

鞭毛可视化方法及其在鞭毛功能研究中的应用

孔东洋¹, 王璐², 张红^{3*}, 张静超^{4*}

1 天津大学 化工学院 合成生物学前沿科学中心和系统生物工程教育部重点实验室, 天津 300350

2 中国石油集团科学技术研究院有限公司, 北京 100083

3 中国石油天然气股份有限公司石油化工研究院, 北京 102206

4 电子科技大学 四川省人民医院 医学遗传中心, 四川 成都 610054

孔东洋, 王璐, 张红, 张静超. 鞭毛可视化方法及其在鞭毛功能研究中的应用[J]. 生物工程学报, 2025, 41(1): 117-130.
KONG Dongyang, WANG Lu, ZHANG Hong, ZHANG Jingchao. Visualization of flagella and its applications in research on flagellar functions[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2025, 41(1): 117-130.

摘要: 鞭毛作为细菌主要的运动器官, 是细菌表面重要的蛋白质结构, 在细菌运动、趋化性、致病性以及环境感知等方面发挥着重要作用。随着细菌显微追踪技术的发展以及鞭毛可视化工具的开发应用, 鞭毛新的运动形态和在细菌生理活动中更加详细的功能作用被逐步发现。本文主要综述了鞭毛可视化方法以及基于此方法对鞭毛功能的研究进展, 为研究鞭毛功能提供了更多的思路, 为未来其在抑制细菌传播和治疗细菌感染等领域的应用提供了理论基础。

关键词: 鞭毛; 可视化; 功能; 运动性; 致病性

资助项目: 国家重点研发计划(2018YFA0902102); 中国博士后科学基金 (2023M740523); 四川省人民医院博士后基金 (2022B1013)

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2018YFA0902102), the China Postdoctoral Science Foundation (2023M740523), and the Postdoctoral Fund of Sichuan Provincial People's Hospital (2022B1013).

*Corresponding authors. E-mail: ZHANG Jingchao, 2015207553@tju.edu.cn; ZHANG Hong, zhanghong010@peteochina.com.cn

Received: 2024-03-14; Accepted: 2024-05-24

Visualization of flagella and its applications in research on flagellar functions

KONG Dongyang¹, WANG Lu², ZHANG Hong^{3*}, ZHANG Jingchao^{4*}

1 Frontier Science Center for Synthetic Biology and Key Laboratory of Systems Bioengineering (Ministry of Education), School of Chemical Engineering and Technology, Tianjin University, Tianjin 300350, China

2 China Petroleum Corporation Science and Technology Research Institute Co., Ltd., Beijing 100083, China

3 Petrochemical Research Institute of PetroChina Co., Ltd., Beijing 102206, China

4 Medical Genetics Center, Sichuan Provincial People's Hospital, University of Electronic Science and Technology of China, Chengdu 610054, Sichuan, China

Abstract: Flagella are important protein structures on the cell surface of bacteria and the main appendage for bacterial swimming. Flagella play a crucial role in bacterial motility, chemotaxis, pathogenicity, and environmental sensing. With the development of microscopic tracking technology and flagellum visualization tools, new forms of flagellar motility and increasing roles of flagella in the physiological activities of bacteria have been discovered. This review introduces the visualization methods of flagella and the applications of these methods in studying flagellar functions, giving insights into exploring the functions of flagella and laying a theoretical foundation for its future applications in inhibiting bacterial transmission and treating bacterial infections.

Keywords: flagellum; visualization; function; motility; pathogenicity

细菌运动是其生命活动的一种重要行为,并且细菌的运动方式具有多样性。细菌运动行为主要包括鞭毛介导的游泳运动 (swimming motility)、菌毛介导的蹭行运动 (twitching motility)、两者共同介导的群集运动 (swarming motility) 以及不依靠鞭毛和菌毛的滑行运动 (gliding motility) 等^[1-3]。其中,鞭毛介导的运动是细菌在液体中和半固体表面运动的主要方式。鞭毛是细菌表面重要的结构之一,广泛存在于弧菌(如霍乱弧菌)、杆菌(如大肠杆菌)和个别球菌(如溶血性链球菌)等细菌中。根据鞭毛的着生部位,可以大致分为极生鞭毛、侧生鞭毛、周生鞭毛和周质鞭毛。

鞭毛的结构主要由基体、钩型鞘和鞭毛丝这 3 部分组成^[4]。如图 1 所示,基体嵌入细胞膜内类似马达,能够提供动力;鞭毛丝则类似

螺旋桨产生前后运动的推力;而钩型鞘则是充当万向节的作用,将马达产生的扭矩平稳地传递到鞭毛丝上面^[6]。由单个蛋白质 FliC 组成的鞭毛丝和由蛋白质 FlgE 组成的聚合物钩型鞘通过蛋白质 FlgK 和 FlgL 连接在一起^[7]。鞭毛丝的末端有帽蛋白 FliD,能够协助鞭毛组装和防止鞭毛丝蛋白流失^[8]。基体由 1 个转子和十几个定子等组成,其中转子由 4 种鞭毛蛋白 FliF、FliG、FliM 和 FliN 组成,定子则由 2 个完整的膜蛋白 MotA 和 MotB 组成^[9]。

鞭毛在细菌生命活动中扮演着重要的角色,为细菌提供了运动的动力。此外,最新研究表明鞭毛在细菌的毒性、生物被膜的形成、免疫逃逸等中也发挥着重要作用^[10]。图 2 为鞭毛可视化方法和主要功能示意图。越来越多的研究人员开始关注鞭毛在细菌生命活动中的作

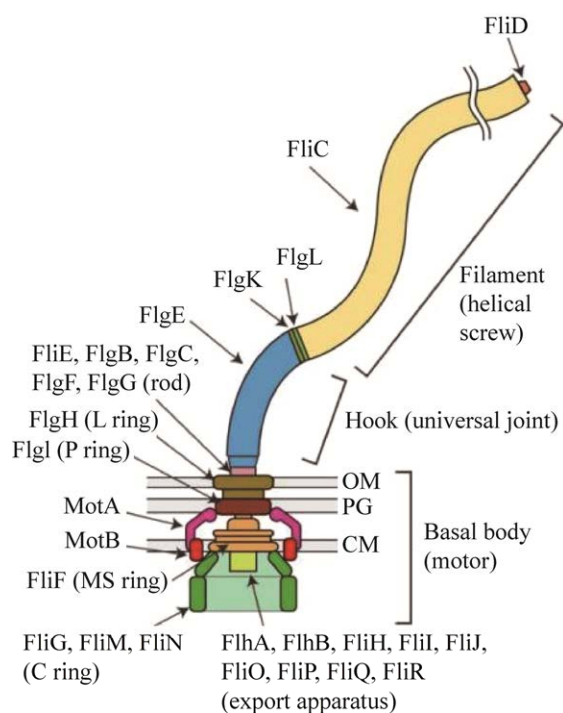


图 1 鞭毛结构示意图^[5] OM: 外膜; IM: 内膜; PG: 肽聚糖层; MS ring: 内膜环; C ring: 外部细胞质环。

Figure 1 Schematic diagram of flagella structure^[5]. OM: Outer membrane; IM: Inner membrane; PG: Peptidoglycan layer; MS ring: Endometrial ring; C ring: Cytoplasmic ring.

