

DOI:10.3724/SP.J.1008.2013.01281

· 论 著 ·

## 类鼻疽菌素是类鼻疽伯克霍尔德菌的主要毒力因子之一

马广强<sup>1,2</sup>, 王倩<sup>1</sup>, 朱金华<sup>1</sup>, 叶荷平<sup>1</sup>, 袁志明<sup>2</sup>, 万红娇<sup>1\*</sup>

1. 江西中医药大学生命科学院医学免疫学与病原生物学学科组, 南昌 330004

2. 中国科学院武汉病毒研究所, 武汉 430071

**[摘要]** **目的** 研究类鼻疽菌素在类鼻疽伯克霍尔德菌(*Burkholderia pseudomallei*, *B. pseudomallei*)致病性中的作用。**方法** 通过基因同源重组的方法突变类鼻疽菌素的主要合成酶基因 *mes C*, 检测野生菌和突变菌产生类鼻疽菌素能力的差异以及突变前后该菌对微生物(2株真菌:青霉菌、黑曲霉菌;2株细菌:粪链球菌、金黄色葡萄球菌)、线虫、小鼠的毒力差异。**结果** 突变菌的菌落形态发生了明显变化,失去了产生菌膜的能力,同时也失去了对微生物的抑制活性和对线虫、小鼠的致病性。**结论** 类鼻疽菌素可能是 *B. pseudomallei* 的主要毒力因子之一,在其致病性中起着重要的作用。

**[关键词]** 类鼻疽伯克霍尔德菌; *mes C* 基因; 毒力因子类; 类鼻疽菌素

**[中图分类号]** R 378.991 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2013)12-1281-06

### Melioidosin is a main virulent factor of *Burkholderia pseudomallei*

MA Guang-qiang<sup>1,2</sup>, WANG Qian<sup>1</sup>, ZHU Jin-hua<sup>1</sup>, YE He-ping<sup>1</sup>, YUAN Zhi-ming<sup>2</sup>, WAN Hong-jiao<sup>1\*</sup>

1. Medical Immunology and Pathogenic Group, College of Life Science, Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, Jiangxi, China

2. Wuhan Institute of Virology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430071, Hubei, China

**[Abstract]** **Objective** To investigate the pathogenic role of melioidosin in pathogenicity of *Burkholderia pseudomallei* (*B. pseudomallei*). **Methods** A synthetase gene associated with melioidosin synthesis in *B. pseudomallei* was inactivated by homologous recombination. Melioidosin producing ability and the virulent effects of the wild-type and mutant *B. pseudomallei* upon microorganisms (*Penicillium* spp., *Aspergillus niger* spp., *Streptococcus faecalis* spp. and *Staphylococcus aureus* spp.), *C. elegans* and BALB/c mice were compared. **Results** The mutant *B. pseudomallei* underwent notable morphology change, lost the ability to form bacterial membrane and the virulent effects to microorganisms, *C. elegans* and BALB/c mice. **Conclusion** It suggests that melioidosin is one of the main virulent factors of *B. pseudomallei*.

**[Key words]** *Burkholderia pseudomallei*; *mes C* gene; virulence factors; melioidosin

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2013, 34(12):1281-1286]

类鼻疽伯克霍尔德菌(*Burkholderia pseudomallei*, *B. pseudomallei*)是一种革兰阴性短杆菌<sup>[1]</sup>,是导致东南亚及澳大利亚东北部人和动物类鼻疽病的病原体<sup>[2]</sup>。类鼻疽病例多发于南北纬 20°之间的赤道地区,是导致泰国东北部以及澳大利亚 20% 获得性败血症和 20%~40% 菌血症死亡病例的主要原因<sup>[3-4]</sup>。目前,其主要毒力因子尚不清楚<sup>[5]</sup>,也没有商业化疫苗可以使用。

