

# 一株新的 $\alpha$ -糖苷酶抑制剂生产菌株 PW0852 的初步研究

白芳<sup>1</sup> 张奇<sup>1</sup> 彭臻臻<sup>2</sup> 齐西珍<sup>1</sup> 白钢<sup>1,2\*</sup>

(1. 南开大学药学院 天津 300071)

(2. 南开大学生命科学学院 天津 300071)

**摘要:** 从土壤中分离并筛选得到了一株  $\alpha$ -糖苷酶抑制剂生产菌 PW0852。根据形态特征、培养特征、生理生化特征及 16S rRNA 序列相似性分析等多相分类方法, 初步判定菌株 PW0852 为淡紫灰链霉菌(*Streptomyces lavendulae*)。该菌经 10 L 发酵罐水平发酵, 发酵液中可积累一定量的  $\alpha$ -糖苷酶抑制剂。采用膜过滤技术、离子交换树脂吸附及冷冻干燥等方法, 从 PW0852 发酵液中分离获得混合型  $\alpha$ -糖苷酶抑制剂 GIB852。GIB852 对人类胰腺  $\alpha$ -淀粉酶和  $\alpha$ -麦芽糖酶都有明显的抑制作用, 其对麦芽糖酶的抑制性比同剂量的市售双糖酶抑制剂米格列醇强 28.7 倍, 而对  $\alpha$ -淀粉酶的抑制性较弱。通过小鼠糖耐量实验, 发现  $\alpha$ -糖苷酶抑制剂 GIB852 对哺乳动物餐后高血糖的形成有明显改善作用, 具有开发为糖尿病药物的潜力。

**关键词:** 淡紫灰链霉菌, 多相分类, 发酵,  $\alpha$ -糖苷酶抑制剂

## Study of a Novel Strain PW0852 Producing $\alpha$ -Glucosidase Inhibitor

BAI Fang<sup>1</sup> ZHANG Qi<sup>1</sup> PENG Zhen-Zhen<sup>2</sup> QI Xi-Zhen<sup>1</sup> BAI Gang<sup>1,2\*</sup>

(1. College of Pharmacy, Nankai University, Tianjin 300071, China)

(2. College of Life Sciences, Nankai University, Tianjin 300071, China)

**Abstract:** Actinomycete strain PW0852 with high production of  $\alpha$ -glucosidase inhibitor was isolated from soil samples. Based on the results of morphological, physiological, chemotaxonomic characteristics and 16S rRNA analysis, strain PW0852 was placed within the genus *Streptomyces* and identified as the species *Streptomyces lavendulae*. After fermentation in a 10 L fermentor,  $\alpha$ -glucosidase inhibitors were accumulated in the harvested broth of strain PW0852. The mixed-type  $\alpha$ -glucosidase inhibitor GIB852 we obtained was isolated and purified after ultra-filtration, nano-filtration, resin-adsorption and desiccation. GIB852 could efficaciously inhibit human pancreatic  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -maltase glucoamylase. The inhibition of maltase is stronger than the same dose of the commercial  $\alpha$ -glucosidase inhibitor miglitol 28.7 times, while the inhibition of  $\alpha$ -amylase is weak. GIB852 could significantly depress blood glucose levels in mammalian systems

基金项目: 国家 863 计划项目(No. 2006AA020502)

\*通讯作者: Tel/Fax: 86-22-23508371; 信箱: gangbai@nankai.edu.cn

收稿日期: 2009-09-24; 接受日期: 2009-11-18

and be developed towards a possible therapeutic agent for diabetes.

