

# 鸭疫里氏杆菌 CH-1 株 B739\_RS03695 基因的功能鉴定

时春风<sup>#1,2,3,4</sup>, 郭方<sup>#1,2,3,4</sup>, 刘马峰<sup>1,2,3,4</sup>, 程安春<sup>1,2,3,4</sup>, 汪铭书<sup>\*1,2,3,4</sup>

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

时春风, 郭方, 刘马峰, 程安春, 汪铭书. 鸭疫里氏杆菌 CH-1 株 B739\_RS03695 基因的功能鉴定[J]. 微生物学通报, 2023, 50(11): 4966-4975.

SHI Chunfeng, GUO Fang, LIU Mafeng, CHENG Anchun, WANG Mingshu. Functional identification of B739\_RS03695 in *Riemerella anatipestifer* CH-1[J]. Microbiology China, 2023, 50(11): 4966-4975.

**摘要:** 【背景】鸭疫里默氏杆菌是一种可引起鸭传染性浆膜炎的革兰氏阴性病原菌。对于该菌的铁离子转运系统已有大量研究, 但有关该菌铁硫簇装配基因的功能知之甚少。【目的】序列分析表明, 鸭疫里默氏杆菌 CH-1 株 B739\_RS03695 编码铁硫结合蛋白, 但其具体功能未知。本研究旨在鉴定鸭疫里默氏杆菌 CH-1 株 B739\_RS03695 基因在抗氧化应激及耐药中的功能。【方法】构建 B739\_RS03695 缺失株, 通过测定生长曲线、氧化应激存活率探究其在抗氧化应激中的功能; 通过最小抑菌浓度、杀菌试验探究其在耐药中的功能。【结果】与亲本株相比, RA CH-1ΔB739\_RS03695 在 GCB 培养基中生长不受影响, 但在铁限制性培养基中的生长受到明显抑制; 与亲本株相比, RA CH-1ΔB739\_RS03695 对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的敏感性增加; 与亲本株相比, RA CH-1ΔB739\_RS03695 对庆大霉素的抵抗力显著增加; 荧光定量 PCR 结果表明, 与对照组相比, B739\_RS03695 基因的转录水平在铁限制性条件和存在过氧化氢条件下显著上调。【结论】B739\_RS03695 基因缺失后会损害 RA CH-1 在铁限制性培养基中生长, B739\_RS03695 基因参与 RA CH-1 对过氧化氢的抵抗并促进庆大霉素对 RA CH-1 的杀灭作用。

**关键词:** 鸭疫里默氏杆菌; 铁硫结合蛋白; 氧化应激; 耐药

资助项目: 国家自然科学基金(32172851); 四川省自然科学基金(2022NSFSC0007)

<sup>#</sup>对本文贡献相同

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (32172851) and the Natural Science Foundation of Sichuan Province (2022NSFSC0007).

<sup>#</sup>These authors contributed equally to this work.

\*Corresponding author. E-mail: mshwang@163.com

Received: 2023-05-25; Accepted: 2023-06-25; Published online: 2023-08-04

# Functional identification of *B739\_RS03695* in *Riemerella anatipestifer* CH-1

SHI Chunfeng<sup>#1,2,3,4</sup>, GUO Fang<sup>#1,2,3,4</sup>, LIU Mafeng<sup>1,2,3,4</sup>, CHENG Anchun<sup>1,2,3,4</sup>,  
WANG Mingshu<sup>\*1,2,3,4</sup>

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:** [Background] *Riemerella anatipestifer* (RA) is a Gram-negative bacterium that causes infectious serositis in ducks. Despite the extensive studies about the iron transport system of this bacterium, little is known about the function of iron-sulfur cluster assembly gene. [Objective] Sequence analysis shows that *B739\_RS03695* encodes an iron sulfur binding protein in *R. anatipestifer* CH-1, while the function of this gene remains unknown. This study aims to reveal the role of gene *B739\_RS03695* in the strain resistance to oxidative stress and antibiotics. [Methods] We constructed the *B739\_RS03695*-deleted strain and studied its response to oxidative stress by establishing the growth curve and conducting the oxidative stress assay. The role of the gene in antibiotic resistance was measured by the minimum inhibitory concentration (MIC) and time-dependent killing experiment. [Results] Compared with the parent strain, RA CH-1 $\Delta$ *B739\_RS03695* presented unaffected growth in the GCB medium, inhibited growth in the iron-restricted medium, increased sensitivity to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, and enhanced resistance to gentamicin. The real-time PCR results showed that compared with the control group, the transcription level of *B739\_RS03695* was significantly up-regulated under iron restriction and hydrogen peroxide stress conditions. [Conclusion] The deletion of *B739\_RS03695* impaired the growth of RA CH-1 in iron-restricted medium. *B739\_RS03695* was required for the resistance of RA CH-1 to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and the killing effect of gentamicin on RA CH-1.

