

SpyCatcher-SpyTag 共价偶联系统中的结构特征及应用现状

孙晓萌

高分子的生物合成受到许多因素的影响^[1-3], 然而实现拓扑结构的精准控制才是大分子研究领域的最大挑战。近年来, 研究者通过蛋白质骨架应用、化学交联及基因融合等技术构建了多个蛋白质复合体^[4-5], 但是上述组装模块存在许多问题, 如引入半胱氨酸残基造成二硫键干扰、蛋白载体局限等。随后在探索和发掘新型模块化组装技术过程中研究者发现基于异肽键的 SpyCatcher-SpyTag 共价偶联系统可以实现蛋白质空间结构的精准控制^[6]。构建稳定且具有普适性的异肽键系统在大分子拓扑结构精准控制领域具有重要意义。

1 异肽键

肽键是指一分子氨基酸的 α -羧基和另一分子氨基酸的 α -氨基脱水缩合形成的酰胺键, 是蛋白质一级结构的基础。该反应由核糖体催化完成并由 DNA 遗传序列定义。然而, 少数蛋白质含有第二类肽键, 称为异肽键。它是指蛋白质序列中氨基酸之间至少有一个非 α 位的氨基或羧基参与而形成的不可逆的酰胺键。作为酰胺键, 该共价键也具有稳定的稳定性且广泛存在于革兰氏阳性菌的菌毛蛋白中^[7]。近年来, 人们利用异肽键作为分子粘合剂在疫苗合成、细菌纳米生物反应器以及蛋白质水凝胶等领域开展了一系列研究工作。

人们最早在猪粪分离出的 HK97 噬菌体衣壳蛋白组装过程中发现氨基酸之间可以自发形成异肽键^[8], 而后又在化脓性链球菌 (*Streptococcus pyogenes*) 菌毛蛋白中再次得以验证^[9]。随着研究的不断深入, 人们总结出: 在目前已知细菌中, 异肽键常见于革兰氏阳性菌; 异肽键主要存在于两大类成分中——微生物表面成分识别黏附基质分子 (microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules, MSCRAMMs) 和菌毛^[10]。在这些 MSCRAMMs 和菌毛中, 异肽键不断地自发形成, 增强了蛋白质和菌毛的稳定性。

异肽键的形成可以分为脱氨和脱水两种形式。赖氨酸在谷氨酸催化下亲核攻击天冬酰胺, 该过程释放一分子氨并自发形成异肽键^[9]。与此类似, 赖氨酸在谷氨酸参与下亲核攻击天冬氨酸, 通过释放一分子水形成酰胺键^[11] (图 1)。

2 SpyCatcher-SpyTag 系统

源于化脓性链球菌黏连蛋白 FbaB 中 CnaB2 结构域的 SpyCatcher-SpyTag 模体可形成稳定且特异的酰胺键, 为

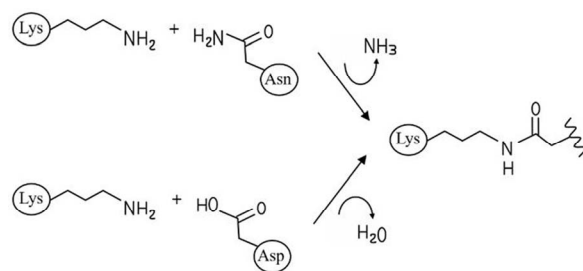


图 1 异肽键形成机制^[12]

模块化蛋白质的构建提供了基础^[13-14]。CnaB2 结构域被分为两个部分: 较大的、不完整的、由 138 个残基 (15 kD) 组成的免疫球蛋白样结构域 (称为 SpyCatcher) 和一个有 13 个残基的短肽 (称为 SpyTag)。SpyCatcher 包含反应性赖氨酸和催化用谷氨酸, 而 SpyTag 包含反应性天冬氨酸, 这两个组件可以高亲和力识别彼此。

另外, 基于另一种革兰氏阳性菌表面蛋白——肺炎链球菌的黏附素 RrgA, 研究人员已经开发出了类似的系统^[15-16]。RrgA 的 D4 结构域可自发形成异肽键。与 CnaB2 结构域类似, 该结构域也可以分为一个大的支架蛋白 (称为 SnoopCatcher) 和一个只有 12 个氨基酸残基的短肽 (称为 SnoopTag)。与 SpyCatcher-SpyTag 一样, SnoopCatcher 与 SnoopTag 两者混合后能够迅速形成不可逆的共价键。然而不同的是反应性赖氨酸存在于 SnoopTag 中, 反应性天冬氨酸存在于 SnoopCatcher 中, 因而该系统与 SpyCatcher-SpyTag 正交, 即 SnoopCatcher 不与 SpyTag 反应, SpyCatcher 也不与 SnoopTag 反应。这使得在设计一种疫苗时可同时使用这两种系统, 因而扩展了模块化多蛋白协作方式, 为精准设计多蛋白复合体提供了双轨道 (表 1)。

