DOI:10.16016/j.1000-5404.202008056

类鼻疽杆菌Ⅵ型分泌系统蛋白 Hcp1 的重组表达及免疫学性质鉴定

章美娟,胡治强,夏瑀培,袁思琪,闫晶敏,饶承龙,李 倩,杨文波,毛旭虎 400038 重庆,陆军军医大学(第三军医大学)药学与检验医学系临床微生物及免疫学教研室

[摘要] **目的** 重组表达类鼻疽杆菌Ⅵ型分泌系统溶血素共调节蛋白 1(hemolysin coregulated protein 1,Hcp1),并对其免疫学性质进行鉴定。**方法** 利用 DNA 重组技术以 pET-28a 表达系统在 *E. coli* BL21(DE3)中重组表达 Hcp1;通过亲和层析制备高纯度 Hcp1 蛋白;采用腹腔注射免疫小鼠制备抗 Hcp1 血清,ELISA 检测抗体滴度,免疫印迹及免疫荧光分析抗体的免疫反应性。**结果** 成功获得纯度达 95%的重组 Hcp1 蛋白,该蛋白免疫小鼠后获得的抗血清具有较好的特异性和较高的抗体滴度(1∶512 000),表现出良好的免疫原性和免疫反应性。**结论** 成功制备了具有生物学活性的 Hcp1 重组蛋白及其抗血清。

[关键词] 类鼻疽杆菌;Ⅵ型分泌系统蛋白;溶血素共调节蛋白 1;重组表达
[中图法分类号] R378.99; R394-33; R446.62 [文献标志码] A

Recombinant expression and immunological characterization of hemolysin coregulated protein 1, *Burkholderia pseudomallei* type Ⅵ secretion system protein

ZHANG Meijuan, HU Zhiqiang, XIA Yupei, YUAN Siqi, YAN Jingmin, RAO Chenglong, LI Qian, YANG Wenbo, MAO Xuhu Department of Clinical Microbiology and Immunology, College of Pharmacy and Medical Laboratory, Army Medical University (Third Military Medical University), Chongqing, 400038, China

[**Abstract**] **Objective** To express recombinant hemolysin coregulated protein 1 (Hcp1) of type Ⅵ secretion system (T6SS) of *Burkholderia pseudomallei* and identify its immunological properties. **Methods** The recombinant Hcp1 protein was expressed by using DNA recombination technology through pET-28a expression system in *E. coli* BL21(DE3), and then purified by affinity chromatography. Then 6-week-old BALB/c mice were immunized with the obtained Hcp1 *via* intraperitoneal injection, the serum samples were collected to detect the titers of anti-Hcp1 specific antibodies by ELISA. Meanwhile, the immune response against antigen-specific antibodies was evaluated by Western blotting and immunofluorescence assay. **Results** The recombinant Hcp1 protein was successfully obtained, with a purity of 95%. The obtained recombinant protein stimulated the antisera of good specificity and high titer (1∶512 000), with good immunogenicity and immunoreactivity. **Conclusion** The recombinant protein Hcp1 and its antisera are successfully prepared.

[**Key words**] *Burkholderia pseudomallei*; type Ⅵ secretion system protein; hemolysin coregulated protein 1; recombinant expression

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (81971907, 31970135). Corresponding author: MAO Xuhu, E-mail: maoxh2012@hotmail.com

类鼻疽伯克霍尔德菌(*Burkholderia pseudomallei*,BP)简称类鼻疽杆菌,属兼性胞内革兰阴性杆菌,可引起一种称为类鼻疽的人兽共患病[1]。其主要分布于东南亚和澳大利亚北部,我国海南、广东等地区是类鼻疽病的重灾区[2]。人和动物可通过皮肤擦伤、吸入或摄入等方式感染该菌[3],由于易传播、诊断难、耐药广、无疫苗等潜在的生物威胁,已被 WHO 列为 B 类生物恐怖制剂。研究表明溶血素共调节蛋白 1(hemolysin coregulated protein 1,Hcp1)作为类鼻疽杆菌的Ⅵ型分泌系统(type Ⅵ secretion system,T6SS)毒力因子,可刺激机体产生特异性抗体[4],在血清学鉴定及疫苗候选抗原的筛选方面都具有潜在的应用价值,但目前尚未见利用 DNA 重组技术表达类鼻疽杆菌 Hcp1 蛋白的

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81971907,31970135)
[通信作者] 毛旭虎,E-mail:maoxh2012@hotmail.com