**Keywords:** *Streptomyces lavendulae*, Polyphasic taxonomy, Fermentation,  $\alpha$ -glucosidase inhibitor

$\alpha$ -糖苷酶抑制剂是目前临床治疗 2 型糖尿病的一线口服降糖药物,它通过可逆性地抑制肠系膜刷状缘的  $\alpha$ -糖苷酶,延缓  $\alpha$ -糖苷酶将多糖(如淀粉、寡糖等)分解为葡萄糖,从而减慢葡萄糖的吸收速度,降低餐后血糖<sup>[1-2]</sup>。目前用于临床糖尿病治疗的  $\alpha$ -糖苷酶抑制剂代表性药物主要有阿卡波糖(Acarbose)、福格列波糖(Voglibose)、米格列醇(Miglitol)<sup>[3-5]</sup>等。其中,阿卡波糖对淀粉酶的抑制作用最强,对双糖酶(蔗糖酶和麦芽糖酶)的抑制作用差;而伏格列波糖和米格列醇则恰好相反,因此,后两者的肠胀气副作用比前者轻一些<sup>[6]</sup>。

链霉菌是土壤中种类和数量庞大的一个微生物类群,具有强大的生物合成能力,一直以来都是人们筛选新型天然化合物的资源宝库。阿卡波糖就发现于游动放线菌(*Actinoplanes* sp. SE50)的发酵液中<sup>[7]</sup>。本实验室利用稀释分离法从京、津、黑、辽、鲁、皖、闽、桂、滇等地区的 200 多份土壤样品中共分离到 3000 余株放线菌。随后进行发酵培养,应用  $\alpha$ -糖苷酶抑制剂筛选模型对菌株发酵液进行初筛和复筛,优选出一株  $\alpha$ -糖苷酶抑制剂产生菌,编号为 PW0852。本文采用 16S rRNA 序列相似性分析等多相分类方法对菌株 PW0852 进行菌种鉴定,确认其分类地位,然后在 10 L 发酵罐水平考察其发酵过程,对发酵产物进行初步分离纯化,得到混合型  $\alpha$ -糖苷酶抑制剂 GIB852,并对 GIB852 进行了初步的生物学活性分析。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

放线菌 PW0852 菌株为本实验室从土壤中自行分离获得。实验动物为昆明种小鼠,体重 18-22 g,雌雄各半,为二级实验动物,由军事医学科学院实验动物中心提供。人胰液  $\alpha$ -淀粉酶(Human pancreatic  $\alpha$ -amylase, HPA)和人  $\alpha$ -麦芽糖酶(Maltase glucoamylase, MGAM)均由本实验室克隆表达获得。16S rRNA 序列测定工作由上海生工公司完成;阿卡波糖片(Acarbose, 拜唐苹)为德国拜耳医药保健有限公司产品;米格列醇片(Miglitol, 奥恬苹)为四

川维奥制药有限公司产品;葡萄糖体外诊断试剂盒(GOD. PAP 法)为北京中生生物工程公司产品;超滤膜和纳滤膜设备均购自上海朗极化工科技有限公司;各型树脂均购自南开大学化工厂;其余试剂均为国产分析纯。

### 1.2 方法

**1.2.1 菌株 PW0852 的多相分类:**所有相关方法参照文献[8]进行。

**1.2.2 菌株 PW0852 的发酵:**于高氏 1 号液体培养基接种菌株 PW0852 斜面孢子,摇床 140 r/min、28°C 培养 48 h 后作为发酵种子。在 10 L 不锈钢机械搅拌全自动型发酵罐中投入 6 L 相同组分的培养基,1 × 10<sup>5</sup> Pa 灭菌 30 min 后冷却,以 5%接种量接入种子,开始发酵,搅拌转速 200 r/min,通气量 3 L/min,在 28°C 发酵 50 h 后收集发酵液(约 5 L)。

