

细胞工厂的构建技术

芽胞表面展示技术研究进展

徐小曼¹, 王啸辰², 马翠卿¹

1 山东大学 微生物技术国家重点实验室, 济南 250100

2 四川大学生命科学学院, 成都 610065

摘要: 芽胞表面展示技术作为微生物表面展示技术的一种, 因所表达的异源蛋白无需经过跨膜过程及芽胞的抗逆性等独特优势而备受研究者的关注。以下介绍了芽胞的生理结构和形成过程、芽胞表面展示系统构建原则及目前所构建的芽胞表面展示系统种类。芽胞表面展示技术不仅在疫苗生产中应用广泛, 在生物催化和细胞工厂研究领域也具有广阔的应用前景。

关键词: 芽胞, 芽胞表面展示, 生物催化

Recent progress of the research on spore surface display

Xiaoman Xu¹, Xiaochen Wang², and Cuiqing Ma¹

1 State Key Laboratory of Microbial Technology, Shandong University, Jinan 250100, China

2 School of Life Science, Sichuan University, Chengdu 610065, China

Abstract: Spore surface display is one of attractive microorganism surface display systems. With the advantage of resistance attribute and specific assembly pattern, the technology of spore surface display now is attracting more and more attention. According to the current reports and main achievements of spore surface display, the structure and assembly of spores, the principle for construction and some existing spore surface display systems were elaborated in this paper. Now with the unique property of spores, the technique is not only widely used in production of vaccines but also has great applied potential in the field of biocatalysis and cell-factory.

Keywords: spore, spore surface display, biocatalysis

表面展示 (Surface display) 是一种有价值的基因操作技术, 它使表达的外源肽 (或蛋白质的结构域) 以融合蛋白形式展现在噬菌体或细胞的表面, 被展示的多肽或蛋白质可以保持相对独立的空间结构和生物活性, 因而可以用于多肽性质、相互识别和作用的研究, 以及构建大型的展示库。

第一个表面展示系统由 Geroge P. Smith 等于 1985 年建立, 他利用丝状噬菌体 M13 的 pIII 蛋白将抗体

固定在噬菌体表面, 为抗原的生产提供了一种新的技术和方法^[1]。该实验的成功使表面展示系统引起了研究学者们越来越广泛的关注, 并建立了多样的表面展示系统, 如噬菌体表面展示系统^[2]、酵母表面展示系统^[3]、细菌表面展示系统^[4]和新发展起来的芽胞表面展示系统^[1]。与噬菌体和细胞等表面展示系统相比, 虽然芽胞表面展示系统起步较晚, 但具有表达过程更为简捷有效的优点。由于芽胞具有特

Received: May 24, 2010; Accepted: July 19, 2010

Supported by: National Basic Research Program of China (973 Program) (No. 2007CB707803).

Corresponding author: Cuiqing Ma. Tel: +86-531-88364003; Fax: +86-531-88369463; E-mail: macq@sdu.edu.cn

国家重点基础研究发展计划 (973 计划) (No. 2007CB707803) 资助。

殊的生理结构, 使得融合蛋白在固定到表面的过程中无需经过穿膜过程, 大大增加了融合蛋白正确折叠和有效定位的效率, 同时借助芽胞的抗逆特性还可提高异源蛋白的稳定性^[5]。此外, 芽胞表面展示系统可固定多聚体蛋白在芽胞表面, 并且不影响其活性, 为多聚体蛋白的应用提供了一种新的方法^[6]。

目前芽胞表面展示技术的应用较为广泛。在活疫苗和抗体生产方面, 可用于将异源抗原决定簇固定在芽胞表面来引起特定抗原的抗体免疫应答。芽胞良好的抗逆性使疫苗能够耐受胃液中的酸性环境, 储存时间长, 可顺利通过胃肠屏障, 快速诱导机体产生保护性免疫反应。在蛋白或多肽的高通量筛选方面, 借助芽胞的特殊组装机制和抗逆特性, 可有效增加结合和淘洗的过程中所展示蛋白或多肽的稳定性。此外, 芽胞表面展示技术还应用于化学物质和重金属的生物吸附、构建生物传感器等方面(图 1)^[7]。随着科技的不断发展和进步, 芽胞表面展示技术在不断的变化更新, 其应用的领域和范围也在逐渐扩大。

