

细菌表面 S-层的结构及其功能和应用前景*

孙 明 张 蕾 朱晨光 喻子牛

(华中农业大学生命科学技术学院 农业部暨教育部农业微生物重点实验室 武汉 430070)

Structural Feature of Bacterial Cell Surface S-layers and Its Functions and Application Potential

Sun Ming Zhang Lei Zhu Chenguang Yu Ziniu

(College of Life Science and Technology, Huazhong Agricultural University; Key Laboratory of Agricultural Microbiology, Ministry of Agriculture and Education, Wuhan 430070, China)

关键词 细胞表面结构, S-层, 生物技术, 蛋白质晶状结构

中图分类号 Q24, Q932 文献标识码 A 文章编号 1001-6209(2002)04-0506-04

细菌的细胞外壁一般由细胞壁和细胞膜组成,除此之外,在许多古细菌和真细菌中还有一层表面结构,称为表面层(Surface layers)或称为 S-层(S-layers),它们是由蛋白质组成的晶格状结构,位于细胞壁或细胞膜外层,是生物进化过程中最简单的一种生物膜^[1,2]。

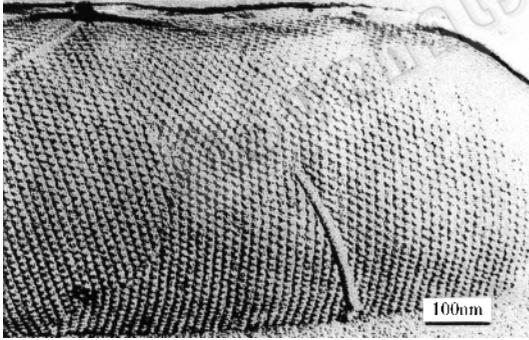


图 1 细菌细胞表面 S-层的冰冻蚀刻电镜照片^[3]

1 S-层的形态结构

细菌的每一个分类群都存在 S-层,涉及 300 多个种,其中在古细菌中分布更广。与大多数原核细胞的其它表层结构不同, S-层只有通过电镜,特别是冰冻蚀刻技术才能清晰地观察到。在真细菌和古细菌中, S-层可在细胞生长和分裂的所有阶段完全覆盖在细胞表面(图 1)^[2,3]。过去, S-层的广泛存在并不被人们所关注,因为在实验室条件下,过长的培养时间会导致 S-层的丢失,而且必须用电镜才能观察^[4]。

1.1 S-层与其它细胞表层结构之间的关系

S-层在原核生物的存在状况可分三种情况。在革兰氏阴性(G^-)古细菌中,外鞘结构最简单,由细胞膜和 S-层组成, S-层紧贴在细胞膜外,革兰氏阳性(G^+)古细菌和真细菌的 S-层存在于细胞壁外面, G^- 真细菌的 S-层存在于外膜的外层,其外鞘结构依次为细胞膜、肽聚糖层、外膜和 S-层^[1,2]。图 2 和图 3 分别为 S-层与其它细胞外层结构的关系示意图。对于有荚膜和 S-层的细菌,荚膜存在于 S-层外面^[5]。

* 国家自然科学基金(38970036 和 30080013)和教育部“跨世纪优秀人才培养计划”资助

作者简介 孙 明(1966 -)男,江西省景德镇市人,教授,博士,主要从事芽胞杆菌的分子生物学研究。E-mail: m98sun@mail.hzau.edu.cn

收稿日期 2001-09-10,修回日期 2001-11-26

1.2 S-层的超级结构

S-层是由蛋白质亚单位组成的单分子晶状结构,其厚度为 5~20nm,在古细菌中可达 70nm,比细胞膜略厚(7~8nm),比 G⁺ 细菌的细胞壁略薄(20~80nm)。其外表面相对较平滑,而内表面则相对比较粗糙。S-层是多孔的网状结构,其孔洞可占整个表面积的 30%~70%,孔洞的大小和形状非常均匀一致,孔径为 2~8nm(图 4)^[2,6]。从结构上看,S-层由不同形状的形态学单位组成,它们在 S-层中均匀对称分布,彼此间的中心间距为 3~35nm(图 4),形成均匀分布的孔洞。有些形态学单位较复杂,其中有

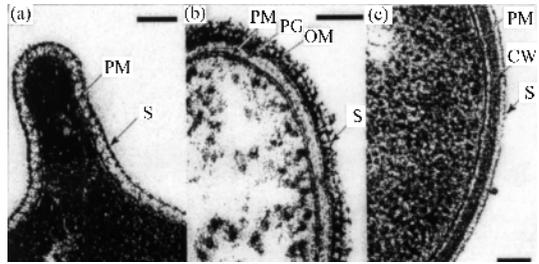


图 2 细菌细胞表面外鞘结构^[1]

a.嗜酸热硫化叶菌 *Sulfolobus acidocaldarius*(古细菌);b.杀鲑气单胞菌(G⁻);c.苏云金芽胞杆菌(G⁺)。PM,质膜;PG,肽聚糖层;OM,*Aeromonas salmonicida* 外膜;CW,细胞壁;S,S-层内标 50nm。

