

文章编号:1673-1689(2009)06-0721-06

乳酸菌 S-层蛋白的多样性及其研究方法

李宗军, 杨秀华, 刘元元, 王远亮, 肖荣

(湖南农业大学 食品科技学院, 湖南 长沙 410128)

摘要: 乳酸菌是人体和许多动物肠道的正常菌群, 在预防肠道感染、促进人体健康方面, 具有不可或缺的作用。乳酸菌通过竞争性黏附来抑制致病菌的繁殖。研究表明, 乳酸菌的黏附作用与细胞表层蛋白密切相关。表层蛋白又名 S-层蛋白 (surface layer protein, Slp), 是许多细菌及古生菌细胞壁表面所包被的生物活性大分子, 在一些乳酸菌中也发现了 S-层蛋白的存在。S-层蛋白的相对分子质量在 40 000~200 000 间, 而在已发现的乳酸菌中, S-层蛋白相对分子质量在 25 000~70 000 间。作者讨论了乳酸菌中 S-层蛋白的多样性及主要特性, 对乳酸菌 S-层蛋白的研究方法进行了初步探索。

关键词: 乳酸细菌; S-层蛋白; 黏附

中图分类号: Q 51

文献标识码: A

Heterogeneity of Putative Surface Layer Proteins in *Lactobacilli* and Its Research Methods

LI Zong-jun, YANG Xiu-hua, LIU Yuan-yuan, WANG Yuan-liang, XIAO Rong

(College of Food Science and Technology, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China)

Abstract: *Lactobacilli*, an important intestinal microbiota in human and animals, plays dominant role on the maintaining of gastrointestinal tract (GIT) stability and the intestinal health. The cell surface layer protein (S-layers, slp) was considered to be exhibited important role on the competitively inhibit pathogens. In this manuscript, the distribution, characters and the study methods were reviewed and introduced.

Key words: lactic acid bacteria, surface layer protein, adhesion

乳酸菌是人体和许多动物肠道的正常菌群, 在预防肠道感染、促进人体健康方面, 具有不可或缺的作用。在西方国家中, 有 76% 的内科医生认为, 益生性乳酸菌在疾病治疗中占有重要地位^[1]。哥伦比亚的一项人体试验表明, 每天用 2.5×10^8 cfu 活性嗜酸乳杆菌及 2.5×10^8 cfu 双歧杆菌喂养过的

1237 名新生儿, 比对照组 1282 名患病新生儿因坏死性小肠结肠炎引起的死亡率要低 60%^[2]。Gregor Reid 等^[1]研究了大量临床试验结果, 表明乳酸菌在预防和治疗因肠道致病菌引起的疾病方面具有显著效果。

一般认为, 乳酸菌抑制致病菌的重要机制为竞

收稿日期: 2009-02-16

基金项目: 国家 863 计划项目 (2007AA10Z347)。

作者简介: 李宗军 (1968-), 男, 湖南益阳人, 工学博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事食品微生物与生物技术方面的研究。Email: lizongjun@yahoo.com.cn

竞争性抑制致病菌受体结合位点,因为黏附到小肠上皮细胞,是致病菌感染的重要环节,通过竞争性黏附来抑制致病菌在人体肠道中的定殖^[3]。影响乳酸菌与宿主组织黏附作用的主要因素有:细胞表面疏水性和自动聚集性,脂磷壁酸以及 S-层蛋白^[4]等。目前已在许多乳酸菌中发现了 S-层蛋白, Miiia Jakava-Viljanen^[4]等从猪小肠中分离到一些含 S-层蛋白的乳酸菌,体外试验表明,这些乳酸菌对小肠上皮细胞都有极强的黏附能力。作者从一些不同分离源中找到了含 S-层蛋白的乳酸菌,但未能从婴儿粪便中分离到含 S-层蛋白的乳酸菌。