**1.2.3 菌株 PW0852 发酵液中  $\alpha$ -糖苷酶抑制剂的分离制备:**将发酵液经 5000 r/min 低温离心 20 min 后,收集上清液,先后过截留分子量为 6000 D 的超滤膜和 1000 D 的纳滤膜,收集具有  $\alpha$ -糖苷酶抑制活性部分,再通过 180 D 纳滤膜浓缩。浓缩液经 001 × 7 型强阳离子交换吸附树脂柱吸附  $\alpha$ -糖苷酶抑制剂,以 1 mol/L 氨水洗脱,收集具有  $\alpha$ -糖苷酶抑制活性部分。洗脱液经减压旋蒸去氨后,真空冻干获得  $\alpha$ -糖苷酶抑制剂混合物,命名为 GIB852。

**1.2.4  $\alpha$ -糖苷酶抑制剂抑制效果分析:**对人胰液  $\alpha$ -淀粉酶抑制效果的测定。以 200  $\mu$ L 0.1%可溶性淀粉为底物,加入 100  $\mu$ L 系列稀释的  $\alpha$ -糖苷酶抑制剂溶液,随后加入 100  $\mu$ L HPA 启动反应,37°C 孵育 30 min 后沸水浴 5 min 终止反应,加入 50  $\mu$ L 卢戈氏碘液,于 630 nm 测定光吸收值。以抑制剂浓度为横坐标,  $\alpha$ -淀粉酶的相对活力为纵坐标做图,绘制剂量依赖的抑制曲线。

对人  $\alpha$ -麦芽糖酶抑制效果的测定。以 200  $\mu$ L 0.1%麦芽糖为底物,加入 100  $\mu$ L 系列稀释的  $\alpha$ -糖苷酶抑制剂溶液,随后加入 100  $\mu$ L MGAM 启动反应,37°C 孵育 30 min 后沸水浴 5 min 终止反应,取 50  $\mu$ L 反应液用葡萄糖氧化酶法测定 490 nm 光吸收值,具体操作方法详见葡萄糖体外诊断试剂盒使用说明

书。以抑制剂浓度为横坐标,  $\alpha$ -麦芽糖酶的相对活力为纵坐标做图, 绘制剂量依赖的抑制曲线。

**1.2.5  $\alpha$ -糖苷酶抑制剂对餐后血糖升高的抑制作用:** 将正常小鼠按体重随机分为空白对照组、阿卡波糖组、米格列醇组和 GIB852 组, 每组各 10 只。实验前 16 h 禁食不禁水, 取同一剂量阿卡波糖、米格列醇和 GIB852 与淀粉(3 g/kg)混合, 对小鼠灌胃给药, 分别在给药后 0、30、60、120 min 进行尾静脉采血, 用葡萄糖体外诊断试剂盒测定血浆葡萄糖水平。

## 2 结果

### 2.1 $\alpha$ -糖苷酶抑制剂生产菌株 PW0852 的分类地位

**2.1.1 菌株 PW0852 的形态特征与培养特征:** 菌株 PW0852 在固体培养基上表现出典型的链霉菌菌落特征。菌落干燥致密, 不透明, 具有颜色不同的气生菌丝和基内菌丝。200 倍电镜下观察, 气生菌丝生长较密集。10000 倍电镜下观察, 气生菌丝较直, 无螺旋状结构, 孢子呈圆柱形, 竹节状成串生长, 且表面光滑无刺(图 1)。在不同组分固体培养基上, 菌株 PW0852 均生长旺盛, 其培养特征如表 1 所示。在高

氏一号培养基上, 基内菌丝发达, 颜色为浅乳脂色。气生菌丝发达, 培养初期(1 周)呈淡肉桂粉, 后期(2 周)颜色略深为肉桂粉色。在酪氨酸培养基上, 产生黑色色素。

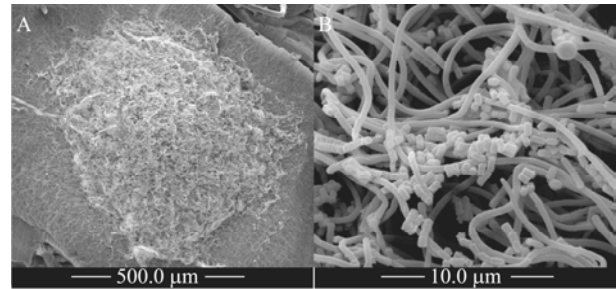


图 1 菌株 PW0852 的菌落及菌丝的电子显微镜照片  
Fig. 1 Scanning electron micrograph of strain PW0852

注: A: 200 倍扫描电镜; B: 10000 倍扫描电镜。

Note: A: Scanning electron microscope ( $\times 200$ ); B: Scanning electron microscope ( $\times 10000$ ).

