

DOI: 10.16781/j.0258-879x.2019.07.0732

· 专题报道 ·

铜绿假单胞菌VI型分泌系统和群体感应系统参与生物被膜形成

邹雅如¹, 李颖¹, 伍勇^{2*}, 汪怀周^{1*}

1. 海军军医大学(第二军医大学)长海医院实验诊断科, 上海 200433

2. 中南大学湘雅三医院检验科, 长沙 410013

[摘要] **目的** 探讨铜绿假单胞菌中VI型分泌系统(T6SS)和群体感应(QS)系统在铜绿假单胞菌生物被膜形成中的作用。**方法** 将铜绿假单胞菌生物被膜阳性的模式菌株 PAO1 制备成生物被膜菌和浮游菌。采用实时荧光定量 PCR 法检测菌株中 T6SS 相关溶血素共调节蛋白(Hcp)基因 *Hcp1*、*Hcp2* 和 *Hcp3*, QS 系统相关基因 *LasR*, 胞外多糖相关多糖合成位点基因 A (*PslA*) 和菌膜基因 A (*PelA*), 以及IV型菌毛基因(*PilA*)和鞭毛蛋白基因(*FliC*)的表达水平。采用独立样本 *t* 检验比较 PAO1 生物被膜菌与浮游菌中上述基因表达的差异。**结果** PAO1 生物被膜菌 *PslA*、*PelA*、*PilA* 和 *FliC* 基因的相对表达量均明显高于浮游菌, 分别为浮游菌的 714、274、604 和 42 倍 (P 均 <0.05), 提示制备的 PAO1 生物被膜菌形成了具有鞭毛和菌毛结构的成熟生物被膜。PAO1 生物被膜菌 *Hcp1*、*Hcp2*、*Hcp3* 和 *LasR* 基因的相对表达量均明显高于浮游菌, 分别为浮游菌的 1 045、11 268、6 654 和 1 226 倍 (P 均 <0.05), 提示 T6SS 和 QS 系统与 PAO1 菌生物被膜的形成有关。**结论** 铜绿假单胞菌中 T6SS 和 QS 系统可能参与生物被膜形成, 其具体调控机制有待进一步研究。

[关键词] 铜绿假单胞菌; VI型分泌系统; 群体感应系统; 生物被膜**[中图分类号]** R 738.991**[文献标志码]** A**[文章编号]** 0258-879X(2019)07-0732-05

Type VI secretion system and quorum sensing system involved in biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*

ZOU Ya-ru¹, LI Ying¹, WU Yong^{2*}, WANG Huai-zhou^{1*}

1. Department of Laboratory Medicine, Changhai Hospital, Naval Medical University (Second Military Medical University), Shanghai 200433, China

2. Department of Laboratory Medicine, The Third Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410013, Hunan, China

[Abstract] **Objective** To explore the roles of type VI secretion system (T6SS) and quorum sensing (QS) system in the biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*. **Methods** The PAO1 biofilm bacteria and planktonic bacteria were established. The expression levels of T6SS associated genes hemolysin co-regulated protein (Hcp) gene (*Hcp1*, *Hcp2*, *Hcp3*), QS associated gene *LasR*, exopolysaccharide associated genes polysaccharide synthesis locus A (*PslA*) and pellicle A (*PelA*), type IV pili gene pilus A (*PilA*) and flagellin C (*FliC*) were detected by quantitative real-time PCR, and the expression levels of those genes were compared between PAO1 biofilm bacteria and planktonic bacteria using independent *t*-test. **Results** The expression levels of *PslA*, *PelA*, *PilA* and *FliC* genes in PAO1 biofilm bacteria were respectively 714, 274, 604 and 42 folds of those in the planktonic bacteria (all $P<0.05$), suggesting that PAO1 bacteria formed mature biofilm with flagellum and pili. The expression levels of *Hcp1*, *Hcp2*, *Hcp3*, and *LasR* genes in PAO1 biofilm bacteria were respectively 1 045, 11 268, 6 654 and 1 226 folds of those in planktonic bacteria (all $P<0.05$), suggesting that T6SS and QS systems were related to the biofilm formation of PAO1 bacteria. **Conclusion** T6SS and QS systems might be involved in biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*, and its regulatory mechanism needs further study.

