

Burkholderia pickettii 中 D-乙内酰脲酶基因(*dha*) 的克隆、测序及表达

许 祯 姜卫红 焦瑞身 杨蕴刘*

(中国科学院上海植物生理生态研究所, 上海 200032)

摘 要 对一株能转化 D,L-对羟基苯乙内酰脲为 D-对羟基苯甘氨酸的菌株 MMR003 进行了细菌分类学鉴定, 该菌为皮氏伯克霍尔德氏菌(*Burkholderia pickettii*)。实验通过 Southern 杂交、部分文库构建和筛选, 并经一系列亚克隆测序分析, 获得一长度为 1374bp 的完整开放阅读框, 编码 458 个氨基酸的 D-乙内酰脲酶基因。用该基因序列构建的高表达质粒 pXZPH2 转化 *E. coli* BL21(DE3) 经 IPTG 诱导后, 检测到 D-乙内酰脲酶活性。该基因编码的氨基酸序列经 Blast 同源比较分析与放射形土壤杆菌 NRRL B11291 所产相应酶有 85% 的同源性。以 D,L-对羟基苯乙内酰脲为底物测得的表达酶的活力为 0.66u/mL, 比相同条件下所测出发菌株 MMR003 的酶活提高了 2 倍。

关键词 皮氏伯克霍尔德氏菌, D-乙内酰脲酶, 克隆, 表达

中图分类号 Q78 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2002)02-0149-06

阿莫西林和头孢羟氨苄是临床使用最为广泛的半合成 β -内酰胺类抗生素, 该类抗生素分子由 2 个结构部分组成: 含 β -内酰胺环的母核和 D-对羟基苯甘氨酸(D-p-hydroxyphenylglycine)侧链。后者可利用 D,L-对羟基苯乙内酰脲(D,L-p-hydroxyphenylhydantoin)为原料经化学法或酶法水解而获得。由于酶法制备产品得率较化学法高且具有环保优势, 因此近年来工业上已有用酶法生产 D-对羟基苯甘氨酸的报道^[1]。

酶法生产即是以 D,L-对羟基苯乙内酰脲为底物经 D-乙内酰脲酶(D-hydantoinase, Dhase, EC 3.5.2.2)和 D-脱氨甲酰基酶(D-decarbonylase, Dcase)的酶促转化产生 D-对羟基苯甘氨酸。研究表明, 产 D-乙内酰脲酶的微生物在自然界中广泛分布^[2], 活力较高的产酶菌种有恶臭假单胞菌 DSM 84^[3], 嗜热脂肪芽孢杆菌 SD-1^[4,5], 芽孢杆菌 AR 9^[6], 环状芽孢杆菌^[7], 根癌土壤杆菌^[8], 热链形芽孢杆菌 GH-2^[9], 金黄节杆菌 DSM 3745^[10]等, 而有一些微生物, 如芽生杆菌 A17p-4^[11], 放射形土壤杆菌 NRRL B11291^[12], 成晶节杆菌 AM2^[13]等同时具有 D-乙内酰脲酶和 D-脱氨甲酰基酶活性。其中, 放射形土壤杆菌 NRRL B11291^[12], 恶臭假单胞菌^[3,14], 嗜热脂肪芽孢杆菌 SD-1^[4,5]的相关酶基因已被克隆、测序并进行了基因

表达的研究。我国孙万儒曾报道过产 D-乙内酰脲酶微生物的筛选、分离和发酵条件^[15,16], 但未见分子生物学方面的研究报告。本项工作主要对一支工业上用于制备 D-对羟基苯甘氨酸兼具 D-乙内酰脲酶和 D-脱氨甲酰基酶活性的 MMR003 菌株进行了细菌分类学鉴定, 并完成了 D-乙内酰脲酶编码基因的克隆、测序和在大肠杆菌中表达的研究。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒 菌株 *E. coli* DH5 α , *E. coli* BL21(DE3) 及质粒 pBluscript KS(+) 和 pET28b 由本室保存。放射形土壤杆菌 NRRL B11291 购自 NRRL, 该菌染色体上编码的 D-乙内酰脲酶(*dha*) 和 D-脱氨甲酰基酶(*dca*) 基因已被克隆, 得到带 *dha* 的重组质粒 pXZAH2 和带 *dca* 的重组质粒 pXZACX(待发表)。菌株 MMR003 由浙江海正药业有限公司提供。质粒 pGEMT 购自 Promega 公司。