表 1 Catcher-Tag 系统氨基酸序列

Catcher 名称	Tag 名称	Tag 氨基酸序列	来源
SpyCatcher	SpyTag	AHIVMVDAYKPTK	[14]
SpyCatcher Δ N1 Δ C1	SpyTag	AHIVMVDAYKPTK	[17]
SnoopCatcher	SnoopTag	KLGDIIEFIKVNK	[16]
SpyCatcher002	SpyTag002	VPTIVMVDAYKRYK	[18]

作者单位: 130031 吉林, 长春医学高等专科学校基础医学部, Email:

xiaomeng_sonia@sina.com

收稿日期: 2021-07-01

2.1 SpyCatcher-SpyTag 系统的常规应用

作为快速、可靠、不可逆的肽-蛋白质偶联工具, SpyCatcher-SpyTag 系统是在生物大分子研究领域从药物递送到检测工具、疫苗研发的理想选择^[19-21]。

2.1.1 Spy 环 SpyCatcher-SpyTag 系统的主要应用是形成 Spy 环 (SpyRings), 即通过将蛋白质氨基酸 N 末端融合 SpyTag, C 末端融合 SpyCatcher, 两者间可自发形成共价键, 从而使蛋白质发生环化, 反之亦然。该环化过程可以增强蛋白质对变性的抵抗, 减缓蛋白质的降解^[22]。

2.1.2 水凝胶 SpyCatcher-SpyTag 系统的另一个用途是工程蛋白水凝胶, 如作为医疗材料人工胞外基质、人体工程组织、细胞培养基等^[23-25]。水凝胶是一种聚合材料, 可模拟特定组织的细胞外环境, 满足生理功能与结构要求, 同时也可以作为分子传递的载体。研究人员利用 SpyCatcher 与聚合材料融合, 再将 SpyTag 融合蛋白与其混合即可实现特定微环境的模拟^[26-27]。SpyCatcher-SpyTag 系统作为稳定、快速的偶联工具, 可以将不同的靶分子掺入或呈递到水凝胶中或者表面, 从而避免了费力的工程过程, 实现了靶分子的精准定位。

2.1.3 合成疫苗 将 SpyCatcher 与不动杆菌噬菌体 AP205 衣壳蛋白基因融合并在大肠杆菌系统中表达及组装, 组装后 SpyCatcher 可均匀分布在病毒样颗粒的表面。再将 SpyTag 融合外源性抗原的产物与病毒样颗粒混合即可通过形成异肽键获得二价或多价病毒样颗粒^[28-30]。这种蛋白质组装策略可有效激活免疫系统。此外, 研究人员在个体化精准治疗领域也将异肽键灵活运用于抗体标记、示踪、药物递送等, 成功地实现了特定蛋白质结合位点的扩展^[31]。

2.1.4 纳米生物反应器 基于 SpyCatcher-SpyTag 系统构建的立体几何规则的纳米级颗粒, 若在其表面融合酶等大分子可用于生物催化反应^[32]。将一种酶与 SpyCatcher 进行重组, 并与连接在大肠杆菌膜上的 SpyTag 混合可自发形成异肽键。这样酶即固定在大肠杆菌上形成了稳定的功能性生物膜结构^[33]。这种带有某种酶的改良型生物膜可以在广泛的环境条件下维持有效活性, 具有良好的延展性。

2.2 SpyCatcher-SpyTag 系统在细菌致病因子中的应用

随着对 SpyCatcher-SpyTag 系统研究的不断加深, 人们也将视野放宽至更广阔的领域, 特别是对革兰氏阴性菌的研究。最近该系统被用于调查革兰氏阴性菌的致病因子, 特别是自转运蛋白。自转运蛋白也被称为 V 型分泌系统, 是革兰氏阴性菌分泌蛋白家族成员。该家族中许多蛋白与毒力介导相关^[34]。