**2.1.2 菌株 PW0852 的生理生化特性与碳源利用能力:** 如表 2 所示, PW0852 可以使淀粉水解、牛奶酪化和凝固, 并产生黑色素和硫化氢; 但不能使明胶液化, 不能水解纤维素。除了木糖、半乳糖和甘露醇, 菌株 PW0852 可以利用测试的所有碳源, 说明其利用碳源能力极强。

表 1 菌株 PW0852 在不同培养基上的培养特征  
Table 1 The culture characteristics of strain PW0852 on various agar media

培养基 Media	基内菌丝 Substrate mycelia		气生菌丝 Aerial mycelia		色素 Pigments
	One week	Two weeks	One week	Two weeks	
Gause's No. 1 synthetic medium agar	White	White-yellow	Light-Purple	Purple-gray	None
Potato infusion agar	Brown	Brown	Purple-gray	Purple-gray	Brown
ISP4 medium agar	White-yellow	White-yellow	White	White	None
Czapek's medium agar	White	White	Purple	Purple	None
Glucose asparagines agar	Yellow	Yellow	White	White-gray	None
Tyrosine agar	White-yellow	White-yellow	White	White	Black

**2.1.3 16S rRNA 序列分析:** 菌株 PW0852 的 16S rRNA 核酸序列全长为 1477 bp, 该序列已提交 GenBank, 登录号: FJ820336。将所得序列与 GenBank 数据库中的相关种进行比较, 发现 PW0852 菌株与链霉菌属(*Streptomyces*)的 16S rRNA 序列同源性都很高, 其中与淡紫灰链霉菌(*S. lavendulae*, 登录号: EF371424, 菌株 3026)具有 98.6%的相似性, 与多产色链霉菌(*S. polychromogenes*, 登录号:

AY999923, 菌株 NRRL B-3032)的相似性为 98.7%。结合形态学特征、培养特征和生理生化特征, 最终将菌株 PW0852 的分类地位初步确定为链霉菌属淡紫灰链霉菌。

### 2.2 $\alpha$ -糖苷酶抑制剂生产菌株 PW0852 的发酵

菌株 PW0852 的整个发酵过程在 10 L 不锈钢机械搅拌全自动型发酵罐中完成, 发酵曲线如图 2 所示。发酵过程的前 12 h, 菌株 PW0852 处于延滞期,

菌体生长缓慢, pH 快速降低。12 h 后, 直至 84 h, 菌株 PW0852 处于生长对数期, 在此期间, 菌体生长迅速, pH 恒定(约 5.9)。从 96 h 开始, 菌株 PW0852 进入稳定期。此后, 菌体几乎不再生长, 而糖苷酶抑制剂开始大量合成和分泌, 同时 pH 开始小幅降低, 到达 120 h 处, pH 达到最小值(约 5.6), 而糖苷酶抑制剂的累积达到最大值。发酵产物经超滤、纳滤、阳离子树脂吸附、减压旋蒸和真空干燥等流程, 得到具备  $\alpha$ -糖苷酶抑制剂活性的白色粉末状物质 200 mg, 命名为 GIB852, 用于后续实验分析。

