

## 芽胞杆菌的表层蛋白研究及应用前景

杨玲玲, 胡晓敏, 袁志明\*

中国科学院武汉病毒研究所, 武汉 430071

**摘要:**细菌表层蛋白(surface layer protein, S-层蛋白)是由同种蛋白质或糖蛋白亚基装配而成,广泛分布于各种古生菌和真细菌表面,形成的多孔网状结构。成熟的S-层蛋白一般具有两个功能域——特异性锚定区域和自组装区域。近年来基于芽胞杆菌属几种细菌的S-层蛋白的研究已经成为热点,其在生物传感器、疫苗研制、表面展示、纳米材料、生物治理等方面具有广泛的应用前景。本文就芽胞杆菌S-层蛋白的结构、生化遗传、功能、病原相关性及其在工业和生物学上的应用进行综述。

**关键词:** S-层蛋白, 自组装, 锚定, 芽胞杆菌, 纳米生物技术

中图分类号: Q816 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2011)11-1440-07

长期以来细胞壁一直被认为是绝大多数原核生物细胞最外层的结构,而自从1953年Houwink在螺旋菌属细菌最外层发现了一层排列规则的大分子物质之后<sup>[1]</sup>,科学家们又陆续在其它古细菌和真细菌最外层发现了这种形成规则晶格的单分子层结构,并称之为表层蛋白(S-层蛋白)。迄今已知的存在S-层蛋白的真细菌和古生菌已经达到了400多种<sup>[2]</sup>。

### 1 S-层蛋白的一般特性

从理化性质看,S-层蛋白的分子量在40-200 kDa之间。来源不同的S-层蛋白,其氨基酸组成相似:一般疏水性氨基酸占40%-60%,含有较多酸性氨基酸如谷氨酸、天冬氨酸(15%左右),赖氨酸的含量也相当高可达10%,极少存在含硫氨基酸。约20%的氨基酸构成 $\alpha$ 螺旋,40%形成 $\beta$ 折叠, $\alpha$ 螺旋常常出现在S-层蛋白的N端<sup>[3]</sup>。一般情况下,S-层蛋

白略偏酸性,等电点在4-6,但乳杆菌属(*Lactobacillus*)和炽热甲烷嗜热菌(*Methanothermus fervidus*)的S-层蛋白的等电点可达8-10。

从结构上看,由同种蛋白质或糖蛋白亚基装配而成的S-层蛋白会形成网孔结构,厚度5-20 nm,但在古细菌中可达70 nm,借助电镜技术可清晰的观察到它的存在。根据组成的亚基单元不同,S-层蛋白可以形成斜方形(P1, P2)、正方形(P4)或者六边形(P3, P6)对称的晶格结构(图1)<sup>[4]</sup>。S-层蛋白的网孔大小和形状非常均一,孔洞可占整个表面积的30%-70%,孔径2-8 nm。有些S-层蛋白还存在多种不同类别的孔洞。在细菌生长分裂的整个阶段,S-层以非共价键的方式与位于下方的细胞结构(细胞膜、外膜或细胞壁)连接而包裹着菌体。

S-层蛋白可以被糖基化、磷酸化和甲基化修饰。糖基化的S-层蛋白在古细菌中非常普遍,在革兰氏阳性细菌也较多,但最近在少数革兰氏阴性细菌如福赛斯坦纳菌(*Tannerella forsythia*)<sup>[5]</sup>中也有发现。

基金项目:国家“973项目”(0403042A01)

\* 通信作者。Tel: +86-27-87877242; Fax: +86-27-87641072; E-mail: yzm@wh.iov.cn

作者简介:杨玲玲(1988-),女,湖北潜江人,硕士研究生,主要从事芽胞杆菌分子遗传方向研究。

收稿日期:2011-05-05;修回日期:2011-06-29

S-层蛋白的糖基化过程非常复杂,其糖基成分、连接方式、结构远比真核生物中多样,至今已知的糖基结构类型已经达到了15种<sup>[6]</sup>。虽然糖基化修饰对S-层蛋白的具体作用还不清楚,但确信的是它拓宽了S-层蛋白的功能谱,而且对于探索细菌间相互作用具有一定的启发性。

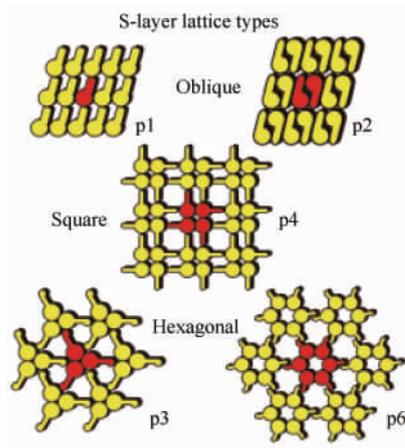


图1 不同S-层蛋白的晶格类型结构示意图<sup>[4]</sup>

Fig. 1 Schematic of the different S-layer lattice types.

