

# 铜绿假单胞菌铁摄取调节子 Fur 诱导表达突变株构建及表型分析

王志鹏<sup>1,2</sup>, 于海英<sup>1</sup>, 马旅雁<sup>1,2</sup>

1 中国科学院微生物研究所 微生物资源前期开发国家重点实验室, 北京 100101

2 中国科学院大学, 北京 100049

王志鹏, 于海英, 马旅雁. 铜绿假单胞菌铁摄取调节子 Fur 诱导表达突变株构建及表型分析. 生物工程学报, 2021, 37(9): 3253-3267.

Wang ZP, Yu HY, Ma LY. Construction and phenotypic study of *Pseudomonas aeruginosa* inducibly expressing a ferric uptake regulator. Chin J Biotech, 2021, 37(9): 3253-3267.

**摘要:** 铁摄取调节子 (Ferric uptake regulator, Fur) 是细菌控制细胞内铁平衡的一类重要的调节子。铜绿假单胞菌 *Pseudomonas aeruginosa* 的 *fur* 为必需基因, 不能直接敲除。文中通过构建诱导型缺失突变株  $\Delta fur/attB::P_{BAD}-fur$ , 来研究该基因对铜绿假单胞菌的生长、生物被膜形成、运动能力和抗氧应激能力等方面的影响。结果表明, 当 Fur 低表达时, 铜绿假单胞菌在高铁和高铁环境中出现了生长阻滞的现象; 低表达 Fur 的铜绿假单胞菌抵抗  $H_2O_2$  的能力降低, 形成生物被膜的能力减弱, 游动、颤动 (Twitching) 和丛集 (Swarming) 运动能力也出现了减弱的现象。Fur 的表达直接影响铜绿假单胞菌荧光嗜铁素的产量。在铜绿假单胞菌体内表达来自格瑞菲斯瓦尔德磁螺菌 Fur 超级家族中的蛋白, 可以部分恢复铜绿假单胞菌荧光嗜铁素的产量。由此说明, Fur 对铜绿假单胞菌的生长、生物被膜形成、抗氧应激能力和运动能力方面都起着至关重要的作用。本研究为铜绿假单胞菌的防治提供理论指导。

**关键词:** 铜绿假单胞菌, 铁摄取调节子, 荧光嗜铁素, 生物被膜, 运动性

## Construction and phenotypic study of *Pseudomonas aeruginosa* inducibly expressing a ferric uptake regulator

Zhipeng Wang<sup>1,2</sup>, Haiying Yu<sup>1</sup>, and Lüyan Ma<sup>1,2</sup>

1 State Key Laboratory of Microbial Resources, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

2 University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

**Abstract:** Members of the ferric uptake regulator (Fur) protein family are bacterial transcriptional repressors that control iron uptake and storage in response to iron availability, thereby playing a crucial role in the maintenance of iron homeostasis.

**Received:** December 1, 2020; **Accepted:** March 1, 2021

**Supported by:** National Natural Science Foundation of China (No. 91951204).

**Corresponding author:** Lüyan Ma. Tel: +86-10-64807437; E-mail: luyanma27@im.ac.cn

国家自然科学基金 (No. 91951204) 资助。

网络出版时间: 2021-03-16

网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1998.q.20210315.1404.001.html>

The *fur* null mutants of *Pseudomonas aeruginosa* could not be obtained because *fur* is an essential gene. In this study, We constructed a Fur inducibly expression strain  $\Delta fur/attB::P_{BAD}-fur$  in order to study the effect of *fur* on the growth, biofilm formation, motilities and oxidative stress response of *P. aeruginosa*. The results showed that a low level of *fur* expression retarded the growth of *P. aeruginosa* at an iron-depleted condition, or under high concentration of iron, or in the presence of  $H_2O_2$ . Fur affected the biofilm formation and the motilities (swimming, twitching, and swarming) of strain PAO1. The production of pyoverdine is regulated by Fur. Interestingly, proteins from *Magnetospirillum gryphiswaldense* MSR-1, which shares homology with Fur, can partially recover the pyoverdine production of strain  $\Delta fur/attB::P_{BAD}-fur$ . This study provides new clues for the prevention and treatment of *P. aeruginosa* infections.

**Keywords:** *Pseudomonas aeruginosa*, ferric uptake regulator (Fur), pyoverdine, biofilm, motility

铁对于微生物的生长发育和生理代谢是必不可缺少的。生物体内的很多酶催化反应都需要铁离子的参与。铁通常存在于具有[Fe-S]簇的蛋白质和血红蛋白中,参与包括呼吸和三羧酸循环在内的多种代谢过程。对于病原微生物来说,面临着铁摄取和细胞内的铁平衡两道难题。宿主通过将铁隔离在细胞内的蛋白质(如血红蛋白、细胞色素或铁蛋白)中,或通过将细胞外  $Fe^{3+}$ 与糖蛋白、转铁蛋白和乳铁蛋白螯合而主动限制铁的流动性,从而增加了病原菌摄取铁的难度<sup>[1]</sup>。同时,胞内过量  $Fe^{2+}$ 会引发芬顿反应(Fenton/Haber-Weiss),产生有害的活性氧(Reactive oxygen species, ROS),如超氧物( $O_2^-$ )、过氧化氢( $H_2O_2$ )和高破坏性羟基自由基等。这些 ROS 可导致[Fe-S]簇的损伤、蛋白质羰基化、Cys/Met 残基氧化、膜脂过氧化以及 DNA 损伤等<sup>[2-3]</sup>。所以,细菌胞内铁浓度受到非常精细而严格的调控。铁摄取调节子(Ferric uptake regulator, Fur)是细菌铁离子代谢中最重要的调节子,是革兰氏阴性菌中的一种保守蛋白。细菌胞内的铁浓度受到 Fur 的严格调控。Fur 通过抑制或者激活基因的转录,来调节与铁摄取、利用和储存相关的基因,维持胞内铁离子浓度动态平衡<sup>[4]</sup>。此外, Fur 还参与细菌的氧化应激、抗酸能力、毒力和能量代谢等多种生物过程的调节。Fur 蛋白最常见的调节机制是以金属辅助因子  $Fe^{2+}$ 作为共阻遏物,以二聚体形式特异结合靶基因启动子 A/T 丰富的回文序列(Fur box)区域,从而阻碍了 RNA 聚合酶的结合,导致基因的转录抑制<sup>[5]</sup>。多数的细菌只有一个 Fur 蛋白,但

格瑞菲斯瓦尔德磁螺菌 *Magnetospirillum gryphiswaldense* MSR-1 基因组中却发现了有 5 个 Fur 的同源蛋白,分别为 IrrA (MGMSRv2\_1721)、IrrB (MGMSRv2\_3149)、IrrC (MGMSRv2\_3660)、Fur (MGMSRv2\_3137) 和 Zur (MGMSRv2\_2136)。来自铜绿假单胞菌的 Fur (pFur)与磁螺菌中上述 Fur 同源蛋白只有 30%–40%的氨基酸序列一致性<sup>[6]</sup>。有趣的是,体外实验证明,磁螺菌的 Fur (本文中称为 mFur)可以与铜绿假单胞菌的 Fur box 结合,是否可以在铜绿假单胞菌体内发挥作用还未知<sup>[7]</sup>。

铜绿假单胞菌是条件致病菌,易感染免疫力较弱的人,是医院内感染的主要细菌,也是耐药较为严重的细菌之一。该细菌是导致囊性纤维化病人气道炎症、肺损伤和死亡的主要原因<sup>[8]</sup>。该菌极易形成生物被膜(Biofilm),导致其相关感染难以根除<sup>[9]</sup>。转录组分析结果表明,铜绿假单胞菌的许多基因受到 Fur 调控<sup>[10]</sup>。Fur 可以直接或间接地控制许多与铁摄取有关的基因和毒力基因的转录,如荧光嗜铁素(Pyoverdine)、外毒素 A 和胞外蛋白酶 PrpL 等<sup>[11]</sup>。铜绿假单胞菌的 Fur 还控制两个小 RNA 的转录, PrrF1 和 PrrF2,它们可以调节与氧化应激反应有关的多个基因的转录后修饰,来应对氧化应激和铁储存带来的压力<sup>[12]</sup>。已有的研究提示 Fur 是铜绿假单胞菌获取外界的铁过程中的一个关键调节子。*fur* 在铜绿假单胞菌中是一个必需基因,所以无法获得该基因的缺失突变株,以往对 Fur 的研究基本利用的是点突变的方法来阐明相关的作用原理和机制<sup>[13]</sup>。本研究

拟构建可诱导表达的突变株  $\Delta fur/attB::P_{BAD}\text{-}fur$ , 为进一步研究 Fur 的功能及其在铜绿假单胞菌环境适应中的作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

#### 1.1.1 菌株与质粒

本实验中所用菌株和质粒如表 1。所用的 pSW196、pEX18Gm 与 pUCP20 质粒均为本实验室保存。

#### 1.1.2 培养基及培养条件

实验所用培养基配方如下:

LB 培养基 (1 L): 胰蛋白胨 10 g, 酵母提取物 5 g, NaCl 10 g;

Jensen's 培养基 (1 L): NaCl 5 g,  $K_2HPO_4$  3.286 g, 谷氨酸 15.56 g, 缬氨酸 2.81 g, 苯丙氨酸

1.32 g; 葡萄糖 277.4 g,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.33 g,  $CaCl_2$  0.021 g,  $FeSO_4$  0.001 g,  $ZnSO_4$  0.002 g;

LBNS 培养基 (1 L): 胰蛋白胨 10 g, 酵母提取物 5 g;

Swimming 培养基: 在 Jensen's 培养基成分中加入琼脂粉 0.3% (W/V);

Twitching 培养基: 在 Jensen's 培养基成分中加入琼脂粉 1.0% (W/V);

Swarming 培养基: Nutrient Broth (Oxoid, CM1168B) 8 g, 葡萄糖 5 g, 琼脂粉 0.5% (W/V)。

铜绿假单胞菌的菌液在 37 °C 培养于 Jensen's 培养基中, 生物被膜在 30 °C 静置培养于 Jensen's 培养基。

大肠杆菌抗生素使用终浓度: 氨苄青霉素 (Ap) 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 四环素 (Tc) 12.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 庆大霉素 (Gm) 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 三氯生 (Irg) 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

表 1 本实验所用菌株和质粒

Table 1 Strains and plasmids used in this study

Strains and plasmids	Characteristics	Sources or references
<b>Strains</b>		
<i>P. aeruginosa</i> PAO1	Wild-type strain	[14]
$\Delta fur/P_{BAD}\text{-}fur$	<i>fur</i> in frame deletion with <i>araC-P_{BAD}\text{-}fur</i> inserted at attB site of PAO1 chromosome	This study
Other strains		
<i>Escherichia coli</i> DH5 $\alpha$	F <sup>-</sup> , $\phi$ 80 <i>dlacZ</i> $\Delta$ M15, $\Delta$ ( <i>lacZYA -argF</i> )U169, <i>deoR</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> (rK <sup>-</sup> , mK <sup>+</sup> ), <i>phoA</i>	TaKaRa Bio(Beijing)
<i>Escherichia coli</i> S17-1 $\lambda$ pir	<i>thi pro hsdR hsdM<sup>+</sup> recA RP4-2-Tc::Mu-Km::Tn7</i> $\lambda$ pir, Gm <sup>r</sup>	[15]
<i>Magnetospirillum gryphiswaldense</i> MSR-1	Wild-type strain	[16]
<b>Plasmids</b>		
pSW196	mini-CTX <i>lacZ</i> with $P_{BAD}$ promoter	[17]
pFLP2	FLP recombinase expressing plasmid, Ap <sup>r</sup>	[18]
pEX18Gm	Allelic exchange and suicide cloning vector, Gm <sup>r</sup>	[19]
pEX18Gm- <i>fur</i>	pEX18Gm derived plasmid for <i>fur</i> in-frame deletion, Gm <sup>r</sup>	This study
pUCP20	<i>E. coli</i> - <i>P. aeruginosa</i> shuttle plasmid, ori 160 0 $P_{lac}$ , Ap <sup>r</sup>	[20]
pUCP20-IrrA	IrrA form MSR-1 expressed in pUCP20, Ap <sup>r</sup>	This study
pUCP20-IrrB	IrrB form MSR-1 expressed in pUCP20, Ap <sup>r</sup>	This study
pUCP20-IrrC	IrrC form MSR-1 expressed in pUCP20, Ap <sup>r</sup>	This study
pUCP20-mFur	Fur form MSR-1 expressed in pUCP20, Ap <sup>r</sup>	This study
pUCP20-pFur	Fur form PAO1 expressed in pUCP20, Ap <sup>r</sup>	This study

Ap<sup>r</sup>, Tc<sup>r</sup> and Gm<sup>r</sup> indicate resistance to ampicillin, tetracycline and gentamycin, respectively.

### 1.1.3 主要试剂

分子生物学试剂：快速 DNA 内切酶 (Fermentas); DNA 连接酶(Thermo); 高保真 DNA 聚合酶、DNA marker (TaKaRa); 质粒抽提试剂盒 (TIANGEN)。

## 1.2 实验方法

### 1.2.1 Fur 诱导表达突变株 $\Delta fur/attB::P_{BAD}-fur$ 的构建与验证

铜绿假单胞菌 PAO1 基因组 DNA 的提取及纯化, 质粒 DNA 的提取、PCR 产物回收及纯化、目的基因 PCR 的扩增、PCR 产物及质粒的酶切与连接等均按照相关试剂盒产品说明书进行。

可诱导型菌株的构建: 质粒 pSW196 具有阿拉伯糖诱导的  $P_{BAD}$  启动子, 同时也有质粒

mini-CTX lacZ 将目的基因整合到染色体上特异性 attB 位点的特性。

根据 *Pseudomonas genome database* (www.pseudomonas.com/) 查找到的 *fur* 基因及侧翼序列设计引物 Fur-F、Fur-R, 以菌株 PAO1 基因组为模板, PCR 扩增 *fur* 基因片段, 连接到 pSW196 载体  $P_{BAD}$  启动子之后, 得到重组载体 pSW196-*fur*。

按照质粒 mini-CTX lacZ 相关文献中的实验方法, 并用检测引物(表 2)进行 PCR 验证, 验证质粒整合在铜绿假单胞菌染色体 attB/P 位点<sup>[21]</sup>。敲除 *fur* 基因: 设计两对引物 Fur-up-F/Fur-up-R 和 Fur-down-F/Fur-down-R (表 2), 分别以菌株 PAO1 基因组为模板, 扩增 *fur* 基因的上下游序列。上下游片段经过 T4 DNA 连接酶连接同一载体

表 2 引物序列

Table 2 Primer sequences

Primer name	Sequence (5'-3') <sup>a</sup>	Size (bp)
Fur-F	<b>GGAATTCC</b> ATGGTTGAAAATAGCGAAC	405
Fur-R	CCCCGGGCTACTTCTTCTTGCAC	
attB2	GTCGCCGCCGCGATGC	950
CTX1	CCTCGTCCCAGTTTGTTC	
attB4	CGCCCTATAGTGAGTCG	450
attB5	CGCCCCAACCTCGCTGG	
Fur-up-F	CAGCTATGACCATGATTAC <b>GAATTC</b> GGCTGGGTGACGGTGGTGCT	495
Fur-up-R	ACCAGATTGTGATCGACCAGTTCAACCATGTCTGCTTTCTCAGCG	
Fur-down-F	CGCTGAGAAAGCAGACATGGTTGAACTGGTCGATCACAATCTGG	332
Fur-down-R	ACGACGCCAGTGCCCC <b>GGTCTC</b> ACCGTGACCCACTTG	
Fur-M-F	<b>GAATTC</b> ATGGTTTCGCGTATTGAACAGC	432
Fur-M-R	<b>AAGCTT</b> CTATTTGTCGTCGGAAACACCG	
IrrB-M-F	<b>GAATTC</b> ATGCTTGTCCGCCATCAAGCAC	420
IrrB-M-R	<b>AAGCTT</b> TTACCCGTGCGGCAGACGCCGC	
IrrA-M-F	<b>GAATTC</b> GTGCTGCGTATCGACGAAGCGA	402
IrrA-M-R	<b>AAGCTT</b> TTACGATGCCCGCGCAAGCGG	
IrrC-M-F	<b>GAATTC</b> ATGAGCATGGTAACCGTACGCC	420
IrrC-M-R	<b>AAGCTT</b> TCAACCGTCAACCCTGACTATA	
Zur-M-F	<b>GAATTC</b> ATGAGTTTTCCCCAGCCGACG	465
Zur-M-R	<b>AAGCTT</b> TTCATGGCTTTCCCCCGGCAG	
Fur-P-F	<b>GAATTC</b> ATGGTTGAAAATAGCGAACTTC	405
Fur-P-R	<b>AAGCTT</b> TCTACTTCTTCTTGCACGCTAG	

<sup>a</sup>Bold fonts indicate the recognition sites of the corresponding restriction enzymes.

pEX18Gm, 通过测序验证后得到重组自杀载体 pEX18Gm-*fur*。在前一突变株基础上利用双亲接合的方法筛选二次重组突变体, 并用检测引物 Fur-up-F、Fur-down-R (表 2) 进行 PCR 验证, 最终得到诱导型缺失突变体  $\Delta fur/attB::P_{BAD}\text{-}fur$  菌株。