表 2 菌株 PW0852 的生理生化反应与碳源利用情况  
Table 2 The phenotypic characteristics of PW0852

特征	结果	特征	结果
Characteristics	Results	Characteristics	Results
Starch hydrolysis	+	Fructose	+
Gelatin liquefaction	-	Xylose	-
Mick peptonization	+	Rhamnose	+
Mick solidification	+	Sorbitol	+
Melanin production	+	Sucrose	+
H <sub>2</sub> S production	+	Galactose	-
Growth in cellulose	-	Inositol	+
Glucose	+	Mannitol	-

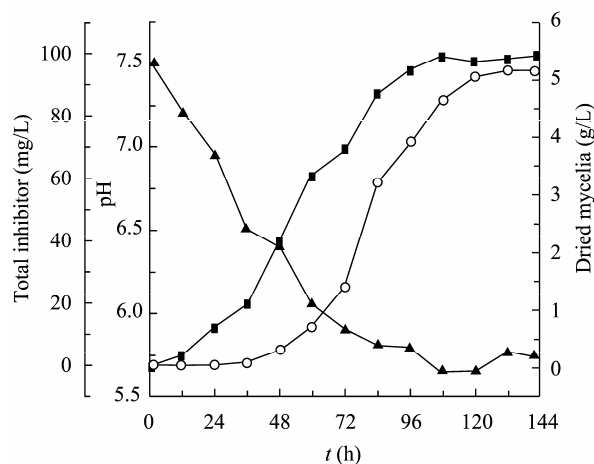


图 2 菌株 PW0852 的发酵曲线

Fig. 2 Time courses of  $\alpha$ -glucosidase inhibitors production in fermentation of strain PW0852

注:  $\circ$ -: 抑制剂含量;  $\square$ -: 菌丝体干重;  $\triangle$ -: pH 值。

Note:  $\circ$ -: Total inhibitors;  $\square$ -: Dried mycelia;  $\triangle$ -: pH.

### 2.3 菌株 PW0852 发酵产生的 $\alpha$ -糖苷酶抑制剂 GIB852 的抑制活性

以抑制剂浓度为横坐标, HPA 或 MGAM 的相对活力为纵坐标绘制剂量依赖的抑制曲线(图 3)。将 GIB852 同时与市售的  $\alpha$ -淀粉酶抑制剂阿卡波糖和  $\alpha$ -双糖酶抑制剂米格列醇进行比较。如图 3A 所示, GIB852 在酶学水平对 HPA 具有一定的抑制作用, GIB852 的半数抑制浓度(IC<sub>50</sub>)值为阿卡波糖的 44.5 倍, 即 GIB852 对淀粉酶的抑制活性较阿卡波糖弱 44.5 倍。图 3B 显示, GIB852 对 MGAM 具有较强的抑制作用, 其 IC<sub>50</sub> 值为米格列醇的 0.035 倍, 即同剂量的 GIB852 比米格列醇对人  $\alpha$ -麦芽糖酶的抑制性强 28.7 倍。