用和功能,但由于鞭毛只能通过电子显微镜直接观察,因此无法广泛开展实验探究。随着显微技术和荧光染色的发展,目前已经实现了光学显微镜下鞭毛的可视化,这为研究鞭毛相关的机制提供了重要的技术手段。

本文结合本课题组在鞭毛功能方面的研究,从鞭毛可视化的发展进程及鞭毛在运动、致病性、抗原性、免疫原性、环境感知等方面的作用进行阐述,并对鞭毛未来发展方向进行了展望,以期为开发操控细菌运动的新方法以及实现其在抗细菌感染等领域的进一步应用提供参考。

1 鞭毛的可视化

鞭毛的直径约为 20 nm,无法直接在光学显微镜下观察。在电子显微镜出现之前,人们主要是通过鞭毛染色法来了解鞭毛。这种方法借助媒染剂和染色剂的沉淀作用,在鞭毛上形成染料层,以便在光学显微镜下观察到鞭毛的存在(图 3A)^[11]。染色方法包括 Leifson 染色法、Cerares-Gill 染色法、银盐染色法、柯达卡溶液

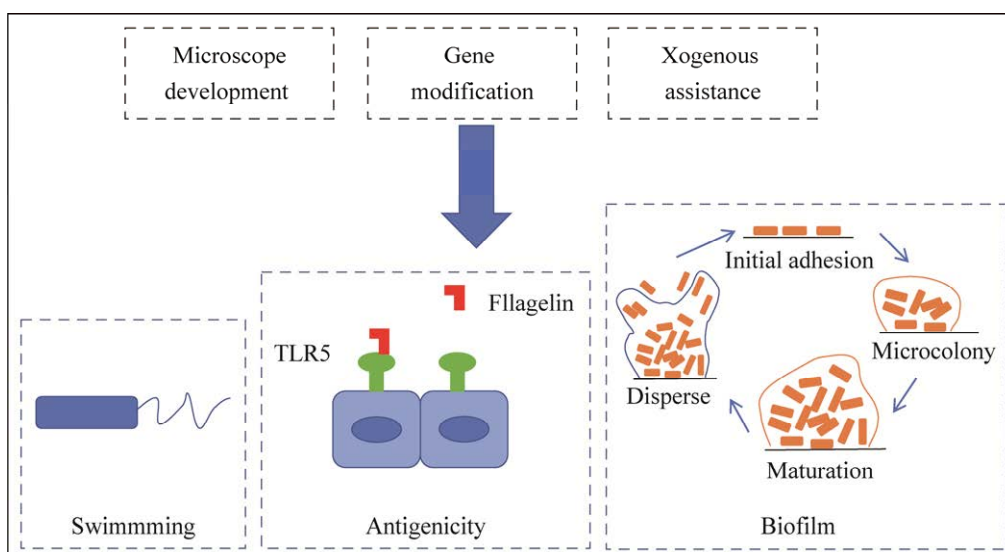


图 2 鞭毛可视化方法及主要生物学功能

Figure 2 Flagella visualization method and main biological functions.

染色法及负染法等,其中 Leifson 染色法最为常用^[15]。然而,鞭毛染色法操作繁琐,无法实时观测鞭毛的运动状态,只能用于观察细菌鞭毛的形态、数量和位置。1951年,Koffler^[15]首次使用电子显微镜观察到了细菌的鞭毛,提供了一种能够直接观测鞭毛的方法。通常使用的电子显微镜包括透射电子显微镜、扫描电子显微镜和免疫电子显微镜等,能够清晰地观察到鞭毛的结构形态以及细胞骨架(图 3B)^[12]。然而,这种方法需要固定细胞,会导致鞭毛丧失活性和结构真实性。虽然冷冻电子断层扫描法能够在细胞天然的状态下获得鞭毛的原位可视化三维结构,但是需要搜索和参考粒子的具体数据,并且成本也非常昂贵^[16-17]。随着显微成像技术的发展,光学显微镜逐渐能够实现对细菌鞭毛

运动状态的观察。Macnab 等^[18]在暗场显微镜下观察到了处于移动状态的鞭毛;他们使用短弧氙灯或高表面亮度的汞灯,用 530 nm 长通滤光片衰减蓝色光,初步探究了鞭毛对细菌运动行为的作用^[19]。但由于胞体的耀斑的存在,暗场显微镜会在几微米距离内出现模糊的视野,影响鞭毛的观察,并且该方法对于单个鞭毛可视化的技术要求较高^[20]。仅仅通过显微镜技术的发展无法满足观察活性状态下鞭毛的实验需求,2000年 Turner 等^[21]发现鞭毛丝能够被氨基特异性或巯基特异性 Alexa Fluor 染料染色,这提供了一种将显微镜和染色结合的鞭毛可视化新方法。

通过荧光染料对鞭毛进行染色,能够在保证鞭毛活性以及在自然状态下观察到鞭毛的运动,根据染色机理的不同可分为 2 种类型。一

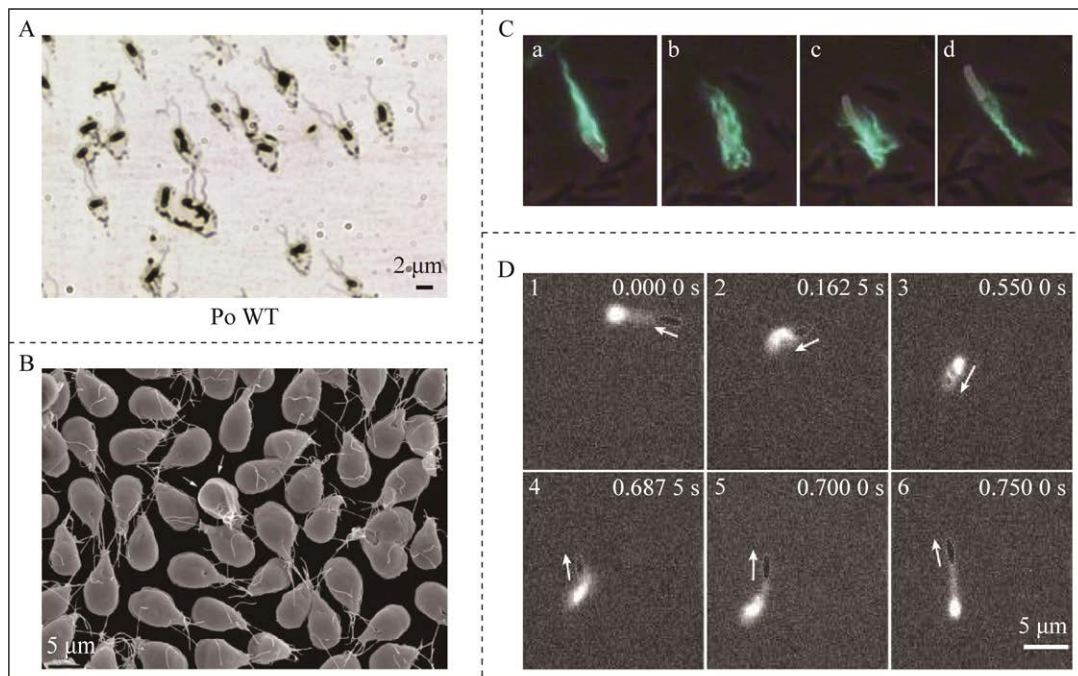


图 3 鞭毛可视化方法 A: 果胶杆菌野生型鞭毛染色^[11]; B: 肠贾第鞭毛虫扫描电子显微镜示意图^[12]; C: 大肠杆菌经 Cy3 标记后的翻转观察^[13]; D: 铜绿假单胞菌点突变染色后游泳运动行为观察^[14]。

Figure 3 Flagella visualization method. A: Wild type flagella staining of *Pectobacterium odoriferum*^[11]; B: Scanning electron microscopy schematic diagram of *Giardia intestinalis*^[12]; C: Flip observation of *Escherichia coli* labeled with Cy3^[13]; D: Observation of swimming behavior after point mutation staining of *Pseudomonas aeruginosa*^[14].

种是使用荧光染料对鞭毛进行染色, 如使用 Cy3 的琥珀酰亚胺酯标记鞭毛, 随后使用巯基反应性染料溶液(Alexa Fluor 532 或 C5 马来酰亚胺)进行染色(图 3C)^[13]。该方法标记技术简单且图像十分生动, 能够使用普通的荧光显微镜进行观察, 并且不会影响细菌的正常运动。但该方法进行的染色没有遗传性, 无法观察子代鞭毛的状态。另一种方法是鞭毛的氨基特异性荧光标记, 来达到对鞭毛的可视化。如将编码鞭毛蛋白 FliC 引入了半胱氨酸突变, 使鞭毛能够被巯基反应性荧光染料 Alexa Fluor 488 染色(图 3D)^[14]。这种方法虽然改变了鞭毛的基因导致无法得到原始鞭毛, 但该方法并不会影响鞭毛的正常的生理行为, 也具有良好的遗传性, 有助于探究鞭毛在细菌生长分裂中的作用。

