

利用 Sed1p 锚定蛋白在毕赤酵母表面展示 米黑根毛霉脂肪酶及其应用

江逢春 林影 叶燕锐*

(华南理工大学生物科学与工程学院 广东省发酵与酶工程重点实验室 广东 广州 510006)

摘 要: 通过 PCR 扩增米黑根毛霉脂肪酶基因, 在米黑根毛霉脂肪酶 N 端加入 Flag 标签。将米黑根毛霉脂肪酶基因与酿酒酵母细胞壁蛋白 Sed1p 基因的 N 端融合构建质粒 pPIC9K-Flag-RML-Sed1, 转化毕赤酵母 GS115 获得重组菌 GS115/pPIC9K-Flag-RML-Sed1。重组菌经过甲醇诱导表达后, 显微镜免疫荧光分析与流式细胞仪检测结果均证实米黑根毛霉脂肪酶已经成功展示在毕赤酵母上。该重组菌水解活力达到 169.6 U/g (Dry cell weight), 在非水相中催化脂肪酸甲酯的合成, 72 h 后脂肪酸甲酯的产率达 82.36%。

关键词: 酵母表面展示, 米黑根毛霉脂肪酶, 全细胞催化

Surface Display of *Rhizomucor Miehei* Lipase in *Pichia pastoris* Using Sed1p as an Anchor Protein and Its Application

JIANG Feng-Chun LIN Ying YE Yan-Rui*

(School of Bioscience and Technology, Key Laboratory of Fermentation and Enzyme Engineering, South China University of Technology, Guangzhou, Guangdong 510006, China)

Abstract: We constructed a *Rhizomucor Miehei* Lipase(RML)-Displaying yeast whole-cell biocatalyst and applied it to methylesters synthesized from triglyceride and methanol. RML was fused with the Sed1p cloned from *Saccharomyces cerevisiae* to constructed plasmid pPIC9K-Flag-RML-Sed1. The plasmid was linearized and transformed into *Pichia pastoris* GS115 and *Pichia pastoris* recombinant strain GS115/pPIC9K-Flag-RML-Sed1 was obtained. Cell-surface display of the RML via Sed1p was confirmed by flow Fluorescence micrograph and flow cytometer. After incubated at 28°C for 48 h the hydrolytic activity of the GS115/pPIC9K-Flag-RML-Sed1 reached a plateau, 169.6 U/g (Dry cell weight). In nonaqueous media, the yield of 82.36% methylesters was obtained from triglyceride and methanol after 72 h using lyophilized RML displaying yeast whole cells.

Keywords: Yeast cell-surface Display, *Rhizomucor Miehei* lipase, Whole-cell Biocatalyst

脂肪酶(EC3.1.1.3)在药物生产^[1]、生物柴油的合成^[2]以及在食品的生产中^[3]均有广泛的应用。在众多

的脂肪酶中, 米黑根毛霉脂肪酶(*Rhizomucor miehei* lipase, RML)是应用最广泛的脂肪酶之一, 不仅能催

化油脂水解,也能在非水相中催化酯合成、转酯化、酸解等反应^[4]。

但使用游离的米黑根毛霉脂肪酶为催化剂,酶分离、再生,循环使用困难,使用成本较高限制了其在工业化中的应用。固定化酶可以改善酶的性质,使酶更容易回收利用。而将米黑根毛霉脂肪酶展示于细胞表面后,即具有固定化酶的特点。细胞表面展示的酶制剂生产十分简单,将发酵液直接离心收集菌体,真空冷冻干燥制得菌体冻干粉,无需分离纯化酶蛋白,并且无需固定化即可用于酶的催化反应,反应后离心收集菌体即可重复利用,大大降低了生产成本。在细胞表面展示应用较多的是絮凝素和凝集素蛋白^[5-6]。目前利用酿酒酵母 α -凝集素已经将 RML 成功展示于酿酒酵母细胞表面^[7],利用酿酒酵母絮凝素将 RML 展示于巴斯德毕赤酵母(*Pichia pastoris*)细胞表面^[8]。