相关报道。因此,本研究通过重组表达获得纯度达95%的Hcp1蛋白,并对其免疫学性质进行初步研究,旨在为后续深入研究类鼻疽杆菌T6SS的致病机制提供工具手段,也为开发血清学检测方法及开展类鼻疽流行病学调查提供相应的技术支撑。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒和菌株 pET-28a表达载体购自北京索莱宝公司,*E. coli* BL21(DE3)、类鼻疽杆菌BPC006,小鼠巨噬细胞RAW264.7由本室保存。

1.1.2 主要试剂 细菌DNA基因组提取试剂盒、PCR超薄产物回收试剂盒、质粒提取试剂盒购自康为世纪公司,DNA聚合酶、DNA连接酶、*Bam*HⅠ和*Hind*Ⅲ限制性内切酶购自大连TaKaRa公司,蛋白质定量(bicinchoninic acid,BCA)试剂盒、SDS-PAGE凝胶试剂盒、硫酸卡那霉素购自上海碧云天公司,异丙基β-D-硫代半乳糖苷(isopropyl β-D-thiogalactoside,IPTG)、DMEM培养基、牛血清白蛋白BSA购自Thermo Fisher公司,小鼠抗组氨酸(histidine,His)标签单克隆抗体、辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase,HRP)标记的山羊抗小鼠抗体及兔抗人抗体购自北京中杉金桥公司,His Trap层析柱购自美国GE Healthcare公司,弗氏完全佐剂和弗氏不完全佐剂购自美国Sigma公司,结合缓冲液(pH=8.0)由20 mmol/L Na_3PO_4、30 mmol/L imidazole、500 mmol/L NaCl配制,洗脱缓冲液(pH=8.0)由20 mmol/L Na_3PO_4、500 mmol/L imidazole、500 mmol/L NaCl配制。

1.1.3 实验动物 6~8周龄BALB/c雌性小鼠10只,体质量14~16 g,购自陆军军医大学实验动物中心。

1.1.4 血清样本 收集2009年海南省三亚市人民医院感染科确诊为类鼻疽住院患者临床血清。本实验收集5份患者血清,其中男性3例,女性2例;年龄40~70岁;入院诊断:类鼻疽杆菌感染。纳入标准:①入院后第一时间采集患者脓液和分泌物标本,进行实验室培养、分离鉴定为类鼻疽杆菌;②典型临床症状;③病例信息资料完整。排除标准:①无疫区接触史;②无典型的影像学表型:如肺脓肿、肺空洞等;③拒绝参与者。同时收集来自该院健康体检者血清。共5份阴性对照血清,其中男性2例,女性3例;年龄40~70岁;入院诊断:健康体检。纳入标准:无疫区接触史,身体状况良好。排除标准:拒绝参与者。本研究中所使用的血清样本患者均知情。

1.2 方法

1.2.1 蛋白重组表达

1.2.1.1 Hcp1原核表达载体的构建 根据BPC006菌株Hcp1蛋白的基因序列(NCBI上检索)以及质粒pET-28a多克隆位点序列设计PCR上下游引物,上游引物:5′-GGATCCATGCTGGCCGGAATATATC-TCAA-3′(*Bam*HⅠ),下游引物:5′- AAGCTTTCAGC-CATTCGTCCAGTTTGCGGC-3′(*Hind*Ⅲ),PCR扩增目的基因Hcp1(510 bp);将Hcp1基因片段与pET-28a质粒同时进行*Bam*HⅠ/*Hind*Ⅲ双酶切,连接产物转化至*E. coli* BL21(DE3)感受态细胞并涂布于卡那霉素抗性平板筛选阳性菌落于LB液体培养基进行增菌培养,提取质粒,进行DNA测序[5]验证。

1.2.1.2 工程菌的诱导表达 阳性重组大肠杆菌BL21(DE3)于37 ℃培养至光密度*D*(600)值为0.6~0.8,加入0.5 mmol/L IPTG于16、25、37 ℃分别诱导3、5、12 h后收集菌体,SDS-PAGE检测蛋白的表达情况,确定最佳诱导表达的条件。收集菌体,超声波法充分裂解菌体(冰浴条件下),离心(4 ℃,12 000 r/min)收集上清液和沉淀,SDS-PAGE检测蛋白的表达情况。工程菌于37 ℃培养至光密度*D*(600)值为0.6~0.8,加入不同量的IPTG至终浓度分别为:0.1、0.3、0.5、0.7、0.9 mmol/L,等量收集菌体,以SDS-PAGE检测IPTG诱导浓度对Hcp1表达量的影响。

