

嗜热枯草芽孢杆菌普鲁兰酶基因的表达与重组酶的性质

韩鹏¹ 周鹏¹ 闫巧娟² 杨绍青¹ 江正强^{1*}

(1. 中国农业大学 食品科学与营养工程学院 北京 100083)

(2. 中国农业大学 工学院 北京 100083)

摘要: 克隆嗜热枯草芽孢杆菌 WY-34 普鲁兰酶基因并在大肠杆菌中进行表达, 对重组酶进行纯化和酶学性质研究, 根据枯草芽孢杆菌的普鲁兰酶蛋白序列, 设计 PCR 引物对 WY-34 的普鲁兰酶基因进行克隆及异源表达。对表达蛋白的最适 pH、pH 稳定性及最适温度、温度稳定性等特性进行研究, 并测定重组普鲁兰酶的底物特异性。将普鲁兰酶基因 *pluA* 克隆及分析序列后, 发现基因长度为 2.2 kb, 编码 718 个氨基酸, 在大肠杆菌中异源表达。通过 Ni-IDA 亲和层析一步纯化得到比活力为 93.2 U/mg 的纯酶, SDS-PAGE 和凝胶层析测定的分子量分别为 76.2 kD 和 74.3 kD。酶学性质研究表明, 该酶的最适温度为 40 °C, 在温度不高于 45 °C 条件下稳定; 最适 pH 为 6.0, 同一温度下 pH 6.0-9.0 范围内处理 30 min 可以保持 80% 以上的酶活力, 此酶对普鲁兰糖有很强的底物特异性。此重组普鲁兰酶的酶学性质表明此酶具有一定的工业化应用价值。

关键词: 枯草芽孢杆菌, 普鲁兰酶, 酶学性质, 基因表达

Expression of a pullulanase gene from the thermophilic *Bacillus subtilis* and characterization of the recombinant enzyme

HAN Peng¹ ZHOU Peng¹ YAN Qiao-Juan² YANG Shao-Qing¹
JIANG Zheng-Qiang^{1*}

(1. College of Food Science and Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China)

(2. College of Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China)

Abstract: The pullulanase gene of thermophilic *Bacillus subtilis* WY-34 was cloned in *E. coli* to characterize the recombinant pullulanase. The *pluA* gene encoding pullulanase from the thermophilic *B. subtilis* WY-34 was overexpressed in *E. coli*. The properties of recombinant pullulanase were studied.

基金项目: 国家 863 计划项目(No. 2011AA100905); 新世纪优秀人才支持计划(No. NCET-08-0534)

* 通讯作者: Tel: 86-10-62737689; 信箱: zhqjiang@cau.edu.cn

收稿日期: 2011-05-21; 接受日期: 2011-08-04

Also substrate specificity of the recombinant pullulanase was evaluated in this paper. The *pluA* gene was 2.2 kb in length and encoded 718 amino acid protein. The recombinant pullulanase was purified to homogeneity using Ni-IDA agarose chromatography, resulting in a specific activity of 93.2 U/mg. SDS-PAGE and gel permeation chromatography analysis showed that the molecular weight of the protein is approximately 76.2 kD and 74.3 kD respectively. The purified enzyme was optimally active at 40 °C and pH 6.0, stable at 45 °C and retained more than 80% relative activity with in pH 6.0–9.0. It exhibited high substrate specificity toward pullulan. The properties of recombinant pullulanase may be useful for application of pullulanase in industry.

Keywords: *Bacillus subtilis*, Pullulanase, Enzyme characterization, Gene expression

普鲁兰糖是麦芽三糖通过 α -1,6-糖苷键连接的直链寡糖, 普鲁兰酶(EC 3.2.1.41)是指能高效水解普鲁兰糖的水解酶^[1]。根据底物特异性及水解产物可以把普鲁兰酶分为 4 种类型, 分别为 I 型普鲁兰酶、II 型普鲁兰酶、新普鲁兰酶和异普鲁兰酶, I 型普鲁兰酶水解普鲁兰糖和支链寡糖中的 α -1,6-糖苷键生成麦芽三糖和直链寡糖; 能水解普鲁兰糖中的 α -1,6-糖苷键同时也能水解其它多糖中的 α -1,4-糖苷键的为 II 型普鲁兰酶; 新普鲁兰酶和异普鲁兰酶作用于普鲁兰糖中 α -1,4-糖苷键分别产生潘糖和异潘糖^[2]。