植物病原菌丁香假单胞菌(*Pseudomonas syrin-*

*gae*, *P. syringae*)可以引起多种作物病害,与 *B. pseudomallei* 同属于假单胞菌属(*Pseudomonas*)。丁香假单胞菌能分泌一些在结构上相似的多肽缩氨酸及其衍生物,被称之为丁香素,其主要成分是丁香素 A(syringolin A)<sup>[6-7]</sup>。丁香素具有抗生素活性,能抑制真菌(如青霉菌、酵母菌)和细菌(如伤寒沙门菌、链球菌)等的生长。研究发现,丁香素是丁香假单胞菌的主要毒力因子,敲除该菌的丁香素主要合成酶基因后,该菌完全失去了对植物的致病作用<sup>[7-9]</sup>。

[收稿日期] 2013-05-22

[接受日期] 2013-07-11

[基金项目] 国家高技术研究发展计划("863"计划, 2005AA219070). Supported by National High-Tech R&D Program of China ("863" Project, 2005AA219070).

[作者简介] 马广强, 博士. E-mail: maguangqiang@163.com

\* 通信作者(Corresponding author). Tel: 0791-87118816, E-mail: ann.wan@163.com

作为假单胞菌属的一员, *B. pseudomallei* 有很好的抑制青霉菌生长的活性,也能抑制多种真菌和细菌的生长<sup>[10-11]</sup>。通过基因序列比对发现, *B. pseudomallei*也有小分子抗生素物质的合成酶基因,而这些基因和丁香假单胞菌丁香素合成酶基因有70%的相似性<sup>[8,12]</sup>。因此 *B. pseudomallei* 也可能合成这种小分子活性物质,我们将其命名为类鼻疽菌素(melioidosin)。基于此,本实验首先通过序列比对,得到 *B. pseudomallei* 基因组中类鼻疽菌素合成酶的同源序列,确定其主要合成酶基因 *mes C*。然后对野生菌株 *B. pseudomallei* 中的合成酶基因 *mes C* 通过同源重组进行缺失突变,并系统研究突变菌株和野生菌株对真菌、细菌、线虫和小鼠的毒力。

### 1 材料和方法

1.1 材料及实验安全要求 *B. pseudomallei* CM-CC 53001 购自中国兽药药品监察所菌种保藏中心。其他用于检测的病原微生物由西安交通大学医学院馈赠。pET-28a、pMTL-20 购自 EMD Biosciences (Novagen)公司。所有涉及 *B. pseudomallei* 的菌株培养、培养物的制备、DNA 的抽提、抗菌活性检测、突变和野生菌株的动物感染实验均在中国科学院武汉病毒研究所 BSL-3 级实验室完成,培养物和 DNA 经过加热处理灭菌后,在 BSL-2 级实验室开展相关实验。动物实验获得中国科学院武汉病毒研究所动物伦理委员会许可。

1.2 同源重组载体的构建 通过序列比对,得到 *B. pseudomallei* 基因组中类鼻疽菌素合成酶的同源序列(表1),确定其主要合成酶基因 *mes C*。将从

pET-28a 载体上切下的卡那霉素抗性编码基因连接到载体 pMTL-20 上,得到 pMTL-20-*kan*。以 *B. pseudomallei*全基因组 DNA 作为 PCR 扩增的模板。设计类鼻疽菌素合成酶基因 *mes C* 上游片段的引物 PS MESC-UP-321-1 和 PS MESC-UP-321-2 (表2),用于扩增上游同源基因(321 bp)。设计下游片段的引物 PS MESC-D-301-1 和 PS MESC-D-301-2(表2),用于扩增下游同源基因(305 bp)。将 *Bam*H I 和 *Eco*R I 双酶切的上游片段连接至同样双酶切的 pMTL-20-*kan*,转化 *E. coli* DH5 $\alpha$ ,获得 pMTL-20-*up-kan* 质粒。将 *Stu* I 和 *Bgl* II 双酶切的下游片段连接至同样双酶切的 pMTL-20-*up-kan*,获得 pMTL-20-*up-kan-down* 同源重组质粒,电转入 *B. pseudomallei* 感受态细胞。质粒 DNA 提取、*B. pseudomallei*总基因组 DNA 的提取、DNA 片段回收和纯化、外源片段和载体的连接、*E. coli* 的转化参照《分子克隆实验指南》。