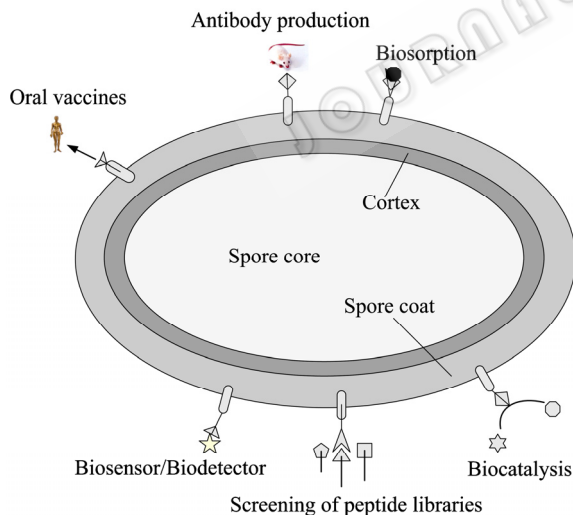


图 1 芽胞基本结构以及芽胞表面展示技术的应用^[6,8,16,18,21,23]

Fig. 1 Structure of spore and application of spore surface display^[6,8,16,18,21,23].

1 芽胞的组成

芽胞是有些细菌在饥饿或者环境恶劣的情况下形成的一种圆形或椭圆形的休眠体, 以抵抗不良环境。芽胞从外至内的结构为孢子外壁、芽胞衣、外

膜、皮层、内膜和核心^[8], 每部分行使不同的功能。芽胞的结构和化学组成在芽胞的抗逆性中起到了重要的作用。

孢子外壁是一层疏松的结构, 存在于少数特定的孢子外层, 尤其是蜡样芽胞杆菌 *Bacillus cereus* 属。芽胞衣是由多个分层和超过 50 种蛋白组成的复杂结构, 以规则严密的矩阵形式自组装形成, 并且多数蛋白都是芽胞基因特有的表达产物。芽胞衣使芽胞对化学试剂和外部溶菌酶具有抵抗作用, 防止含有染色体的核心被降解或被原生动动物吞噬, 但对热、辐射和一些其他的化学试剂的抵抗作用并不明显^[9-10]。外膜位于芽胞衣的内侧, 是芽胞形成不可或缺的结构, 但具体功能目前尚不明确。与芽胞的外膜相比, 芽胞内膜是具有选择性的透性屏障, 保护芽胞染色体 DNA 免于被一些化学试剂破坏。在芽胞中, 内膜呈现为一种紧密压缩的状态。

芽胞的皮层和核心是休眠孢子形成和保持较低水分的关键因素。皮层主要是由肽聚糖 (PG) 组成, 其结构与生长细胞中的肽聚糖结构类似但具有特殊的后修饰。当芽胞开始萌发时, 皮层会被降解, 为核心的膨胀和后续的细胞生长提供空间^[8,11]。芽胞的最内层是核心, 含有大部分的酶、染色体 DNA、核糖体和 tRNA。大部分情况下, 芽胞核心中的酶和核酸与生长细胞中基本相同, 但芽胞核心中的自由水含量非常低, 并含有一种特殊的小分子——嘧啶-2,6-二羧酸 (DPA)。DPA 的主要作用是在芽胞形成的过程中降低核心的含水量, 并且保护芽胞染色体免于受紫外光和化学物质的破坏^[8]。

2 芽胞的形成

芽胞的形成是一系列调控基因和结构基因严格按照时序性和空间性调控表达的过程。部分外界因素主要是细胞密度和营养环境会影响芽胞的形成, 而外部环境的改变最终影响到内部环境中芽胞形成的关键调节蛋白 Spo0A 的表达状态, 当 Spo0A 的含量和磷酸化水平达到一定阈值时, 可直接或间接调节菌体内的多个基因表达, 促使芽胞的形成^[12-13]。

