in *Vibrio parahaemolyticus*[J]. Virulence, 2023, 14(1): 2156196.
- [26] ZHENG CK, ZHAI YM, QIU J, WANG MX, XU ZZ, CHEN X, ZHOU XH, JIAO XN. ZntA maintains zinc and cadmium homeostasis and promotes oxidative stress resistance and virulence in *Vibrio parahaemolyticus*[J]. Gut Microbes, 2024, 16(1): 2327377.
- [27] MAKINO K, OSHIMA K, KUROKAWA K, YOKOYAMA K, UDA T, TAGOMORI K, IJIMA Y, NAJIMA M, NAKANO M, YAMASHITA A, KUBOTA Y, KIMURA S, YASUNAGA T, HONDA T, SHINAGAWA H, HATTORI M, IIDA T. Genome sequence of *Vibrio parahaemolyticus*: a pathogenic mechanism distinct from that of *V. cholerae*[J]. The Lancet, 2003, 361(9359): 743-749.
- [28] MORALES VM, BÄCKMAN A, BAGDASARIAN M. A series of wide-host-range low-copy-number vectors that allow direct screening for recombinants[J]. Gene, 1991, 97(1): 39-47.
- [29] GUAN GH, PINOCHET-BARROS A, GABALLA A, PATEL SJ, ARGÜELLO JM, HELMANN JD. P_{1B4}-type ATPase, effluxes ferrous iron and protects *Bacillus subtilis* against iron intoxication[J]. Molecular Microbiology, 2015, 98(4): 787-803.
- [30] LIVAK KJ, SCHMITTGEN TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-delta delta C(T)) Method[J]. Methods, 2001, 25(4): 402-408.
- [31] WANG RZ, ZHONG YF, GU XS, YUAN J, SAEED AF, WANG SH. The pathogenesis, detection, and prevention of *Vibrio parahaemolyticus*[J]. Frontiers in Microbiology, 2015, 6: 144.
- [32] MARTÍNEZ-MÉNDEZ R, CAMACHO-HERNÁNDEZ DA, SULVARÁN-GUEL E, ZAMORANO-SÁNCHEZ D. A trigger phosphodiesterase modulates the global c-di-GMP pool, motility, and biofilm formation in *Vibrio parahaemolyticus*[J]. Journal of Bacteriology, 2021, 203(13): e0004621.
- [33] XU ZL, WANG PC, WANG HB, YU ZH, AU-YEUNG HY, HIRAYAMA T, SUN HZ, YAN AX. Zinc excess increases cellular demand for iron and decreases tolerance to copper in *Escherichia coli*[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2019, 294(45): 16978-16991.
- [34] MAUNDERS EA, GANIO K, HAYES AJ, NEVILLE SL, DAVIES MR, STRUGNELL RA, McDEVITT CA, TAN A. The role of ZntA in *Klebsiella pneumoniae* zinc homeostasis[J]. Microbiology Spectrum, 2022, 10(1): e0177321.
- [35] WANG TT, CHEN KQ, GAO F, KANG YW, CHAUDHRY MT, WANG Z, WANG Y, SHEN XH. ZntR positively regulates T6SS4 expression in *Yersinia pseudotuberculosis*[J]. Journal of Microbiology, 2017, 55(6): 448-456.
- [36] GANGULY T, PETERSON AM, BURKHOLDER M, KAJFASZ JK, ABRANCHES J, LEMOS JA. ZccE is a

- novel P-type ATPase that protects *Streptococcus mutans* against zinc intoxication[J]. *PLoS Pathogens*, 2022, 18(8): e1010477.
- [37] CHAOPRASID P, NOOKABKAEW S, SUKCHAWALIT R, MONGKOLSUK S. Roles of *Agrobacterium tumefaciens* C58 ZntA and ZntB and the transcriptional regulator ZntR in controlling Cd²⁺/Zn²⁺/Co²⁺ resistance and the peroxide stress response[J]. *Microbiology*, 2015, 161(9): 1730-1740.
- [38] SHEEHAN LM, BUDNICK JA, ROOP RM 2nd, CASWELL CC. Coordinated zinc homeostasis is essential for the wild-type virulence of *Brucella abortus*[J]. *Journal of Bacteriology*, 2015, 197(9): 1582-1591.
- [39] CHEN L, LI XH, XU P, HE ZG. A novel zinc exporter CtpG enhances resistance to zinc toxicity and survival in *Mycobacterium bovis*[J]. *Microbiology Spectrum*, 2022, 10(2): e0145621.
- [40] PARANJPYE RN, MYERS MS, YOUNT EC, THOMPSON JL. Zebrafish as a model for *Vibrio parahaemolyticus* virulence[J]. *Microbiology*, 2013, 159(Pt 12): 2605-2615.
- [41] ZHANG QH, DONG XH, CHEN B, ZHANG YH, ZU Y, LI WM. Zebrafish as a useful model for zoonotic *Vibrio parahaemolyticus* pathogenicity in fish and human[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2016, 55: 159-168.
- [42] BERTRAND N, HOULE S, LeBIHAN G, POIRIER É, DOZOIS CM, HAREL J. Increased Pho regulon activation correlates with decreased virulence of an avian pathogenic *Escherichia coli* O78 strain[J]. *Infection and Immunity*, 2010, 78(12): 5324-5331.
- [43] LIU JJ, YIN F, LIU T, LI SW, TAN C, LI L, ZHOU R, HUANG Q. The Tat system and its dependent cell division proteins are critical for virulence of extra-intestinal pathogenic *Escherichia coli*[J]. *Virulence*, 2020, 11(1): 1279-1292.
- [44] TARTILÁN-CHOYA B, TEJEDOR C, CONDE-ÁLVAREZ R, MUÑOZ PM, VIZCAÍNO N. Characterization of three predicted zinc exporters in *Brucella ovis* identifies ZntR-ZntA as a powerful zinc and cadmium efflux system not required for virulence and unveils pathogenic Brucellae heterogeneity in zinc homeostasis[J]. *Frontiers in Veterinary Science*, 2024, 10: 1323500.