1.3 突变株的筛选及鉴定 挑取卡那霉素平板上 *B. pseudomallei* 转化菌的单菌落,接种到涂布酵母菌的平板上,观察野生菌株与突变菌株对酵母菌抗性变化。设计引物 PS MESC-UP-815-403 和 pMTL-20-*kan*-22-450(表2),扩增 *mes C* 上游和卡那霉素抗性基因的序列(450 bp),用于 *mes C* 基因插入失活检测。如果 PCR 扩增能检测到 450 bp 的条带,说明该菌株有可能是突变菌株。突变菌的全基因组 DNA 用基因组提取试剂盒(北京天根生化科技有限公司)提取。用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳观察 PCR 产物条带。测序在上海生工生物工程技术有限公司进行。

表 1 *B. pseudomallei* 全基因组中类鼻疽菌素合成酶相关基因

Tab 1 Homologous genes for melioidosin synthetases in *B. pseudomallei* genome

Gene	Site (NC_006350)	Name of synthetase	Length (aa)
<i>mes A</i>	1735704-1737497	Putative acyl-CoA dehydrogenase	598
<i>mes B</i>	1734147-1734950	Hypothetical protein BPSS1270	268
<i>mes C</i>	1721387-1734097	Putative peptide synthase	4 236
<i>mes D</i>	1720093-1721382	Putative efflux system protein	430
<i>mes E</i>	1719868-1720074	Putative MbtH-like protein	69
<i>mes F</i>	1716573-1719788	Siderophore synthetase	1 072

1.4 突变菌株的形态观察 将 *B. pseudomallei* 突变体和野生型接种到 Ashdown 和 LB 固体培养

基上,37℃培养 3 d。取 Ashdown 平板上的单菌落涂布到载玻片上,用碱性复红染色后,显微镜下观察

菌体形态。野生型在培养液中能形成菌膜, 表现为在培养液表面形成一层黄色活性物质。将野生型和突变体接种到 *B. pseudomallei* 发酵培养液中, 30℃ 震荡培养 (150 r/min) 7 d 后, 观察菌膜的形成。

1.5 突变菌株抑菌活性分析 将野生菌株和突变

菌株接种到 5 mL 的 LB 培养液中, 37℃ 震荡培养 (150 r/min) 24 h 后, 将药敏纸片溶于菌液, 得到含菌的药敏纸片。将该药敏纸片分别贴于涂布青霉菌、黑曲霉菌、粪链球菌和金黄色葡萄球菌的固体培养基上, 检测 *mes C* 突变对抑菌活性的影响。

表 2 同源重组中用到的引物以及检测引物  
Tab 2 Primers used in homologous recombination

Name of primer	Sequence (5'-3')	Length (bp)
PS MESC-UP-321-1	TTGGATCCTGCCGGCCGCTTCACCTT ( <i>Bam</i> H I)	321
PS MESC-UP-321-2	TTGAATTCGCACGTTACCGCCAGCACAT ( <i>Eco</i> R I)	
PS MESC-D-301-1	TTTTAGATCTGTGTGCGGGCCGACGTATG ( <i>Bgl</i> II)	305
PS MESC-D-301-2	TTTTAGGCCTTCAGCGCGTCGTTGTTTCAGG ( <i>Stu</i> I)	
pMTL-20-kan-22-450	CAAATGGTTCGCTGGGTTTATC	450
PS MESC-UP-815-403	AAATCGATCGTGCCGTCTTCGA	