芽胞的整个形成过程从开始到结束大约需要 8~10 h 左右。大致可分为 7 个步骤。首先当遇到恶劣环境时细胞开始形成休眠孢子以抵御外界不良环

境,此时细胞内的 σ^H 因子的活力开始增加,随后细胞被特定不均匀的隔膜进行不等分裂,形成一个大的母细胞和一个小的前芽胞,这时在前芽胞中 σ^F 因子开始活跃,而在母细胞中则是 σ^E 因子。不均等分裂完成后,母细胞的质膜逐渐包裹前芽胞,使前芽胞的外部包裹两层膜结构,随后被激活或合成的具有特定空间作用的 σ^G 因子和 σ^K 因子开始诱导前芽胞和母细胞中的基因表达,在前芽胞的内外两层膜中合成一层厚的糖蛋白皮层。在此过程中由GerE蛋白和 σ^K 因子相互协作共同引导基因表达的最后阶段,同时前芽胞质体的水分含量大大降低,从而使前芽胞内的pH值降低。前芽胞在此后的过程中逐渐充满在母细胞中合成的DPA,DPA可使得前芽胞在后续过程中继续脱水。随后在芽胞衣蛋白CotE、CotG和CotB的相互作用下,芽胞衣逐渐形成,覆盖在芽胞外;最后,母细胞被裂解释放出成熟的芽胞^[9]。

3 芽胞表面展示系统

在过去10年中,由于芽胞的特殊结构和生理性质,芽胞表面展示已成为抗体生产和酶催化的一种实用新型技术。2001年,Pozzi课题组以CotB为锚定蛋白将破伤风毒素展示在枯草芽胞杆菌芽胞表面,建立了第一个芽胞表面展示系统,提供了一种新型高效的抗原免疫模式^[14]。与其他表面展示系统相比,芽胞表面展示系统具有独特的优势:1) 客体蛋白在表面展示的过程中不需穿膜过程,因此提高了蛋白折叠效率和展示效率。2) 可展示分子量较大的蛋白。3) 可展示多聚体蛋白。4) 芽胞特有的抗逆性可增加客体蛋白的应用范围^[1]。

目前芽胞表面展示系统中的宿主应用最多的是枯草芽胞杆菌芽胞,因为目前枯草芽胞杆菌的芽胞研究的最为详细,并具有完整的基因组信息和完善的遗传操作体系,便于重组芽胞的构建;同时枯草芽胞杆菌是公认的益生菌,安全性高,可广泛应用于食品和药品领域^[14-15]。除枯草芽胞杆菌外,苏云金芽胞杆菌、炭疽芽胞杆菌、嗜热脂肪芽胞杆菌等也都曾被用作芽胞表面展示系统的宿主。

3.1 芽胞表面展示系统构建原则

芽胞表面展示系统由载体蛋白、目的蛋白和宿

主3部分组成,每一部分都是表面展示系统构建成功的关键,因此三者的选择非常重要。

20世纪90年代,许多不同的载体蛋白(锚定基序)被用于异源蛋白的表面展示,但部分被应用的细胞功能蛋白或结构蛋白,如外膜蛋白和细胞附属物的亚基,可导致细胞的生长缺陷和细胞膜不稳定。一个成功的载体蛋白必须符合4项要求。首先,它必须具有一个结构域可使异源蛋白展示在芽胞的表面;其次,它必须具有一个强大的锚定结构域,以保证融合蛋白能够固定在细胞表面而不被分开;第三,载体蛋白和外源蛋白必须兼容,可以形成融合蛋白,而不会出现由于外源蛋白的插入使载体蛋白或芽胞不稳定的现象;最后,载体蛋白必须具有一定抵抗培养基或周质空间中蛋白酶的能力^[7]。不同的载体蛋白具有不同的性质特点,可根据具体的展示系统来选择。目前用于枯草芽胞杆菌芽胞表面展示的载体蛋白主要为CotB、CotC和CotG,研究表明这些蛋白的缺失不会影响芽胞的形成和正常的出芽。

芽胞表面展示系统中的目的蛋白又称为客体蛋白,被展示在芽胞表面的客体蛋白是根据需要而选择的,但客体蛋白本身也可影响整个转运过程以及最终的表面展示结果。芽胞表面展示系统对客体蛋白的要求较低,不仅可展示分子量较大的蛋白还可展示多聚体蛋白,并且在展示到表面的过程中不影响蛋白的自身活力。

在表面展示系统中,宿主所起到的重要作用是不能忽略的。一个好的宿主必须能和客体蛋白兼容,易于培养而不被裂解,并且与细胞壁相关的蛋白酶和胞外蛋白酶的活力应尽量低^[7]。芽胞是杆状菌和梭菌在环境恶劣的情况下形成的一种休眠体结构,芽胞作为具有代谢能力的特殊结构,也可作为表面展示的宿主并具有其独特的优势。在芽胞表面展示时,可根据需要选择芽胞宿主。若固定的异源蛋白是用于进行免疫反应实验和疫苗的生产,或是用于生产医药、食品化合物和中间体等生物安全性要求较高的领域,可选择枯草芽胞杆菌作为芽胞表面展示的宿主菌株,因其是公认的益生菌,安全性较高。另外根据特殊的需要,一些致病菌株如苏云金芽胞杆菌、炭疽芽胞杆菌也可作为表面展示的宿主。