**Keywords:** *Riemerella anatipestifer*; iron-sulfide-binding protein; oxidative stress; antibiotic resistance

铁硫簇是由亚铁离子或铁离子与硫化物组成的重要辅因子, 是几乎所有生物体中存在的最大类金属蛋白, 也是最古老、最普遍的氧化还原中心之一<sup>[1]</sup>。铁硫簇在生命中起到重要作用, 如能量转换、柠檬酸循环、氨基酸生物合成、血红素和生物素生物合成、DNA 合成修复以及基因的表达调控等<sup>[2]</sup>。铁硫簇的合成和组

装在各生物中高度保守, 由大量特定的蛋白发挥作用, 主要包括三大系统: iron-sulfur cluster assembly (ISC)、sulfur mobilization (SUF) 和 nitrogen fixation (NIF)<sup>[3]</sup>。ISC 系统是在正常条件下线粒体铁硫簇合成和装配最重要的途径; SUF 系统在很多方面与 ISC 相似, 主要在铁限制或氧化应激等恶劣条件下发挥作用; NIF 系

统则主要是固氮菌中产生固氮酶蛋白的铁硫簇的专用途径<sup>[4-6]</sup>。其中,铁硫簇中的硫是通过半胱氨酸脱硫酶从 L-半胱氨酸中获得的, IscA 和 SufA 等铁硫结合蛋白可募集细胞内的铁并为铁硫簇的组装输送铁<sup>[7]</sup>。

鸭疫里默氏杆菌(*Riemerella anatipestifer*, RA)是一种威克斯菌科里氏杆菌属的革兰氏阴性菌,该菌引起的鸭传染性浆膜炎是造成雏鸭死亡的重要原因之一,给我国养鸭业的健康发展造成严重威胁<sup>[8-9]</sup>。前期研究表明,鸭疫里默氏杆菌编码多种铁离子转运系统<sup>[10]</sup>,序列分析表明,在鸭疫里默氏杆菌 CH-1 中 *B739\_RS03695* 被注释为一种铁硫结合蛋白,但其具体功能未知。本研究旨在对 *B739\_RS03695* 基因在铁硫簇装配、抗氧化应激及耐药中的功能进行鉴定。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

菌株 RA CH-1 由本实验室保存; RA CH-1Δ*B739\_RS03695* 由本研究构建;质粒 pOBS 由本实验室保存。限制性内切酶 *Xho* I 和 *Spe* I, New England Biolabs 公司; DNA 纯化回收试剂盒和质粒小提试剂盒,北京天根生化科技有限公司; SYBR Green I 嵌合荧光法专用试剂,南京诺唯赞生物科技有限公司;培养基,北京索

莱宝科技有限公司。超净工作台,苏州净化有限公司;微量移液枪,赛默飞世尔科技有限公司;恒温空气摇床,上海智城分析仪器制造有限公司。

### 1.2 引物设计与合成

研究使用的基因序列来自 NCBI 数据库,引物序列由北京擎科生物科技有限公司合成,见表 1。

### 1.3 菌株 RA CH-1Δ*B739\_RS03695* 的构建

利用自杀质粒 pOBS 构建 *B739\_RS03695* 基因“无痕”缺失株<sup>[11]</sup>。具体步骤:从 RA CH-1 株基因组扩增 *B739\_RS03695* 基因的上、下游同源臂(上游 1 377 bp,下游 1 051 bp),通过融合 PCR 的方法得到融合片段 *B739\_RS03695 up-down*, PCR 反应体系和条件见表 2。随后将融合片段克隆至自杀质粒 pOBS 上,将构建成功的重组质粒命名为 pOBS::*B739\_RS03695 up-down*。将重组质粒 pOBS::*B739\_RS03695 up-down* 通过接合转移的方式转入 RA CH-1 中,用含有头孢西丁(1 μg/mL)和卡那霉素(50 μg/mL)的血琼脂平板进行筛选。待长出阳性转化子后利用引物 *Cfx* P1/*Cfx* P2 以及 16S rRNA P1/16S rRNA P2 (表 1)进行鉴定,并将鉴定正确的菌株命名为 RA CH-1 pOBS::*B739\_RS03695 up-down*。刮取菌落至 TSB 培养基中,于 37 °C、180 r/min 恒

表 1 本研究所用引物信息

Table 1 Primer information used in this study

Primer name	Primer sequence (5'→3')	Restriction enzyme site (underline)
<i>B739_RS03695 upP1</i>	CCGCTCGAGTTTTAGAGGGATAGAAG	<i>Xho</i> I
<i>B739_RS03695 upP2</i>	GTTATCTTCAAAGATATGATTTTCGCCAAC	
<i>B739_RS03695 downP1</i>	GTTGGCGAAAATCATATCTTTGAAGATAAC	
<i>B739_RS03695 downP2</i>	GGACTAGTCCACCTCATCTAAACTCGC	<i>Spe</i> I
<i>Cfx</i> P1	TTTCATTGTTCCATAAATCAGC	
<i>Cfx</i> P2	TACACCTGTTTTGCATTCTTTT	
CH-1 16S rRNA P1	TACACCTGTTTTGCATTCTTTT	
CH-1 16S rRNA P2	GCAGCACCTTGAAAATTGT	
q <i>B739_RS03695</i> qRTP1	TCAGACCACAGATACAGACC	
q <i>B739_RS03695</i> qRTP2	CACAACCACAAGTTCTAGCA	

