

Fur 调控副溶血弧菌的铁稳态和氧化应激反应

马涪溶, 朱晓雅, 李文秀, 徐正中, 陈祥, 焦新安, 郑成坤*

扬州大学 生物科学与技术学院, 江苏省人兽共患病学重点实验室, 江苏 扬州

马涪溶, 朱晓雅, 李文秀, 徐正中, 陈祥, 焦新安, 郑成坤. Fur 调控副溶血弧菌的铁稳态和氧化应激反应[J]. 微生物学报, 2026, 66(7): 3337-3353.

MA Furong, ZHU Xiaoya, LI Wenxiu, XU Zhengzhong, CHEN Xiang, JIAO Xin'an, ZHENG Chengkun. Fur regulates iron homeostasis and oxidative stress response in *Vibrio parahaemolyticus*[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2026, 66(7): 3337-3353.

摘要: 【目的】探究铁摄取调节因子(ferric uptake regulator, Fur)对副溶血弧菌铁稳态、氧化应激反应和毒力的影响。【方法】通过 BLASTp 和多序列比对分析 Fur 蛋白在部分革兰氏阴性菌中的保守性。构建 *fur* 基因缺失株(Δfur)及其回补株($C\Delta fur$), 比较野生株、 Δfur 和 $C\Delta fur$ 在正常培养(铁充足)、铁过量、铁限制及氧化应激条件下的生长情况。利用电感耦合等离子体质谱测定各菌株菌体内金属含量。通过斑马鱼存活率测定和竞争感染试验评估 Fur 对副溶血弧菌毒力的影响。利用转录组测序分析 Fur 调控的基因。【结果】Fur 蛋白在部分革兰氏阴性菌中高度保守。*fur* 基因缺失减弱副溶血弧菌在正常培养(铁充足)和铁过量条件下的生长, 并降低其对铁限制的敏感性。 Δfur 胞内铁含量显著低于野生株和 $C\Delta fur$ 。Fur 参与调控副溶血弧菌的氧化应激反应。Fur 对副溶血弧菌在斑马鱼模型中的毒力无显著影响。 Δfur 中多个铁摄取、铁储存和 III 型分泌系统 1 相关基因表达显著上调, 编码含铁蛋白和 VI 型分泌系统 2 相关基因表达显著下调。【结论】Fur 调控副溶血弧菌的铁稳态和氧化应激反应, 但不影响其在斑马鱼模型中的毒力。

关键词: 副溶血弧菌; Fur; 铁稳态; 氧化应激反应; 毒力; 调控

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 author. E-mail: zhengchengkun@yzu.edu.cn

Received: 2025-12-23; Accepted: 2026-03-31; Published online: 2026-04-13

Fur regulates iron homeostasis and oxidative stress response in *Vibrio parahaemolyticus*

MA Furong, ZHU Xiaoya, LI Wenxiu, XU Zhengzhong, CHEN Xiang, JIAO Xin'an, ZHENG Chengkun*

Jiangsu Key Laboratory of Zoonosis, College of Bioscience and Biotechnology, Yangzhou University, Yangzhou, Jiangsu, China

Abstract: [Objective] To investigate the effects of ferric uptake regulator (Fur) on iron homeostasis, oxidative stress response, and virulence in *Vibrio parahaemolyticus*. [Methods] BLASTp and multiple sequence alignment analyses were employed to analyze the conservation of Fur proteins in several Gram-negative bacteria. A *fur* gene deletion mutant (Δfur) and a complementation strain ($C\Delta fur$) were constructed. The growth of the wild-type (WT), Δfur , and $C\Delta fur$ was compared under normal (iron-replete), iron-excess, iron-restricted, and oxidative stress conditions. Inductively coupled plasma mass spectrometry was employed to measure intracellular metal content in each strain. A zebrafish survival assay and a competition infection assay were performed to assess the impact of Fur on the virulence of *V. parahaemolyticus*. RNA sequencing was conducted to identify the genes regulated by Fur. [Results] The Fur proteins were highly conserved among several Gram-negative bacteria. The deletion of *fur* attenuated the growth of *V. parahaemolyticus* under normal (iron-replete) and iron-excess conditions, and reduced its sensitivity to iron restriction. The intracellular iron content in Δfur was significantly lower than that in the WT and $C\Delta fur$ strains. Fur regulated the oxidative stress response in *V. parahaemolyticus*. Fur played no significant role in the virulence of *V. parahaemolyticus* in the zebrafish model. The expression of multiple genes related to iron uptake, iron storage, and type III secretion system 1 (T3SS1) was significantly upregulated, whereas genes encoding iron-containing proteins and type VI secretion system 2 (T6SS2) components were significantly downregulated in Δfur . [Conclusion] Fur regulates iron homeostasis and oxidative stress response in *V. parahaemolyticus*, but does not affect its virulence in zebrafish.

Keywords: *Vibrio parahaemolyticus*; Fur; iron homeostasis; oxidative stress response; virulence; regulation

副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)是一种革兰氏阴性菌,广泛分布于河口、海洋及沿海环境中^[1]。近年来,研究者也已从多种淡水食品中分离到该菌^[2]。副溶血弧菌是一种食源性致病菌,人类主要通过食用被该菌污染的生食或未充分烹煮的海产品而感染,进而引发急性胃肠炎等疾病^[1]。患有基础疾病的患者感染该菌后病

情可能进展为败血症,具有较高的死亡风险^[3]。副溶血弧菌是我国食品中最常见的食源性致病菌之一,也是我国尤其是沿海地区食源性疾病的重要病原菌^[4-5]。在美国,每年约有 50 000 人感染该菌^[6]。此外,副溶血弧菌还能感染多种水生动物,给水产养殖业带来严重威胁^[7]。

副溶血弧菌的毒力因子主要包括溶血素、

III型分泌系统(type III secretion system, T3SS)、VI型分泌系统(type VI secretion system, T6SS)和黏附素等^[8]。耐热直接溶血素(thermostable direct hemolysin, TDH)和TDH相关溶血素(TDH-related hemolysin, TRH)具有溶血活性、细胞毒性、心脏毒性和肠毒性,通常被认为是副溶血弧菌的主要毒力因子^[9]。T3SS1位于副溶血弧菌的第1号染色体上,存在于几乎所有的临床和环境分离株中。该系统能将效应蛋白VopQ等注入宿主细胞,引起细胞毒性^[10]。T3SS2位于第2号染色体的致病岛上,主要存在于临床分离株中,其效应蛋白能引起细胞毒性和肠毒性^[11]。T6SS1位于第1号染色体上,主要存在于临床分离株中,与黏附和种间竞争有关^[12-13]。T6SS2位于第2号染色体上,存在于临床和环境分离株中,与黏附和诱导巨噬细胞自噬有关^[12,14]。副溶血弧菌的黏附素,如MAM7^[15]和VpadF^[16]在其致病过程中发挥着重要作用。

铁在地壳中含量丰富,是几乎所有生物所必需的微量元素^[17]。作为多种金属蛋白的组成成分,铁在氧感应、电子传递和催化等生化反应中发挥着关键作用^[18]。然而,环境中铁的生物可利用性较低,因为在中性、有氧水体环境中铁容易与其他物质形成难溶的复合物^[19]。在哺乳动物宿主体内,铁被乳铁蛋白等铁结合蛋白螯合,形成“营养免疫”屏障,从而限制细菌对铁的摄取^[20]。另一方面,过量铁具有毒性,可通过芬顿反应催化生成活性氧,造成细菌损伤甚至死亡^[21]。因此,细菌须严格调控胞内铁含量,使其维持在合适的水平。

在革兰氏阴性菌中,铁稳态主要由铁摄取调节因子(ferric uptake regulator, Fur)调控^[22]。Fur蛋白不仅调控铁摄取,还影响细菌的生长、代谢和毒力等生物学过程。在鼠伤寒沙门菌中,Fur通过直接结合 $clpV$ 的启动子抑制T6SS功能,并对细菌的致病性至关重要^[23]。在铜绿假单胞菌中,Fur是菌落形成所必需的,但对生物膜形成及在昆虫模型中的致病性并非必需^[24]。

在霍乱弧菌中,Fur不仅通过调节铁摄取系统来维持铁稳态,还通过调节毒力因子的表达来影响细菌的致病性^[25]。在灿烂弧菌中,Fur调控毒力基因的表达、集群运动及生物膜形成,影响其对仿刺参的致病性^[26]。在哈维弧菌中,Fur影响生物膜形成、集群运动、黏附和毒力^[27]。在鳗弧菌中,Fur通过直接或间接调控铁摄取系统、氧化应激相关基因和毒力因子,维持铁稳态并增强鳗弧菌的致病性^[28]。然而,副溶血弧菌中Fur蛋白的功能尚不明确。

本研究构建了副溶血弧菌*fur*基因缺失株及相应回补株,通过生长曲线测定、电感耦合等离子体质谱(inductively coupled plasma mass spectrometry, ICP-MS)分析、斑马鱼存活率测定和竞争感染试验、转录组测序(RNA sequencing, RNA-seq)等方法,探究了Fur蛋白对副溶血弧菌铁稳态、氧化应激反应和毒力的影响,以期阐明副溶血弧菌铁稳态调控机制。