3.2 枯草芽胞杆菌芽胞表面展示系统

芽胞表面展示系统的构建主要是基于外源

DNA 与芽胞衣蛋白 DNA 的基因融合。目前, 芽胞外衣蛋白中已证实可用作锚定蛋白的有 3 种, 分别为 CotB、CotC 和 CotG。这 3 类蛋白常以多聚体的形式存在于富含酪氨酸的芽胞衣外层中。*cotB* 基因编码一段大小为 46 kDa 的多肽, 在经过翻译后修饰变为 66 kDa。CotC 是一个分子量只有 8.8 kDa 的小蛋白, 富含酪氨酸、赖氨酸和天冬氨酸, 而 CotG 是分子量为 24 kDa 的蛋白, 在核心区含有 9 个甘氨酸-丝氨酸-精氨酸的重复序列。对于 CotG 和 CotC 而言, 它们的整个序列常被用作锚定基序, 而对于 CotB 通常只涉及其中很短的一段序列^[1,14,16]。目前, 大多数的表面展示系统是利用 CotB 和 CotC 作为锚定蛋白来展示抗原, 应用于疫苗免疫等领域, 而 CotG 蛋白不仅可用来展示抗原, 还可应用于生物催化领域展示不同酶。

第一个芽胞表面展示系统是以 CotB 为锚定蛋白, 将具有高免疫原性的模式抗原破伤风毒素 C 末端 (TTFC) 展示在了枯草芽胞杆菌芽胞的表面。由 459 个氨基酸组成的破伤风毒素分别与 CotB 的 N 末端、有所缩短的 C 末端相连或直接插入到 CotB 序列中间, 随后将展示有 TTFC 的芽胞用于进行小鼠口腔和鼻内免疫反应实验。实验证明重组芽胞可同时引起鼠科动物粘膜和全系统的免疫应答^[14]。随后, 有研究者将表面展示有 CotB-TTFC 融合蛋白的芽胞在小鼠的体内培养, 发现小鼠血清中 TTFC 特异性抗体 IgG 产生了高水平应答^[17]。

除 CotB 外, 2004 年英国皇家霍洛威大学的 Cutting 课题组利用芽胞外衣蛋白 CotC 展示了 TTFC 和 LTB (大肠杆菌不耐热肠毒素)。通过基因融合的方式将 TTFC 和 LTB 的基因插入至 *cotC* 基因的 C 末端, 并利用染色体重组技术将融合基因插入枯草芽胞杆菌淀粉酶基因的位置, 得到可稳定遗传的重组菌株。通过体外注射的形式将表面展示有 TTFC 和 LTB 的芽胞注入小鼠体内, 发现 CotC-TTFC 重组芽胞不仅可引起局部免疫反应还可产生系统免疫反应, 而对于 CotC-LTB 重组芽胞, 其局部免疫应答比全身免疫应答更为有效。与 CotB-TTFC 相比, CotC-TTFC 重组芽胞在进行小鼠口服免疫实验时的剂量低了 2 倍, 但同样可产生保护性免疫应答。然而对于 CotB-TTFC 重组芽胞可抵抗 50 倍抗毒素半

数致死量的能力, CotC-TTFC 重组芽胞 20 倍的抵抗能力显得稍弱。此外, 该研究还发现, 体外注射的一小部分完整芽胞可穿过黏膜到达派氏淋巴结, 并可与肠道相关淋巴组织相互作用, 芽胞的这种能力对细胞内的免疫反应具有重要的指导意义^[18]。

中国广州中山大学的 Yu 课题组同样利用 CotC 将华支睾吸虫外壳蛋白 TP20.8 展示在枯草芽胞杆菌芽胞的表面, 并将重组的芽胞以口服的形式注入小鼠体内, 发现在小鼠体内产生了黏膜应答, 并且提高了 IgA 的分泌水平。IgA 在动物体内具有重要的生理作用, 它可聚集病原体、抑制病原体的移动、防止其与上皮细胞的发生吸附。因此, 芽胞表面展示系统可作为防止和控制寄生虫的有效免疫工具^[19]。