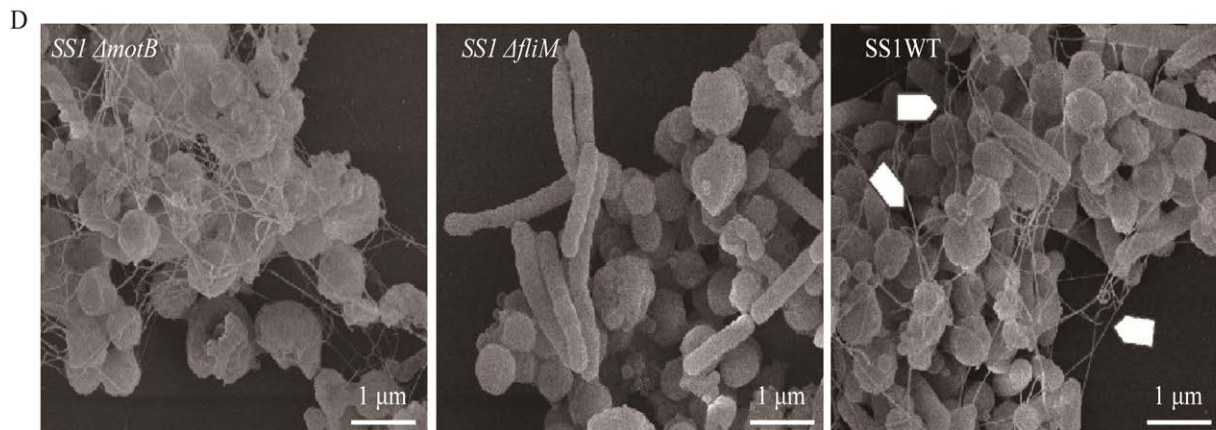
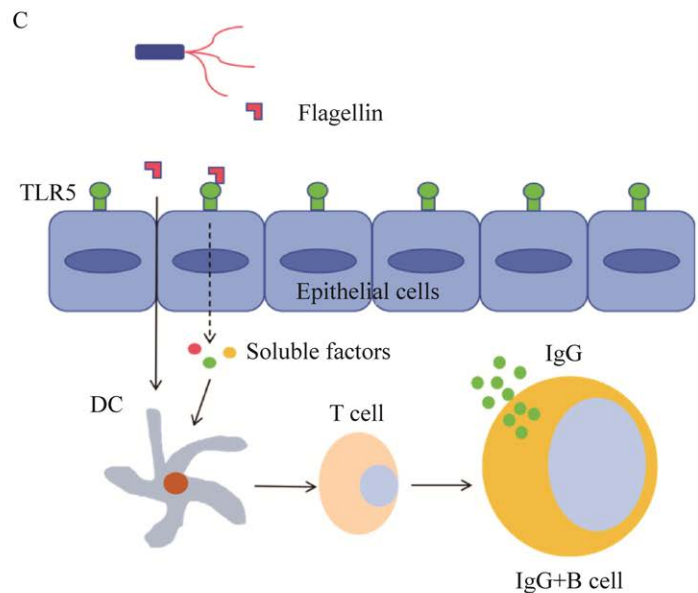
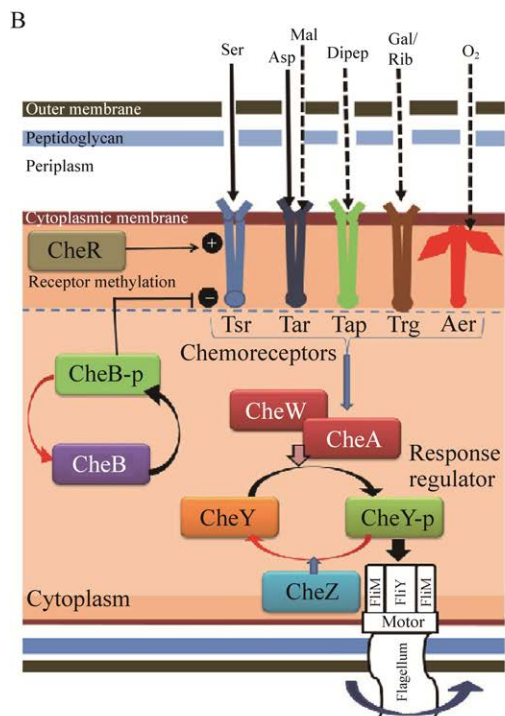
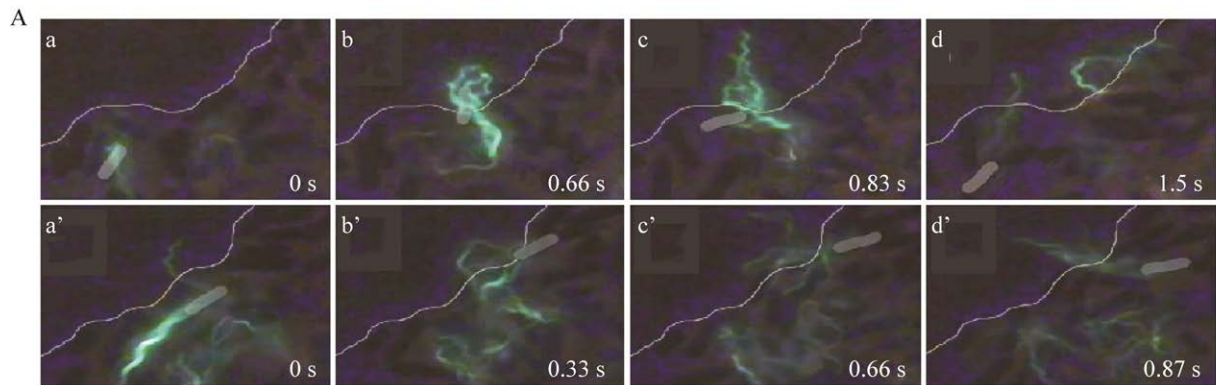
本课题组以铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)为基础菌株, 通过点突变将鞭毛蛋白 FliC394 位置上的碱基 ACT 突变为 TGC, 即将苏氨酸点突变为半胱氨酸, 得到点突变质粒; 进而与线性载体构建成自杀质粒, 电转入宿主细胞, 随后与野生型铜绿假单胞菌进行双亲结合导入基因组中, 最后得到能够进行鞭毛染色的菌株, 从而实现了鞭毛的可视化^[14]。本团队还详细记录了鞭毛驱动细菌在不同液体环境中的行为方式和生物被膜形成过程的作用关系等, 对鞭毛的行为机制和生理功能进行了深入探究。在一系列鞭毛可视化方法的助力下, 越来越多研究人员聚焦于鞭毛功能和机理的研究。

2 鞭毛的功能研究进展

鞭毛作为功能细胞器, 对细胞的生命活动有着重要作用。随着鞭毛可视化方法的发展和运用, 鞭毛在细菌运动、致病性、环境感知、抗原性和免疫原性等方面的功能作用也逐渐被揭示。

2.1 运动

鞭毛在细胞运动中发挥着尤为重要的作用, 在鞭毛的牵引下细胞可以在不同的环境中发生游泳运动或群集运动。游泳运动是指细菌在液体环境中的运动行为, 早期研究就指出细菌通过以底部可逆旋转的马达驱动, 由离子通道提供动力, 并通过旋转螺旋状的鞭毛进行游动^[22-24]。通过对细菌鞭毛进行可视化, 可以在显微镜下清晰观察到鞭毛的运动形式, 这对探究鞭毛在细菌生命活动中的作用有很大的意义。由于鞭毛数量和结构等不同, 鞭毛细菌会采取不同的运动策略。多鞭毛细菌如大肠杆菌(*Escherichia coli*)利用胞体周围的鞭毛采用奔跑-翻滚的方式运动。当鞭毛进行逆时针旋转时, 鞭毛丝会拧成一束并推动细胞平稳移动; 而当 1 个或多个鞭毛顺时针旋转时, 鞭毛丝则从鞭毛束中脱离出来, 进而改变细胞的运动方向(图 4A)^[13,25-26]。*E. coli* 通过改变鞭毛的旋转方向来改变胞体的运动状态, 从而实现了大肠杆菌的趋化性。另外, 一些多鞭毛菌由于钩型鞘结构的不稳定性, 在改变旋转方向时则会发生 90°的角度偏转, 从而形成奔跑-反转-轻弹的运动形式^[27-28]。而单鞭毛细菌如铜绿假单胞菌则是采用了运行-反转-暂停的运动策略。鞭毛逆时针旋转时, 推动细菌向前移动; 鞭毛顺时针旋转时, 鞭毛则会拉着细菌向相反方向运动; 鞭毛停止旋转时, 细菌会进入暂停的状态^[29-30]。近期有研究通过对鞭毛进行染色后发现 *P. aeruginosa* 存在一种新的运动方式, 即运行-反转-包裹的运动模式。铜绿假单胞菌在鞭毛切换旋转方向, 从拉动切换至推动的过程中, 可能出现包裹模式, 即鞭毛顺时针缠绕在菌周围^[21]。包裹模式的出现使得细菌运动方向更加随机, 增强了细菌的趋化能力。基于鞭毛可视化的发展和应用, 结合显微追踪技术, 研究人员对细