[Key words] *Pseudomonas aeruginosa*; type VI secretion system; quorum sensing system; biofilms

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2019, 40(7): 732-736]

铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 是医院感染最常见的病原菌之一, 尤其易感染免疫

力低下的人群和囊性纤维化患者^[1]。生物被膜是铜绿假单胞菌的主要毒力因子之一, 可黏附在物体表

[收稿日期] 2019-02-18 [接受日期] 2019-07-08

[作者简介] 邹雅如, 硕士, 检验技师. E-mail: yaruzou@163.com

*通信作者(Corresponding authors). Tel: 0731-88618442, E-mail: wuyong_xy@126.com; Tel: 021-31162070, E-mail: whz_sh@163.com

面, 进而造成严重的持续性感染。铜绿假单胞菌生物被膜感染的发生率和耐药性较高, 现有的抗菌药物很难将其彻底去除^[1]。研究铜绿假单胞菌生物被膜形成的分子机制, 有助于寻找新的靶点, 为防治生物被膜相关的难治性感染提供新的思路。

细菌能通过蛋白质分泌系统转运效应蛋白, 与周围环境相互作用。VI型分泌系统 (type VI secretion system, T6SS) 是革兰阴性细菌中的一种重要的毒性因子分泌系统, 与病原菌的致病性密切相关。溶血素共调节蛋白 (hemolysin co-regulated protein, Hcp) 由 160 个氨基酸构成, 是典型的 T6SS 效应分子^[2]。铜绿假单胞菌含有 3 种 T6SS 基因簇, 分别编码 Hcp1、Hcp2 和 Hcp3 蛋白^[3]。群体感应 (quorum sensing, QS) 系统是细菌根据生物被膜内的细胞密度来调控自身基因表达的信号系统, 有研究发现 QS 系统抑制剂可抑制铜绿假单胞菌的生物被膜形成^[4], 并且铜绿假单胞菌 QS 系统对 T6SS 有重要的调控作用^[5]。

本研究拟通过观察铜绿假单胞菌 PAO1 菌株的成熟阶段生物被膜菌与浮游菌中 T6SS 相关基因和 QS 系统相关基因表达水平的差异, 探讨 T6SS 和 QS 系统在铜绿假单胞菌生物被膜形成中的作用。

1 材料和方法

1.1 菌株、试剂与仪器 铜绿假单胞菌生物被膜阳性的模式菌株 PAO1 由南开大学乔明强教授惠赠。血琼脂平板培养基 (上海科玛嘉微生物技术有限公司), 96 孔和 6 孔细胞培养板 (加拿大 JET 公司), LB (Lurib-Bertani) 液体培养基 (北京陆桥技术股份有限公司), 细菌总 RNA 提取试剂盒 (美国 Omega 公司), 反转录试剂盒、荧光定量 PCR 试剂盒 TransStart Green qPCR SuperMix UDG (北京全式金生物技术有限公司)。PCR 仪 (美国 Applied Biosystems 公司), 实时荧光定量 PCR 仪 (德国 Eppendorf 公司)。

1.2 PAO1 浮游菌和生物被膜菌制备

1.2.1 PAO1 浮游菌制备 将 4 °C 保存的 PAO1 菌种接种于血琼脂平板培养基上, 37 °C 培养 18 h; 挑取单个菌落接种到 5 mL LB 液体培养基中, 半拧紧管盖, 置于气浴恒温摇床上, 37 °C、160 r/min 过夜培