## 2 S-层蛋白的基因及其表达

尽管30多年前科学家就发现了S-层的存在,但直到1986年才克隆到S-层蛋白基因。近几年来,S-层蛋白基因的序列信息增长迅速(表1)。其编码的S-层蛋白一般包括:N端信号肽序列(成熟S-层蛋白中此序列被剪切),S-层蛋白同源区(S-layer homology, SLH)以及C端自组装相关序列。不同的S-层蛋白具有独特的形态学单位间距,晶格形状和分子量,理论上它可能作为分类学特征区分不同的种。然而,即使是同一个菌种的不同菌株,其S-层蛋白也有明显的区别。如嗜热脂肪芽胞杆菌(*Geobacillus stearothermophilus*)在不同环境条件下可以表达出至少5种不同的S-层蛋白。实际上,S-层蛋白并不是根据序列的同源性归类,而是因为它在细胞表面形成的晶格结构。

目前,通过比较本实验室自行分离的高毒力杀蚊幼虫球形芽胞杆菌(*Lysinibacillus sphaericus*) C3-

表1 部分已知序列的芽胞杆菌的S-层蛋白<sup>[8]</sup>

Table 1 Sequence of S-layer genes of *Bacillus* species

Species	Strains	Genes	Number of amino acids/ N-terminal leader peptide	Lattice type <sup>a</sup>	GeneBank accession number
<i>Bacillus anthracis</i>	Sterne derivative substrain 9131	<i>sap</i>	814/29	O <sup>b</sup>	Z36946
		<i>eag</i>	862/29	O	X99724
<i>Brevibacillus brevis</i> ( <i>Bacillus brevis</i> )	47	<i>owp</i>	1 004/24	N <sup>c</sup>	M14238
		<i>mup</i>	1 053/23	H	M19115
<i>Brevibacillus brevis</i> ( <i>Bacillus brevis</i> )	HPD31	<i>HWP</i>	1 087/23	H	D90050
<i>Bacillus licheniformis</i>	HM105	<i>olpA</i>	874/29	N <sup>c</sup>	U38842
<i>Lysinibacillus sphaericus</i>	P1	<i>sequence 8</i>	1 252/30	S	A45814
		<i>gene 125</i>	1 176/30	S	
<i>Lysinibacillus sphaericus</i>	2362	<i>gene 80</i>	745 (silent)	N <sup>c</sup>	M28361
<i>Lysinibacillus sphaericus</i>	NCTC 9602	<i>slfA</i>	1228/31	S	AJ849547
<i>Lysinibacillus sphaericus</i>	JG-A12	<i>slfB</i>	1238/32	S	AJ849549
<i>Lysinibacillus sphaericus</i>	CCM 2177	<i>sbpA</i>	1268/30	S	AF211170
<i>Lysinibacillus sphaericus</i>	C3-41	<i>slpC</i>	1 176/30	O	EF535606
<i>Lysinibacillus sphaericus</i>	1593	<i>slpC</i>	1176	N <sup>c</sup>	EF535608
<i>Lysinibacillus sphaericus</i>	SSII-4	<i>slpC</i>	1176	N <sup>c</sup>	EF535607
<i>Lysinibacillus sphaericus</i>	2317-2	<i>slpC</i>	1176	N <sup>c</sup>	EF535610
<i>Lysinibacillus sphaericus</i>	IAB881	<i>slpC</i>	1176	N <sup>c</sup>	EF535609
		<i>sbsA</i>	1 228/30	H	X71092
<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	PV72/p6	<i>sbsB</i>	920/31	O	X98095
<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	ATCC 12980	<i>sbsC</i>	1 099/30	O	AF055578
<i>Bacillus thuringiensis</i>	CTC	<i>ctc</i>	842/29	N <sup>c</sup>	AJ012290
		<i>ctc<sub>2</sub></i>	862/29	N <sup>c</sup>	AY460125
<i>Bacillus thuringiensis</i>	NRRL4045	<i>slpA</i>	821/29	N <sup>c</sup>	AJ249446
<i>Bacillus thuringiensis</i>	GP1	<i>slgp1</i>	863	N <sup>c</sup>	AY956311