1.2.1.3 Hcp1蛋白的纯化与鉴定 将蛋白粗提液利用His Trap亲和层析进行纯化,采用梯度浓度洗脱(流速2.5 mL/min),并收集目的蛋白的洗脱液,经超滤浓缩后冷冻干燥,获得固体粉末状纯化蛋白。纯化的Hcp1蛋白经12% SDS-PAGE电泳后转膜,一抗为小鼠抗组氨酸标签单抗(1∶1 000)4 ℃孵育过夜,二抗为HRP-山羊抗小鼠IgG(1∶8 000),用MaxiLumin™化学发光液成像。

1.2.2 免疫学性质鉴定

1.2.2.1 抗Hcp1多克隆抗体的制备及效价测定 将纯化的重组Hcp1蛋白与弗氏完全佐剂等体积混合并充分乳化后,腹腔注射免疫小鼠[17],0.05 mg/只。每间隔7 d免疫1次,共免疫3次。小鼠断尾取血,以ELISA检测抗血清效价。抗血清效价设定标准:抗血清效价≥1∶8 000。如达到设定标准,麻醉小鼠后,迅速摘眼球取全血分离血清备用。抗体效价检测:以重组Hcp1蛋白(5 μg/mL;100 μL/孔)包被96孔酶标板,4 ℃过夜,5%的脱脂奶粉37 ℃封闭2 h,采用间接ELISA检测抗血清的效价,加入倍比稀释的小鼠抗血清(1∶1 000~1∶1 024 000;100 μL/孔),每个浓度梯度3个复孔,HRP-山羊抗小鼠IgG为二抗,以TMB溶液显色,以未免疫小鼠血清作为阴性对照,检测抗体滴度,结果判读标准为:$D(450)_{样品}/D(450)_{阴性}\geq 2.1$。

1.2.2.2 免疫印迹验证抗体特异性 纯化的Hcp1蛋白经12%SDS-PAGE电泳后转膜,一抗为制备的小

鼠抗血清 4℃过夜孵育,二抗为 HRP-山羊抗小鼠 IgG,同时设置牛血清白蛋白作为阴性对照;同法,将来自本校第一附属医院阴性血清和海南省三亚市人民医院类鼻疽阳性患者血清进行 4 ℃过夜孵育,以 HRP-兔抗人 IgG 作为二抗检测 Hcp1 蛋白,同时设置牛血清白蛋白作为对照。将实验室保存的不同类鼻疽杆菌临床菌株(BPC008、BPC010、BPC014、BPC018、BPC006)灭活后(70 ℃加热处理 30 min)采用相同方法分别检测其与 Hcp1 抗血清之间的抗原抗体反应。此外,以同样方法检测 Hcp1 抗血清与结核分枝杆菌、泰国伯克霍尔德菌、铜绿假单胞菌和金黄色葡萄球菌之间的抗原抗体反应,鉴定其特异性。

1.2.2.3　免疫荧光实验　　将爬片放置 12 孔板中,培养小鼠巨噬细胞 RAW 264.7 至 1.5×10^5/孔,以感染复数 1∶10 加入类鼻疽杆菌菌液,同时以大肠杆菌组做对照,培养 6 h 后,将爬片用 4% 多聚甲醛固定 10 min,0.3% Triton X-100 透膜 10 min,染目的蛋白 Hcp1:一抗为 1∶1 000 稀释的 Hcp1 多克隆抗体 37 ℃孵育 1 h,二抗为 1∶1 000 稀释的 Alexa Fluor488 抗鼠室温避光 1 h;染菌体:一抗为 1∶200 稀释实验室制备的类鼻疽菌体多克隆兔抗体 37 ℃孵育 1 h,二抗为 1∶500 稀释的 Alexa Fluor555 抗兔室温避光 1 h;染细胞核用 1∶1 000 稀释的 DAPI 避光孵育 10 min。小心扣取爬片,反扣在滴有荧光淬灭剂的载玻片上,避光操作放于 4 ℃暂存,等待激光共聚焦显微镜观察结果。

1.3　统计学分析

采用 SPSS 20.0 统计软件对数据进行分析。结果以 $\bar{x}\pm s$ 表示,实验重复 3 次。采用 t 检验,检验水准 $\alpha=0.05$。