### 1.2.2 基因表达水平的测定

细菌 RNA 的提取: 取约  $1 \times 10^7$  细菌细胞收集至 15 mL 离心管。然后加 1 mL Trizol, 然后在 4 °C 条件下  $10\ 000 \times g$  离心 10 min。取上清至新的 1.5 mL 离心管, 加入 200  $\mu$ L 氯仿, 剧烈振荡混匀后, 室温静置 5 min。在 4 °C 条件下,  $10\ 000 \times g$  离心 15 min 后, 小心吸取分层后的上清 500  $\mu$ L 转移至新的 1.5 mL 离心管, 加入等体积异丙醇, 剧烈振荡混匀后, 室温静置或 -20 °C 放置 30 min。在 4 °C 条件下  $10\ 000 \times g$  离心 15 min, 小心弃上清后加入 1 mL 75 % 乙醇洗涤。在 4 °C 条件下  $10\ 000 \times g$  离心 5 min, 弃上清, 充分晾干后, 使用 RNase-free  $H_2O$  30–50  $\mu$ L 溶解 RNA。

反转录: 使用全式金 EasyScript<sup>®</sup> First-Strand cDNA Synthesis SuperMix (AE301-02) 来去除 RNA 中的 DNA, 并将 RNA 反转录为 cDNA, 按照说明书进行实验。

RT-qPCR: 使用 LightCycler480 (Roche) 进行, 使用荧光染料 SYBR Green I (Thermo Fisher) 对扩增出来的 DNA 进行染色, 反应体系如表 3。

表 3 qRT-PCR 反应体系

Table 3 qRT-PCR reaction system

Component	Volume ( $\mu$ L)
EvaGreen 2 $\times$ qPCR MasterMix	5.0
Forward primer (10 $\mu$ mol/L)	0.3
Reverse primer (10 $\mu$ mol/L)	0.3
Template DNA	0.5
Nuclease-free $H_2O$	3.9

Note: reference gene is rpsL in strain PAO1.

### 1.2.3 生长曲线的测定

铜绿假单胞菌 PAO1 接种于 5 mL 的 Jensen's 培养液中, 37 °C、200 r/min 培养至稳定生长期; 按 1 : 100 (V/V) 的比例接于 100 mL 的 Jensen's 培

养液中, 37 °C、200 r/min 培养; 培养 7 h 后开始取样, 测定其在 600 nm 处的吸光值 ( $OD_{600}$ ), 每 3 h 取样 1 次, 重复 3 次。

### 1.2.4 铜绿假单胞菌生物被膜形成能力的测定

生物被膜检测平板的制备: 将铜绿假单胞菌 PAO1 接种于 LBNS 平板, 放置于 37 °C 过夜培养。挑取过夜培养平板上的单菌落, 将其接种于 5 mL LBNS 培养液中, 37 °C、200 r/min 过夜培养。然后取 50  $\mu$ L 过夜培养的菌液接种于 5 mL Jensen's 培养液中, 37 °C 200 r/min 培养至  $OD_{600}$  等于 0.5 左右。取 100  $\mu$ L 菌液接种于 96 孔 PVC 板中, 30 °C 静置培养 1 h。

生物被膜形成能力的测定: 用排枪吸走 PVC 板中的菌液 (游离及松散吸附的菌体), 用生理盐水轻柔地洗 3 次。将 120  $\mu$ L 0.1% 结晶紫加入 PVC 板中, 30 °C 静置培养 30 min (结晶紫溶液可以对牢固吸附的细菌细胞进行染色)。取出 PVC 板, 用排枪吸走结晶紫溶液, 并用生理盐水清洗 3 遍 (洗去残余的结晶紫溶液)。将 200  $\mu$ L 30% 乙酸加入 PVC 板中, 检测  $OD_{560}$  值 (乙酸能溶解结晶紫)。

### 1.2.5 铜绿假单胞菌荧光噬铁素产量的测定

培养细菌至生长对数期, 取样品于 Jensen's 无菌培养基中, 并适当稀释培养样品, 分为同样的两份。一份等体积稀释至无菌培养基中用酶标仪测定其  $OD_{600}$  值。另一份离心使得菌体沉淀, 取培养上清液于等体积的缓冲液 0.1  $\mu$ mol/L Tris-HCl (pH 8) 中, 使用酶标仪测其  $OD_{405}$  值。 $OD_{405}$  需要用其相应培养物的  $OD_{600}$  进行标准化。 $OD_{405}/OD_{600}$  则为其荧光噬铁素产量 (Relative pyoverdine)<sup>[22]</sup>。

### 1.2.6 铜绿假单胞菌运动能力的检测

#### (1) 鞭毛运动能力的检测 (Swimming)

用牙签将单菌落接种到 swimming 固体培养基平板表面上。37 °C 过夜培养后测量平板上细菌游动所形成的半透明区域的直径<sup>[22]</sup>。

#### (2) 菌毛运动能力的检测 (Twitching)

用牙签将单菌落穿刺接种到 twitching 固体培养基平板底部。30 °C 培养 1–2 d 后测量培养基与塑料板交界面细菌颤触运动所形成的半透明区域的直径<sup>[23]</sup>。

### (3) 丛集运动能力的检测 (Swarming)

将活化好的菌株接种到 LBNS 液体培养基, 37 °C 振荡培养过夜。取 1 μL 菌液接种于 swarming 固体培养基平板表面, 37 °C 过夜培养。测量每个平板细菌运动区域的直径<sup>[24]</sup>。

## 2 结果与分析

### 2.1 Fur 诱导表达突变株 $\Delta fur/attB::P_{BAD-fur}$ 的构建与验证

构建 Fur 诱导表达突变株, 即先在菌株 PAO1 基因组上不影响铜绿假单胞菌正常生理代谢的 attB 位点插入以  $P_{BAD}$  为启动子的 *fur* 基因, 然后在阿拉伯糖诱导表达的 *fur* 基因的情况下, 敲除基因组上原来的 *fur* 基因, 最终经测序验证获得 Fur 诱导表达突变株  $\Delta fur/attB::P_{BAD-fur}$  (图 1)。

### 2.2 突变株 $\Delta fur/attB::P_{BAD-fur}$ 在不同铁浓度的环境中的生长情况

在本研究中, 为了便于控制铜绿假单胞菌培养基中的铁浓度, 选用基础培养基 Jensen's 培养基。根据文献报道, 100 μmol/L 的铁浓度被认为是铜绿假单胞菌所处环境中的高铁浓度<sup>[25]</sup>。Jensen's 培养基中的  $FeSO_4$  浓度为 4 μmol/L。在本研究中检测了高铁 (100 μmol/L) 和培养基中不加  $FeSO_4$  (约为 0 μmol/L, 本实验中作为低铁条件) 对铜绿假单胞菌及其突变株生长的影响。

结果如图 2 所示, 以野生型 PAO1 为对照, 突变株  $\Delta fur/attB::P_{BAD-fur}$  以剂量依赖的方式在阿拉伯糖的诱导下表达, 完全未诱导的突变株  $\Delta fur/P_{BAD-fur}$  的表达量只有野生型 PAO1 的 40% 左右, 而 1% 或 0.4% 的阿拉伯糖诱导下, 突变株  $\Delta fur/attB::P_{BAD-fur}$  中 *fur* 的表达可以达到野生型的表达水平 (图 2A)。

野生型菌株 PAO1 在高铁和低铁的环境中

$OD_{600}$  最高可以达到 1.5–2.0 之间, 而在 Jensen's 培养基的铁浓度下  $OD_{600}$  可以达到 6 左右, 这表明菌株 PAO1 在高铁和低铁环境中生长能力都受损。相对于菌株 PAO1, 突变株  $\Delta fur/attB::P_{BAD-fur}$  在高铁或低铁的环境中的生长都会受到极大的损害, 接近于不生长的状态, 并逐渐被阿拉伯糖以剂量依赖的方式恢复生长能力, 在 0.4% 阿拉伯糖诱导时, 可以恢复到与菌株 PAO1 一样的生长能力 (图 2C, D)。在正常培养基的铁浓度下, 突变株  $\Delta fur/attB::P_{BAD-fur}$  的生长情况不受阿拉伯糖的调控, 生长情况与野生型一样 (图 2B)。综上所述, 环境中的铁浓度会影响铜绿假单胞菌的生长能力, 在高铁和低铁的环境中, 铜绿假单胞菌生长都会受限, 尤其是突变株  $\Delta fur/attB::P_{BAD-fur}$  在未诱导的情况下, 在高铁和低铁环境中表现出严重的生长抑制, 接近于不长的状态。当外界的铁或多或少地超过 Fur 所能调节的范围, 细菌的生长就会受到抑制, 在极端的条件下可能出现生长不了的情况。该结果验证了 *fur* 诱导表达突变株构建成功, 同时验证了 *fur* 是必需基因及其在铁调控中的重要性。

### 2.3 突变株 $\Delta fur/attB::P_{BAD-fur}$ 的氧化还原应激的研究

作为全局性调控因子 Fur 被报道可以调节氧化应激反应过程中的过氧化氢酶 KatG、超氧化物歧化酶 SodB 等。在固体培养基培养状态下, 铜绿假单胞菌 *fur* 点突变株相比于菌株 PAO1, 对外源添加  $H_2O_2$  敏感性增加<sup>[26]</sup>。本研究进一步验证液体环境中过多的  $H_2O_2$  是否会影响突变株  $\Delta fur/attB::P_{BAD-fur}$  的生长能力。