养 18 h, 获得浮游菌。

1.2.2 PAO1 生物被膜菌制备 将 4 °C 保存的 PAO1 菌种接种于血琼脂平板培养基上, 37 °C 培养 18 h; 挑取单个菌落接种到 15 mL LB 液体培养基中, 半拧紧管盖, 置于气浴恒温摇床上, 37 °C、160 r/min 过夜培养 18 h; 调整菌液浓度至 0.5 麦氏浊度 (1.5×10^8 CFU/mL), 在 6 孔板中每孔加 800 μ L 菌液和 2.4 mL LB 液体培养基, 置于恒温培养箱中, 37 °C 培养 6 d 成膜 (生物被膜成熟阶段), 其间每 2 d 用新鲜 LB 液体培养基换 1 次液。培养 6 d 后, 可见 6 孔板的底部明显黏着一层膜状物, 即为形成的生物被膜。弃去培养液, 加入适量无菌生理盐水, 轻轻震荡洗去浮游菌; 再弃去液体, 向每孔中加入少量生理盐水, 用细胞刮刮下黏附在 6 孔板底部和壁上的生物被膜菌; 最后将各孔的菌液混合, 获得生物被膜菌的菌悬液。

1.3 各基因表达检测 按照细菌总 RNA 提取试剂盒说明书, 分别提取 PAO1 浮游菌和生物被膜菌的总 RNA, 将提取的总 RNA 用 1.5% 琼脂糖凝胶进行电泳, 检测 RNA 完整性; 用紫外分光光度法检测 RNA 的浓度及 260 nm 和 280 nm 处的光密度值并计算其比值 (D_{260}/D_{280})。使用反转录试剂盒将提取的总 RNA 反转录合成 cDNA。以 16S rRNA 为内参基因, 采用实时荧光定量 PCR 扩增浮游菌中 T6SS 相关基因 *Hcp1*、*Hcp2* 和 *Hcp3*, QS 系统相关基因 *LasR*, 胞外多糖相关多糖合成位点基因 A (polysaccharide synthesis locus A, *PslA*) 和菌膜基因 A (pellicle A, *PelA*), 以及 IV 型菌毛基因 (*pilus A*, *PilA*)、鞭毛蛋白基因 (*flagellin C*, *FliC*)。各基因实时荧光定量 PCR 引物序列及目的产物长度见表 1, 引物由生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成。以上所有实验过程均重复 3 次, 根据 3 次实验结果中各目的基因和内参基因 16S rRNA 的 Ct 值, 分别计算出 PAO1 浮游菌和生物被膜菌各基因的 Ct 均值和 Δ Ct 值, 进而根据 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算出各目的基因的相对表达量。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 17.0 软件进行统计学分析, 符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间比较采用独立样本 *t* 检验。检验水准 (α) 为 0.05。

表 1 实时荧光定量 PCR 引物序列及目的产物长度

Tab 1 Primer sequences for quantitative real-time PCR and the length of expected product

Gene	Primer sequence (5'-3')	Product length (bp)
16S rRNA	Forward: 5'-AAC GCG AAG AAC CTT ACC-3' Reverse: 5'-AAG GGT TGC GCT CGT TAC-3'	149
<i>Hcp1</i>	Forward: 5'-CGA GAA CGT GAC CCT GAA CT-3' Reverse: 5'-TGT TCC AGC CGT ACT TGA CC-3'	101
<i>Hcp2</i>	Forward: 5'-CGG TGG TCA TCA CCA AGG TC-3' Reverse: 5'-CTG GCA GTT GTG CAT GTA GTC C-3'	194
<i>Hcp3</i>	Forward: 5'-GGA TGC GAT CAT TCT CGA TT-3' Reverse: 5'-GGT CGA GGT GTC GAT GAA CT-3'	199
<i>LasR</i>	Forward: 5'-TCG GTT ATC TGC AAC TGC TC-3' Reverse: 5'-GAC CCA AAT TAA CGG CCA TA-3'	115
<i>PslA</i>	Forward: 5'-CGG TCA GCG AAT ACA GCT C-3' Reverse: 5'-TTG ATC TTG TGC AGG GTG TC-3'	103
<i>PelA</i>	Forward: 5'-GGA ACA GCC AGG TAA TGG AC-3' Reverse: 5'-TCC AGG GTA TCG AGG AAC AG-3'	112
<i>PilA</i>	Forward: 5'-GAT CAA CCC GCT GAA GAC C-3' Reverse: 5'-TGT TTC GGT CGC AGT AGA AG-3'	100
<i>FliC</i>	Forward: 5'-CGA CAA GGG TGT ACT GAC CA-3' Reverse: 5'-GAC CTT CAC TGC GAC CTG AC-3'	100