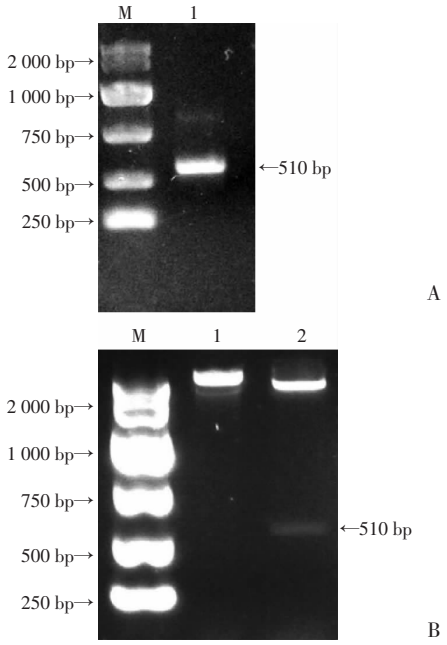
2　结果

2.1　原核表达载体 pET-28a-Hcp1 的构建

以 BPC006 菌株全基因组 DNA 为模板,经 PCR 扩增得到目的基因 Hcp1(约 510 bp,图 1A)。重组质粒 pET-28a-Hcp1,经双酶切法(*Bam*HⅠ/*Hind*Ⅲ)鉴定目的片段与理论大小一致(图 1B),其 DNA 测序结果与 NCBI 检索结果一致。

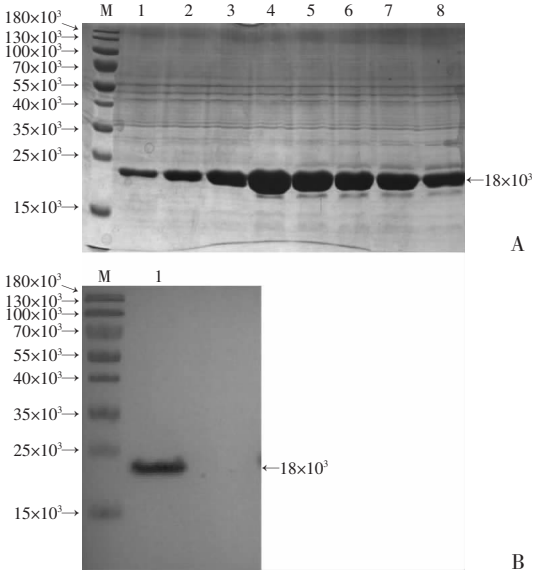
2.2　Hcp1 蛋白的诱导表达、纯化与鉴定

重组质粒 pET-28a-Hcp1 转入 *E. coli* BL21(DE3)后,在不同的诱导温度培养(16、25、37 ℃)、不同诱导时间(3、5、12 h)和不同 IPTG 诱导浓度条件下,Hcp1 在 25 ℃,诱导 5 h,0.7 mmol/L IPTG 诱导表达效果最佳。利用 His Trap 层析柱对重组蛋白进行分离纯化。采用梯度浓度洗脱(流速 2.5 mL/min),并收集目的蛋白的洗脱液。以超滤离心管(分子量=3 000)浓缩所收集目的蛋白(1.8 mL,6.2 mg/mL),其回收率为 4.6%。SDS-PAGE 结果显示,目的蛋白的纯度达 95%左右,其相对分子量约 18×10^3,与预期理论值相一致(图 2A)。目的蛋白经电泳后转膜,一抗为小鼠抗组氨酸标签单抗,二抗为 HRP-山羊抗小鼠 IgG,免疫印迹结果显示在相应分子量位置出现特异的印迹带(图 2B)。



A:PCR 扩增 Hcp1 基因　M:标准;1:Hcp1 基因 PCR 产物;B:pET-28a-Hcp1 重组质粒双酶切鉴定　M:标准;1:pET-28a-Hcp1 未酶切;2:pET-28a-Hcp1 *Bam*HⅠ/*Hind*Ⅲ双酶切

图 1　Hcp1 基因扩增产物和 pET-28a-Hcp1 载体鉴定



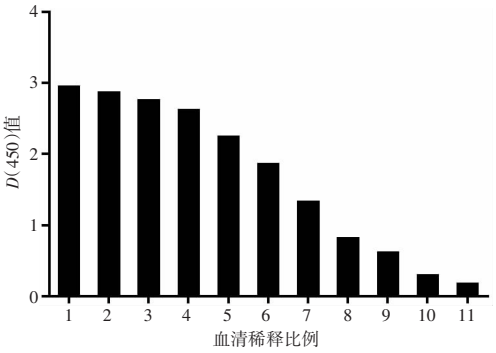
A:重组蛋白纯化　M:标准;1~8:不同时间点流穿液;B:免疫印迹鉴定重组蛋白　M:标准;1:重组蛋白

