

肠炎沙门菌 Z11 中 *iscA* 基因的敲除及功能

余逸^{1,2,3,4}, 顾丹^{1,2,3,4}, 焦新安^{1,2,3,4}, 潘志明^{1,2,3,4*}

- 1 扬州大学, 江苏省人兽共患病学重点实验室, 江苏 扬州
- 2 扬州大学, 江苏高校动物重要疫病与人兽共患病防控协同创新中心, 江苏 扬州
- 3 扬州大学, 农业农村部农产品质量安全生物性危害因子(动物源)控制重点实验室, 江苏 扬州
- 4 扬州大学, 教育部农业与农产品安全国际合作联合实验室, 江苏 扬州

余逸, 顾丹, 焦新安, 潘志明. 肠炎沙门菌 Z11 中 *iscA* 基因的敲除及功能[J]. 微生物学报, 2025, 65(5): 2144-2156.

YU Yi, GU Dan, JIAO Xin'an, PAN Zhiming. Knockout and functional characterization of *iscA* in *Salmonella* Enteritidis Z11[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2025, 65(5): 2144-2156.

摘要: 肠炎沙门菌(*Salmonella* Enteritidis)是一种重要的食源性病原菌,可引起人和动物的胃肠道感染。*iscA* 是编码铁-硫(Fe-S)簇组装的关键基因之一,参与铁离子的转运和能量代谢,是一种保守的 A 型铁结合蛋白。【目的】通过构建肠炎沙门菌 Z11 Δ *iscA* 突变株,探究 IscA 在沙门菌感染过程中的作用。【方法】以实验室保存的肠炎沙门菌 Z11 菌株为研究对象,采用无标记框内缺失突变法构建 *iscA* 突变株。分析并比较野生株与突变株在运动性、生物被膜形成能力等方面的差异;分别在小鼠单核巨噬细胞 RAW264.7 和小鼠模型上探究 IscA 对肠炎沙门菌毒力的影响。【结果】本研究成功构建了 Δ *iscA* 缺失株;与野生株相比, Δ *iscA* 在生长能力和生物被膜形成能力方面无明显差异,表明缺失 *iscA* 基因不会影响肠炎沙门菌的正常生长和生物被膜形成;在运动性方面, Δ *iscA* 在 6 h 时的菌圈直径显著小于野生株,表明 *iscA* 基因的缺失降低了肠炎沙门菌 Z11 的游动能力。在 RAW264.7 细胞实验中,与野生株相比, Δ *iscA* 缺失株的黏附和侵袭能力均显著降低,分别下降至约 37% 和 20%;并且, Δ *iscA* 缺失株突破细胞屏障进入细胞内的增殖速率也显著低于野生株。小鼠感染实验结果显示, Δ *iscA* 缺失株在空肠和盲肠中的定殖能力显著低于野生株感染组。【结论】基因 *iscA* 与肠炎沙门菌的毒力密切相关,其缺失会影响该菌株的运动性、黏附侵袭能力、胞内增殖能力,并且降低其在宿主肠道中的定殖能力,从而进一步影响肠炎沙门菌的感染过程。

关键词: 肠炎沙门菌; *iscA* 基因; 运动性; 定殖

资助项目: 国家自然科学基金(32161143011, 31972685)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (32161143011, 31972685).

*Corresponding author. E-mail: zmpan@yzu.edu.cn

Received: 2024-11-25; Accepted: 2025-01-05; Published online: 2025-02-26

Knockout and functional characterization of *iscA* in *Salmonella* Enteritidis Z11

YU Yi^{1,2,3,4}, GU Dan^{1,2,3,4}, JIAO Xin'an^{1,2,3,4}, PAN Zhiming^{1,2,3,4*}

1 Jiangsu Key Laboratory of Zoonosis, Yangzhou University, Yangzhou, Jiangsu, China

2 Jiangsu Co-innovation Center for the Prevention and Control of Important Animal Infectious Diseases and Zoonoses, Yangzhou University, Yangzhou, Jiangsu, China

3 Key Laboratory of Prevention and Control of Biological Hazard Factors (Animal Origin) for Agricultural Product Safety and Quality, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Yangzhou University, Yangzhou, Jiangsu, China

4 Joint International Research Laboratory of Agriculture and Agri-product Safety, Ministry of Education, Yangzhou University, Yangzhou, Jiangsu, China

Abstract: *Salmonella* Enteritidis is a major foodborne pathogen that can cause gastrointestinal infections in both humans and animals. As one of the key genes encoding the iron-sulfur cluster assembly, *iscA* plays a role in the transport of iron ions and energy metabolism. IscA is a conserved A-type iron-binding protein. **[Objective]** To study the role of *iscA* in the infection process of *Salmonella* by constructing an *iscA*-deleted mutant (Δ *iscA*) of *Salmonella* Enteritidis Z11. **[Methods]** The unmarked in-frame gene deletion method was employed to construct Δ *iscA* from the laboratory-preserved *Salmonella* Enteritidis Z11 strain. The wild type (WT) and Δ *iscA* were compared in terms of motility and biofilm formation. Additionally, the impact of IscA on the virulence of *Salmonella* Enteritidis was explored in both RAW264.7 cells and a mouse model. **[Results]** The deletion mutant Δ *iscA* was successfully constructed. No significant difference in the growth or biofilm formation was observed between Δ *iscA* and WT, indicating that the deletion of *iscA* did not affect the normal growth or biofilm formation of *Salmonella* Enteritidis. However, Δ *iscA* exhibited a significantly smaller zone of motility than WT at the time point of 6 h, suggesting that the loss of *iscA* reduced the motility of *Salmonella* Enteritidis Z11. In RAW264.7 cells, the adhesion and invasion of Δ *iscA* significantly decreased to 37% and 20%, respectively, of those of WT. Furthermore, the proliferation rate of Δ *iscA* in the cells was significantly lower than that of WT. Mouse infection experiments revealed that Δ *iscA* demonstrated reduced colonization in the jejunum and cecum compared with WT. **[Conclusion]** *iscA* is closely associated with the virulence of *Salmonella* Enteritidis. Its deletion affects the motility, adhesion, invasion, and proliferation, ultimately reducing the colonization in the host intestine and influencing the infection process of *Salmonella* Enteritidis.

Keywords: *Salmonella* Enteritidis; *iscA*; motility; colonization

肠炎沙门菌(*Salmonella* Enteritidis)是一种重要的人兽共患食源性病原菌, 广泛存在于畜禽及其肉制品中, 能够通过受污染的食物感染人类, 严重威胁公共健康^[1-2]。肠炎沙门菌感染后,

通常会导致急性胃肠道疾病, 主要表现为腹泻、发烧和腹痛, 严重时可导致败血症, 甚至危及生命^[3]。感染后, 肠炎沙门菌定殖于宿主肠道, 通过黏附和侵袭等方式突破宿主肠道屏障, 进

一步扩散至肠道黏膜下层和淋巴组织, 引发典型的胃肠道症状^[4]。在肠炎沙门菌的感染和致病过程中, 沙门菌毒力岛 1 (*Salmonella pathogenicity island 1*, SPI-1)和毒力岛 2 (*Salmonella pathogenicity island 2*, SPI-2)发挥着关键作用。SPI-1 基因编码的 III 型分泌系统 T3SS1 主要促进沙门菌对肠道上皮细胞的黏附和入侵, 而 SPI-2 基因编码的 T3SS2 则协助病原菌在宿主细胞内的存活和复制, 二者协同作用使沙门菌能有效突破宿主免疫防御机制^[5]。随着对沙门菌致病机制的深入研究, 发现宿主环境信号, 如 pH、渗透压、温度和铁离子等, 通过调控 SPI-1 和 SPI-2 的表达, 进而影响沙门菌的感染过程^[6]。