1.1.2 试剂和工具酶 限制酶, T4 DNA 连接酶和碱性磷酸酶(CIAP)为 Promega 公司产品。溶菌酶、蛋白酶 K 和 RNA 酶为 Sigma 公司产品。寡核苷酸引物由上海基康公司合成。PCR 扩增所用试剂为生工公司产品。D,L-对羟基苯乙内酰脲, N-氨甲酰-对羟

基苯甘氨酸(N-carbamoyl-D-hydroxyphenylglycine)由浙江海正药业有限公司提供。其余为国产分析纯试剂。

1.1.3 培养基及培养条件 培养 *E. coli* 所用 LB 培养基, LB 选择培养基及培养条件均按参考文献 [19]。MMR003 (*Burkholderia pickettii*) 的产酶培养需在 LB 液体培养基中添加 1% 5-甲硫乙基乙内酰胺作为诱导物, 28℃ 摇床培养(180r/min) 36h。进行总 DNA 抽提的 MMR003 (*Burkholderia pickettii*) 的培养条件为 LB 液体培养基, 28℃ 摇床培养(180r/min) 18 ~ 24h。

1.2 方法

1.2.1 细菌学鉴定方法 按文献 [17, 18] 方法进行。

1.2.2 分子生物学方法 :MMR003 (*Burkholderia pickettii*) 总 DNA 的大量提取, 总 DNA 的限制性酶切, Southern 杂交, 菌落原位杂交, 质粒 DNA 抽提、酶切、去磷酸、连接、凝胶电泳、基因的诱导表达等实验方法均按参考文献 [19] 进行。胶回收 DNA, TA 克隆均按照相应的产品说明书进行。

1.2.3 酶活测定方法 将收获的菌体加入适量的生理盐水洗涤一次并悬浮在 0.3mL 含有 1% 的对羟基苯乙内酰胺的 $\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{-Na}_2\text{HPO}_4$ 缓冲液中(0.1 mol/L, pH8.0) 40℃ 反应 1h, 立即离心, 取上清 250 μL 加入到 550 μL 含 5% 对二甲氨基苯甲醛的 6mol/L 盐酸溶液中, 并在 438nm 测定 OD 值。根据相应的标准曲线计算酶活。1 酶活定义为每小时产生 1 μmol N-氨甲酰-对羟基苯甘氨酸所需酶量。

1.2.4 SDS-PAGE 分析 :为测定全菌体中 D-乙内酰胺酶蛋白的表达量, *E. coli* BL21(DE3)pXZPH2 转化子 37℃ 培养至 OD_{600} 为 0.6 经 1mmol/L IPTG 诱导培养 2h, 收集菌体, 加 SDS 凝胶加样缓冲液(还原性), 煮沸 5min 裂解全细胞, 高速离心, 取上清液进行 SDS-PAGE 分析。为测定全菌体中可溶性 D-乙内酰胺酶蛋白的表达量, 收集菌体并悬浮在 H_2O 中, 超声波破碎处理, 离心, 分别取上清及沉淀物进行 SDS-PAGE 分析。

2 结果

2.1 MMR003 菌株的细菌学分类鉴定

MMR003 是一支在工业上用于酶法转化 D, L-对羟基苯乙内酰胺为 D-对羟基苯甘氨酸的双酶菌株, 为便于从该菌株中克隆 D-乙内酰胺酶和 D-脱氨甲酰基酶编码基因及进行下游工作, 首先对该菌进行了分类鉴定的研究。有关该菌的形态, 生长和生理

学特征总结如下:

MMR003 为杆状单生的革兰氏阴性菌, 大小为 $(0.5 \sim 0.6) \mu\text{m} \times (1.0 \sim 2.0) \mu\text{m}$, 无荚膜, 菌落圆, 表面有皱褶, 在 LB 上的老培养物为褐色。单根极生鞭毛, 运动, 严格好氧生长, 在休-利夫森氧化发酵培养基上呈氧化产酸反应。胞内有聚 β -羟基丁酸盐颗粒。在 41℃ 生长, 但 pH4.5 不生长。接触酶和氧化酶皆阳性。不产生精氨酸双水解酶和卵磷脂酶, 不水解明胶、淀粉, 不还原硝酸盐, 不利用乙酸盐厌氧生长, 但能利用硝酸盐厌氧生长。能利用葡萄糖、木糖、蔗糖、鼠李糖和酒石酸盐生长。

