2026, 66(10): 5122-5135
CSTR: 32112.14.j.AMS.20260192
DOI: 10.13343/j.cnki.wsxb.20260192

微生物学报
Acta Microbiologica Sinica
http://journals.im.ac.cn/actamicrocn

Research Article 研究报告

根癌农杆菌细菌储铁蛋白辅助铁氧还蛋白及其编码基因的功能鉴定

冯梦雅[#]，周琴[#]，王浩，徐楠，郭敏亮[*]

扬州大学 生物科学与技术学院，江苏 扬州

冯梦雅, 周琴, 王浩, 徐楠, 郭敏亮. 根癌农杆菌细菌储铁蛋白辅助铁氧还蛋白及其编码基因的功能鉴定[J]. 微生物学报, 2026, 66(10): 5122-5135.

FENG Mengya, ZHOU Qin, WANG Hao, XU Nan, GUO Minliang. Functions of *Agrobacterium fabrum* bacterioferritin-associated ferredoxin and its encoding gene[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2026, 66(10): 5122-5135.

摘　要：【目的】解析根癌农杆菌(*Agrobacterium fabrum*)细菌储铁蛋白(bacterioferritin, Bfr)释放铁的生理生化机制。确定根癌农杆菌细胞中为 Bfr 铁释放提供电子的生理还原剂。鉴定和验证 Bfr 辅助铁氧还蛋白质(bacterioferritin-associated ferredoxin, Bfd)在协助还原剂传递电子给 Bfr 过程中的作用。探究抑制 Bfr 铁释放、破坏细胞内铁平衡以及影响根癌农杆菌细胞增殖的新方法。【方法】通过生物信息学分析确定根癌农杆菌基因组中可能编码 Bfd 的基因。异源表达和纯化根癌农杆菌 Bfr 和预测的 Bfd。通过体外验证预测的 Bfd 是否能协助相关的生理还原剂传递电子给 Bfr，再通过基因敲除的方法将编码 Bfd 的基因敲除，在细胞水平进一步测定 Bfd 缺失对根癌农杆菌 Bfr 铁释放和细胞增殖的影响。【结果】根癌农杆菌 *ATU_RS13485* 基因编码一种(2Fe-2S)-结合蛋白[(2Fe-2S)-binding protein]，该蛋白质含有 Bfd 蛋白所具有的共同氨基酸基序(motif sequence): …C-X-C…C-X_2-C…，确定该蛋白质是根癌农杆菌的 Bfd。异源表达并纯化根癌农杆菌 Bfd，其能在体外协助 $FADH_2$ 将电子传给 Bfr，使矿化的根癌农杆菌 Bfr 释放出 Fe^{2+}。将该基因敲除后，根癌农杆菌胞内 Bfr 的铁释放严重受阻，细胞的增殖也受影响。【结论】*ATU_RS13485* 基因是根癌农杆菌编码 Bfd 的基因。根癌农杆菌的 Bfr 需要 Bfd 协助才能利用生理还原剂 $FADH_2$ 的电子释放铁。Bfd 的缺失会阻遏根癌农杆菌 Bfr 释放铁，并影响根癌农杆菌的生长，有望通过筛选抑制 Bfr 与 Bfd 相互结合的物质来实现防治根癌农杆菌冠瘿瘤病的目的。

关键词：根癌农杆菌；细菌储铁蛋白；铁平衡；细菌储铁蛋白辅助铁氧还蛋白；铁释放

资助项目：国家自然科学基金(31870118, 32300151)
This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (31870118, 32300151).
[#]These authors contributed equally to this work.
*Corresponding author. E-mail: guoml@yzu.edu.cn
Received: 2026-03-09; Accepted: 2026-05-08; Published online: 2026-05-21

Functions of *Agrobacterium fabrum* bacterioferritin-associated ferredoxin and its encoding gene

FENG Mengya[#], ZHOU Qin[#], WANG Hao, XU Nan, GUO Minliang[*]

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

Abstract: [Objective] To elucidate the physiological and biochemical mechanisms of iron release from bacterioferritin (Bfr) in *Agrobacterium fabrum*, identify the physiological reductant that provides electrons for the iron release from Bfr in cells, and determine whether Bfr-associated ferredoxin (Bfd) is required to facilitate electron transfer from the reductant to Bfr, thereby exploring a new approach to inhibit the iron release from Bfr and further disrupt intracellular iron homeostasis as well as impair *A. fabrum* growth and proliferation. **[Methods]** Bioinformatics analysis was carried out to identify the gene encoding Bfd-like protein in the *A. fabrum* genome. Bfr and the predicted Bfd were heterologously expressed and the obtained proteins were purified. *In vitro* assays were conducted to determine whether the predicted Bfd could assist the physiological reductant in transferring electrons to Bfr. Subsequently, we knocked out the Bfd-encoding gene to assess the impacts of Bfd on the iron release of Bfr and *A. fabrum* growth at the cellular level. **[Results]** The *A. fabrum* gene *ATU_RS13485* encoded a (2Fe-2S)-binding protein containing the conserved amino acid motif (⋯C-X-C⋯C-X_2-C⋯) existent in Bfd proteins, confirming it as the Bfd of *A. fabrum*. Purified recombinant Bfd was able to assist $FADH_2$ in delivering electrons to Bfr *in vitro*, triggering the release of Fe^{2+} from mineralized *A. fabrum* Bfr. Upon *bfd* knockout, intracellular Bfr iron release of *A. fabrum* was severely impaired, and *A. fabrum* growth was significantly affected. **[Conclusion]** *ATU_RS13485* encodes the Bfd of *A. fabrum*. *A. fabrum* Bfr requires Bfd to utilize electrons from the physiological reductant $FADH_2$ for iron release. The absence of Bfd blocks iron release from Bfr and impairs *A. fabrum* growth, which suggests that designing inhibitors to disrupt the Bfr-Bfd interaction may offer a promising strategy for controlling crown gall disease caused by *A. fabrum*.

Keywords: *Agrobacterium fabrum*; bacterioferritin; iron homeostasis; bacterioferritin-associated ferredoxin; iron release

铁是生命活动的必需元素，生物体内的许多生物学过程都需要铁，如呼吸作用、DNA 复制、微生物固氮、动物的氧输送等。最为人熟悉的就是铁以血红素铁和铁-硫(Fe-S)族的形式作为许多酶和蛋白质的辅助因子，参与多种重要的生物学过程[1-2]。作为地壳含量第 4 的元素和第二的金属——铁，虽然含量丰富，但由于其存在的主要化合价态不易被生物所利用，因此在很多特定条件下仍然有很多生物会遇到缺铁的情况。铁在生物体内的存在价态主要是二价(Fe^{2+})和三价(Fe^{3+})；因三价铁(Fe^{3+})的水溶性差，一般情况下生物只能利用环境中的二价铁(Fe^{2+})；由于氧的存在二价铁很容易氧化成三价铁，所以生物经常会遇到环境中没有足够可利用铁的情况[3]。然而，即使环境中含有足够的二价铁，生物也不能短时间大量地吸收铁，这会导致细

胞内的二价铁浓度过高，发生芬顿(Fenton)反应，产生活性氧自由基，对细胞造成毒害[3-4]。为了满足细胞的铁需求和避免过量二价铁可能造成的毒害，生物进化出了一类储铁蛋白(ferritin)以维持细胞内的铁平衡。当细胞内 Fe^{2+}过量时 Fe^{2+}被转运至储铁蛋白内，且被氧化成水不溶的 Fe^{3+}，并以类似铁矿石的形式$[Fe^{3+}\text{-}O]_x$存储在储铁蛋白内，此过程称为储铁蛋白的铁矿化(iron mineralization)[5]。当细胞需要铁时，这些存储的 Fe^{3+}被还原成可溶的 Fe^{2+}释放出来[1-2,6]。

生物界存在的储铁蛋白均为 24 或 12 个蛋白质亚基形成的寡聚体纳米笼(nanocage)结构，铁存储在纳米笼的内腔[2,7]。一般将储铁蛋白分为 3 类[1-2]。第 1 类是早期在动物中发现和鉴定的储铁蛋白，后来也发现广泛存在于植物和微生物中[8-9]，现在将其称为传统的或经典的储铁蛋白(classic ferritin, Ftn)。Ftn 的结构特点是 24 聚体，不含血红素。哺乳动物的 Ftn 多数为由 2 类不同亚基构成的异源 24 聚体[10]，而植物和微生物中的 Ftn 多为由相同亚基构成的同源 24 聚体[7]。第 2 类是只存在于原核生物中的细菌储铁蛋白(bacterioferritin, Bfr)，Bfr 也是由相同亚基构成的同源 24 聚体，含 12 个血红素[2,11]。第 3 类储铁蛋白也只存在于原核生物中，为同源 12 聚体[12]。由于这类储铁蛋白最早是在饥饿的大肠杆菌(*Escherichia coli*)中发现鉴定的，并且能结合 DNA，所以被叫作来自饥饿细胞的 DNA 结合蛋白(DNA-binding protein from starved cells, Dps)[12-14]。