在感染过程中, 细菌需应对多种环境应激, 主要包括来自反应性化学物质或营养限制的挑战, 如活性氧(reactive oxygen species, ROS)、活性氮(reactive nitrogen species, RNS)以及限铁环境等^[7]。为了维持在不同环境条件下的存活, 细菌进化出了多个系统以抵御这些化学物质或营养限制。铁-硫(Fe-S)簇结合蛋白在这一过程中发挥了重要作用。Fe-S 簇是由铁和硫原子构成的金属簇, 广泛存在于各种生物体内, 作为多种蛋白质的辅因子参与多种重要的生物学过程, 如铁稳态调节、电子转移、代谢催化、固氮、基因表达调控以及活性氧的感应等^[8]。目前, 在原核生物中已经鉴定出 5 种 Fe-S 簇生物合成系统, 即 nitrogen fixation (NIF)、iron-sulfur cluster (ISC)、mobilization of Sulfur (SUF)、minimal *isc* system (MIS) 和 SUF-like minimal system (SMS), 其中 ISC 和 SUF 被认为是主要的合成系统^[9-10]。ISC 被认为是大肠杆菌中主要的 Fe-S 簇生物合成途径, 而 SUF 途径则被视为是替代途径, 主要在 Fe-S 需求提高的条件下发挥作用^[11]。

在大肠杆菌中, ISC 铁-硫(Fe-S)簇合成系统主要由高度保守的基因簇 *iscRSUA-hscBA-fdx* 组成, 该基因簇编码 7 种蛋白——IscR、IscS、IscU、IscA、HscB、HscA 和铁氧还蛋白, 它们在 Fe-S 簇的合成过程中各自发挥着关键作

用^[12]。IscS 是一种半胱氨酸脱硫酶, 负责催化 L-半胱氨酸的脱硫反应, 从而产生 Fe-S 簇组装所必需的硫^[13]。IscU 则作为支架, 帮助结合和组装 Fe-S 簇, 并在组装完成后将其转移到靶蛋白上^[14]。IscA 是一种铁结合蛋白, 通过运输细胞内的铁和硫来克服铁限制的问题, 为 IscU 中的铁硫团簇组装提供铁^[15]。HscA 伴侣蛋白通过识别特定的氨基酸序列与 IscU 特异性相互作用^[16]。IscR 是一个转录抑制因子, 通过感知细胞中 Fe-S 簇的水平来调控 ISC 基因簇的表达^[17]。当胞内 Fe-S 簇水平较高时, IscR 与 Fe-S 簇结合形成全酶-IscR, 与 *isc* 操纵子启动子结合, 抑制其转录; 当细胞内 Fe-S 簇水平较低时, IscR 不结合 Fe-S 簇形成脱簇形式, 无法结合 *isc* 操纵子启动子, 此时 *isc* 操纵子表达, 促进 Fe-S 簇的合成, 以维持细胞内 Fe-S 簇的稳态^[18-19]。

近年来的研究表明, 在志贺氏菌中 *iscA* 基因的表达与细菌的毒力和致病性密切相关, 缺乏 *iscA* 基因的细胞会面临 Fe-S 簇合成不足的问题, 进而导致细胞增殖减缓甚至死亡^[20]。在沙门菌中 *iscA* 基因的表达受到环境因素的调控, 例如活性氧^[21]和铁离子^[22]。IscR 是调控 Fe-S 簇基因表达的关键调控因子, 其可以直接结合到沙门菌毒力岛 SPI-1 的关键调控因子 *hilD* 的启动子上直接调控该基因的表达, 进而调控 SPI-1 的表达^[23]。此外, 通过转座子插入突变体文库的筛选发现鼠伤寒沙门菌的 *iscA* 基因对其在苜蓿上的定殖具有重要作用^[24]。实验室前期构建了肠炎沙门菌 Z11 转座子突变体文库, 并通过小鼠模型筛选发现, *iscA* 基因插入突变导致其小鼠肠道中的定殖能力减弱^[25]。这些结果都表明沙门菌的 *iscA* 可能在其感染过程中发挥重要作用。本研究选择 *iscA* 基因进行后续研究, 通过无标记框内缺失法构建 Δ *iscA* 突变株, 分析其毒力表型、黏附侵袭和胞内增殖能力, 以及在小鼠不同脏器中的定殖能力, 旨在揭示 *iscA* 基因在肠炎沙门菌感染中的功能, 为进一步探究其致病机制提供新思路。

1 材料与方法

1.1 细菌、质粒、引物、细胞和实验动物

肠炎沙门菌(*Salmonella Enteritidis*) Z11 野生株(wild type, WT)由本课题组分离并保存, 大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5 α λ pir 和 X7213 λ pir 用于质粒 pDM4 的扩增, 本研究所用的菌株和质粒见表 1; 所用引物均由南京擎科生物科技有限公司合成。小鼠单核巨噬细胞 RAW264.7 为本实验室保存, 需在含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基中培养, 培养条件为 37 °C、5% CO₂。6–8 周龄 C57BL/6 小鼠由扬州大学比较医学中心提供。本研究所有动物实验均获得扬州大学动物伦理委员会的批准(批准号: 202104013)。

1.2 培养基

LB 固体培养基(g/L): NaCl 10.0, 胰蛋白胨 10.0, 牛肉膏 5.0, 琼脂 15.0; 煌绿琼脂培养基(g/L): 胰酪蛋白胨 5.0, 蛋白胨 5.0, 酵母粉 3.0, NaCl 5.0, 乳糖 10.0, 蔗糖 10.0, 亮绿 0.012 5, 苯酚红 0.08, 琼脂 20.0, pH 6.9 $\pm$ 0.2。根据实验需求添加以下成分: 氯霉素(Cm, 25 μ g/mL)、羧苄青霉素(Carb, 100 ng/mL)、硫酸庆大霉素(Gm, 100 μ g/mL、10 μ g/mL)、2,6-二氨基庚二酸(mes0-2,6-diaminopimelic acid, DAP, 50 μ g/mL)。

1.3 主要试剂和仪器

羧苄青霉素、链霉素、硫酸卡那霉素、微孔滤膜、蔗糖、超级感受态制备试剂盒, 生工生物工程(上海)股份有限公司; 2,6-二氨基庚二酸(DAP), Sigma-Aldrich 公司; 2 $\times$ Taq MasterMix、PrimeSTAR Max DNA Polymerase、*Sal* I、*Sac* I 限制性核酸内切酶, TaKaRa 公司; ClonExpress Ultra One Step Cloning Kit, 南京诺维赞生物科技股份有限公司; DMEM 细胞培养基、Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (DPBS)、胰酶和胎牛血清, Gibco 公司; 细菌基因组提取试剂盒、琼脂糖凝胶回收试剂盒、无内毒素质粒大提试剂盒、快速质粒小提试剂盒, 天根生化科技(北京)有限公司;

摇床, 上海市离心机械研究所有限公司; PCR 仪, 凝胶成像仪、基础通用电泳仪、琼脂糖凝胶水平电泳槽、全自动细胞计数仪, Bio-Rad 公司; 超微量紫外-可见分光光度计、CO₂ 培养箱, ThermoFisher Scientific 公司; 恒温金属浴, 杭州博日科技有限公司; 多功能酶标仪, BioTek 公司。