Hcp: Hemolysin co-regulated protein; PslA: Polysaccharide synthesis locus A; PelA: Pellicle A; PilA: Pilus A; FliC: Flagellin C

2 结果

2.1 RNA 提取物完整性及纯度检测 将提取的总 RNA 用 1.5% 琼脂糖凝胶进行电泳, 可见 23S 和 16S RNA 两条明显条带, 说明总 RNA 完整, 未发生明显降解 (图 1)。经紫外分光光度法检测 RNA 的纯度, 其 D_{260}/D_{280} 均在 1.9~2.0, 提示 RNA 纯度良好。

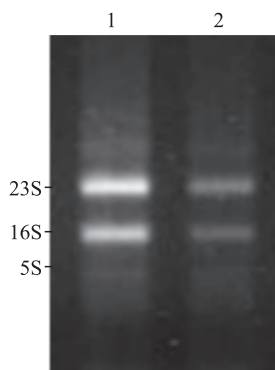


图 1 PAO1 浮游菌和生物被膜菌总 RNA 电泳图

Fig 1 Electrophoretogram of total RNA from PAO1 planktonic bacteria and biofilm bacteria

1: PAO1 planktonic bacteria; 2: PAO1 biofilm bacteria

2.2 PAO1 生物被膜菌的鉴定 实时荧光定量 PCR 检测结果显示, 各目的基因溶解曲线均为单一峰, 说明引物的特异性良好。PAO1 生物被膜菌 *PslA*、*PelA*、*PilA*、*FliC* 基因的相对表达量分别为浮游菌的 714、274、604 和 42 倍, 差异均有统计学意义 (P 均 < 0.05 , 图 2)。提示制备的 PAO1 生物被膜菌形成了具有鞭毛和菌毛结构的成熟生物被膜。

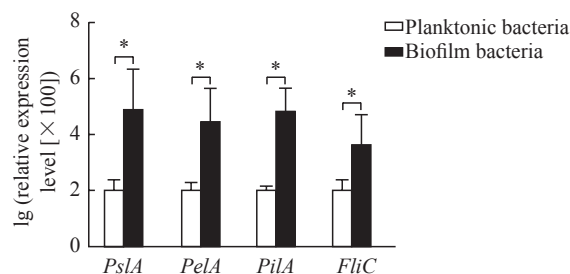


图 2 PAO1 浮游菌和生物被膜菌 *PslA*、*PelA*、*PilA* 和 *FliC* 基因的相对表达量比较

Fig 2 Comparison of expression levels of *PslA*, *PelA*, *PilA* and *FliC* in PAO1 planktonic bacteria and biofilm bacteria

PslA: Polysaccharide synthesis locus A; *PelA*: Pellicle A; *PilA*: Pilus A; *FliC*: Flagellin C. * $P < 0.05$. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$