1 材料与方法

1.1 菌株、质粒及培养条件

本研究所用菌株和质粒见表1。副溶血弧菌野生株(WT) RIMD 2210633^[29]、基因缺失株 Δfur 及回补株 $C\Delta fur$ 使用胰蛋白胨大豆琼脂(tryptic soy agar, TSA)或胰蛋白胨大豆肉汤(tryptic soy broth, TSB)(均为BD公司产品)培养。使用铁螯合剂2,2'-联吡啶(2,2'-dipyridyl, Sigma-Aldrich公司)制备铁限制培养基。大肠杆菌DH5 α λpir 和S17-1 λpir 使用LB培养基[生工生物工程(上海)股份有限公司]于37℃培养。必要时向培养基中添加羧苄青霉素(50 μg/mL)或氯霉素(25 μg/mL)。

1.2 生物信息学分析

通过美国国家生物技术信息中心(NCBI)网站获取副溶血弧菌、霍乱弧菌等多种细菌的Fur蛋白序列。使用BLASTp工具分析副溶血弧菌Fur蛋白与这些同源蛋白的氨基酸序列一致性。

使用 Swiss-Model^[32]预测副溶血弧菌 Fur 蛋白的三维结构，使用 Clustal Omega 进行多序列比对，并使用 ESPrnt 3.2^[33]呈现比对结果。

1.3 *fur* 基因缺失株及回补株构建

本研究所用引物见表 2。利用 *sacB* 基因的蔗糖致死特性和同源重组技术构建 *fur* 基因缺失株 Δfur 。以副溶血弧菌 RIMD 2210633 菌液为模板，使用引物 L1/L2 和 R1/R2 分别扩增 *fur* 基因

的上下游同源臂。PCR 反应体系：2×PrimeSTAR Max [宝日医生物技术(北京)有限公司] 25 μ L，引物 1 和 2 (10 μ mol/L) 各 2 μ L，模板 1 μ L，H₂O 20 μ L。PCR 反应条件：98 $^{\circ}$ C 5 min；98 $^{\circ}$ C 10 s，55 $^{\circ}$ C 15 s，68 $^{\circ}$ C 45 s，共 30 个循环；68 $^{\circ}$ C 1 min；16 $^{\circ}$ C 保存。通过重叠 PCR 技术将上下游同源臂融合成一个线性 DNA 片段。将该 DNA 片段与自杀性质粒 pDM4^[30]进行双酶切并连接，构建重组自杀性质粒 pDM4- Δfur 。将

表1 本研究所用的菌株和质粒

Table 1 Bacterial strains and plasmids used in this study

Strain or plasmid	Relevant characteristics	Source or reference
Strains		
<i>V. parahaemolyticus</i>		
RIMD 2210633	Clinical isolate from a diarrhea patient in Japan (1996), serotype O3:K6, Carb ^R	[29]
Δfur	<i>fur</i> deletion mutant of RIMD 2210633, Carb ^R	This study
C Δfur	Complementation strain of Δfur , Carb ^R , Cm ^R	This study
<i>E. coli</i>		
DH5 α λpir	Cloning host for recombinant vector	Laboratory collection
S17-1 λpir	Conjugal donor for recombinant vector	Laboratory collection
Plasmids		
pDM4	Suicide vector containing a <i>sacB</i> counterselectable marker, Cm ^R	[30]
pDM4- Δfur	Knockout vector for <i>fur</i> deletion, Cm ^R	This study
pMMB207	Wide-host-range low-copy-number vector, Cm ^R	[31]
pMMB207- <i>fur</i>	pMMB207 containing <i>fur</i> and a ribosome-binding site, Cm ^R	This study

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

Primer names	Primer sequences (5'→3')	Amplicon size/bp
L1	TCCCCCGGGTTGAAGTGGGCGCTGTAG	758
L2	GGTCTAAAAGCCAGATGCGCACAAACC	
R1	GCGCATCTGGCTTTTAGACCCGCACTCCTT	734
R2	GCTCTAGACGTTACCGCCTCTTCTTCT	
in1	TGGTCGTGGTGATGTTGAG	185
in2	CCAGACTGCCAGCACATC	
out1	CGGTTGGCCTACGTGATA	821/441
out2	GCAGTCCATGCCCTCTCT	
C1	CGGAATTCTAAGGAGGTAGGATAATAATGTCAGATAATAATCAGGCGC	450
C2	CGGGATCCTTATTTTGCAGGTTTGTGCG	

The underlined sequences are restriction sites.

pDM4- Δfur 转化至大肠杆菌 S17-1 λpir 感受态细胞中, 并通过接合转移至 RIMD 2210633 中。在添加羧苄青霉素和氯霉素(双抗)的 TSA 平板上筛选接合子。挑取单菌落接种于添加双抗的 TSB 培养基中培养 12 h, 将培养物划线接种于添加 15% 蔗糖的 TSA 平板上。挑取蔗糖平板上的单菌落, 通过 PCR 检测 *fur* 基因的缺失情况。

以 RIMD 2210633 菌液为模板, 使用引物 C1/C2 扩增 *fur* 基因及核糖体结合位点。PCR 反应体系: 2×PrimeSTAR Max 25 μ L, 引物 C1 和 C2 (10 μ mol/L)各 2 μ L, 模板 1 μ L, H₂O 20 μ L。PCR 反应条件: 98 $^{\circ}$ C 5 min; 98 $^{\circ}$ C 10 s, 55 $^{\circ}$ C 15 s, 68 $^{\circ}$ C 30 s, 共 30 个循环; 68 $^{\circ}$ C 1 min; 16 $^{\circ}$ C 保存。将 PCR 产物与广宿主表达质粒 pMMB207^[31]进行双酶切并连接, 构建重组质粒 pMMB207-*fur*。将 pMMB207-*fur* 转化至大肠杆菌 S17-1 λpir 中, 再通过接合转移至 Δfur 中。在添加双抗的 TSA 平板上筛选回补株 C Δfur , 并通过 PCR 进行验证。

1.4 生长曲线测定

将副溶血弧菌 WT、 Δfur 和 C Δfur 分别划线接种于添加 100 μ mol/L 2,2'-dipyridyl 的 TSA 平板上, 于 37 $^{\circ}$ C 培养 12 h。挑取单菌落, 接种于添加 100 μ mol/L 2,2'-dipyridyl 预处理的 TSB 培养基 (3 mL)中, 于 30 $^{\circ}$ C、220 r/min 培养 12 h。取 1 mL 培养物, 6 000 r/min 离心 5 min 收集菌体, 用 PBS 重悬并调整细菌浓度至 1×10^9 CFU/mL, 得到种子液。

将种子液按照 1:100 的比例分别转接至以下 TSB 培养基中: (1) 不含任何添加物的 TSB 培养基; (2) 添加不同浓度 FeSO₄ (0、1、2 mmol/L) 的 TSB 培养基; (3) 添加不同浓度 2,2'-dipyridyl 预处理 (0、75、100 μ mol/L) 的 TSB 培养基; (4) 添加不同浓度 H₂O₂ (75、100 μ mol/L) 的 TSB 培养基; (5) 经 100 μ mol/L 2,2'-dipyridyl 预处理后再添加不同浓度 H₂O₂ (75、100 μ mol/L) 的 TSB 培养基。由于亚铁易于氧化, FeSO₄ 母液现用现配, 且在添加 FeSO₄ 的培养基中同时添加柠檬

酸钠[trisodium citrate dihydrate (TCD), 1 g/L]以减少铁的沉淀^[34]。将培养物分装于 96 孔细胞培养板中 (每孔 200 μ L, 设置 3 孔重复), 于 37 $^{\circ}$ C、120 r/min 培养 9 h。每隔 1 h 使用 CMax Plus 酶标仪[美谷分子仪器(上海)有限公司]测定 OD₅₉₅ 值, 生长速率(μ)如公式(1)所示。

$$\mu = \Delta OD_{595} / \Delta t \quad (1)$$

式中: ΔOD_{595} 为相邻 2 个时间点的 OD₅₉₅ 差值, Δt 为对应的时间间隔 (1 h)。最大生长速率 ($\mu_{\max}$) 取各时间段 μ 值中的最大值。实验独立重复 3 次。

1.5 金属含量测定

称取适量 TSB 粉末, 经 66% 硝酸消解后, 用去离子水稀释至硝酸浓度为 2%, 通过 ICP-MS 测定铁含量。根据 TSB 培养基配方 (30 g 粉末溶于 1 L 去离子水) 换算得出 TSB 培养基中的铁浓度。按照 1.4 节的方法制备副溶血弧菌 WT、 Δfur 和 C Δfur 的种子液。将种子液按照 1:100 的比例转接至 TSB 培养基中, 于 37 $^{\circ}$ C、220 r/min 培养 6 h。取 40 mL 培养物, 10 000 r/min 离心 10 min 收集菌体, 按照文献[35]中的方法处理样品, 并通过 ICP-MS 测定胞内金属含量。实验独立重复 4 次。

1.6 斑马鱼感染实验

斑马鱼 (3–4 月龄, AB 品系) 购自上海费曦生物科技有限公司。本研究所有动物实验获得扬州大学实验动物福利伦理委员会批准, 编号为 202307019。

存活率测定: 按照 1.4 节的方法制备副溶血弧菌 WT 和 Δfur 的种子液。将 30 条斑马鱼随机分为 3 组, 用 1% 间氨基苯甲酸乙酯甲磺酸盐 (MS-222, Sigma-Aldrich 公司) 麻醉后, 分别通过腹腔注射 10 μ L WT、 Δfur 种子液或 PBS。感染后每隔 12 h 观察 1 次, 连续观察 7 d, 记录斑马鱼存活情况。