普鲁兰酶可以将最短的支链分解, 最大限度地利用淀粉原料, 因此, 它在淀粉加工工业中有着重要的用途。例如: 可以利用普鲁兰酶生产高麦芽糖浆, 生产高纯度葡萄糖及果糖^[3]。目前应用最广、产量最大的普鲁兰酶源自 Novo 公司^[4]。芽孢杆菌属是产普鲁兰酶的主要种属之一, 其基因的表达在国内外已有一些报道, 但 I 型普鲁兰酶基因的表达并不多见。迄今, 报道的有来自嗜酸普鲁兰芽孢杆菌(*Bacillus acidopullulyticus*)^[5]、芽孢杆菌(*Bacillus flavocaldarius*) KP 1228^[6]、喜热嗜油芽孢杆菌(*Bacillus thermoleovorans*) US 105^[7]、泥土芽孢杆菌(*Geobacillus thermoleovorans*) US 105^[8]以及枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*) 168^[9]的基因。只有 Malle 等人将枯草芽孢杆菌 168 的 I 型普鲁兰酶基因在大肠杆菌中进行了表达。

本文克隆了嗜热枯草芽孢杆菌(Thermophilic *Bacillus subtilis*) WY-34 的 I 型普鲁兰酶基因并在

大肠杆菌中表达, 进一步研究了重组普鲁兰酶的酶学性质, 为该酶的工业化应用提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株:嗜热枯草芽孢杆菌 WY-34 菌株由本实验室从土壤中筛选和保存。

1.1.2 培养基:斜面培养基(g/L): 肉蛋白胨 10, 酵母提取物 5, 氯化钠 10, 琼脂 20, 定容至 1 L。

液体培养基(g/L): 肉蛋白胨 10, 酵母提取物 5, 氯化钠 10, 定容至 1 L。

1.2 方法

1.2.1 基因组 DNA 的提取:斜面培养基上生长 48 h 的新鲜菌株接入液体培养基, 培养 18 h 用于 DNA 提取, DNA 的提取采用 SDS 法《精编分子生物学实验指南》。

1.2.2 普鲁兰酶基因克隆:根据枯草芽孢杆菌的普鲁兰酶基因序列, 使用 DNAMAN 比对得到长的保守序列, 设计上下游简并引物, 通过 PCR 反应克隆基因片段。设计的简并引物 DP1: 5'-GAYGCNTAYA AYTGGGGNTA(DAYNWGY)-3', DP2: 5'-CCNGCD ATNCCRTGCATNAC(VMHGIAG)-3' (其中 N: A/G/C/T; Y: C/T; R: A/G)。PCR 反应体系参见使用说明, 枯草芽孢杆菌 WY34 的总 DNA 为模板, 反应条件为: 94 °C 5 min; 94 °C 30 s, 50 °C 30 s, 72 °C 1 min, 30 个循环; 72 °C 10 min。采用 1%的琼脂糖凝胶回收目的片段, 连接到 pMD-18T 载体上, 由上海生工北京公司测序。

根据普鲁兰酶基因序列和表达载体 pET-30a (+) 的多克隆位点设计正向引物 P1: 5'-CATATGTCAG CATCCGCCGAGC-3' (下划线处为 *Nco* I 酶切位点); 反向引物 P2: 5'-CTCAGAGCAAACTCTT AAGATCTG-3' (下划线处为 *Xho* I 酶切位点)。以基因组 DNA 为模板, PCR 条件为: 94 °C 5 min; 94 °C 30 s, 58 °C 30 s, 72 °C 4 min, 30 个循环; 72 °C 10 min。采用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测并回收 PCR 产物。将目的片段连接至 pMD18-T 载体, 热激转化 *E. coli* JM109。筛选阳性菌落, 提取重组质粒, 经酶切鉴定后测序。将测序正确的重组质粒用 *Nco* I 和 *Xho* I 酶切后, 回收目的片段, 连接至 pET-30a(+) 载体, 转化 *E. coli* Rosetta(DE3)。