结果如图 3 所示, 当  $H_2O_2$  浓度为 1 200 μmol/L, 前 11 h 内菌株 PAO1 的生长受损, 然后恢复正常, 这说明 1 200 μmol/L 的浓度是对菌株 PAO1 生长有压力的浓度, 但压力是在菌株 PAO1 的调节范围之内, 通过一段时间的调节, 菌株 PAO1 的生长回归正常水平。突变株  $\Delta fur/attB::P_{BAD-fur}$  在  $H_2O_2$  为 1 200 μmol/L 时, 一直表现出生长受到限

制, 说明当缺失 *Fur* 以后, 细菌面对环境中的巨大氧压力, 失去了部分调节能力, 从而影响了细菌的生长, 结果表明 *Fur* 在铜绿假单胞菌对液体环境的氧化应激反应中发挥着调节作用。

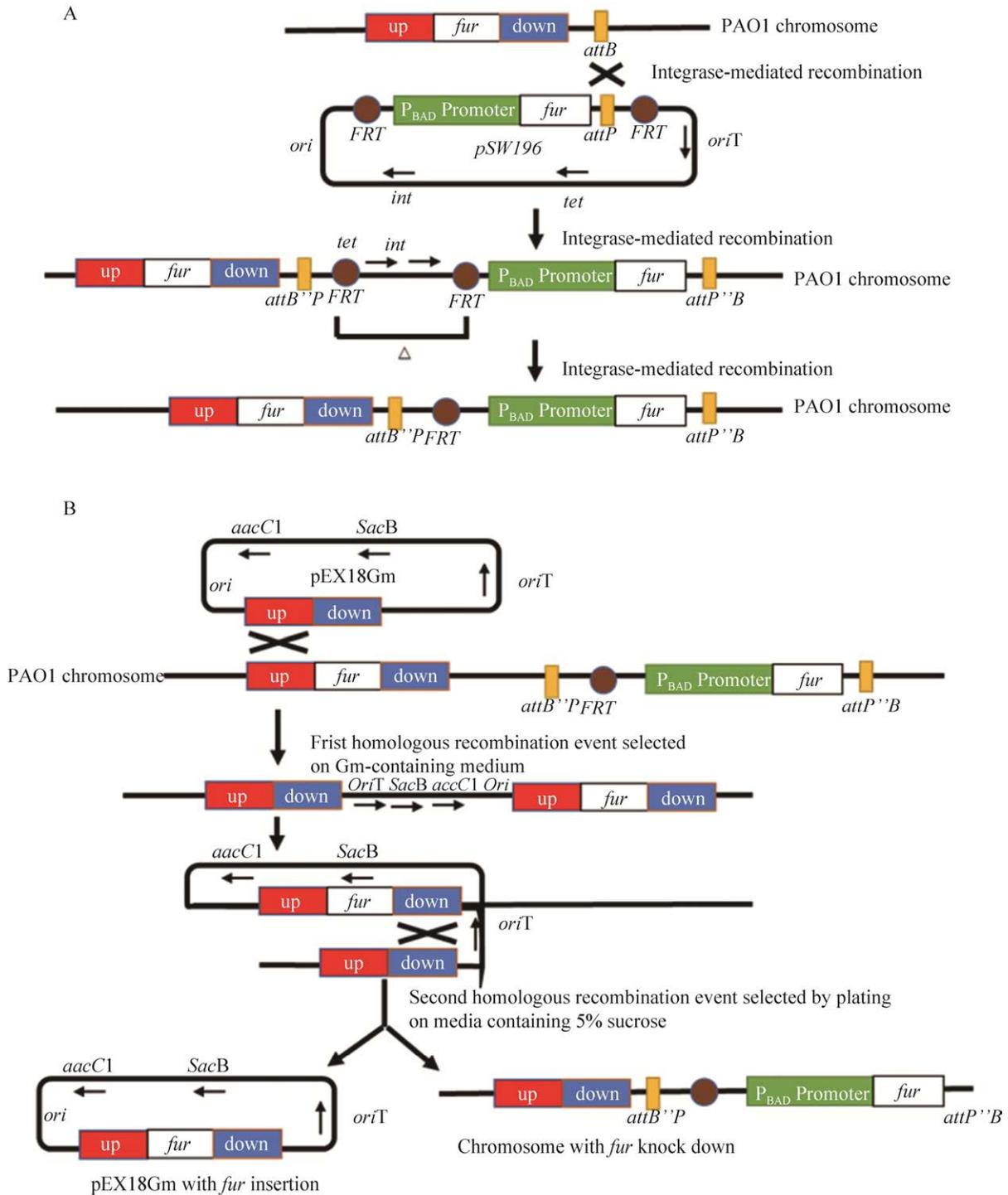


图 1  $\Delta fur/attB::P_{BAD}fur$  突变株构建示意图

Fig. 1 Schematic diagram of the construction of mutant strain  $\Delta fur/attB::P_{BAD}fur$ . (A) The *fur* gene with  $P_{BAD}$  promoter was inserted into the *attB* site of the genome of strain PAO1. (B) Deletion of *fur* gene in strain PAO1/ $attB::P_{BAD}fur$ .