竞争感染试验: 按照 1.4 节的方法制备副溶血弧菌 WT 和 Δfur 的种子液, 并按照 1:1 的比

例混合。将 6 条斑马鱼用 MS-222 麻醉后, 通过腹腔注射 5 μ L 混合液。在感染后 24 h, 将斑马鱼麻醉后处死, 取肠道组织, 加入 1 mL PBS, 用组织破碎仪匀浆后划线接种于添加 100 μ mol/L 2,2'-dipyridyl 的硫代硫酸盐柠檬酸盐胆盐蔗糖琼脂培养基(thiosulfate citrate bile salts sucrose agar culture medium, TCBS, BD 公司)上, 于 37 $^{\circ}$ C 培养至长出单菌落。随机挑取每条斑马鱼样品中的 90–100 个单菌落, 通过菌落 PCR 确定 Δfur 与 WT 的比值。PCR 反应体系: 2 $\times$ Rapid Taq Master Mix (南京诺唯赞生物科技股份有限公司) 10 μ L, 引物 out1 和 out2 (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, 共 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 1 min; 16 $^{\circ}$ C 保存。竞争指数(competitive index, CI)计算如公式(2)所示。

$$CI = \frac{\text{样品中 } \Delta fur \text{ 与 WT 的比值}}{\Delta fur \text{ 与 WT 的比值}} \quad (2)$$

1.7 RNA 提取

按照 1.4 节的方法制备副溶血弧菌 WT 和 Δfur 的种子液。将种子液按照 1:100 的比例转接至 TSB 培养基中, 于 37 $^{\circ}$ C、220 r/min 培养至 OD₆₀₀ 约为 0.6–1.0。取 1 mL 培养物, 12 000 r/min 离心 2 min 收集菌体, 随后用 Eastep Super 总 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。通过 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的完整性, 并使用微量分光光度计 Nano-200 (杭州奥盛仪器有限公司)测定 RNA 浓度。实验独立重复 3 次, 以获得 3 份独立的 RNA 样品。

1.8 RNA 测序

RNA 样品经检测合格后, 送至安升达公司进行转录组测序。rRNA 去除、文库构建和 Illumina 测序由安升达公司协助完成。差异表达基因的筛选标准为变化倍数 ≥ 2 且修正后 P 值 (P_{adj}) < 0.05 。将差异表达基因列表提交至 DAVID

数据库(<https://davidbioinformatics.nih.gov/>)进行基因本体论(gene ontology, GO)富集分析。转录组数据已提交至国家生物信息中心 GSA 数据库, 登录号为 CRA034515。

1.9 数据统计及分析

实验数据采用 GraphPad Prism 10.6.1 软件进行分析。生长曲线相关数据(最大生长速率 μ_{max} 、最高 OD₅₉₅ 值)和 ICP-MS 数据使用单因素方差分析, 并通过 Bonferroni 法进行事后多重比较。斑马鱼存活率测定数据采用 log-rank 检验分析, 竞争感染试验数据用双尾配对 t 检验进行分析。除斑马鱼存活率测定外, 实验结果均以平均值 $\pm$ 标准差(mean $\pm$ SD)表示。*表示 $P < 0.05$; **表示 $P < 0.01$; ns 表示无显著差异。补充材料已上传至 ScienceDB 数据库(<https://www.scidb.cn/s/n6fuqu>), CSTR 编号为 31253.11.sciencedb.j00231.00059。

2 结果与分析

2.1 Fur 蛋白在部分革兰氏阴性菌中高度保守

BLASTp 结果显示, 副溶血弧菌 Fur 蛋白与霍乱弧菌、创伤弧菌、鳗弧菌、哈维弧菌和灿烂弧菌中同源蛋白的氨基酸序列一致性分别为 92.67%、95.89%、89.93%、95.97% 和 91.95%。此外, 该蛋白与大肠杆菌、鼠伤寒沙门菌和铜绿假单胞菌中同源蛋白的氨基酸序列一致性分别为 80.14%、79.73% 和 57.94%。多序列比对结果显示, 这些细菌的 Fur 蛋白具有多个保守基序和位点(图 1)。Swiss-Model 预测, 副溶血弧菌 Fur 蛋白含有 5 个 α 螺旋、6 个 β 折叠和 1 个 η 螺旋(图 1)。

2.2 fur 基因缺失株和回补株的构建

为探究副溶血弧菌 Fur 蛋白的功能, 以副溶血弧菌 RIMD 2210633 菌株为亲本株构建了 *fur*

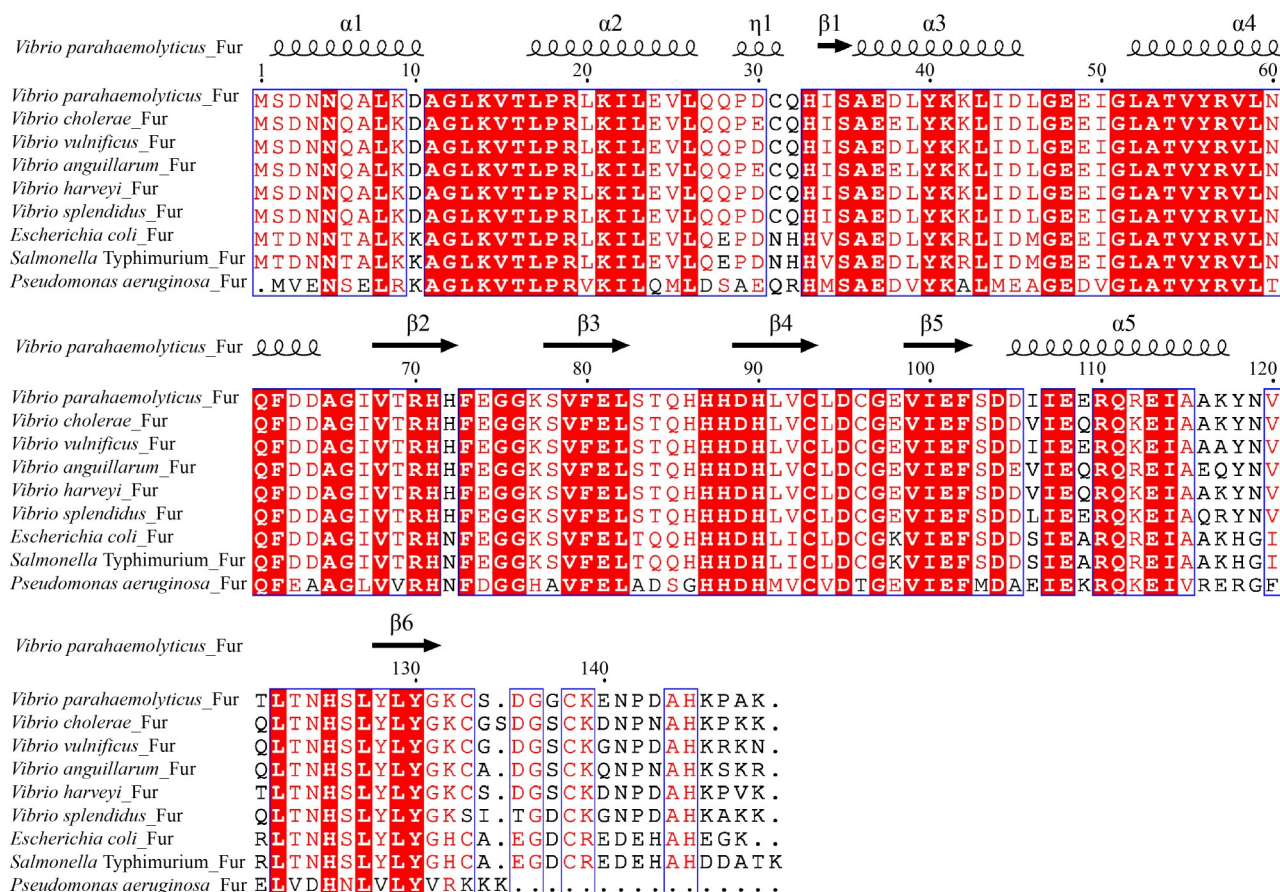


图1 FUR蛋白的多序列比对

Figure 1 Multiple sequence alignment of the Fur homologues. The GenBank accession numbers are as follows: *Vibrio parahaemolyticus* Fur, WP_005489847.1; *Vibrio cholerae* Fur, WP_001282826.1; *Vibrio vulnificus* Fur, ADV87235.1; *Vibrio anguillarum* Fur, WP_010318689.1; *Vibrio harveyi* Fur, AIV04866.1; *Vibrio splendidus* Fur, WP_004734226.1; *Escherichia coli* Fur, NP_415209.1; *Salmonella* Typhimurium Fur, NP_459678.1; and *Pseudomonas aeruginosa* Fur, NP_253452.1. The predicted secondary structures of *V. parahaemolyticus* Fur are shown at the top.