1.2.3 基因表达: 大肠杆菌的种子培养使用含卡那霉素(50 mg/L)和氯霉素(25 mg/L) LB 培养基, 添加 1.5% 琼脂为 LB 固态培养基。从固态培养基上挑取阳性转化子到液体培养基中, 37 °C 培养 15 h, 以 2% 的接种量转接到 200 mL LB 培养基中, 30 °C 培养, 当培养液 OD_{600} 达到 0.6–0.8 时, 加入 IPTG 至终浓度 1 mmol/L, 诱导培养 15 h, 离心收集细胞。

1.2.4 酶活和蛋白浓度测定: 取 1 g 普鲁兰糖(日本林元)溶于 0.1 mol/L MES 缓冲溶液(pH 6.0)中, 使普鲁兰糖溶液终浓度为 10 g/L, 取此溶液 500 μ L 和等体积稀释酶液于 45 °C 水浴中反应 30 min, 用 DNS 法^[10]测定产生的还原糖的量, 同时以葡萄糖为标准。在以上条件下, 每分钟产生 1 μ mol 葡萄糖所需要的酶量为一个酶活单位(U)。

蛋白含量的测定采用 Lowry 法^[11], 以牛血清蛋白作为标准蛋白。

1.2.5 SDS-PAGE: 按照 Laemmli 方法进行^[12]。分离胶 7.5%, 浓缩胶 4.5%, 考马斯亮蓝 R 250 染色显示蛋白带, 双色预染宽分子量标准蛋白与样品在同一条件下电泳。

1.2.6 重组普鲁兰酶的纯化: 用含 0.5 mol/L NaCl 和 20 mmol/L 咪唑的 20 mmol/L pH 7.4 磷酸缓冲液

悬浮细胞, 超声波破碎, 4 °C、12 000 r/min 离心 15 min, 收集上清作为粗酶液。纯化采用 Ni-IDA 进行亲和层析, 以 1 mL/min 的流速用缓冲液(20 mmol/L pH 7.4 磷酸缓冲液, 0.5 mol/L NaCl, 20 mmol/L 咪唑)平衡柱料, 目标蛋白与柱料充分结合后, 用含 20 mmol/L 和 50 mmol/L 咪唑的缓冲液洗去未吸附的蛋白及其它杂质, 再用 50–150 mmol/L 咪唑进行线性洗脱, 收集纯蛋白。

1.2.7 重组普鲁兰酶分子量的测定: 纯酶非变性状态下分子量测定采用凝胶层析测定。层析柱为 1 cm \times 100 cm, 柱料为 Sephacryl S-200, 所用缓冲体系为含 0.15 mol/L NaCl, 20 mmol/L pH 7.4 磷酸缓冲液, 标准蛋白均购于 Sigma 公司, 上样量 0.2 mL, 每种标准蛋白的含量均为 1 mg。标准蛋白为 Alcohol dehydrogenase (150 kD), Albumin bovine (66 kD), Albumin from egg chicken white (45 kD), α -chymotrypsinogen A (Type II from Bovine Pancreas, 25.7 kD)。

1.2.8 重组普鲁兰酶的最适 pH 及 pH 稳定性: 40 °C 条件下, 在 pH 3.0–11.0 的不同缓冲体系中测定, 分别为磷酸/柠檬酸(pH 3.0–6.0)、醋酸(pH 4.0–5.5)、MES [2-(N-吗啉代)乙磺酸] (pH 5.0–7.0)、MOPS [3-(N-吗啉基)丙磺酸] (pH 6.5–8.5)、CHES (N-2-环己胺基乙磺酸) (pH 8.0–11.0)。以酶活最高点为 100%。pH 稳定性测定是用上述不同缓冲体系将纯酶稀释适当倍数, 40 °C 保温 30 min, 冰水浴冷却 30 min 后在 40 °C 下 100 mmol/L pH 6.0 MES 缓冲体系下测定残余酶活力, 以未处理的酶液为对照, 计算残余酶活占对照酶活力的百分比。

1.2.9 重组普鲁兰酶的最适温度及温度稳定性: 最适温度的测定是以 100 mmol/L pH 6.0 的 MES 缓冲液配置 1% 的普鲁兰糖底物, 分别在不同温度测定普鲁兰酶活力, 以酶活力最高点为 100%。温度稳定性的测定为酶液用同样的缓冲体系适当稀释后分别置于不同温度下处理 30 min, 冰水浴冷却 30 min, 以未经处理的酶液作为对照, 测定残余酶活力, 最后计算残余酶活力占对照酶活力的百分含量。