使用不同的锚定蛋白对展示的蛋白活性有较大影响,主要受锚定蛋白本身性质的影响^[5]。Sed1p 是酿酒酵母细胞壁蛋白,通过与细胞壁 β -1,3-葡聚糖共价结合,锚定在酿酒酵母细胞壁上。Sed1p 富含丝氨酸与苏氨酸,是酿酒酵母稳定期时主要的细胞壁蛋白,并且与酵母细胞的酵母裂解酶抗性有关^[9-10]。Van der Vaart 等^[5]的研究发现,以 α -半乳糖苷酶作为报告基因,利用絮凝素展示时,会有很大一部分的 α -半乳糖苷酶停留在细胞内或者出现在发酵液中。本研究拟利用酿酒酵母锚定蛋白 Sed1p 将 RML 展示于毕赤酵母细胞壁表面,并且将发酵后的菌体冻干成全细胞催化剂催化脂肪酸甲酯的合成。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 菌株、质粒:毕赤酵母 GS115 及表达载体 pPIC9K 购自 Invitrogen 公司;菌株 *E. coli* Top10F⁺ 及质粒 pPIC9K-RML 与质粒 pPIC9K-CALB-Sed1 由本实验室保存。

1.1.2 培养基:LB 培养基:1%胰蛋白胨,0.5%酵母抽提物,1%氯化钠,根据需要添加 50 g/L 氨苄青霉素。培养基 YPD、MD、MM、BMGY、BMMY 参考《Invitrogen 公司操作手册》。

1.1.3 试剂与材料:无氨基酸酵母氮源 YNB (Yeast nitrogen base),蛋白胨均购自 Difco 公司;酵母提取

物购自 Oxford 公司。对硝基苯酚丁酸酯(pNPB)、对硝基苯酚辛酸酯(pNPC)购于 Sigma 公司。限制性内切酶、T4 连接酶、RNase A 购于大连宝生物有限公司。基因组抽提试剂盒、PCR 产物纯化试剂盒、胶回收试剂盒等购于 QIAGEN 公司。其它试剂均为国产分析纯。

1.2 实验方法

1.2.1 RML 的克隆:设计引物,上游引物 RMLp1: 5'-GCGGGAATTTCGATTACAAGGATGATGACGATAAGGTTCCAATTAAGAGACAATCTAACT-3',含 *EcoR* I 酶切位点(以下划线示出),在 5'端加入 Flag 标签。下游引物 RMLp2: 5'-GCGCACGCGTAGTACACAAACCAGTGTTAATACCA-3',含 *Mlu* I 酶切位点(以下划线示出)。以质粒 pPIC9K-RML 为模板,RMLp1 和 RMLp2 为引物进行 PCR 扩增。体系为模板 1 μ L,10 \times *Taq* DNA 聚合酶 Buffer 5 μ L (含 Mg^{2+}),2.5 mmol/L dNTPs 4 μ L,20 μ mol/L 的上下游引物各 1 μ L,*Taq* DNA 聚合酶 0.75 μ L,加无菌水至总体积为 50 μ L。反应条件为:94 $^{\circ}$ C 5 min;94 $^{\circ}$ C 45 s,45 $^{\circ}$ C 45 s,72 $^{\circ}$ C 2 min,30 个循环;72 $^{\circ}$ C 10 min。PCR 产物进行 0.8%琼脂糖凝胶电泳检测并切胶回收纯化。

1.2.2 表面展示载体的构建:将本实验室保存的 pPIC9K-CALB-Sed1 与 PCR 产物都用 *EcoR* I 与 *Mlu* I 双酶切,构建重组质粒后用 $CaCl_2$ 法转入 *E. coli* Top10F⁺,在 Amp⁺ LB (50 mg/L)平板上涂板,过夜培养。提取阳性转化子质粒进行 *Mlu* I 和 *EcoR* I 双酶切鉴定。鉴定正确后,委托上海生工生物工程有限公司进行测序。