a H, hexagonal; S, square; O, oblique; b, Presumably; c, unknown

41 与其它球形芽胞杆菌的 S-层蛋白基因也发现了 S-层蛋白的菌株差异性。球形芽胞杆菌不同菌株的 S-层蛋白同源性不一致,有毒株的 S-层蛋白序列同源性非常高而无毒株的序列同源性很低;而且不同功能域的同源性也不一致,N 末端同源性高而 C 末端同源性低<sup>[7]</sup>。从进化上看,S-层蛋白这些差异性可能是为了满足个体不同需要的一种适应过程。

S-层蛋白在细菌中的含量很高,可以达到细菌总蛋白的 15%。对于一个中等大小的杆状细菌来说,完整的 S-层大约含有  $5 \times 10^5$  个单体,按代时 20 分钟计算,每秒种大约需要合成 500 个 S-层蛋白单体。在细菌完成分裂前,S-层蛋白必须分泌结合到细胞壁外并组装成一定形态的晶格结构,以保持细胞能完全被 S-层蛋白包裹<sup>[8]</sup>。由此可以推测编码 S-层蛋白的基因是一种高效表达的基因。Boot 等人发现 S-层蛋白基因的启动子效率非常高,如嗜酸乳酸杆菌(*Lactobacillus acidophilus*)的 S-层蛋白的启动子效率是乳酸盐脱氢酶的两倍,而后的启动子效率是已发表的细菌启动子中效率最高的。许多细菌不止含有一个 S-层蛋白基因的启动子,如短乳杆菌 ATCC 8287 (*L. brevis*) 含有 2 个启动子<sup>[9]</sup>。多个启动子不仅可以提高转录效率,而且可以根据细菌不同的生长阶段和所处环境更有效的调节 S-层蛋白的表达。除此之外,S-层蛋白的 mRNA 的半衰期较长。细菌中 mRNA 的寿命往往很短,半衰期仅 2 - 5 min,而 S-层蛋白的 mRNA 的半衰期可长达到 22 min。同时,S-层蛋白基因具有显著的密码子使用偏好性现象,从而有利于提高翻译的效率和准确性。利用 S-层蛋白基因的高效表达分泌机制建立新的异源蛋白质表达系统,对于 S-层蛋白的应用具有重要的指导意义。

### 3 S-层蛋白的锚定特性和自组装

大多数 S-层蛋白的 N 末端存在一个保守结构域,称为 S-层同源区(S-layer homology,SLH)。SLH 区可以由 1、2 或 3 个重复的 SLH 基序(SLH motif)组成,每个基序含 50 - 60 个氨基酸。现已证实,SLH 起着将 S-层蛋白锚定在细胞表面的作用,它以非共价键的方式将 S-层蛋白结合于肽聚糖或次生细胞壁聚合物上(secondary cell wall polymers,

SCWP)<sup>[10-11]</sup>。而炭疽芽胞杆菌(*Bacillus anthracis*) S-层蛋白的 SLH 还具有结合血红素并介导其运输的作用<sup>[12]</sup>。本实验室研究人员在前期对球形芽胞杆菌 C3-41 的 S-层蛋白的研究发现其 SLH 区包括 3 个 SLH 基序,每个 SLH 基序都能与细胞壁结合,但 3 个 SLH 基序对 S-层蛋白的锚定功能的贡献并不等同。rSLH<sub>31-92</sub> 和 rSLH<sub>93-151</sub> 基序与细胞壁的结合不稳定,rSLH<sub>152-210</sub> 基序能与细胞壁稳定结合,因此 rSLH<sub>152-210</sub> 基序是与细胞壁稳定结合的关键区域。此外,球形芽胞杆菌的 S-层蛋白对细胞壁的锚定作用具有种属特异性——只能与球形芽胞杆菌的细胞壁结合,不能与其它种属的细菌的细胞壁结合<sup>[13]</sup>。这种结合特性可能暗示着 S-层蛋白非常精细的锚定过程,同时也促进人们对不同的 SLH 基序的高级结构的关注。