图 2　重组蛋白的纯化和鉴定

2.3　重组 Hcp1 的免疫学性质鉴定

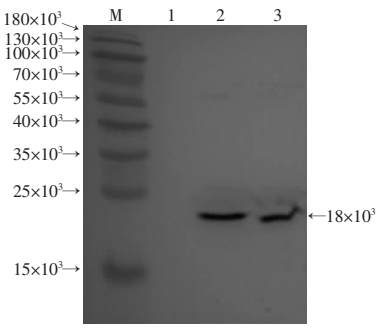
收集纯化后的重组 Hcp1 蛋白免疫小鼠血清进行 ELISA 检测,结果显示血清抗体滴度为 1∶512 000(图

3)。将其作为一抗,以 HRP-山羊抗小鼠 IgG 抗体作为二抗,进行免疫印迹实验,结果显示该抗血清与 Hcp1 蛋白和类鼻疽全菌裂解液在 18×10^3 处均出现了特异性印迹条带(图 4)。同时,在不同的类鼻疽杆菌临床菌株(BPC008、BPC010、BPC014、BPC018、BPC006)细胞裂解液中也检测到相同分子量的特异条带(图 5A)。类鼻疽杆菌、结核分枝杆菌、泰国伯克霍尔德菌、铜绿假单胞菌和金黄色葡萄球菌的菌液样本检测结果显示,在类鼻疽杆菌和泰国伯克霍尔德菌全菌裂解液中检测到相同分子量的特异条带(图 5B)。此外,进一步研究发现 Hcp1 蛋白与类鼻疽杆菌感染的患者血清可发生特异性结合,而与阴性对照血清不发生反应(图 6),并且免疫荧光实验结果显示 Hcp1 多克隆抗体能够与类鼻疽杆菌表达的 Hcp1 蛋白发生特异性抗原抗体结合反应,菌体呈现红色荧光,Hcp1 蛋白呈现绿色荧光,对照组大肠杆菌则没有产生相应的荧光(图 7)。上述结果显示 Hcp1 重组蛋白制备的抗血清可以和类鼻疽杆菌、泰国伯克霍尔德菌发生特异性反应,但不能与大肠杆菌、结核分枝杆菌、铜绿假单胞菌及金黄色葡萄球菌发生特异性结合。



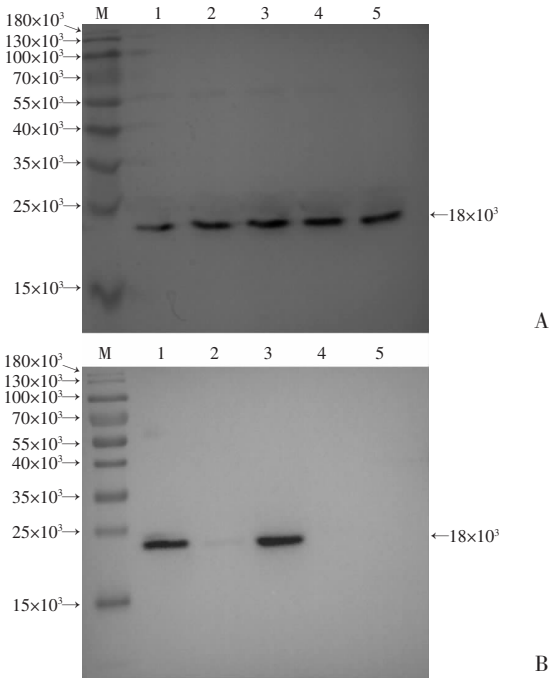
1:1∶1 000;2:1∶2 000;3:1∶4 000;4:1∶8 000;5:1∶16 000;6:1∶32 000;7:1∶64 000;8:1∶128 000;9:1∶256 000;10:1∶512 000;11:1∶1 024 000