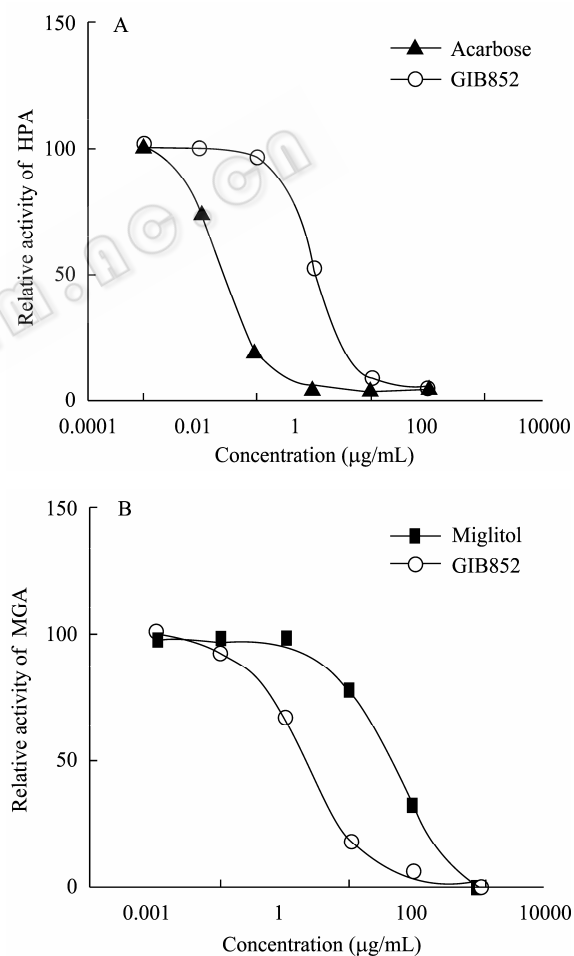


图 3 GIB852 对  $\alpha$ -淀粉酶/糖苷酶的剂量依赖抑制曲线

Fig. 3 Dose-dependent inhibitory curves of the inhibitor GIB852

注: A: 对人胰腺  $\alpha$ -淀粉酶(Human pancreatic  $\alpha$ -amylase, HPA)的剂量依赖抑制曲线; B: 对人  $\alpha$ -麦芽糖酶(Maltase glucoamylase, MGAM)的剂量依赖抑制曲线。

Note: A: Dose-dependent inhibitory curves of HPA; B: Dose-dependent inhibitory curves of MGAM.

## 2.4 $\alpha$ -糖苷酶抑制剂 GIB852 的应用

为了确认 GIB852 在哺乳动物体内的降血糖效果, 分别设计空白对照组和给药组(阿卡波糖组、米格列醇组和 GIB852 组)进行动物耐糖量实验, 测定小鼠在给予相同剂量淀粉后, 2 h 内的血糖变化。分别于 0、30、60、120 min 时间点取血测定血浆葡萄糖浓度, 以时间点为横坐标, 以血糖值为纵坐标绘制小鼠餐后 2 h 内血糖变化曲线。如图 4 所示, 健康小鼠在淀粉灌胃后血糖开始升高, 在 30 min 时血糖达到峰值, 120 min 时血糖基本降到空腹水平, 而同时给予  $\alpha$ -糖苷酶抑制剂的 3 组小鼠, 其血糖高峰受到了明显的抑制和延迟, 30 min 时给药组和空白对照组之间的血糖值存在显著差异( $P < 0.01$ ); 对于给药组来讲, 阿卡波糖组、米格列醇组和 GIB852 组在 30 min 时血糖水平相当, 统计学分析无显著性差异。即  $\alpha$ -糖苷酶抑制剂 GIB852 可以明显降低正常小鼠的餐后血糖水平, 且与现有上市药物的降血糖效果相当。

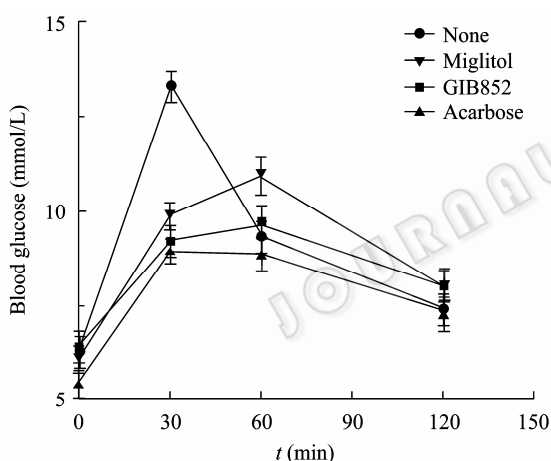


图 4  $\alpha$ -糖苷酶抑制剂 GIB852 对正常小鼠糖耐量的影响  
Fig. 4 Suppressive effect of GIB852 on postprandial blood glucose elevation Group in normal mice