1.2.3 重组毕赤酵母的构建:以 LiCl 法将 *Sac* I 线性化的重组质粒 pPIC9K-Flag-RML-Sed1 转化宿主菌 GS115,30 $^{\circ}$ C 培养 3 d,随机挑取转化子点种于三丁酸甘油酯平板进行培养。

1.2.4 毕赤酵母重组菌株的诱导表达及免疫荧光分析:将筛选得到的重组转化子和对照菌毕赤酵母 GS115接种于 50 mL BMGY 培养基中,30 $^{\circ}$ C,200 r/min 振荡培养 16-20 h 至 OD_{600} 到 2-6。离心收集菌体,再将其悬浮于 BMMY 培养基中,稀释至 OD_{600} 为 1,继续振荡培养,每隔 24 h 向 BMMY 培养基中补加 1%的甲醇进行诱导表达,同时测定重组菌的生长曲线。

培养结束后取样,利用分光光度计,比浊法,以蒸馏水稀释后测 OD_{600} ;然后收集菌体,6000 r/min

离心 3 min; 弃上清, 加入 $1 \times$ PBS 洗涤, 悬浮, 6000 r/min 离心 3 min, 重复洗涤 3 次; 再以适量的含 1% BSA 的 TBS 悬浮, 使其 OD_{600} 为 10; 取 200 μ L 菌体悬浮液, 加入 1 μ L 单克隆抗体(Anti-flag monoclonal antibody); 于室温不断轻摇 2 h, 使其悬浮; 6000 r/min 离心 2 min; 用 1 mL $1 \times$ PBS 洗 3 次, 离心 6000 r/min, 2 min; 用 1 mL 含 1% BSA 的 PBS 洗 1 次, 6000 r/min 离心 2 min; 用 200 μ L 含 1% BSA 的 PBS 悬浮菌体, 每管加入 1 μ L 2 g/L 的 Alexa Fluor 488 标记羊抗鼠 IgG 抗体, 室温静置 1 h, 用锡纸包住, 不断轻摇, 使其悬浮; 用 1 mL $1 \times$ PBS 洗 3 次, 6000 r/min 离心 2 min; 用 1.5 mL $1 \times$ PBS 悬浮菌体; 在荧光显微镜下观察, 及用流式细胞仪检测细胞表面蛋白的表达量。

1.2.5 毕赤酵母重组菌株的酶活力测定: 利用分光光度法测定脂肪酶的酶活力^[11]。用超纯水配制浓度为 2.5 mmol/L 的 pNPC, 其中添加 5% 的 Triton X-100。在 0.3 mL 浓度为 2.5 mmol/L 的底物溶液中加入 0.7 mL 适当浓度的菌体悬液, 45°C 反应 5 min, 测定 OD_{405} 值。每个样品测定 3 个平行样, 1 个酶活力单位定义为每分钟水解底物生成 1 μ mol 对硝基苯酚所需的酶量。

1.2.6 催化脂肪酸甲酯的合成: 将 0.97 g 大豆油与 87 μ L 甲醇溶于 2 mL 异辛烷中, 将混合液放入 50 mL 具塞三角瓶中, 每隔 24 h 加入 87 μ L 甲醇, 55°C、200 r/min 振荡反应。72 h 后, 取样 12000 r/min 离心 3 min^[10]。

2 结果与分析

2.1 RML 基因的克隆和表达载体的构建

以质粒 pPIC9K-RML 为模板扩增 RML 基因, 按方法“1.2.2”构建重组质粒 pPIC9K-Flag-RML-Sed1。重组质粒双酶切与 PCR 鉴定表明重组质粒 pPIC9K-Flag-RML-Sed1 已经成功构建, 质粒同时送去上海生工有限公司测序, 测序结果正确。