2.3 T6SS 相关基因和 QS 系统与 PAO1 生物被膜形成的关系 实时荧光定量 PCR 检测结果显示, PAO1 生物被膜菌 QS 系统相关基因 *LasR* 的相对表达量为浮游菌的 1 226 倍, T6SS 相关基因 *Hcp1*、*Hcp2* 和 *Hcp3* 基因的相对表达量分别是浮游菌的 1 045、11 268 和 6 654 倍, 差异均有统计学意义 (P 均 <0.05 , 图 3)。提示 T6SS 和 QS 系统与 PAO1 菌生物被膜的形成有关。

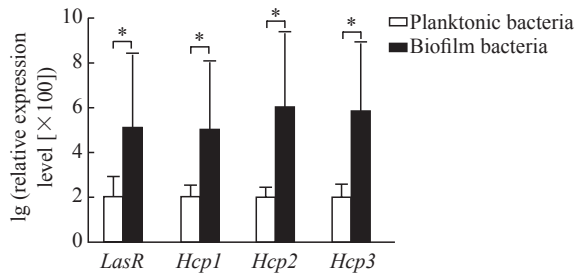


图3 PAO1 浮游菌和生物被膜菌 *LasR*、*Hcp1*、*Hcp2* 和 *Hcp3* 基因的相对表达量比较

Fig 3 Comparison of expression levels of *LasR*, *Hcp1*, *Hcp2* and *Hcp3* in PAO1 planktonic bacteria and biofilm bacteria

Hcp: Hemolysin co-regulated protein. * $P<0.05$. $n=3$, $\bar{x}\pm s$

3 讨论

细菌的生物被膜是细菌黏附在惰性物体表面而形成的一种生长方式, 其形成是一个动态发展的过程, 具有稳定的生长周期。位于生物被膜里层的细菌处于休眠甚至静止的状态, 生长代谢较为缓慢, 生物学特性也与浮游菌显著不同, 对环境的适应力和对外界压力的抵抗力明显增强^[6]。

在细菌生物被膜形成过程中, 多糖合成位点 (polysaccharide synthesis locus, *Psl*) 和菌膜 (pellicle, *Pel*) 基因群构成的两种操纵子与细胞外多糖合成密切相关。*Psl* 基因群包括 15 个开放阅读框架, 即 *PslA*~*PslO*。*Pel* 基因群包括 7 个开放阅读框架, 即 *PelA*~*PelG*^[7]。在生物被膜形成的初始阶段, 一些细菌细胞外多糖基因的转录就被激活, 进而大量合成多糖复合物, 在胞外形成能将细菌包绕在其中的基质, 增强细菌的黏附力, 促进生物被膜的形成和成熟^[7]。铜绿假单胞菌中 IV 型菌毛位于菌体端部, 由单一基因 *PilA* 编码, 与细菌黏附力相关。*FliC* 基因编码的功能性鞭毛蛋白 (flagellin) 具有较强的免疫原性, 是铜绿假单胞

菌鞭毛丝状部的主要蛋白。铜绿假单胞菌的运动性与其致病性密切相关, 失去鞭毛的菌株不能黏附于物体表面, 失去 IV 型菌毛的菌株只能在物体表面形成单层结构, 而不能进一步形成成熟的蘑菇状生物被膜结构^[8]。本研究结果显示, 铜绿假单胞菌 PAO1 成熟阶段生物被膜菌的细胞外多糖相关基因 *PslA*、*PelA* 以及运动相关基因 *PilA*、*FliC* 的表达水平均高于浮游菌, 与上述理论和相关研究相符。

LasR 是 QS 系统中 *Las* 系统的组分之一。*Las* 系统通过激活 *LasR* 和 *LasI* 蛋白质的转录, 促进铜绿假单胞菌某些群感应信号因子的合成, 进而调控蛋白酶、外毒素 A 和弹性蛋白酶等细菌毒力因子的表达^[4]。本研究发现, 铜绿假单胞菌 PAO1 成熟期生物被膜菌的 *LasR* 基因表达量明显高于浮游菌。目前公认的研究结果认为 QS 系统的激活是铜绿假单胞菌形成成熟的生物被膜所必需的因素^[4], 然而细菌是如何将这些外部信号转化为内部信号以及其中基因水平的调控网络仍不清楚。有研究发现, 铜绿假单胞菌能通过与生物膜形成相关的酪氨酸磷酸酶 (tyrosine phosphatase related to biofilm formation A, *TpbA*), 将胞外 QS 信号和细菌细胞外多糖的产生及生物被膜的形成联系起来^[9]。