1.6 突变菌株对线虫 (*C. elegans*) 的毒力检测 供试线虫 (*C. elegans* strain N2) 来源于华中农业大学。将 20  $\mu$ L 过夜培养的野生株和突变株的菌液分别均匀涂布到 NG 琼脂平板上放置 2 h。待平板干燥后, 在 NG 培养基平板上分别接入 80 条线虫 (利用 M9 缓冲液从 NG 琼脂平板上冲洗下来的不同生长阶段的线虫)。将平板放入 26℃ 培养箱中, 每 8 h 观察活线虫的数量, 直到所有线虫死掉。实验重复 2 次。用 *E. coli* OP50 作为对照菌株。

1.7 突变菌株对 BALB/c 小鼠的毒力检测 4 周龄 BALB/c 小鼠, 体质量 17~23 g (购自武汉大学中南医院动物实验中心)。通过向小鼠腹腔内一次性接种不同菌量的细菌菌液, 观察突变菌株和野生菌株对小鼠存活的影响并计算半数致死量 (LD<sub>50</sub>)。BALB/c 小鼠分为 13 组, 每组 6 只 (雌雄各 3 只)。野生菌株和突变菌株各接种 6 组, 接种菌量分别为 10<sup>1</sup>、10<sup>2</sup>、10<sup>3</sup>、10<sup>4</sup>、10<sup>5</sup>、10<sup>6</sup> CFU/只; 另设 1 组作为对照, 接种细菌稀释液 PBS。观察 21 d, 记录小鼠的死亡情况, 并对死亡小鼠进行解剖, 观察脏器的变化。

## 2 结果

2.1 同源突变载体构建 通过 PCR 扩增得到同源基因的上下游片段 (图 1A、1B)。成功构建了类鼻疽菌素合成酶基因的同源突变载体 pMTL-20-up-kan-down, 长度为 4 800 bp (图 2A), 双酶切鉴定分别可以看到上游和下游基因片段 (图 2B、2C)。

2.2 突变菌株的筛选与鉴定 肉眼观察可见, 突变菌株失去了对酵母菌的抑制活性, 没有抑菌圈, 而野

生对照有明显的抑菌圈。用鞭毛扩增引物和突变检测引物同时对突变菌株进行 PCR 检测, 可同时扩增到产物条带 (图 3)。胶回收产物条带测序表明得到了 *B. pseudomallei mes C* 基因的同源突变菌株。PCR 扩增突变株 16S rDNA 序列, 回收 1 500 bp 的产物条带进行测序。序列比较发现和 *B. pseudomallei* 的 16S rDNA 同源性达到 100%, 鉴定该突变株为 *B. pseudomallei*。

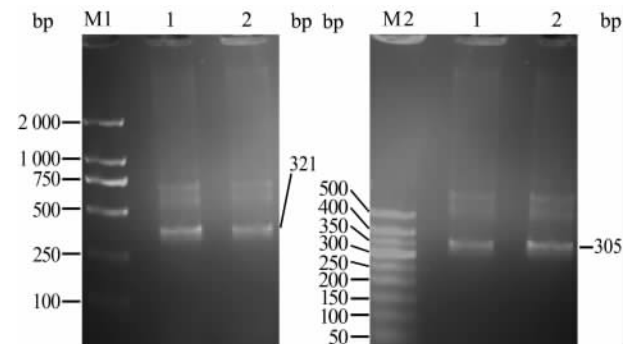


图 1 PCR 扩增类鼻疽菌素合成酶基因的同源片段

Fig 1 PCR product of the homologous gene for melioidosin synthetases

A: Upstream PCR product (1, 2) and DL 2000 (M1); B: Downstream PCR product (1, 2) and 500 bp ladder (M2)