基因缺失株 Δfur ，并进一步构建了 Δfur 的回补株 $C\Delta fur$ 。构建成功的菌株通过 PCR 进行验证。如图 2 所示，使用基因内部引物 in1/in2 进行 PCR 扩增，WT 和 $C\Delta fur$ 能扩增出 185 bp 的目的条带，而 Δfur 不能；使用基因外部引物 out1/out2 进行 PCR 扩增，WT 能扩增出 821 bp 的大条带，而 Δfur 和 $C\Delta fur$ 仅能扩增出 441 bp 的小条带。上述结果表明， Δfur 和 $C\Delta fur$ 构建成功。

2.3 *fur* 基因缺失减弱副溶血弧菌在正常培养(铁充足)条件下的生长

为评估 *fur* 基因缺失对副溶血弧菌生长的影响，将副溶血弧菌 WT、 Δfur 和 $C\Delta fur$ 分别划线接种于 TSA 平板上，于 37 °C 培养 12 h。结果显示， Δfur 形成的菌落明显小于 WT 和 $C\Delta fur$ ，而 $C\Delta fur$ 与 WT 形成的菌落大小相当(图 3A)。进一步将副溶血弧菌 WT、 Δfur 和 $C\Delta fur$ 接

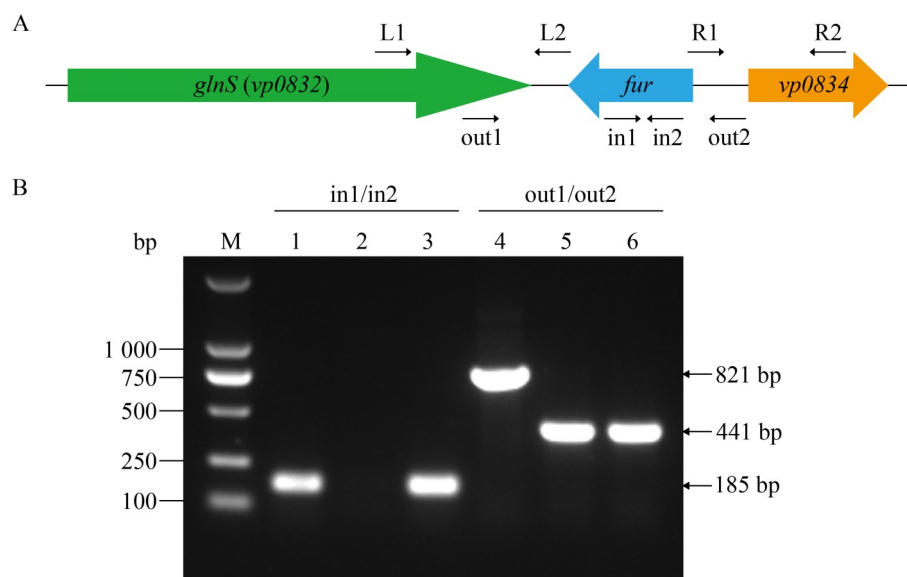


图2 *FUR*基因缺失株和回补株的PCR鉴定

Figure 2 PCR identification of *fur* deletion mutant and complemented strains. A: Positions of the primers used for the construction and identification of Δfur ; B: PCR amplification of genomic DNA from the WT strain (lanes 1 and 4), Δfur (lanes 2 and 5), and $C\Delta fur$ (lanes 3 and 6) using the primer pairs in1/in2 and out1/out2, respectively. Lane M: DL2000 DNA marker.

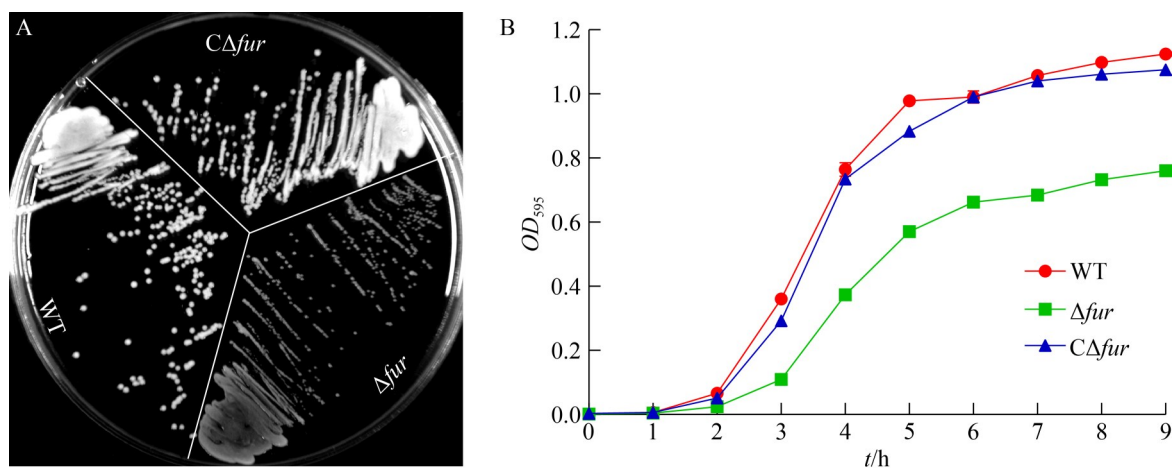


图3 副溶血弧菌各菌株在TSA (A)和TSB (B)培养基中的生长情况

Figure 3 Growth of *Vibrio parahaemolyticus* strains on TSA (A) and in TSB (B). Data in (B) are presented as mean $\pm$ SD from three independent experiments.

种于 TSB 培养基中, 测定各菌株的生长曲线。结果显示, Δfur 的最大生长速率和最高 OD_{595} 值均显著低于 WT 和 $C\Delta fur$ (图 3B)。ICP-MS 测定结果显示, TSB 培养基中的铁浓度

为 $10.9 \mu\text{mol/L}$, 高于弧菌属最适生长所需的铁浓度($0.1\text{--}5.0 \mu\text{mol/L}$)^[36]。上述结果说明, *fur* 基因缺失影响副溶血弧菌在正常培养(铁充足)条件下的生长。

2.4 *fur* 基因缺失降低副溶血弧菌对铁限制的敏感性

为探究 Fur 在副溶血弧菌铁稳态中的作用, 将副溶血弧菌 WT、 Δfur 和 $C\Delta fur$ 接种于不同铁含量的 TSB 培养基中, 测定各菌株在铁过量和铁限制条件下的生长曲线。在不额外添加 FeSO_4 , 或添加 1、2 mmol/L FeSO_4 的 TSB 培养基中, Δfur 的最大生长速率和最高 OD_{595} 值均显著低于 WT 和 $C\Delta fur$, 但与正常培养(铁充足)条件相比, 铁过量并未明显加重 Δfur 的生长缺陷(图 4A–4C)。然而, 在添加 2,2'-dipyridyl 预处理的 TSB 培养基中, WT 和 $C\Delta fur$ 的生长速率和最高 OD_{595} 值相较于对照组(添加无水乙醇, 即 2,2'-dipyridyl 的溶剂, 预处理)明显下降, 而 Δfur 的生长缺陷程度无明显

变化, 导致 3 种菌株的生长曲线趋于一致(图 4D–4F)。上述结果表明, *fur* 基因缺失降低了副溶血弧菌对铁限制的敏感性。

2.5 *fur* 基因缺失影响副溶血弧菌菌体内铁的积累

为探究 Fur 影响副溶血弧菌铁稳态的机制, 将副溶血弧菌 WT、 Δfur 和 $C\Delta fur$ 接种于 TSB 培养基中, 培养 6 h 后收集菌体, 采用 ICP-MS 法测定胞内铁含量。结果显示, WT、 Δfur 和 $C\Delta fur$ 胞内铁含量分别为 (85.96 ± 5.276) 、 (74.81 ± 2.822) 、 (88.30 ± 4.522) $\mu\text{g Fe/g}$ 细胞(干重); Δfur 胞内铁含量显著低于 WT 和 $C\Delta fur$ (图 5A)。此外, 本研究还测定了各菌株菌体内的锌含量。结果显示, Δfur 菌体内的锌含量 $[(11.10 \pm 1.448) \mu\text{g Zn/g}$ 细胞(干重)]与 WT $[(11.77 \pm 0.468) \mu\text{g Zn/g}$ 细胞