2.2 重组毕赤酵母菌株脂肪酶活力检测

按“1.2.3”操作筛选出水解圈较大的菌株, 进行菌落 PCR 鉴定与水解圈鉴定。平板筛选结果见图 3, 其中 1 为对照菌株毕赤酵母 GS115, 不能产生水解圈。2-4 为重组菌株 GS115/pPIC9K-Flag-RML-Sed1, 其周围已经形成明显的水解圈。证明 RML 已经成功展示于毕赤酵母细胞表面, 并具有催化活性。

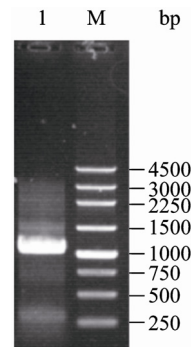


图 1 RML 基因 PCR 扩增 Agarose 电泳图
Fig. 1 PCR amplification of RML gene

注: 1: RML 基因; M: Marker DL2000.

Note: 1: PCR product; M: Marker DL2000.

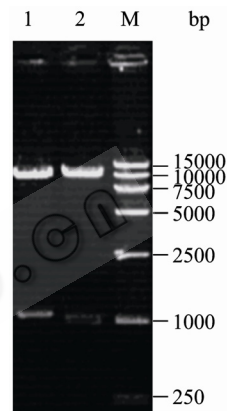


图 2 重组质粒 pPIC9K-Flag-RML-Sed1 的双酶切鉴定电泳图

Fig. 2 Restriction enzyme digestion of pPIC9K-Flag-RML-Sed1

注: 1: pPIC9K-Flag-RML-Sed1 经 *EcoRI* 与 *MluI* 双酶切图; 2: pPIC9K-CALB-Sed1 经 *EcoRI* 与 *MluI* 双酶切图; M: Marker 250 bp Ladder.

Note: 1: pPIC9K-Flag-RML-Sed1/*EcoRI* + *MluI*; 2: pPIC9K-CALB-Sed1/*EcoRI* + *MluI*; M: Marker 250 bp Ladder.

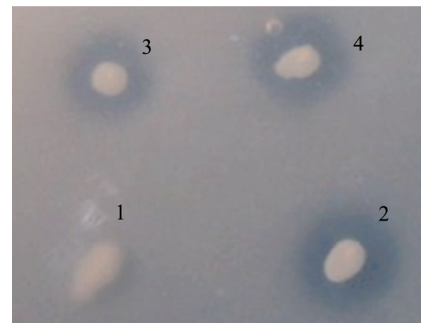


图 3 重组菌株 GS115/pPIC9K-Flag-RML-Sed1 在三丁酸甘油酯平板上形成水解圈

Fig. 3 Haloformation of RML-diaplaying yeast on tributyrin agar plate

注: 1: 对照 *P. pastoris* GS115; 2-4: GS115/pPIC9K-Flag-RML-Sed1.

Note: 1: *P. pastoris* GS115 as a control; 2-4: GS115/pPIC9K-Flag-RML-Sed1.

2.3 重组菌株的诱导表达

挑取水解圈较大的菌株与阴性菌株进行同批次液体摇瓶培养, 发酵产酶曲线见图 4。从图 4 可以看出, 重组菌株 GS115/pPIC9K-Flag-RML-Sed1 在 48 h 达到最大干重酶活 169.6 U/g (Dry cell weight)。在发酵 48 h 后, 虽然菌体的干重仍然缓慢上升, 并在培养 144 h 其 OD_{600} 达到 29.4, 但菌体干重的酶活基本保持稳定。张卫国^[7]等利用酿酒酵母 α -凝乳素在酿酒酵母表面展示 RML 酶活力达到 182 U/g (Dry cell weight), 韩双艳等^[8]利用酿酒酵母絮凝素在毕赤酵母展示 RML 酶活力达到 105.3 U/g (Dry cell weight)。本研究中利用酿酒酵母 Sed1p 在毕赤酵母表面展示 RML 酶活力达到 169.6 U/g (Dry cell weight), 略低于酿酒酵母 α -凝乳素在酿酒酵母表面展示 RML, 高于酿酒酵母絮凝素在毕赤酵母表面展示 RML。如图 5 所示, 重组菌株 GS115/pPIC9K-Flag-RML-Sed1 菌体酶活较高, 而发酵液中的酶活力较低这与 Van der Vaart^[5]等报道的利用 Sed1p 在酿酒酵母表面展示 α -半乳糖苷酶时菌体酶活力较高而发酵酶活力较低相符。