一个较大的方形、二个长方形和四个较小的孔洞组成,其形态学单位之间的中心间距为 13.5nm(图 4)^[1,2]。

2 S-层的化学组成

2.1 S-层蛋白

大多数 S-层由蛋白质或糖蛋白组成,其分子量为 40kDa~200kDa。乳酸杆菌的 S 层蛋白分子量较小,立克氏体的 S-层蛋白的分子量较大^[7]。炭疽芽胞杆菌(*Bacillus anthracis*)和苏云金芽胞杆菌(*B. thuringiensis*)的 S-层蛋白非常相似,由 814~862 个氨基酸残基组成,其中第一个来自前者的 S-层蛋白 CTC^[8]与后者的 S-层蛋白 Sap^[9]有 83%的同源性。

无论是在哪种细菌中,S-层蛋白的组成相似,一般疏水性氨基酸占 40%~60%,含有大量谷氨酸和天冬氨酸(15%),赖氨酸的含量也相当高(10%),极少存在含硫氨基酸。20%的氨基酸构成 α 螺旋,40%为 β 折叠,非周期性的折叠和 β-turn 在 5%~45%之间。一般情况下,S-层蛋白的等电点在 4~6,个别为 8~10。

许多古细菌和 G⁺ 细菌的 S-层蛋白被糖基化,可与糖链共价结合,糖链一般由含中性己糖、戊糖、庚糖、6-脱氧己糖和氨基糖的 20~50 个重复单位组成。在有些 S-层蛋白中还有磷酸化修饰作用^[7,10]。

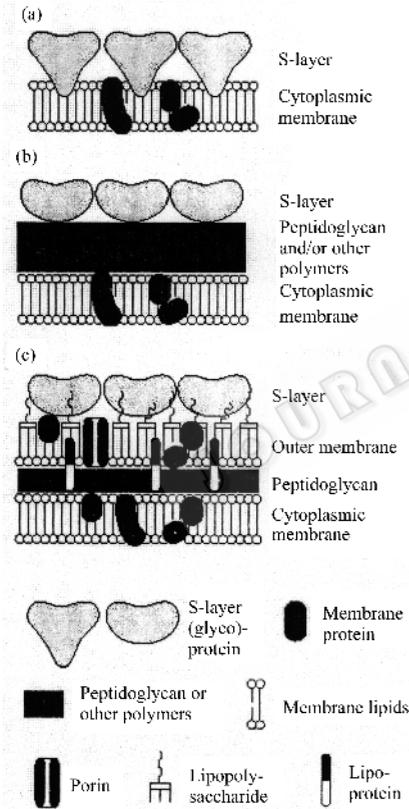


图 3 细菌细胞表面 S-层与其它外鞘结构的关系示意图^[1]

a. G⁻ 古细菌 b. G⁺ 细菌 c. G⁻ 真细菌。中等大小的杆状细胞来说,完整的 S-层大约由 5 × 10⁵ 个单体组成,因此为了维持 S-层在细胞表面的存在,对于代时为 20~30 分钟的细菌来说,每秒种至少必须合成 500 个 S-层蛋白多肽,并且运送到细胞表面组装成 S-层^[2,3],因此可以认为 S-层蛋白

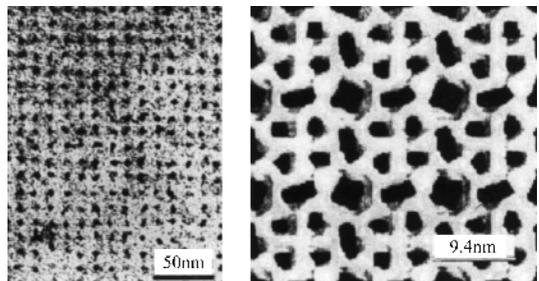


图 4 细菌 S-层孔洞精细结构示意图^[2]

白的启动子是非常强的,如嗜酸乳酸杆菌(*Lactobacillus acidophilus*) S-层蛋白的启动子是细菌中最强启动子之一的乳酸脱氢酶基因启动子的两倍^[11]。