1.4 肠炎沙门菌 Z11 基因组提取

复苏肠炎沙门菌 Z11 于添加 Carb 的 LB 平板上, 37 °C 培养 12–16 h, 用接种环刮取单菌落于

表1 本研究所用的菌株和质粒

Table 1 The strains and plasmids used in this study

菌株/质粒 Strains/plasmids	说明/用途 Relevant characteristics	来源 Source
<i>Escherichia coli</i>		
X7213 λ pir	Host for π requiring plasmids, Conjugal donor	Laboratory collection
DH5 α λ pir	Host for π requiring plasmids	Laboratory collection
<i>Salmonella</i> Enteritidis		
Z11	Wild type	Laboratory collection
Δ iscA	Z11, in-frame deletion in <i>iscA</i>	This study
Δ iscA:: <i>iscA</i>	Δ iscA, complements <i>iscA</i>	This study
Δ iscA::Vector	Δ iscA, complements vector	This study
Plasmids		
pDM4	Suicide vector, <i>pir</i> dependent, R6K, <i>Sac</i> BR, Cm ^r	Laboratory collection
pBAD33	Carrying a mob gene in pBAD33, Cm ^r	Laboratory collection

添加 Carb 的 LB 液体培养基中, 37 °C、180 r/min 培养 12 h, 按照细菌基因组提取试剂盒说明书提取肠炎沙门菌 Z11 基因组总 DNA。

1.5 框内无标记缺失突变株构建

构建缺失突变株和回补株所用引物见表 2。

以 Z11 菌株基因组为模板, 分别扩增 *iscA* 上下游同源臂(up 和 down 片段), 引物为 *iscA*-Up-F 和 *iscA*-Up-R。PCR 反应体系 (50 μL): PrimeSTAR Max DNA Polymerase 25 μL, 上、下游引物 (10 μmol/L) 各 2 μL, DNA 模板 2 μL, ddH₂O 19 μL。PCR 反应条件: 98 °C 预变性 3 min; 95 °C 变性 15 s, 58 °C 退火 10 s, 72 °C 延伸 15 s, 30 个循环; 72 °C 终延伸 10 min。使用 ClonExpress Ultra One Step Cloning Kit 将上下游同源臂插入到 *Sal* I 和 *Sac* I 双酶切的 pDM4 质粒, 50 °C 连接 15–20 min, 42 °C 热转化 *E. coli* DH5α *λpir* 和 X7213 *λpir* 感受态细胞。转化后, 挑取单菌落进行 PCR 验证。PCR 反应体系 (20 μL): 2×*Taq* MasterMix 10 μL, 上、下游引物 (10 μmol/L) 各 1 μL, DNA 模板 1 μL, ddH₂O 7 μL。PCR 反应条件: 95 °C 预变性 5 min; 95 °C 变性 30 s,

58 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 1 min 30 s, 30 个循环; 72 °C 终延伸 10 min。重组质粒通过接合转移方式转化进入 Z11 菌株, 用 *Sal* I-up/Out-F 和 *Sac* I-down/Out-F 两对引物分别进行 PCR 扩增验证单交换正确的菌落, 并进行蔗糖筛选。单菌落分别用 *iscA*-Out-F/R 和 *iscA*-In-F/R 引物对进行 PCR 验证, 获得正确的 *iscA* 缺失突变株。PCR 反应体系 (20 μL): 2×*Taq* MasterMix 10 μL, 上、下游引物 (10 μmol/L) 各 1 μL, DNA 模板 1 μL, ddH₂O 7 μL。PCR 反应条件: 95 °C 预变性 5 min; 95 °C 变性 30 s, 58 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 2 min, 30 个循环; 72 °C 终延伸 10 min。

1.6 回补株构建

以 Z11 菌株基因组为模板, 扩增 *iscA* 基因启动子及开放阅读框(open reading frame, ORF)区域。PCR 反应体系: PrimeSTAR Max DNA Polymerase 25 μL, 上、下游引物 (10 μmol/L) 各 2 μL, DNA 模板 2 μL, ddH₂O 19 μL。PCR 反应条件: 98 °C 预变性 3 min; 95 °C 变性 15 s, 58 °C 退火 10 s, 72 °C 延伸 15 s, 30 个循环; 72 °C 终延伸 10 min。PCR 产物通过 ClonExpress

表2 Z11Δ*iscA*缺失突变株和Δ*iscA*::*iscA*回补株构建和验证引物

Table 2 Primers used for the construction and verification of the Z11Δ*iscA* deletion mutant and Δ*iscA*::*iscA* complementation strains

Primer name	Primer sequences (5'→3')
<i>iscA</i> -Up-F	GAGCGGATAACAATTTGTGGAATCCCGGGAAGAGGGTGAAGTAATCCATA
<i>iscA</i> -Up-R	TTTTGTTATGTAACCGTGTTCCGCTGTTATACCGA
<i>iscA</i> -Down-F	AACACGGTTACATAACAAAACCTCAATGTTAACGT
<i>iscA</i> -Down-R	AGCGGAGTGATATCAAGCTTATCGATACCTCTGGTAACGGAGTGGGTGA
<i>iscA</i> -Out-F	GAACCGTCGCAACCAGAGAG
<i>iscA</i> -Out-R	CGTCTGCGTGACCTTTCTCC
<i>iscA</i> -In-F	AAATTGCAGGCTCTTGCCGT
<i>iscA</i> -In-R	CTGGCCAACCGTGGTAAAGG
<i>iscA</i> -F	AGCGAATTTTCGAGCTCGGTACCTTACACGTGGAAGCTTTTCGCC
<i>iscA</i> -R	TCCGCCAAAACAGCCAAGCTTACGTCATGAAGTTGCAGATTAAAGTT
pBAD33-F	TCTACTGTTTCTCCATACCCGTTTT
pBAD33-F	TTCTGCGTTCTGATTTAATCTGTAT
<i>Sal</i> I-up	GGTGCTCCAGTGGCTTCTGTTTCTA
<i>Sac</i> I-down	CAGCAACTTAAATAGCCTCTAAGGT

Ultra One Step Cloning Kit 插入到 *Kpn* I 和 *Hind* III 双酶切的 pBAD33 质粒中。重组质粒通过电转化进入 $\Delta iscA$ 缺失株, PCR 验证获得正确的 $\Delta iscA::iscA$ 回补株。PCR 反应体系(20 μ L): $2\times$ Taq MasterMix 10 μ L, 上、下游引物(10 μ mol/L) 各 1 μ L, DNA 模板 1 μ L, ddH₂O 7 μ L。PCR 反应条件: 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 95 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 58 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min 30 s, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 终延伸 10 min。在培养细菌时, 回补株和空质粒回补株需添加氯霉素(25 μ g/mL)以维持质粒的稳定性。

1.7 *iscA* 基因缺失对肠炎沙门菌表型的影响

1.7.1 生长曲线测定

复苏 Z11、 $\Delta iscA$ 突变株及回补株, 挑取单菌落接种于 LB 液体培养基中, 37 $^{\circ}$ C、180 r/min 培养过夜。取 1 mL 新鲜菌液测 OD_{600} , 并调节 OD_{600} 至 0.05, 取 200 μ L 菌液加入 96 孔板中, 37 $^{\circ}$ C、180 r/min 培养, 使用酶标仪每隔 1 h 测定 OD_{600} 值, 直至所有菌株达到平台期并记录相关数据(测定 24 h)。

1.7.2 运动性测定

复苏 Z11、 $\Delta iscA$ 突变株及回补株, 挑取单菌落接种于 LB 液体培养基中, 37 $^{\circ}$ C、180 r/min 培养过夜。取 1 mL 新鲜菌液用 PBS 洗涤 2 遍, 8 000 r/min 离心 2 min, 用 PBS 轻轻吹打重悬菌体后测 OD_{600} 值, 调节 OD_{600} 至 1.0, 取 2.5 μ L 菌液分别点在含 0.3% 琼脂的 LB 平板上, 于 37 $^{\circ}$ C 培养箱中正置培养 6 h。观察菌株的形态, 并测量菌圈直径。