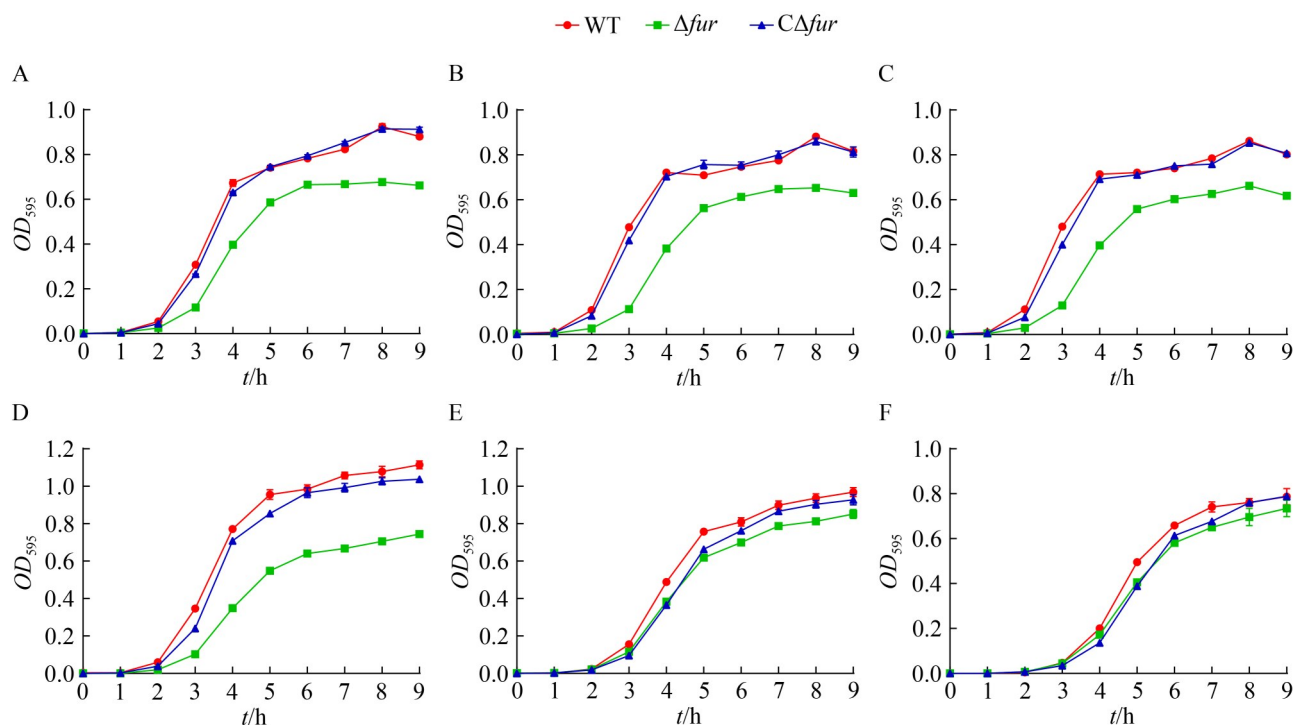


图4 副溶血弧菌各菌株在铁充足和铁限制条件下的生长情况

Figure 4 Growth of *Vibrio parahaemolyticus* strains under iron-replete and iron-restricted conditions. A: 1 g/L TCD+ H_2O ; B: 1 g/L TCD+1 mmol/L FeSO_4 ; C: 1 g/L TCD+2 mmol/L FeSO_4 ; D: Absolute ethanol (the solvent of 2,2'-dipyridyl); E: 75 $\mu\text{mol/L}$ 2,2'-dipyridyl; F: 100 $\mu\text{mol/L}$ 2,2'-dipyridyl. TCD was supplemented to the medium to alleviate iron precipitation. Data are presented as mean $\pm$ SD from three independent experiments.

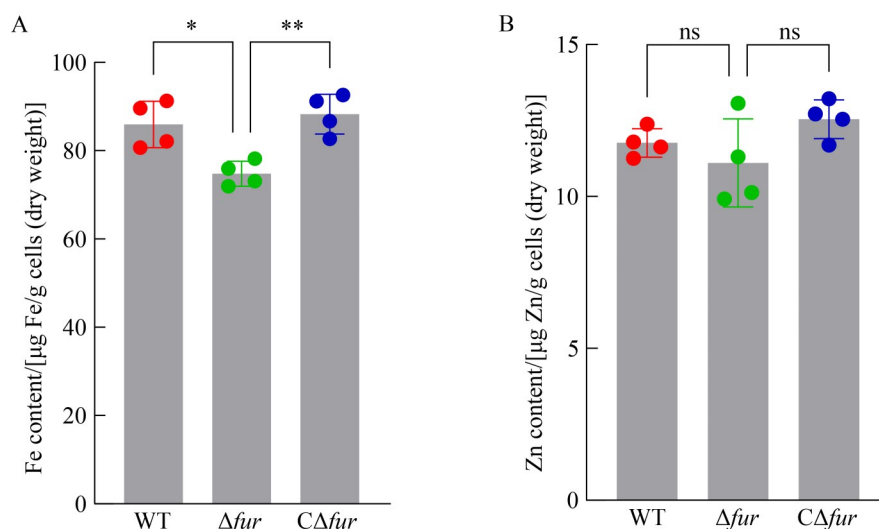


图5 副溶血弧菌各菌株胞内金属含量分析

Figure 5 Analysis of intracellular metal content in *Vibrio parahaemolyticus* strains. A: Iron content; B: Zinc content. *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ns: No significant difference. Data are presented as mean $\pm$ SD from four independent experiments.

(干重)]和 $C\Delta fur$ [(12.54 $\pm$ 0.633) $\mu\text{g Zn/g}$ 细胞(干重)]相比无显著差异(图 5B)。上述结果表明, *fur* 基因缺失显著降低了副溶血弧菌胞内铁含量。

2.6 Fur 调控副溶血弧菌的氧化应激反应

为探究 Fur 对副溶血弧菌氧化应激反应的影响,将副溶血弧菌 WT、 Δfur 和 $C\Delta fur$ 接种于添加 H_2O_2 的 TSB 培养基中,测定各菌株在氧化应激条件下的生长曲线。结果显示,在添加 75、100 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 的 TSB 培养基中, Δfur 的最大生长速率和最高 OD_{595} 值均显著低于 WT 和 $C\Delta fur$ (图 6A、6B)。然而,与正常培养条件下的生长曲线(图 3B)相比,添加 H_2O_2 并未明显加重 Δfur 的生长抑制程度。考虑到 Δfur 在 TSB 培养基中已表现出生长缺陷, H_2O_2 的影响可能被掩盖。

为排除铁含量因素的干扰,在铁限制条件下重复了该实验。在经 100 $\mu\text{mol/L}$ 2,2'-dipyridyl 预处理的 TSB 中,添加 75 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 后 Δfur 的最大生长速率与 WT 和 $C\Delta fur$ 无显著差异,但

最高 OD_{595} 值显著低于 WT 和 $C\Delta fur$ (图 6C);添加 100 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 后, Δfur 的最大生长速率和最高 OD_{595} 值均显著低于 WT 和 $C\Delta fur$ (图 6D)。上述结果表明, Fur 参与调控副溶血弧菌的氧化应激反应。

2.7 Fur 对副溶血弧菌在斑马鱼模型中的毒力无显著影响

利用斑马鱼存活率测定和竞争感染试验探究 Fur 对副溶血弧菌致病性的影响。感染后 12 h, WT 组有 1 条斑马鱼死亡;感染后 24 h, WT 组再有 4 条斑马鱼死亡, Δfur 组有 3 条斑马鱼死亡;感染后 36 h, WT 组再有 1 条斑马鱼死亡(图 7A)。最终, WT 组斑马鱼存活率为 40%, Δfur 组为 70%, PBS 组无斑马鱼死亡。 Δfur 组与 WT 组斑马鱼存活率无显著差异。竞争感染试验结果显示, Δfur 与 WT 的 CI 为 1.004 $\pm$ 0.131,与 1 (表示同等竞争力)相比无显著差异(图 7B)。上述结果表明, *fur* 基因缺失对副溶血弧菌在斑马鱼模型中的毒力无显著影响。

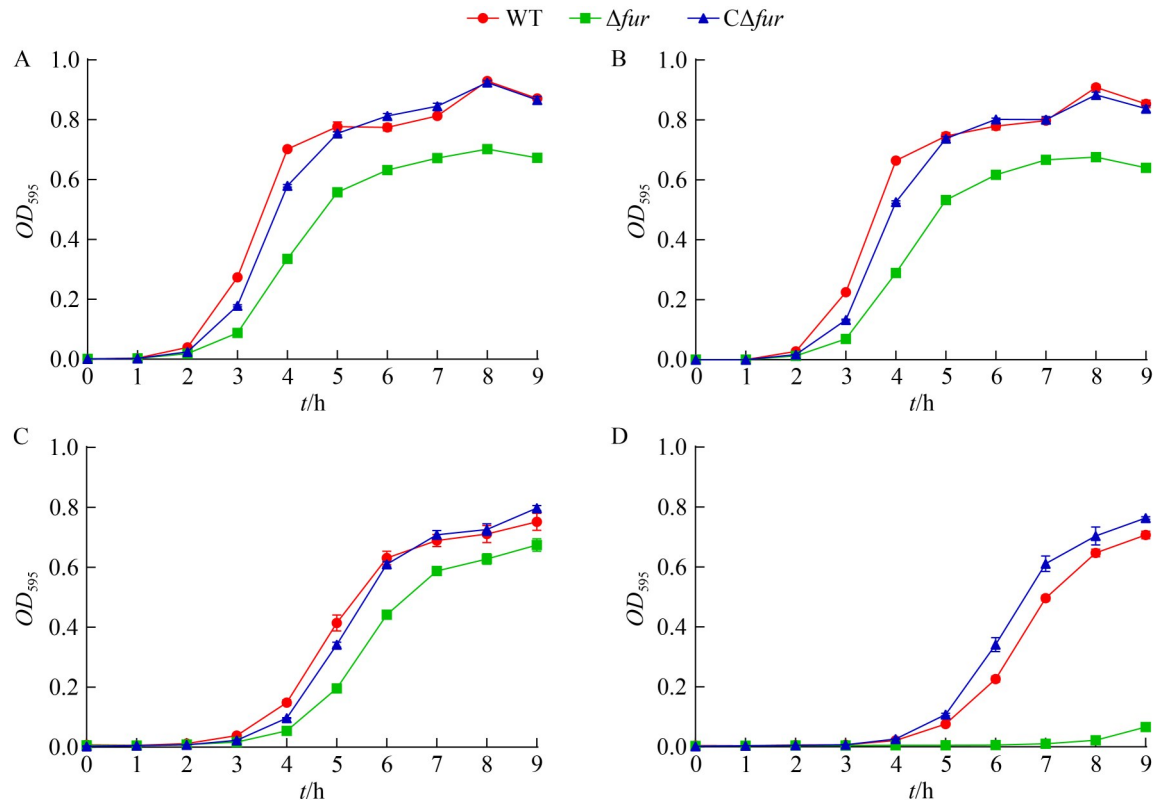


图6 副溶血弧菌各菌株在氧化应激条件下的生长情况

Figure 6 Growth of *Vibrio parahaemolyticus* strains under oxidative stress conditions. A: TSB+75 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 ; B: TSB+100 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 ; C: 2,2'-dipyridyl (100 $\mu\text{mol/L}$)-pretreated TSB+75 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 ; D: 2,2'-dipyridyl (100 $\mu\text{mol/L}$)-pretreated TSB+100 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 . Data are presented as mean $\pm$ SD from three independent experiments.