图 3　ELISA 检测抗 Hcp1 多克隆抗体效价



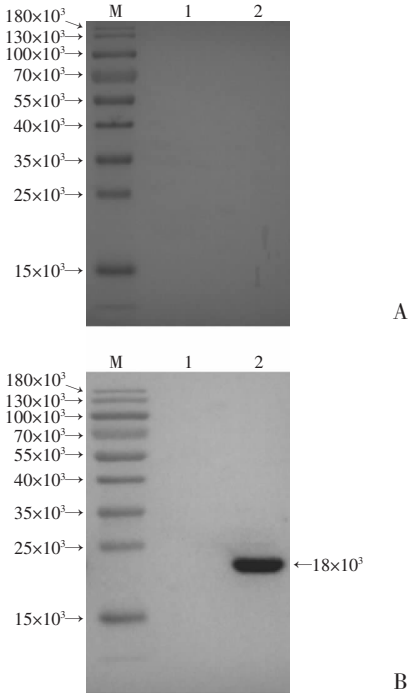
M:标准;1:牛血清白蛋白作阴性对照;2:Hcp1 蛋白;3:类鼻疽杆菌

图 4　重组 Hcp1 蛋白的免疫印迹鉴定



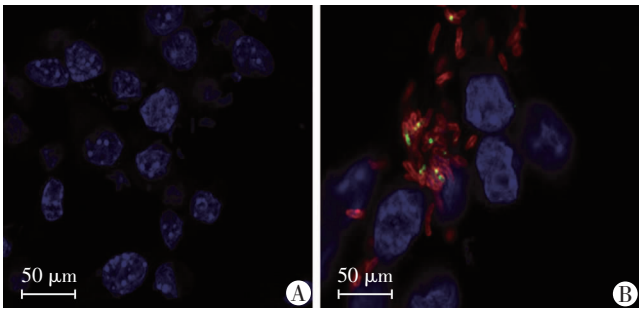
A:免疫印迹鉴定抗血清与不同类鼻疽临床菌株间反应性 M:标准;1:BPC008;2:BPC010;3:BPC014;4:BPC018;5:BPC006;B:免疫印迹鉴定抗血清与其他菌属菌株间反应性　M:标准;1:类鼻疽杆菌;2:结核分枝杆菌;3:泰国伯克霍尔德菌;4:铜绿假单胞菌;5:金黄色葡萄球菌

图 5　免疫印迹鉴定抗血清与不同类鼻疽临床菌株、其他菌属菌株间反应性



M:标准;1:牛血清白蛋白作阴性对照;2:Hcp1 蛋白
A:阴性血清;B:阳性血清

图 6　免疫印迹鉴定 Hcp1 蛋白与临床血清反应性



A:大肠杆菌作对照;B:类鼻疽杆菌

图 7 免疫荧光分析 Hcp1 多克隆抗体与类鼻疽杆菌发生特异性结合反应 (×400)