不具有 SLH 区的 S-层蛋白一般通过电荷效应将其锚定在细菌外层。例如嗜热脂肪芽胞杆菌的 S-层蛋白 SbsC 不具有 SLH 区,其 N 端带正电荷,能够与细胞壁中带负电荷的 SCWP 相互作用而完成 S-层蛋白的锚定<sup>[14]</sup>。少数细菌还具有一些特别的锚定方式,如谷氨酸棒状杆菌(*Corynebacterium glutamicum*) ATCC 17965 的 S-层蛋白通过疏水的 C 末端与细胞壁中富含分枝菌酸(mycolic acids)的细胞层相结合<sup>[15]</sup>。短乳杆菌(*L. brevis*)的 S-层锚定在细胞壁上不带电荷的多糖上,其锚定区域尚不清楚<sup>[16]</sup>。

S-层蛋白具有自组装的能力。大多数细菌的 S-层蛋白是以非共价键的方式与细胞膜结合,通过变性剂或离解剂处理可以将 S-层从细菌表面分离下来。解离的 S-层蛋白既可以在溶液中自组装成片层状、圆柱形或球形的产物,还可以在固相支持物上、气水相界面上、脂质膜上、脂质体上和微团上重新结晶形成单分子层<sup>[15]</sup>(图 2)。在悬浮液中,S-层蛋白先快速形成小晶核,然后再缓慢地自组装形成更大的聚集体。在固相支持物上,S-层蛋白随机形成很多小的晶格粘附到固相物表面,然后在晶核的各个方向进行晶体生长,直到其生长到与另一个结晶区域相遇,最后形成封闭、嵌合的 S-层蛋白结晶块。研究表明,S-层蛋白的自组装是一个熵驱动的过程,其自组装的方式、形成的晶格类型由 S-层蛋白的氨基酸序列决定<sup>[4]</sup>。

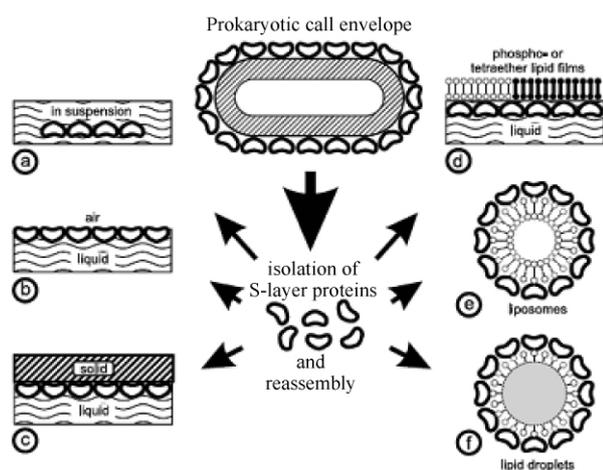


图2 分离的S-层蛋白单体在不同界面的重结晶的示意图<sup>[15]</sup>。自组装过程可以发生在悬液中(a)、气液界面上(b)、固液界面上(c)、脂膜上(d)、脂质体上(e)和微团上(f)。

Fig.2 Schematic illustration of the recrystallization of isolated S-layer subunits into crystalline arrays. The self-assembly process can occur in suspension (a), at air-liquid interface (b), at solid-liquid interface (c), at lipid films (d), on liposomes (e), on emulsomes (f).

## 4 S-层蛋白的功能

S-层蛋白是古生菌和真细菌中普遍存在的一种结构,其功能是多样的,这种多样性反应了原核生物对环境的适应过程,在原核生物的进化中具有特殊的意义。目前,得到广泛认可的功能主要集中在以下几个方面:第一,S-层作为细胞的外层结构,具有维持细胞形态和保护的功能。例如对于缺少细胞壁结构的古细菌,S-层担当了细胞壁的角色,使菌体对渗透压和机械力有一定的抗性。S-层还可以保护一些菌体免受噬菌体、蛭弧菌(*Bdellovibrio bacteriovorus*)等细菌寄生生物的攻击;增加菌体对环境的抗逆性。第二,具有分子筛的功能,S-层孔洞的大小和形状均一,可以选择性的透过某些物质。如嗜热脂肪芽孢杆菌的S-层蛋白的孔径约为4.5 nm,它能够阻止分子量大于45 kDa的物质通过,而允许比之小的物质进出细胞,充分发挥了其分子筛的作用。第三,作为胞外酶的吸附位点,如热产硫磺热厌氧杆菌(*Thermoanaerobacterium thermosulfurigenes*)的S-层蛋白上具有支链淀粉酶的吸附位点,这些胞外酶的吸附,有助于菌体利用它们