2 结果与讨论

2.1 普鲁兰酶基因的克隆和表达

利用引物 P1 和 P2 从嗜热枯草芽孢杆菌 WY-34 扩增得到与枯草芽孢杆菌 168 的普鲁兰酶基因大小基本一致约 2.2 kb 的片段。测序验证该基因与普鲁兰酶的同源性为 99%，说明已克隆嗜热枯草芽孢杆菌 WY-34 的普鲁兰酶基因，进一步在大肠表达，经诱导培养后，检测酶活为 3.6 U/mL 发酵液，酶比活 25.6 U/mg 蛋白。

嗜热枯草芽孢杆菌 WY-34 基因编码含 718 个氨基酸的蛋白，经 NCBI BLAST 比对分析，蛋白序列与来源于枯草芽孢杆菌 168 的 I 型普鲁兰酶最为相近，共有 9 个氨基酸不同，同源性为 99% (表 1)，说明此重组普鲁兰酶属于 I 型普鲁兰酶。与来源于枯草芽孢杆菌 BEST195 (BAI 86501) 的普鲁兰酶的同源性为 99%；与枯草芽孢杆菌 ATCC 6633 (ZP 06874494) 的同源性为 89%；但与萎缩芽孢杆菌 (*Bacillus atrophaeus*) 1942 (YP_003974414) 的普鲁兰酶的同源性为 69%；与地衣芽孢杆菌 (*Bacillus licheniformis*) ATCC14580 (YP 080284) 假定的普鲁

兰酶的同源性为 56%；与其他芽孢杆菌属的其它种(如泥土芽孢杆菌、蜡状芽孢杆菌)来源的普鲁兰酶的同源性在 50%左右。这说明枯草芽孢杆菌种内普鲁兰酶的差异较小，但在芽孢杆菌的不同种之间，普鲁兰酶的差异很大。

2.2 重组普鲁兰酶的纯化

重组普鲁兰酶纯化过程见表 2。粗酶液经亲和层析得到电泳纯普鲁兰酶(图 1)。重组普鲁兰酶纯化了 3.6 倍，回收率为 41.1%，比酶活力为 93.2 U/mg，高于枯草芽孢杆菌 168^[9]、泥土芽孢杆菌 US105^[8]、嗜热菌 (*Thermotoga neapolitana*)^[13]、海栖热袍菌 (*Thermotoga maritima*) MSB8^[14]、嗜热厌氧菌 (*Fervidobacterium pennavorans*) Ven5^[15] 的重组酶比活力，仅低于嗜酸普鲁兰芽孢杆菌^[5] 的重组 I 型普鲁兰酶比活力。

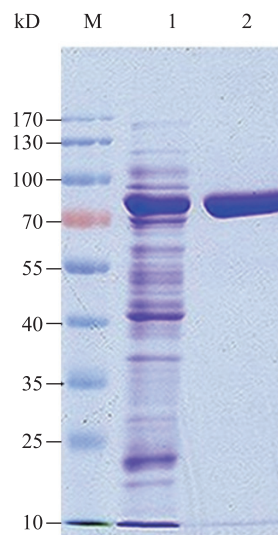


图 1 重组普鲁兰酶纯化图

Fig. 1 SDS-PAGE of the recombinant pullulanase during purification

注: M: 预染宽分子量标准蛋白; 1: 粗酶液; 2: Ni-IDA.

Note: M: Dual color prestained broad molecular weight standard; 1: Crude lysate; 2: Ni-IDA.

表 1 嗜热枯草芽孢杆菌 WY-34 与枯草芽孢杆菌 168 氨基酸差异比对

Table 1 Amino acid comparison between thermophilic *Bacillus subtilis* WY-34 and *Bacillus subtilis* 168

氨基酸位置 Amino acid position	B. S. WY34 (This study)	B. S. 168
40	T	I
46	V	A
68	P	T
112	S	A
179	P	Q
481	A	T
487	S	N
488	S	G
553	A	V

表 2 重组普鲁兰酶纯化表

Table 2 Summary of the recombinant pullulanase purification

纯化步骤 Steps	总蛋白 Total protein (mg)	总活力 Total activity (U)	比酶活力 Specific activity (U/mg)	回收率 Yield (%)	纯化倍数 Purification (fold)
粗酶液 Crude lysate	137.9	3 533.2	25.6	100	1
Ni 亲和柱 Ni-IDA	15.6	1 452.2	93.2	41.1	3.6

