

微生物细胞表面工程研究进展*

石晶 殷涌光** 张桂林 于建群

(吉林大学生物与农业工程学院 长春 130025)

摘要: 微生物细胞表面工程是近年来发展起来的, 它利用细胞表面展示技术使外源蛋白固定于细胞表面, 从而生产微生物细胞表面蛋白。微生物细胞表面工程可用于细胞催化剂、细胞吸附剂、活疫苗、生物传感器的开发等。微生物细胞表面工程具有广阔的应用前景, 但是国内对这一领域的研究尚刚起步。在介绍了细胞表面工程的基础上, 对微生物细胞表面工程技术进展进行了综述, 并对该技术的发展给予展望。

关键词: 微生物细胞表面工程, 细胞表面展示技术, 外源蛋白

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2004) 05-0106-05

The Microbe Cell-surface Engineering Study Progress

SHI Jing YIN Yong-Guang** ZHANG Guei-Lin YU Jian-Qun

(*Biology and Agriculture College of Jilin university, Changchun 130025*)

Abstract: Microbe cell-surface engineering, which use the microbe cell surface display technology to display foreign proteins on the microbe cell surface to produce cell-surface proteins, was developed in recent years. It can be utilized to develop cell-catalyst, cell-adsorbent, live vaccine, biosensor and so on, and have a wide application perspective. But in our county, the microbe cell-surface engineering is studied just now. This review explain the development of the microbe cell surface engineering, overview the study and progress of microbe cell-surface engineering, and look this technology into the future.

Key words: Microbe cell surface engineering, Cell surface display, Foreign proteins

微生物细胞表面工程是利用细胞表面展示技术使外源蛋白固定在微生物细胞表面, 从而开发一些独特的生物产品。微生物细胞表面展示技术的原理(图1)是通过把靶蛋白基因序列(外源蛋白)与特定的载体蛋白基因序列(又叫定位序列)融合后导入微生物宿主细胞, 从而使靶蛋白表达并定位于微生物细胞表面。外源蛋白与载体蛋白序列的融合方法有C末端融合、N末端融合、插入融合。N末端融合适用于载体蛋白的定位区域在它的C末端; C末端融合适用于载体蛋白的定位区域在它的N末端; 插入融合适用于融合位点在载体蛋白的中部区域。微生物细胞表面展示技术有着广泛的用途(图2): 开发活疫苗^[1]; 开发细胞催化剂; 开发细胞吸附剂; 生物传感器的开发; 开发用于医学诊断、工业、环境保护等的细胞受体等。

微生物细胞表面展示系统首先是由 Geore P 在 20 世纪 80 年代中期开发的, 此后人们进行了大量研究^[2]。但是国内现在对微生物细胞表面展示技术的研究很少, 本文论述了近年来微生物细胞表面展示技术进展和应用状况, 以便使我国科研人员关注这一

* 吉林省科技发展计划项目资助 (No. 20020610)