的降解产物。

随着研究的深入,科学家们慢慢发现了S-层蛋白的一些新功能。S-层蛋白能赋予病原菌一些致病特性。Kern等人发现炭疽芽孢杆菌的S-层蛋白参与菌体吸附宿主细胞的过程<sup>[17]</sup>,从而证实了S-层蛋白是炭疽芽孢杆菌的一种毒力因子。牙周炎病原菌福赛斯坦纳菌(*Tannerella forsythia*)的S-层蛋白可以介导红细胞凝集、粘附及入侵上皮细胞、引起小鼠的皮下脓肿等与致病相关的反应<sup>[5]</sup>。McCarren等人发现聚球藻(*Synechococcus*) WH8102两种S-层蛋白的缺失可以导致细菌丧失运动能力<sup>[18-19]</sup>,进而确定S-层蛋白还与细菌的运动相关。S-层蛋白具有吸附重金属的能力<sup>[20]</sup>。如球形芽孢杆菌JG-A12菌株能结合铀、铅、铜、铝、镉等重金属,电镜观察发现铀原子沉积在菌株的S-层表面<sup>[21]</sup>。嗜酸乳杆菌(*L. acidophilus*)的S-层蛋白可以抑制由鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella Typhimurium*)导致的细胞凋亡,为治疗沙门氏菌引起的感染提供了新的思路<sup>[22]</sup>。此外,苏云金芽孢杆菌(*B. thuringiensis*) CTC和GP1的S-层蛋白在芽孢期可以形成伴胞晶体<sup>[23-24]</sup>。Pena等人证实了在苏云金芽孢杆菌GP1中,以伴胞晶体存在的S-层蛋白具有杀墨西哥豆瓢虫(*Epilachna varivestis*)的活性。这一发现对于以杀虫晶体蛋白(ICP)作为鉴别苏云金芽孢杆菌的传统分类提出了挑战。S-层蛋白的功能非常多样,近年来对S-层蛋白的一些新认识将会帮助我们更好的理解S-层存在的意义,为工业化应用奠定理论基础。

## 5 S-层蛋白的应用和展望

S-层蛋白的应用研究主要分为两类:一类是利用S-层蛋白的表达分泌系统使外源性的蛋白质或多肽(抗体、抗原、细胞因子、酶等)大量表达,并准确定位在细胞表面。如在苏云金芽孢杆菌的表面展示了禽流感病毒的核蛋白<sup>[25]</sup>,鸡毒霉形体粘附素蛋白<sup>[26]</sup>,丝氨酸乙酰内酯酶<sup>[27]</sup>。Nomellini等人在新月柄杆菌(*Caulobacter crescentus*)表面展示的HIV受体CD4和辅助受体MIP1 $\alpha$ 能够特异性的阻断HIV的侵入,可作为预防HIV感染的候选杀微生物剂(microbicide)<sup>[28]</sup>。利用这一系统表达的抗原含量高,后续提取过程简单,而且S-层蛋白还可以直接充当抗原佐剂和载体使用。虽然早期就有人摸索

S-层重组蛋白表达系统,但至今它仍面临着一些问题。首先,革兰氏阳性菌的肽聚糖结构限制了重组S-层蛋白的有效分泌,革兰氏阴性菌可以利用膜通道将S-层蛋白直接泵出细胞外,避免了重组蛋白分泌的问题<sup>[29]</sup>,但是对于革兰氏阴性菌的S-层蛋白的研究却不够深入。其次,根据表达的外源蛋白不同,所选择的启动子、表达菌株也不尽相同。如Novotny选择嗜热脂肪芽胞杆菌NRS 2004/3a的S-层蛋白启动子(一种温度敏感型启动子),建立了一个温度敏感的外源蛋白表达系统,只需要通过改变培养温度就可以达到调节外源蛋白表达的目的<sup>[30]</sup>。而Ilk等人选择了枯草芽胞杆菌(*B. subtilis*)作为表达菌株,发现其比大肠杆菌更有优势<sup>[31]</sup>。此外,展示在细菌表面的外源蛋白可能需要以二聚体或多聚体的形式存在才能行使其生物学功能,有些蛋白可能还需要与辅助蛋白作用后才能成为靶点。在S-层重组蛋白表达系统投入大规模应用之前,这些因素都需要不断完善。