2005 年, 韩国 Kim 课题组以 CotG 为载体蛋白, 将链霉菌的链霉素基因插入 *cotG* 基因的 C 末端, 然后将链霉素以融合蛋白的形式展示在枯草芽胞杆菌芽胞表面。链霉素的活性形式同四聚体, 并且在活性蛋白中具有 4 个生物素结合位点。生物素是生物体内重要的生理活性物质, 易与蛋白、核酸和碳水化合物等生物分子相结合, 因此利用展示有链霉素的芽胞可非常有效地检测与生物素相结合的生物分子。就目前链霉素的生产方法, 其 DNA 序列中的高 GC 含量、细胞内生物素的结合以及四聚体的活性形式都限制了链霉素的细胞内表达及活性分子的分泌, 而利用芽胞表面展示系统可有效解决这些问题^[16]。2006 年, 该课题组又以 CotG 为载体蛋白将绿色荧光蛋白 (GFP) 展示在芽胞表面, GFP 在紫外光的激发下可产生绿色荧光, 表面展示有 GFP 的芽胞在紫外线下有荧光出现而没有 GFP 的芽胞则没有荧光产生。根据这一特性, GFP 可作为报告基因, 用于鉴定其他的可用作锚定基序的外层芽胞衣蛋白^[20]。

除了用于展示抗原外, 芽胞表面展示系统也可用于生物催化过程。2007 年韩国 Pan 课题组以 CotG 为载体蛋白将大肠杆菌的 β -半乳糖苷酶展示在枯草芽胞杆菌芽胞表面。具有生物活性的 β -半乳糖苷酶是以同四聚体的形式存在的, 每个单体的分子量为 116 kDa, 常被用作生物学研究中的报告蛋白。表面展示有 β -半乳糖苷酶的芽胞经由流式细胞仪检测和蛋白酶可及性测试 (Protease accessibility test) 验证

发现, 相对于其他的细菌表面展示系统, 芽胞表面展示系统对展示的客体蛋白没有大小和多聚体的限制。 β -半乳糖苷酶除了可水解乳糖为葡萄糖和半乳糖外, 还可催化水-有机溶剂两相系统中的糖基转移反应, 产生烷基- β -半乳糖苷——一种具有抗微生物活性的药物中间体。与游离的 β -半乳糖苷酶相比, 展示在芽胞表面的 β -半乳糖苷酶在有机溶剂, 尤其是乙醚、甲苯、乙酸乙酯及乙腈中的稳定性大大增加, 同时热稳定性也有所增加。通过芽胞表面展示的方法, 不仅酶在有机溶剂中低稳定性的问题得到了有效解决, 而且还消除了由于酶和底物分散在两相引起的传质问题^[1,6]。

3.3 其他芽胞表面展示系统

在土壤中存在很多杆菌尤其是腐生物, 大多数不是致病菌, 但是蜡样芽胞杆菌 *B. cereus*、炭疽芽胞杆菌 *B. anthracis* 和苏云金芽胞杆菌 *B. thuringiensis* 对动物和昆虫是病原微生物。这些病原微生物与腐生物的芽胞结构与枯草芽胞杆菌芽胞的结构不同, 在其最外层有一层孢子外壁。孢子外壁包裹在芽胞衣外, 由基本的类晶体层和外部毛发般的绒毛组成^[1]。孢子外壁中的一些蛋白同样可作为表面展示系统中的载体蛋白, 并且已有成功的报道。

2008 年, 美国密苏里州立大学的研究者们分别克隆了不同长度的炭疽芽胞杆菌孢子外壁类糖蛋白 BclA 和 BclB 的基因, 将其连入芽胞表面展示的表达载体中, 以 BclA 的启动基因为启动子, 以绿色荧光蛋白为报告基因, 验证了 BclA 和 BclB 作为表面展示系统中锚定蛋白的功能, 同时还阐述了 BclA 在孢子外壁中的组装模式。该研究发现 BclA 的 N 末端对蛋白在芽胞表面的定位起着至关重要的作用, 而 C 末端的最后 35 个氨基酸不是 BclA 行使生物功能的必须区域, 可作为外源蛋白的替代区域; 与 BclA 不同, BclB 在母细胞中的含量较少, 并且组装机制与 BclA 不同, 可能与其 N 末端的结构有关, 但这并不影响其在芽胞表面展示系统中行使锚定蛋白的功能。利用炭疽芽胞杆菌芽胞表面展示系统所固定的疫苗, 在抵抗炭疽热和其他具有生物威胁性的试剂方面更为安全有效, 使炭疽芽胞杆菌成为极具前途的重组疫苗运输载体之一。此外, 使用芽胞作为疫苗载体可同时引发 Th1 和 Th2 免疫反应, 而现有