3 讨论

类鼻疽是由类鼻疽杆菌感染引起的一种热带传染性疾病,其死亡率高达 40%左右[3]。近年来类鼻疽的流行越来越广泛,非疫源地出现了输入性病例的报道。随着研究的不断深入,人们对于类鼻疽杆菌的致病机制有了更多的认识,相继发现了多种重要的毒力因子,其中主要包括群体感应系统、Ⅲ型分泌系统(type Ⅲ secretion system,T3SS)、T6SS、荚膜多糖、脂多糖、类鼻疽致死因子 1(*Burkholderia* lethal factor 1,BLF1)等[6]。存在于革兰阴性菌中的Ⅵ型分泌系统(T6SS)含 13 个保守的编码基因,可形成具有噬菌体尾状结构的大分子膜跨越注射器[7-8]。它通过效应物接触依赖方式将毒力因子分泌到宿主细胞中[9]。溶血素共调节蛋白(hemolysin coregulated protein,Hcp)是 T6SS 的分泌底物,与噬菌体尾部蛋白同源,也是 T6SS 发挥功能所必需的组成部分[10-11]。类鼻疽杆菌基因库中共有 6 个基因簇编码 T6SS,分别是 T6SS-1(BPSL3111-BPSL3097)、T6SS-2(BPSS0095-BPSS0116)、T6SS-3(BPSS0158-BPSS0167)、T6SS-4(BPSS0515-BPSS0533)、T6SS-5(BPSS1493-BPSS1511)和 T6SS-6(BPSS2093-BPSS2109),通过检测 6 个类鼻疽杆菌 T6SS 基因簇在 U937 巨噬细胞感染过程中的表达谱,发现 T6SS-5 基因簇的转录显著升高,而其他 5 个基因簇未有明显变化,同时 T6SS-5 的效应蛋白 Hcp1(BPSS1498)在被类鼻疽杆菌感染的 U937 巨噬细胞中的表达水平也显著升高,提示 Hcp1 很可能在类鼻疽的致病机制中发挥重要的作用[12-13]。对类鼻疽杆菌 K96243 的 6 个 Hcp 基因研究发现:Hcp1~6 分别由 BPSS1498、BPSS0518、BPSS2098、BPSS0171、BPSS0099 以及 BPSL3105 编码。其中 Hcp1 是形成 T6SS 分泌装置的关键结构蛋白,也是其发挥生物学效应的重要效应蛋白,通常在表达 T6SS 细菌的上清液中被发现[14]。在吞噬细胞系和非吞噬细胞系中,细胞间融合和多核巨细胞(multinucleated giant cells,MNGC)的形成是类鼻疽杆菌感染的 1 个典型形态学改变[15],Hcp1 突变/缺失株在 RAW264.7 巨噬细胞中不能形成 MNGC 或形成 MNGC 能力下降,提示 Hcp1 在类鼻疽杆菌感染以及后续致病过程中起到了非常重要的作用。研究还发现 Hcp1 优先与宿主体内抗原呈递细胞结合,通过增加对辅助 T 细胞的摄取和抗原呈递来增强其免疫原性,从而产生相应的抗体[16]。BURTNICK 等[17]发现 Hcp1 免疫小鼠后,可使小鼠在 42 d 内的存活率达到 50%,但进一步研究发现存活小鼠的脾脏中仍然观察到定植在其中的类鼻疽杆菌。类鼻疽杆菌自 1911 年被发现以来,人们就展开了其疫苗的研究工作,但目前还有进入临床研究的相关报道。本研究显示,重组 Hcp1 蛋白的抗血清可在伯克霍尔德菌属中引起交叉反应,推测其可能具有交叉保护作用,是潜在的疫苗候选抗原。结合文献[17]报道,Hcp1 能否产生有效的免疫保护作用还需要进一步的深入研究。因此,研究 Hcp1 的生物学功能对揭示类鼻疽杆菌感染的致病机制及类鼻疽疫苗的研发具有重要意义。

本研究成功构建了表达 Hcp1 的重组质粒 pET-28a-Hcp1,并在 *E. coli* BL21(DE3)中诱导表达,通过亲和层析纯化,得到了分子质量为 18×10^3 左右的高纯度目的蛋白 Hcp1。以重组蛋白 Hcp1 免疫 BALB/c 小鼠获得的抗血清中抗体效价达 1∶512 000。该抗血清能与多种的类鼻疽杆菌临床菌株发生特异性抗原抗体反应,而不与其他细菌(如大肠杆菌、结核分枝杆菌、铜绿假单胞菌及金黄色葡萄球菌)结合,此外,重组 Hcp1 还能与类鼻疽杆菌感染的患者血清发生特异性抗原抗体反应,表明重组表达的 Hcp1 具有良好的免疫原性和特异的抗原反应性。同时,在实验中我们发现抗 Hcp1 的多克隆抗体除了能识别类鼻疽杆菌外,还能与基因型相近的泰国伯克霍尔德菌发生抗原抗体反应。结果提示:一方面,类鼻疽杆菌和泰国伯克霍尔德菌 Hcp1 在结构和功能上可能具有相似性,我们制备的重组 Hcp1 及其抗血清可为伯克霍尔德菌属细菌 T6SS 的研究提供良好的工具和手段。另一方面,类鼻疽杆菌和泰国伯克霍尔德菌 Hcp1 与相应的抗血清具有交叉反应性,因此,在利用 Hcp1 作为诊断抗原进行类鼻疽血清学检验时,要充分考虑其特异性。下一步,课题组将对伯克霍尔德菌 Hcp1 蛋白进行核苷酸、氨基酸

比对,找到类鼻疽杆菌特异的片段作为类鼻疽的血清学诊断抗原,来提高诊断的准确性,进一步为类鼻疽血清学筛查以及流行病学调查奠定基础。

参考文献:

[1] WIERSINGA W J, CURRIE B J, PEACOCK S J. Melioidosis [J]. N Engl J Med, 2012,367(11): 1035-1044. DOI:10.1056/nejmra1204699.

[2] LIMMATHUROTSAKUL D, GOLDING N, DANCE D A B, *et al*. Predicted global distribution of *Burkholderia pseudomallei* and burden of melioidosis[J]. Nat Microbiol, 2016, 1(1):15008. DOI:10.1038/nmicrobiol.2015.8.