1.7.3 生物被膜形成能力测定

将过夜培养的菌液用 PBS 洗涤 2 遍, 8 000 r/min 离心 2 min, 用 PBS 轻轻吹打重悬菌体后测 OD_{600} 值, 调节 OD_{600} 至 1.0。取 150 μ L 菌液接入 3 mL 新鲜 LB 液体培养基中, 静置培养 72 h。随后进行结晶紫染色, 加入 200 μ L 甲醇固定 15 min, 加入 200 μ L 结晶紫染色液, 静

置染色 15 min, 弃掉液体, 用蒸馏水洗去多余染液; 加入 200 μ L 33% 冰醋酸, 用枪头轻微洗下试管壁的生物膜, 取 100 μ L 测量 OD_{595} 处的吸光值。

1.8 细胞感染试验

1.8.1 黏附和侵袭能力测定

复苏实验室冻存的鼠源巨噬细胞 RAW264.7 于含有 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基中, 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 条件下培养。感染前 1 天, 将巨噬细胞以 5×10^5 /孔接种于 24 孔板中, 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养 10–12 h。将培养好的菌液 4 500 r/min 离心 5 min, 用 DPBS 洗涤 2 遍, 测定并调节 OD_{600} 至 1.0, 取 1 mL 菌液梯度稀释后计数。以 MOI=10 感染细胞, 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养 0.5 h。黏附孔中加入 1 mL 含有 0.2% Triton X-100 的 PBS 裂解细胞 10 min, 梯度稀释后计数。按照公式(1)计算黏附率。

$$\text{黏附率} = (\text{胞外黏附细菌数} / \text{总感染细菌数}) \times 100\% \quad (1)$$

按照上述方法感染并黏附细胞 0.5 h 后, 用 DPBS 洗涤 3 遍, 加入含有 100 μ g/mL 庆大霉素的 DMEM 培养基分别侵袭 2、4 和 6 h。用含有 0.2% Triton X-100 的 PBS 裂解细胞 10 min, 梯度稀释后进行计数。按照公式(2)计算侵袭率。

$$\text{侵袭率} = (\text{胞内侵袭细菌数} / \text{总感染细菌数}) \times 100\% \quad (2)$$

1.8.2 胞内增殖能力测定

复苏实验室冻存的 RAW264.7 细胞于含有 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基中。感染前 1 天, 将巨噬细胞以 5×10^5 /孔接种于 24 孔板中, 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养 10–12 h; 将培养好的菌液 4 500 r/min 离心 5 min, 用 DPBS 洗涤 2 遍, 测定并调节 OD_{600} 至 1.0, 取 1 mL 菌液进行梯度稀释后计数。以 MOI=10 感染细胞, 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 黏附 0.5 h 后, 用 DPBS 洗涤 3 遍, 加入含有 100 μ g/mL 庆大霉素的 DMEM 培养基继续培养 1 h。弃去培养基后, 换用含低浓度庆大霉素(10 μ g/mL)的

DMEM 培养基进行培养, 此时记为 0 h。分别在 0、2、4、6 h 取样。用 1 mL 含有 0.2% Trion X-100 的 PBS 裂解细胞 10 min, 取裂解液梯度稀释后点板计数, 采用公式(3)测定细菌胞内增殖情况。

$$\text{增殖速率} = (\text{胞内增殖菌量} - \text{初始侵袭细胞菌量}) / \text{初始侵袭细胞菌量} \times 100\% \quad (3)$$

1.9 小鼠感染试验

将培养好的菌液 4 500 r/min 离心 5 min, 用 PBS 洗涤 2 遍, 测定并调节 OD_{600} 至 1.0, 随后用 PBS 稀释为 5×10^6 CFU。以 5×10^6 CFU 的剂量对 C57BL/6 小鼠进行口服感染, 并持续观察小鼠的存活、活跃度、进食和炸毛等情况, 绘制存活曲线。在感染 3 d 后剖杀小鼠, 取出空肠和盲肠, 称重后置于均质管中进行均质处理。将均质液进行 10 倍梯度稀释, 取原液及 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 稀释倍数的菌液涂布 LB 平板, 37 °C 培养过夜, 计算载菌量。

1.10 数据处理与分析

利用 GraphPad Prism 6.0 对所有数据进行统计分析。实验结果以平均值 $\pm$ 标准误(mean $\pm$ SEM)格式表示, 采用 *t* 检验进行统计学分析, *表示

$P < 0.05$, **表示 $P < 0.01$, ***表示 $P < 0.001$ 。

2 结果与分析

2.1 肠炎沙门菌 Z11 Δ iscA 突变株及 Δ iscA::iscA 回补株的构建

基于同源重组原理, 构建了肠炎沙门菌 Z11 Δ iscA 的框内无标记缺失突变株。运用特异性外部引物(iscA-Out-F/R)和内部引物(iscA-In-F/R)对缺失突变株进行验证。结果如图 1A 所示, 外部引物在野生株中扩增的条带大小为 1 679 bp, 而在缺失突变株中扩增条带大小为 1 355 bp, 内部引物在缺失突变株中未能扩增出条带, 表明缺失突变株构建成功。通过质粒回补方法构建 Δ iscA::iscA 回补株和空质粒菌株 Δ iscA::Vector, 结果如图 1B 所示, 基因片段长度为 624 bp, 表明回补株和空质粒菌株构建成功。

2.2 iscA 基因缺失对肠炎沙门菌表型的影响

2.2.1 iscA 基因缺失不影响肠炎沙门菌的生长

在 LB 培养基中测定肠炎沙门菌 Z11 和 Δ iscA

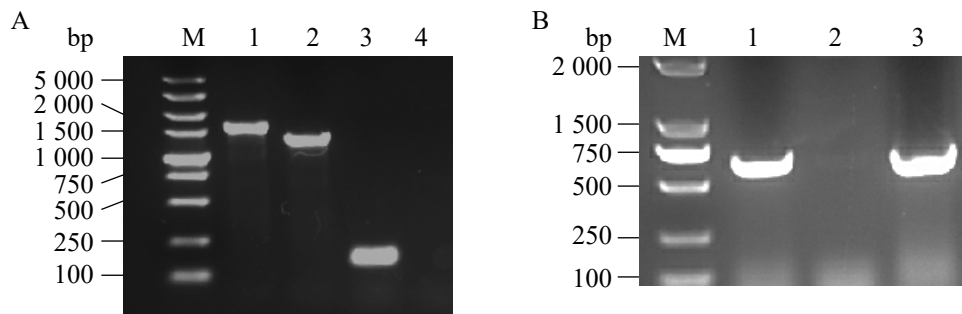


图1 突变株 Δ iscA、回补株 Δ iscA::iscA和空质粒菌株 Δ iscA::Vector的PCR验证。A: 突变株 Δ iscA的PCR验证[泳道M: DL5000 DNA marker; 泳道1: Z11 (Out); 泳道2: Z11 Δ iscA (Out); 泳道3: Z11 (In); 泳道4: Z11 Δ iscA (In)]; B: 回补株 Δ iscA::iscA和空质粒菌株 Δ iscA::Vector的PCR验证[泳道M: DL2000 DNA marker; 泳道1: Z11; 泳道2: Z11 Δ iscA::Vector; 泳道3: Z11 Δ iscA::iscA]。

Figure 1 Identification of Z11 Δ iscA, complemented strain Δ iscA::iscA and Δ iscA::Vector by PCR. A: Identification of Z11 Δ iscA by PCR (Lane M: DL5000 DNA marker; Lane 1: Z11 (Out); Lane 2: Z11 Δ iscA (Out); Lane 3: Z11 (In); Lane 4: Z11 Δ iscA (In)); B: Identification of complemented strain Δ iscA::iscA and Δ iscA::Vector by PCR (Lane M: DL2000 DNA marker; Lane 1: Z11; Lane 2: Z11 Δ iscA::Vector; Lane 3: Z11 Δ iscA::iscA).