表 2 融合 PCR 反应体系及条件

Table 2 The reaction system and procedure of overlap PCR

Reaction components	Volume ( $\mu\text{L}$ )	Reaction procedure
Primer Star Max	25	Pre-denaturation at 98 °C for 30 s; denaturation at 98 °C for 10 s, annealing at 55 °C for 30 s, extension at 72 °C for 1 min, a total of 25 cycles
B739_RS03695 upP1 (10 $\mu\text{mol/L}$ )	2.5	
B739_RS03695 downP2 (10 $\mu\text{mol/L}$ )	2.5	
RO H <sub>2</sub> O	15	
Template: B739_RS03695 up (150 ng/ $\mu\text{L}$ )	2.5	
Template: B739_RS03695 down (150 ng/ $\mu\text{L}$ )	2.5	

温空气摇床中振荡培养至对数生长期( $OD_{600}$  约为 1.0–1.5), 用含有 15%蔗糖的血平板进行反向筛选。待长出阳性转化子后利用引物 Cfx P1/Cfx P2、B739\_RS03695 upP1/B739\_RS03695 downP2 以及 16S rRNA P1/16S rRNA P2 (表 1) 进行 PCR 鉴定, 并将鉴定正确的菌株命名为 RA CH-1 $\Delta$ B739\_RS03695。

#### 1.4 生长曲线的测定

比较 RA CH-1 和 RA CH-1 $\Delta$ B739\_RS03695 菌株分别在 GC broth (GCB) 及 GCB+150  $\mu\text{mol/L}$  2,2-联吡啶(2,2-dipyridyl, Dip) 液体培养基(铁限制性培养基)中的生长情况。具体步骤: 将菌株接种血平板放于 37 °C 培养箱进行复苏, 待长出单克隆后接种于 5 mL GCB 液体培养基中于 37 °C、180 r/min 恒温空气摇床中振荡培养过夜。次日, 重新将菌液分别接种于 20 mL GCB 或 GCB+150  $\mu\text{mol/L}$  Dip 液体培养基中, 起始  $OD_{600}$  调整为 0.1。37 °C 恒温振荡培养, 每隔 2 h 测定一次菌液  $OD_{600}$  值, 共监测 12 h。本试验重复 3 次, 每组所得数据取平均值后以时间为横坐标、菌液  $OD_{600}$  值为纵坐标, 绘制细菌的生长曲线。

#### 1.5 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 敏感性试验

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 敏感性试验方法参照文献[11]进行。具体操作步骤: 将菌株如上复苏于血平板, 待长出单克隆后接种至 5 mL GCB 液体培养基中于 37 °C、180 r/min 恒温空气摇床中振荡培养过夜。次日, 将菌液接种于 10 mL GCB 液体培养

基, 起始  $OD_{600}$  调整为 0.1, 37 °C、180 r/min 振荡培养至生长对数期( $OD_{600}$  约为 1.0–1.5)。7 500 r/min 离心 5 min 收集菌体后, 用 PBS 重悬、洗涤并调整  $OD_{600}$  为 0.5。用 5 mmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 处理 30 min 后, 8 000 r/min 离心 5 min 弃上清, 菌体沉淀经 PBS 洗涤 3 次, 取 100  $\mu\text{L}$  菌悬液经梯度稀释至 10<sup>-5</sup> 和 10<sup>-6</sup> 浓度梯度, 稀释液各取 100  $\mu\text{L}$  涂布于 GCA 平板上用于统计活菌数, 并计算存活率, 试验重复 3 次。计算公式: 存活率(%)=试验组活菌数/对照组活菌数 $\times$ 100。

#### 1.6 最小抑菌浓度(minimum inhibitory concentration, MIC)的测定

根据美国临床和实验室标准协会(Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI)标准<sup>[12]</sup>, 采用肉汤微量稀释法测定庆大霉素、恩诺沙星和氟苯尼考等 14 种常用抗生素对 RA CH-1 和 RA CH-1 $\Delta$ B739\_RS03695 菌株的最小抑菌浓度(MIC)。具体步骤: 将每种抗生素配成 5.12 mg/mL 的储存液, 取 200  $\mu\text{L}$  已配制好的抗生素加到 800  $\mu\text{L}$  的胰蛋白胍大豆肉汤(tryptic soy broth, TSB)培养基中混匀, 然后按照体积比为 1:1 逐级稀释至抗生素终浓度为 0.5  $\mu\text{g/mL}$ 。将菌株接种至 5 mL TSB 液体培养基中, 于 37 °C、180 r/min 恒温空气摇床中振荡培养至生长对数期( $OD_{600}$  约为 1.0–1.5), 测定菌液  $OD_{600}$  值, 以新鲜的 TSB 培养基将其调至  $OD_{600}$  为 0.04, 96 孔板中先加入 100  $\mu\text{L}$  药液后再加入 100  $\mu\text{L}$  菌液, 每孔的

菌液含量约为  $5 \times 10^5$  CFU/mL。培养 18–24 h 后观察每孔的浑浊情况, 将抑制细菌生长的最小浓度判定为该药物 MIC 值, 试验重复 3 次。