** 联系人 Tel: 0431-5705254, E-mail: biofood@jlu.edu.cn

收稿日期: 2003-10-20, 修回日期: 2003-11-12

领域的研究。

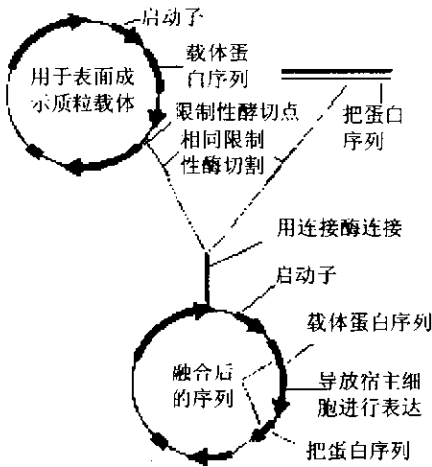


图1 微生物细胞表面展示技术原理

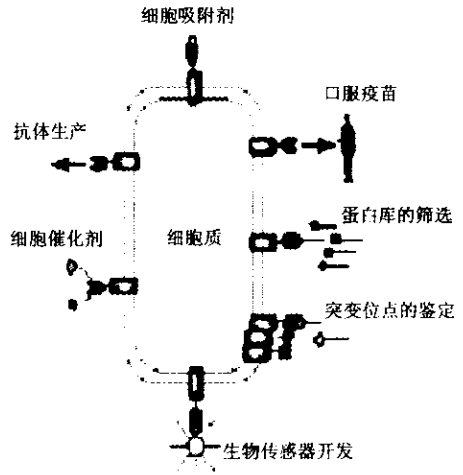


图2 微生物细胞表面工程的应用

1 微生物细胞表面展示系统构成

1.1 载体蛋白 一个成功的载体蛋白应满足4个条件：(1) 具有信号肽序列，从而使已经表达的融合蛋白能够通过细胞内膜；(2) 具有较强的定位结构以便使融合蛋白固定于细胞表面而不能脱落；(3) 与外源蛋白融合后，载体蛋白的定位特性不会改变；(4) 不会被细胞壁膜之间和培养基中的蛋白酶水解。此外确定合适的融合位点非常重要，因为它会影响融合蛋白的定位、稳定性、比活性以及翻译后修饰等。同时靶蛋白必须融合在确定载体蛋白位于细胞表面的区域，才能被成功的展示在细胞表面，所以必须确定载体蛋白位于细胞表面的区域。目前已有几种不同的方法用来确定载体蛋白位于细胞表面的区域，其中最简单且最有效的方法是同源性比较，就是利用生物信息学方法对载体蛋白和与它的同源的已知结构的蛋白进行序列比对，从而确定载体蛋白位于细胞表面的区域。另一个方法就是利用蛋白序列通过计算机软件绘制亲疏水性分布图，依据亲疏水性分析确定位于细胞表面的区域。如果利用以上方法不能获得理想结果，我们可以通过随机筛选的办法来确定，就是在不同的随机位点融合外源蛋白然后检测细胞表面是否有外源蛋白及表达效果如何，从而确定融合的合适位点。

1.2 靶蛋白 靶蛋白是根据特定的应用来选择的，靶蛋白的性质也会影响表达效果，靶蛋白的性质对转运过程有很大的影响，靶蛋白位于细胞外膜内侧的折叠结构将会影响转运和定位过程。此外，靶蛋白序列中带有许多带电氨基酸残基或者是疏水性残基时将会抑制融合蛋白的分泌。

1.3 宿主菌株 一个好的宿主细胞应该能和被展示的蛋白兼容共处且容易培养。对于革兰氏阴性细菌宿主细胞来说，大肠杆菌是一个理想的宿主。

可用的革兰氏阳性细菌宿主细胞较多如葡萄球菌、链锁状球菌、炭疽杆菌、枯草芽孢杆菌、球形杆菌等。

酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 是一个较理想的酵母宿主，它有以下优点：(1)

它是人们认可的安全的菌株；(2) 它的蛋白折叠和分泌机制与动物细胞相似，可用于哺乳动物蛋白的表面展示；(3) 它的发酵机理和性质研究的较清楚；(4) 靶蛋白可以通过糖基磷脂酰肌醇附着点 (GPI anchor) 或通过二硫键与细胞壁结合而展示于细胞壁表面。

2 重要微生物细胞表面展示系统

2.1 革兰氏阴性细菌表面展示系统

革兰氏阴性细菌展示系统的宿主细胞主要是大肠杆菌，革兰氏阴性细菌表面展示系统的载体蛋白大部分都是利用外膜蛋白开发的。图3显示了目前为止成功的用于在大肠杆菌宿主细胞表面展示靶蛋白的载体蛋白。

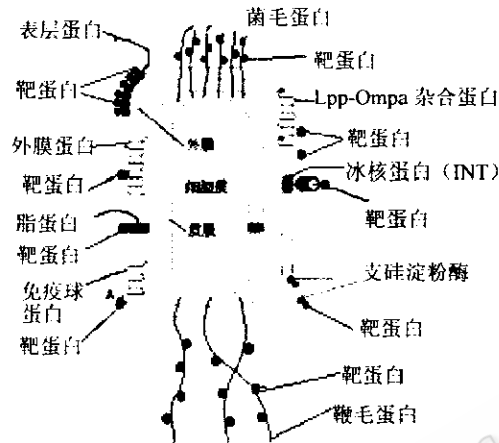


图3 革兰氏阴性细菌细胞表面展示系统

N端融合、C端融合、插入融合这三种融合方法在革兰氏阴性细菌展示系统中都有应用。肽聚糖脂蛋白 PAL (Peptidoglycan-associated lipoprotein) 就是典型 N 端融合载体蛋白。免疫球蛋白 A 蛋白酶家族中的一些蛋白含有自动转运结构 (Autotransporter structures)，这一结构能促使融合于载体蛋白 N 端的靶蛋白跨过细胞外膜展示于细胞表面^[3]。