构成所有 3 类不同储铁蛋白的亚基，尽管在氨基酸序列上相似度不高(<20%)[15]，但三级结构却高度相似，为一高度保守的四螺旋束(four-helix bundle)结构，多数亚基在螺旋束的中央存在一个含 2 个铁的铁氧化酶中心(ferroxidase center, FOC)，有些储铁蛋白的亚基可能在 C-端会有一个较短的螺旋[2,7,11-12]。2 个亚基以反向平行的方式形成二聚体，Ftn 和 Bfr 是 12 个二聚体形成的 24 聚体纳米笼结构[2,7,11]，而 Dps 是 6 个二聚体形成的 12 聚体纳米笼结构[12]。Bfr 的 24 聚体纳米笼为近似球形的八面体结构，具有高度的对称性，存在 2-3-4 三种不同的对称轴，其血红素位于每个二聚体的对称中心，纳米笼的整体直径约为 12 nm，内径约为 8 nm，蛋白质笼体厚度约为 4 nm，有 62 个小孔，使纳米笼的内腔能够与外面的溶液连通，铁离子就是通过这些小孔进出 Bfr 纳米笼[2,11,16]。

Bfr 吸收和释放的铁是二价铁，而存储的是三价铁，在这个过程中铁必须经过氧化和还原，O_2 和 H_2O_2 都可以接受 Fe^{2+}氧化为 Fe^{3+}时所释放的电子[17-18]。当 Bfr 中存储的 Fe^{3+}需要释放时，必须还原成 Fe^{2+}，因此，需要还原剂提供电子。体外实验显示，不少还原剂都可使矿化 Bfr 释放 Fe^{2+}，一些分子较小的物质，如连二亚硫酸钠、抗坏血酸、谷胱甘肽和小分子酚醌类等[19-23]，可直接使 Bfr 释放出 Fe^{2+}，而分子较大的生理还原剂 $FMNH_2$/$FADH_2$ 和 NADH/NADPH 却需要其他的蛋白质或酶协助才能使 Bfr 释放出二价铁[24-27]。然而，在胞内，Bfr 内核铁的还原应该主要由生理还原剂 $FMNH_2$/$FADH_2$ 或 NADH/NADPH 提供电子，通过相关蛋白质或酶以及 Bfr 自身的活性中心等可调控环节来实现。关于 Bfr 催化铁氧化还原的机制，早期的研究表明，四螺旋束内部的 FOC 主要负责储铁时 Fe^{2+}的氧化，而铁释放时还原 Fe^{3+}的电子主要是来自 2 重对称轴位置的血红素[2,11,17-18,25,28]。最近的研究却证明，FOC 和血红素之间存在电子转移[29]，认为这 2 个活性中心在铁氧化还原过程中的分工并非早期认为的那么明确[29-30]，2 个活性中心可能是相通的，电子在 2 个中心之间的转移应该是由彼此的氧化还原电位决定。铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*) Bfr 的研究结果显示，以 NADPH 为 Bfr 的电子供体时需要一种铁氧还蛋白(ferredoxin)和一种铁氧还蛋白还原酶(ferredoxin protein reductase, Fpr)才能使其释放二价铁[31]。

在大肠杆菌和铜绿假单胞菌中，已经鉴

定出为 Bfr 提供电子的铁氧还蛋白是一种含[2Fe-2S]铁硫族的铁氧还蛋白，由于编码这种铁氧还蛋白的基因紧连 *bfr* 基因的上游，且该蛋白能够与 Bfr 蛋白形成稳定的复合物，因此，被称为 Bfr 辅助铁氧还蛋白(bacterioferritin-associated ferredoxin, Bfd)[25,31]。此后的一系列实验证明，不论是体外还是胞内，Bfd 对 Bfr 的铁释放均是极其重要的[25,31-34]。抑制 Bfr 与 Bfd 之间的结合会导致胞内 Bfr 存储的铁不能释放，细菌缺铁，生长和生物被膜(biofilm)的形成受阻，最终死亡[32-33,35]。据此，干扰 Bfr 与 Bfd 之间的结合可能成为寻找细菌抗生素的新靶点[36-37]。由此可见，鉴定和验证各种细菌中 Bfd 的功能的重要性。

根癌农杆菌(*Agrobacterium fabrum*)是一种对细菌和植物分子生物学领域产生广泛影响的植物病原菌，其独特的致病机制使其成为一种应用最广泛的植物和真菌的转基因工具菌，同时根癌农杆菌也成为细菌中多种生物学过程研究的模式菌[38-42]，因此，对其基因组中的各种基因及编码的蛋白质功能进行鉴定和研究就显得非常重要和有意义。在根癌农杆菌的基因组数据库中注释出 2 个编码储铁蛋白的基因，一个是编码 Bfr，一个是编码 Dps。对于这 2 个基因及其编码蛋白质的功能已有相关的实验研究[43-44]，证明 Bfr 的缺失使胞内铁含量下降，并严重影响根癌农杆菌的抗氧化能力和致病性[43]。然而，在根癌农杆菌基因组数据库中未注释出编码 Bfd 的基因。本研究以期在根癌农杆菌基因组找出为根癌农杆菌 Bfr 传递电子的 Bfd，并对其功能进行鉴定和验证。

1 材料与方法

1.1 重组蛋白的表达纯化和根癌农杆菌突变体菌株的构建

重组蛋白的表达和纯化参考文献[44-47]中所使用的方法。用 pET-30a 质粒表达融合组氨酸标签(6×His)的重组蛋白。构建质粒的宿主为大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5α 菌株。6×His 直接融合到 Bfr 和 Bfd 蛋白的 C-端，分别简写为 Bfr-His 和 Bfd-His。重组蛋白质的表达用大肠杆菌(*E. coli*) BL21(DE3)菌株。用 BeyoGold™ His-tag Purification Resin (耐变性剂型) (上海碧云天生物技术股份有限公司)纯化重组蛋白质，通过透析和浓缩的方法来更换重组蛋白质的缓冲液和调整浓度。蛋白质浓度采用考马斯亮蓝法测定[48]。纯化的重组蛋白质用 SDS-PAGE 鉴定其纯度和分子量。

用于根癌农杆菌培养的 MG/L 和 AB 培养基的配制、根癌农杆菌的培养以及根癌农杆菌的电击转化均参照文献[43-45]。根癌农杆菌 Bfd 缺失突变体菌株的构建参考文献[43-47,49-50]中所使用的方法。将根癌农杆菌(*A. fabrum*)野生菌株 C58 中可能编码 Bfd 的 *ATU_RS13485* 基因进行精确无痕地删除编码 N-端 10 个氨基酸的 30 bp DNA 片段，即得到根癌农杆菌 Bfd 缺失突变体菌株。构建过程为：将 *ATU_RS13485* 基因起始密码子 AUG 上游 500 bp 与 AUG 下游第 31 个核苷酸算起的 747 bp 片段连接成一个完整片段(即准确删除包括 AUG 在内的 30 个核苷酸)，然后将该片段插入到不能在根癌农杆菌复制的自杀性质粒 pEX18Km 中[49]，构建出用于删除根癌农杆菌 *ATU_RS13485* 基因的质粒。将该质粒引入根癌农杆菌 C58 中，用质粒携带的卡那霉素抗性进行筛选。因质粒不能在根癌农杆菌中独立复制，未整合质粒的细胞无抗性，不能增殖，只有质粒经同源重组整合到基因组的转化细胞才具有抗性，能够增殖。将整合了自杀质粒的根癌农杆菌转化细胞用蔗糖进行第二次筛选，因自杀性质粒携带不耐蔗糖的自杀基因，只有在整合了自杀质粒的根癌农杆菌进行第二次同源重组，将原质粒的自杀基因丢掉之后才能在蔗糖中增殖。在第二次重组中筛到的能在蔗糖中增殖的重组细胞有 2 种，一种是在与第一次整合完全相同的位置进行第二次同源重组，将

整个质粒完全丢掉，回到野生型；另一种是，在不同于第一次整合的位置进行第二次同源重组，重组后将多余的质粒序列和要删除的目标序列一起丢掉了，这种重组得到的细胞就是需要的突变体。用 PCR 从这些重组子中筛选所需突变体，并通过测序进一步核实，所删除的序列与设计是一致的。更具体的原理和实验过程可参考文献[49]。