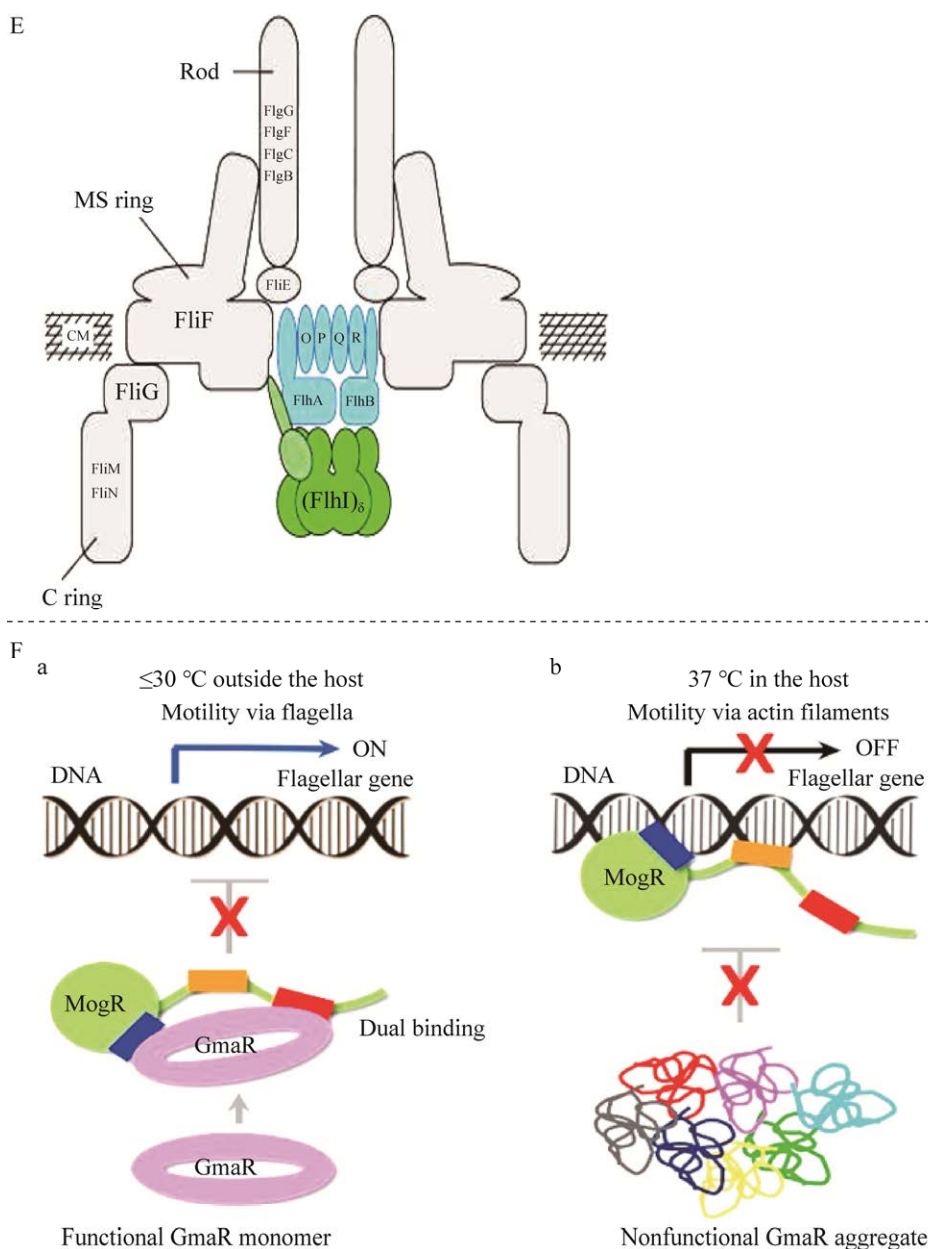


图4 鞭毛功能举例 A: 大肠杆菌靠近边缘时, 鞭毛改变旋转方向, 鞭毛束解开导致游离边缘^[13]; B: 大肠杆菌趋化性信号通路示意图^[44]; C: 鞭毛蛋白刺激跨膜蛋白 TLR5, 产生促炎介质示意图; D: 幽门螺杆菌野生型和鞭毛突变型形成生物被膜的扫描电子显微镜图像^[45]; E: 鞭毛 III 型分泌装置示意图^[46]; F: GmaR-MogR 系统对鞭毛表达进行温度依赖性调控的分子模型^[47]。

Figure 4 Example of flagella function. A: When *Escherichia coli* approaches the edge, the flagella change direction of rotation, and the flagella bundle is released, resulting in free edges^[13]; B: Schematic diagram of the chemotactic signaling pathway in *Escherichia coli*^[44]; C: The flagellar protein stimulates the transmembrane protein TLR5, leading to the production of pro-inflammatory mediators; D: Scanning electron microscopy images of biofilms formed by wild-type and mutant strains of *Helicobacter pylori*^[45]; E: Schematic diagram of flagella type III secretion device^[46]; F: A molecular model of temperature dependent regulation of flagella expression by the GmaR-MogR system^[47].

菌在各种环境中的行为差异以及鞭毛在游泳运动过程中的行为有了更加直观清晰的认识,这对探究鞭毛在细胞运动过程中的作用和功能起了推动作用。

细菌在半固体表面以集体运动的形式进行扩展的运动的模式称为群集运动,该行为广泛存在于多种细菌中,如大肠杆菌属、弧菌属和假单胞菌属等^[31-33]。群集运动是由鞭毛驱动的,鞭毛活性不足或缺失鞭毛会导致细菌群体在表面的扩散速度降低^[34]。对于单鞭毛细菌来说,在特定情况下细菌甚至可以产生 2 个鞭毛,从而产生超群集表型^[35]。在多鞭毛细菌中,相邻细胞间多个鞭毛会相互交错形成螺旋结构,使得相邻细胞捆绑形成筏,促进群集行为的进行^[36]。虽然已知鞭毛对细菌群体扩张起着关键作用,但其中的机制尚不明确。通过鞭毛可视化的技术,研究人员能够清晰地观察到群集运动过程中的行为状态^[20]。通过多种模型可以发现,一方面鞭毛通过剥离细菌表面的脂多糖来增加细菌层中的渗透压,将营养物质和液体流向群体,促进细菌的生长分裂并降低细菌表面的张力,进而增加群体的直径^[37];另一方面鞭毛的活动产生了可以增加渗透压的代谢物,进而增加群体的扩张^[38-39]。这在一定程度上解释了鞭毛在群集运动中产生作用的方式,为后续探究其具体机制打下基础。

在自然环境中,细菌通过鞭毛的运动来实现趋化性,这是一种对化学梯度的偏向性运动,有助于细菌在最佳的环境内生存^[40]。在过去的几十年里,大肠杆菌作为模式菌株在细菌趋化性领域得到了广泛的研究。在趋化过程中,大肠杆菌细胞内细胞质蛋白处理感觉信号,并将控制信号传递到鞭毛上,从而改变其运动以实现趋化运动。大肠杆菌具有 5 种甲基接受趋化蛋白(methyl-accepting chemotaxis protein, MCP)或

跨膜化学感受器,能够感应环境中的氧、核糖和二甲胺等含量变化。当这些化学感受器接收到信号后,细胞内的组氨酸激酶 CheA 蛋白接收 MCP 的信号后开始自磷酸化,并将磷酸基团传递给反应调节蛋白 CheY,使之磷酸化。磷酸化的 CheY 蛋白附着在鞭毛的马达上面,与其相互作用并改变鞭毛的旋转方向^[41-42]。当加入诱导剂后, CheA 的自磷酸化速率会降低,导致 CheY 的去磷酸化,鞭毛进行顺时针旋转,降低了翻滚频率,使细胞在有利的环境中平稳运行;相反,当加入驱虫剂后,则会增加 CheA 的自磷酸化速率,进而增加其翻转频率(图 4B)^[43-44]。此外,在趋磁细菌中,趋化作用则是在鞭毛和外界磁场的共同作用下实现的,并使细菌沿着地球的磁场线进行游动^[48]。细菌的趋化性能够驱使细菌前往营养物质丰富位置,增加形成生物被膜的概率,也能够影响细菌的发病机制和增强宿主感染的能力。但也有研究者利用细菌的趋化性实现了生物修复、水平基因转移和靶向药物递送等^[44]。因此细菌的趋向性在制药行业和化工行业有着广阔的市场应用前景。