用 SDS-PAGE 和凝胶过滤测定重组普鲁兰酶的分子量分别为 76.2 kD 和 74.3 kD。这表明该重组普鲁兰酶是单亚基蛋白。该酶的分子量与已报道的一些普鲁兰酶的分子量相近,比如来源于枯草芽孢杆菌 168^[9]、嗜热放线菌(*Thermoactinomyces thalophilus*)^[16]、*F. pennavorans* Ven5 的普鲁兰酶^[15]。

2.3 重组普鲁兰酶的最适 pH 及 pH 稳定性

重组普鲁兰酶的最适 pH 为 6.0 (图 2A), pH 稳定性测定表明(图 2B), 该酶在 pH 6.0–9.0 范围内处理 30 min 可以保持 80% 以上的酶活力, 表现出良好的 pH 稳定性。

大多 I 型普鲁兰酶的最适 pH 范围很窄(pH 4.0–6.0), 此重组普鲁兰酶与喜热嗜油芽孢杆菌 US105^[7]、枯草芽孢杆菌 168^[9]和 *T. neapolitana*^[13] 的此类型普鲁兰酶的最适 pH 一致。

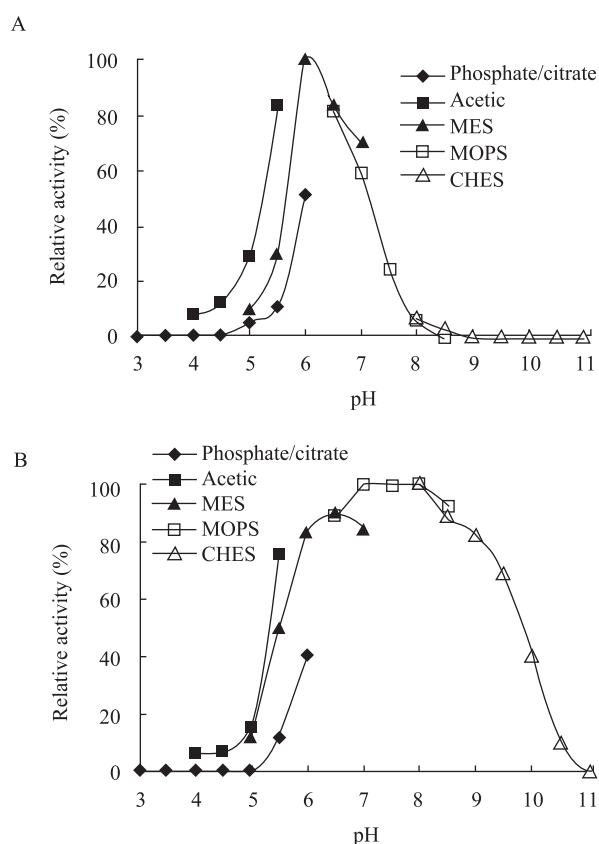


图 2 重组普鲁兰酶最适 pH(A)及 pH 稳定性(B)
Fig. 2 Optimal pH (A) and pH stability (B) of the recombinant pullulanase

2.4 重组普鲁兰酶的最适温度及温度稳定性

重组普鲁兰酶的最适温度为 40 °C (图 3A)。该酶在温度不高于 45 °C 条件下均很稳定, 当温度高于 45 °C 时酶活力迅速下降(图 3B)。同时, 测定了该酶在 35 °C、45 °C、50 °C 的半衰期, 根据图 3C 中半衰期公式计算出此酶在以上 3 个温度下的半衰期分别为 320 min、107 min 和 7 min。