根癌农杆菌 Bfd 回补菌株的构建参照文献[51-52]的方法。将根癌农杆菌中可能编码 Bfd 的 *ATU_RS13485* 基因准确插入 pUCA19 质粒 *LacZ* 启动子的起始密码子后，利用质粒自带的 *LacZ* 启动子启动 *bfd* 基因的表达。将构建好的能表达 Bfd 的质粒引入根癌农杆菌 Bfd 缺失菌株内构建回补菌株，使其能够重新表达 Bfd。

1.2 Bfr 的铁矿化

Bfr 铁矿化形成的$[Fe^{3+}\text{-}O]_x$能吸收 300−350 nm 的光，因此可通过测定 Bfr 溶液对这一波段光的吸光度(absorbance，以惯用的符号 *OD* 表示)来监测矿化过程。Bfr 的铁矿化参照文献[18,23,53-54]的方法并稍作修改，具体过程为：将用 1 mmol/L HCl 溶液现配的 2 mmol/L 的 $FeSO_4$ 溶液与等体积的纯化重组根癌农杆菌 Bfr 溶液[Bfr 溶于 100 mmol/L NaCl，100 mmol/L 吗啉乙磺酸(3-(*N*-morpholino)propanesulfonic acid, MOPS)，pH 7.0 缓冲溶液，校准浓度为 4 μmol cages/L，确保矿化时 Fe^{2+}/cage 为 500]混合。然后，立即用酶标仪(Tecan 公司)或分光光度计记录 OD_{340} 的变化，监测矿化过程。为保证 Bfr 能够充分矿化，用于后续实验的 Bfr 会将上述矿化过程在室温下持续 2 h 后置于 4 ℃过夜，再离心收集并用缓冲液洗涤 1 次，以获得矿化好的 Bfr 备用。

1.3 根癌农杆菌胞内矿化 Bfr 的分离和铁特异性染色

矿化后的 Bfr 内腔含有大量 Fe^{3+}，能与亚铁氰化钾(potassium ferrocyanide)形成蓝色的普鲁士蓝(Prussian blue)，蓝色深浅与 Fe^{3+}量成正比。未矿化的 Bfr 和其他含 Fe^{3+}极少的蛋白质不会显出蓝色，因此，用亚铁氰化钾染色经非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)分离的矿化 Bfr 具有特异性，凝胶中的其他蛋白质不会染上颜色。在颜色不够深的情况下，可用 3,3′-二氨基联苯胺(3,3′-diaminobenzidine, DAB)进一步染色，DAB 染色后，颜色由蓝色变为棕色。胞内 Bfr 分离的大致程序是：将在 MG/L 中培养的根癌农杆菌转入无铁的 AB 培养基中培养至特定时间，然后离心收集细胞，用液氮冻融法将细胞破碎，离心得到上清液，即为根癌农杆菌的 Bfr 粗提液，非变性 PAGE 分离 Bfr 后用铁特异性染色鉴定，实验的具体操作、所用溶液、离心条件和液氮冻融次数均参照文献[44,55]。

1.4 矿化 Bfr 的铁释放检测

矿化 Bfr 内腔的 Fe^{3+}被还原成 Fe^{2+}后会释放到溶液中。Fe^{2+}能与菲洛嗪(ferrozine)形成红色络合物，最大吸收峰为 562 nm，可用于测定溶液中的 Fe^{2+}浓度。本研究依据文献[23-24,30,34,56]采用菲洛嗪法检测矿化 Bfr 的铁释放。用于检测矿化 Bfr 铁释放的终溶液组成及各组分的浓度为：1 mmol/L 菲洛嗪，0.5 μmol cage/L 矿化 Bfr，100 mmol/L NaCl，100 mmol/L MOPS 缓冲液(pH 7.0)，以及每次具体实验中所标出的特定浓度的还原剂，当测定 Bfd 对矿化 Bfr 铁释放的影响时，再加入终浓度为 12 μmol/L 的 Bfd。铁释放反应在还原剂加入后立即启动，用酶标仪或分光光度计记录反应液 562 nm 波长吸光度的变化。如需直接测定溶液中 Fe^{2+}的浓度，可用已知光径的比色皿在分光光度计中测定吸光度，直接根据 Fe(II)-菲洛嗪复合物，$[Fe(Fz)_3]^{4-}$的消光系数[ε_{562}=25.40 L/(mmol·cm) 或 ε_{563}=27.90 L/(mmol·cm)]来计算[23-24,34]。

2 结果与分析

2.1 根癌农杆菌细菌储铁蛋白的矿化

为了能够鉴定根癌农杆菌的细菌储铁蛋白辅助蛋白(bacterioferritin-associated ferredoxin, Bfd)，必须先取得具有完整功能的根癌农杆菌Bfr。根据预测的根癌农杆菌 Bfr 的结构和以前发表的实验结果[44]，在 Bfr 的 C-端直接连上 His 标签后的 Bfr-His 融合蛋白，仍可形成 24 聚体纳米笼结构，6 个 His 的融合对 Bfr 的整体结构和功能影响不大，这样可以比较容易获得大量纯化的 Bfr。图 1 的结果表明，C-端融合 6 个 His 的 Bfr 能够形成 24 聚体纳米笼结构，并且具有铁矿化和存储的功能。从图 1A 中可以看出，在正常的大气氧浓度下，Bfr 能快速使 Fe^{2+} 氧化成类似铁矿石结构的$[Fe^{3+}\text{-}O]_x$，在 10 min 之内基本完成，此后趋于平缓，可能是因为溶液中的 Fe^{2+}浓度已经很低了，而加入变性 Bfr 的对照却无可检测到的$[Fe^{3+}\text{-}O]_x$ 生成。图 1B 的铁特异性染色结果进一步说明，生成的$[Fe^{3+}\text{-}O]_x$ 是存储在 24 聚体纳米笼内。

2.2 生理还原剂 $FADH_2$ 和 NADPH 不能直接使 Bfr 释放铁

Bfr 使 Fe^{2+}氧化成类似铁矿石的$[Fe^{3+}\text{-}O]_x$，除了可减少 Fe^{2+}可能引起的毒害外，还可存储多余的铁，保持胞内的铁平衡。当细胞需要时将存储的 Fe^{3+}还原成 Fe^{2+}提供给细胞。在这一过程中需要还原剂为其提供电子。一般认为，能为细胞提供可控和可持续还原力的还原剂主要是 $FADH_2$、NADH 和 NADPH 等还原性的辅酶或辅基。为此，本研究先选择 $FADH_2$ 和 NADPH 进行试验。为了检测矿化后的 Bfr 是否能释放铁，选择了一种小分子还原剂抗坏血酸作为正对照，因为以前在其他储铁蛋白中已经证明，

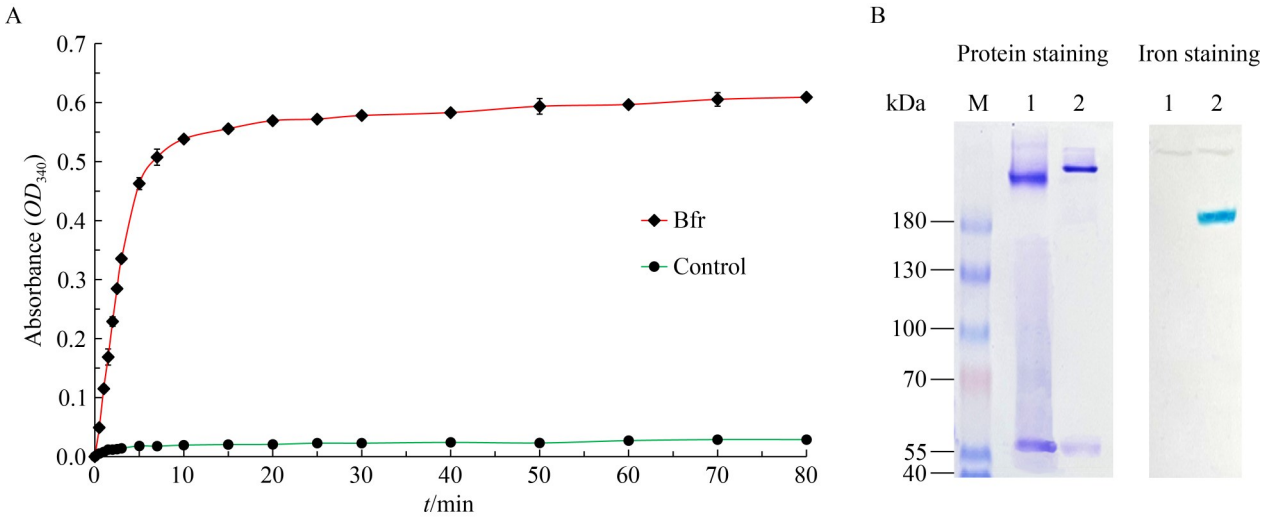


图1 根癌农杆菌Bfr的矿化

Figure 1 Mineralization of *Agrobacterium fabrum* Bfr. A: Mineralizing process of Bfr in 1 mmol/L $FeSO_4$ solution (Bfr: 2 μmol cages/L was added to the solution; Control: Denatured Bfr was added). $[Fe^{3+}\text{-}O]_x$ produced by Bfr during the mineralizing process exhibits an absorption peak at 340 nm. Absorbance at 340 nm was measured at different times. The data represent the mean of three independent experiments. B: The Bfr before and after mineralization was separated by native PAGE, and then stained by Coomassie brilliant blue (left panel) or potassium ferrocyanide $K_4[Fe(CN)_6]$ (right panel); Lane M: protein marker; Lane 1: Bfr before mineralization; Lane 2: Bfr after mineralization.