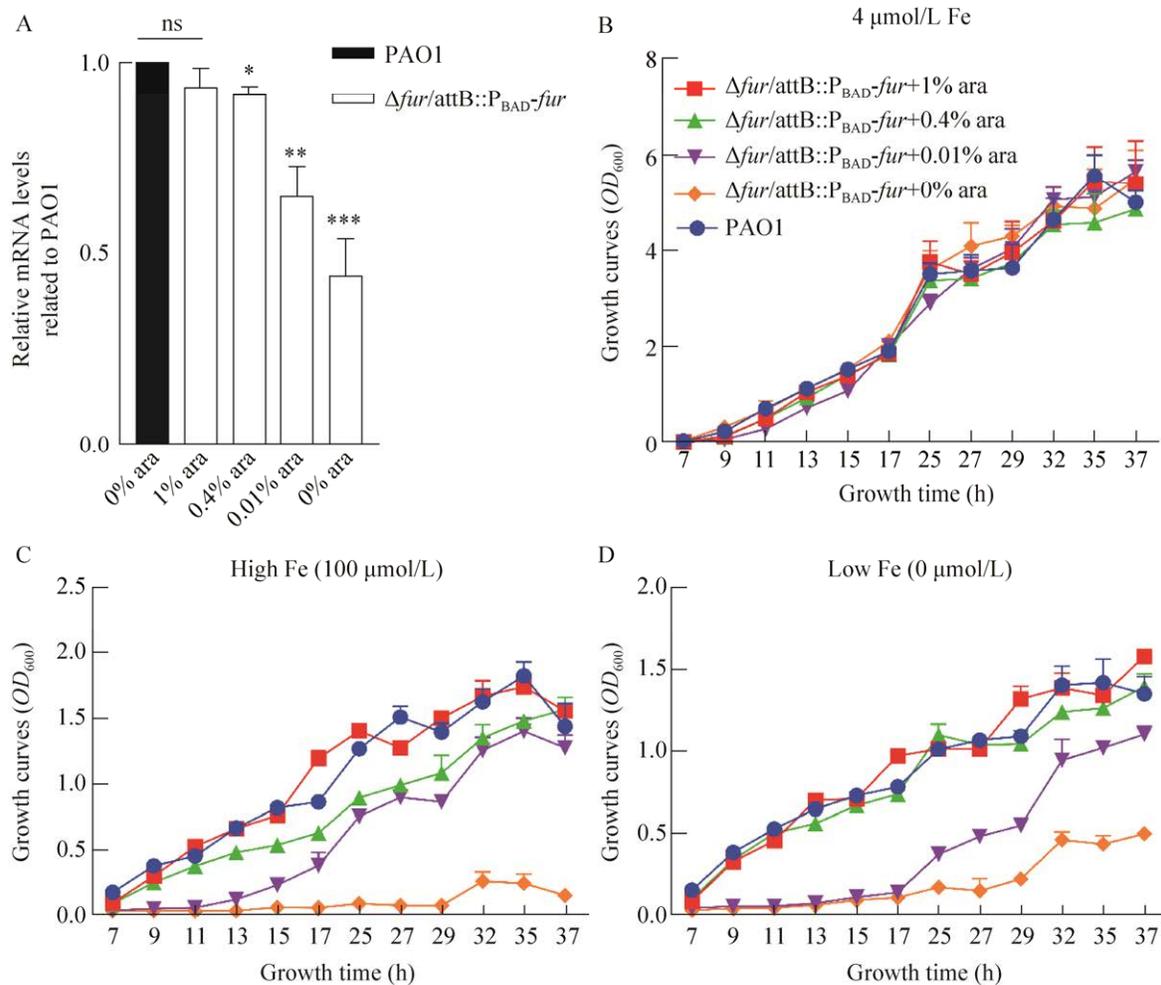


图2 添加不同浓度诱导剂条件下突变株  $\Delta fur/attB::P_{BAD-fur}$  中 Fur 的表达以及该菌在不同铁浓度环境中的生长曲线

Fig. 2 Expression of Fur in strain  $\Delta fur/attB::P_{BAD-fur}$  under different arabinose and the growth curves with different concentrations of iron. (A) Expression of Fur in strain  $\Delta fur/attB::P_{BAD-fur}$  induced by different arabinose. The amount of strain  $\Delta fur/attB::P_{BAD-fur}$  is normalized to the level of strain PAO1. The corresponding arabinose (ara) concentration are listed below each bar, the superscript letter “\*” indicates a significant difference compared to strain PAO1. *t*-test of unpaired unequal variance was performed for testing differences between groups. \* $P < 0.03$ , \*\* $P < 0.02$ , \*\*\* $P < 0.0002$ . (B–D) Growth curves ( $OD_{600}$ ) of strain  $\Delta fur/attB::P_{BAD-fur}$  in Jensen's media with 4  $\mu mol/L$ , 100  $\mu mol/L$  (high iron concentration), or without iron (low iron) at increasing concentrations of arabinose. Values are the mean of at least three independent assays.

#### 2.4 Fur 对铜绿假单胞菌在不同铁浓度的环境中形成生物被膜的影响

环境中的铁浓度可以作为一种信号调节铜绿假单胞菌生物被膜的发育。这种铁对铜绿假单胞菌生物被膜的调节效应可能是受到铁摄取调节子 Fur 的调控<sup>[27]</sup>。为了研究 Fur 对生物被膜的影响,本研究检测了菌株 PAO1 和突变株  $\Delta fur/attB::P_{BAD-fur}$

在不同铁浓度的环境下,它们的生物被膜形成能力的差异。经过 6、12、24、36 h 的不同时间阶段的取样,发现早期的培养时间内,生物被膜形成能力差异最为显著。所以,本研究生物被膜形成能力培养时间均为 6 h。

结果如图 4 所示,与野生型菌株 PAO1 相比,未加诱导的突变株  $\Delta fur/attB::P_{BAD-fur}$  生物被膜的

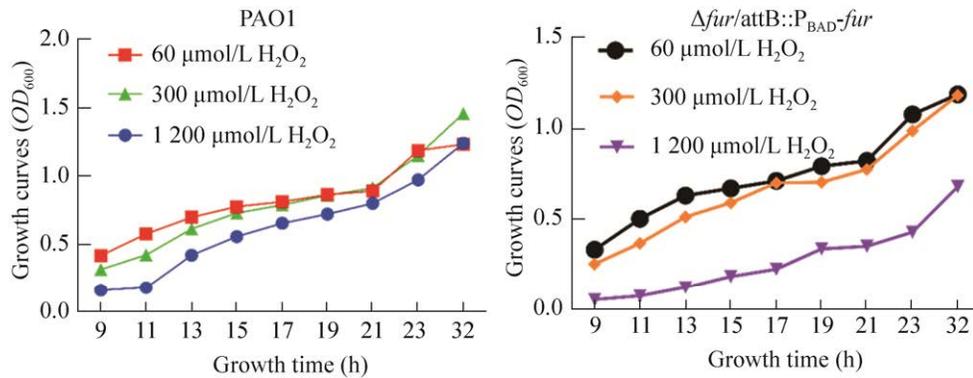


图 3 野生型菌株 PAO1 和突变株  $\Delta fur/attB::P_{BAD-fur}$  在不同  $H_2O_2$  浓度的环境中的生长曲线

Fig. 3 Growth curves of strains PAO1 and  $\Delta fur/attB::P_{BAD-fur}$  in different  $H_2O_2$  concentrations. Values are the mean ( $\pm$ standard deviation) from at least three independent assays.

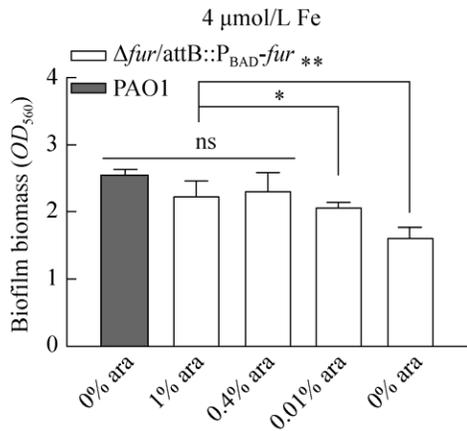


图 4 菌株 PAO1 与  $\Delta fur/attB::P_{BAD-fur}$  在  $4 \mu mol/L$  铁浓度的环境中生物被膜形成生物量

Fig. 4 Biofilm biomass of strains PAO1 and  $\Delta fur/attB::P_{BAD-fur}$  in  $4 \mu mol/L$  iron concentrations. The biofilm biomass of strain  $\Delta fur/attB::P_{BAD-fur}$  is compared with the level of strain PAO1. The corresponding arabinose concentration are listed below each bar. Values are means from two independent experiments, each with three replicates. T-test of unpaired unequal variance was performed for testing differences between groups. \* $P < 0.03$ , \*\* $P < 0.02$ .

形成能力显著降低，生物被膜的产量减少接近 30%；0.01%阿拉伯糖诱导水平下，突变株  $\Delta fur/attB::P_{BAD-fur}$  的生物被膜形成也显著减少。而 0.4% 和 1%阿拉伯糖诱导下，突变株  $\Delta fur/attB::P_{BAD-fur}$  生物被膜形成恢复到野生型 PAO1 水平。

为进一步探究不同铁浓度对铜绿假单胞菌生

物被膜形成的影响，本研究在高铁和高铁浓度下进行了相同的实验。

结果如图 5 所示，野生型菌株 PAO1 在铁浓度不同的环境下，生物被膜的形成能力有所差异。当铁浓度为  $100 \mu mol/L$  时，相比于高铁和  $4 \mu mol/L$  铁的环境中，菌株 PAO1 的生物被膜形成量高出 50%左右，说明充足铁环境 ( $10-100 \mu mol/L$ ) 能促进铜绿假单胞菌生物被膜的形成，与已有的研究结果一致。无论环境中铁的浓度为多少，与野生型菌株 PAO1 相比，未加诱导的突变株  $\Delta fur/attB::P_{BAD-fur}$  生物被膜的形成能力都减弱，生物被膜的产量减少接近 50%。

### 2.5 Fur 对细菌运动的影响

铜绿假单胞菌存在 3 种主要的运动方式，分别是 twitching、swarming 和 swimming。这 3 种运动形式和铜绿假单胞菌生物被膜的形成、毒力、趋化、慢性感染等众多生理生化过程都息息相关。对细菌在新的介质表面吸附和定植过程都发挥着重要作用。本研究以野生型菌株 PAO1 为对照，对突变株  $\Delta fur/attB::P_{BAD-fur}$  在不同阿拉伯糖诱导下的运动能力进行了实验。

Twitching 运动是由四型菌毛 (Type IV pili, T4P) 介导的在固体表面的一种运动形式。铜绿假单胞菌的 twitching 运动还被证明和生物被膜的形成和细菌的致病性密切相关<sup>[28]</sup>。

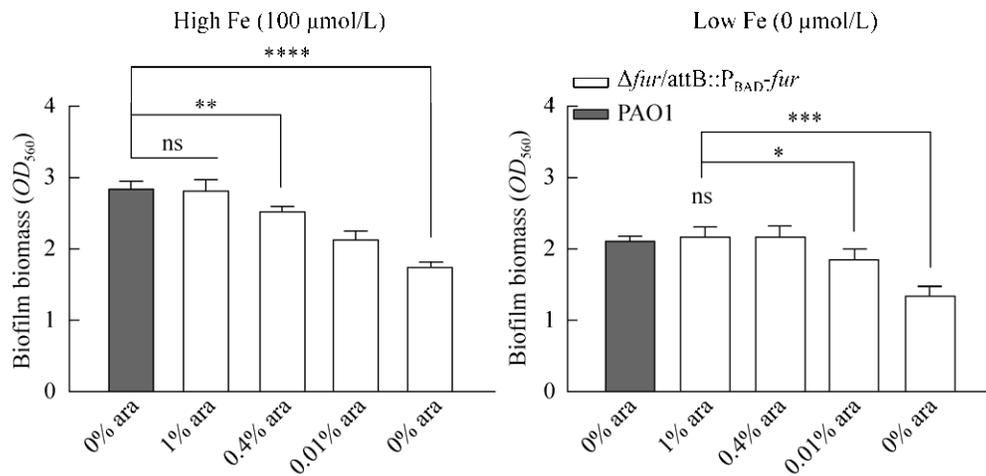


图5 突变株  $\Delta fur/attB::P_{BAD-fur}$  在高铁 (100  $\mu\text{mol/L}$ ) 和高铁 (0  $\mu\text{mol/L}$ ) 的环境中生物被膜形成生物量

Fig. 5 Biofilm biomass of strain  $\Delta fur/attB::P_{BAD-fur}$  in high and low iron environments. The biofilm biomass of strain  $\Delta fur/attB::P_{BAD-fur}$  is compared with the level of strain PAO1. The corresponding arabinose concentration are listed below each bar. Values are means from two independent experiments, each with three replicates. *t*-test of unpaired unequal variance was performed for testing differences between groups. \* $P < 0.03$ , \*\* $P < 0.02$ , \*\*\* $P < 0.0002$ , \*\*\*\* $P < 0.0001$ .