根据以上特征, 参照 Bergey 氏细菌学分类手册 [17] 和 Yubuumchi 等 [18] 的有关说明, MMR003 被鉴定为皮氏伯克霍尔德氏菌 (*Burkholderia pickettii*)。图 1 则为该菌的电子显微镜照片。

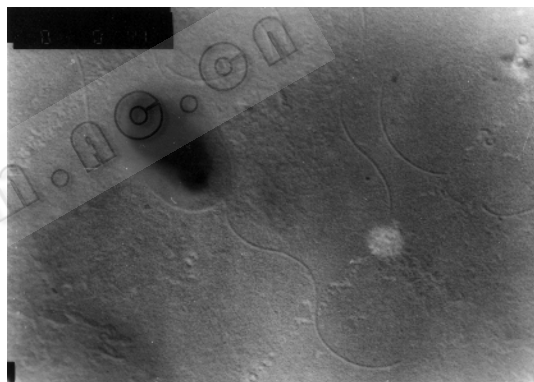


图 1 MMR003 (*Burkholderia pickettii*) 菌株的透射电镜照片(19000 \times)

Fig.1 Morphology of MMR003 (*Burkholderia pickettii*), TEM, 19000 \times

2.2 MMR003 (*Burkholderia pickettii*) D-乙内酰胺酶基因的克隆

2.2.1 基因杂交探针的选择 :为了从 MMR003 (*Burkholderia pickettii*) 中克隆 D-乙内酰胺酶的编码基因, 在预备实验中, 分别用放射性土壤杆菌 NRRL B11291 的 D-脱氨甲酰基酶基因片段 [12], 恶臭假单胞菌的 D-乙内酰胺酶基因的重组质粒 pQE38 [14] 以及假单胞菌中的 122bp 的寡核苷酸 DNA [3] 作为探针(同位素 ^{32}P 标记), 与不同限制酶消化的 MMR003 总 DNA 片段进行 Southern 杂交, 结果发现 ^{32}P 标记的放射性土壤杆菌 NRRL B11291 的 D-脱氨甲酰基酶基因片段可与 MMR003 总 DNA 的不同酶切片段形成阳性杂交带。图 2 为杂交结果。

2.2.2 MMR003 (*Burkholderia pickettii*) 中目标基因片段的克隆 鉴于产双酶的菌株中 D-乙内酰胺酶基因

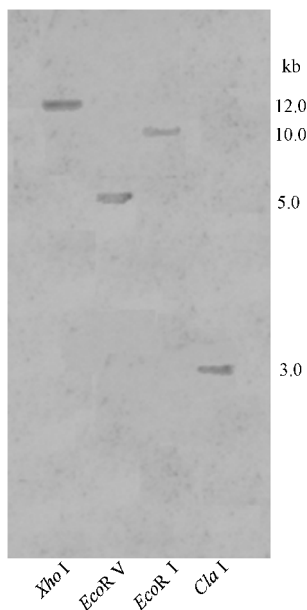


图2 皮氏伯克霍尔德氏菌 MMR003 DNA 的不同限制性酶切片段与³²P 标记根癌土壤杆菌 NRRL B11291 D-脱氨甲酰基酶基因(*dca*)片段探针的 Southern 杂交图

Fig.2 Southern-blotting for DNA restriction fragments of MMR003(*Burkholderia pickettii*) probing with *dca* of *Agrobacterium radiobacter* NRRL B11291

和 D-脱氨甲酰基酶基因呈连锁分布,而与探针呈阳性杂交的 5.0kb *EcoR V* 酶切片段是所希望克隆基因长度的 3~4 倍,所以很有可能包括 D-乙内酰胺酶基因的全序列。因此,从 MMR003 的细胞中抽提总 DNA,以 *EcoR V* 完全酶切,从电泳后的凝胶上分离回收 5.0kb 的 *EcoR V* 酶切片段,将其与同样酶切并去磷酸化的载体质粒 pBluKS(+) 的线性 DNA 连接,连接产物转化 *E. coli* DH5 α 感受态细胞,并涂布于含 100 μ g/mL 氨苄青霉素的选择平板上,构建部分基因文库。用 ³²P 标记的放射性土壤杆菌 NRRL B11291 的 D-脱氨甲酰基酶基因片段探针进行菌落原位杂交,从约 1000 多个转化子中筛选获得一支阳性克隆株。该阳性克隆株含有的重组质粒长度为 7.9kb,将其命名为 pXZ-total。图 3 为重组质粒 pXZ-total 的图谱。