2.3 固体培养基上突变株菌落形态 菌落在 Ashdown 培养基上由有皱褶的菜花样 (野生型, 图 4A1) 变成了光滑的圆形 (突变株, 图 4B1); 平板的底色由紫色 (野生型) 变为红色 (突变株)。在 LB 平板培养基上, 野生株为明显的皱褶菌落 (图 4A2), 而突变株为光滑圆形凸起菌落 (图 4B2), 野生株和突变

株的菌落大小及颜色相差不大。取 Ashdown 平板上的单菌落涂布到载玻片上,用碱性复红染色后,显微镜下可见野生株为两极浓染的短杆菌,两极着色比较明显。而突变株两极着色较浅,菌体形态变得椭圆。

2.4 液体培养液中突变菌株形态 野生菌株能产生明显的菌膜,培养液上明显漂浮一层土黄色物质;突变株不能产生菌膜(图 5)。

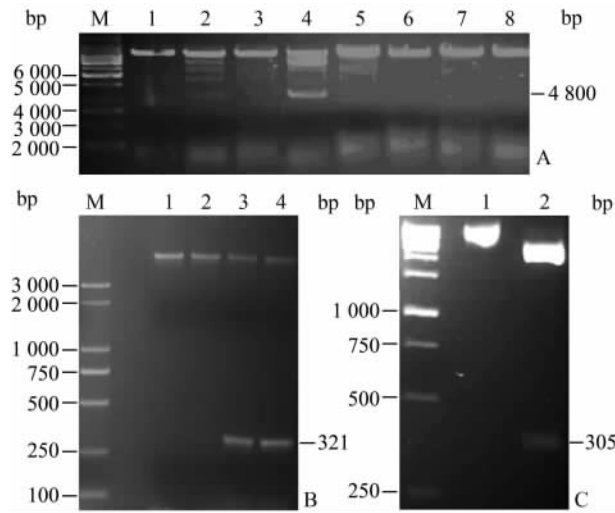


图 2 同源突变载体的构建

Fig 2 Construction of the homologous recombinant plasmid A: pMTL-20-up-kan-down (M: 1 kb ladder; 1-8: Test strains); B: pMTL-20-up-kan digested by BamH I and EcoR I (M: 1 kb ladder; 1-4: Screened strains); C: pMTL-20-kan-down digested by Stu I and Bgl II (M: 1 kb ladder; 1-2: Screened strains)

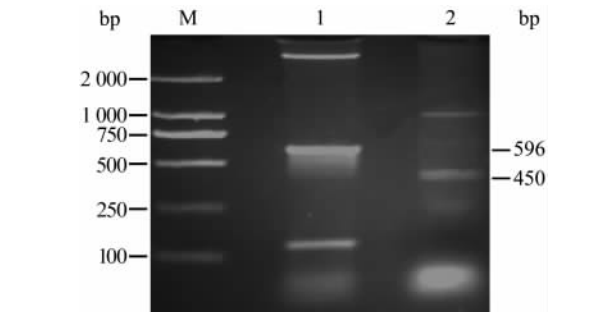


图 3 同源突变菌株检测以及同源突变 PCR 检测

Fig 3 Detection of homologous recombinant *B. pseudomallei* and PCR detection of homologous mutant

M: 1 kb ladder; 1: Flagellin gene (*Flic*); 2: Mutation *mes C*

2.5 突变菌的抑菌活性分析 *B. pseudomallei* 突变体和野生型对 2 株真菌和 2 株细菌的抑菌活性见图 6,平板中心为野生菌株,四周为突变菌株。野生菌株对青霉菌和黑曲霉菌能产生明显的抑菌圈,而