### 1.7 庆大霉素杀菌性试验

分别测定庆大霉素对亲本株 RA CH-1 和缺失株 RA CH-1 $\Delta$ B739\_RS03695 的杀菌效果。具体步骤: 将菌株如上复苏于血平板并培养过夜, 待长出单克隆后, 接种至 5 mL GCB 液体培养基中, 于 37 °C、180 r/min 培养过夜。次日, 将菌液接种于 GCB 液体培养基, 起始  $OD_{600}$  为 0.2, 分为 2 组: (1) 试验组: RA CH-1+200  $\mu$ g/mL 庆大霉素、RA CH-1 $\Delta$ B739\_RS03695+200  $\mu$ g/mL 庆大霉素; (2) 对照组: RA CH-1、RA CH-1 $\Delta$ B739\_RS03695; 各吸取 100  $\mu$ L 菌液 8 000 r/min 离心 5 min 弃上清, 用 1 mL PBS 重悬菌体, 梯度稀释至  $10^{-5}$  和  $10^{-6}$  浓度梯度后涂板计数, 该时间点记为 T0。37 °C、180 r/min 振荡培养 6 h, 每隔 2 h 吸取 100  $\mu$ L 菌液 8 000 r/min 离心 5 min 弃上清后, 用 1 mL PBS 将菌体重悬, 梯度稀释至  $10^{-5}$  和  $10^{-6}$  浓度梯度后涂板计数。分别计算 T0、T2、T4 和 T6 时间点每毫升中活菌数(CFU/mL)。试验重复 3 次。存活率(%)=Tx 活菌数/T0 活菌数 $\times$ 100, 绘制曲线图。

### 1.8 荧光定量 PCR

将菌株 RA CH-1 接种于血平板后于 37 °C 恒温培养箱培养 12–16 h, 挑取单克隆于 GCB 液体培养基中于 37 °C、180 r/min 恒温空气摇床中振荡培养过夜。次日, 将菌液分别接种于 20 mL GCB、GCB+150  $\mu$ mol/L Dip、GCB+20 mmol/L  $H_2O_2$  液体培养基于 37 °C、180 r/min 振荡培养至对数生长期( $OD_{600}$  约为 1.0–1.5), 调整  $OD_{600}$  为 0.5, 菌液 8 000 r/min 离心 5 min 后收集菌体。利用细菌总 RNA 提取试剂盒提取总 RNA, 用反转录试剂盒将 1  $\mu$ g RNA 反转录为 cDNA 样

品。用上述 cDNA 为模板, 按照 SYBR Green I 嵌合荧光法专用试剂的反应体系及条件进行荧光定量 PCR, 得到各样品目标基因的  $C_t$  值, 运用  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  法计算 B739\_RS03695 基因在不同条件下的相对表达水平, 编码 16S rRNA 的基因作为内参基因<sup>[13]</sup>。

### 1.9 试验数据处理

所有试验数据采用软件 GraphPad Prism 8 进行统计学分析, 通过  $t$  检验确定数据的统计学显著性(\*代表  $P < 0.05$ , \*\*代表  $P < 0.01$ , \*\*\*代表  $P < 0.001$ , \*\*\*\*代表  $P < 0.0001$ )。

## 2 结果与分析

### 2.1 RA CH-1 $\Delta$ B739\_RS03695 的构建

序列分析表明, 鸭疫里默氏杆菌 CH-1 株 B739\_RS03695 基因编码铁硫结合蛋白, 与大肠杆菌 IscA 的相似性为 40.91%。为了研究该基因编码蛋白的功能, 本研究构建了 B739\_RS03695 基因缺失株。将重组质粒 pOBS::B739\_RS03695 *up-down* 以接合转移的方式转入 RA CH-1 后, 用含头孢西丁和卡那霉素的抗性平板筛选阳性转化子, 并通过 PCR 进行鉴定。结果如图 1A 所示, 从阳性转化子能够扩增出 *Cfx* 和 16S rRNA 基因, 说明菌株 RA CH-1 pOBS::B739\_RS03695 *up-down* 构建成功。将上一步获得的菌株培养至对数生长期后, 在含 15% 的蔗糖血琼脂平板上进行反向筛选, 对长出的阳性转化子进行 PCR 鉴定。结果如图 1B 所示, 通过 PCR 能扩增出 B739\_RS03695 *up-down* 片段, 而不能扩增出 *Cfx* 基因, 说明 RA CH-1 $\Delta$ B739\_RS03695 无痕缺失株构建成功。荧光定量 PCR 检测 B739\_RS03695 上、下游基因的表达量, 结果表明, 与亲本株相比, B739\_RS03695 缺失株上、下游基因无显著改变, 即未产生“极效应”。