2.2.2 目标基因片段的序列测定:为了对重组质粒 pXZ-total 中 5.0kb 的 *EcoR V* 酶切外源片段进行 DNA 序列测定,首先用 *Not I* 将该质粒 DNA 切成约 1.5kb、2.5kb 和 4.0kb 3 个片段,分别将这些片段亚克隆到 pBluKS(+) 载体质粒中,得到亚克隆质粒 pXZ-KS-N1.5、pXZ-KS-N2.5 和 pXZ-KS-N4.0。测序所用引物见表 1。

2.2.3 MMR003(*Burkholderia pickettii*)D-乙内酰胺酶

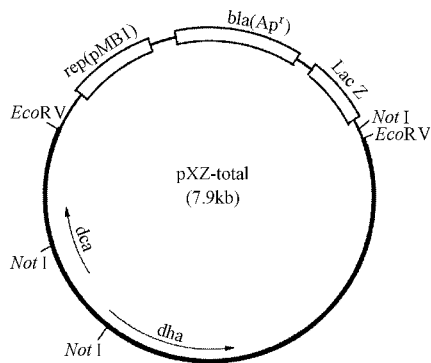


图3 重组质粒 pXZ-total 的图谱

Fig.3 The map of the recombinant plasmid of pXZ-total

表 1 测序所用引物

Table 1 The primers used in sequencing

Subclone	Primer used in sequencing
PXZ-KS-N1.5	SK Primer, T7 Primer 5'cggtctctagaagctatcg3'
PXZ-KS-N2.5	T3 Primer 5'acgccgccgactatctgc3' 5'ttccctaccagttctg3'
PXZ-KS-N4.0	T3 Primer

基因的 DNA 序列:对 5.0kb *EcoR V* 片段测序后,采用 BioEdit 对所测得序列的分析证明该片段含有两个完整的开放阅读框,其一起始于 1758 位 ATG,终止于 3129 位 TAA 的正向 ORF 为 D-乙内酰胺酶的编码基因,共长 1374bp,编码 458 个氨基酸的多肽,在 ATG 上游 7 个碱基处有一 GAGAG 序列,可能与 16S rRNA 的 3' 端序列相结合;其二经分析比较为 D-脱氨甲酰基酶的编码基因。二酶基因呈连锁分布,但阅读方向相反。全序列已登录到 GenBank,登录号为 AF320814。

利用 Blast 软件与其它来源的同类酶进行同源性比较证明该顺向 ORF 与来源于放射形土壤杆菌 NRRL B11291、嗜热脂肪芽孢杆菌 SD-1、恶臭假单胞菌 DSM84 以及 *Ratus norvegicus* 4 种微生物的 D-乙内酰胺酶基因编码蛋白的同源性分别为 85%、47%、35%、33%(图 4)。

2.3 MMR003(*Burkholderia pickettii*)D-乙内酰胺酶基因在大肠杆菌中的表达

2.3.1 重组质粒 pXZPH2 的构建:为构建表达 D-乙内酰胺酶的基因工程菌,根据 Primer 软件设计扩增 *dha* 基因的两条引物 5'gctagcatggacatcattatcaaa3' 和 5'aagcttaaatgcgggtttactg3',以 pXZ-total 质粒 DNA 为模板,进行 PCR 扩增,扩增条件为 94 $^{\circ}$ C 变性 5min 后,94 $^{\circ}$ C 变性 1min,51 $^{\circ}$ C 退火 1min,72 $^{\circ}$ C 延伸 1.5min,共进行 30 个循环,最后 72 $^{\circ}$ C 放置 10min 用于添加碱基 A。然后按流程图构建得到高表达质粒 pXZPH2,见图 5。