T6SS 与病原菌致病性相关, 并在细菌识别异己的过程中发挥重要作用^[10]。铜绿假单胞菌含有 3 种不同的 T6SS 基因簇, 分别为 H1-T6SS、H2-T6SS 和 H3-T6SS, 各自在不同方面参与细菌与其他生物体的相互作用。近期 Burkinshaw 等^[11]发现一种由 H2-T6SS 分泌的效应蛋白 TOX-REase-5 (*TseT*) 与铜绿假单胞菌杀伤竞争性细菌的毒力密切相关。亦有研究发现鼠疫耶尔森菌中存在 6 种 *Hcp* 蛋白, 分别在诱导细胞毒性和抗吞噬作用等方面发挥不同的作用^[12]。本研究提示在铜绿假单胞菌 PAO1 生物被膜成熟阶段, 3 种 T6SS 相关基因 *Hcp1*、*Hcp2* 和 *Hcp3* 的表达水平均远高于浮游状态, 说明 T6SS 可能在铜绿假单胞菌生物被膜的形成中起着重要作用。T6SS 在转录水平的表达受 QS 系统调控因子 *LasR* 的调控, QS 系统对铜绿假单胞菌 3 种 T6SS 的调控不同, 然而在铜绿假单胞菌的 *Hcp* 分泌岛上并没有发现 *LasR* 的结合位点^[13], 因此, *LasR* 通过何种途径来影响 T6SS 的表达尚有待进一步研究。混合传感器蛋白激酶 *RetS* 是一种多功能调控因子, 是 QS 系统的重要组分, Moscoso 等^[14]研究表明,

RetS 基因缺失不仅能促进生物被膜的形成,还可诱导高水平的胞内第二信使环鸟苷二磷酸(cyclic di-guanylate, c-di-GMP)的产生,而 c-di-GMP 是细菌从浮游状态向定植状态转换过程中的传感器,高水平的 c-di-GMP 可促进生物被膜的形成;*RetS* 基因的缺失还可抑制 III 型分泌系统(type III secretion system, T3SS)表达,上调 T6SS 的表达。Allsopp 等^[15]研究发现 H2-T6SS 和 H3-T6SS 的活性被 QS 系统的转录后调节因子 RsmA 和转录调节因子 AmrZ 抑制。此外, Mougous 等^[16]研究发现,一种磷酸化的丝氨酸-苏氨酸激酶 PpkA 参与了 T6SS 翻译后水平的调控,其可以调控 Hcp1 的分泌。因此,这些途径之间可能存在一定的关联,通过某些信号分子的调控,形成复杂的调控网络。

综上所述,铜绿假单胞菌中 T6SS 和 QS 系统与生物被膜的形成有着重要的关系, QS 系统以及其他信号通路与 T6SS 之间可能存在着一个相互联系的复杂的调控网络,共同调控着细菌生物被膜的形成,其具体调控机制有待进一步研究。

[参考文献]