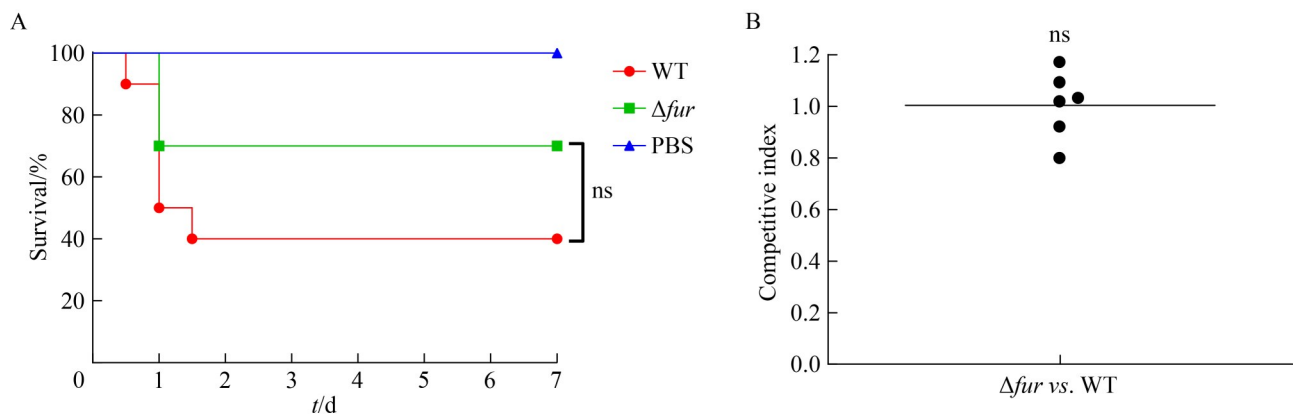


图7 野生株和 Δfur 在斑马鱼模型中的毒力比较

Figure 7 Virulence comparison of the WT and Δfur strains in a zebrafish model. A: Survival of zebrafish infected with the WT and Δfur strains; B: Competition between Δfur and the WT strain in the colonization of the zebrafish intestine. ns: no significant difference.

2.8 Δfur 中多种铁摄取、铁储存和 T3SS1 相关基因显著上调表达, 含铁蛋白和 T6SS2 相关基因显著下调表达

通过 RNA 测序比较副溶血弧菌 WT 和 Δfur 的转录谱。结果显示, 与 WT 相比, Δfur 中有 820 个基因显著差异表达, 约占副溶血弧菌基因总数的 18%; 其中 523 个基因上调表达, 297 个基因下调表达(图 8A)。如图 8B 所示, 差异表达基因可显著富集至 3 个 GO 类别, 包括属于生物过程(biological process, BP)的通过 III 型分泌系统的蛋白质分泌(protein secretion by the type III secretion system)、属于分子功能(molecular function, MF)的 RNA 解旋酶活性(RNA helicase activity)和铁载体摄取跨膜转运蛋白活性(siderophore uptake transmembrane transporter activity)。

多种铁摄取相关基因显著上调表达, 包括亚铁转运系统 Feo (*feoABC*)、TonB/ExbBD 能量转导系统、多种 TonB 依赖型外膜受体(铁载体受体、血红素受体等)、内膜铁/血红素 ABC 转运系统、血红素利用基因(*hutW/X/Z*)以及铁载体合成基因(*pvsB*、*pvsD* 等), 表明在副溶血弧菌中 Fur 负调控铁摄取系统。同时, 铁储存相关基因, 包括编码细菌铁蛋白的 *bfr* 和编码细菌铁蛋白相关铁氧还蛋白的 *bfd*, 在 Δfur 中也显著上调表达。

与铁摄取、铁储存相关基因显著上调表达形成鲜明对比, Δfur 中大量编码含铁蛋白的基因显著下调表达, 涵盖呼吸链组分(*cbb3* 型细胞色素 c 氧化酶基因 *ccoN/O/P*、泛醌氧化酶基因 *cydA*、 Na^+ 转运型 NADH: 泛醌还原酶基因 *nqrB-F*、多种细胞色素 c 基因)、TCA 循环含铁酶(琥珀酸脱氢酶基因 *sdhABCD* 和乌头酸酶基因 *acnB*)、铁依赖型超氧化物歧化酶基因 *sodB*、过氧化氢酶基因 *katG* 以及黄素血红蛋白基因 *hmpA* 等。值得注意的是, Δfur 中出现了含铁与非含铁同工酶之间的表达切换现象: 含[4Fe-4S]簇的

I 类延胡索酸水合酶基因(*VP_RS09125*)显著下调表达(0.15 倍), 而不含铁的 II 类延胡索酸水合酶基因(*VP_RS14130*)显著上调表达(77.44 倍); 铁依赖型超氧化物歧化酶基因 *sodB* (*VP_RS10295*)显著下调表达(0.08 倍), 而非铁依赖型超氧化物歧化酶基因(*VP_RS14070*)显著上调表达(6.03 倍)。

此外, 绝大多数 T3SS1 相关基因显著上调表达, 而许多 T6SS2 相关基因显著下调表达。上述结果表明, 副溶血弧菌 Fur 在调控铁摄取、铁储存、含铁蛋白合成以及 T3SS1 和 T6SS2 表达方面发挥着重要作用。

3 讨论与结论

金属对生物的生存至关重要, 然而过量的金属却具有毒性作用。因此, 细菌必须精密调控菌体内金属稳态^[37]。副溶血弧菌维持锌^[35,38]、铜^[39]、钴^[40]等金属稳态的机制已得到初步阐明, 但其维持铁稳态的分子机制尚不明确。本研究探究了 Fur 在副溶血弧菌中的功能, 结果表明, Fur 调控副溶血弧菌的铁稳态和氧化应激反应, 但不影响其在斑马鱼模型中的毒力。

生物信息学分析表明, Fur 蛋白在部分革兰氏阴性菌中高度保守, 尤其是副溶血弧菌 Fur 蛋白与其他弧菌中同源蛋白的氨基酸序列一致性接近或超过 90%。这表明 Fur 蛋白在这些细菌中可能具有类似的功能。在正常培养(铁充足)和铁过量条件下, 相较于 WT 和 $C\Delta fur$, Δfur 表现出明显的生长缺陷, 说明 Fur 有利于副溶血弧菌在正常培养和铁过量条件下的生长。此外, 在铁限制条件下, Δfur 的生长缺陷未明显加重, 而 WT 和 $C\Delta fur$ 的生长均受到抑制, 其生长曲线与 Δfur 趋于一致。其可能原因是, 在正常培养和铁过量条件下 WT 和 $C\Delta fur$ 能有效维持铁稳态, 而 Δfur 因编码含铁蛋白的基因下调表达而不能有效利用铁; 在铁限制条件下, 由于环境中铁的缺乏, WT 和 $C\Delta fur$ 不能有效获取铁, 从而导致 3 个菌株的生长趋于一致。这一推测得到了后续 ICP-MS 结果的支持: 在正常培养条