1 S-层蛋白的结构特点

S-层蛋白(surface layer protein, Slp)是许多细菌及古生菌细胞壁表面所包被的生物活性大分子,其相对分子质量在40 000~200 000之间。绝大多数 S-层蛋白都由单一的蛋白质或糖蛋白组成,罕有由两种或多种蛋白质组成的情况^[5]。S-层蛋白基因的表达及 S-层蛋白合成、分泌能力很强,质量分数占到了细菌总蛋白质的10%~15%^[6-7]。S-层蛋白能够表现出倾斜形(P1, P2),正方形(P4)或是匀称的六边形(P3, P6)等形态,见图1,是在熵驱动下经复杂的过程自我组装而成^[8]。

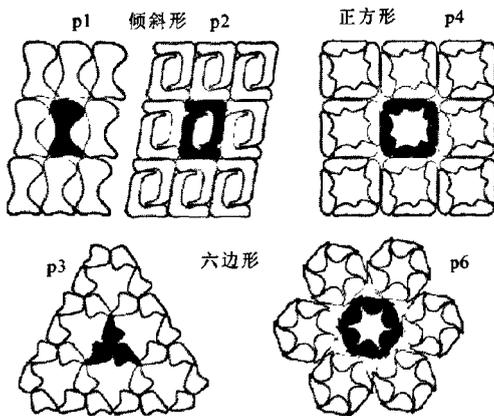


图1 S-层蛋白的形态结构^[9]

Fig. 1 Schematic drawing illustrating the various S-layer lattice types

每种 S-层蛋白都以一种多孔结构形式存在,小孔面积占到网格表面积的70%以上^[4]。S-层蛋白的厚度一般在5~15 nm之间,与细菌内部表层结构相比, S-层蛋白显得更光滑平整^[10]。

S-层蛋白亚基通过非共价键相互连接,并通过非共价键连接到宿主表面,利用变性剂如尿素、盐酸胍、金属螯合剂或通过阳离子置换法等^[11],可将

S-层蛋白降解成单体。而将分离试剂去除后, S-层蛋白亚基又可在固体基质、气液界面、高脂膜、脂质体、悬浮液等中重新聚集成规则的单层膜结构^[12-13]。

高含量的疏水性氨基酸(31.9%~45%^[14])及酸性氨基酸,低等电点,是 S-层蛋白的典型特征^[7]。几乎所有的原核 S-层蛋白都含有一段由25~30个氨基酸组成的 N-端分泌信号肽(the signal peptide; SP),在目前已发现的乳酸菌中都检测到了该信号肽的存在;嗜酸乳杆菌 ATCC 4356 含有一段由24个氨基酸组成的 SP^[14];瑞士乳杆菌 CNRZ 892 含有一段由30个氨基酸组成的 SP^[15]等等。

从一级结构上看,乳酸菌 S-层蛋白的相似性很低,即使在同种菌之间也不例外^[16],如此一来,不同种的乳酸菌或相同种的不同菌株能够黏附到不同的受体上,以便在同一环境中共存^[17]。

人们对 S-层蛋白的超微结构、生物合成、分子生物学、遗传学,生物学功能的了解还相当有限,一般认为 S-层蛋白是细胞的保护膜,决定着细胞的形状、分子及离子阱、黏附位点等功能^[5-6]。对于一些致病菌来说, S-层蛋白还是毒力因子^[18-20]。

2 乳酸菌 S-层蛋白的多样性

相对于其它细菌而言,目前已发现的含有 S-层蛋白的乳酸菌并不多,主要是:嗜酸乳杆菌(*L. acidophilus*)、瑞士乳杆菌(*L. helveticus*)、短乳杆菌(*Lactobacillus brevis*)、卷曲乳杆菌(*L. crispatus*)等,乳酸菌 S-层蛋白的多样性不仅表现在种间,而且在同种的不同菌株间也有差异,见表1。