抗坏血酸能使储铁蛋白中 Fe^{3+}还原成 Fe^{2+}，并释放到溶液中[20,22]。图 2 结果说明，本研究所取得的矿化根癌农杆菌 Bfr 可以用小分子抗坏血酸为还原剂，直接提供电子还原 Bfr 笼内的 Fe^{3+}，而 $FADH_2$ 和 NADPH 都不能直接使 Bfr 释放铁。结果还说明，抗坏血酸的浓度影响铁的释放速度和释放量。

2.3 根癌农杆菌中存在的拟细菌储铁蛋白辅助蛋白(Bfd)及其编码基因的分析

在大肠杆菌(*E. coli*)和铜绿假单胞菌(*P. aeruginosa*) Bfr 的铁释放机制研究中发现，如果要使这 2 种菌中的 Bfr 利用 $FADH_2$ 和 NADPH 的电子来还原其 Fe^{3+}，需要一种辅助蛋白才能实现。由于编码这种辅助蛋白的基因紧挨着编码 Bfr 的基因，因此将其称为细菌储铁蛋白辅助蛋白(bacterioferritin-associated ferredoxin, Bfd)[25-27]。根癌农杆菌的 Bfr 也不能直接利用 $FADH_2$ 和 NADPH 的电子来还原其 Fe^{3+} (图 2)，

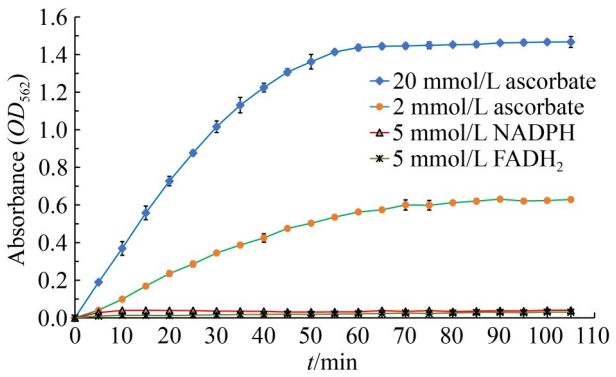


图2 矿化根癌农杆菌Bfr的铁释放

Figure 2 Iron release of mineralized *Agrobacterium fabrum* Bfr. The mineralized Bfr was incubated with 2 or 20 mmol/L ascorbate, 5 mmol/L $FADH_2$, or 5 mmol/L NADPH, respectively. Meanwhile, the Fe^{2+} chelator ferrozine was added to the reaction mixture. Fe(II)-ferrozine chelating complex, $[Fe(Fz)_3]^{4-}$, exhibits an absorption peak at 562 nm. Absorbance at 562 nm was measured at the indicated reaction time. The data represent the mean of three independent experiments.

是否也需要 Bfd 目前无相关的研究。为此，希望能在根癌农杆菌的基因组数据库中找到可能编码 Bfd 的基因。在早期注释的基因组中，*bfr* 基因附近未注释出能编码 Bfd 的基因。在最近的重新分析和注释中，*bfr* 基因的上游注释出了一个新基因，编号为 *ATU_RS13485*，与原有的 *bfr* 基因(*atu2771*)的编号方式完全不同，该基因编码的蛋白质为(2Fe-2S)-结合蛋白[(2Fe-2S)-binding protein]，与 *bfr* 基因共用 35 bp 的核苷酸(图 3A)。Bfd 也是一类(2Fe-2S)-结合蛋白，该基因编码的蛋白质氨基酸序列与已经实验鉴定过的 4 种 Bfd 比对显示，尽管氨基酸的相似度非常低，但含有(2Fe-2S)-结合蛋白的共同特征基序序列(motif sequence): ⋯C-X-C⋯C-X_2-C⋯(图 3B)，而且 SWISS-MODEL 预测的 Bfd 结构模型(图 3C)与铜绿假单胞菌(*P. aeruginosa*) Bfd 的晶体结构(图 3D)非常相似，因此，*ATU_RS13485* 基因编码的蛋白质应该是根癌农杆菌的 Bfd，可对该基因及其编码的蛋白质的功能进行实验鉴定。

2.4 根癌农杆菌 *ATU_RS13485* 基因编码的蛋白质是一种 Bfd

为了证明根癌农杆菌 *ATU_RS13485* 基因编码的蛋白质是否能协助 Bfr 利用 $FADH_2$、NADH 或 NADPH 等还原剂释放铁。首先需取得纯的蛋白质，为此在该蛋白质的 C-端直接融合 6 个 His 表达成融合蛋白方便纯化。现暂且认定它就是根癌农杆菌的 Bfd，用 Bfd 代表它。将 Bfd 加入到测定矿化 Bfr 铁释放的反应液中，再加入不同的还原剂，以刚加入还原剂启动反应时反应液的 562 nm 吸光度为参比校正光度计的零，然后分别测定反应 10、30、60、90 min 后反应液在 562 nm 波长的吸光度。从图 4 的结果可以看出，Bfd 可以协助 Bfr 利用 $FADH_2$ 的电子释放 Fe^{2+}，而不能协助利用 NADH 和 NADPH 来释放 Fe^{2+}。变性 Bfd 不能协助 Bfr 利用 $FADH_2$ 的电子释放 Fe^{2+}，这说明 Bfd 起着促