2.4 重组菌株 GS115/pPIC9K-Flag-RML-Sed1 免疫荧光分析

取发酵培养 144 h 的含有 Flag 标签的 GS115/pPIC9K-Flag-RML-Sed1, 按照方法“1.2.4”以加入 anti-flag 单克隆抗体作为一抗, Alexa Fluor 488 标记

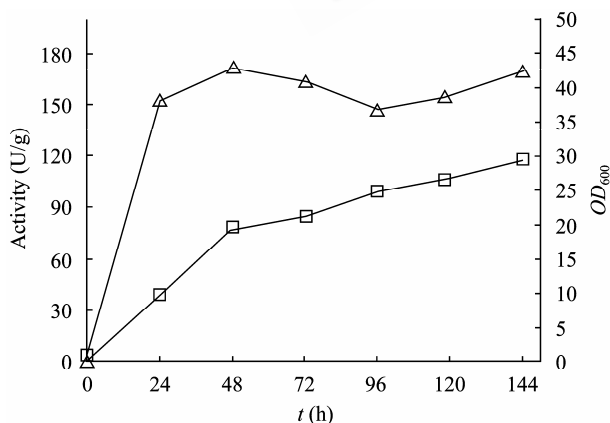


图 4 重组菌株 GS115/pPIC9K-Flag-RML-Sed1 的发酵产酶曲线

Fig. 4 Time course of lipase hydrolytic activities of GS115/pPIC9K-Flag-RML-Sed1

注: Δ : GS115/pPIC9K-Flag-RML-Sed1 干重酶活力; \square : GS115/pPIC9K-Flag-RML-Sed1 菌体浓度。

Note: Δ : Activity of GS115/pPIC9K-Flag-RML-Sed1; \square : Cell density of GS115/pPIC9K-Flag-RML-Sed1.

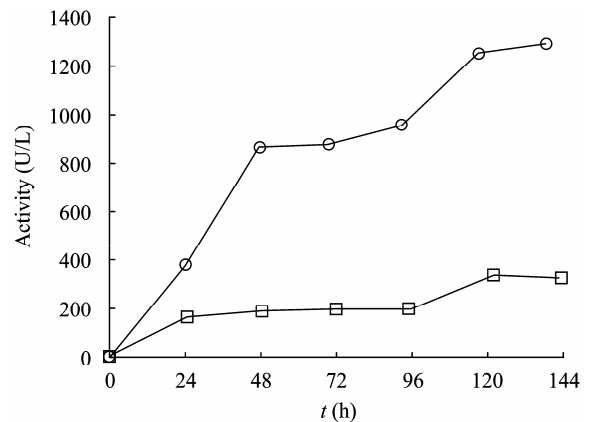


图 5 相同体积重组菌株 GS115/pPIC9K-Sed1-RML-Flag 菌体酶活力与培养基中酶活力比较

Fig. 5 Compare the activity of cell and media in the same volume

注: \circ : GS115/pPIC9K-Flag-RML-Sed1 菌体酶活力; \square : GS115/pPIC9K-Sed1-RML-Flag 发酵液酶活力。

Note: \circ : Cell activity of GS115/pPIC9K-Flag-RML-Sed1; \square : Media activity of GS115/pPIC9K-Flag-RML-Sed1.