- [1] DRISCOLL J A, BRODY S L, KOLLEF M H. The epidemiology, pathogenesis and treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infections[J]. *Drugs*, 2007, 67: 351-368.
- [2] MA J, SUN M, PAN Z, SONG W, LU C, YAO H. Three Hcp homologs with divergent extended loop regions exhibit different functions in avian pathogenic *Escherichia coli*[J/OL]. *Emerg Microbes Infect*, 2018, 7: 49. doi: 10.1038/s41426-018-0042-0.
- [3] DAS S, CHAUDHURI K. Identification of a unique IAHP (IcmF associated homologous proteins) cluster in *Vibrio cholerae* and other proteobacteria through *in silico* analysis[J]. *In Silico Biol*, 2003, 3: 287-300.
- [4] KALAIARASAN E, THIRUMALASWAMY K, HARISH B N, GNANASAMBANDAM V, SALI V, JOHN J. Inhibition of quorum sensing-controlled biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa* by quorum-sensing inhibitors[J]. *Microb Pathog*, 2017, 111: 99-107.
- [5] LESIC B, STARKEY M, HE J, HAZAN R, RAHME L G. Quorum sensing differentially regulates *Pseudomonas aeruginosa* type VI secretion locus I and homologous loci II and III, which are required for pathogenesis[J]. *Microbiology*, 2009, 155(Pt 9): 2845-2855.
- [6] MANN E E, WOZNIAC D J. *Pseudomonas* biofilm matrix composition and niche biology[J]. *FEMS Microbiol Rev*, 2012, 36: 893-916.
- [7] AL-WRAFY F, BRZOZOWSKA E, GÓRSKA S, GAMIAN A. Pathogenic factors of *Pseudomonas aeruginosa*—the role of biofilm in pathogenicity and as a target for phage therapy[J]. *Postepy Hig Med Dosw (Online)*, 2016, 70: 78-91.
- [8] O'TOOLE G A, KOLTER R. Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development[J]. *Mol Microbiol*, 1998, 30: 295-304.
- [9] UEDA A, WOOD T K. Connecting quorum sensing, c-di-GMP, pel polysaccharide, and biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa* through tyrosine phosphatase TpbA (PA3885)[J/OL]. *PLoS Pathog*, 2009, 5: e1000483. doi: 10.1371/journal.ppat.1000483.
- [10] GALLIQUE M, BOUTEILLER M, MERIEAU A. The Type VI secretion system: a dynamic system for bacterial communication?[J/OL]. *Front Microbiol*, 2017, 8: 1454. doi: 10.3389/fmicb.2017.01454.
- [11] BURKINSHAW B J, LIANG X, WONG M, LE A N H, LAM L, DONG T G. A type VI secretion system effector delivery mechanism dependent on PAAR and a chaperone-co-chaperone complex[J]. *Nat Microbiol*, 2018, 3: 632-640.
- [12] ANDERSSON J I, SHA J, EROVA T E, FITTS E C, PONNUSAMY D, KOZLOVA E V, et al. Identification of new virulence factors and vaccine candidates for *Yersinia pestis*[J/OL]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2017, 7: 448. doi: 10.3389/fcimb.2017.00448.
- [13] SANA T G, HACHANI A, BUCIOR I, SOSCIA C, GARVIS S, TERMINE E, et al. The second type VI secretion system of *Pseudomonas aeruginosa* strain PAO1 is regulated by quorum sensing and Fur and modulates internalization in epithelial cells[J]. *J Biol Chem*, 2012, 287: 27095-27105.
- [14] MOSCOSO J A, MIKKELSEN H, HEEB S, WILLIAMS P, FILLOUX A. The *Pseudomonas aeruginosa* sensor RetS switches type III and type VI secretion via c-di-GMP signalling[J]. *Environ Microbiol*, 2011, 13: 3128-3138.
- [15] ALLSOPP L P, WOOD T E, HOWARD S A, MAGGIORELLI F, NOLAN L, WETTSTADT S, et al. RsmA and AmrZ orchestrate the assembly of all three type VI secretion systems in *Pseudomonas aeruginosa*[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2017, 114: 7707-7712.
- [16] MOUGOUS J D, GIFFORD C A, RAMSDELL T L, MEKALANOS J J. Threonine phosphorylation post-translationally regulates protein secretion in *Pseudomonas aeruginosa*[J]. *Nat Cell Biol*, 2007, 9: 797-803.

[本文编辑] 孙 岩