相比革兰氏阳性菌, 革兰氏阴性菌细胞表面是以外膜 (outer membrane, OM) 为代表的复杂的、不对称的脂质双分子层。外膜表面主要由脂多糖和外膜蛋白构成, 包含许多常见的用于黏附、迁移和分泌的致病因子, 如自转运黏附素、鞭毛等^[35-36]。在研究外膜蛋白的表达、分泌、迁移及相互作用时需要通过报告蛋白或其他荧光团进行标记, 然而目前该技术仍具挑战。虽然可以通过基因融合的方式表达报告

基因, 但是许多荧光报告基因无法在细胞周质中成熟^[37], 因而基因融合表达系统在蛋白示踪领域应用较少。一个较为理想的方法是利用非共价键结合或者通过蛋白质相互作用进行定位、示踪。然而, 非共价键需要高亲和力以使荧光标记能够与蛋白质维持长时间的结合, 蛋白交互作用由于占位等原因可能干扰其他外膜蛋白。为应对这些挑战, 研究人员采用 SpyCatcher-SpyTag 系统通过高特异性共价标记外膜结合的致病因子从而发挥了探针的作用, 解决了传统致病因子研究中的难点。系统中 SpyTag 为线性短肽, 解决了空间位阻问题, 为研究蛋白质交互作用、蛋白荧光标记提供了优化方案, 为基于细菌致病因子开发疫苗提供了便利。

2.3 SpyCatcher-SpyTag/SnoopCatcher-SnoopTag 正交系统的应用

多样模块化的偶联系统构建了可塑性高、时间成本低的研究工具, 也为实现个体化精准医疗提供了选择。研究人员利用该正交系统在甲羟戊酸生物合成途径中组装了多个关键酶, 从而极大地提高了产量^[38]; 以烟草花叶病毒 (TMV) 病毒样颗粒 (VLP) 作为蛋白质支架, 正交反应蛋白作为接头模块, 在大肠杆菌中可组装三种萜烯生物合成酶^[39]。这些例子说明在多酶复合物体系中, 应用 SpyCatcher-SpyTag/SnoopCatcher-SnoopTag 正交系统可以协同生物合成, 改善细胞内代谢通量, 并促使人们获得更高产品产量。

2.4 SpyCatcher-SpyTag/SnoopCatcher-SnoopTag 正交系统的优势

该正交系统最大的价值在于对蛋白质工程中的拓扑调控。拓扑在数学上是指点、线和多边形在不断变换中所保持不变的空间性质, 而在化学领域中则是被用来描述分子在化学键不断裂的前提下保有的原子间和肽链间的连接关系和空间关系。在分子中, 拓扑结构常常是调控高分子物理性能与功能的重要参数。利用异肽键的特异性与紧密结合的特点, 可赋予蛋白质特定的拓扑结构, 使其兼具稳定性与生物功能。

另外, 值得一提的是该系统将蛋白质工程模块化。模块的概念从建筑学引申至生物医学领域。人们可通过模块组合满足定制需求, 这样就可以创建不同需求的生物产品。同时该产品也可基于经验与相似性而进行二次加工再利用, 这大大缩减了产品研究的生命周期; 减轻了产品工程复杂程度, 使得 SpyCatcher-SpyTag/SnoopCatcher-SnoopTag 正交系统所携带的功能区既为整体服务, 又发挥了特定靶点研究的作用。

相比传统的 His-Tag-Ni-NTA 连接系统、生物素链霉素和素系统, 该正交系统突破了底物分子大小、亲和力强弱的限制, 为基于该系统的偶联工具在多个领域的开发与灵活应用拓展了空间。

2.5 SpyCatcher-SpyTag/SnoopCatcher-SnoopTag 正交系统的劣势

该正交系统相关研究仍处于初级阶段, 特别是对于 SnoopCatcher-SnoopTag 的研究很少, 可能需要进一步的验

证。其中值得注意的是尚不清楚 SpyCatcher-SpyTag/SnoopCatcher-SnoopTag 正交系统本身是否会引起强烈的免疫应答,这限制了其在疫苗领域中的应用。

3 结语

基于异肽键的分子偶联系统具有良好的稳定性及可操作性,在多个领域具有广阔的应用前景。其中,可修饰的 SpyCatcher-SpyTag 系统为模块化精准控制蛋白质拓扑结构,构建多价疫苗快速生产体系提供了新思路。