突变株的生长曲线, 结果如图 2 所示, 与 WT 相比, $\Delta iscA$ 突变株的生长曲线并无显著差异, 表明 *iscA* 基因的缺失不影响 Z11 菌株的正常生长。

2.2.2 *iscA* 基因缺失降低肠炎沙门菌的运动能力

沙门菌通过鞭毛等运动器官实现快速运动, 从而入侵宿主肠道上皮细胞或扩散。本研究探讨了 *iscA* 基因缺失对肠炎沙门菌运动性的影响。结果如图 3 所示, 在 LB 半固体平板上, $\Delta iscA$ 突变株的菌圈直径明显小于野生株, 而回补株的菌圈直径与野生株相近(图 3A)。不同菌株的菌圈直径统计结果如图 3B 所示, $\Delta iscA$ 的菌圈直径显著低于野生株, 而回补株则与野生株相似, 表明 *iscA* 基因缺失会降低肠炎沙门菌的游动能力。

2.2.3 *iscA* 基因缺失不会影响肠炎沙门菌生物被膜形成能力

对肠炎沙门菌 WT 和 $\Delta iscA$ 的生物被膜形成能力进行检测, 在试管中静置培养 72 h 后, 用结晶紫染色发现 $\Delta iscA$ 缺失突变株的生物被膜形成能力略微下降, 但由于试管间差异较大, 未达到显著差异, 回补株 $\Delta iscA::iscA$ 与 WT 之间也无显著差异, 结果如图 4 所示。

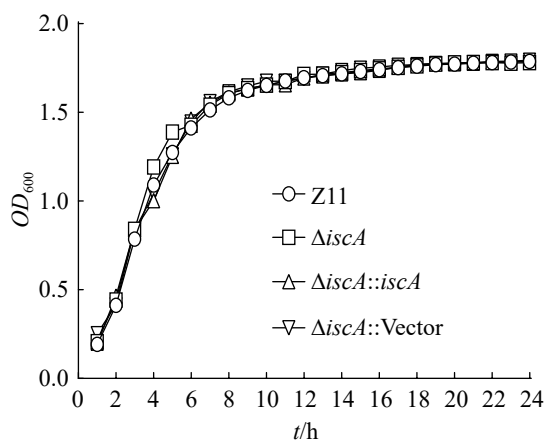


图2 突变株 $\Delta iscA$ 、回补株 $\Delta iscA::iscA$ 和空质粒菌株 $\Delta iscA::Vector$ 的生长曲线

Figure 2 The growth curves of $\Delta iscA$, complementation strains $\Delta iscA::iscA$ and $\Delta iscA::Vector$.

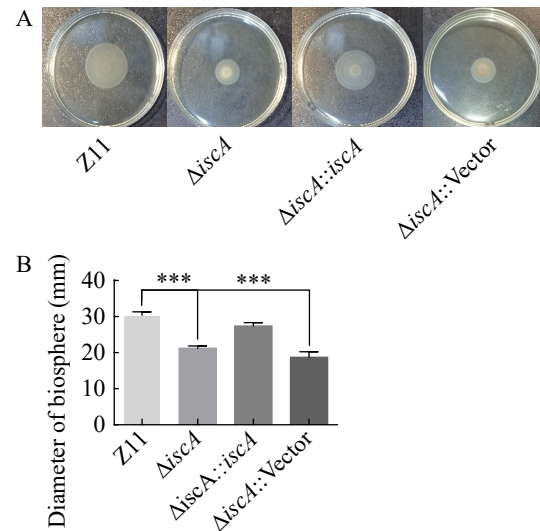


图3 突变株 $\Delta iscA$ 、回补株 $\Delta iscA::iscA$ 和空质粒菌株 $\Delta iscA::Vector$ 的运动能力测定($n=3$)。A: 突变株 $\Delta iscA$ 、回补株 $\Delta iscA::iscA$ 和空质粒菌株 $\Delta iscA::Vector$ 在LB半固体平板上的运动能力; B: 突变株 $\Delta iscA$ 、回补株 $\Delta iscA::iscA$ 和空质粒菌株 $\Delta iscA::Vector$ 的运动能力柱状图(***: $P<0.001$)。

Figure 3 Determination of motility of $\Delta iscA$, complemented strain $\Delta iscA::iscA$ and $\Delta iscA::Vector$ ($n=3$). A: The swimming ability of $\Delta iscA$, complemented strains $\Delta iscA::iscA$ and $\Delta iscA::Vector$ on LB semi-solid plates; B: Histogram of the swimming ability of $\Delta iscA$, complemented strain $\Delta iscA::iscA$ and $\Delta iscA::Vector$ (***: $P<0.001$).

2.3 *iscA* 缺失降低肠炎沙门菌的黏附侵袭能力

以 RAW264.7 细胞为模型, 评估了 *iscA* 基因缺失对肠炎沙门菌黏附和侵袭能力的影响。黏附能力结果如图 5A 所示, $\Delta iscA$ 突变株在 RAW264.7 细胞上的黏附率较野生株降低了 15%, 差异显著, 而回补株 $\Delta iscA::iscA$ 的黏附能力恢复到与野生株相当的水平。侵袭能力结果如图 5B 所示, $\Delta iscA$ 缺失突变株的侵袭率下降到 20%, 显著低于野生株的 28%, 回补株的侵袭率也恢复到野生株的水平。上述结果表明, *iscA* 基因的缺失显著降低了肠炎沙门菌的黏附

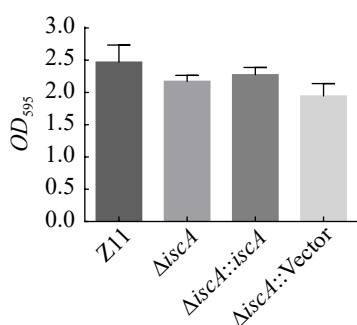


图4 缺失突变株 Δ iscA、回补株 Δ iscA::iscA和空质粒菌株 Δ iscA::Vector生物被膜形成能力测定($n=3$)
Figure 4 Determination of biofilm formation of Δ iscA, complemented strains Δ iscA::iscA and Δ iscA::Vector ($n=3$).