[3] CHENG A C, CURRIE B J. Melioidosis: epidemiology, pathophysiology, and management[J]. Clin Microbiol Rev, 2005, 18(2): 383-416. DOI:10.1128/CMR.18.2.383-416.2005.

[4] D'CRUZE T, GONG L, TREERAT P, *et al*. Role for the *Burkholderia pseudomallei* type three secretion system cluster 1 bpscN gene in virulence[J]. Infect Immun, 2011, 79(9): 3659-3664. DOI:10.1128/iai.01351-10.

[5] 胡艺, 胡志强, 马腾飞, 等. 类鼻疽杆菌Ⅲ型分泌系统BPSS1395蛋白表达及其抗体制备与鉴定[J]. 第三军医大学学报, 2017, 39(10): 941-945. DOI:10.16016/j.1000-5404.201611152.
HU Y, HU Z Q, MA T F, *et al*. Expression and identification of recombinant *Burkholderia pseudomallei* type Ⅲ secretion system BPSS1395 protein and preparation of its polyclonal antibodies[J]. J Third Mil Med Univ, 2017, 39(10): 941-945. DOI:10.16016/j.1000-5404.201611152.

[6] PUAH S M, PUTHUCHEARY S D, WANG J T, *et al*. Molecular characterization of putative virulence determinants in *Burkholderia pseudomallei*[J]. Sci World J, 2014, 2014: 590803. DOI:10.1155/2014/590803.

[7] BÖNEMANN G, PIETROSIUK A, MOGK A. Tubules and donuts: a type Ⅵ secretion story[J]. Mol Microbiol, 2010, 76(4): 815-821. DOI:10.1111/j.1365-2958.2010.07171.x.

[8] CASCALES E, CAMBILLAU C. Structural biology of type Ⅵ secretion systems[J]. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2012, 367(1592): 1102-1111. DOI:10.1098/rstb.2011.0209.

[9] HO B T, DONG T G, MEKALANOS J J. A view to a kill: the bacterial type Ⅵ secretion system[J]. Cell Host Microbe, 2014, 15(1): 9-21. DOI:10.1016/j.chom.2013.11.008.

[10] SILVERMAN J M, BRUNET Y R, CASCALES E, *et al*. Structure and regulation of the type Ⅵ secretion system[J]. Annu Rev Microbiol, 2012, 66: 453-472. DOI:10.1146/annurev-micro-121809-151619.

[11] HARRISON J W, DUNG T T, SIDDIQUI F, *et al*. Identification of possible virulence marker from *Campylobacter jejuni* isolates[J]. Emerg Infect Dis, 2014, 20(6): 1026-1029. DOI:10.3201/eid2006.130635.

[12] CHIENG S, CARRETO L, NATHAN S. *Burkholderia pseudomallei* transcriptional adaptation in macrophages[J]. BMC Genom, 2012, 13(1): 1-13. DOI:10.1186/1471-2164-13-328.

[13] CHIENG S, MOHAMED R, NATHAN S. Transcriptome analysis of *Burkholderia pseudomallei* T6SS identifies Hcp1 as a potential serodiagnostic marker[J]. Microb Pathog, 2015, 79: 47-56. DOI:10.1016/j.micpath.2015.01.006.

[14] BURTNICK M N, BRETT P J, HARDING S V, *et al*. The cluster 1 type Ⅵ secretion system is a major virulence determinant in *Burkholderia pseudomallei* [J]. Infect Immun, 2011, 79(4): 1512-1525. DOI:10.1128/iai.01218-10.

[15] BODDEY J A, DAY C J, FLEGG C P, *et al*. The bacterial gene lfpA influences the potent induction of calcitonin receptor and osteoclast-related genes in *Burkholderia pseudomallei*-induced TRAP-positive multinucleated giant cells[J]. Cell Microbiol, 2007, 9(2): 514-531. DOI:10.1111/j.1462-5822.2006.00807.x.

[16] LIM Y T, JOBICHEN C, WONG J, *et al*. Extended loop region of Hcp1 is critical for the assembly and function of type Ⅵ secretion system in *Burkholderia pseudomallei*[J]. Sci Rep, 2015, 5: 8235. DOI:10.1038/srep08235.

[17] BURTNICK M N, BRETT P J, HARDING S V, *et al*. The cluster 1 type Ⅵ secretion system is a major virulence determinant in *Burkholderia pseudomallei* [J]. Infect Immun, 2011, 79(4): 1512-1525. DOI:10.1128/iai.01218-10.

(收稿:2020-08-07;修回:2020-09-25)

(编辑 王 红)