的 AVA 疫苗则不能, 因此将某些异源蛋白如具生物威胁性个体 (Biothreat agents) 的表面蛋白展示在芽胞的表面, 可有效建立针对一系列病原微生物的多样疫苗^[21]。

除炭疽芽胞杆菌外, 苏云金芽胞杆菌芽胞也可作为芽胞表面展示系统中的宿主^[22-23]。2004 年, 韩国 Choi 课题组首次以苏云金芽胞杆菌芽胞为载体, 展示了绿色荧光蛋白, 并借助酶联免疫吸附技术、微阵列技术和微接触印刷技术, 构建芽胞微模式模型 (Micro pattern)。微模式在高通量细胞分析系统、高灵敏细胞生物传感器的建立和稀有元素的探测方面具有巨大的发展潜力, 而芽胞微模式在传感器和探测器领域与传统的细胞微模式相比, 具有更高的稳定性并且便于操作, 因此芽胞表面展示技术在生物传感方面的应用前景也十分广阔^[23]。

苏云金芽胞杆菌的芽胞含有一个大小为 130 kDa 的原毒素蛋白, 是芽胞层的重要组成部分, 属于杀虫晶体蛋白 Cry1Ac 亚群, 形成最初位于孢子外壁的伴孢晶体。有学者推测伴孢晶体的 N 末端暴露在芽胞表面, 而 C 末端则在芽胞衣内与蛋白相连。目前 GFP 和识别化学组分的单链抗体 (ScFv) 这两种客体蛋白通过替代载体蛋白 N 末端、形成融合蛋白的方法已成功展示在芽胞表面^[24]。利用苏云金芽胞杆菌芽胞进行表面展示的优势一方面是其产孢率较高, 产孢率可达 98%~100%; 另一方面客体蛋白仅存在于伴孢晶体, 而伴孢晶体并不是整个芽胞所必须的结构, 因此其展示的空间不受限制, 而在枯草芽胞杆菌芽胞表面展示系统中融合蛋白与其原始的芽胞衣蛋白在空间上存在竞争作用, 因此展示效率低于苏云金芽胞表面展示系统^[1,24]。虽然苏云金芽胞杆菌芽胞表面展示系统较其他芽胞表面展示具有独特的优势, 但由于其具有致病性, 所以苏云金芽胞杆菌的生物安全性问题仍需考虑。

4 展望

近 10 年来, 由于芽胞独特的优势, 芽胞表面展示技术逐渐受到越来越多的关注。芽胞独特的抗逆性, 使芽胞在恶劣环境中具有抵抗热、化学试剂和辐射的能力, 同时枯草芽胞杆菌是公认的生物安全菌株, 因此枯草芽胞杆菌芽胞在医药领域有着广泛

的应用。

以枯草芽胞杆菌芽胞为载体生产的口服疫苗,克服了传统可溶性口服疫苗在肠胃中耐受性差、易被降解、吸收有限的缺陷。芽胞良好的抗逆性使疫苗能够耐受胃液中的酸性环境,储存时间长,可顺利通过胃肠屏障,快速诱导机体产生保护性免疫反应。不仅口服疫苗可诱导机体正常的免疫应答,腹膜注射仍然可以产生免疫应答,使枯草芽胞杆菌芽胞在疫苗领域的应用极为广泛。

现在,芽胞表面展示技术不仅在疫苗领域得到广泛应用,在生物催化和细胞工厂研究领域也越来越受重视。芽胞表面展示技术作为酶固定化方式的一种,无需纯化蛋白,可直接将异源蛋白固定在载体芽胞表面,免去繁琐的酶纯化过程,使生物催化过程更加便捷高效;同时展示在芽胞表面的蛋白借助芽胞的抗逆性,在恶劣环境中的稳定性也大大增加,为高附加值化合物的工业生产提供了重要参考。