另一类是利用S-层蛋白的自组装特性。过去的20多年里,利用生物体合成金属或半导体纳米材料已经得到了广泛的关注,但是金属纳米材料在生物医学和仿生材料研制上还是存在较大的局限性,于是科学家们开始寻找一些新型的有机纳米合成原料。S-层蛋白可以在溶液中、固相支持物上、气水相界面上、脂质膜上、脂质体和微团上自组装形成纳米级的单分子层,而且融合了外源蛋白的S-层蛋白仍具有自组装成晶格结构的能力。这一特点引起了研究者极大的兴趣。有研究证实S-层蛋白与链霉亲和素的融合蛋白具备结合生物素铁蛋白的能力,而且能够作为模板使被结合的分子有序的排列在悬浮液、硅片、脂质体、细胞壁上<sup>[32]</sup>。这一探索使S-层蛋白在纳米技术应用中取得了巨大突破。近期Schrems等人利用化学修饰过的S-层蛋白作为支撑介质合成了厚度约6 nm的生物膜,其高分辨率图像信息、表面敏感性、膜电化学值等均符合已知的膜结构相关指标。这种S-层支撑的带正电的膜结构可以结合DNA、钠钾ATP泵、缬氨霉素等<sup>[33]</sup>,在膜蛋白程序化的药物投递、包装假病毒研究中具有应用价值。

在S-层蛋白的研究中还有许多难题需要攻克,如何丰富S-层蛋白高分辨率的三维结构信息成为了一个亟待解决的问题。一方面S-层蛋白自组装

产物的不溶性限制了核磁共振技术的使用,另一方面不易获得S-层蛋白三维晶体又限制了X-射线晶体衍射技术的使用。目前获得的S-层蛋白最高分辨率结构是球形芽胞杆菌SbpA的7 Å结构<sup>[34]</sup>。在原子结构水平上,虽然Pavkov得到了嗜热脂肪芽胞杆菌S-层蛋白的锚定相关区域的原子水平结构图,但却始终未能获得自组装区域的结构<sup>[35]</sup>。随着S-层蛋白的研究深入化、系统化,它在生物传感器、疫苗研制、表面展示、纳米材料、生物治理等方面也将体现更大的应用价值。毋庸置疑,S-层蛋白的应用前景是光明的,但要实现S-层蛋白从探索向应用的转折还需要更多人的努力。

## 参考文献

- [1] Bahl H, Scholz H, Bayan N, Chami M, Leblon G, Gulik-Krzywicki T, Shechter E, Fouet A, Mesnage S, Tosi-Couture E, Gounon P, Mock M, Conway de Macario E, Macario AJ, Fernandez-Herrero LA, Olabarria G, Berenguer J, Blaser MJ, Kuen B, Lubitz W, Sara M, Pouwels PH, Kolen CP, Boot HJ, Resch S. Molecular biology of S-layers. *FEMS Microbiology Review*, 1997, 20 (1-2): 47-98.
- [2] Claus H, Akca E, Debaerdemaeker T, Evrard C, Declercq JP, Harris JR, Schlott B, Konig H. Molecular organization of selected prokaryotic S-layer proteins. *Canadian Journal of Microbiology*, 2005, 51 (9): 731-743.
- [3] Sara M, Sleytr UB. Biotechnology and biomimetic with crystalline bacterial cell surface layers (S-layers). *Micron*, 1996, 27 (2): 141-156.
- [4] Sleytr UB, Huber C, Ilk N, Pum D, Schuster B, Egelseer EM. S-layers as a tool kit for nanobiotechnological applications. *FEMS Microbiology Letters*, 2007, 267 (2): 131-144.
- [5] Lee SW, Sabet M, Um HS, Yang J, Kim HC, Zhu W. Identification and characterization of the genes encoding a unique surface (S-) layer of *Tannerella forsythia*. *Gene*, 2006, 371 (1): 102-111.
- [6] Ristl R, Steiner K, Zarschler K, Zayni S, Messner P, Schaffer C. The s-layer glycome-adding to the sugar coat of bacteria. *International Journal of Microbiology*, 2011, 2011:
- [7] Hu X, Li J, Hansen BM, Yuan Z. Phylogenetic analysis and heterologous expression of surface layer protein SlpC of *Bacillus sphaericus* C3-41. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 2008, 72 (5): 1257-1263.