## 3 讨论

自从 1970 年从玫瑰产色链霉菌 R-468 的发酵液中发现  $\beta$ -糖苷酶抑制剂野尻霉素(Nojirimycin)以来, 研究者陆续又从放线菌发酵液中发现了 Acarbose、Trestatins 等多种淀粉酶(糖苷酶)抑制剂。产生这些抑制剂的微生物, 大多数属于链霉菌属, 还有些属于芽孢杆菌属、游动放线菌属等<sup>[9]</sup>。

本研究以从土壤中分离得到的链霉菌 PW0852

菌株为研究对象, 首先通过形态特征、培养特征、生理生化特征以及 16S rRNA 序列的同源性分析等多项分类的方法, 将 PW0852 菌株确认为淡紫灰链霉菌。随后, 在 10 L 发酵罐水平对菌株 PW0852 进行发酵培养, 从糖苷酶抑制剂的产生过程来看, 基本符合次级代谢产物的合成特征, 说明该糖苷酶抑制剂是菌株 PW0852 的次级代谢产物。随后, 采用一系列膜过滤技术、阳离子树脂吸附等方法, 从 PW0852 发酵液中分离获得混合型  $\alpha$ -糖苷酶抑制剂 GIB852, 并从酶学水平考察了 GIB852 对人类胰腺  $\alpha$ -淀粉酶和  $\alpha$ -麦芽糖酶的抑制效果, 结果显示, GIB852 对人类胰腺  $\alpha$ -淀粉酶和  $\alpha$ -麦芽糖酶都有明显的抑制作用, 对麦芽糖酶的抑制性较强, 比同剂量的市售双糖酶抑制剂米格列醇的抑制性强 28.7 倍, 而对  $\alpha$ -淀粉酶的抑制效果较弱。最后, 通过小鼠糖耐量实验, 证实 GIB852 对餐后高血糖的形成有明显的改善作用。

由于淀粉酶抑制剂类药物的副作用较大, 因此开发对双糖酶抑制性强, 而对  $\alpha$ -淀粉酶抑制性弱的糖苷酶抑制剂将具有更好的市场前景<sup>[10]</sup>。本研究从该要求着手, 通过上述系列研究与分析, 获得了有效的双糖酶抑制剂 GIB852, 对餐后高血糖有显著的改善效果, 具有开发治疗糖尿病、肥胖症药物的潜力, 也可应用于相应的功能性食品的制备, 改善病人生活质量, 具备社会效益和经济价值。

## 参考文献

- [1] Kim YM, Wang MH, Rhee HI. A novel  $\alpha$ -Glucosidase inhibitor from pine bark. *Carbohydr Rs*, 2004(339): 715-717.
- [2] Puls W. Pharmacology of glucosidase inhibitors. In *Handbook of Experimental Pharmacology: Oral Antidiabetics*, 1996(119): 497-525.
- [3] Balfour JA, McTavish D. Acarbose: an update of its pharmacology and therapeutic use in diabetes mellitus. *Drugs*, 1993, 46(6): 1025.
- [4] 王家驰. 新一代  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制剂—伏格列波糖(倍欣). *中国糖尿病杂志*, 1999, 7(2): 126-127.
- [5] 钟倩. 米格列醇首次上市用于 II 型糖尿病. *国外医药-合成药、生化药、制剂分册*, 1998, 19(6): 369-370.
- [6] 王卫东, 徐婷娟, 徐维平.  $\alpha$ -糖苷酶抑制剂和二甲双胍联用对 2 型糖尿病患者治疗效果的 Meta-分析. *中国临*