REFERENCES

- [1] Kim J, Schumann W. Display of proteins on *Bacillus subtilis* endospores. *Cell Mol Life Sci*, 2009, **66**: 3127–3136.
- [2] Bair CL, Oppenheim A, Trostel A, et al. A phage display system designed to detect and study protein-protein interactions. *Mol Microbiol*, 2008, **67**: 719–728.
- [3] Durauer A, Berger E, Zandian M, et al. Yeast cell surface display system for determination of humoral response to active immunization with a monoclonal antibody against EpCAM. *J Biochem Biophys Methods*, 2008, **70**: 1109–1115.
- [4] He MX, Feng H, Zhang YZ. Construction of a novel cell-surface display system for heterologous gene expression in *Escherichia coli* by using an outer membrane protein of *Zymomonas mobilis* as anchor motif. *Biotechnol Lett*, 2008, **30**: 2111–2117.
- [5] Driks A. Overview: development in bacteria: spore formation in *Bacillus subtilis*. *Cell Mol Life Sci*, 2002, **59**: 389–391.
- [6] Kwon SJ, Jung HC, Pan JG. Transgalactosylation in a water-solvent biphasic reaction system with beta-galactosidase displayed on the surfaces of *Bacillus subtilis* spores. *Appl Environ Microbiol*, 2007, **73**: 2251–2256.
- [7] Lee SY, Choi JH, Xu Z. Microbial cell-surface display. *Trends Biotechnol*, 2003, **21**: 45–52.
- [8] Setlow P. Spores of *Bacillus subtilis*: their resistance to and killing by radiation, heat and chemicals. *J Appl Microbiol*, 2006, **101**: 514–525.
- [9] Driks A. *Bacillus subtilis* spore coat. *Microbiol Mol Biol Rev*, 1999, **63**: 1–20.
- [10] Driks A. The *Bacillus* spore coat. *Phytopathology*, 2004, **94**: 1249–1251.
- [11] Setlow P. Spore germination. *Curr Opin Microbiol*, 2003, **6**: 550–556.
- [12] Hilbert DW, Piggot PJ. Compartmentalization of gene expression during *Bacillus subtilis* spore formation. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2004, **68**: 234–262.
- [13] Molle V, Fujita M, Jensen ST, et al. The Spo0A regulon of *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol*, 2003, **50**: 1683–1701.
- [14] Istickato R, Cangiano G, Tran HT, et al. Surface display of recombinant proteins on *Bacillus subtilis* spores. *J Bacteriol*, 2001, **183**: 6294–6301.
- [15] Kunst F, Ogasawara N, Moszer I, et al. The complete genome sequence of the gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. *Nature*, 1997, **390**: 249–256.
- [16] Kim JH, Lee CS, Kim BG. Spore-displayed streptavidin: a live diagnostic tool in biotechnology. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, **331**: 210–214.
- [17] Ciabattini A, Parigi R, Istickato R, et al. Oral priming of mice by recombinant spores of *Bacillus subtilis*. *Vaccine*, 2004, **22**: 4139–4143.
- [18] Mauriello EM, Duc le H, Istickato R, et al. Display of heterologous antigens on the *Bacillus subtilis* spore coat using CotC as a fusion partner. *Vaccine*, 2004, **22**: 1177–1187.
- [19] Zhou Z, Xia H, Hu X, et al. Immunogenicity of recombinant *Bacillus subtilis* spores expressing *Clonorchis sinensis* tegumental protein. *Parasitol Res*, 2008, **102**: 293–297.
- [20] Kim JH, Roh C, Lee CW, et al. Bacterial surface display of GFP(UV) on *Bacillus subtilis* spores. *J Microbiol Biotechnol*, 2007, **17**: 677–680.
- [21] Thompson BM, Stewart GC. Targeting of the BclA and BclB proteins to the *Bacillus anthracis* spore surface. *Mol Microbiol*, 2008, **70**: 421–434.
- [22] Park TJ, Choi SK, Jung HC, et al. Spore display using *Bacillus subtilis* exosporium protein InhA. *J Microbiol Biotechnol*, 2009, **19**: 495–501.
- [23] Park TJ, Lee KB, Lee SJ, et al. Micropatterns of spores displaying heterologous proteins. *J Am Chem Soc*, 2004, **126**: 10512–10513.
- [24] Du C, Chan WC, McKeithan TW, et al. Surface display of recombinant proteins on *Bacillus thuringiensis* spores. *Appl Environ Microbiol*, 2005, **71**: 3337–3341.