通过一系列梯度浓度的阿拉伯糖诱导下的突变株  $\Delta fur/attB::P_{BAD-fur}$  的 twitching 实验检测菌毛运动, 证明未诱导的突变株丧失了 twitching 运动能力, 低诱导水平的突变株  $\Delta fur/attB::P_{BAD-fur}$  的菌毛运动能力减弱, 并且呈现出一种对诱导剂量依赖的效应, 随着阿拉伯糖浓度的增加, twitching 运动能力逐渐增加, 当阿拉伯糖浓度为 0.4% 及以上可以恢复到野生型水平 (图 6)。

铜绿假单胞菌的 swimming 运动需要依赖有功能的极生鞭毛的驱动<sup>[29]</sup>。通过同样的一系列梯度浓度的阿拉伯糖诱导下的突变株  $\Delta fur/attB::P_{BAD-fur}$  的 swimming 实验检测鞭毛运动, 证明低诱导水平的突变株  $\Delta fur/attB::P_{BAD-fur}$  的 swimming 运动能力减弱, 并且可以用阿拉伯糖以剂量依赖的方式回补到野生型 PAO1 的水平 (图 6)。

Swarming 是一种受群体感应调控在培养基表面形成的有分枝样的运动形式。影响 swarming 的因素有鞭毛、T4P 以及鼠李糖脂<sup>[30]</sup>。通过同样的一系列梯度浓度的阿拉伯糖诱导下的突变株  $\Delta fur/attB::P_{BAD-fur}$  的 swarming 实验检测菌毛运动, 证明低诱导水平的突变株  $\Delta fur/attB::P_{BAD-fur}$

的 swarming 运动能力减弱, 并且同样可以在阿拉伯糖诱导下, 以剂量依赖的方式恢复 (图 6)。

上述结果说明 *fur* 的低表达影响细菌的运动性。

## 2.6 突变株 $\Delta fur/attB::P_{BAD-fur}$ 的荧光嗜铁素产量

荧光嗜铁素 (Pyoverdine) 是由一个肽链和一个发色团组成的混合型铁载体, 受到 Fur 负调控<sup>[31]</sup>。通过检测野生型菌株 PAO1 和突变株  $\Delta fur/attB::P_{BAD-fur}$  在不同浓度阿拉伯糖诱导下荧光嗜铁素的产量变化的方法, 以此来测试 Fur 的表达对荧光嗜铁素的调控。

结果如图 7 所示, 在不同铁浓度的培养基中, 未诱导和以 0.01% 阿拉伯糖诱导时, 突变株  $\Delta fur/attB::P_{BAD-fur}$  的荧光嗜铁素合成量显著高于野生型菌株的荧光嗜铁素合成量, 说明突变株的荧光嗜铁素的产量几乎没有受到 Fur 的抑制调控作用; 而当以 1% 阿拉伯糖诱导时, 由于 Fur 的抑制作用, 突变株  $\Delta fur/attB::P_{BAD-fur}$  的荧光嗜铁素合成量基本可以恢复到野生型菌株 PAO1 的合成水平。在高铁 (100  $\mu\text{mol/L}$ ) 环境条件下, PAO1

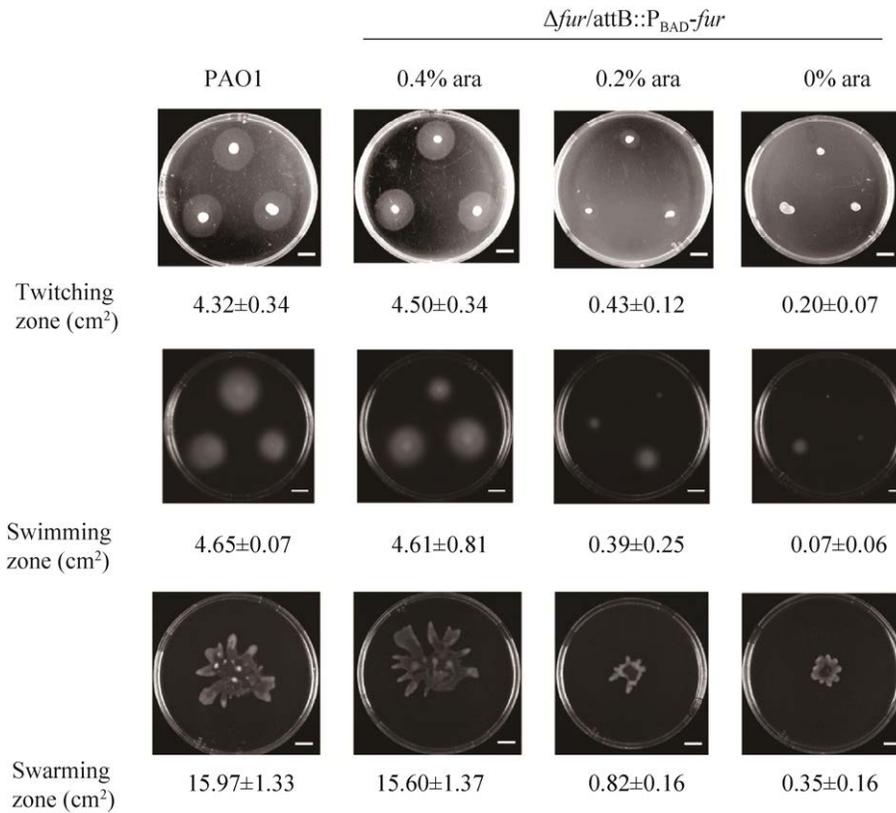


图 6 突变株  $\Delta fur/attB::P_{BAD-fur}$  的运动能力

Fig. 6 Motilities analysis of strain  $\Delta fur/attB::P_{BAD-fur}$ . The flagella mediated swimming motility, type IV pili mediated twitching motility and swarming motility were tested for strains PAO1 and  $\Delta fur/attB::P_{BAD-fur}$ . The corresponding arabinose concentration are listed on the line. Strain PAO1 is used as a positive control. Shown are the means of three independent experiments and standard deviations. Scale bar, 1 cm.

野生型菌株和 1%阿拉伯糖诱导的突变株的荧光嗜铁素合成量明显下降, 约为未诱导和 0.01%诱导的突变株  $\Delta fur/attB::P_{BAD-fur}$  的荧光嗜铁素合成量的 1/10。

这说明在充足的铁环境中, 铜绿假单胞菌不需要形成很多荧光嗜铁素释放到环境中去摄取铁, 荧光嗜铁素的合成受到 *Fur* 的抑制, 而在突变株  $\Delta fur/attB::P_{BAD-fur}$  中, 在未诱导条件下, 没有 *Fur* 去抑制荧光嗜铁素的表达, 因此细胞仍然大量合成荧光嗜铁素, 造成了细菌物质和能量的浪费。由此证明诱导型突变株  $\Delta fur/attB::P_{BAD-fur}$  构建正确并且可以通过不同阿拉伯糖浓度的诱导来控制 *Fur* 的表达进而控制 *Fur* 的调控作用, 可

以利用该突变株来研究铜绿假单胞菌中 *fur* 基因的敲除对细菌生理的影响。

实验结果显示, 在 *Fur* 存在的情况下, 即野生型 PAO1 和 1%的阿拉伯糖诱导条件下的突变株  $\Delta fur/attB::P_{BAD-fur}$  在不同铁浓度的环境下荧光嗜铁素合成量明显不同, 在高铁 (100  $\mu\text{mol/L}$ ) 环境中, 菌株 PAO1 的荧光嗜铁素产量约为低铁环境中荧光嗜铁素产量的 1/5。这表明野生型铜绿假单胞菌可以感应并根据环境中的铁含量来改变自己摄取铁的策略。