突变株失去了对这 2 株真菌的抑制活性。野生菌株对粪链球菌和金黄色葡萄球菌有很好的抑制活性,突变株失去了对这 2 种细菌的抑制活性。

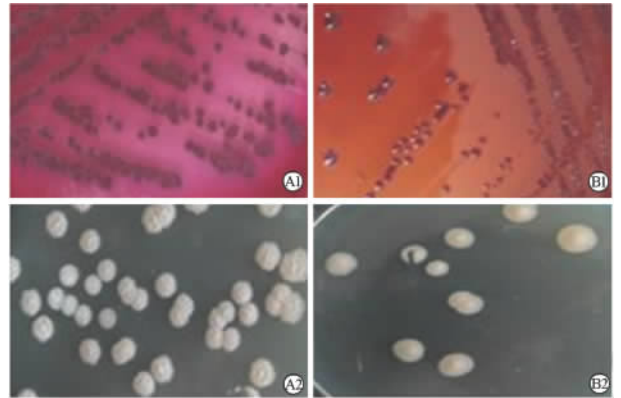


图 4 Ashdown 培养基(上)和 LB 培养基(下)上的菌落形态  
Fig 4 Colony morphology of *B. pseudomallei* on Ashdown agar plate (upper) and LB agar plate (lower)  
A1, A2: Wild-type strains; B1, B2: Mutant strains



图 5 突变对菌膜形成的影响

Fig 5 Effect of mutation on formation of bacterial membrane

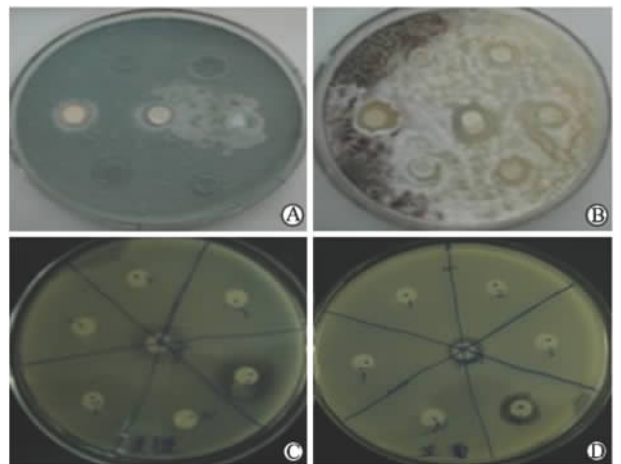


图 6 野生型和突变株对微生物的抑制活性

Fig 6 Anti-microorganism activity of wild-type and mutant *B. pseudomallei*

A: *Penicillium* spp.; B: *Aspergillus niger* spp.; C: *Streptococcus faecalis* spp.; D: *Staphylococcus aureus* spp.. Center strain is wild-type bacteria, and others are mutant strains

2.6 突变株对线虫的毒力 野生株在 24 h 内杀死了所有线虫, 包括成虫和幼虫, 死亡率达到 100% (图 7)。而突变株平板在 3 d 培养时间内未见线虫死亡, 说明突变菌株完全失去了对线虫的毒性。

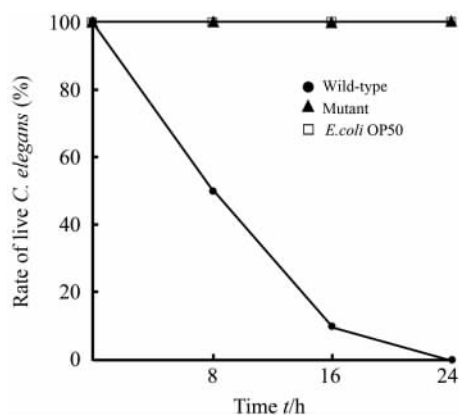


图 7 野生型和突变株对线虫的毒力作用

Fig 7 Virulent effect of wild-type and mutant *B. pseudomallei* on *C. elegans*

2.7 突变株对小鼠的毒力 小鼠腹腔接种野生菌株后第 4 天开始出现死亡, 死亡小鼠的肝脏、脾脏肿大, 肺部萎缩; 接种菌量  $10^6$  CFU/只的小鼠第 4 天全部死亡, 接种菌量  $10^5$  CFU/只的小鼠在第 6 天全部死亡, 接种菌量  $10^4$  CFU/只的小鼠在 21 d 的观察期里仅死亡 2 只, 接种菌量  $10^3$  CFU/只的小鼠在 21 d 的观察期里仅死亡 1 只, 其余组别小鼠均未发生死亡; 野生株的  $LD_{50}$  为  $10^4$  CFU。而接种突变株的小鼠全部存活, 接种 21 d 内未见死亡。对照组小鼠正常。