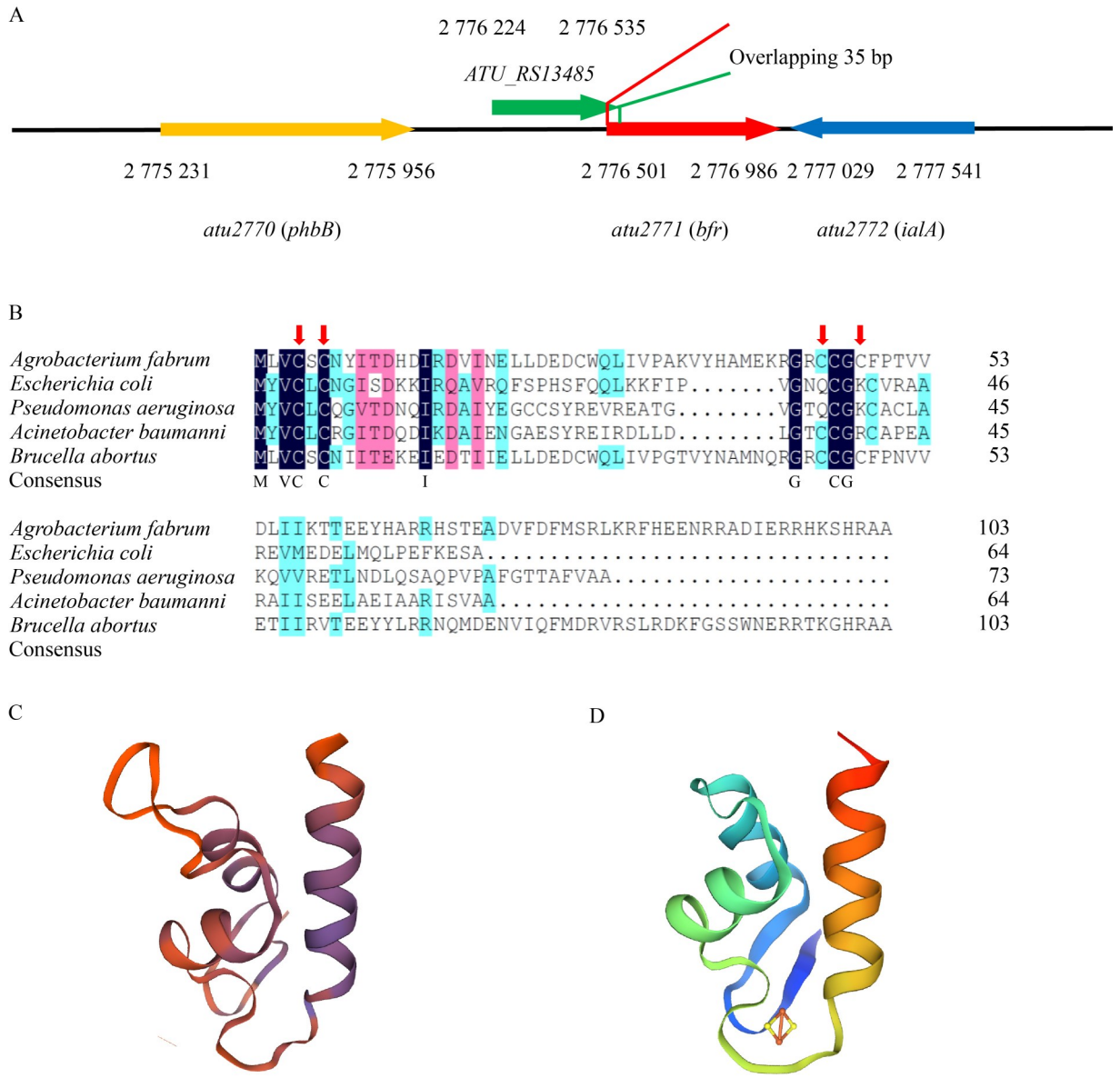


图3 根癌农杆菌*ATU_RS13485*基因及其编码蛋白与已知Bfd蛋白的氨基酸序列和结构比对

Figure 3 Characterization of the *Agrobacterium fabrum* gene *ATU_RS13485*, and comparison of the amino acid sequence and structural model of its encoded protein with experimentally verified Bfd proteins. A: The *ATU_RS13485* gene is annotated to encode a (2Fe-2S)-binding protein, potentially a Bfd-like protein, as it is located upstream of the *bfr* gene and shares a 35 bp overlap with the latter [Arrows represent genes (labeled with italicized letters and numbers); Regular numbers denote the sequence loci of the genes on the circular chromosome]; B: The amino acid sequence encoded by the *ATU_RS13485* gene was aligned with those of experimentally verified Bfd proteins [To date, only 4 Bfd proteins have been experimentally verified. Bfds are a family of (2Fe-2S)-binding protein containing the conserved amino acid motif (⋯C-X-C⋯C-X_2-C⋯) indicated by red arrows]; C: Homology structural model of the protein encoded by the *ATU_RS13485* gene, built using SWISS-MODEL; D: Crystal structure of Bfd from *Pseudomonas aeruginosa* (PDB ID: 6e6q.1).

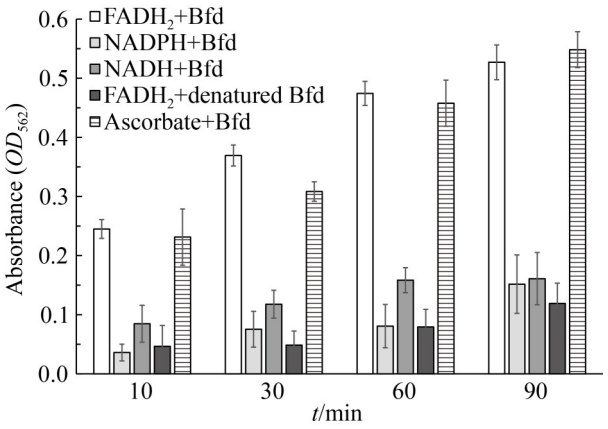


图4 根癌农杆菌Bfd对矿化Bfr铁释放的影响

Figure 4 Effect of *Agrobacterium fabrum* Bfd on iron release from mineralized *Agrobacterium fabrum* Bfr. Bfd (or denatured Bfd) was added to the mineralized Bfr solution with 5 mmol/L ascorbate, 5 mmol/L $FADH_2$, 5 mmol/L NADH, or 5 mmol/L NADPH, respectively. Meanwhile, the Fe^{2+} chelator ferrozine was added to the reaction mixture. Fe(II)-ferrozine chelating complex, $[Fe(Fz)_3]^{4-}$, exhibits an absorption peak at 562 nm. Absorbance at 562 nm was measured at the indicated reaction time. The data represent the mean of three independent experiments.

进 $FADH_2$ 将电子传递给 Bfr 的作用。该结果也说明 Bfd 不会影响像抗坏血酸这类小分子对 Bfr 内腔 Fe^{3+}的还原。

2.5 *ATU_RS13485* 基因的缺失影响根癌农杆菌缺铁条件下的生长和胞内 Bfr 的铁释放

为了进一步验证根癌农杆菌 Bfd 在胞内的生理功能，本研究对根癌农杆菌 Bfd 的编码基因 *ATU_RS13485* 进行精确删除突变。如图 3A 所示，该基因在 *bfr* 的上游，而且与 *bfr* 阅读框共用了 35 bp 核苷酸，因此不能将 *bfd* 基因的完整编码框全部删除，否则会影响 *bfr* 基因的表达。考虑到 *bfr* 基因应该是与 *bfd* 基因位于同一操纵子，*bfr* 基因的核糖体结合序列(S-D 序列)也在 *bfd* 基因内部，在敲除 *bfd* 基因时要充分考虑可能对 *bfr* 造成的影响。因此只删除了 *bfd* 基因从起始密码子 AUG 算起的下游 30 个核苷酸，使 *bfd* 失去起始蛋白质合成的能力，使根癌农杆菌缺失 Bfd。根癌农杆菌的 Bfd 回补菌株则以质粒的方式将 *bfd* 基因重新引入根癌农杆菌的 Bfd 缺失菌株中。将 C58 野生菌、Bfd 缺失菌和 Bfd 回补菌分别在 MG/L 富营养培养基中生长到 OD_{600} 为 0.80，让细胞中的 Bfr 存储充分的铁，然后收集细胞，并用不含铁的合成培养基—AB 培养基洗涤 3 次，将残留的富营养培养基洗干净，再以细胞浓度为 OD_{600}=0.01 接种到不含铁的 AB 培养基中培养，在培养不同的时间后进行取样，测定培养液的 OD_{600} 值，绘制 3 种菌株在缺铁状态下的生长曲线。图 5A 结果显示，Bfd 的缺失显著影响根癌农杆菌在缺铁状态下的生长。与此同时，也测定了 3 种菌株在富营养的 MG/L 培养基中的生长曲线，结果显示，3 种菌株在不缺铁的情况下生长曲线无明显差别(结果未展示)。

为了检测细胞内 Bfr 存储的铁是否能释放，提取在无铁 AB 培养基中培养不同时间的根癌农杆菌的 Bfr 粗提液，然后测定粗提液中的总蛋白质含量，将等蛋白质量的不同根癌农杆菌 Bfr 粗提液进行非变性 PAGE 电泳将蛋白质分开。电泳后的凝胶用铁特异性染色显示含铁的 Bfr 蛋白。图 5B 的结果显示，随着培养时间的延长，在野生菌株 C58 中 Bfr 存储的铁逐渐释放，铁特异性染色逐渐变浅，而 Bfd 缺失菌胞内 Bfr 存储的铁却很难释放，在缺铁条件下培养 20 h 后，Bfr 蛋白质的铁特异性染色仍然很深，说明存储的铁未释放出去。这也说明 *bfd* 基因的删除未影响下游 *bfr* 基因的表达。回补菌胞内 Bfr 释放铁的速度比野生菌还要快，可能是因为用质粒回补 Bfd，基因拷贝数增多，启动子也较强，导致表达量比野生型多。该结果说明，Bfd 的缺失显著影响根癌农杆菌胞内 Bfr 释放其储存的铁，进而影响生长。