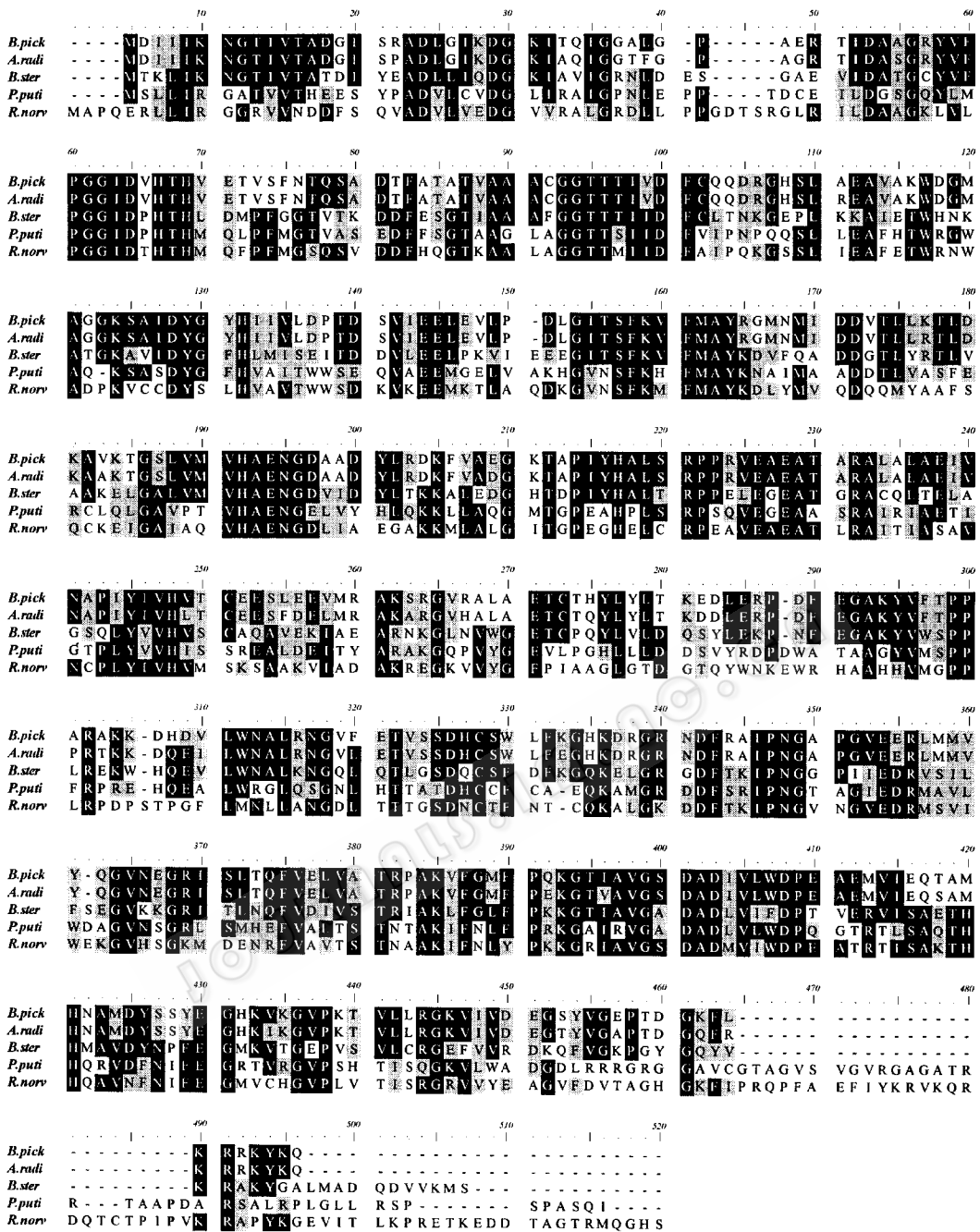


图4 不同来源的D-乙内酰胺酶氨基酸序列的同源比较

Fig.4 Alignment of amino acid sequences of hydantoinase from *Burkholderia pickettii* MMR003 (B. pick), *Agrobacterium radiobacter* NRRL B11291 (A. radi), *Bacillus stearothermophilus* SD-1 (B. ster), *Pseudomonas putida* DSM 84 (P. puti), and *Ratus norvegicus* (R. norv)