有几种外膜蛋白的定位序列在它们的 N 端。这些蛋白可作为载体蛋白通过 C 端融合来构建细胞表面展示系统。Lpp-OmpA 杂合体蛋白就是典型的 C 端融合载体蛋白^[4]。细菌

Pseudomonas syringae 的冰核蛋白 INP (Ice Nucleation Protein) 是又一个广泛使用的载体蛋白。利用冰核蛋白作为载体通过 C 端融合已经成功的在细胞表面展示了几种蛋白：果聚糖蔗糖酶、羧甲基纤维素酶、有机磷水解酶^[5]等。同时人们也利用肺炎杆菌 (*Klebsiella pneumoniae*) 支链淀粉酶作为细胞表面展示系统的载体蛋白，它是一个胞外酶，它能够通过 N 端的半胱氨酸与脂肪酸结合暂时固定于细胞表面，随后逐渐释放到培养基中，利用它作为载体蛋白通过 C 端融合已经成功的在细胞表面展示了几种蛋白： β -内酰胺酶、碱性磷酸酶。最近有报道利用冰核蛋白在大肠杆菌表面成功展示了丙型肝炎抗原^[6]。

插入融合型载体蛋白有 3 类：外膜蛋白，胞外附属结构 (如鞭毛) 的蛋白，表层蛋白。外膜蛋白在外膜上形成跨膜 β -桶状结构 (β -barrels) 结构。其胞外较长的环状结构序列不具有保守性，因此允许一定程度的人为修饰：取代、插入、缺失，因此可作为融合位点来展示靶蛋白。

大肠杆菌鞭毛和菌毛的亚蛋白也可作为蛋白载体对靶蛋白进行细胞表面展示。亚蛋白暴露于外部的部分不是菌体所必须的部分，这一部分可以插入外源靶蛋白。携带外源靶蛋白的亚蛋白仍可以被细菌装配成细胞附属物 (如鞭毛)。

2.2 革兰氏阳性细菌表面展示系统

革兰氏阳性细菌的许多表面蛋白与细胞壁以共价键的方式结合从而固定在细胞表面，这些蛋白通常有一个特异性的信号肽，目前为止革兰氏阳性细菌细胞表面展示系统的可用的融合方法只有 N 端融合和 C 端融合。

葡萄球菌蛋白 A (SpA) 被作为一个典型载体蛋白系统来研究细胞表面蛋白在革兰氏阳性细菌中的转运和定位机理。除了葡萄球菌蛋白 A 外, 还有其它一些载体序列被用来在革兰氏阳性细菌表面展示外源蛋白 (表 1)。

表 1 典型的革兰氏阳性细菌表面展示系统^[7-9]

载体蛋白	靶蛋白	宿主	应用
N 端融合型			
金黄色葡萄球菌 FnBPB	β -半乳糖苷酶 (66 kD)	肉葡萄球菌	体内酶固定化
化脓性链球菌 M6 蛋白	大黄蜂毒液变应原 (204 aa)	链锁状球菌	疫苗
葡萄球菌蛋白 A	人类 RSV 糖蛋白酶片断	葡萄球菌	活疫苗
	霍乱毒素 B 亚基 (103 aa)	葡萄球菌	活疫苗
C 端融合型			
炭疽杆菌表层蛋白	破伤风毒素 C 端片断	炭疽杆菌	预防破伤风
枯草芽孢杆菌 ColB	破伤风毒素 C 端片断	枯草芽孢杆菌	表达蛋白
球形杆菌表层蛋白	链锁状球菌粘性蛋白	球形杆菌	生物芯片开发