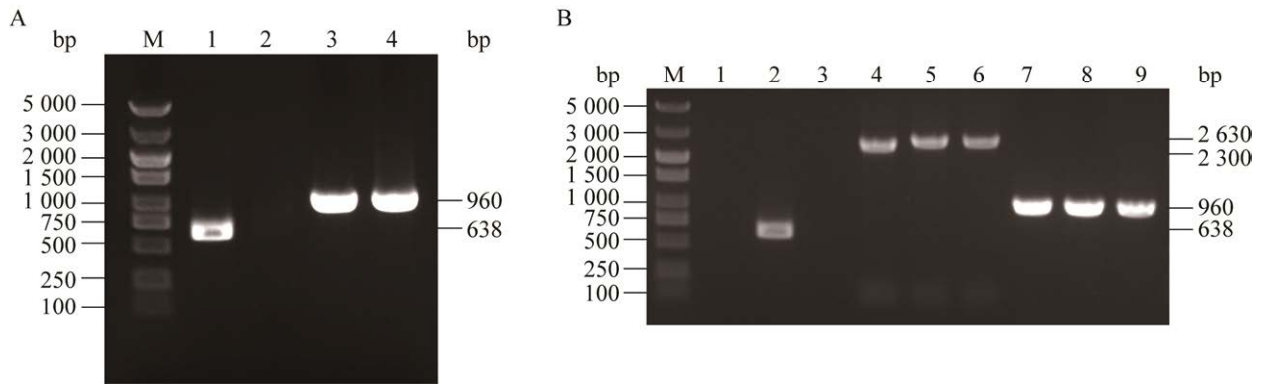


图 1 PCR 鉴定 *B739\_RS03695* 基因缺失株凝胶电泳图

Figure 1 The gel electrophoresis of *B739\_RS03695* gene deletion strain identified by PCR. A: M: DNA marker; 1 and 3: *Cfx*, 16S rRNA fragments were amplified from RA CH-1 pOBS::*B739\_RS03695 up-down*; 2 and 4: *Cfx*, 16S rRNA fragments were amplified from RA CH-1. B: M: DNA Marker; 1, 4, and 7: *Cfx*, *B739\_RS03695 up-down*, 16S rRNA fragments were amplified from RA CH-1Δ*B739\_RS03695*; 2, 5, and 8: *Cfx*, *B739\_RS03695 up-down*, 16S rRNA fragments were amplified from RA CH-1 pOBS::*B739\_RS03695 up-down*; 3, 6, and 9: *Cfx*, *B739\_RS03695 up-down*, 16S rRNA fragments were amplified from RA CH-1.

## 2.2 *B739\_RS03695* 基因缺失后损害 RA CH-1 在铁限制培养基中的生长

*B739\_RS03695* 基因编码一种铁硫结合蛋白, 而铁离子对于鸭疫里氏杆菌的生长极其重要。为探究 *B739\_RS03695* 基因是否有利于 RA CH-1 抵抗铁限制性环境, 分别在富铁和限铁培养基中测定亲本株和 *B739\_RS03695* 基因缺失株的生长情况。结果如图 2 所示, 在 GCB 培养基中, 缺失株与亲本株相比并无明显的生长差异。然而在 GCB 加入 150 μmol/L Dip 成为铁限制性环境后, RA CH-1Δ*B739\_RS03695* 的生长受到明显抑制。此结果说明, *B739\_RS03695* 基因缺失后损害了 RA CH-1 在铁限制性培养基中的生长。

## 2.3 *B739\_RS03695* 基因参与鸭疫里氏杆菌 CH-1 株对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的抵抗

为了检测 *B739\_RS03695* 基因是否参与鸭疫里氏杆菌 CH-1 株的抗氧化应激反应能力, 研究比较了 RA CH-1 和 RA CH-1Δ*B739\_RS03695* 在 5 mmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 中的存活率。结果如图 3 所

示, RA CH-1 的存活率为 72.8%±7.5%, RA CH-1Δ*B739\_RS03695* 的存活率为 33.0%±3.4%。与 RA CH-1 相比, RA CH-1Δ*B739\_RS03695* 在 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 压力下存活率明显降低。此结果说明,

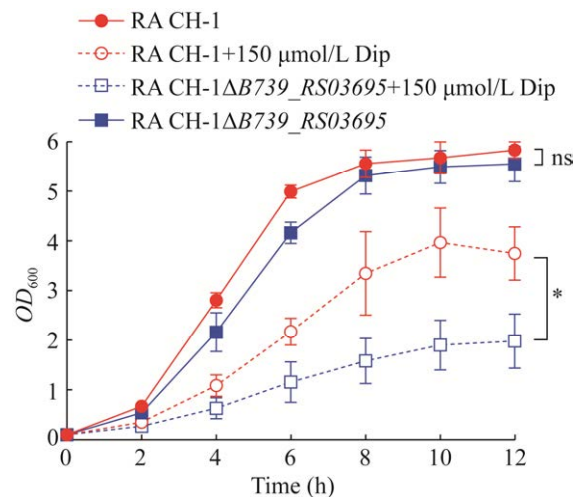


图 2 RA CH-1、RA CH-1Δ*B739\_RS03695* 在 GCB 及 GCB 含 Dip 液体培养基中的生长曲线

Figure 2 Growth curve of RA CH-1, RA CH-1Δ*B739\_RS03695* in GCB and GCB containing Dip. ns: No significant difference; \*\*:  $P < 0.01$ . The same below.

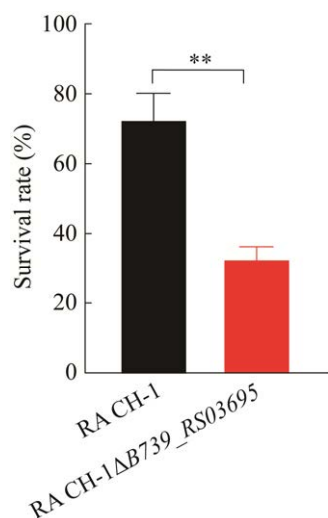


图3 RA CH-1、RA CH-1ΔB739\_RS03695 经 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 处理后的存活率

Figure 3 Survival rate of RA CH-1 and RA CH-1ΔB739\_RS03695 after H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment.