- [ 8 ] Sara M , Sleytr UB. S-Layer proteins. *Journal of Bacteriology* ,2000 ,182 ( 4 ) : 859-868.
- [ 9 ] Hynonen U , Avall-Jaaskelainen S , Palva A. Characterization and separate activities of the two promoters of the *Lactobacillus brevis* S-layer protein gene. *Applied Microbiology and Biotechnology* ,2010 ,87 ( 2 ) : 657-668.
- [10] Mesnage S , Fontaine T , Mignot T , Delepierre M , Mock M , Fouet A. Bacterial SLH domain proteins are non-covalently anchored to the cell surface via a conserved mechanism involving wall polysaccharide pyruvylation. *EMBO Journal* ,2000 ,19 ( 17 ) : 4473-4484.
- [11] Kern J , Ryan C , Faull K , Schneewind O. *Bacillus anthracis* surface-layer proteins assemble by binding to the secondary cell wall polysaccharide in a manner that requires *csaB* and *tagO*. *Journal of Molecular Biology* , 2010 ,401 ( 5 ) : 757-775.
- [12] Tarlovsky Y , Fabian M , Solomaha E , Honsa E , Olson JS , Maresso AW. A *Bacillus anthracis* S-layer homology protein that binds heme and mediates heme delivery to IsdC. *Journal of Bacteriology* ,2010 ,192 ( 13 ) : 3503-3511.
- [13] Li J , Hu X , Yan J , Yuan Z. Species-specific cell wall binding affinity of the S-layer proteins of mosquitocidal bacterium *Bacillus sphaericus* C3-41. *Applied and Environment Microbiology* ,2009 ,75 ( 12 ) : 3891-3895.
- [14] Jarosch M , Egelseer EM , Huber C , Moll D , Mattanovich D , Sleytr UB , Sara M. Analysis of the structure-function relationship of the S-layer protein SbsC of *Bacillus stearothermophilus* ATCC 12980 by producing truncated forms. *Microbiology* , 2001 , 147 ( Pt 5 ) : 1353-1363.
- [15] Sleytr UB , Sara M , Pum D , Schuster B. Characterization and use of crystalline bacterial cell surface layers. *Progress in Surface Science* ,2001 ,68 ( 7-8 ) : 231-278.
- [16] Avall-Jaaskelainen S , Hynonen U , Ilk N , Pum D , Sleytr UB , Palva A. Identification and characterization of domains responsible for self-assembly and cell wall binding of the surface layer protein of *Lactobacillus brevis* ATCC 8287. *BMC Microbiology* ,2008 ,8 : 165.
- [17] Kern J , Schneewind O. BslA , the S-layer adhesin of *B. anthracis* , is a virulence factor for anthrax pathogenesis. *Molecular Microbiology* ,2010 ,75 ( 2 ) : 324-332.
- [18] McCarren J , Heuser J , Roth R , Yamada N , Martone M , Brahamsha B. Inactivation of *swmA* results in the loss of an outer cell layer in a swimming *Synechococcus* strain. *Journal of Bacteriology* ,2005 ,187 ( 1 ) : 224-230.
- [19] McCarren J , Brahamsha B. Swimming motility mutants of marine *Synechococcus* affected in production and localization of the S-layer protein SwmA. *Journal of Bacteriology* ,2009 ,191 ( 3 ) : 1111-1114.
- [20] Allievi MC , Sabbione F , Prado-Acosta M , Palomino MM , Ruzal SM , Sanchez-Rivas C. Metal biosorption by surface-layer proteins from *Bacillus* species. *Journal of Microbiology and Biotechnology* ,2011 ,21 ( 2 ) : 147-153.
- [21] Merroun ML , Raff J , Rossberg A , Hennig C , Reich T , Selenska-Pobell S. Complexation of uranium by cells and S-layer sheets of *Bacillus sphaericus* JG-A12. *Applied and Environment Microbiology* ,2005 ,71 ( 9 ) : 5532-5543.
- [22] Li P , Yin Y , Yu Q , Yang Q. *Lactobacillus acidophilus* S-layer protein-mediated inhibition of *Salmonella*-induced apoptosis in Caco-2 cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* ,2011 ,409 ( 1 ) : 142-147.
- [23] Pena G , Miranda-Rios J , de la Riva G , Pardo-Lopez L , Soberon M , Bravo A. A *Bacillus thuringiensis* S-Layer Protein Involved in Toxicity against *Epilachna varivestis* (Coleoptera: Coccinellidae). *Applied and Environmental Microbiology* ,2006 ,72 ( 1 ) : 353-360.
- [24] Zhu C , Yu Z. The surface layer protein of *Bacillus thuringiensis* CTC forms unique intracellular parasporal inclusion body. *Journal of Basic Microbiology* ,2008 ,48 ( 4 ) : 302-307.
- [25] Liu M , Li S , Hu S , Zhao C , Bi D , Sun M. Display of avian influenza virus nucleoprotein on *Bacillus thuringiensis* cell surface using CTC as a fusion partner. *Applied Microbiology and Biotechnology* ,2008 ,78 ( 4 ) : 669-676.
- [26] Liu M , Guo S , Hu S , Xiao Y , Xu Q , Li Z , Bi D , Sun M. Displaying the protein of *Mycoplasma gallisepticum* agglutinin on the cell surface of *Bacillus thuringiensis* with the S-layer protein. *Veterinary Microbiology* ,2008 ,130 ( 1-2 ) : 99-106.
- [27] Zhang L , Ruan L , Hu C , Wu H , Chen S , Yu Z , Sun M. Fusion of the genes for AHL-lactonase and S-layer protein in *Bacillus thuringiensis* increases its ability to inhibit soft rot caused by *Erwinia carotovora*. *Applied Microbiology and Biotechnology* ,2007 ,74 ( 3 ) : 667-675.
- [28] Nomellini JF , Li C , Lavallee D , Shanina I , Cavacini LA , Horwitz MS , Smit J . Development of an HIV-1