参考文献

- [1] Dever TE, Kinzy TG, Pavitt GD. Mechanism and regulation of protein synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 2016, 203(1):65-107.
- [2] Anisimova AS, Alexandrov AI, Makarova NE, et al. Protein synthesis and quality control in aging. *Aging (Albany NY)*, 2018, 10(12):4269-4288.
- [3] Ingolia NT, Hussmann JA, Weissman JS. Ribosome profiling: Global views of translation. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2019, 11(5):a032698.
- [4] Yang W, Lee KW, Srivastava RM, et al. Immunogenic neoantigens derived from gene fusions stimulate T cell responses. *Nat Med*, 2019, 25(5):767-775.
- [5] Chichester JA, Green BJ, Jones RM, et al. Safety and immunogenicity of a plant-produced Pfs25 virus-like particle as a transmission blocking vaccine against malaria: a phase 1 dose-escalation study in healthy adults. *Vaccine*, 2018, 36(39):5865-5871.
- [6] Wang R, Sun F. The Spy that links: Creation of nonlinear protein architectures and materials using SpyTag/SpyCatcher chemistry. *Methods Enzymol*, 2021, 647:283-301.
- [7] Zakeri B, Howarth M. Spontaneous intermolecular amide bond formation between side chains for irreversible peptide targeting. *J Am Chem Soc*, 2010, 132(13):4526-4527.
- [8] Dhillon EK, Dhillon TS, Lai AN, et al. Host range, immunity and antigenic properties of lambdoid coliphage Hk97. *J Gen Virol*, 1980, 50(1):217-220.
- [9] Kang HJ, Coulibaly F, Clow F, et al. Stabilizing isopeptide bonds revealed in gram-positive bacterial pilus structure. *Science*, 2007, 318(5856):1625-1628.
- [10] Baker EN, Squire CJ, Young PG. Self-generated covalent cross-links in the cell-surface adhesins of Gram-positive bacteria. *Biochem Soc Trans*, 2015, 43(5):787-794.
- [11] Reddington SC, Howarth M. Secrets of a covalent interaction for biomaterials and biotechnology: SpyTag and SpyCatcher. *Curr Opin Chem Biol*, 2015, 29:94-99.
- [12] Hatlem D, Trunk T, Linke D, et al. Catching a SPY: using the SpyCatcher-SpyTag and related systems for labeling and localizing bacterial proteins. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(9):2129.
- [13] Terao Y, Kawabata S, Nakata M, et al. Molecular characterization of a novel fibronectin-binding protein of *Streptococcus pyogenes* strains isolated from toxic shock-like syndrome patients. *J Biol Chem*, 2002, 277(49):47428-47435.
- [14] Zakeri B, Fierer JO, Celik E, et al. Peptide tag forming a rapid covalent bond to a protein, through engineering a bacterial adhesin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012, 109(12):E690-E697.
- [15] Izoré T, Contreras-Martel C, El Mortaji L, et al. Structural basis of host cell recognition by the pilus adhesin from *Streptococcus pneumoniae*. *Structure*, 2010, 18(1):106-115.
- [16] Veggiani G, Nakamura T, Brenner MD, et al. Programmable polypeptides built using twin peptide superglues. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2016, 113(5):1202-1207.
- [17] Li L, Fierer JO, Rapoport TA, et al. Structural analysis and optimization of the covalent association between SpyCatcher and a peptide Tag. *J Mol Biol*, 2014, 426(2):309-317.
- [18] Keeble AH, Banerjee A, Ferla MP, et al. Evolving accelerated amidation by SpyTag/SpyCatcher to analyze membrane dynamics. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2017, 56(52):16521-16525.
- [19] Brune KD, Howarth M. New routes and opportunities for modular construction of particulate vaccines: stick, click, and glue. *Front Immunol*, 2018, 9:1432.
- [20] Fierer JO, Veggiani G, Howarth M. SpyLigase peptide-peptide ligation polymerizes affibodies to enhance magnetic cancer cell capture. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2014, 111(13):E1176-E1181.
- [21] Brune KD, Leneghan DB, Brian IJ, et al. Plug-and-display: decoration of virus-like particles via isopeptide bonds for modular immunization. *Sci Rep*, 2016, 6:19234.
- [22] Xu C, Xu Q, Huang H, et al. Enhancing the stability of trehalose synthase via SpyTag/SpyCatcher cyclization to improve its performance in industrial biocatalysts. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2018, 82(9):1473-1479.
- [23] Langer R, Tirrell DA. Designing materials for biology and medicine. *Nature*, 2004, 428(6982):487-492.
- [24] Guilak F, Butler DL, Goldstein SA, et al. Biomechanics and mechanobiology in functional tissue engineering. *J Biomech*, 2014, 47(9):1933-1940.
- [25] Caliri SR, Burdick JA. A practical guide to hydrogels for cell culture. *Nat Methods*, 2016, 13(5):405-414.
- [26] Gao X, Fang J, Xue B, et al. Engineering protein hydrogels using SpyCatcher-SpyTag chemistry. *Biomacromolecules*, 2016, 17(9):2812-2819.
- [27] Alam MK, Brabant M, Viswas RS, et al. A novel synthetic trivalent single chain variable fragment (tri-scFv) construction platform based on the SpyTag/SpyCatcher protein ligase system. *BMC Biotechnol*, 2018, 18(1):55.
- [28] Yenkindok-Douti L, Williams AE, Canepa GE, et al. Engineering a virus-like particle as an antigenic platform for a Pfs47-targeted malaria transmission-blocking vaccine. *Sci Rep*, 2019, 9(1):16833.
- [29] Fierle JK, Abram-Saliba J, Brioschi M, et al. Integrating SpyCatcher/SpyTag covalent fusion technology into phage display workflows for rapid antibody discovery. *Sci Rep*, 2019, 9(1):12815.
- [30] Schoene C, Fierer JO, Bennett SP, et al. SpyTag/SpyCatcher cyclization confers resilience to boiling on a mesophilic enzyme. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2014, 53(24):6101-6104.
- [31] Siegmund V, Piater B, Zakeri B, et al. Spontaneous isopeptide bond formation as a powerful tool for engineering site-specific antibody-drug conjugates. *Sci Rep*, 2016, 6:39291.
- [32] Sharma J, Douglas T. Tuning the catalytic properties of P22 nanoreactors through compositional control. *Nanoscale*, 2020, 12(1):336-346.