2.3.2 D-乙内酰胺酶蛋白在大肠杆菌中表达量分析 经 SDS-PAGE 分析, D-乙内酰胺酶蛋白分子量在还原条件下为 50kD。SDS-PAGE 结果经 IS-1000 Digital Imaging System 分析, 酶蛋白占菌体总蛋白的 38.2%, 菌体经超声波破碎处理后, 上清中酶蛋白占菌体总蛋白的 14.5%, 沉淀物中酶蛋白占菌体总蛋白 24.5%。见图 6。由此推测, *E. coli* BL21 (DE3) pXZPH2 表达的 D-乙内酰胺酶蛋白主要以包涵体的

形式存在。同时, 测定以 D,L-对羟基苯乙内酰胺为底物经 IPTG 诱导后的菌体的酶活为 0.66u/mL, 较同样条件下经 5-甲硫乙基乙内酰胺诱导后相同菌浓的出发菌株 MMR003 的酶活提高 2 倍。

3 讨论

MMR003 (*Burkholderia pickettii*) 的 D-乙内酰胺酶基因所编码的蛋白只与放射形土壤杆菌 NRRL

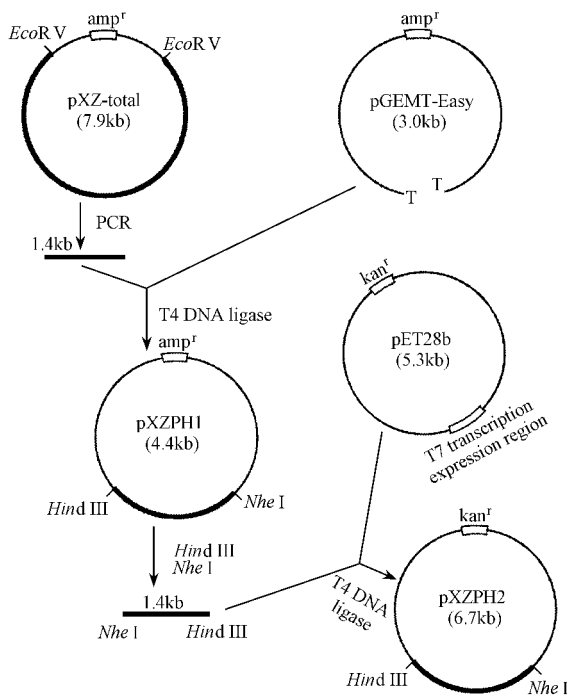


图 5 D-乙内酰胺酶高表达质粒 pXZPH2 的构建

Fig.5 Construction of recombinant plasmid pXZPH2 overexpressing the Dhase in *E. coli*

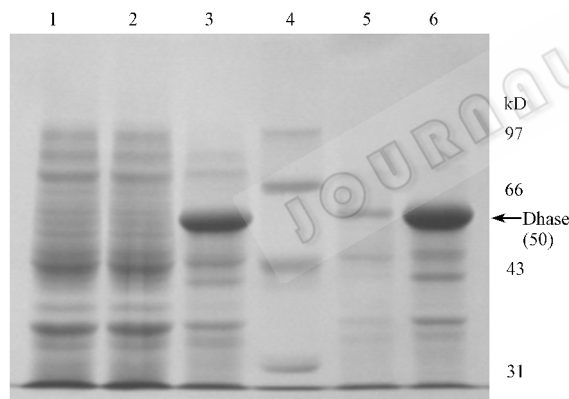


图 6 在诱导和未诱导条件下 D-乙内酰胺酶表达量的 SDS-PAGE 图

Fig.6 SDS-PAGE analysis of the expression of *dha* gene in *E. coli* induced with or without IPTG

1) *E. coli* BL21(DE3) 2) *E. coli* BL21(DE3) pXZPH2 without IPTG 3) *E. coli* BL21(DE3) pXZPH2 with IPTG 4) Marker 5) The supernatant of *E. coli* BL21(DE3) pXZPH2 with IPTG treated with sonication 6) The precipitation of *E. coli* BL21(DE3) pXZPH2 with IPTG treated with sonication

B11291 有较高的同源性(85%),而与嗜热脂肪芽孢杆菌 SD-1,恶臭假单胞菌 DSM84 以及 *Ratus norvegicus* 3 种生物的 D-乙内酰胺酶基因编码蛋白的同源性分别为 47% 35% 33%。比较和分析它们之间的保守序列与非保守序列将为研究该酶的催化位点和底物结合位点提供重要的信息,并为利用分子生