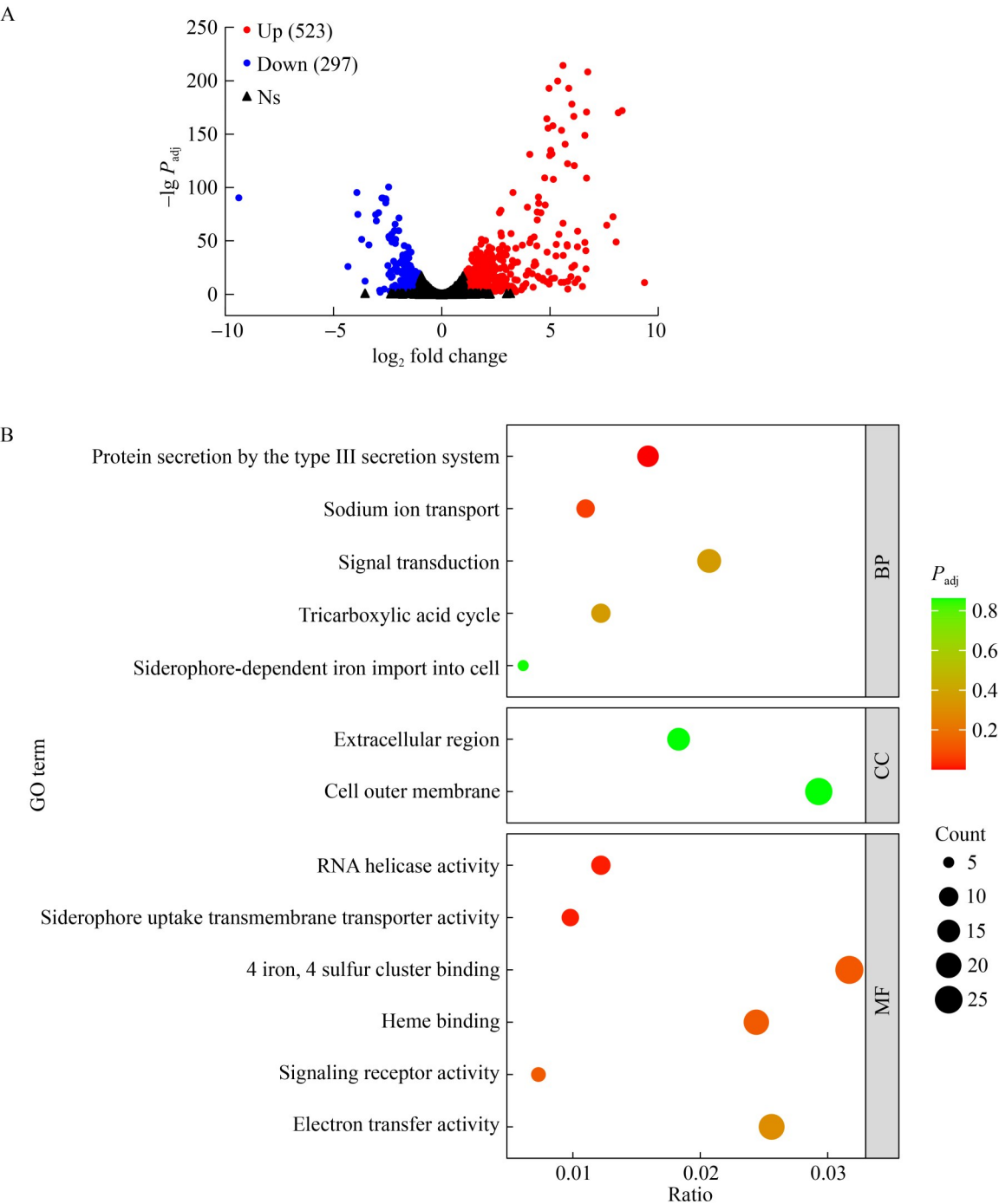


图8 RNA测序分析 Δfur 的差异表达基因

Figure 8 RNA sequencing analysis of the differentially expressed genes (DEGs) in Δfur . A: A volcano plot of the DEGs in Δfur compared to the WT strain (Up, down, and ns represent the upregulated genes, downregulated genes, and non-differentially expressed genes, respectively); B: Gene ontology (GO) term enrichment analysis of the DEGs (GO terms with an $P_{adj}<0.05$ were considered significantly enriched. BP, CC, and MF represent the biological process, cellular component, and molecular function, respectively).

件下, Δfur 菌体内积累的铁含量显著低于 WT 和 $C\Delta fur$ 。

在铜绿假单胞菌中, Δfur 对 H_2O_2 的敏感性显著升高^[41]。在鳗弧菌中, *fur* 基因缺失损害了细菌在 H_2O_2 存在情况下的生长^[28]。因此, 本研究还评估了 Fur 对副溶血弧菌氧化应激反应的影响。结果显示, 在正常 TSB 培养基中, 添加 H_2O_2 并未明显加重 Δfur 的生长抑制程度。然而, 由于 Δfur 在 TSB 中表现出固有生长缺陷, H_2O_2 的效应可能被该背景差异所掩盖。当用 2,2'-dipyridyl 降低培养基中的铁含量后, Δfur 对 H_2O_2 的敏感性显著升高, 且呈剂量依赖关系。这一结果表明, 副溶血弧菌 Fur 与其他细菌类似, 也参与调控氧化应激反应。

在多种弧菌中, Fur 被证实是关键的毒力调控因子。例如, 在霍乱弧菌中, *fur* 基因缺失株在幼鼠肠道中的竞争力显著低于野生株^[25]; 在灿烂弧菌中, *fur* 敲低突变株对仿刺参的致病性降低^[26]; 在哈维弧菌中, Δfur 对美洲鳗鲡的毒力仅为野生株的 1/18^[27]; 在鳗弧菌中, *fur* 基因缺失也导致细菌对大菱鲆幼鱼的致病性降低^[28]。然而, Fur 对铜绿假单胞菌毒力的影响尚存在争议。Pasqua 等^[24]报道, *fur* 条件突变株对大蜡螟幼虫的 90% 致死剂量与 WT 无显著差异, 表明 Fur 并非感染所必需。马鑫等^[41]发现, *fur* 基因缺失显著降低了铜绿假单胞菌对大蜡螟幼虫的毒力。本研究通过斑马鱼存活率测定和竞争感染试验证实, Fur 不影响副溶血弧菌在斑马鱼模型中的毒力。这一结果可能与多种因素有关。(1) T3SS1 的过量表达可能不利于体内感染。RNA 测序结果显示, Δfur 中 T3SS1 相关基因大幅上调表达, 而 T6SS2 相关基因显著下调表达。虽然 T3SS1 和 T6SS2 均是副溶血弧菌的重要毒力因子, 但有研究表明副溶血弧菌 T3SS1 的过量表达反而会降低细菌的肠道定殖能力^[42]。 Δfur 中 T3SS1 的大幅上调表达并不一定表现为毒力增强。同时, T6SS2 的下调可能削弱了细菌的

黏附能力。因此, Δfur 中 T3SS1 和 T6SS2 在转录水平上的显著变化可能并未在体内转化为相应的毒力表型改变。(2) 感染模型的局限性。本研究采用斑马鱼腹腔注射感染模型, 该模型绕过了经口自然感染的早期阶段(如胃酸耐受、肠上皮初始黏附等), Fur 在这些特定感染阶段的作用有待采用新生仔兔模型(灌胃感染)进一步评估。(3) Fur 对致病性的影响存在物种特异性, 即使是同一物种, 不同研究也可能因菌株背景、实验条件和动物模型的差异而得出不同结论, 如铜绿假单胞菌中的矛盾报道^[24,41]。(4) 功能冗余的可能性。副溶血弧菌基因组中编码有其他 Fur 家族蛋白(如锌摄取调节因子 Zur), 虽然它们的主要调控靶标不同, 但不排除在 *fur* 缺失时对部分靶基因存在交叉调控, 从而部分补偿 Fur 对毒力的调控功能。

Fur 通常作为铁摄取系统的抑制子。当铁充足时, Fur 结合 Fe^{2+} 后发生构象变化, 形成二聚体并结合至靶基因的启动子区, 通过空间阻遏作用抑制 RNA 聚合酶, 阻断铁摄取相关基因的转录; 当铁缺乏时, Fur 无法结合靶基因的启动子区, 从而解除对铁摄取基因的抑制作用^[43]。与该调控模型一致, RNA 测序结果显示, Δfur 中铁摄取相关基因显著上调表达。此外, 尽管 Δfur 中铁摄取和铁储存相关基因的表达显著上调, 但 Δfur 胞内铁含量显著低于 WT 和 $C\Delta fur$ 。在大肠杆菌中也观察到了类似现象: *fur* 基因缺失株的铁含量仅为 WT 的 40%, 尽管其铁摄取系统持续表达^[44]。McHugh 等^[45]通过全基因组转录分析揭示了其机制: Fe^{2+} -Fur 复合物不仅负调控铁摄取基因, 还正向调控大量编码含铁蛋白(如呼吸链中的细胞色素、铁硫簇蛋白和 TCA 循环含铁酶等)的基因。在 Δfur 中, 这些含铁蛋白的合成受到抑制, 导致细胞对铁的“利用”能力大幅下降, 铁无法被有效整合至功能性蛋白中, 最终导致总铁含量降低^[45]。本研究 RNA 测序数据也支持上述机制。在副溶血弧菌 Δfur 中,

虽然铁摄取和铁储存相关基因显著上调表达, 但大量编码含铁蛋白的基因显著下调表达。此外, 本研究还观察到了典型的“铁节约反应”特征。 Δfur 中含铁蛋白的大量下调表达导致细胞不能有效利用铁, 这可能是其菌体内总铁含量降低的主要原因。已有研究表明, 铁饥饿能诱导副溶血弧菌 T3SS1 相关基因的表达^[46]。这一结果与本研究的发现一致: Δfur 中铁含量较低, 但其 T3SS1 相关基因的表达显著上调。在鼠伤寒沙门菌中, Fur 通过 HilD 调控致病岛 1 中 T3SS 的表达^[47]。然而, 在副溶血弧菌中 Fur 对 T3SS1 的调控是直接作用还是间接作用仍有待进一步研究。在铜绿假单胞菌中, T6SS2 受 Fur 调控^[48]; 类似地, 本研究发现副溶血弧菌中 T6SS2 也受到 Fur 调控。

综上所述, 本研究探究了 Fur 对副溶血弧菌铁稳态、氧化应激反应和毒力的影响。结果表明, Fur 调控副溶血弧菌的铁稳态和氧化应激反应, 但不影响其在斑马鱼模型中的毒力。此外, Fur 还调控多种铁摄取、铁储存、含铁蛋白、T3SS1 和 T6SS2 相关基因的表达。

作者贡献声明

马涪溶: 实验操作, 论文初稿撰写; 朱晓雅: 实验操作, 数据分析; 李文秀: 实验操作; 徐正中: 研究构思和设计; 陈祥: 研究构思和设计, 提供资源; 焦新安: 获取基金, 提供资源; 郑成坤: 获取基金, 研究构思和设计, 数据分析, 论文修改。