羊抗鼠 IgG 抗体为二抗。如图 6 所示通过荧光显微镜可以看到, 在 488 nm 激发光激发下, 重组酵母 GS115/pPIC9K-Flag-RML-Sed1 表面有明显的特异性荧光, 对照 *P. pastoris* GS115 几乎无荧光, 证明米黑根毛霉脂肪酶被锚定在酵母细胞壁上。在流式细胞仪上进行检测(图 7), 在 495 nm 激发光激发下, 重组酵母 GS115/pPIC9K-Flag-RML-Sed1 比对照菌株 GS115 有明显的漂移, 也证明米黑根毛霉脂肪酶已经锚定在酵母细胞壁上。

2.5 全细胞合成脂肪酸甲酯

脂肪酸甲酯是生物柴油的主要成分, 由于其燃烧性能好, 密度、粘度等都与普通柴油相当, 被认为是一种可以替代石油的绿色燃料。RML 可在非水相体系中高效催化酯交换和酯合成, 被广泛地应用在催化脂肪酸甲酯的合成中。而将重组菌株 GS115/pPIC9K-Flag-RML-Sed1 液体发酵培养 144 h。离心收集菌体, 用双蒸水洗涤 3 次, 真空冷冻干燥, 制得全细胞脂肪酶催化剂。利用此酶制剂在非水相中催化甲醇与大豆油合成脂肪酸甲酯。在反应 72 h 后脂肪酸甲酯的产量达到 82.36%。图 8、图 9 分别为阴性对照菌株 GS115 与重组菌株 GS115/pPIC9K-Flag-RML-Sed1 在非水相中催化脂肪酸甲酯合成的气相色谱检测图, 图中 1、2、3、4、5、6 分别是棕榈酸甲酯(内标)、十七碳酸甲酯、硬脂酸甲酯、油酸甲酯、亚油酸甲酯和亚麻酸甲酯。

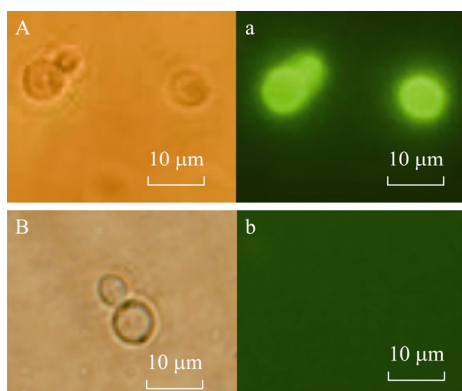


图 6 重组毕赤酵母 GS115/pPIC9K-Flag-RML-Sed1 显微镜免疫荧光分析

Fig. 6 Detection of GS115/pPIC9K-Flag-RML-Sed1 with immunofluorescence

注: A, a: GS115/pPIC9K-Flag-RML-Sed1; B, b: 对照 *P. pastoris* GS115.

Note: A, a: GS115/pPIC9K-Flag-RML-Sed1; B, b: *P. pastoris* GS115 as a control.

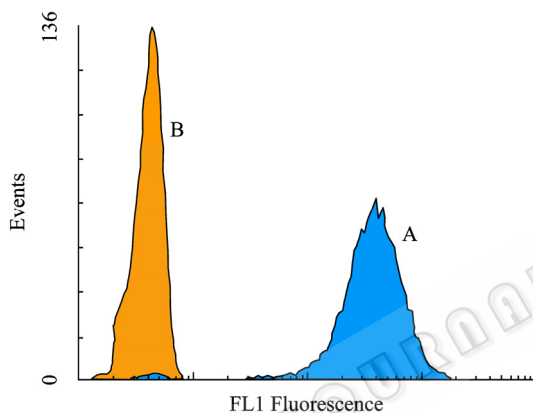


图 7 重组酵母 GS115/pPIC9K-Flag-RML-Sed1 流式细胞仪分析

Fig. 7 Flow cytometry analysis of GS115/pPIC9K-Flag-RML-Sed1

注: A: GS115/pPIC9K-Flag-RML-Sed1; B: 对照 *P. pastoris* GS115.

Note: A: GS115/pPIC9K-Flag-RML-Sed1; B: *P. pastoris* GS115 as a control.