从表1不难发现,乳酸菌中含有 S-层蛋白的主要是杆菌,还未发现乳球菌有关于 S-层蛋白的报道,而且作者所在实验室在近几年的研究中也未曾发现含 S-层蛋白的乳球菌。相对于乳球菌而言, S-层蛋白似乎是乳杆菌的专利,而且有的乳杆菌还含有2~3种^[14, 31, 37] S-层蛋白基因。与其他细菌不同的是,乳酸菌的 S-层蛋白等电点相当高,达9.35~10.4。乳酸菌 S-层蛋白的相对分子质量在25 000~70 000之间,是目前所知道的 S-层蛋白中相对分子质量最小的。

不同菌株间 S-层蛋白的多样性可能与其基因表达的环境生态有关, Jakava-Viljanen^[31]等的研究显示, *L. brevis* ATCC14869 在通风条件下 SlpB 和 SlpD 都能表达;在厌氧条件下仅 SlpB 能够表达;而 SlpC 在实验条件下都未检测到表达,这似乎是微生物对不同环境的适应。当然不同的分离方法也会

对 S-层蛋白的量产生影响甚至造成 S-层蛋白的丢失^[39],这也会对结果产生一定影响。不同的培养基也会对 S-层蛋白的性状和功能造成影响,Prisca Schar-Zammaretti^[24]等的研究显示,当大量减少碳

水化合物含量时,嗜酸乳杆菌 NCC2628 S-层蛋白的含量会稍有增加;在没有蛋白胨的培养基中,S-层蛋白的成分也会发生改变,而且 S-层蛋白的表达也与氮源密切相关。

表 1 S-层蛋白在乳酸菌中的分布
Tab. 1 The distribution of S-layers in lactobacillus

菌种	菌株	S-层蛋白相对分子质量	等电点	参考文献
嗜酸乳杆菌	ATCC 4356	SlpA:43 SlpB: 44.9	SlpA: 10. 4 SlpB: 10. 3	[14]
	NCFM	—	—	[21]
	7 株	41~49	—	[22]
	M92	45	—	[23]
	NCC 2628	21. 5~45	—	[24]
瑞士乳杆菌	CNRZ 892	SlpH:48. 4	SlpH:10. 19	[15]
	CNRZ 1269	SlpH:48. 4	—	[15]
	21 株	44. 7~47. 8	—	[16]
	R0052	48	—	[25]
	ATCC 10797	51. 5	—	[26]
	ATCC 521	—	—	[26]
	ATCC 12046	52	—	[27]
	10 株	44~55	—	[28]
短乳杆菌	GRL1	46	—	[29]
	GRL1046	47	—	[29]
	ATCC 8287	46	9. 88	[30]
	ATCC 14869	SlpB: 48 SlpC:46 SlpD: 42	SlpB: 9. 99 SlpC:10. 12 SlpD: 10. 08	[31]
卷曲乳杆菌	ZJ001	42	—	[10]
	JCM 5810	43. 9	—	[32]
<i>L. sobrius</i>	8 株	31~66	—	[4]
食淀粉乳杆菌	LMG 9496	45	—	[33]
鸡乳杆菌	LMG 9435	45	—	[33]
布氏乳杆菌	ATCC 4005	55	—	[34]
干酪乳杆菌	ATCC 7469	—	—	[35]
发酵乳细菌	NCIB 6991	—	—	[36]
	NCTC 7230	51. 5	—	
约氏乳杆菌	5 株	Apf1:25. 4~28. 7	Apf1: 9. 35~9. 72	[37]
		Apf2: 29. 8~32. 4	Apf2: 9. 60~9. 80	
高加索酸奶乳杆菌	CIDCA 8321	66	—	[38]
类高加索酸奶乳杆菌	3 株	66~69	—	[38]

“—”表示无相关数据

除表1中列举的乳酸细菌外,还有一些乳酸菌也含有S-层蛋白,只是未曾报道,其编码基因收录在GeneBank中,如卷曲乳杆菌(编号AF253043, AF253044, AB110091, AB110090, AJ007839),瑞士乳杆菌(编号AB061776, AB061775, AJ388561, AJ388560, AJ388559, AJ388558, X92752, AJ388564, AJ388563, AJ388562),嗜酸乳杆菌(编号AF250229)等。在分析了GeneBank中收录的乳酸菌S-层蛋白基因后发现,不同乳酸菌间S-层蛋白的基因相似性很低,基因相似性仅存在于同种乳酸菌间。正是依赖这一特性, M. Ventura^[29]等利用PCR技术或探针技术发展了一种瑞士乳杆菌的快速鉴定法。