- 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 2020 年版一部. 北京: 中国医药科技出版社, 2020.
- [4] Jin J. Comparison of different methods for detection of *Salmonella enteritidis*. *Chin J Sch Doctor*, 2018, 32(2):139-140, 142. (in Chinese)
金晶. 肠炎沙门菌不同检测方法比较. *中国校医*, 2018, 32(2):139-140, 142.
- [5] Sun YL, Wu B, Qin C, et al. Studies on culture conditions of *Salmonellae* in food. *Chin J Microecol*, 2006, 18(1):48, 52. (in Chinese)
孙玉岭, 吴斌, 秦成, 等. 食品中沙门菌培养条件的研究. *中国微生物学杂志*, 2006, 18(1):48, 52.
- [6] Chen HJ, Zhang CP, Li JG, et al. Effect of different enrichment broth and culture medium on isolation effects of *Salmonella*. *China Poultry*, 2011, 33(24):20-23. (in Chinese)
陈惠娟, 张纯萍, 李金贵, 等. 不同增菌液和培养基对沙门菌分离效果的比较研究. *中国家禽*, 2011, 33(24):20-23.
- [7] Yang LJ, Ye L, Zhao YM, et al. Feature of *Salmonella* and its research progress in detection. *China Feed*, 2019, (17):93-97. (in Chinese)
杨凌君, 叶玲, 赵奕敏, 等. 沙门氏菌的特征及检测方法研究进展. *中国饲料*, 2019, (17):93-97.
- [8] Zhang P, Feng F. Research progress of *Salmonella* detection techniques and methods. *J Food Saf Qual*, 2015, (5):1834-1841. (in Chinese)
张萍, 冯芳. 沙门氏菌的检测技术和方法的研究进展. *食品安全质量检测学报*, 2015, (5):1834-1841.
- [9] Chen DN, Han YY, Li J, et al. Establishment of a real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction assay for rapid detection of *Salmonella* in stool samples of humans and animals. *Dis Surveill*, 2020, 35(2):151-155. (in Chinese)
陈丹妮, 韩营营, 李杰, 等. 利用实时荧光定量聚合酶链式反应快速检测人及动物粪便中的沙门菌. *疾病监测*, 2020, 35(2):151-155.
- [10] Tian S, Guo WG, Bao RL, et al. Establishment of rapid detection method for salmonella by real-time fluorescence quantitative PCR. *Lett Biotechnol*, 2019, 30(6):805-809, 816. (in Chinese)
田赛, 郭卫光, 包仁龙, 等. 沙门菌实时荧光定量 PCR 快速检测方法的建立. *生物技术通讯*, 2019, 30(6):805-809, 816.
- [11] Liu XP, Li JL, Xiong J, et al. Establishment of PCR method for detecting foodborne *Salmonella*. *Chin J Health Lab Technol*, 2017, 27(24):3548-3550. (in Chinese)
刘绪平, 李景莲, 熊骏, 等. 食源性沙门菌 PCR 检测方法的建立. *中国卫生检验杂志*, 2017, 27(24):3548-3550.
- [12] Chinese Pharmacopoeia Commission. *Pharmacopoeia of the People's Republic of China*. Volume 4, 2020. Beijing: China Medical Science Press, 2020. (in Chinese)
国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 2020 年版四部. 北京: 中国医药科技出版社, 2020.
- [13] Ma K, Li BM, Bai Y, et al. Rapid and simultaneous detection of *Salmonella*, *Shigella*, and *Staphylococcus aureus* in food using a multiplex RT-PCR assay based on immunomagnetic separation. *Microbiology*, 2014, 41(11):2369-2377. (in Chinese)
马凯, 李宝明, 白羽, 等. 基于免疫磁分离的三重荧光定量 PCR 检测食品中沙门氏菌, 志贺氏菌和金黄色葡萄球菌. *微生物学通报*, 2014, 41(11):2369-2377.
- [14] Liu WD, Zhang WT, Yi Q, et al. Detection of *Salmonella* in traditional Chinese medicine preparations by real-time fluorescence quantitative PCR. *Chin J Mod Appl Pharm*, 2021, 38(7):836-840. (in Chinese)
刘卫德, 张文婷, 易巧, 等. 实时荧光定量 PCR 法检测中药制剂中沙门菌. *中国现代应用药学*, 2021, 38(7):836-840.
- [15] Gong JS, Wang X, Han XG, et al. Effects of different bacterial culture condition on the expression of avian *Salmonella* Fimbrial genes. *Acta Veterinaria Et Zootechnica Sinica*, 2014, 45(1):116-122. (in Chinese)
龚建森, 王鑫, 韩先干, 等. 不同培养条件对禽源沙门菌菌毛基因表达的影响. *畜牧兽医学报*, 2014, 45(1):116-122.
- [16] Wang KX, Liang ZW, Cao JW. Effects of 20 kinds of Chinese herbal extracts on the bacteriostatic effect and growth curve of *Salmonella* in vitro. *Guide Chin Poultry*, 2018, 35(4):54-56. (in Chinese)
王克祥, 梁滋旺, 曹积武. 20 种中药提取液对沙门菌的体外抑菌效果及生长曲线的影响. *中国禽业导刊*, 2018, 35(4):54-56.
- [17] Liu Y, Li SH, Li HS, et al. Antibacterial effects of 12 kinds of traditional Chinese medicine on *Salmonella* in vitro. *J Traditional Chin Vet Med*, 2020, 39(1):17-19. (in Chinese)
刘勇, 李淑红, 李海山, 等. 12 种中药对沙门菌的体外抑菌效果. *中兽医医药杂志*, 2020, 39(1):17-19.
- [18] Li D, Yu D, Zeng FL, et al. Combined antibacterial effect of five traditional medicines against *Salmonella choleraesuis*. *Chin J Vet Sci*, 2019, 39(2):318-322. (in Chinese)
李东, 于丹, 曾范利, 等. 5 种中药对猪霍乱沙门菌的抑菌作用. *中国兽医学报*, 2019, 39(2):318-322.