作者利益冲突公开声明

作者声明不存在任何可能会影响本文所报告工作的已知经济利益或个人关系。

参考文献

- [1] Letchumanan V, Chan KG, Lee LH. *Vibrio parahaemolyticus*: a review on the pathogenesis, prevalence, and advance molecular identification techniques[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2014, 5: 705.
- [2] 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.
- [3] Yeung PSM, Boor KJ. Epidemiology, pathogenesis, and prevention of foodborne *Vibrio parahaemolyticus* infections[J]. *Foodborne Pathogens and Disease*, 2004, 1(2): 74-88.
- [4] 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.
- [5] 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.
- [6] Martinez-Urtaza J, Baker-Austin C. *Vibrio parahaemolyticus*[J]. *Trends in Microbiology*, 2020, 28(10): 867-868.
- [7] 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).
- [8] Li LZ, Meng HM, Gu D, Li Y, Jia MD. Molecular mechanisms of *Vibrio parahaemolyticus* pathogenesis[J]. *Microbiological Research*, 2019, 222: 43-51.
- [9] 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.
- [10] Broberg CA, Calder TJ, Orth K. *Vibrio parahaemolyticus* cell biology and pathogenicity determinants[J]. *Microbes and Infection*, 2011, 13(12/13): 992-1001.
- [11] Zhang LL, Orth K. Virulence determinants for *Vibrio parahaemolyticus* infection[J]. *Current Opinion in Microbiology*, 2013, 16(1): 70-77.
- [12] 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.
- [13] Salomon D, Gonzalez H, Updegraff BL, Orth K. *Vibrio parahaemolyticus* type VI secretion system 1 is activated in marine conditions to target bacteria, and is differentially regulated from system 2[J]. *PLoS One*, 2013, 8(4): e61086.
- [14] Yu Y, Fang LH, Zhang Y, Sheng HX, Fang WH. VgrG2 of type VI secretion system 2 of *Vibrio parahaemolyticus* induces autophagy in macrophages[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2015, 6: 168.
- [15] Lim J, Stones DH, Hawley CA, Watson CA, Krachler AM. Multivalent adhesion molecule 7 clusters act as signaling platform for host cellular GTPase activation and facilitate epithelial barrier dysfunction[J]. *PLoS Pathogens*, 2014, 10(9): e1004421.

- [16] Liu M, Yang SS, Zheng CK, Luo XS, Bei WC, Cai P. Binding to type I collagen is essential for the infectivity of *Vibrio parahaemolyticus* host cells[J]. *Cellular Microbiology*, 2018, 20(9): e12856.
- [17] Yang YF, Harris DP, Luo F, Wu LY, Parsons AB, Palumbo AV, Zhou JZ. Characterization of the *Shewanella oneidensis* Fur gene: roles in iron and acid tolerance response[J]. *BMC Genomics*, 2008, 9(Suppl 1): S11.
- [18] Oliveira F, Rocha S, Fernandes R. Iron metabolism: from health to disease: iron metabolism[J]. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 2014, 28(3): 210-218.
- [19] Tanabe T, Funahashi T, Shiuchi K, Okajima N, Nakao H, Miyamoto K, Tsujibo H, Yamamoto S. Characterization of *Vibrio parahaemolyticus* genes encoding the systems for utilization of enterobactin as a xenosiderophore[J]. *Microbiology*, 2012, 158(8): 2039-2049.
- [20] Ullah I, Lang ML. Key players in the regulation of iron homeostasis at the host-pathogen interface[J]. *Frontiers in Immunology*, 2023, 14: 1279826.
- [21] Bradley JM, Svistunenko DA, Wilson MT, Hemmings AM, Moore GR, Le Brun NE. Bacterial iron detoxification at the molecular level[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2020, 295(51): 17602-17623.
- [22] Kang SM, Kang HS, Chung WH, Kang KT, Kim DH. Structural perspectives on metal dependent roles of ferric uptake regulator (Fur)[J]. *Biomolecules*, 2024, 14(8): 981.
- [23] Wang SH, Yang DH, Wu XJ, Yi ZF, Wang Y, Xin SH, Wang D, Tian MX, Li T, Qi JJ, Ding C, Yu SQ. The ferric uptake regulator represses type VI secretion system function by binding directly to the *clpV* promoter in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium[J]. *Infection and Immunity*, 2019, 87(10): e00562-19.
- [24] Pasqua M, Visaggio D, Lo Sciuto A, Genah S, Banin E, Visca P, Imperi F. Ferric uptake regulator Fur is conditionally essential in *Pseudomonas aeruginosa*[J]. *Journal of Bacteriology*, 2017, 199(22): e00472-17.
- [25] Mey AR, Wyckoff EE, Kanukurthy V, Fisher CR, Payne SM. Iron and Fur regulation in *Vibrio cholerae* and the role of Fur in virulence[J]. *Infection and Immunity*, 2005, 73(12): 8167-8178.
- [26] Shi Y, Liao CY, Dai F, Zhang YW, Li CH, Liang WK. *Vibrio splendidus* Fur regulates virulence gene expression, swarming motility, and biofilm formation, affecting its pathogenicity in *Apostichopus japonicus*[J]. *Frontiers in Veterinary Science*, 2023, 10: 1207831.
- [27] Wan QJ, Zhai SW, Chen MX, Xu M, Guo SL. Comparative phenotype and transcriptome analysis revealed the role of ferric uptake regulator (Fur) in the virulence of *Vibrio harveyi* isolated from diseased American eel (*Anguilla rostrata*)[J]. *Journal of Fish Diseases*, 2024, 47(6): e13931.
- [28] Li YJ, Yu XR, Li P, Li X, Wang LS. Characterization of the ferric uptake regulator *VaFur* regulon and its role in *Vibrio anguillarum* pathogenesis[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2024, 90(11): e01508-24.
- [29] Makino K, Oshima K, Kurokawa K, Yokoyama K, Uda T, Tagomori K, Iijima 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.
- [30] Milton DL, O'Toole R, Horstedt P, Wolf-Watz H. Flagellin A is essential for the virulence of *Vibrio anguillarum*[J]. *Journal of Bacteriology*, 1996, 178(5): 1310-1319.
- [31] 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.
- [32] Waterhouse A, Bertoni M, Bienert S, Studer G, Tauriello G, Gumienny R, Heer FT, de Beer TAP, Rempfer C, Bordoli L, Lepore R, Schwede T. SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes[J]. *Nucleic Acids Research*, 2018, 46(W1): W296-W303.
- [33] Robert X, Gouet P. Deciphering key features in protein structures with the new ENDScript server[J]. *Nucleic Acids Research*, 2014, 42(W1): W320-W324.
- [34] 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.
- [35] 王梦娟, 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 MX, Zhai YM, Qiu J, Xu ZZ, Chen X, Zheng CK, Jiao XA. ZntR modulates zinc homeostasis, oxidative stress resistance, and virulence of *Vibrio parahaemolyticus*[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2024, 64(12): 4774-4788 (in Chinese).
- [36] Payne SM, Mey AR, Wyckoff EE. *Vibrio* iron transport: evolutionary adaptation to life in multiple environments[J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2016, 80(1): 69-90.
- [37] Chandrangsu P, Rensing C, Helmann JD. Metal homeostasis and resistance in bacteria[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2017, 15(6): 338-350.
- [38] 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: 2327377.
- [39] Zheng CK, Zhai YM, Wang MX, Xu ZZ, Zhang YZ, Zhou XH, Chen X, Jiao XN. The CueR-regulated transporters *CopA* and *CusFABC* coordinate copper detoxification in *Vibrio parahaemolyticus*[J]. *Virulence*, 2025, 16: 2545557.
- [40] 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, 2023, 24(1): 414.
- [41] 马鑫, 李雯雯, 肖维, 成娟丽, 林金水. 铜绿假单胞菌 *fur* 基因缺失突变株的构建及其表型分析[J]. 微生物学报, 2024, 64(3): 917-937.
- Ma X, Li WW, Xiao W, Cheng JL, Lin JS. Construction and phenotypic characterization of *fur*-deleted mutant of *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2024, 64(3): 917-937 (in Chinese).
- [42] Gu D, Zhang YB, Wang QY, Zhou XH. S-nitrosylation-mediated activation of a histidine kinase represses the type 3 secretion system and promotes virulence of an enteric pathogen[J]. Nature Communications, 2020, 11: 5777.
- [43] 马玥, 宋楠楠, 李冰清. 细菌铁摄取调节蛋白 Fur 的研究进展[J]. 中国病原生物学杂志, 2021, 16(1): 117-121, 126.
- Ma Y, Song NN, Li BQ. Advances in research on a bacterial ferric uptake regulator[J]. Journal of Pathogen Biology, 2021, 16(1): 117-121, 126 (in Chinese).
- [44] Abdul-Tehrani H, Hudson AJ, Chang YS, Timms AR, Hawkins C, Williams JM, Harrison PM, Guest JR, Andrews SC. Ferritin mutants of *Escherichia coli* are iron deficient and growth impaired, and *fur* mutants are iron deficient[J]. Journal of Bacteriology, 1999, 181(5): 1415-1428.
- [45] McHugh JP, Rodríguez-Quinones F, Abdul-Tehrani H, Svistunenko DA, Poole RK, Cooper CE, Andrews SC. Global Iron-dependent gene regulation in *Escherichia coli* a new mechanism for iron homeostasis[J]. Journal of Biological Chemistry, 2003, 278(32): 29478-29486.
- [46] 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.
- [47] Ellermeier JR, Slauch JM. Fur regulates expression of the *Salmonella* pathogenicity island 1 type III secretion system through HilD[J]. Journal of Bacteriology, 2008, 190(2): 476-486.
- [48] Sana TG, Hachani A, Bucior I, Soscia C, Garvis S, Termine E, Engel J, Filloux A, Bleves S. The second type VI secretion system of *Pseudomonas aeruginosa* strain PAO1 is regulated by quorum sensing and fur and modulates internalization in epithelial cells[J]. Journal of Biological Chemistry, 2012, 287(32): 27095-27105.