和侵袭能力。

2.4 *iscA* 缺失影响肠炎沙门菌的胞内增殖

本研究进一步探讨了 *iscA* 基因缺失对肠炎沙门菌胞内增殖的影响。将野生株和 Δ iscA 突变株以 MOI=10 感染 RAW264.7 细胞，并在 0、2、4、6 h 分别取样裂解细胞，测定胞内增殖情况。

结果如图 6 所示，在 2 h 时，WT 和 Δ iscA 突变株的胞内增殖速率无显著差异；在 4 h 和 6 h 时， Δ iscA 突变株的增殖速率显著低于 WT，而回补株恢复到野生株的水平，表明 *iscA* 基因缺失降低了肠炎沙门菌在 RAW264.7 细胞内的增殖能力。

2.5 *iscA* 基因缺失对肠炎沙门菌毒力的影响

以小鼠为模型，进一步评估了 *IscA* 对肠炎沙门菌毒力的影响。将 WT 和 Δ iscA 缺失株以 5×10^6 CFU 的剂量口服灌胃 C57BL/6 小鼠，观察发现缺失株感染组小鼠的精神状态和炸毛情况较野生株感染组更好。记录小鼠每天的存活情况并绘制存活曲线，结果如图 7 所示。在 C57BL/6 小鼠感染模型中，野生株感染组小鼠的死亡开始于第 4 天，而缺失株感染组小鼠的死亡推迟至第 6 天，并且缺失株感染组小鼠在第 8 天才全部死亡。上述结果表明， Δ iscA 缺失突变株可以延缓小鼠的死亡，表明 *iscA* 基因的缺失降低了肠炎沙门菌对小鼠的致死率。

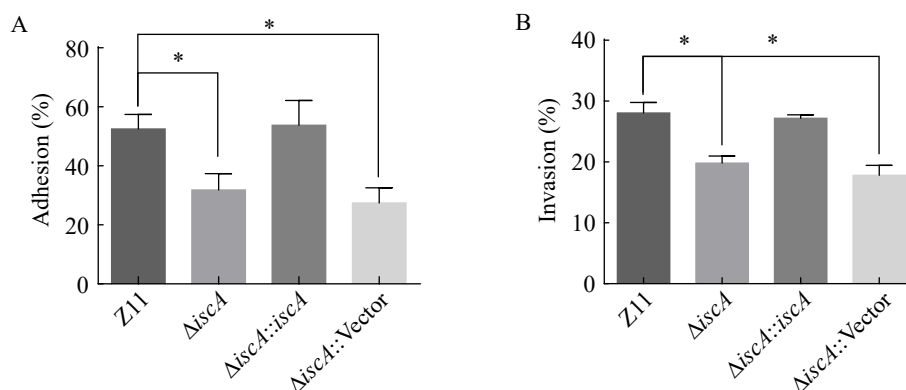


图5 缺失突变株 Δ iscA、回补株 Δ iscA::iscA和空质粒菌株 Δ iscA::Vector黏附和侵袭能力测定($n=3$)。A: 缺失突变株 Δ iscA、回补株 Δ iscA::iscA和空质粒菌株 Δ iscA::Vector在RAW264.7细胞上的黏附能力测定；B: 缺失突变株 Δ iscA、回补株 Δ iscA::iscA和空质粒菌株 Δ iscA::Vector在RAW264.7细胞上的侵袭能力测定。

Figure 5 Determination of adhesion and invasion ability of Δ iscA, complemented strains Δ iscA::iscA and Δ iscA::Vector ($n=3$). A: The adhesion capability of Δ iscA, complemented strains Δ iscA::iscA and Δ iscA::Vector in RAW264.7 cells; B: The invasion capability of Δ iscA, complemented strains Δ iscA::iscA and Δ iscA::Vector in RAW264.7 cells. *: $P<0.05$.

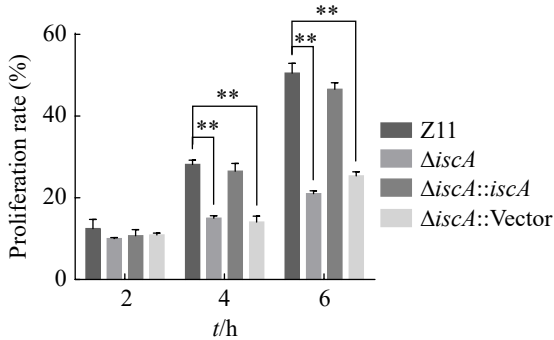


图6 缺失突变株 $\Delta iscA$ 、回补株 $\Delta iscA::iscA$ 和空质粒菌株 $\Delta iscA::Vector$ 胞内增殖能力测定($n=3$)

Figure 6 Determination of the intracellular proliferation ability of $\Delta iscA$, complemented strains $\Delta iscA::iscA$ and $\Delta iscA::Vector$ ($n=3$). **: $P<0.01$.

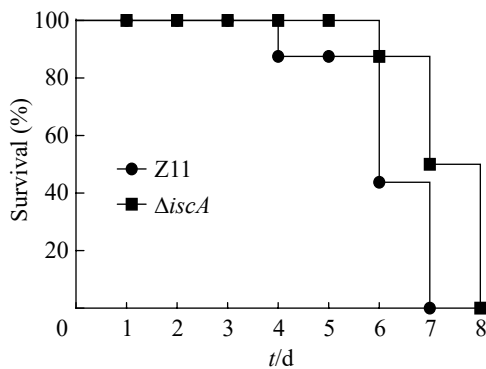


图7 小鼠口服感染后的存活率($n=7$)

Figure 7 Mouse survival after oral infection ($n=7$).

2.6 *iscA* 基因缺失对肠炎沙门菌在小鼠肠道定殖的影响

本研究评估了野生株 Z11 和 $\Delta iscA$ 突变株在 C57BL/6 小鼠体内的定殖情况。将 WT 和 $\Delta iscA$ 突变株分别以 5×10^6 CFU 的剂量口服灌胃 C57BL/6 小鼠, 在感染 3 d 后, 取小鼠空肠和盲肠组织测定载菌量。结果如图 8 所示, $\Delta iscA$ 突变株感染组在空肠(图 8A)和盲肠(图 8B)中的定殖能力显著低于 WT, 表明 *iscA* 基因缺失降低了肠炎沙门菌在小鼠体内的定殖能力。

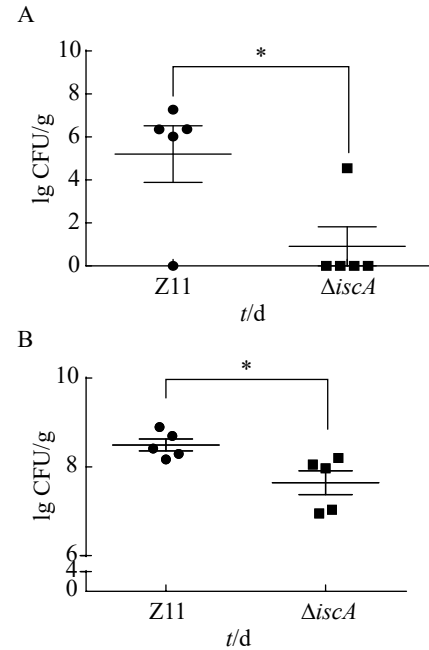


图8 缺失突变株 $\Delta iscA$ 在小鼠不同脏器的定殖能力测定。A: 缺失突变株 $\Delta iscA$ 和WT野生株在小鼠空肠中的载菌量变化; B: 缺失突变株 $\Delta iscA$ 和WT野生株在小鼠盲肠中的载菌量变化。

Figure 8 Determination of colonization ability of $\Delta iscA$ in mouse organs. A: Changes in bacterial load of WT and $\Delta iscA$ in the jejunum; B: Changes in bacterial load of WT and $\Delta iscA$ in the caecum. *: $P<0.05$.