3 乳酸菌S-层蛋白的研究方法

3.1 超微结构研究技术

电子显微镜和图像分析技术已广泛应用于S-层蛋白的结构分析,以获得纳米尺度结构信息。这些超微结构研究表明,目前已知的所有S-层蛋白都有一个相同的特点,即以二维空间结构形式存在^[40-41];通过电子显微镜我们还可以判断某种S-层蛋白的晶格类型。用于S-层蛋白的超微结构研究的电镜技术有:薄切片技术、冷冻蚀刻技术、负染色技术、阴影投射技术、冷冻干燥技术等。其中研究乳酸菌S-层蛋白最常用的是负染色技术,薄切片技术,冷冻蚀刻技术等。此外, Vidgren, G.^[30]等在研究短乳杆菌SlpA以及 Callegari, M. L.^[42]等在瑞士乳杆菌SlpH时,用到了免疫金标记技术。但是这些技术方法也存在一些不足之处,比如说在用负染色进行处理时,需将细胞破坏、分离具自动聚集能力的S-层蛋白,因为未经处理的细胞会产生很强的背景颜色,而不利于观察。为了解决这一问题, Silja Ávall-Jaaskelainen等^[29]在研究短乳杆菌时用到了冷冻蚀刻技术以及薄切片技术。但是这些技术处理又会使细胞壁原本无序的结构(比如说聚合物)变得有层理,从而对结果产生影响。

3.2 黏附作用研究技术

细胞培养和显微镜技术是常用的研究手段,特别是随着技术的发展,应用原子力显微镜研究S-层蛋白变得越来越普遍^[6,43]。应用原子力显微镜与应用电子显微镜研究S-层蛋白有许多相似之处:一是都能够用于观察黏附实验及观察黏附能力的大小;

二是都能够用于晶格类型分析;三是都能够观察到S-层蛋白的表面形貌等。与电子显微镜相比,原子力显微镜还有些独特的优点:能够以力的形式直观地反应S-层蛋白与基质间黏附力的大小,而不用像电镜那样需要借助小肠上皮细胞;而且原子力显微镜对样品的破坏几乎可以忽略不计。但是利用原子力显微镜研究S-层蛋白,对针尖的要求较高,处理较复杂。Kathene C. Johnson-Henry等^[25]在研究瑞士乳杆菌S-层蛋白对大肠杆菌O157的抑制效果时,用到了相衬显微镜以及荧光显微镜,两者联用使对抑菌效果的观察变得非常简便和直观。

3.3 基于S-层蛋白的表面展示技术

基于S-层蛋白的表面展示技术,国外的研究较深入,也取得了很多的成果。Magdalena Pleschberger等^[44]将重链骆驼抗体可变区(cAb-Lys3)融入球形芽孢杆菌CCM 2177 S-层蛋白中,原子力显微镜观察显示,融合后的球形芽孢杆菌S-层蛋白,其自动聚集性、晶格类型等性质均未发生变化。华中农业大学的农业微生物学国家重点实验室在这方面也有较深入的研究,利用苏云金芽孢杆菌S-层蛋白CTC作为表面展示载体,将多聚组氨酸^[45]、淀粉酶和金属硫蛋白^[46]以及禽流感病毒NP蛋白^[47]等展示在细胞表面,均取得了不错的效果。

基于乳酸菌S-层蛋白的表面展示技术,最有代表性的当属 Silja等^[29]的抗原表层展示研究;利用质粒pKTH5006、pKTH5007、pKTH5008、pKTH5063以及pKTH5074等将脊髓灰质炎病毒VP1和人c-myc原癌基因融入短乳杆菌S-层蛋白中并展示在细胞表面。酶法、免疫荧光及Southern杂交等显示两抗原均融入了短乳杆菌S-层蛋白中。如何构建一株稳定的乳酸菌S-层蛋白变异株,一直困扰着乳酸菌S-层蛋白在生物技术领域的应用研究;而Silja的研究很好地解决了这一问题,使乳酸菌S-层蛋白在抗原抗体的表面展示方面取得了突破性进展。