2.2 S-层蛋白基因

尽管在 30 多年前就认识了 S-层,但直到 1986 年才克隆到 S-层蛋白基因。该基因的克隆与其它基因的克隆明显不同,许多 S-层蛋白基因存在于 *E. coli* 中时对宿主细胞的生长有负面作用,即宿主细胞易于裂解,如嗜热脂肪芽胞杆菌和苏云金芽胞杆菌的 S-层蛋白基因^[8,12]。因此有些 S-层蛋白基因是直接克隆在芽胞杆菌^[13]或克隆出部分片段再组装成完整的基因^[8,9]。近两年来,S-层蛋白基因的克隆发展迅速。在 2000 年 2 月以前克隆到的 S-层蛋白基因有 43 个,来自 19 个属的 31 个种,如芽胞杆菌(*Bacillus*),弯曲杆菌(*Campylobacter*) 乳杆菌(*Lactobacillus*) 等^[3]。到 2001 年 11 月,在 GenBank 上新增的 S-层蛋白基因有 44 个,其来源扩大了 6 个属 11 个种,其中 10 个基因是通过测定 5 个细菌的基因组序列而得知的。

3 S-层的形态发生和功能结构

通过离液剂(chaotropic agent)或改变 pH 值,可使 S-层完全发生解离,金属螯合剂或阳离子替换可使部分 G⁺ 细菌的 S-层发生解离,说明 S-层的组装是通过疏水作用、氢键和离子键等非共价键来完成的,并且将 S-层单位组合在一起的键比将 S-层固定在细胞表面的作用力大,只在少数古细菌中通过共价键来完成^[2,6]。在离体条件下,纯化的 S-层蛋白可自我组装成与在完整细胞表面相似的排列整齐的晶格结构,这种重结晶过程可发生在水溶液、汽/液界面、固面、以及脂膜等介质中^[2,14]。S-层蛋白合成以后,必须分泌到细胞外才能形成 S-层。大多数 S-层蛋白在 N-末端含有决定分泌的信号肽序列,该序列在组装成 S-层之前会被切除^[3]。多数 S-层蛋白的信号肽由 12~34(多为 19~34)个氨基酸组成。在有些细菌的 S-层蛋白中存在 I 型分泌机制以及不依赖于信号肽的分泌机制。

在 G⁺ 细菌中,其坚硬的细胞壁除了主要由肽聚糖组成外,还有一层由磷壁(酸)质、糖醛酸磷壁(酸)质、脂磷壁(酸)质,或脂聚糖组成的次生细胞壁聚合物(Secondary cell wall polymers)。在许多 S-层蛋白的 N-末端存在一个保守结构域(motifs)称为 SLH。SLH 由三个区段组成,各含 50~60 个氨基酸。现已证实,正是这个 SLH 起着锚定在细胞表面的作用,通过非共价键锚定在次生细胞壁聚合物上^[15,16]。

在有些 G⁺ 细菌中,其 S-层蛋白没有 SLH 结构,但它们可通过在 N-末端带正电区域来锚定。因此,尽管主流意见认为 S-层蛋白结合在次生细胞壁聚合物上^[15],但是 Message^[17]认为应避免使用次生细胞壁聚合物这一概念,最好使用细胞壁相关的聚合物或干脆使用肽聚糖来阐述这一问题。

4 S-层的功能

有关 S-层的功能知道的很少,但由于具有 S-层的细菌广泛存在,因此 S-层的功能应是多样化的。带有 S-层的细菌在自然环境下有何优势,现在还不清楚,但 S-层的某些功能还是明确的^[1,2,3]。

S-层可以决定或维持细胞的形状,特别是对于那些只以 S-层作为细胞壁的古细菌。在芽胞杆菌中 S-层可作为胞外酶的吸收附位点,如胞外淀粉酶可在 S-层上紧密排列,而干扰营养物质或代谢产物穿过 S-层的网格。S-层具有保护功能,有些兰细菌可在含有高浓度钙和硫的湖水中生长,S-层作为精细颗粒矿化作用的模板,可连续从表面排除这些颗粒,使得不致于阻塞细胞的外鞘。分子筛是 S-层的重要功能之一,由于 S-层孔洞的大小和形状均匀一致,可起到精细分子筛的作用。对于只利用小分子气体和盐类的细菌以及产生大量的胞外酶的芽胞杆菌,其 S-层只允许相应大小的分子通过。对于只以 S-层作为细胞壁的古细菌,S-层与细胞膜之间可形成一个周质空间,贮存一些涉及营养物降解和运输以及蛋白质折叠和输出的大分子。S-层具有保护一些细菌不被蛭弧菌寄生的作用;在病原菌中,S-层可作为一种病原因子,对免疫和非免疫血清中补体的杀菌活性具有较高或中等抗性,对吡啉的吸收发挥重要作用,对免疫球蛋白和胞外蛋白质复合体具有结合能力