3 讨论与结论

随着沙门菌感染在全球范围内的广泛流行及其对畜禽养殖业造成的重大影响, 沙门菌已成为主要的食源性病原菌之一, 其中肠炎沙门菌是人类感染沙门菌病的主要血清型^[26-27]。沙门菌主要通过受污染的食物经口进入宿主体内, 在其感染过程中, 会面临营养匮乏以及诸多不利的环境因素, 如低 pH、低浓度的铁离子、活性氮(RNS)和活性氧(ROS)的产生^[28]。研究表明, 沙门菌的运动性和生物被膜形成能力在其感染过程中具有重要意义。沙门菌依靠鞭毛的运动性进行游动, 能够在宿主的黏膜表面或其他部

位定殖；这种运动能力不仅有助于沙门菌寻找有利的感染位点，还能够帮助细菌获取营养物质^[29]。生物被膜的形成不仅帮助沙门菌抵御宿主胃肠道的酸性环境，增强其存活率，还可以通过包裹和隔离作用，使细菌能够有效逃避宿主免疫系统的攻击^[25,30-31]。Fe-S 簇系统已被证实能够感知活性氧^[21]和铁离子^[22]等信号，参与调控鼠伤寒沙门菌的毒力。然而，关于 Fe-S 簇在沙门菌运动性和生物被膜形成中的研究较少。因此，本研究测定了 *iscA* 基因缺失对肠炎沙门菌运动性和生物被膜形成能力的影响。结果显示，*iscA* 基因缺失导致肠炎沙门菌的游动能力显著减弱，而生物被膜形成能力则无显著变化，表明 IscA 会影响肠炎沙门菌的运动能力，但不影响生物被膜形成能力。在大肠杆菌中的研究发现，Fe-S 簇装配途径中的 *iscS*、*iscU* 和 *iscA* 基因的缺失能够导致生物被膜形成减弱，并且这一作用受到转录抑制因子 IscR 的调控^[32]。这些结果表明 Fe-S 簇装配蛋白 IscA 在不同菌株中对生物被膜形成能力的影响存在一定的差异。

肠炎沙门菌利用鞭毛等运动器官迅速移动到肠道，并通过其特殊的疏水分子黏附在宿主细胞，进而突破肠道上皮细胞屏障，侵袭并扩散至其他脏器，引发全身感染^[33-34]。研究表明，ISC 系统在沙门菌侵袭上皮细胞中发挥重要作用，IscR 通过抑制 SPI-1 的关键调控因子 HilD 的表达，进而下调 T3SS 基因簇的表达，参与沙门菌致病过程^[23]。IscR 是 ISC 系统的调控因子，能够抑制 *iscRSUA* 基因簇的表达^[35]。此外，沙门菌 Fe-S 簇生物合成蛋白 CyaY 和 YggX 对沙门菌在小鼠中的致病性也是至关重要的^[36]。因此，Fe-S 簇合成蛋白在沙门菌感染中发挥重要作用。然而，关于 IscA 蛋白对肠炎沙门菌在细胞和动物水平影响的研究较少。本研究以鼠源 RAW264.7 细胞为模型，测定了 WT 和 Δ *iscA* 的黏附、侵袭和胞内增殖能力，发现 Δ *iscA* 突变株的黏附和侵袭能力较 WT 显著降低，表明 IscA 通过影响沙门菌对宿主细胞的黏附和侵袭进一

步影响肠炎沙门菌的感染过程。沙门菌被巨噬细胞吞噬后，会在细胞内形成 SCV 泡，并在其中进行增殖^[34]。本研究也测定了 Δ *iscA* 和 WT 在 RAW264.7 细胞中的胞内增殖能力，结果显示在 4 h 后， Δ *iscA* 突变株的增殖速率显著低于 WT，表明 *iscA* 基因缺失后降低了肠炎沙门菌在 RAW264.7 细胞内的增殖能力，这可能与细胞内限铁环境有关。

此外，本研究还评估了 Z11 和 Δ *iscA* 在 C57BL/6 小鼠模型上的毒力和定殖情况。在毒力实验中，发现 Δ *iscA* 缺失突变株可以将小鼠的死亡时间延缓至第 8 天。在定殖实验中，在感染 3 d 后取空肠和盲肠样本进行载菌量测定，结果显示 Δ *iscA* 缺失突变株的载菌量显著低于野生株，说明大部分 Δ *iscA* 缺失突变株被宿主的免疫系统清除，表明 *iscA* 基因对于肠炎沙门菌在肠道中的定殖能力至关重要。

综上所述，本研究通过基因敲除技术构建了 Δ *iscA* 缺失突变株，证明了 *iscA* 基因的缺失对肠炎沙门菌 Z11 在运动性、黏附侵袭、胞内增殖、毒力以及定殖能力的影响，结果表明 IscA 能够显著影响肠炎沙门菌感染宿主的致病过程，揭示了 *iscA* 基因在沙门菌抵御宿主体内不良环境因素从而成功定殖的过程中发挥了调控作用。研究结果为预防和控制沙门菌感染提供了新的思路和方法，有助于深入了解沙门菌的致病机制，为开发新型抗菌药物和疫苗提供理论依据。