### 3 讨论

本实验结果发现: 类鼻疽菌素合成酶基因 *mes C* 缺失突变的 *B. pseudomallei* 不能产生菌膜, 失去了对真菌、细菌的抑制活性, 完全失去了对线虫和小鼠的毒力, 说明类鼻疽菌素有可能是 *B. pseudomallei* 的主要毒力因子。

线虫是 *B. pseudomallei* 的毒力检测的模式生物, 可以根据线虫的死亡率判断 *B. pseudomallei* 毒力的强弱。Chua 等<sup>[13]</sup> 的研究表明 *B. pseudomallei* KHW 可在 3 d 内杀死所有线虫。本实验中, *B. pseudomallei* CMCC 53001 野生菌株在 24 h 内对线虫致死率为 100%, 这表明 *B. pseudomallei* CMCC 53001 的毒力大大强于 *B. Pseudomallei* KHW 的毒力。在 3 d 甚至 1 周的时间内, 突变

株对线虫的致死率为 0, 而且线虫的数量由于繁殖有所增长。类鼻疽菌素合成酶 *mes C* 的突变使 *B. pseudomallei* 完全失去了对线虫的毒力, 这表明类鼻疽菌素可能是 *B. pseudomallei* 的主要毒力因子, 至少是导致线虫死亡的主要原因。

在对小鼠的毒力实验中, Liu 等<sup>[14]</sup> 的研究发现, *B. pseudomallei* 对 BALB/c 小鼠的最低  $LD_{50}$  为 45 CFU。相对于 Liu 等的实验结果, 我们实验用到的 *B. pseudomallei* CMCC 53001 可能由于保存时间较长, 对小鼠的致病力有所下降, 在  $10^4$  CFU 才能达到  $LD_{50}$ , 接种 4 d 后才开始死亡。相比较而言, 突变株完全失去了对小鼠的致病性, 21 d 甚至 1 个月的观察期内没有小鼠死亡。这个结果进一步证实了类鼻疽菌素有可能是 *B. pseudomallei* 的主要毒力因子。

丁香菌素是丁香假单胞菌的主要毒力因子, 具有不可逆酶抑制活性, 特别是对真核生物的一系列蛋白酶具有很好地抑制活性作用<sup>[15]</sup>; 丁香假单胞菌是小麦病原菌, 能导致小麦的白粉病, 将丁香菌素的主要合成酶突变后, 其失去了对植物的致病性<sup>[6,16]</sup>。与之类似, 在本实验中, *B. pseudomallei* 的类鼻疽菌素的主要合成酶基因的突变导致其对小鼠和线虫的毒力完全丧失。所以, 我们认为类鼻疽菌素是 *B. pseudomallei* 的主要毒力因子之一, 在 *B. pseudomallei* 的致病性中起着重要的作用。

类鼻疽菌素作为 *B. pseudomallei* 的主要毒力因子, 目前还没有关于其分离纯化的相关报道。这可能与其为生物安全等级三级微生物有关。本实验在相关文献研究的基础上将类鼻疽菌素的主要合成酶基因进行突变, 发现该菌素是其致病力的主要原因之一。但是由于条件所限, 本实验没有进行该菌的发酵实验来分离纯化该类鼻疽菌素, 也没有做该菌突变后产生菌素的生长曲线研究。在以后的实验中, 我们可以通过基因工程技术将 *B. pseudomallei* 所有合成类鼻疽菌素相关基因克隆成一个大质粒载体, 在工程菌株中表达类鼻疽菌素, 从而研究该菌素的一些生物学功能。