2.3 酵母菌表面展示系统 酵母细胞表面展示系统中宿主细胞一般为酿酒酵母, 载体蛋白主要是酿酒酵母细胞表面的两类甘露糖蛋白: SDS 可提取甘露糖蛋白和葡聚糖酶可提取甘露糖蛋白。

SDS 可提取甘露糖蛋白是以非共价键的方式与细胞壁结合, 经 SDS 和还原剂处理后就能从细胞壁上释放出来。葡聚糖酶可提取蛋白以共价键的方式与细胞壁交联, 只有当细胞壁经过葡聚糖酶处理后才能从细胞壁上释放出来。

表 2 概括了酵母细胞表面展示系统以及其目前的应用^[10,11], 最近 Susan 等^[12] 利用一种新的酵母表面展示系统, 成功的展示了一种老鼠的一种跟免疫有关的复合蛋白, 为蛋白的筛选开辟了新途径。

表 2 典型的酵母表面展示系统

载体蛋白	靶蛋白	宿主	应用
N 端融合型			
酿酒酵母	乙型肝炎表面抗原	酿酒酵母	口服疫苗
α -凝集素	金黄色葡萄球菌蛋白	酿酒酵母	细胞免疫吸附剂
酿酒酵母 YCR89w	α -半乳糖苷酶 (450 aa)	酿酒酵母	定位区域的筛选
C 端融合型			
酿酒酵母 Aga2p	单链抗体可变区 (271 aa)	酿酒酵母	多肽文库的筛选
	多肽文库的构建	酿酒酵母	正向突变体的筛选
α -凝集素	淀粉酶	酿酒酵母	细胞催化剂

3 微生物细胞表面工程的现有问题及前景展望

尽管人们已经成功的开发了一些细胞表面展示系统, 但是在这一领域里仍有许多问题需要解决。比如利用细胞表面技术开发细胞催化剂的时候, 细胞表面酶的活性与游离酶相比往往降低; 在构建细胞表面蛋白库的时候, 有些蛋白的表达量太少以至于难以鉴定; 还有空间阻碍、多亚基蛋白的表达、多种外源蛋白的同时表达等问题。而且到目前为止对细胞表面技术的研究和应用只是停留在实验室阶段, 还没有工业化。

尽管有这么多问题,但是我们相信随着细胞表面展示技术、分子生物学技术以及相关的生物技术的发展,微生物细胞表面展示技术的工业化应用为时不远。

参考文献

- [1] Lee J, Shin K, Pan J, *et al.* *Nat Biotechnol*, 2000, **18** (6): 645 ~ 648.
- [2] Benhar I. *Biotechnol Adv*, 2001, **19**: 1 ~ 33.
- [3] Sang Y, Lee, J, Hyun C, *et al.* *Trends in Biotechnology*, 2003, **21** (1): 45 ~ 51.
- [4] Bae W, Chen W, Mulchandani A, *et al.* *Biotechnol Bioeng*, 2000, **70** (5): 518 ~ 524.
- [5] Cho C. *Appl Environ Microbiol*. 2002, **68**: 2026 ~ 2030.
- [6] Sunin K, Jinkyu R, Euijoong K, *et al.* *FEMS Microbiology Letters*, 2003, **226**: 347 ~ 353.
- [7] Mesnage S, Weber ~ Levy M, Haustant M, *et al.* *Infect Immun*, 1999, **67** (9): 4847 ~ 4850.
- [8] Rachele I, Giuseppina C, Hoa T, *et al.* *Bacteriol*, 2001, **183** (21): 6294 ~ 6301.
- [9] Hilk N, Christine V, Eva M, *et al.* *Appl Environ Microbiol*, 2002, **68** (7): 3251 ~ 3260.
- [10] Nakamura Y, Shibasaki S, Ueda M, *et al.* *Appl Microbiol Biotechnol*, 2001, **57**: 500 ~ 505.
- [11] Hoischen C, Fritsche C, Gumpert J, *et al.* *Appl Environ Microbiol*, 2002, **68** (2): 525 ~ 531.
- [12] Susan E, Brophy D, Holler M. *Journal of Immunological Methods*, 2003, **272**: 235 ~ 246.