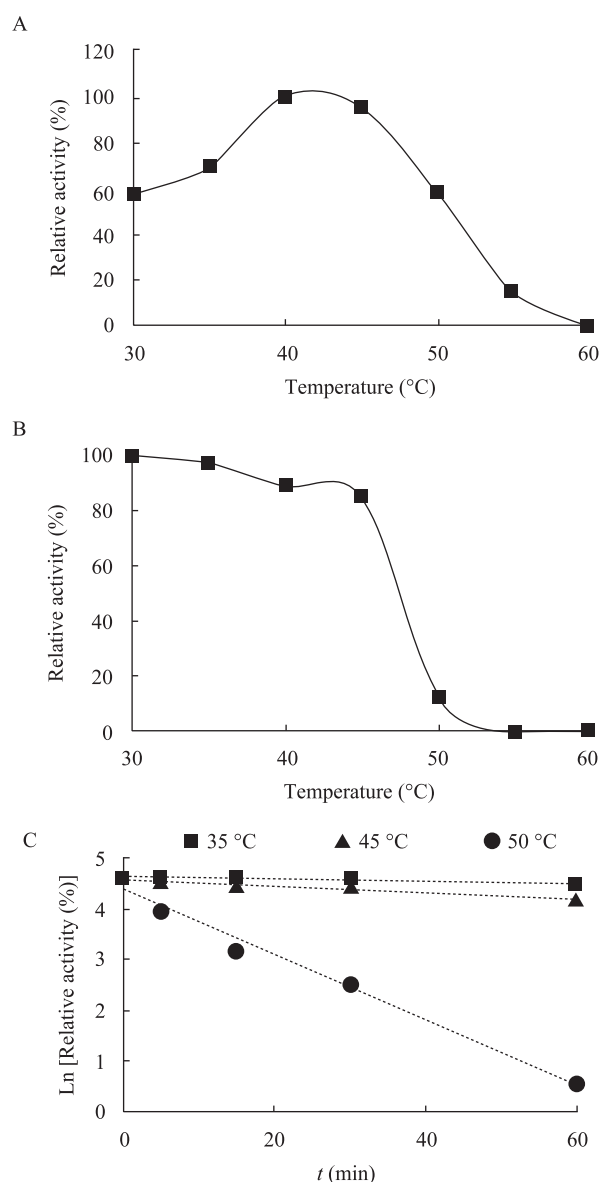


图 3 重组普鲁兰酶的最适温度(A)、温度稳定性(B)、和半衰期(C)

Fig. 3 Optimal temperature (A), thermostability (B) and thermal inactivation (C) of the recombinant pullulanase.
Note: 35 °C, $y = -0.0022x + 4.6157$, $R^2 = 0.9289$; 45 °C, $y = -0.0062x + 4.5782$, $R^2 = 0.9397$; 50 °C, $y = -0.0638x + 4.3649$, $R^2 = 0.9866$.

该酶的最适温度与其它 I 型重组普鲁兰酶相比, 与枯草芽孢杆菌 168 一致^[9], 低于嗜热嗜油芽孢杆菌 US105^[7]以及嗜酸普鲁兰芽孢杆菌^[5]。因其良好的温度稳定性及 pH 稳定性, 所以具有一定的工业应用前景。

2.5 重组普鲁兰酶的底物特异性

重组普鲁兰酶的底物特异性见表 3。研究表明, 该酶对普鲁兰糖表现出很高的活性, 同时, 对可溶性淀粉有一定的水解能力, 对可溶性淀粉的相对酶活为 17.5%。此酶对直链淀粉没有活性说明该酶属于 I 型普鲁兰酶。此重组酶的底物特异性与来自嗜碱性芽孢杆菌(*Alkaliphilic Bacillus* sp.) S-1 的胞内及胞外 I 型普鲁兰酶的底物特异性相似, 但可溶性淀粉的相对酶活略高于嗜碱性芽孢杆菌 S-1^[17]。由于此酶对普鲁兰糖有很强的底物特异性, 所以可以有效的用于麦芽低聚糖的生产。

表 3 重组普鲁兰酶的底物特异性

Table 3 Substrate specificity of the recombinant pullulanase

底物* Substrate	比酶活 Specific activity (U/mg)	相对酶活 Relative activity (%)
普鲁兰糖 Pullulan	93.2±0.8	100
可溶性淀粉 Soluble starch	16.3±0.7	17.5
直链淀粉 Amylose	—	—

注: * 以普鲁兰糖为底物测得的酶活力为 100%。

Note: *: The activity for pullulan was defined as 100%.

3 结论

本文克隆和表达了嗜热枯草芽孢杆菌 WY-34 普鲁兰酶基因, 所表达的 I 型普鲁兰酶与来源于枯草芽孢杆菌 168 的普鲁兰酶有 9 个氨基酸不同, 酶的比活高于枯草芽孢杆菌 168 的普鲁兰酶, 同时发现此重组普鲁兰酶具有良好的温度稳定性和 pH 稳定性, 对普鲁兰糖有很强的底物特异性。酶学性质表明此酶具有一定的工业化应用价值。

参考文献

[1] Abdel-Naby MA, Osman MY, Abdel-Fattah AF. Production of pullulanase by free and immobilized cells of *Ba-*

cillus licheniformis NRC22 in batch and continuous cultures[J]. *World J Microbiol Biotechnol*, 2011(5): 1-9.