2.2 抗原性与免疫原性

鞭毛丝是由大约 2 000 个鞭毛蛋白组成的直径约 20 nm、长约 5–20 μm 的空心螺旋状结构,有 L 型和 R 型两种构象^[49]。鞭毛蛋白 FliC 是目前研究最为深入的一种蛋白,由 4 个结构域(D0、D1、D2 和 D3)组成。其中 D0 和 D1 结构域形成高度保守的 α 螺旋结构作为内芯;D2 和 D3 结构域以 β 折叠形式形成外部结构,其氨基酸序列高度可变^[50]。在冷冻电子显微镜下,可以观察到鞭毛丝的完整分子模型,即外部的亚基间主要通过极性相互作用进行互作,疏水作用较小,但鞭毛丝内部的亚基多是疏水性的,因此鞭毛丝的结构十分稳定^[51]。Wei 等^[52]通过对幽门螺杆菌的鞭毛帽蛋白 FliD 进行克隆和表

达,发现其具有很高的抗原性,证明了鞭毛蛋白具有抗原性。鞭毛的高度可变区域影响着其抗原性的多样性,据此可以对细菌进行血清型鉴定^[53]。而鞭毛的高度保守区域能被 Toll 样受体(Toll-like receptors, TLR)的跨膜蛋白 TLR5 特异性识别,诱导信号级联反应,最终产生促炎介质(图 4C)^[54-55]。由此可见,鞭毛除了具有抗原性,也具有免疫原性。有研究表明除了鞭毛帽蛋白 FliD 外,铜绿假单胞菌的鞭毛丝蛋白 FliC 也具有抗原性并能够被 TLR5 识别从而具有免疫原性^[56]; Zarei 等^[57]通过克隆、表达和纯化幽门螺杆菌的鞭毛蛋白 FlaA 的蛋白特异性区域,也证实了其具有抗原性和免疫原性。

鞭毛蛋白除了自身具有免疫原性外,还能够增强外源抗原的免疫原性^[58]。根据这种特性,鞭毛蛋白被广泛用作免疫佐剂用于疾病研究和疫苗研发。有研究发现,将纯化后的鞭毛蛋白通过鼻腔给药注入小鼠中,发现鞭毛蛋白能够促进肺抗原呈递细胞(activation of lung antigen presenting cell, APC)的激活,增强了呼吸道感染的抵抗力^[59]。另外在禽流感疫苗的研发中,鞭毛蛋白作为免疫佐剂也有着举足轻重的地位。将鞭毛蛋白的 N 端部分(nFliC)与猪胸膜肺炎放线杆菌(*Actinobacterium pleuropneumoniae suis*)的抗原 ApxIIpF 进行基因融合,对小鼠进行 2 次疫苗接种和空白对照实验,发现与鞭毛蛋白融合后的疫苗产生了更高水平的抗体, T 细胞的含量也明显增加,增强了疫苗的保护率^[60]。在人体免疫佐剂研究中,将鞭毛蛋白基因插入乙型肝炎的病毒样颗粒(HBc VLP)中,制成呈递异源抗原的疫苗递送平台(FH VLP)。由此方法制成的疫苗能够有效引发抗体反应和 T 淋巴细胞(cytotoxic T lymphocyte, CTL)反应并具有良好的自身安全性,可以作为预防流感病毒的新型候选疫苗^[61]。鞭毛蛋白作为疫苗研发的候选免

疫佐剂,因其具有能够低剂量发挥效用、给药简单、不会对人体造成损伤等优势,在疫苗研究领域有着很大的开发空间。目前囿于活体实验的限制,鞭毛可视化在鞭毛的抗原性与免疫原性研究领域的应用较少,亟待开发更多适用于活性细胞中的鞭毛可视化技术来进一步深入研究鞭毛的抗原性与免疫原性。

2.3 鞭毛的致病性

鞭毛作为细菌在溶液中的“发动机”,影响着细菌从液体环境中靠近宿主表面、定殖和黏附的过程。研究表明,鞭毛缺失后细菌会丧失对宿主细胞的黏附功能,并且细菌的致病能力也明显下降^[62-63]。同时比较减毒菌株和高毒性菌株中鞭毛相关基因的转录表达情况,相较于减毒菌株,后者有更强的转录水平,这在一定程度上阐释了鞭毛与毒力因子相关^[64]。鞭毛参与细菌致病的主要方式有 2 种:(1) 鞭毛促进生物被膜的形成;(2) 细菌鞭毛能够分泌与毒力相关的蛋白。

2.3.1 鞭毛与生物被膜的相关性

鞭毛细菌通过游泳运动靠近并黏附在宿主表面,生长聚集并形成具有特异性分化和结构化的微生物群落,这些群落被称为生物被膜^[65]。生物被膜的形成不仅提高了细菌对外部环境的抵抗力,还增加了细菌的耐药性^[66]。研究发现,鞭毛作为生物被膜的组成部分,会对生物被膜的结构产生影响。例如,通过在扫描电子显微镜下可视化鞭毛后发现,在对鞭毛进行突变后,幽门螺杆菌的生物被膜稳定性降低且缺少鞭毛丝(图 4D)^[45]。另有研究表明细菌中的第二信使环二鸟苷酸(c-di-GMP)能够调节生物被膜的形成,c-di-GMP 浓度增高会激活胞外多糖的合成来构建生物被膜^[67]。也有研究表明 c-di-GMP 能够降低鞭毛马达中定子的定位从而影响鞭毛的运动功能^[68]。而合成 c-di-GMP 的二鸟苷酸环

化酶通过调节酶的活性来控制鞭毛的运动^[69]。而鞭毛定子也能够与二鸟苷酸环化酶相互作用刺激环化酶的活性,促进 c-di-GMP 的产生,并形成正反馈循环^[70]。这种循环促进了生物被膜的形成,也抑制了群集运动的进行。这种正反馈模型主要作用于群集运动中,并不适用游泳运动,其中具体的机制需要继续深入研究。

2.3.2 鞭毛与分泌系统的相关性

革兰氏阴性菌具有 9 个分泌系统,其中最关键的是细菌 III 型分泌系统(type III secretion system, T3SS),这种系统负责将毒力蛋白传递至菌体外。值得注意的是, T3SS 与鞭毛 T3SS 同源,有着相似的结构^[71]。鞭毛 T3SS 位于鞭毛在基体的 MS 环内,由 6 种完整的膜蛋白(FlhA、FlhB、FliO、FliP、FliQ、FliR)和 3 种细胞质蛋白(FliH、FliI、FliJ)组成。其核心功能在于,通过鞭毛丝内部直径约 2 nm 的狭窄通道,将各类蛋白从细胞质中分泌出去(图 4E)^[46]。研究表明,鞭毛 T3SS 不仅能够分泌鞭毛结构蛋白,还能分泌一些非鞭毛结构蛋白和毒力因子,如将来自蜘蛛、蛇、细菌等的多种神经肽和蛋白与鞭毛分泌底物 FlgM 融合后,发现各种测试肽都是通过沙门氏菌的鞭毛 T3SS 分泌的^[72]。与弯曲杆菌抗原相关的蛋白(*Campylobacter invasion antigens*, Cia)在鞭毛 T3SS 结构元件缺失后,会无法分泌到细胞外,导致细菌丧失了对宿主细胞的侵袭能力,这说明 Cia 蛋白是由鞭毛 T3SS 分泌的^[73]。此外,与毒力相关的磷脂酶也是通过鞭毛 T3SS 分泌至胞外^[73]。近期,研究人员通过标记细菌并利用荧光显微镜观察鞭毛的组装和分泌过程^[75],对鞭毛的分泌系统有了进一步的认识,这为更深入地理解鞭毛的分泌系统提供了新的视角。