B739\_RS03695 基因有助于鸭疫里默氏杆菌 CH-1 抵抗氧化应激损伤。

#### 2.4 多种抗生素对 RA CH-1ΔB739\_RS03695 与亲本株的 MIC 无明显差异

为探究 B739\_RS03695 基因在耐药中的功能, 采用微量肉汤稀释法测定了庆大霉素、恩诺沙星和氟苯尼考等 14 种常用抗生素对 RA CH-1 和 RA CH-1ΔB739\_RS03695 的 MIC。结果如表 3 所示, 14 种抗生素对 RA CH-1ΔB739\_RS03695 和 RA CH-1 的 MIC 无明显差异。

#### 2.5 RA CH-1ΔB739\_RS03695 对庆大霉素的抵抗力增强

细菌呼吸产生的质子动力对庆大霉素的摄取至关重要, B739\_RS03695 缺失后会影 响铁硫簇的装配, 继而影响到细菌的呼吸。为进一步探究 B739\_RS03695 基因是否会影响庆大霉素的杀菌效果, 本研究测定了庆大霉素在 2、4 和 6 h 这 3 个时间点对 RA CH-1 和 RA CH-1ΔB739\_RS03695 的杀菌率。结果如图 4 所示, 当培养基中不加庆大霉素时, 在 2–6 h 中, RA CH-1 和 RA

表 3 不同抗生素对 RA CH-1 和 RA CH-1ΔB739\_RS03695 的 MIC

Table 3 MIC of different antibiotics to RA CH-1 and RA CH-1ΔB739\_RS03695

Antibiotics	RA CH-1 (μg/mL)	RA CH-1ΔB739_RS03695 (μg/mL)
Tetracycline	4	4
Erythromycin	32	64
Gentamicin	16	16
Lincomycin	>512	>512
Clindamycin	512	512
Enrofloxacin	1	1
Doxitard	1	1
Tigecycline	1	1
Trimethoprim	32	64
Ampicillin	<0.25	<0.25
Streptomycin	16	16
Polymyxin B	1 024	512
Oxacillin	2	1
Florfenicol	0.5	0.5

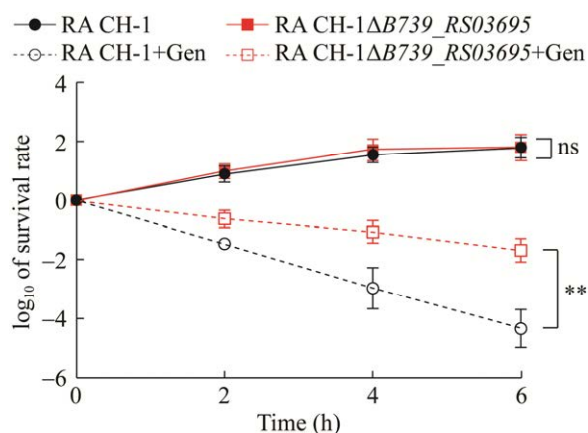


图 4 庆大霉素对 RA-CH-1、RA-CH-1ΔB739\_RS03695 的杀菌效果

Figure 4 The killing effect of gentamicin to RA-CH-1 and RA-CH-1ΔB739\_RS03695.

CH-1ΔB739\_RS03695 存活率均呈上升趋势, 且无明显差异; 当向培养基中加入 200 μg/mL 庆大霉素后, 随着时间的延长, RA CH-1 和 RA CH-1ΔB739\_RS03695 存活率都逐渐下降, 但 RA CH-1ΔB739\_RS03695 在每个时间点的存活

率都高于 RA CH-1, 并且时间越久, 两者存活率相差越大。此结果说明缺失 *B739\_RS03695* 基因后会导致 RA CH-1 对庆大霉素的敏感性降低, *B739\_RS03695* 基因促进了庆大霉素对 RA CH-1 的杀灭作用。

### 2.6 *B739\_RS03695* 基因在铁限制性环境和氧化应激条件下转录上调

当 *B739\_RS03695* 基因缺失后, RA CH-1 菌株在铁限制条件下生长受到明显抑制, 且抵抗氧化应激损伤的能力下降。因此, 本研究测定了亲本株在铁限制条件下和  $H_2O_2$  刺激后 *B739\_RS03695* 基因的转录水平。结果如图 5 所示, 当 RA CH-1 分别经 Dip 和  $H_2O_2$  处理后, *B739\_RS03695* 基因的转录水平均显著上调。其中, 在铁限制性环境下, *B739\_RS03695* 基因上调大约 4.5 倍, 在经  $H_2O_2$  刺激后, *B739\_RS03695* 基因上调大约 2 倍。此结果表明铁限制环境和  $H_2O_2$  都会影响 *B739\_RS03695* 基因的转录, 且转录水平明显上调。

## 3 讨论与结论

铁硫蛋白参与了各种生命活动, 如电子传递、DNA 合成和修复和氮的合成等<sup>[14]</sup>。在大肠杆菌中可合成 150 个左右的铁硫蛋白, 其成熟依赖于 ISC 或 SUF 机制<sup>[15]</sup>。IscA 和 SufA 是大肠杆菌中铁硫簇组装系统中的成员, 主要负责招募细胞内的铁并为铁硫簇的生物发生提供铁<sup>[16]</sup>。然而在鸭疫里氏杆菌中, 对于铁硫簇的组装等机制研究较少。通过序列比对发现, 在鸭疫里氏杆菌 CH-1 中, *B739\_RS03695* 基因注释为一种铁硫结合蛋白, 与大肠杆菌 IscA 的相似性为 40.91%, 但其功能尚未被鉴定。