5 S-层的应用前景

在生物技术和仿生学方面^[2,48] S-层可开发成超滤膜分子筛,以及功能生物分子固定化的良好介质。在开发疫苗方面前景广阔,可与特异性抗原或半抗原结合可作为佐剂系统加以使用。通过 S-层蛋白在脂膜上重结晶形成 S-层,可明显提高脂膜的稳定性,便于研究膜蛋白的生物学功能。S-层在纳米材料方面也有巨大应用潜力^[19],可作为形成有序排列的纳米金属或半导体材料的模板,这些具有特殊性质的材料可广泛用于纳米电子学和非线性光学的研究。

通过分子遗传学技术,可将蛋白质分子与 S-层蛋白的 SLH 结构组成融合蛋白,从而进行细胞表面展示,用以开发基因工程疫苗、全细胞固定化酶、生物传感器、组织再生生物吸附系统,选择性离子结合介质,微载体,生物介面,诊断试剂等。现在已成功地在细胞表面表达了一些生物活性蛋白或多肽,如在芽胞杆菌细胞表面展示了果聚糖蔗糖酶^[20]和 α -淀粉酶以及可吸附重金属的多聚组氨酸肽(未发表资料)。同时,铜绿假单胞菌的病原性抗原决定簇^[21]和感染性生血坏死病毒的糖蛋白^[22]以及破伤风毒素的 C 片段^[23]在细胞表面也得到了良好表达,用这种方法制成的基因工程疫苗在实验室测试中达到了预期的效果。

有关 S-层蛋白的研究是当今非常热门的一个领域,然而在我国却鲜见相关报道。从美国国立卫生研究院的 PubMed 数据库中可看到有关 S-层的论文从 90 年代以来一直呈上升趋势,从 1991 年的 400 多篇增加到 2000 年的 1000 多篇。希望本文能提高我国对 S-层的认识,并增强对其应用潜力的重视。

参 考 文 献

- [1] Sleytr U B, Beveridge T J. *Trends Microbiol*, 1999, **7**: 253 ~ 260.
- [2] Sleytr U B, Messner P, Pum D, et al. *Angew Chem Int Ed*, 1999, **38**: 1034 ~ 1054.
- [3] Sara M, Selytr U B. *J Bacteriol*, 2000, **182**(4): 859 ~ 868.
- [4] Koval S F, Murray R G E. *Microbiol Sci*, 1986, **3**: 357 ~ 362.
- [5] Mesnage S, Tosi-Couture E, Goumon P, et al. *J Bacteriol*, 1998, **180**: 52 ~ 58.
- [6] Sleytr U B, Messner P, Pum D, et al. *Crystalline bacterial cell surface proteins*. Austin: Landes Company, Academic Press, 1996. 1 ~ 33.
- [7] Messner P, Allmaier G, Schaffer C, et al. *FEMS Microbiol Rev*, 1997, **20**(1 ~ 2): 25 ~ 46.
- [8] 孙 明, 朱晨光, 喻子牛. *微生物学报*, 2001, **41**(2): 141 ~ 147.
- [9] Etienne-Toumelin I, Sirard J C, Duflot E, et al. *J Bacteriol*, 1995, **177**(3): 614 ~ 620.
- [10] Schaffer C, Graninger M, Messner P. *Electrophoresis*, 2001, **22**(4): 248 ~ 261.
- [11] Pouwels P, Kolen C P A M, Boot H J. *FEMS Microbiol Rev*, 1997, **20**: 78 ~ 82.
- [12] Kuen B, Sara M, Lubitz W. *Mol Microbiol*, 1995, **19**: 495 ~ 503.
- [13] Tsuboi A, Uchihira R, Tabata R, et al. *J Bacteriol*, 1986, **168**: 365 ~ 373.
- [14] Pum D, Weinhandl M, Hodl C, et al. *J Bacteriol*. 1993, **175**(9): 2762 ~ 2766.
- [15] Sara M. *Trends Microbiol*, 2001, **9**(2): 47 ~ 49.
- [16] Mesnage S, Fontaine T, Mignot T, et al. *EMBO J*, 2000, **19**(17): 4473 ~ 4484.
- [17] Mesnage S. *Trends Microbiol*, 2001, **9**(2): 49 ~ 50.
- [18] Sara M, Sleytr U B. *Micron*, 1996, **27**: 141 ~ 156.
- [19] Pum D, Sleytr U B. *Trends Biotechnol*, 1999, **17**: 8 ~ 12.
- [20] Mesnage S, Tosi-Couture E, Fouet A. *Mol Microbiol*, 1999, **31**: 927 ~ 936.
- [21] Umelo-Njaka E, Nomellini J F, Bingle W H, et al. *Vaccine*, 2001, **19**(11 ~ 12): 1406 ~ 1415.
- [22] Simon B, Nomellini J, Chiou P, et al. *Dis Aquat Organ*, 2001, **44**(1): 17 ~ 27.
- [23] Mesnage S, Weber-Levy M, Haustant M, et al. *Infect Immun*, 1999, **67**(9): 4847 ~ 4850.