4 结 语

乳酸菌S-层蛋白由于其独特的性质(如自动聚集性、黏附性以及耐酶的作用)而受到越来越多的重视,也取得了一些成果,如黏附性的转移^[48]、抗原抗体的表达^[29]以及酶的固定^[46]等。目前作者所在实验室已成功分离出几株产S-层蛋白的乳酸菌,其

性状的研究工作也正在进行中。

参考文献(References):

- [1] Reid G, JASS J, Sebulyky T, et al. Potential uses of probiotics in clinical practice[J]. **Clinical Microbiology Reviews**, 2003,16(4):658—672.
- [2] Hoyos A B. Reduced incidence of necrotizing enterocolitis associated with enteral administration of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium infantis* to neonates in an intensive care unit[J]. **Int J Infect Dis**, 1999,3:197—202.
- [3] Finlay B B, Caparon M. Bacterial adherence to cell surfaces and extracellular matrix[J]. **Cellular Microbiology**, 2005,105—120.
- [4] Miiia J V, Airi P. Isolation of surface (S) layer protein carrying *Lactobacillus* species from porcine intestine and faeces and characterization of their adhesion properties to different host tissues[J]. **Sci**, 2007,3672:1—10.
- [5] Sara M, Sleytri U B. S-layer proteins[J]. **Bacteriol**, 2000,182:859—868.
- [6] Jos L, Rumen K, Vera B, et al. Recrystallization of bacterial S-Layers on flat polyelectrolyte surfaces and hollow polyelectrolyte capsules[J]. **Formation of Biomimetic Surfaces**, 2005, 1(3): 339—348.
- [7] Sleytr U B, Beveridge T J. Bacterial S-layers[J]. **Trends Microbiol**, 1999,7:253—260.
- [8] Sleytr U B. Basic and applied S-layer research; an overview[J]. **FEMS Microbiol Rev**, 1997,20: 5—12.
- [9] Uwe B, Eva M E, Nicola I, et al. S-Layers as a basic building block in a molecular construction kit[J]. **FEBS**, 2007,274: 323—334.
- [10] Chen X Y, Xu J J, Shuai J B, et al. The S-layer proteins of *Lactobacillus crispatus* strain ZJ001 is responsible for competitive exclusion against *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella typhimurium*[J]. **International Journal of Food Microbiology**, 2007,115:307—312.
- [11] Sijia A, Airi P. Lactobacillus surface layers and their applications[J]. **FEMS Microbiol**, 2005,29:511—529.
- [12] Messner P, Sleytr U B. Crystalline bacterial cell surface layers[J]. **Adv Microbial Physiol**, 1992,33:213—275.
- [13] Sleytr U B, Sara M, Pum D, et al. Characterization and use of crystalline bacterial cell surface layers[J]. **Sci**, 2001,68: 231—278.
- [14] Hein J B, Carin P A M K, Johannes M, et al. S-Layer protein of *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356: purification, expression in *Escherichia coli*, and nucleotide sequence of the corresponding gene[J]. **Bacteriology**, 1993,175(19):6089—6096.
- [15] Tenance J B, Peter H P, Margit S, et al. V. Functions of S-layers[J]. **FEMS Microbiology Reviews**, 1997,20:99—149.
- [16] Monica G, Lia R, Maria E F, et al. Heterogeneity of putative surface layer proteins in *Lactobacillus helveticus*[J]. **AEM**, 2005,71(11):7582—7588.
- [17] Hagen K E, Guan L L, Tannock G W, et al. Detection, characterization, and in vitro and in vivo expression of genes encoding S-proteins in *Lactobacillus gallinarum* strains isolated from chicken crops[J]. **AEM**, 2005,71 (11):6633—6643.
- [18] Blaser M J, Pei Z. Pathogenesis of *Campylobacter fetus* infections; critical role of high-molecular-weight S-layer proteins in virulence[J]. **Infect Dis**, 1993,167:372—377.
- [19] Ishiguro E E, Kay W W, Ainsworth T, et al. Loss of virulence during culture of *Aeromonas salmonicida* at high temperature[J]. **J Bacteriol**, 1981, 148: 333—340.
- [20] Sabet M, Lee S W, Nauman R K, et al. The surface (S-) layer is a virulence factor of *Bacteroides forsythus*[J]. **Microbiology**, 2003,149:3617—3627.
- [21] Logan Buck B, Altermann E, Svingerudet T, et al. Functional analysis of putative adhesion factors in *Lactobacillus acidophilus* NCFM[J]. **AEM**, 2005, 71(12):8344—8351.
- [22] Masuda K. Heterogeneity of S-layer proteins of *Lactobacillus acidophilus* strains[J]. **Microbiol Immunol**, 1992, 36:297—301.
- [23] Kos B, Suskovic J, Vukovic S, et al. Adhesion and aggregation ability of probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* M92 [J]. **AEM**, 2003,94:981—987.
- [24] Prisca S Z, Dillmann M L, Nicola D A, et al. Influence of fermentation medium composition on physicochemical surface properties of *Lactobacillus acidophilus*[J]. **AEM**, 2005,71(12):8165—8173.
- [25] Kathene C J H, Karen E H, Mahsa G, et al. Surface-layer protein extracts from *Lactobacillus helveticus* inhibit enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 adhesion to epithelial cells[J]. **Cellular Microbiology**, 2007,9(2):356—367.
- [26] Masuda K, Kawata T. Distribution and chemical characterization of regular arrays in the cell walls of strains of the genus *Lactobacillus*[J]. **FEMS Microbiol**, 1983, 20:145—150.
- [27] Lortal S, Heijenoort J, Gruber K, et al. S-layer of *Lactobacillus helveticus* ATCC 12046: isolation, chemical character-