(上接第 52 页)

- [33] Alves NJ, Turner KB, Daniele MA, et al. Bacterial nanobioreactors--directing enzyme packaging into bacterial outer membrane vesicles. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2015, 7(44):24963-24972.
- [34] Fan E, Chauhan N, Udatha DBRKG, et al. Type V secretion systems in Bacteria. *Microbiol Spectr*, 2016, 4(1).
- [35] Pena RT, Blasco L, Ambroa A, et al. Relationship between quorum sensing and secretion systems. *Front Microbiol*, 2019, 10:1100.
- [36] Gu H. Role of flagella in the pathogenesis of *helicobacter pylori*. *Curr Microbiol*, 2017, 74(7):863-869.
- [37] Feilmeier BJ, Iseminger G, Schroeder D, et al. Green fluorescent protein functions as a reporter for protein localization in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 2000, 182(14):4068-4076.
- [38] Qu J, Cao S, Wei Q, et al. Synthetic multienzyme complexes, catalytic nanomachineries for cascade biosynthesis in vivo. *ACS Nano*, 2019, 13(9):9895-9906.
- [39] Wei Q, He S, Qu J, et al. Synthetic multienzyme complexes assembled on virus-like particles for cascade biosynthesis in cellulose. *Bioconjug Chem*, 2020, 31(10):2413-2420.