铜绿假单胞菌中的 *Fur* 属于 *Fur* 金属调节子家族中的调控因子。*fur* 在铜绿假单胞菌中是必需基因, 不能获得其完全的缺失突变株。为了验证

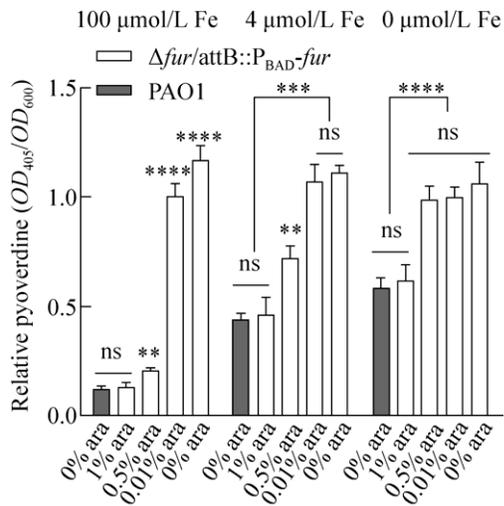


图7 突变株  $\Delta fur/attB::P_{BAD-fur}$  在  $4 \mu\text{mol/L}$ 、 $100 \mu\text{mol/L}$  和  $0 \mu\text{mol/L}$  不同铁浓度的环境中荧光嗜铁素的产量

Fig. 7 Pyoverdine production of strain  $\Delta fur/attB::P_{BAD-fur}$  in environmental sinks with  $4 \mu\text{mol/L}$ ,  $100 \mu\text{mol/L}$  and low iron concentrations. The relative pyoverdine production of strain  $\Delta fur/attB::P_{BAD-fur}$  is compared with the level of strain PAO1. The corresponding arabinose concentration are listed below each bar. Values are means from two independent experiments, each with three replicates. *t*-test of unpaired unequal variance was performed for testing differences between groups. \* $P < 0.03$ , \*\* $P < 0.02$ , \*\*\* $P < 0.0002$ , \*\*\*\* $P < 0.0001$ .

在铜绿假单胞菌中，其他类型的 Fur 金属调节子家族的成员是否可以回补突变株  $\Delta fur/attB::P_{BAD-fur}$  的相应表型，本研究将来自磁螺菌 MSR-1 中 Fur 金属调节子家族中 Fur-M、IrrA、IrrB、IrrC、Zur 连接到组成型表达质粒 pUCP20 上，转入到菌株 PAO1 和突变株  $\Delta fur/attB::P_{BAD-fur}$ 。通过检测荧光嗜铁素产量来判断磁螺菌来源的 Fur 金属调节子家族是否可以在铜绿假单胞菌中发挥作用。

结果如图 8 所示，含有质粒 pUCP20-mFur 的突变株  $\Delta fur/attB::P_{BAD-fur}$  与含有空质粒的空白对照相比，荧光嗜铁素产量下降接近 30%左右。这表明在组成型质粒上表达出来自磁螺菌的 mFur 蛋白可以在突变株  $\Delta fur/attB::P_{BAD-fur}$  中抑制荧光嗜铁素的产量，结合先前文章报道 mFur 可以结合在铜绿假单胞菌的 Fur box 上，实验证明在铜绿假单胞菌中 mFur 也同样可以发挥作用。磁螺菌的 Fur 金属调节子家族中的成员都可以在突变株  $\Delta fur/attB::P_{BAD-fur}$  中抑制荧光嗜铁素的产量。而在菌株 PAO1 中，除了表达 IrrC 蛋白外，表达其他 Fur 金属调节子家族中的蛋白的情况下，荧光嗜铁素产量也出现了增多的现象。

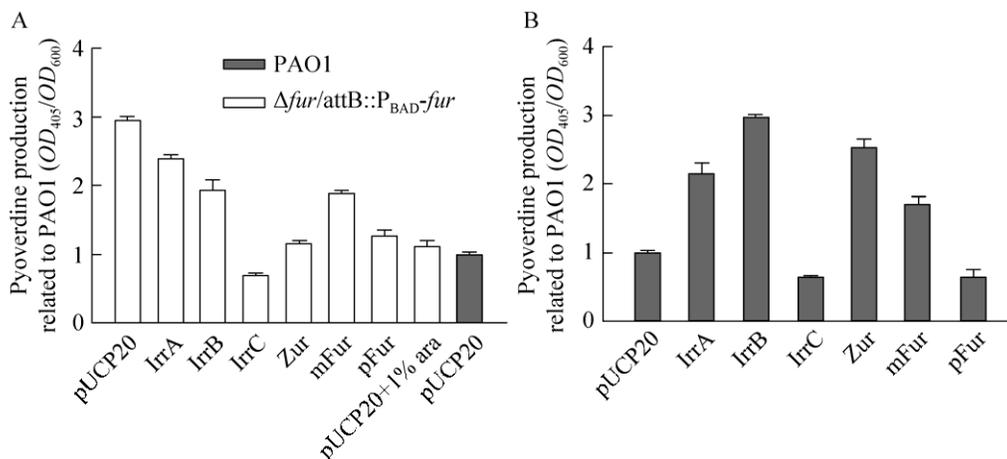


图8 磁螺菌 MSR-1 的 Fur 超级家族蛋白影响铜绿假单胞菌荧光嗜铁素产量

Fig. 8 The Fur superfamily of MSR-1 affect the production of pyoverdine in *P. aeruginosa*. (A) The Fur superfamily of MSR-1 affect the production of pyoverdine in strain  $\Delta fur/attB::P_{BAD-fur}$ . (B) The Fur superfamily of MSR-1 affect the production of pyoverdine in strain PAO1. The amount production of pyoverdine is normalized to the level of strain PAO1. The corresponding Fur protein of strains PAO1 or MSR-1 are listed under each bar. Values are means from two independent experiments, each with three replicates.

### 3 讨论

对 Fur 的研究由来已久, 由于 Fur 是铜绿假单胞菌中全局性调节子, 也是关键的必需基因。因为不能获得铜绿假单胞菌 *fur* 缺失突变株, 之前的研究都建立在 Fur 与 DNA 结合关键位点的点突变株上; 或者对铜绿假单胞菌在不同铁浓度环境中的转录组进行生物信息学分析, 得到 Fur 可能调控的基因。根据已经获得 *fur* 基因敲除突变株的其他细菌的研究, 可以总结出 Fur 在铁吸收系统或毒力因子的表达、抗酸或氧化应激抵抗、运动和生物被膜形成等方面都发挥着重要的作用。最近, 两项独立的转座子测序研究证实了 Fur 与铜绿假单胞菌在环境适应性方面的相关性<sup>[32-33]</sup>。为了进一步探索 Fur 对于铜绿假单胞菌在环境适应方面的作用, 我们构建出诱导型缺失突变株  $\Delta fur/attB::P_{BAD-fur}$ , 并探索了突变株的表型方面的变化。结果表明, 在不同铁浓度的环境中, Fur 的缺失可以影响到细菌的生长。Fur 可以对铜绿假单胞菌早期的生物被膜形成能力有影响; 它还影响铜绿假单胞菌的 twitching、swimming、swarming 等运动能力; 来自磁螺菌中 Fur 家族蛋白抑制突变株  $\Delta fur/attB::P_{BAD-fur}$  中荧光嗜铁素的合成。

在铜绿假单胞菌中无法获得 Fur 的缺失突变株可能是因为 Fur 影响铜绿假单胞菌的生长。所以, 本研究对突变株  $\Delta fur/attB::P_{BAD-fur}$  在不同铁浓度的生长环境中进行了生长曲线的测定。结果表明, 在高铁和高铁的情况下, Fur 的低表达会导致铜绿假单胞菌在铁短缺和铁充足的环境中生长受损的现象, 并且可以在阿拉伯糖诱导下, 以剂量依赖的方式来恢复突变株的生长能力。

生物被膜是一种微生物由自身分泌的胞外多聚基质包被而形成的聚集体。生物被膜具有极强的环境适应性, 可以对抗菌药物产生耐药性。有文章报道, 铁可以作为信号, 高铁浓度的环境

有利于生物被膜的形成。经过实验, 证明 Fur 的低水平表达会对铜绿假单胞菌生物被膜的形成造成影响, 根据实验结果的分析, 排除了生物被膜形成能力受损原因是细菌生长和胞内铁浓度的可能性, 其原因还需进一步实验探索。

已有报道表明 Fur 可以调节鞭毛的合成从而对细菌的运动能力产生影响。当幽门螺旋杆菌处于低 pH 环境下时, Fur 能激活鞭毛合成蛋白基因 *flhP* 和脂肪族氨酰酶基因 *amiE* 来抵抗酸环境。在大肠杆菌 K-12 中, Fur 直接调控 *flhD*、*flhC*, 它们对鞭毛的生长起着主要的调节作用<sup>[34]</sup>。除此之外, 最新发现在铜绿假单胞菌中, 受 Fur 调节的两个小 RNA 可以参与调节菌毛、鞭毛的合成<sup>[35]</sup>。