为鉴定其功能, 本研究首先在 RA CH-1 株构建了 *B739\_RS03695* 基因的缺失株, 然后比较了与亲本株在 GCB 和 GCB+150  $\mu\text{mol/L}$  Dip 液体培养基中的生长情况。结果表明, 在 GCB 培养条件下, *B739\_RS03695* 基因缺失株与亲本株相比生长情况并无明显差异, 说明在铁充足

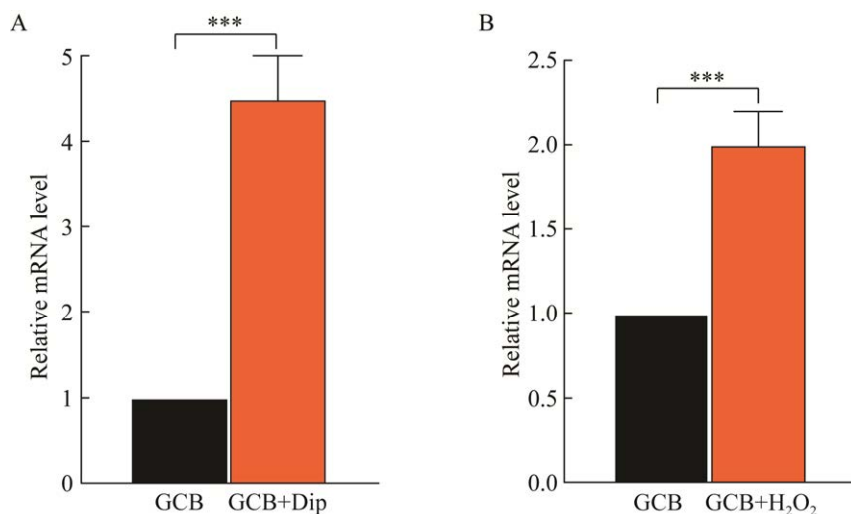


图 5 *B739\_RS03695* 在不同条件下相对转录水平

Figure 5 Relative transcription levels of *B739\_RS03695* gene under different conditions. A: Relative transcription level of *B739\_RS03695* gene in RA CH-1 after treating with 150  $\mu\text{mol/L}$  Dip. B: Relative transcription level of *B739\_RS03695* gene in RA CH-1 after treating with 20 mmol/L  $H_2O_2$ . \*\*\*:  $P < 0.001$ .



条件下 *B739\_RS03695* 对于 RA CH-1 的生长并不是必需的。然而在培养基中加入 150  $\mu\text{mol/L}$  Dip 成为铁限制性环境后, 缺失株的生长受到明显抑制, 说明 *B739\_RS03695* 在铁限制性条件下发挥了重要作用。为进一步研究 *B739\_RS03695* 是否受铁离子的调控, 本研究进一步鉴定了 *B739\_RS03695* 在不同铁离子环境的相对表达量。结果表明, 在限铁条件下 *B739\_RS03695* 基因上调约 4.5 倍。综合以上结果说明 *B739\_RS03695* 基因有利于 RA CH-1 抵抗铁饥饿环境。

细菌铁离子代谢与氧化应激反应密切相关。胞内过多的铁离子会通过芬顿反应对细菌蛋白质和 DNA 等大分子物质造成氧化应激损伤<sup>[17]</sup>。另外, 细菌的一些抵抗氧化应激的酶需要铁离子作为辅基<sup>[18]</sup>。因此, 本研究探究了 *B739\_RS03695* 基因是否参与对  $\text{H}_2\text{O}_2$  的抵抗。结果表明, 与亲本株相比, RA CH-1 $\Delta$ *B739\_RS03695* 在  $\text{H}_2\text{O}_2$  压力下的存活率明显降低。同理, 为进一步研究 *B739\_RS03695* 与  $\text{H}_2\text{O}_2$  刺激的相关性, 本研究测定了 *B739\_RS03695* 在  $\text{H}_2\text{O}_2$  刺激下的相对转录水平。结果表明, 与未处理组相比, *B739\_RS03695* 基因的转录水平在  $\text{H}_2\text{O}_2$  刺激后上调约 2 倍。综合以上结果说明 *B739\_RS03695* 基因参与抵抗氧化应激损伤。

研究表明, 铁硫簇在生物体中最重要的功能之一是参与电子传递, 在细菌的呼吸复合物 I 中含有 9 个铁硫簇, 呼吸复合物 II 中含有 3 个铁硫簇<sup>[19]</sup>, 而氨基糖苷类抗生素进入细菌需要细菌呼吸所产生的能量。*B739\_RS03695* 基因参与铁硫簇的组装, *B739\_RS03695* 缺失后会导致鸭疫里默氏杆菌的呼吸能力受损。因此, 本研究测定了庆大霉素对 *B739\_RS03695* 基因缺失株的杀灭效果。结果显示, 与 RA CH-1 相比, RA CH-1 $\Delta$ *B739\_RS03695* 对庆大霉素更为抵抗。其

原因可能是缺失 *B739\_RS03695* 基因后铁硫簇的装配受到影响, 从而减慢了细胞的呼吸代谢, 不能为庆大霉素发挥作用提供足够的能量, 因此 *B739\_RS03695* 缺失株表现出对庆大霉素更强的抵抗作用。