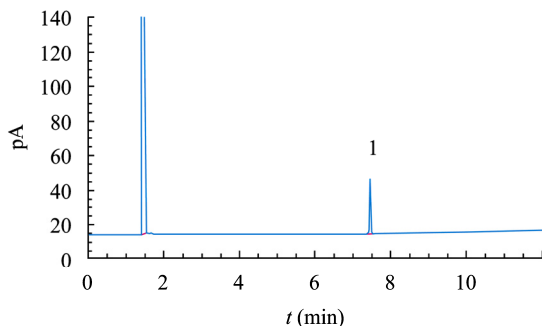


图 8 阴性对照菌株 *P. pastoris* GS115 全细胞催化色谱分析

注: 1: 棕榈酸甲酯(内标).

Note: 1: Methyl palmitate (Internal standard).

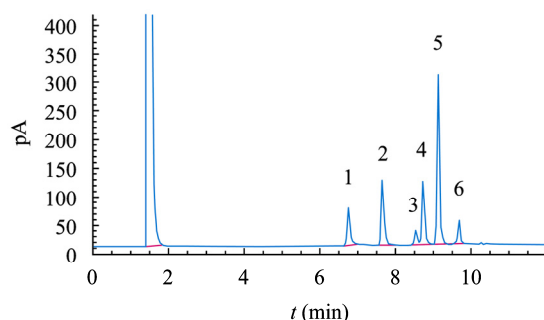


图 9 重组菌株 GS115/pPIC9K-Flag-RML-Sed1 全细胞催化色谱分析

Fig. 9 The chromatogram of sample product catalyzed by GS115/pPIC9K-Flag-RML-Sed1

注: 1: 棕榈酸甲酯(内标); 2: 十七碳酸甲酯; 3: 硬脂酸甲酯; 4: 油酸甲酯; 5: 亚油酸甲酯; 6: 亚麻酸甲酯.

Note: 1: Methyl palmitate (Internal standard); 2: Methyl carbonate 17; 3: Methyl stearate; 4: Methyl oleate; 5: Methyl linoleate; 6: Inolenic acid methyleste.

3 讨论

我们利用酿酒酵母锚定蛋白 Sed1p 成功地将 RML 展示在毕赤酵母表面上, 在发酵 144 h 后重组毕赤酵母酶活力达到 169.6 U/g (Dry cell weight), 高于韩双艳等^[8]利用酿酒酵母絮凝素在毕赤酵母展示 RML。虽然略低于张卫国^[7]等利用酿酒酵母 α -凝乳素在酿酒酵母表面展示 RML, 但是毕赤酵母能获得比酿酒酵母更高的细胞密度, 因此能够得到比酿酒酵母更高的产量。我们利用重组毕赤酵母冻干粉为全细胞催化剂在非水相中催化脂肪酸甲酯的合成取得了较好的结果。在反应 72 h 后, 脂肪酸甲酯的产率为 82.36%。利用重组毕赤酵母冻干粉作为全细胞催化剂, 具有较高的催化效果, 在具有固定化酶特点的同时还少了复杂的纯化步骤。对利用 Sed1p 锚定的毕赤酵母细胞表面展示 RML 的发酵和催化反应过程进行进一步优化, 将有利于 RML 全细胞催化剂在催化合成生产中的应用。

参考文献

- [1] Kennedy JF, Kumar H, Panesar PS, *et al.* Enzymecatalyzed regioselective synthesis of sugar esters and related compounds. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 2006, **81**(6): 866-876.
- [2] Robles-Medina A, González-Moreno PA, Esteban-Cerdán L, *et al.* Biocatalysis: towards ever greener biodiesel production. *Biotechnology advances*, 2009, **27**(4): 398-408.
- [3] Aravindan R, Anbumathi P, Viruthagiri T. Lipase