- Specific Microbicide Using *Caulobacter crescentus* S-Layer Mediated Display of CD4 and MIP1 $\alpha$ . *PLoS ONE*, 2010, 5 (4): e10366.
- [29] Smit J. Heads up S-layer display: the power of many. *Structure*, 2008, 16 (8): 1151-1153.
- [30] Novotny R, Berger H, Schinko T, Messner P, Schaffer C, Strauss J. A temperature-sensitive expression system based on the *Geobacillus stearothermophilus* NRS 2004/3a sgsE surface-layer gene promoter. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 2008, 49 (Pt 1): 35-40.
- [31] Ilk N, Schumi CT, Bohle B, Egelseer EM, Sleytr UB. Expression of an endotoxin-free S-layer/allergen fusion protein in gram-positive *Bacillus subtilis* 1012 for the potential application as vaccines for immunotherapy of atopic allergy. *Microbial Cell Factories*, 2011, 10:6.
- [32] Moll D, Huber C, Schlegel B, Pum D, Sleytr UB, Sara M. S-layer-streptavidin fusion proteins as template for nanopatterned molecular arrays. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA*, 2002, 99 (23): 14646-14651.
- [33] Schrems A, Kibrom A, Kupcu S, Kiene E, Sleytr UB, Schuster B. Bilayer Lipid Membrane Formation on a Chemically Modified S-Layer Lattice. *Langmuir*, 2011, 27 (7): 3731-3738.
- [34] Norville JE, Kelly DF, Knight TF, Jr., Belcher AM, Walz T. 7Å projection map of the S-layer protein sbpA obtained with trehalose-embedded monolayer crystals. *Journal of Structural Biology*, 2007, 160 (3): 313-323.
- [35] Pavkov T, Egelseer EM, Tesarz M, Svergun DI, Sleytr UB, Keller W. The structure and binding behavior of the bacterial cell surface layer protein SbsC. *Structure*, 2008, 16 (8): 1226-1237.

## Progress and perspectives of surface layer proteins from *Bacillus* species—A review

Lingling Yang, Xiaomin Hu, Zhiming Yuan\*

Wuhan Institute of Virology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430071, China

**Abstract:** S-layer proteins are crystalline arrays composed of numerous identical protein or glycoprotein subunits. They comprise the outermost cell envelope component in most archaea and many bacteria. The remarkable properties of S-layer proteins are their capability to self-assemble and specific binding, which give S-layer proteins a wide application potential in nanotechnology and biomimetics. Recently most study in this field was concerned on the S-layer proteins of *Bacillus* species. This review provided a brief survey of the current state of the study about the genetics, function, properties, pathogenic correlation and application of the S-layer proteins of *Bacillus* species. The aim of this review was to gain more knowledge about the function of S-layers and lead to the development of new types of surface display system and recombinant vaccines, diagnostic agents and biocompatible surfaces.

**Keywords:** S-layer proteins, self-assemble, specific binding, *Bacillus* species, nanotechnology

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the National Key Basic Research and Development Plan of China (973 Program) (0403042A01)

\* Corresponding author. Tel: +86-27-87877242; Fax: +86-27-87641072; E-mail: yzm@wh.iov.cn

Received: 5 May 2011 / Revised: 29 June 2011