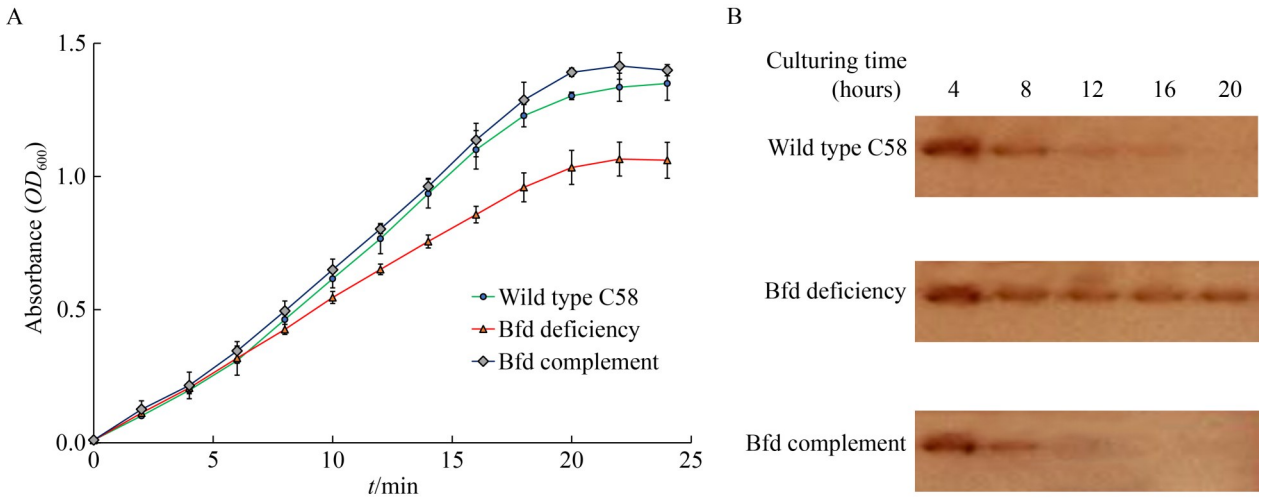


图5 Bfd缺失对根癌农杆菌生长和Bfr铁释放的影响

Figure 5 Effect of Bfd deficiency on the growth of *Agrobacterium fabrum* and Bfr iron release. A: The growth curves of three *Agrobacterium fabrum* strains (wild-type C58, Bfd-deficiency and Bfd-complement). Bacterial cells of the three strains were collected from MG/L rich medium cultures, washed three times with AB defined medium without $FeSO_4$, and then inoculated into the $FeSO_4$-free AB medium at an initial cell concentration of OD_{600}=0.01 to start the culture. The absorbance at 600 nm was measured at different time intervals. Data represent the mean of three independent experiments; B: Iron-specific staining of Bfr from the three *Agrobacterium fabrum* strains. Equal amounts of the cells collected from the three strains at the indicated time intervals were loaded for native PAGE to separate Bfr. The PAGE gel was stained with potassium ferrocyanide $K_4[Fe(CN)_6]$ and the color intensity was enhanced using 3,3′-diaminobenzidine.

3 讨论与结论

储铁蛋白主要功能是维持细胞内的铁平衡，当胞内 Fe^{2+}浓度高时，将溶解性好的 Fe^{2+}吸收进储铁蛋白纳米笼的内腔，并氧化成水溶性差的 Fe^{3+}，以类似铁矿石的结构$[Fe^{3+}\text{-}O]_x$存储在内腔。当细胞需要铁，而胞内 Fe^{2+}浓度较低时，细胞会主动将储铁蛋白中存储的铁还原成可溶的 Fe^{2+}，释放到胞质。在根癌农杆菌的基因组中无编码传统储铁蛋白 Ftn 的基因，只有编码细菌储铁蛋白 Bfr 的基因[43]。尽管根癌农杆菌还有一个能够编码 Dps 的基因，但实验证明 Bfr 是根癌农杆菌胞内储铁的主要蛋白，而且 Bfr 缺失严重影响根癌农杆菌的抗氧化性、生长和致病能力[43-44]。因此，进一步研究根癌农杆菌 Bfr 铁存储和释放的机制就显得非常重要。

Bfr 存储铁的机制研究得较清楚，Bfr 通过其 FOC 的催化将 Fe^{2+}氧化成 Fe^{3+}，并将电子交给 O_2 或 H_2O_2，这也是 Bfr 不仅具有存储铁的功能，还有消除 Fe^{2+}毒害和提高细胞抗氧化能力的原因。铁的氧化和存储过程只需 Bfr 自身就能完成，不需要其他蛋白质的协助[2,11]。然而，Bfr 的铁释放机制就要复杂得多，在不同的情况下可能会有不同的释放机制。从全面分析看，Bfr 存储的铁可能会通过下列 3 种方式释放出来[57]：(1)在低 pH 和对 Fe^{3+}络合能力强的络合剂作用下直接缓慢释放 Fe^{3+}，在酸性条件下 Bfr 存储的三价铁溶解度提高，少量的 Fe^{3+}可被强络合剂络合；(2) Bfr 纳米笼结构的蛋白质外壳被蛋白酶水解，内腔存储的铁直接暴露到细胞质；(3)利用还原剂将 Bfr 存储的 Fe^{3+}还原成 Fe^{2+}，由于 Fe^{2+}的溶解性好，可直接通过 Bfr 纳米笼蛋白质

外壳的孔扩散至细胞质。前 2 种情况被认为是极端或特殊条件下可能发生，是不易调控的被动释放，因此正常情况下 Bfr 存储的铁是通过还原剂主动调控还原成 Fe^{2+}释放出来。

哪种还原剂能为 Bfr 存储的铁提供电子以及电子是如何传递给 Fe^{3+}的，已成为 Bfr 铁释放机制研究的关键。如果 Bfr 释放铁只是一个不被细胞调控的纯化学过程，那么只要有氧化还原电位比 Fe^{3+}/Fe^{2+}氧化还原电位低的还原剂存在就可以还原 Bfr 存储的铁。事实是 Bfr 的铁释放是一个生理生化过程，Bfr 存储的铁在纳米笼的内腔，还原剂或其电子需通过 Bfr 蛋白质外壳才能到达内腔还原$[Fe^{3+}\text{-}O]_x$，是要受 Bfr 调控的。已解析的 Bfr 纳米笼结构显示，其蛋白质外壳上含有孔径大小不同的小孔 62 个[2,11]，个别离子(包括 Fe^{2+})和小分子可通过某些小孔。体外的 Bfr 铁释放实验已经证明，小分子还原剂可以使矿化的 Bfr 迅速释放 Fe^{2+}。本研究结果也显示，小分子还原剂抗坏血酸能直接使矿化的根癌农杆菌 Bfr 迅速释放 Fe^{2+}，不需要其他蛋白质的协助或特殊条件，而 $FADH_2$ 和 NADPH 却不能(图 2)。用不同分子大小的黄素类似物还原型 2,4-二氧四氢蝶啶(lumazine, LM)、还原型核黄素(riboflavin, RF)、$FMNH_2$ 和 $FADH_2$ 还原具完整纳米笼结构的青蛙和分枝杆菌 Ftn 内 Fe^{3+}时发现，分子较小的 LM 和 RF 能使 Ftn 释放出 Fe^{2+}，而分子稍微大一点，且侧链带磷酸基负电荷的 $FMNH_2$ 和 $FADH_2$ 基本不能使 Ftn 释放出 Fe^{2+}，同时 Fe^{2+}的释放速度还因不同的 Ftn 而不同[22,24]。因此，我们的解释是，小分子还原剂可以进入 Bfr 内腔，直接还原其存储的铁，不受 Bfr 蛋白质外壳的主动调控。分子较大的生理还原剂则不能进入内腔，电子需要其他蛋白质的辅助经 Bfr 的蛋白质外壳传给内腔的$[Fe^{3+}\text{-}O]_x$，整个过程受辅助蛋白质和 Bfr 蛋白质外壳的调控。

不同细菌的 Bfr 可能需要不同的辅助蛋白来协助不同的生理还原剂将电子传递给 Bfr。目前，只在大肠杆菌(*E. coli*)、铜绿假单胞菌(*P. aeruginosa*)、鲍氏不动杆菌(*Acinetobacter baumanni*)和流产布鲁氏菌(*Brucella abortus*)中通过实验鉴定出能协助将 $FADH_2$ 电子传给 Bfr 的辅助蛋白 Bfd。Bfd 的缺失和抑制 Bfd 与 Bfr 之间的结合，不仅会严重影响铜绿假单胞菌和鲍曼不动杆菌胞内 Bfr 的铁释放，还严重影响这 2 种菌生物被膜(biofilm)的形成和生长，最终导致死亡[32-33,35]。据此认为，可以通过抑制 Bfd 与 Bfr 的结合破坏细菌细胞内的铁平衡来实现抑菌和抗菌的目标，为新抗生素的寻找开辟一条新途径[36]。需要指出的是，不同细菌的 Bfd 氨基酸序列的同源性很低(图 3B)，意味着不同细菌的 Bfd 与 Bfr 相互作用的关键氨基酸和互作机制可能不同，找不到可以同时抑制多种 Bfd 与 Bfr 互作的广谱抑制剂，每种菌都需要自己专属的 Bfd/Bfr 互作抑制剂，这正好契合专菌专治的发展目标。根癌农杆菌是一种广泛存在于土壤中能引起冠瘿瘤的植物病原菌，如要防治根癌农杆菌确实需要专属的抑菌剂才不会对土壤中的其他菌构成威胁。