2.4 鞭毛与环境感知的相关性

地球上除了温暖适宜生物居住的环境外,

也存在着冰川、火山、深海、强碱和强酸等极端环境。生活在这极端地域的生物,如嗜冷菌、嗜热菌等^[76],在漫长的进化过程中形成了独特的机制来抵抗极端环境。以嗜冷菌为例,研究表明,细菌的耐冷机制不仅与膜的流动性、稳定细胞质溶胶的冷激蛋白的表达、嗜冷酶和类胡萝卜素的生产等因素相关,也与细菌的鞭毛关系密切^[77]。单核细胞增生李斯特菌在低温条件下能够正常生长,是冷藏食品威胁人类的主要病菌之一,且其鞭毛属于低温依赖型鞭毛。研究发现,与野生型相比,鞭毛基因突变体 *AflhA* 和 *ΔmotA* 在低温的环境中表现出 *ΔmotA* 的鞭毛细胞数量显著减少,而 *AflhA* 均呈非鞭毛状态的现象,表明细菌在抵抗寒冷时需要鞭毛^[78]。有研究表明李斯特菌的热传感器蛋白 GmaR 通过以温度响应的方式结合鞭毛基因的运动基因转录阻遏蛋白 MogR 来协调鞭毛的表达;在低温时,单体 GmaR 蛋白通过双重结合方式与 MogR 相互作用,抵消 MogR 对鞭毛表达的抑制活性;而升高温度后,单体 GmaR 被修饰成无官能团聚集体,聚合后, GmaR 无法识别和中和 MogR;因此, MogR 与操作子 DNA 相互作用并转录抑制鞭毛表达(图 4F)^[47]。并且在深海中的希瓦氏菌的侧鞭毛和极性鞭毛在低温和高压的环境下存在差异调控:侧鞭毛在低温下高度表达,而极性鞭毛则是在低温下被高度抑制,说明侧鞭毛对于低温下的细菌运动至关重要^[79]。除此之外鞭毛也能够感应接触的表面,从而调节细菌的行为。有研究发现鞭毛结构蛋白 FliL 具有在表面传递感知的功能,调节细菌蜂群细胞的分化;而 FliL 缺失菌株与运动相关的基因和趋化性都被抑制^[80]。由此可见,鞭毛在细菌的感应环境中扮演了一个重要角色,这对未来探究细菌在极端环境中的生存机制以及为控制冷藏食品中的细菌含量提供重要

数据支持,也为抑制细菌在感应宿主表面进而感染宿主提供了理论基础。

3 总结与展望

随着显微镜观测技术的进步,鞭毛的可视化方法在鞭毛功能研究领域得到了广泛应用,助力揭示其许多未知功能和作用。例如:(1) 微观尺度上的动态观察。研究者利用先进的图像识别技术和高效数据采集方法,在纳米尺度和毫秒量级维度上观察鞭毛在运动过程中的状态变化。这种技术使研究人员能够实时捕捉鞭毛的动态行为,从而深入了解其运动机制。(2) 自然条件下的鞭毛特性测量。在可视化方法的基础上,在自然条件下测量鞭毛的长度、数量、位置和力的物理量,通过计算机构建其运动模型,探究其在不同条件(温度、黏度、pH等)下的运动状态。(3) 鞭毛运动模式的发现。鞭毛在游泳运动的过程中的状态已经被详细地描述,但随着鞭毛可视化和显微追踪技术的发展,鞭毛新的运动模式被发现^[21],未来有望结合技术的发展对鞭毛在运动过程中的作用进行更加详细的叙述。(4) 生长、分裂、群集运动和生物被膜形成的观察。通过微流控技术和显微追踪技术,在短时间和有限空间内,更加详细地观察鞭毛在生长分裂、群集运动和生物被膜的形成过程中的具体作用,这有助于深入了解鞭毛在这些过程中的功能和机制。(5) 免疫佐剂的应用前景与挑战。鞭毛在免疫佐剂方面具有广阔的应用前景,但仍存在许多关键问题尚未解决,包括可能的副作用等。未来的研究需要解决这些问题,以实现其在免疫佐剂领域的广泛应用。(6) 作为药物靶点。鉴于鞭毛在细菌黏附、定殖和侵袭宿主过程中的重要作用,开发遏制细菌感染的药物成为可能。这为防治细菌感染以及与抗生素联合解决耐药问题提供了新的策略。

(7) 环境感应机制的相关研究。鞭毛对感应环境有着重要的作用,这为深入了解细菌适应环境并进行生长分化,探究抑制病菌侵染宿主的方法提供了方向。

通过对鞭毛的长期研究,研究人员对鞭毛的形态结构和不同领域的功能有了更加清晰的认识,但荧光对细菌的抑制、鞭毛的定殖感染、疫苗的制备等未知的领域仍需更加深入地研究。随着新技术方法的不断开发及研究人员的不懈努力,有望发现鞭毛更多的功能,并在生物防治、医学和化工等领域实现应用。

REFERENCES

- [1] WADHWA N, BERG HC. Bacterial motility: machinery and mechanisms[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2022, 20(3): 161-173.
- [2] SHIBATA S, TAHARA YO, KATAYAMA E, KAWAMOTO A, KATO T, ZHU YT, NAKANE D, NAMBA K, MIYATA M, MCBRIDE MJ, NAKAYAMA K. Filamentous structures in the cell envelope are associated with bacteroidetes gliding machinery[J]. *Communications Biology*, 2023, 6(1): 94.
- [3] CORRAL J, SEBASTIÀ P, COLL NS, BARBÉ J, ARANDA J, VALLS M. Twitching and swimming motility play a role in *Ralstonia solanacearum* pathogenicity[J]. *mSphere*, 2020, 5(2): e00740-19.
- [4] MORIMOTO YV, MINAMINO T. Architecture and assembly of the bacterial flagellar motor complex[J]. *Sub-Cellular Biochemistry*, 2021, 96: 297-321.
- [5] MORIMOTO YV, MINAMINO T. Structure and function of the bi-directional bacterial flagellar motor[J]. *Biomolecules*, 2014, 4(1): 217-234.
- [6] MACNAB RM. How bacteria assemble flagella[J]. *Annual Review of Microbiology*, 2003, 57: 77-100.
- [7] KINOSITA Y, SOWA Y. Flagellar polymorphism-dependent bacterial swimming motility in a structured environment[J]. *Biophysics and Physicobiology*, 2023, 20(2): e200024.
- [8] SONG WS, CHO SY, HONG HJ, PARK SC, YOON SI. Self-oligomerizing structure of the flagellar cap protein FliD and its implication in filament assembly[J]. *Journal of Molecular Biology*, 2017, 429(6): 847-857.
- [9] YAMAGUCHI T, MAKINO F, MIYATA T, MINAMINO T, KATO T, NAMBA K. Structure of the molecular bushing of the bacterial flagellar motor[J]. *Nature Communications*, 2021, 12: 4469.
- [10] MINAMINO T, KINOSHITA M. Structure, assembly, and function of flagella responsible for bacterial