荧光嗜铁素是直接被 Fur 抑制且非常容易检测的表型, 可以以荧光嗜铁素的产量来指示 Fur 的表达。本研究构建的  $\Delta fur/attB::P_{BAD-fur}$  突变株荧光嗜铁素的产量与诱导剂阿拉伯糖剂量呈现出负相关的关系, 这表明突变株构建成功。来自磁螺菌中的 Fur 金属调节子家族的蛋白能够在突变株  $\Delta fur/attB::P_{BAD-fur}$  中抑制荧光嗜铁素的合成, 但是在野生型菌株 PAO1 中反而可以增加荧光嗜铁素的产量, 这可能与组成型表达的 Fur 金属调节子家族蛋白与铜绿假单胞菌自身表达的 Fur 蛋白相互竞争 Fur box 有关, 当组成型表达的 Fur 金属调节子家族蛋白结合在 Fur box 上, 但又达不到 pFur 对荧光嗜铁素的抑制效果 (图 8A), 所以出现荧光嗜铁素产量增多的现象; 也可能因为过量的 Fur 会竞争  $Fe^{2+}$ , 使 Fur 从活性状态变为非活性状态; 也可能由于两种来源的 Fur 蛋白形成杂合二聚体导致荧光嗜铁素产量增多。具体原因还需进一步实验验证。

综上所述, 本研究在 Fur 诱导性缺失突变的情况下探索了 Fur 在铜绿假单胞菌中的全局性调控作用。Fur 在细菌生长、生物被膜形成、运动、氧化应激方面都发挥着重要的调控作用, 更加深刻地了解了 Fur 在铜绿假单胞菌环境适应方面的

调控作用, 并且为下一步探索其调控机制提供一定的实验基础。

**致谢:** 感谢中国农业大学生物学院李颖老师的建议, 关国华老师赠送磁螺菌。

## REFERENCES

- [1] Cornelissen CN, Sparling F. Iron piracy: acquisition of transferrin-bound iron by bacterial pathogens. *Mol Microbiol*, 1994, 14(5): 843-850.
- [2] Imlay JA, Chin SM, Linn S. Toxic DNA damage by hydrogen peroxide through the Fenton reaction *in vivo* and *in vitro*. *Science*, 1988, 240(4852): 640-642.
- [3] Rodopulo AK. Oxidation of tartaric acid in wine in the presence of heavy metal salts (activation of oxygen by iron). *Izv Akad Nauk SSSR Biol*, 1951, 3: 115-128.
- [4] Beauchene NA, Mettert EL, Moore LJ, et al. O<sub>2</sub> availability impacts iron homeostasis in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2017, 114(46): 12261-12266.
- [5] Yu CX, Genco CA. Fur-mediated global regulatory circuits in pathogenic *Neisseria* species. *J Bacteriol*, 2012, 194(23): 6372-6381.
- [6] Wang Q, Wang MW, Wang X, et al. Iron response regulator protein IrrB in *Magnetospirillum gryphiswaldense* MSR-1 helps control the iron/oxygen balance, oxidative stress tolerance, and magnetosome formation. *Appl Environ Microbiol*, 2015, 81(23): 8044-8053.
- [7] Deng ZQ, Wang Q, Liu Z, et al. Mechanistic insights into metal ion activation and operator recognition by the ferric uptake regulator. *Nat Commun*, 2015, 6: 7642.
- [8] Gellatly SL, Hancock REW. *Pseudomonas aeruginosa*: new insights into pathogenesis and host defenses. *Pathog Dis*, 2013, 67(3): 159-173.
- [9] Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*, 1999, 284(5418): 1318-1322.
- [10] Cornelis P, Matthijs S, Van Oeffelen L. Iron uptake regulation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Biometals*, 2009, 22(1): 15-22.
- [11] Cornelis P. Iron uptake and metabolism in pseudomonads. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2010, 86(6): 1637-1645.
- [12] Wilderman PJ, Sowa NA, FitzGerald DJ, et al. Identification of tandem duplicate regulatory small RNAs in *Pseudomonas aeruginosa* involved in iron homeostasis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(26): 9792-9797.
- [13] Vasil ML, Ochsner UA. The response of *Pseudomonas aeruginosa* to iron: genetics, biochemistry and virulence. *Mol Microbiol*, 1999, 34(3): 399-413.
- [14] Holloway BW. Genetic recombination in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Gen Microbiol*, 1955, 13(3): 572-581.
- [15] Kristensen CS, Eberl L, Sanchez-Romero JM, et al. Site-specific deletions of chromosomally located DNA segments with the multimer resolution system of broad-host-range plasmid RP4. *J Bacteriol*, 1995, 177(1): 52-58.
- [16] Wang X, Wang Q, Zhang WJ, et al. Complete genome sequence of *Magnetospirillum gryphiswaldense* MSR-1. *Genome Announc*, 2014, 2(2): e00171-14.
- [17] Baynham PJ, Ramsey DM, Gvozdyev BV, et al. The *Pseudomonas aeruginosa* ribbon-helix-helix DNA-binding protein AlgZ (AmrZ) controls twitching motility and biogenesis of type IV pili. *J Bacteriol*, 2006, 188(1): 132-140.
- [18] Studier FW, Rosenberg AH, Dunn JJ, et al. Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Methods Enzymol*, 1990, 185: 60-89.
- [19] Hoang TT, Karkhoff-Schweizer PR, Kutchma AJ, et al. A broad-host-range Flp-*FRT* recombination system for site-specific excision of chromosomally-located DNA sequences: application for isolation of unmarked *Pseudomonas aeruginosa* mutants. *Gene*, 1998, 212(1): 77-86.
- [20] Olsen RH, DeBusscher G, McCombie WR. Development of broad-host-range vectors and gene banks: self-cloning of the *Pseudomonas aeruginosa* PAO chromosome. *J Bacteriol*, 1982, 150(1): 60-69.
- [21] Becher A, Schweizer H P. Integration-proficient *Pseudomonas aeruginosa* vectors for isolation of single-copy chromosomal lacZ and lux gene fusions. *Biotechniques*, 2000, 29(5): 948-950, 952.

- [22] Imperi F, Ciccocanti F, Perdomo AB, et al. Analysis of the periplasmic proteome of *Pseudomonas aeruginosa*, a metabolically versatile opportunistic pathogen. *Proteomics*, 2009, 9(7): 1901-1915.
- [23] Wang SW, Parsek WR, Wozniak DJ, et al. A spider web strategy of type IV pili-mediated migration to build a fibre-like Psl polysaccharide matrix in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Environ Microbiol*, 2013, 15(8): 2238-2253.
- [24] Wang SW, Yu S, Zhang ZY, et al. Coordination of swarming motility, biosurfactant synthesis, and biofilm matrix exopolysaccharide production in *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Environ Microbiol*, 2014, 80(21): 6724-6732.
- [25] Reimann C, Serino L, Beyeler M, et al. Dihydroaeruginic acid synthetase and pyochelin synthetase, products of the pchEF genes, are induced by extracellular pyochelin in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology (Reading)*, 1998, 144(11): 3135-3148.
- [26] Hassett DJ, Sokol PA, Howell ML, et al. Ferric uptake regulator (Fur) mutants of *Pseudomonas aeruginosa* demonstrate defective siderophore-mediated iron uptake, altered aerobic growth, and decreased superoxide dismutase and catalase activities. *J Bacteriol*, 1996, 178(14): 3996-4003.
- [27] Singh PK, Parsek MR, Greenberg EP, et al. A component of innate immunity prevents bacterial biofilm development. *Nature*, 2002, 417(6888): 552-555.
- [28] Burrows LL. *Pseudomonas aeruginosa* twitching motility: type IV pili in action. *Annu Rev Microbiol*, 2012, 66: 493-520.
- [29] Mann EE, Wozniak DJ. *Pseudomonas* biofilm matrix composition and niche biology. *FEMS Microbiol Rev*, 2012, 36(4): 893-916.
- [30] Harshey RM, Matsuyama T. Dimorphic transition in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: surface-induced differentiation into hyperflagellate swarmer cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 91(18): 8631-8635.
- [31] Imperi F, Massai F, Facchini M, et al. Repurposing the antimycotic drug flucytosine for suppression of *Pseudomonas aeruginosa* pathogenicity. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110(18): 7458-7463.
- [32] Ochsner UA, Wilderman PJ, Vasil AI, et al. GeneChip expression analysis of the iron starvation response in *Pseudomonas aeruginosa*: identification of novel pyoverdine biosynthesis genes. *Mol Microbiol*, 2002, 45(5): 1277-1287.
- [33] Palma M, Worgall S, Quadri LEN. Transcriptome analysis of the *Pseudomonas aeruginosa* response to iron. *Arch Microbiol*, 2003, 180(5): 374-379.
- [34] Vassinova N, Kozyrev D. A method for direct cloning of fur-regulated genes: identification of seven new fur-regulated loci in *Escherichia coli*. *Microbiology*, 2000, 146 Pt 12: 3171-3182.
- [35] Brewer LK, Huang WL, Hackert BJ, et al. Static growth promotes PrrF and 2-alkyl-4(1H)-quinolone regulation of type VI secretion protein expression in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol*, 2020, 202(24).

(本文责编 陈宏宇)