- ization and re-formation after extraction with lithium chloride[J]. *J Gen Microbiol*, 1992,138: 611-618.
- [28] Ventura M, Callegari M L, Morelli L. S-layer gene as a molecular marker for identification of *Lactobacillus helveticus* [J]. *FEMS Microbiology*, 2000,189:275-279.
- [29] Silja A J, Kari K N, Minna K, et al. Surface display of foreign epitopes on the *Lactobacillus brevis* S-Layer[J]. *AEM*, 2002,68(12):5943-5951.
- [30] Vidgren G, Palva I, Pakkanen R, et al. S-layer protein gene of *Lactobacillus brevis*: cloning by polymerase chain reaction and determination of the nucleotide sequence[J]. *J Bacteriol*, 1992,174: 7419-7427.
- [31] Jakava-Vijanen M, Avall-Jaaskelainen S, Messner S, et al. Isolation of three new surface (S-) layer protein genes (slp) from *Lactobacillus brevis* ATCC 14869 and characterization of the change in their expression under aerated and anaerobic conditions[J]. *J Bacteriol*, 2002,184: 6786-6795.
- [32] Sillanpää J, Martinez B, Antikainen J, et al. Characterization of the collagen-binding S-layer protein CbsA of *Lactobacillus crispatus* [J]. *J Bacteriol*, 2000,182: 6440-6450.
- [33] Boot H J, Kolen C P A M, Pot B, et al. The presence of two S-layer protein-encoding genes is conserved among species related to *Lactobacillus acidophilus* [J]. *Microbiology*, 1996,142: 2375-2384.
- [34] Masuda K, Kawata T. Characterization of a regular array in the wall of *Lactobacillus buchneri* and its reattachment to the other wall components[J]. *J Gen Microbiol*, 1981, 124: 81-90.
- [35] Barker D C, Thome K J I. Spheroplasts of *Lactobacillus casei* and the cellular distribution of bactoprenin[J]. *J Cell Sci*, 1970, 7: 755-785.
- [36] Masuda K, Kawata T. Distribution and chemical characterization of regular arrays in the cell walls of strains of the genus *Lactobacillus* [J]. *FEMS Microbiol Lett*, 1983,20:145-150.
- [37] Ventura M, Jankovic I, Walker D C, et al. Identification and characterization of novel surface proteins in *Lactobacillus johnsonii* and *Lactobacillus gasserii* [J]. *AEM*, 2002,68: 6172-6181.
- [38] Garrote G L, Delfederico L, Bibioni R, et al. *Lactobacilli* isolated from kefir: evidence of the presence of S-layer proteins [J]. *J Dairy Res*, 2004,71: 222-230.
- [39] 李振梅,陈莹,安利国等.嗜酸乳杆菌表层蛋白提取方法及影响因素的研究[J].生命科学研究,2007,11(1):44-47.