- applications in food industry. *Indian Journal of Biotechnology*, 2007, **6**(2): 141–158.
- [4] Chowdary G, Divakar S, PrapuLla S. Modelling on isoamyl isovalerate synthesis from *Rhizomucor miehei* lipase in organic media: optimization studies. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2002, **18**(3): 179–185.
- [5] Van der Vaart JM, Biesebeke R te, Chapman JW, *et al.* Comparison of cell wall proteins of *Saccharomyces cerevisiae* as anchors for cell surface expression of heterologous proteins. *Applied and Environmental Microbiology*, 1997, **63**(2): 615–620.
- [6] Matsumoto T, Fukuda H, Ueda M, *et al.* Construction of yeast strains with high cell surface lipase activity by using novel display systems based on the Flo1p flocculation functional domain. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, **68**(9): 4517–4522.
- [7] Zhang WG, Han SY, Wei DZ, *et al.* Functional display of *Rhizomucor miehei* lipase on surface of *Saccharomyces cerevisiae* with higher activity and its practical properties. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 2008, **83**(3): 329–335.
- [8] 韩双艳, 韩振林, 林影, 等. 高效絮凝素毕赤酵母表面展示系统的构建. *生物化学与生物物理进展*, 2010, **37**(2): 200–207.
- [9] Shimoi H, Kitagaki H, Ohmori H, *et al.* Sed1p is a major cell wall protein of *Saccharomyces cerevisiae* in the stationary phase and is involved in lytic enzyme resistance. *Journal of Bacteriology*, 1998, **180**(13): 3381–3387.
- [10] Hagen I, Ecker M, Lagorce A, *et al.* Sed1p and Srl1p are required to compensate for cell wall instability in *Saccharomyces cerevisiae* mutants defective in multiple GPI-anchored mannoproteins. *Molecular Microbiology*, 2004, **52**(5): 1413–1425.
- [11] 潘志友, 韩双艳, 林影, 等. 南极假丝酵母脂肪酶 B 的酿酒酵母表面展示及其催化已酸乙酯的合成. *生物工程学报*, 2008, **24**(4): 673–678.

征订启事

2011 年部分生物、农林类学术期刊联合征订表(2-1)

刊物名称	邮发代号	刊 期	年价(元)	网 址	E-mail
癌变·畸·突变	80-285	双月刊	60	www.egh.net.cn	cemsctm@stu.edu.cn
动物学研究	64-20	双月刊	150	www.zoores.ac.cn	zoores@mail.kiz.ac.cn
动物学杂志	2-422	双月刊	360	http://dwxzz.ioz.ac.cn	journal@ioz.ac.cn
分子植物育种	84-23	双月刊	240	www.molplantbreed.org	mpb@hibio.org
国际遗传学杂志	14-55	双月刊	90	www.cma.org.cn	genetics@ems.hrbmu.edu.cn
激光生物学报	42-194	双月刊	150	www.jgswxb.net	jgswxb@hunnu.edu.cn
菌物学报	2-499	双月刊	480	http://journals.im.ac.cn/jwxtcn	jwxt@im.ac.cn
昆虫知识	2-151	双月刊	360	www.ent-bull.com.cn	entom@ioz.ac.cn
林业科学	82-6	月 刊	300	www.linyekexue.net	linyex@forestry.ac.cn
农业生物技术学报	2-367	双月刊	240	www.jabiotech.org.cn/	nsjxb@cau.edu.cn
人类学学报	2-384	季 刊	100	www.ivpp.ac.cn	acta@ivpp.ac.cn
生命科学	4-628	月 刊	480	www.lifescience.net.cn	cbbs@sibs.ac.cn
生命科学研究	42-172	双月刊	108	http://smky.chinajournal.net.cn	life@hunnu.edu.cn
生物工程学报	82-13	月 刊	780	http://journals.im.ac.cn/cjbcn	cjb@im.ac.cn
生物化学与生物物理进展	2-816	月 刊	720	www.pibb.ac.cn	prog@sun5.ibp.ac.cn
生物技术通报	18-92	月 刊	300		biotech@mail.caas.net.cn
生物技术通讯	82-196	双月刊	150	http://swtx.chinajournal.net.cn	swtx@263.net