### 4 利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

## [参考文献]

- [1] Yao Q, Cui J, Zhu Y, Wang G, Hu L, Long C, et al. A bacterial type III effector family uses the papain-like hydrolytic activity to arrest the host cell cycle[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2009, 106: 3716-3721.
- [2] Cheng A C, Currie B J. Melioidosis: epidemiology, pathophysiology, and management[J]. Clin Microbiol Rev, 2005, 18: 383-416.
- [3] Currie B J, Fisher D A, Howard D M, Burrow J N, Lo D, Selva-Nayagam S, et al. Endemic melioidosis in tropical northern Australia; a 10-year prospective study and review of the literature[J]. Clin Infect Dis, 2000, 31: 981-986.
- [4] Wiersinga W J, van der Poll T, White N J, Day N P, Peacock S J. Melioidosis: insights into the pathogenicity of *Burkholderia pseudomallei* [J]. Nat Rev Microbiol, 2006, 4: 272-282.
- [5] 毛旭虎. 加强类鼻疽的研究[J]. 第三军医大学学报, 2011, 33: 1315-1317.
- [6] Wäspi U, Schweizer P, Dudler R. Syringolin reprograms wheat to undergo hypersensitive cell death in a compatible interaction with powdery mildew[J]. Plant Cell, 2001, 13: 153-161.
- [7] Ramel C, Baechler N, Hildbrand M, Meyer M, Schädeli D, Dudler R. Regulation of biosynthesis of syringolin A, a *Pseudomonas syringae* virulence factor targeting the host proteasome[J]. Mol Plant Microbe Interact, 2012, 25: 1198-1208.
- [8] Schellenberg B, Bigler L, Dudler R. Identification of genes involved in the biosynthesis of the cytotoxic compound glidobactin from a soil bacterium[J]. Environ Microbiol, 2007, 9: 1640-1650.
- [9] Archer C R, Groll M, Stein M L, Schellenberg B, Clerc J, Kaiser M, et al. Activity enhancement of the synthetic syrbactin proteasome inhibitor hybrid and biological evaluation in tumor cells[J]. Biochemistry, 2012, 51: 6880-6888.
- [10] Wiersinga W J, Currie B J, Peacock S J. Melioidosis[J]. N Engl J Med, 2012, 367: 1035-1044.
- [11] Wuthiekanun V, Amornchai P, Saiprom N, Chantratita N, Chierakul W, Koh G C, et al. Survey of antimicrobial resistance in clinical *Burkholderia pseudomallei* isolates over two decades in Northeast Thailand[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2011, 55: 5388-5391.
- [12] Amrein H, Makart S, Granado J, Shakya R, Schneider-Pokorny J, Dudler R. Functional analysis of genes involved in the synthesis of syringolin A by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* B301 D-R[J]. Mol Plant Microbe Interact, 2004, 17: 90-97.
- [13] Chua K L, Chan Y Y, Gan Y H. Flagella are virulence determinants of *Burkholderia pseudomallei* [J]. Infect Immun, 2003, 71: 1622-1629.
- [14] Liu B, Koo G C, Yap E H, Chua K L, Gan Y H. Model of differential susceptibility to mucosal *Burkholderia pseudomallei* infection[J]. Infect Immun, 2002, 70: 504-511.
- [15] Groll M, Schellenberg B, Bachmann A S, Archer C R, Huber R, Powell T K, et al. A plant pathogen virulence factor inhibits the eukaryotic proteasome by a novel mechanism[J]. Nature, 2008, 452: 755-758.
- [16] Schellenberg B, Ramel C, Dudler R. *Pseudomonas syringae* virulence factor syringolin A counteracts stomatal immunity by proteasome inhibition[J]. Mol Plant Microbe Interact, 2010, 23: 1287-1293.

[本文编辑] 孙岩