- 床保健杂志, 2008, **11**(6): 572-573.
- [7] Sumitani JI, Tsujimoto Y, Kawaguchi T, *et al.* Cloning and secretive expression of the gene encoding the proteinaeous  $\alpha$ -amylase inhibitor paim from *Streptomyces corchorusii*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2000, **90**(2): 214-216.
- [8] Zhang L, Liu CQ, Gao ZH, *et al.* Research on the lassification of *Streptomyces* strain ZG0429 and urification of streptavidin. *Acta Microbiologica Sinica*, 2007, **47**(1): 7-10.
- [9] 王晓婧, 薛仁风, 李梅, 等. 微生物源  $\alpha$ -淀粉酶抑制剂研究进展. *生物技术通讯*, 2009(7): 52-55.
- [10] Kelley DE, Bidot P, Freedman Z, *et al.* Clinical efficacy of acarbose in diabetes mellitus: a critical review of controlled trials. *Diabetes Metab*, 1998, **21**(12): 311-320.

## 征 稿 简 则

### 1 刊物简介与栏目设置

《微生物学通报》是由中国科学院微生物研究所和中国微生物学会主办的, 以微生物学应用基础研究及技术创新与应用为主的综合性学术期刊。刊登内容包括: 工业微生物学、海洋微生物学、环境微生物学、基础微生物学、农业微生物学、食品微生物学、兽医微生物学、药物微生物学、医学微生物学、病毒学、酶工程、发酵工程、代谢工程等领域的最新研究成果, 产业化新技术和新进展, 以及微生物学教学研究和改革等。设置的栏目有: 研究报告、专论与综述、生物实验室(原技术与方法)、高校教改纵横(原高等院校教学)、名师名课(原名师讲堂)、教学与科研成果展示、显微世界、专题专栏、专家论坛、书讯、会讯等。

### 2 投稿方式

投稿时请登陆我刊主页 <http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>, 点击作者投稿区, 第一次投稿请先注册, 获得用户名和密码, 然后依照提示提交稿件, 详见主页“投稿、征稿须知”。

作者必须在网站投.doc 格式的电子稿, 图与文字编好页码、图号后合成一个文件上传。凡不符合(投稿须知)要求的文稿, 本部恕不受理。

### 3 写作要求

来稿要求论点明确, 数据可靠, 简明通顺, 重点突出。

#### 3.1 篇幅

以 A4 纸 5 号字计算, 综述、教学和方法类文章最好在 4 页以内, 研究报告 4-7 页(以上均包括图表)。

#### 3.2 图表

文中的图表须清晰简明, 文字叙述应避免与图表重复。所有小图的宽度应小于 8 cm(占半栏), 大图的宽度应小于 17 cm(通栏)。

#### 3.3 参考文献及脚注

参考文献按文内引用的先后顺序排序编码, 未公开发表的资料请勿引用。我刊的参考文献需要注明著者(文献作者不超过 3 人时全部列出, 多于 3 人时列出前 3 人, 后加“等”或“*et al.*”, 作者姓前、名后, 名字之间用逗号隔开)、文献名、刊名、年卷期及页码。国外期刊名可以缩写, 但必须标准, 不加缩写点, 斜体。参考文献数量不限。

参考文献格式举例:

期刊: [1] 刘杰, 成子强, 史宣玲. SARS 冠状病毒 *nsp14* 基因的克隆和表达. *微生物学通报*, 2007, **34**(2): 1-3.

[2] Kajiura H, Mori K, Tobimatsu T, *et al.* Characterization and mechanism of action of a reactivating factor for adenosylcobalamin-dependent glycerol dehydratase. *J Biol Chem*, 2001, **276**(39): 36514-36519.

图书: [3] 钱存柔, 黄仪秀. *微生物实验教程*. 北京: 北京大学出版社, 2000: 4.

[4] 董志扬, 张树政, 方宣钧, 等. 海藻的生物合成及抗逆机理//华路等. *核农学进展*. 北京: 中国农业出版社, 1996: 115-120.

脚注(正文首页下方):

基金项目: 基金项目(No. )

\*通讯作者 Tel: ; Fax: ; E-mail:

收稿日期: 2010-00-00 ; 接受日期: 2010-00-00

(下转 p.406)