- locomotion[J]. *EcoSal Plus*, 2023, 11(1): eesp00112023.
- [11] CHEN CL, CUI S, GUAN JT, SU YY, LIANG XC, TIAN Y, XIE H. Investigation of the role of a zinc uptake regulator (Zur) in the virulence of *Pectobacterium odoriferum*[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2023, 24(12): 9991.
- [12] BENCHIMOL M, GADELHA AP, DE SOUZA W. Ultrastructural alterations of the human pathogen *Giardia intestinalis* after drug treatment[J]. *Pathogens*, 2023, 12(6): 810.
- [13] TURNER L, ZHANG RJ, DARNTON NC, BERG HC. Visualization of flagella during bacterial swarming[J]. *Journal of Bacteriology*, 2010, 192(13): 3259-3267.
- [14] TIAN MJ, WU ZY, ZHANG RJ, YUAN JH. A new mode of swimming in singly flagellated *Pseudomonas aeruginosa*[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2022, 119(14): e2120508119.
- [15] 李任峰, 何启盖, 周锐, 陈焕春. 细菌鞭毛研究概况及进展[J]. *微生物学通报*, 2005, 32(6): 124-127.
LI RF, HE QG, ZHOU R, CHEN HC. The research advances on the bacterial flagella[J]. *Microbiology China*, 2005, 32(6): 124-127 (in Chinese).
- [16] BUI KH, ISHIKAWA T. 3D structural analysis of flagella/cilia by cryo-electron tomography[J]. *Methods in Enzymology*, 2013, 524: 305-323.
- [17] OIKONOMOU CM, JENSEN GJ. Cellular electron cryotomography: toward structural biology *in situ*[J]. *Annual Review of Biochemistry*, 2017, 86: 873-896.
- [18] MACNAB RM, ORNSTON MK. Normal-to-curly flagellar transitions and their role in bacterial tumbling. Stabilization of an alternative quaternary structure by mechanical force[J]. *Journal of Molecular Biology*, 1977, 112(1): 1-30.
- [19] MACNAB R, JR KOSHLAND DE. Bacterial motility and chemotaxis: light-induced tumbling response and visualization of individual flagella[J]. *Journal of Molecular Biology*, 1974, 84(3): 399-406.
- [20] BLOCK SM, FAHRNER KA, BERG HC. Visualization of bacterial flagella by video-enhanced light microscopy[J]. *Journal of Bacteriology*, 1991, 173(2): 933-936.
- [21] TURNER L, RYU WS, BERG HC. Real-time imaging of fluorescent flagellar filaments[J]. *Journal of Bacteriology*, 2000, 182(10): 2793-2801.
- [22] TĂTULEA-CODREAN M, LAUGA E. Geometrical constraints on the tangling of bacterial flagellar filaments[J]. *Scientific Reports*, 2020, 10(1): 8406.
- [23] THORMANN KM, BETA C, KÜHN MJ. Wrapped up: the motility of polarly flagellated bacteria[J]. *Annual Review of Microbiology*, 2022, 76: 349-367.
- [24] MINAMINO T, IMADA K. The bacterial flagellar motor and its structural diversity[J]. *Trends in Microbiology*, 2015, 23(5): 267-274.
- [25] KAMDAR S, GHOSH D, LEE W, TĂTULEA-CODREAN M, KIM Y, GHOSH S, KIM Y, CHEEPURU T, LAUGA E, LIM S, CHENG X. Multiflagellarity leads to the size-independent swimming speed of peritrichous bacteria[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2023, 120(48): e2310952120.
- [26] KARMAKAR R, NAAZ F, TIRUMKUDULU MS, VENKATESH KV. *Escherichia coli* modulates its motor speed on sensing an attractant[J]. *Archives of Microbiology*, 2016, 198(8): 827-833.
- [27] XIE L, ALTINDAL T, CHATTOPADHYAY S, WU XL. From the cover: bacterial flagellum as a propeller and as a rudder for efficient chemotaxis[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2011, 108(6): 2246-2251.
- [28] SON K, GUASTO JS, STOCKER R. Bacteria can exploit a flagellar buckling instability to change direction[J]. *Nature Physics*, 2013, 9: 494-498.
- [29] CAI QX, LI ZJ, OUYANG Q, LUO CX, GORDON VD. Singly flagellated *Pseudomonas aeruginosa* chemotaxes efficiently by unbiased motor regulation[J]. *mBio*, 2016, 7(2): e00013.
- [30] QIAN C, WONG CC, SWARUP S, CHIAM KH. Bacterial tethering analysis reveals a “run-reverse-turn” mechanism for *Pseudomonas* species motility[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2013, 79(15): 4734-4743.
- [31] SWIECICKI JM, SLIUSARENKO O, WEIBEL DB. From swimming to swarming: *Escherichia coli* cell motility in two-dimensions[J]. *Integrative Biology*, 2013, 5(12): 1490-1494.
- [32] JAQUES S, MCCARTER LL. Three new regulators of swarming in *Vibrio parahaemolyticus*[J]. *Journal of Bacteriology*, 2006, 188(7): 2625-2635.
- [33] KILMURY SLN, BURROWS LL. The *Pseudomonas aeruginosa* PilSR two-component system regulates both twitching and swimming motilities[J]. *mBio*, 2018, 9(4): e01310-18.
- [34] MADUKOMA CS, LIANG PX, DIMKOVIKJ A, CHEN JX, LEE SW, CHEN DZ, SHROUT JD. Single cells exhibit differing behavioral phases during early stages of *Pseudomonas aeruginosa* swarming[J]. *Journal of Bacteriology*, 2019, 201(19): e00184-19.
- [35] DEFORET M, van DITMARSCH D, CARMONA-FONTAINE C, XAVIER JB. Hyperswarming adaptations in a bacterium improve collective motility without enhancing single cell motility[J]. *Soft Matter*, 2014, 10(14): 2405-2413.
- [36] JONES BV, YOUNG R, MAHENTHIRALINGAM E, STICKLER DJ. Ultrastructure of *Proteus mirabilis* swarmer cell rafts and role of swarming in catheter-associated urinary tract infection[J]. *Infection and Immunity*, 2004, 72(7): 3941-3950.
- [37] KRAJNC M, FEI CY, KOŠMRLJ A, KALIN M, STOPAR D. Mechanical constraints to unbound expansion of *B. subtilis* on semi-solid surfaces[J]. *Microbiology Spectrum*, 2024, 12(1): e0274023.

- [38] KASALLIS S, BRU JL, CHANG R, ZHUO Q, SIRYAPORN A. Understanding how bacterial collectives organize on surfaces by tracking surfactant flow[J]. *Current Opinion in Solid State & Materials Science*, 2023, 27(3): 101080.
- [39] BRU JL, KASALLIS SJ, ZHUO Q, HØYLAND-KROGHSBO NM, SIRYAPORN A. Swarming of *P. aeruginosa*: through the lens of biophysics[J]. *Biophysics Reviews*, 2023, 4(3): 031305.
- [40] SAMPEDRO I, PARALES RE, KRELL T, HILL JE. *Pseudomonas* chemotaxis[J]. *FEMS Microbiology Reviews*, 2015, 39(1): 17-46.
- [41] MUOK AR, BRIEGEL A, CRANE BR. Regulation of the chemotaxis histidine kinase CheA: a structural perspective[J]. *Biochimica et Biophysica Acta Biomembranes*, 2020, 1862(1): 183030.
- [42] FLACK CE, PARKINSON JS. Structural signatures of *Escherichia coli* chemoreceptor signaling states revealed by cellular crosslinking[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2022, 119(28): e2204161119.
- [43] HANZEL J, HARMS H, WICK LY. Bacterial chemotaxis along vapor-phase gradients of naphthalene[J]. *Environmental Science & Technology*, 2010, 44(24): 9304-9310.
- [44] KARMAKAR R. State of the art of bacterial chemotaxis[J]. *Journal of Basic Microbiology*, 2021, 61(5): 366-379.
- [45] HATHROUBI S, ZEREBINSKI J, OTTEMANN KM. *Helicobacter pylori* biofilm involves a multigene stress-biased response, including a structural role for flagella[J]. *mBio*, 2018, 9(5): e01973-18.
- [46] ERHARDT M, NAMBA K, HUGHES KT. Bacterial nanomachines: the flagellum and type III injectisome[J]. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2010, 2(11): a000299.
- [47] CHO SY, NA HW, OH HB, KWAK YM, SONG WS, PARK SC, JEON WJ, CHO H, OH BC, PARK J, KANG SG, LEE GS, YOON SI. Structural basis of flagellar motility regulation by the MogR repressor and the GmaR antirepressor in *Listeria monocytogenes*[J].
- [48] ISLAM T, PENG CS, ALI I. Morphological and cellular diversity of magnetotactic bacteria: a review[J]. *Journal of Basic Microbiology*, 2018, 58(5): 378-389.
- [49] MAKI-YONEKURA S, YONEKURA K, NAMBA K. Conformational change of flagellin for polymorphic supercoiling of the flagellar filament[J]. *Nature Structural & Molecular Biology*, 2010, 17: 417-422.
- [50] RAMOS HC, RUMBO M, SIRARD JC. Bacterial flagellins: mediators of pathogenicity and host immune responses in mucosa[J]. *Trends in Microbiology*, 2004, 12(11): 509-517.
- [51] YONEKURA K, MAKI-YONEKURA S, NAMBA K. Complete atomic model of the bacterial flagellar filament by electron cryomicroscopy[J]. *Nature*, 2003, 424(6949): 643-650.
- [52] WEI L, QIAN W, FANG ZX, MEI GD, FENG ZW, HUI YC. Evaluation of the diagnostic value of FliD, a *Helicobacter pylori* flagellar protein[J]. *Japanese Journal of Infectious Diseases*, 2022, 75(5): 454-460.
- [53] SCHWENK V, DIETRICH R, KLINGL A, MÄRTLBAUER E, JESSBERGER N. Characterization of strain-specific *Bacillus cereus* swimming motility and flagella by means of specific antibodies[J]. *PLoS One*, 2022, 17(3): e0265425.
- [54] HONKO AN, MIZEL SB. Effects of flagellin on innate and adaptive immunity[J]. *Immunologic Research*, 2005, 33(1): 83-101.
- [55] CAO Y, ZHANG EJ, YANG JY, YANG Y, YU J, XIAO Y, LI W, ZHOU DH, LI YM, ZHAO BL, YAN H, LU MJ, ZHONG MH, YAN HM. Frontline Science: nasal epithelial GM-CSF contributes to TLR5-mediated modulation of airway dendritic cells and subsequent IgA response[J]. *Journal of Leukocyte Biology*, 2017, 102(3): 575-587.
- [56] HASSAN R, EL-NAGGAR W, ABD EL-AZIZ AM, SHAABAN M, KENAWY HI, ALI YM. Immunization with outer membrane proteins (OprF and OprI) and flagellin B protects mice from pulmonary infection with mucoid and nonmucoid *Pseudomonas aeruginosa*[J]. *Journal of Microbiology, Immunology, and Infection*, 2018, 51(3): 312-320.
- [57] ZAREI M, MOSAYEBI G, KHANSARINEJAD B, ABTAHI H. Antigenic and immunogenic evaluation of *Helicobacter pylori* FlaA epitopes[J]. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 2017, 20(8): 920-926.
- [58] 郭志燕, 周明旭, 段强德, 朱国强. 细菌鞭毛的致病性及其免疫学应用的研究进展[J]. *微生物学报*, 2014, 54(3): 251-260.
- [59] GUO ZY, ZHOU MX, DUAN QD, ZHU GQ. Advance on the pathogenicity and immunological application of bacterial flagella: a review[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2014, 54(3): 251-260 (in Chinese).
- [60] SHARMA P, LEVY O, DOWLING DJ. The TLR5 agonist flagellin shapes phenotypical and functional activation of lung mucosal antigen presenting cells in neonatal mice[J]. *Frontiers in Immunology*, 2020, 11: 171.
- [61] CHUEKWON K, CHU CY, CHENG LT. N-terminus of flagellin enhances vaccine efficacy against *Actinobacillus pleuropneumoniae*[J]. *BMC Veterinary Research*, 2022, 18(1): 279.
- [62] ZHAO YW, LI ZF, VOYER J, LI YB, CHEN XY. Flagellin/virus-like particle hybrid platform with high immunogenicity, safety, and versatility for vaccine development[J]. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2022, 14(19): 21872-21885.
- [63] TANAKA R, IMAI J, TSUGAWA H, EAP KB, YAZAWA M, KANEKO M, OHNO M, SUGIHARA K, KITAMOTO S, NAGAO-KITAMOTO H, BARNICH N, MATSUSHIMA M, SUZUKI T, KAGAWA T, NISHIZAKI Y, SUZUKI H, KAMADA N, HOZUMI K. Adherent-invasive *E. coli* - induced specific IgA limits pathobiont localization to the epithelial niche in the