总之，本研究在现有 Bfr 铁释放机制研究基础上，结合本实验室以前对根癌农杆菌储铁蛋白的研究，依据生物信息学分析判断，确定根癌农杆菌基因组中重新注释出的 *ATU_RS13485* 基因是编码 Bfd 的基因。通过体外实验证明，无 Bfd 协助根癌农杆菌 Bfr 不能利用生理还原剂 $FADH_2$ 来释放铁。在细胞层次的 Bfd 缺失实验验证了 Bfd 在根癌农杆菌 Bfr 铁释放中的作用，同时也观察到 Bfd 的缺失会影响缺铁情况下根癌农杆菌的生长，明确鉴定了 *ATU_RS13485* 基因及其编码的 Bfd 的功能。如果能进一步解析和验证根癌农杆菌 Bfr 与 Bfd 的互作机制，设计出能抑制这种互作的化合物就有可能找到一种有效且不会对土壤环境微生物造成影响的根癌农杆菌防治办法。

作者贡献声明

冯梦雅：执行实验，数据收集和整理，验证，协

助论文初稿撰写；周琴：执行实验，数据收集和整理；王浩：协助实验操作、形式分析；徐楠：协助实验操作、形式分析；郭敏亮：总体构思，项目管理，获取资助，审核与编辑写作。

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] Plays M, Müller S, Rodriguez R. Chemistry and biology of ferritin[J]. Metallomics, 2021, 13(5): mfab021.

[2] Guo ML, Gao MM, Liu JJ, Xu N, Wang H. Bacterioferritin nanocage: structure, biological function, catalytic mechanism, self-assembly and potential applications[J]. Biotechnology Advances, 2022, 61: 108057.

[3] Expert D. Iron, an element essential to life[M]//Expert D, O'Brian MR. Molecular Aspects of Iron Metabolism in Pathogenic and Symbiotic Plant-Microbe Associations. Dordrecht: Springer Netherlands, 2012: 1-6.

[4] 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.

[5] Le Brun NE, Crow A, Murphy MEP, Mauk AG, Moore GR. Iron core mineralisation in prokaryotic ferritins[J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects, 2010, 1800(8): 732-744.

[6] Bradley JM, Le Brun NE, Moore GR. Ferritins: furnishing proteins with iron[J]. JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry, 2016, 21(1): 13-28.

[7] Crichton RR, Declercq JP. X-ray structures of ferritins and related proteins[J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects, 2010, 1800(8): 706-718.

[8] Finazzi D, Arosio P. Biology of ferritin in mammals: an update on iron storage, oxidative damage and neurodegeneration[J]. Archives of Toxicology, 2014, 88(10): 1787-1802.

[9] Briat JF, Duc C, Ravet K, Gaymard F. Ferritins and iron storage in plants[J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects, 2010, 1800(8): 806-814.

[10] Hempstead PD, Yewdall SJ, Fernie AR, Lawson DM, Artymiuk PJ, Rice DW, Ford GC, Harrison PM. Comparison of the three-dimensional structures of recombinant human H and horse L ferritins at high resolution[J]. Journal of Molecular Biology, 1997, 268(2): 424-448.

[11] Rivera M. Bacterioferritin: structure, dynamics, and protein-protein interactions at play in iron storage and mobilization[J]. Accounts of Chemical Research, 2017, 50(2): 331-340.

[12] Calhoun LN, Kwon YM. Structure, function and regulation of the DNA-binding protein Dps and its role in acid and oxidative stress resistance in *Escherichia coli*: a review[J]. Journal of Applied Microbiology, 2011, 110(2): 375-386.

[13] Almiron M, Link AJ, Furlong D, Kolter R. A novel DNA-binding protein with regulatory and protective roles in starved *Escherichia coli*[J]. Genes & Development, 1992, 6(12b): 2646-2654.

[14] Orban K, Finkel SE. Dps is a universally conserved dual-action DNA-binding and ferritin protein[J]. Journal of Bacteriology, 2022, 204(5): e00036-22.

[15] Andrews SC. The Ferritin-like superfamily: Evolution of the biological iron storeman from a rubrerythrin-like ancestor[J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects, 2010, 1800(8): 691-705.

[16] Theil EC. Ferritin protein nanocages use ion channels, catalytic sites, and nucleation channels to manage iron/oxygen chemistry[J]. Current Opinion in Chemical Biology, 2011, 15(2): 304-311.

[17] Yang XK, Le Brun NE, Thomson AJ, Moore GR, Chasteen ND. The iron oxidation and hydrolysis chemistry of *Escherichia coli* bacterioferritin[J]. Biochemistry, 2000, 39(16): 4915-4923.

[18] Pullin J, Wilson MT, Clémancey M, Blondin G, Bradley JM, Moore GR, Le Brun NE, Lučić M, Worrall JAR, Svistunenko DA. Iron oxidation in *Escherichia coli* bacterioferritin ferroxidase centre, a site designed to react rapidly with H_2O_2 but slowly with O_2[J]. Angewandte Chemie International Edition, 2021, 60(15): 8361-8369.

[19] 黄河清, 张凤章, 陈灿和, 邱雪慧, 许良树, 曾定. 细菌铁蛋白释放铁的动力学研究[J]. 生物物理学报, 1996, 12(1): 33-38.
Huang HQ, Zhang FZ, Chen CH, Qiu XH, Xu LS, Zeng D. Studies on kinetics of iron releasing from bacterial ferritin[J]. Acta Biophysica Sinica, 1996, 12(1): 33-38 (in Chinese).

[20] Badu-Boateng C, Naftalin RJ. Ascorbate and ferritin interactions: consequences for iron release *in vitro* and *in vivo* and implications for inflammation[J]. Free Radical Biology and Medicine, 2019, 133: 75-87.

[21] Bou-Abdallah F, Paliakkara JJ, Melman G, Melman A. Reductive mobilization of iron from intact ferritin: mechanisms and physiological implication[J]. Pharmaceuticals, 2018, 11(4): 120.

[22] Behera N, Bhattacharyya G, Behera RK. *In vitro* iron release from intact ferritin protein nanocages: impact of physiological reducing agents and the ascorbate-quinone redox couple[J]. Chemistry - An Asian Journal, 2025, 20(24): e00803.

[23] Koochana PK, Mohanty A, Das S, Subhadarshanee B, Satpati S, Dixit A, Sabat SC, Behera RK. Releasing iron from ferritin protein nanocage by reductive method: The role of electron transfer mediator[J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects, 2018, 1862(5): 1190-1198.

[24] Koochana PK, Mohanty A, Parida A, Behera N, Behera PM, Dixit A, Behera RK. Flavin-mediated reductive iron mobilization from frog M and Mycobacterial ferritins: impact of their size, charge and reactivities with NADH/O2[J]. JBIC Journal of Biological Inorganic