本研究初步鉴定了鸭疫里默氏杆菌中编码铁硫结合蛋白 *B739\_RS03695* 基因的功能, 当该基因缺失后会导致 RA CH-1 在铁限制性环境的生长受到抑制, 该基因参与抵抗氧化应激反应并促进庆大霉素对鸭疫里默氏杆菌的杀灭作用。

## REFERENCES

- [1] TONG TY, ZHOU YJ, FEI F, ZHOU XJ, GUO Z, WANG S, ZHANG J, ZHANG P, CAI TT, LI GH, ZHANG YB, WANG JF, XIE C. The rational design of iron-sulfur cluster binding site for prolonged stability in magnetoreceptor MagR[J]. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 2022, 9: 1051943.
- [2] DING BJ, SMITH ES, DING HG. Mobilization of the iron centre in *IscA* for the iron-sulphur cluster assembly in *IscU*[J]. *The Biochemical Journal*, 2005, 389(Pt 3): 797-802.
- [3] TSAOUSIS AD, GENTEKAKI E, EME L, GASTON D, ROGER AJ. Evolution of the cytosolic iron-sulfur cluster assembly machinery in *Blastocystis* species and other microbial eukaryotes[J]. *Eukaryotic Cell*, 2014, 13(1): 143-153.
- [4] COUTURIER J, PRZYBYLA-TOSCANO J, RORET T, DIDIERJEAN C, ROUHIER N. The roles of glutaredoxins ligating Fe-S clusters: sensing, transfer or repair functions?[J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2015, 1853(6): 1513-1527.
- [5] ROUAULT TA. Biogenesis of iron-sulfur clusters in mammalian cells: new insights and relevance to human disease[J]. *Disease Models & Mechanisms*, 2012, 5(2): 155-164.
- [6] TOKUMOTO U, KITAMURA S, FUKUYAMA K, TAKAHASHI Y. Interchangeability and distinct properties of bacterial Fe-S cluster assembly systems: functional replacement of the *iscA* and *suf* operons in *Escherichia coli* with the *nifSU*-like operon from *Helicobacter pylori*[J]. *The Journal of Biochemistry*, 2004, 136(2): 199-209.

- [7] BLANC B, GEREZ C, OLLAGNIER de CHOUDENS S. Assembly of Fe/S proteins in bacterial systems: biochemistry of the bacterial ISC system[J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2015, 1853(6): 1436-1447.
- [8] 刘马峰, 田琇, 程安春. 鸭疫里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. 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).
- [9] 杨宇豪, 程安春, 刘马峰. 鸭疫里氏杆菌铁离子代谢机制研究进展[J]. *微生物学通报*, 2022, 49(12): 5359-5366. YANG YH, CHENG AC, LIU MF. Research advances on the iron metabolism of *Riemerella anatipestifer*[J]. *Microbiology China*, 2022, 49(12): 5359-5366 (in Chinese).
- [10] 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.
- [11] TIAN X, HUANG L, WANG MS, FRANCIS B, 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.
- [12] HUMPHRIES R, BOBENCHIK AM, HINDLER JA, SCHUETZ AN. Overview of changes to the Clinical and Laboratory Standards Institute *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing*, M100, 31st edition[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2021, 59(12): e0021321.
- [13] ZHANG L, HUANG L, HUANG M, WANG MY, ZHU DK, WANG MS, JIA RY, CHEN S, ZHAO XX, YANG Q, WU Y, ZHANG SQ, HUANG J, OU XM, MAO S, GAO Q, TIAN B, CHENG AC, LIU MF. Effect of nutritional determinants and TonB on the natural transformation of *Riemerella anatipestifer*[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2021, 12: 644868.
- [14] SROUR B, GERVASO S, HOOCK MH, MONFORT B, WANT K, LARKEM D, TRABELSI N, LANDROT G, ZITOLO A, FONDA E, ETIENNE E, GERBAUD G, MÜLLER CS, OLTMANN J, GORDON JB, YADAV V, KLECZEWSKA M, JELEN M, TOLEDANO MB, DUTKIEWICZ R, et al. Iron insertion at the assembly site of the ISCU scaffold protein is a conserved process initiating Fe-S cluster biosynthesis[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2022, 144(38): 17496-17515.
- [15] GERSTEL A, ZAMARREÑO BEAS J, DUVERGER Y, BOUVERET E, BARRAS F, PY B. Oxidative stress antagonizes fluoroquinolone drug sensitivity via the SoxR-SUF Fe-S cluster homeostatic axis[J]. *PLoS Genetics*, 2020, 16(11): e1009198.
- [16] WANG W, HUANG H, TAN GQ, SI F, LIU M, LANDRY AP, LU JX, DING HG. *In vivo* evidence for the iron-binding activity of an iron-sulfur cluster assembly protein IscA in *Escherichia coli*[J]. *The Biochemical Journal*, 2010, 432(3): 429-436.
- [17] 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).
- [18] 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): 1-14.
- [19] 杜璟, 李艳纯, 任雪营, 谭国强, 吕建新. 真核细胞中铁硫簇的组装机制及相关铁硫蛋白疾病[J]. *中国细胞生物学学报*, 2015, 37(9): 1323-1333. DU J, LI YC, REN XY, TAN GQ, LÜ JX. Mechanisms of iron-sulfur clusters assemble in eukaryotes and related diseases[J]. *Chinese Journal of Cell Biology*, 2015, 37(9): 1323-1333 (in Chinese).