LI Zhen-mei, CHEN Ying, AN Li-guo. The Improvement for the method to get S-layer protein from *Lactobacillus Acidophilus* ATCC 4356 [J]. *Life Science Research*. 2007,11(1):44-47. (in Chinese)
- [40] Baumeister W, Wildhaber I, Phipps B M. Principles of organization in eubacterial and archaeal surface proteins [J]. *Canad J Microbiol*, 1989,35:215-227.
- [41] Saxton W O, Baumeister W. Principles of organization in S layers [J]. *J Mol Biol*, 1986,158:251-253.
- [42] Callegari M L, Riboli B, Sanders J W, et al. The S-layer gene of *Lactobacillus helveticus* CNRZ 892: cloning, sequence and heterologous expression [J]. *Microbiology*, 1998, 144: 719-726.
- [43] Andreas E, Ferry K, Carina H, et al. Atomic-force-microscopy imaging and molecular-recognition-force microscopy of recrystallized heterotetramers comprising an S-layer-streptavidin fusion protein [J]. *Chem Bio Chem*, 2006,7: 588-591.
- [44] Magdalena P, Angela N, Eva M Egelseer, et al. Generation of a functional monomolecular protein lattice consisting of an S-layer fusion protein comprising the variable domain of a camel heavy chain antibody [J]. *Bioconjugate Chem*, 2003, 14: 440-448.
- [45] 王莉,孙明,喻子牛. 利用S-层蛋白在苏云金芽胞杆菌细胞表面展示多聚组氨酸肽 [J]. 实验生物学报, 2003,36(6):476-481.
WANG Li, SUN Ming, YU Zi-niu. Displaying polyhistidine peptide on the cell surface of *Bacillus thuringiensis* by S-layer protein [J]. *Acta Biologica Experimentalis Sinica*, 2003,36(6):476-481. (in Chinese)
- [46] 吴怀光,刘欣,孙明,等. 利用S-层蛋白在细胞表面展示 α -淀粉酶和金属硫蛋白 [J]. 微生物学报, 2004,44(5):658-663.
WU Huai-guang, LIU Xing, SUN Ming. Cell surface display of α -amylase and metallothionein by using s-layer protein of *Bacillus thuringiensis* [J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2004,44(5):658-663.
- [47] 刘梅,李淑云,赵昌明,等. 利用苏云金芽胞杆菌细胞表面展示系统表达禽流感病毒NP蛋白 [J]. 微生物学报, 2007,47(3):486-491.
LIU Mei, LI Shu-yun, ZHAO Chang-ming, et al. Display of avian influenza virus nucleoprotein on *Bacillus thuringiensis* cell surface [J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2007,47(3):486-491. (in Chinese)
- [48] Avall-Jaaskelainen S, Lindholm A, Palva A. Surface display of the receptor-binding region of the *Lactobacillus brevis* S-layer protein in *Lactococcus lactis* provides nonadhesive lactococci with the ability to adhere to intestinal epithelial cells [J]. *AEM*, 2003,69:2230-2236.

(责任编辑:李春丽)