Chemistry, 2021, 26(2/3): 265-281.
[25] Weeratunga SK, Gee CE, Lovell S, Zeng YH, Woodin CL, Rivera M. Binding of *Pseudomonas aeruginosa* apobacterioferritin-associated ferredoxin to bacterioferritin B promotes heme mediation of electron delivery and mobilization of core mineral iron[J]. Biochemistry, 2009, 48(31): 7420-7431.
[26] Yao HL, Wang Y, Lovell S, Kumar R, Ruvinsky AM, Battaile KP, Vakser IA, Rivera M. The structure of the BfrB-bfd complex reveals protein-protein interactions enabling iron release from bacterioferritin[J]. Journal of the American Chemical Society, 2012, 134(32): 13470-13481.
[27] Wijerathne H, Yao HL, Wang Y, Lovell S, Battaile KP, Rivera M. Bfd, a new class of [2Fe-2S] protein that functions in bacterial iron homeostasis, requires a structural anion binding site[J]. Biochemistry, 2018, 57(38): 5533-5543.
[28] Mohanty A, Parida A, Subhadarshanee B, Behera N, Subudhi T, Koochana PK, Behera RK. Alteration of coaxial heme ligands reveals the role of heme in bacterioferritin from *Mycobacterium tuberculosis*[J]. Inorganic Chemistry, 2021, 60(22): 16937-16952.
[29] Pullin J, Bradley JM, Moore GR, Le Brun NE, Wilson MT, Svistunenko DA. Electron transfer from haem to the di-iron ferroxidase centre in bacterioferritin[J]. Angewandte Chemie International Edition, 2021, 60(15): 8376-8379.
[30] Bradley JM, Bugg Z, Sackey A, Andrews SC, Wilson MT, Svistunenko DA, Moore GR, Le Brun NE. The ferroxidase centre of *Escherichia coli* bacterioferritin plays a key role in the reductive mobilisation of the mineral iron core[J]. Angewandte Chemie International Edition, 2024, 63(16): e202401379.
[31] Wang A, Zeng YH, Han H, Weeratunga S, Morgan BN, Moënne-Loccoz P, Schönbrunn E, Rivera M. Biochemical and structural characterization of *Pseudomonas aeruginosa* Bfd and FPR: ferredoxin $NADP^+$ reductase and not ferredoxin is the redox partner of heme oxygenase under iron-starvation conditions[J]. Biochemistry, 2007, 46(43): 12198-12211.
[32] Eshelman K, Yao HL, Punchi Hewage AND, Deay JJ, Chandler JR, Rivera M. Inhibiting the BfrB: Bfd interaction in *Pseudomonas aeruginosa* causes irreversible iron accumulation in bacterioferritin and iron deficiency in the bacterial cytosol[J]. Metallomics, 2017, 9(6): 646-659.
[33] Behm AM, Yao HL, Eze EC, Alli SA, Baugh SDP, Ametsetor E, Powell KM, Battaile KP, Seibold S, Lovell S, Bunce RA, Reitz AB, Rivera M. Inhibitors of the bacterioferritin ferredoxin complex dysregulate iron homeostasis and kill *Acinetobacter baumannii* and biofilm-embedded *Pseudomonas aeruginosa* cells[J]. ACS Infectious Diseases, 2025, 11(7): 1983-1993.
[34] Bradley JM, Carter AM, Bugg Z, Andrews SC, Le Brun NE. The iron-sulfur cluster of bacterioferritin-associated ferredoxin (bfd): a “biological fuse” that prevents oxidative damage to cells[J]. Angewandte Chemie International Edition, 2025, 64(34): e202511340.
[35] Punchi Hewage AND, Yao HL, Nammalwar B, Gnanasekaran KK, Lovell S, Bunce RA, Eshelman K, Phaniraj SM, Lee MM, Peterson BR, Battaile KP, Reitz AB, Rivera M. Small molecule inhibitors of the BfrB-bfd interaction decrease *Pseudomonas aeruginosa* fitness and potentiate fluoroquinolone activity[J]. Journal of the American Chemical Society, 2019, 141(20): 8171-8184.
[36] Rivera M. Mobilization of iron stored in bacterioferritin, a new target for perturbing iron homeostasis and developing antibacterial and antibiofilm molecules[J]. Journal of Inorganic Biochemistry, 2023, 247: 112306.
[37] Liu LJ, Harmon EK, Craig JK, Yao HL, Battaile KP, Johnson DK, Subramanian S, Van Voorhis WC, Rivera M, Lovell S. Structural analysis and inhibitor modeling of bacterioferritin from *Brucella abortus*[J]. Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics, 2026, 94(6): 1170-1181.
[38] Guo ML, Ye JY, Gao DW, Xu N, Yang J. *Agrobacterium*-mediated horizontal gene transfer: Mechanism, biotechnological application, potential risk and forestalling strategy[J]. Biotechnology Advances, 2019, 37(1): 259-270.
[39] Brown PJB, Chang JH, Fuqua C. *Agrobacterium tumefaciens*: a transformative agent for fundamental insights into host-microbe interactions, genome biology, chemical signaling, and cell biology[J]. Journal of Bacteriology, 2023, 205(4): e00005-23.
[40] Liu JJ, Feng MY, Xu N, Wang H, Guo ML. *Agrobacterium fabrum* (*tumefaciens*) chemosensory system: a typical model of one histidine kinase for two coupling proteins and multiple response regulators[J]. Microorganisms, 2025, 13(11): 2556.
[41] Loyola-Vargas VM, Méndez-Hernández HA, Quintana-Escobar AO. The history of *Agrobacterium rhizogenes*: from pathogen to a multitasking platform for biotechnology[M]//Loyola-Vargas V, Ochoa-Alejo N. Plant Cell Culture Protocols. New York, NY: Springer US, 2024: 51-69.
[42] Azizi-Dargahlou S, Pouresmaeil M. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated plant transformation: a review[J]. Molecular Biotechnology, 2024, 66(7): 1563-1580.
[43] Yang J, Pan XY, Xu YJ, Li Y, Xu N, Huang ZW, Ye JY, Gao DW, Guo ML. *Agrobacterium tumefaciens* ferritins play an important role in full virulence through regulating iron homeostasis and oxidative stress survival[J]. Molecular Plant Pathology, 2020, 21(9): 1167-1178.
[44] 周琴, 高苗苗, 潘晓玥, 王浩, 徐楠, 郭敏亮. 两种根癌农杆菌储铁蛋白功能的鉴定和体外自组装[J]. 微生物学报, 2024, 64(11): 4234-4247.
Zhou Q, Gao MM, Pan XY, Wang H, Xu N, Guo ML. Functional identification and *in vitro* self-assembly of two ferritins of *Agrobacterium fabrum*[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2024, 64(11): 4234-4247 (in Chinese).
[45] 宗仁杰, 高苗苗, 张梦琪, 王浩, 徐楠, 郭敏亮. 根癌农杆菌化学受体MCP1912调节趋化响应功能的鉴定[J]. 微生物学报, 2022, 62(5): 1949-1961.
Zong RJ, Gao MM, Zhang MQ, Wang H, Xu N, Guo ML. Functional identification of *Agrobacterium tumefaciens*

chemoreceptor MCP1912 in regulating chemotactic response[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2022, 62(5): 1949-1961 (in Chinese).

[46] Xu N, Yang XJ, Li CH, Zhang C, Guo ML. Identification and functional characterization of chemoreceptors for phenolic acids in *Agrobacterium tumefaciens*[J]. Microbiological Research, 2026, 302: 128348.

[47] Wang H, Zhang MQ, Xu YJ, Zong RJ, Xu N, Guo ML. *Agrobacterium fabrum atu0526*-encoding protein is the only chemoreceptor that regulates chemoattraction toward the broad antibacterial agent formic acid[J]. Biology, 2021, 10(12): 1345.

[48] 郭敏亮, 姜涌明. 考马斯亮蓝显色液组分对蛋白质测定的影响[J]. 生物化学与生物物理进展, 1996, 23(6): 558-561.
Guo ML, Jiang YM. Effect of ingredients of coomassie brilliant blue color-developing reagent on protein assay[J]. Progress in Biochemistry and Biophysics, 1996, 23(6): 558-561 (in Chinese).

[49] Guo ML, Zhu Q, Gao DK. Development and optimization of method for generating unmarked *Agrobacterium tumefaciens* mutants[J]. Progress in Biochemistry and Biophysics, 2009, 36(5): 556-565.

[50] Guo ML, Hou QM, Hew CL, Pan SQ. *Agrobacterium* VirD2-binding protein is involved in tumorigenesis and redundantly encoded in conjugative transfer gene clusters[J]. Molecular Plant-Microbe Interactions®, 2007, 20(10): 1201-1212.

[51] Huang ZW, Zhou QX, Sun P, Yang J, Guo ML. Two *Agrobacterium tumefaciens* CheW proteins are incorporated into one chemosensory pathway with different efficiencies[J]. Molecular Plant-Microbe Interactions®, 2018, 31(4): 460-470.

[52] Guo ML, Jin SG, Sun DY, Hew CL, Pan SQ. Recruitment of conjugative DNA transfer substrate to *Agrobacterium* type IV secretion apparatus[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2007, 104(50): 20019-20024.

[53] Mohanty A, Subhadarshanee B, Barman P, Mahapatra C, Aishwarya B, Behera RK. Iron mineralizing bacterioferritin a from *Mycobacterium tuberculosis* exhibits unique catalase-dps-like dual activities[J]. Inorganic Chemistry, 2019, 58(8): 4741-4752.

[54] Parida A, Mohanty A, Kansara BT, Behera RK. Impact of phosphate on iron mineralization and mobilization in nonheme bacterioferritin B from *Mycobacterium tuberculosis*[J]. Inorganic Chemistry, 2020, 59(1): 629-641.

[55] Wedderhoff I, Kursula I, Groves MR, Ortiz de Orué Lucana D. Iron binding at specific sites within the octameric HbpS protects streptomycetes from iron-mediated oxidative stress[J]. PLoS One, 2013, 8(8): e71579.

[56] Behera N, Bhattacharyya G, Behera S, Behera RK. Iron mobilization from intact ferritin: effect of differential redox activity of quinone derivatives with NADH/O2 and in situ-generated ROS[J]. JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry, 2024, 29(4): 455-475.

[57] Honarmand Ebrahimi K, Hagedoorn PL, Hagen WR. Unity in the biochemistry of the iron-storage proteins ferritin and bacterioferritin[J]. Chemical Reviews, 2015, 115(1): 295-326.