- gut[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2023, 14: 1031997.
- [63] TANAKA R, IMAI J, SUGIYAMA E, TSUBAKI S, HOZUMI K, TSUGAWA H. Cyclic-di-AMP confers an invasive phenotype on *Escherichia coli* through elongation of flagellin filaments[J]. *Gut Pathogens*, 2024, 16(1): 6.
- [64] YE YW, ZHANG XY, ZHANG MF, LING N, ZENG HY, GAO JN, JIAO R, WU QP, ZHANG JM. Potential factors involved in virulence of *Cronobacter sakazakii* isolates by comparative transcriptome analysis[J]. *Journal of Dairy Science*, 2017, 100(11): 8826-8837.
- [65] COSTERTON JW, STEWART PS, GREENBERG EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections[J]. *Science*, 1999, 284(5418): 1318-1322.
- [66] DAYTON H, KISS J, WEI M, CHAUHAN S, LAMARRE E, CORNELL WC, MORGAN CJ, JANAKIRAMAN A, MIN W, TOMER R, PRICE-WHELAN A, NIRODY JA, DIETRICH LEP. Cellular arrangement impacts metabolic activity and antibiotic tolerance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms[J]. *PLoS Biology*, 2024, 22(2): e3002205.
- [67] RÖMLING U, GOMELSKY M, GALPERIN MY. C-di-GMP: the dawning of a novel bacterial signalling system[J]. *Molecular Microbiology*, 2005, 57(3): 629-639.
- [68] KUCHMA SL, DELALEZ NJ, FILKINS LM, SNAVELY EA, ARMITAGE JP, O'TOOLE GA. Cyclic di-GMP-mediated repression of swarming motility by *Pseudomonas aeruginosa* PA14 requires the MotAB stator[J]. *Journal of Bacteriology*, 2015, 197(3): 420-430.
- [69] MERRITT JH, BROTHERS KM, KUCHMA SL, O'TOOLE GA. SadC reciprocally influences biofilm formation and swarming motility via modulation of exopolysaccharide production and flagellar function[J]. *Journal of Bacteriology*, 2007, 189(22): 8154-8164.
- [70] BAKER AE, WEBSTER SS, DIEPOLD A, KUCHMA SL, BORDELEAU E, ARMITAGE JP, O'TOOLE GA. Flagellar stators stimulate c-di-GMP production by *Pseudomonas aeruginosa*[J]. *Journal of Bacteriology*, 2019, 201(18): e00741-18.
- [71] DENG WY, MARSHALL NC, ROWLAND JL, MCCOY JM, WORRALL LJ, SANTOS AS, STRYNADKA NCJ, FINLAY BB. Assembly, structure, function and regulation of type III secretion systems[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2017, 15(6): 323-337.
- [72] SINGER HM, ERHARDT M, STEINER AM, ZHANG MM, YOSHIKAMI D, BULAJ G, OLIVERA BM, HUGHES KT. Selective purification of recombinant neuroactive peptides using the flagellar type III secretion system[J]. *mBio*, 2012, 3(3): e00115-12.
- [73] KONKEL ME, KLENA JD, RIVERA-AMILL V, MONTEVILLE MR, BISWAS D, RAPHAEL B, MICKELSON J. Secretion of virulence proteins from *Campylobacter jejuni* is dependent on a functional flagellar export apparatus[J]. *Journal of Bacteriology*, 2004, 186(11): 3296-3303.
- [74] PARK J, EOM GT, OH JY, PARK JH, KIM SC, SONG JK, AHN JH. High-level production of bacteriotoxic phospholipase A1 in bacterial host *Pseudomonas fluorescens* via ABC transporter-mediated secretion and inducible expression[J]. *Microorganisms*, 2020, 8(2): 239.
- [75] ZHUANG XY, TSENG CK, LO CJ. Live-cell imaging of the assembly and ejection processes of the bacterial flagella by fluorescence microscopy[J]. *Methods in Molecular Biology*, 2023, 2646: 35-42.
- [76] BAZYLINSKI DA, LEFÈVRE CT. Magnetotactic bacteria from extreme environments[J]. *Life*, 2013, 3(2): 295-307.
- [77] DIAS LM, FOLADOR ARC, OLIVEIRA AM, RAMOS RTJ, SILVA A, BARAÚNA RA. Genomic architecture of the two cold-adapted genera *Exiguobacterium* and *Psychrobacter*: evidence of functional reduction in the *Exiguobacterium antarcticum* B7 genome[J]. *Genome Biology and Evolution*, 2018, 10(3): 731-741.
- [78] MATTILA M, LINDSTRÖM M, SOMERVUO P, MARKKULA A, KORKEALA H. Role of *flhA* and *motA* in growth of *Listeria monocytogenes* at low temperatures[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2011, 148(3): 177-183.
- [79] WANG FP, WANG JB, JIAN HH, ZHANG B, LI SK, WANG F, ZENG XW, GAO L, BARTLETT DH, YU J, HU SN, XIAO X. Environmental adaptation: genomic analysis of the piezotolerant and psychrotolerant deep-sea iron reducing bacterium *Shewanella piezotolerans* WP3[J]. *PLoS One*, 2008, 3(4): e1937.
- [80] PARTRIDGE JD, DUFOUR Y, HWANG Y, HARSHEY RM. Flagellar motor remodeling during swarming requires FliL[J]. *Molecular Microbiology*, 2023, 120(5): 670-683.