作者贡献声明

余逸：设计并执行实验，分析数据和撰写论文；顾丹：设计实验，分析数据和修改论文；焦新安：指导设计实验，修改论文；潘志明：指导设计实验，修改论文等。

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] MAJOWICZ SE, MUSTO J, SCALLAN E, ANGULO FJ, KIRK M, O'BRIEN SJ, JONES TF, FAZIL A, HOEKSTRA RM, International Collaboration on Enteric Disease 'Burden of Illness' Studies. The global burden of nontyphoidal *Salmonella* gastroenteritis[J]. Clinical Infectious Diseases, 2010, 50(6): 882-889.
- [2] KIRK MD, PIRES SM, BLACK RE, CAIPO M, CRUMP JA, DEVLEESSCHAUWER B, DÖPFER D, FAZIL A, FISCHER-WALKER CL, HALD T, HALL AJ, KEDDY KH, LAKE RJ, LANATA CF, TORGERSON PR, HAVELAAR AH, ANGULO FJ. World health organization estimates of the global and regional disease burden of 22 foodborne bacterial, protozoal, and viral diseases, 2010: a data synthesis[J]. PLoS Medicine, 2015, 12(12): e1001921.
- [3] CHEN HM, WANG Y, SU LH, CHIU CH. Nontyphoid *Salmonella* infection: microbiology, clinical features, and antimicrobial therapy[J]. Pediatrics & Neonatology, 2013, 54(3): 147-152.
- [4] WANG LD, YAN J, NIU H, HUANG R, WU SY. Autophagy and ubiquitination in *Salmonella* infection and the related inflammatory responses[J]. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 2018, 8: 78.
- [5] KURTZ JR, ALAN GOGGINS J, McLACHLAN JB. *Salmonella* infection: interplay between the bacteria and host immune system[J]. Immunology Letters, 2017, 190: 42-50.
- [6] GUT AM, VASILJEVIC T, YEAGER T, DONKOR ON. *Salmonella* infection-prevention and treatment by antibiotics and probiotic yeasts: a review[J]. Microbiology, 2018, 164(11): 1327-1344.
- [7] NAIR AV, SINGH A, RAJMANI RS, CHAKRAVORTTY D. *Salmonella* Typhimurium employs spermidine to exert protection against ROS-mediated cytotoxicity and rewires host polyamine metabolism to ameliorate its survival in macrophages[J]. Redox Biology, 2024, 72: 103151.
- [8] TAN GQ, LU JX, BITOUN JP, HUANG H, DING HG. IscA/SufA paralogues are required for the [4Fe-4S] cluster assembly in enzymes of multiple physiological pathways in *Escherichia coli* under aerobic growth conditions[J]. Biochemical Journal, 2009, 420(3): 463-472.
- [9] WAYNE OUTTEN F. Recent advances in the Suf Fe-S cluster biogenesis pathway: beyond the proteobacteria[J]. Biochimica et Biophysica Acta, 2015, 1853(6): 1464-1469.
- [10] SOURICE M, ORIOL C, AUBERT C, MANDIN P, PY B. Genetic dissection of the bacterial Fe-S protein biogenesis machineries[J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) -Molecular Cell Research, 2024, 1871(5): 119746.
- [11] FONTENOT CR, DING HG. Ferric uptake regulator (Fur) binds a [2Fe-2S] cluster to regulate intracellular iron homeostasis in *Escherichia coli*[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2023, 299(6): 104748.
- [12] ZHENG L, CASH VL, FLINT DH, DEAN DR. Assembly of iron-sulfur clusters. identification of an *iscSUA-hscBA-fdx* gene cluster from *Azotobacter vinelandii*[J]. The Journal of Biological Chemistry, 1998, 273(21): 13264-13272.
- [13] AGAR JN, KREBS C, FRAZZON J, HUYNH BH, DEAN DR, JOHNSON MK. IscU as a scaffold for iron-sulfur cluster biosynthesis: sequential assembly of [2Fe-2S] and [4Fe-4S] clusters in IscU[J]. Biochemistry, 2000, 39(27): 7856-7862.
- [14] YANG JJ, BITOUN JP, DING HG. Interplay of IscA and IscU in biogenesis of iron-sulfur clusters[J]. Journal of Biological Chemistry, 2006, 281(38): 27956-27963.
- [15] DING HG, CLARK RJ, DING BJ. IscA mediates iron delivery for assembly of iron-sulfur clusters in IscU under the limited accessible free iron conditions[J]. Journal of Biological Chemistry, 2004, 279(36): 37499-37504.
- [16] VICKERY LE, CUPP-VICKERY JR. Molecular chaperones HscA/Ssq1 and HscB/Jac1 and their roles in iron-sulfur protein maturation[J]. Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology, 2007, 42(2): 95-111.
- [17] METTERT EL, KILEY PJ. Fe-S cluster homeostasis and beyond: the multifaceted roles of IscR[J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research, 2024, 1871(6): 119749.
- [18] REMES B, EISENHARDT BD, SRINIVASAN V, KLUG G. IscR of *Rhodobacter sphaeroides* functions as repressor of genes for iron-sulfur metabolism and represents a new type of iron-sulfur-binding protein[J]. MicrobiologyOpen, 2015, 4(5): 790-802.
- [19] METTERT EL, KILEY PJ. Coordinate regulation of the Suf and Isc Fe-S cluster biogenesis pathways by IscR is essential for viability of *Escherichia coli*[J]. Journal of Bacteriology, 2014, 196(24): 4315-4323.
- [20] RUNYEN-JANECKY L, DAUGHERTY A, LLOYD B, WELLINGTON C, ESKANDARIAN H, SAGRANSKY M. Role and regulation of iron-sulfur cluster biosynthesis genes in *Shigella flexneri* virulence[J]. Infection and Immunity, 2008, 76(3): 1083-1092.
- [21] GRUZDEV N, McCLELLAND M, PORWOLLIK S, OFAIM S, PINTO R, SALDINGER-SELA S. Global transcriptional analysis of dehydrated *Salmonella enterica* serovar Typhimurium[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2012, 78(22): 7866-7875.
- [22] DING HG, YANG JJ, COLEMAN LC, YEUNG S. Distinct iron binding property of two putative iron donors for the iron-sulfur cluster assembly: IscA and the bacterial frataxin ortholog CyaY under physiological and oxidative stress conditions[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2007, 282(11): 7997-8004.
- [23] VERGNES A, VIALA JPM, OUADAH-TSABET R, POCACHARD B, LOISEAU L, MÉRÉSSE S, BARRAS F, AUSSEL L. The iron-sulfur cluster sensor IscR is a negative regulator of Spi1 type III secretion system in *Salmonella enterica*[J]. Cellular Microbiology, 2017, 19(4). DOI:10.1111/cmi.12680.
- [24] HOLDEN ER, ABI ASSAF J, AL-KHANAQ H, VIMONT N, WEBBER MA, TRAMPARI E. Identification of pathways required for *Salmonella* to colonize alfalfa using TraDIS-Xpress[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2024, 90(7): e0013924.

- [25] 李灵芝. 肠炎沙门菌持续性感染相关基因的筛选及鉴定[D]. 扬州: 扬州大学硕士学位论文, 2023.
LI LZ. Screening and identification of genes related to persistent infection of *Salmonella enteritis*[D]. Yangzhou: Master's Thesis of Yangzhou University, 2023 (in Chinese).
- [26] BAHRAMIANFARD H, DERA KHSHANDEH A, NAZIRI Z, KHALTABADI FARAHANI R. Prevalence, virulence factor and antimicrobial resistance analysis of *Salmonella* Enteritidis from poultry and egg samples in Iran[J]. BMC Veterinary Research, 2021, 24, 17(1): 196.
- [27] WEI XY, LONG L, YOU L, WANG M, WANG D, LIU CT, LI SJ, WANG JH. Serotype distribution, trend of multidrug resistance and prevalence of β -lactamase resistance genes in human *Salmonella* isolates from clinical specimens in Guizhou, China[J]. PLoS One, 2023, 18(4): e0282254.
- [28] CUNRATH O, PALMER JD. An overview of *Salmonella enterica* metal homeostasis pathways during infection[J]. microLife, 2021, 2: uqab001.
- [29] RANA K, NAYAK SR, BIHARY A, SAHOO AK, MOHANTY KC, PALO SK, SAHOO D, PATI S, DASH P. Association of quorum sensing and biofilm formation with *Salmonella* virulence: story beyond gathering and cross-talk[J]. Archives of Microbiology, 2021, 203(10): 5887-5897.
- [30] JONES BD, GHORI N, FALKOW S. *Salmonella typhimurium* initiates murine infection by penetrating and destroying the specialized epithelial M cells of the Peyer's patches[J]. Journal of Experimental Medicine, 1994, 180(1): 15-23.
- [31] ALEKSANDROWICZ A, CAROLAK E, DUTKIEWICZ A, BŁACHUT A, WASZCZUK W, GRZYMAJLO K. Better together-*Salmonella* biofilm-associated antibiotic resistance[J]. Gut Microbes, 2023, 15(1): 2229937.
- [32] WU Y, WAYNE OUTTEN F. IscR controls iron-dependent biofilm formation in *Escherichia coli* by regulating type I *Fimbria* expression[J]. Journal of Bacteriology, 2009, 191(4): 1248-1257.
- [33] FÀBREGA A, VILA J. *Salmonella enterica* serovar Typhimurium skills to succeed in the host: virulence and regulation[J]. Clinical Microbiology Reviews, 2013, 26(2): 308-341.
- [34] HORSTMANN JA, LUNELLI M, CAZZOLA H, HEIDEMANN J, KÜHNE C, STEFFEN P, SZEFS S, ROSSI C, LOKAREDDY RK, WANG C, LEMAIRE L, HUGHES KT, UETRECHT C, SCHLÜTER H, GRASSL GA, STRADAL TEB, ROSSEZ Y, KOLBE M, ERHARDT M. Methylation of *Salmonella* Typhimurium flagella promotes bacterial adhesion and host cell invasion[J]. Nature Communications, 2020, 11(1): 2013.
- [35] ZENG J, ZHANG K, LIU JS, QIU GZ. Expression, purification, and characterization of iron-sulfur cluster assembly regulator IscR from *Acidithiobacillus ferrooxidans*[J]. Journal of Microbiology and Biotechnology, 2008, 18(10): 1672-1677.
- [36] VELAYUDHAN J, KARLINSEY JE, FRAWLEY ER, BECKER LA, NARTEA M, FANG FC. Distinct roles of the *Salmonella enterica* serovar Typhimurium CyaY and YggX proteins in the biosynthesis and repair of iron-sulfur clusters[J]. Infection and Immunity, 2014, 82(4): 1390-1401.