- [2] Zareian S, Khajeh K, Ranjbar B, et al. Purification and characterization of a novel amylopullulanase that converts pullulan to glucose, maltose, and maltotriose and starch to glucose and maltose[J]. *Enzyme Microb Technol*, 2010, 46(2): 57-63.
- [3] Hyun HH, Zeikus JG. General biochemical characterization of thermostable pullulanase and glucoamylase from *Clostridium thermohydrosulfuricum*[J]. *Appl Environ Microbiol*, 1985, 49(5): 1168-1173.
- [4] 唐宝英, 朱晓慧, 刘佳. 耐酸耐热普鲁兰酶菌株的筛选及发酵条件的研究[J]. *微生物学通报*, 2001, 28(1): 39-43.
- [5] Jensen BF, Norman BE. *Bacillus acidopullulyticus* pullulanase: application and regulatory aspects for use in the food industry[J]. *Process Biochem*, 1984, 19(4): 351-369.
- [6] Suzuki Y, Htagaki K, Oda H. A hyperthermostable pullulanase produced by an extreme thermophile, *Bacillus flavocaldarius* KP 1228, and evidence for the proline theory of increasing thermostability[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1990, 34(6): 707-714.
- [7] Ben Messaoud E, Ben Ammar Y, Mellouli L, et al. Thermostable pullulanase type I from new isolated *Bacillus thermoleovorans* US105: cloning, sequencing and expression of the gene in *E. coli*[J]. *Enzyme Microb Technol*, 2002, 31(6): 827-832.
- [8] Ayadi DZ, Ben Ali M, Jemli S, et al. Heterologous expression, secretion and characterization of the *Geobacillus thermoleovorans* US105 type I pullulanase[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2008, 78(3): 473-481.
- [9] Malle D, Itoh T, Hashimoto W, et al. Overexpression, purification and preliminary X-ray analysis of pullulanase from *Bacillus subtilis* stain 168[J]. *Acta Cryst*, 2006, 62(Pt 4): 381-384.
- [10] Miller GL. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar[J]. *Anal Chem*, 1959, 31(3): 426-428.
- [11] Lowery OH, Rosebrough NJ, Farr AL, et al. Protein measurement with the folin phenol reagent[J]. *J Biol Chem*, 1951, 193(1): 265-275.
- [12] Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4[J]. *Nature*, 1970, 227(5259): 680-685.
- [13] Kang JH, Parka KM, Choi KH, et al. Molecular cloning and biochemical characterization of a heat-stable type I pullulanase from *Thermotoga neapolitana*[J]. *Enzyme Microb Technol*, 2011, 48(3): 260-266.

- [14] Kriegshäuser G, Liebl W. Pullulanase from the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima*: purification by β -cyclodextrin affinity chromatography[J]. J Chromatogr B, 2000, 737(1/2): 245–251.
- [15] Bertoldo C, Duffner F, Jorgensen PL, et al. Pullulanase type I from *Fervidobacterium pennavorans* Ven5: cloning, sequencing, and expression of the gene and biochemical characterization of the recombinant enzyme[J]. Appl Environ Microb, 1999, 65(5): 2084–2091.
- [16] Odibo FJC, Obi SKC. Purification and characterization of a thermostable pullulanase from *Thermoactinomyces thalophilus*[J]. J Ind Microbiol, 1988, 3(6): 343–350.
- [17] Lee MJ, Lee YC, Kim CH. Intracellular and extracellular forms of alkaline Pullulanase from an alkaliphilic *Bacillus* sp. S-1[J]. Arch Biochem Biophys, 1997, 337(2): 308–316.

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、高校教改纵横、名课讲堂、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

投稿时请登录我刊主页 <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 6 页以内,研究报告 4–8 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。国外期刊名要规范完整,不用斜体。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[J]. 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]. Journal of Biological Chemistry, 2001, 276(39): 36514–36519.

图书: [3] 钱存柔,黄仪秀. 微生物实验教程[M]. 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[M]. 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: 2011-00-00; 接受日期: 2011-00-00

(下转 p.1777)