物学手段改造和提高该酶活力及稳定性提供有力的依据。

虽然我们所构建的高表达质粒转化大肠杆菌后测得的活力比出发菌株提高 2 倍,但所表达的可溶性酶蛋白只占所表达酶蛋白的 37%,也就是说以 T7 RNA 聚合酶启动子表达系统构建的该高表达质粒所表达的可溶性功能酶蛋白较少,故酶活力提高幅度远低于酶蛋白表达总量的提高幅度。所以选择不同的表达系统或共转化一种或几种分子伴侣帮助蛋白正确折叠将有可能解决这一问题。

REFERENCES(参考文献)

- [1] Syldatk C, Laufer A, Müller R *et al.* Production of optically pure D- and L-alpha-amino acids by bioconversion of D,L-5-monosubstituted hydantoin derivatives. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 1990, **41**: 31 ~ 75
- [2] Syldatk C, May O, Alterbuchner J *et al.* Microbial hydantoinases-industrial enzymes from the origin of life? *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1999, **51**(3): 293 ~ 309
- [3] LaPointe G, Viau S, LeBlanc D *et al.* Cloning, sequencing, and expression in *Escherichia coli* of the D-hydantoinase gene from *Pseudomonas putida* and distribution of homologous genes in other microorganisms. *Appl Environ Microbiol.* 1994, **60**(3): 888 ~ 895
- [4] Kim G J, Park J H, Lee D C *et al.* Primary structure, sequence analysis, and expression of the thermostable D-hydantoinase from *Bacillus stearothermophilus* SD-1. *Mol Gen Genet.* 1997, **255**(2): 152 ~ 156
- [5] Lee S G, Lee D C, Kim H S. Purification and characterization of thermostable D-hydantoinase from thermophilic *Bacillus stearothermophilus* SD-1. *Appl Biochem Biotechnol.* 1997, **62**(2-3): 251 ~ 266
- [6] Sharma R, Vohra R M. A thermostable D-hydantoinase isolated from a mesophilic *Bacillus* sp AR9. *Biochem Biophys. Res Commun.* 1997, **234**(2): 485 ~ 488
- [7] Luksa V, Starkuviene V, Starkuviene B *et al.* Purification and characterization of the D-hydantoinase from *Bacillus circulans*. *Appl Biochem Biotechnol.* 1997, **62**(2-3): 219 ~ 231
- [8] Durham D R, Weber J E. Properties of D-hydantoinase from *Agrobacterium tumefaciens* and its use for the preparation of N-carbamyl D-amino acids. *Biochem Biophys Res Commun.* 1995, **216**(3): 1095 ~ 1100
- [9] Park J H, Kim G J, Lee S G *et al.* Biochemical properties of thermostable D-hydantoinase from *Bacillus thermocatenulatus* GH-2. *Ann N Y Acad Sci.* 1998, **864**: 337 ~ 340
- [10] May O, Siemann M, Pietzsch M *et al.* Substrate-dependent enantioselectivity of a novel hydantoinase from *Arthrobacter aureus* DSM 3745: purification and characterization as new member of cyclic amidases. *J Biotechnol.* 1998, **61**(1): 1 ~ 13
- [11] Soong C L, Ogawa J, Honda M *et al.* Cyclic-imide-hydrolyzing activity of D-hydantoinase from *Blastobacter* sp. strain A17p-4. *Appl*

- [12] Renata G , Giuliano G , Giovanna C *et al.* Efficient conversion of 5-substituted hydantoin to D- α -amino acids using recombinant *Escherichia coli* strains . *Microbiology* ,1998 ,**144** 947 ~ 954
- [13] Möller A , Syltatk C , Schulze M *et al.* Stereo- and substrate-specificity of a D-hydantoinase and a D-N-carbamyl-amino acid amidohydrolyase of *Arthrobacter crystallopoietes* AM2 . *Enzyme Microb Technol* , 1998 , **10** 618 ~ 625
- [14] Chien H R , Jih Y L , Yang W Y *et al.* Identification of the open reading frame for the *Pseudomonas putida* D-hydantoinase gene and expression of the gene in *Escherichia coli* . *Biochem Biophys Acta* , 1998 , **1395** 68 ~ 77
- [15] JIANG N (江宁) , REN Y H (任永娥) , QIANG Y (强亚静) *et al.* Breeding of hydantoinase overproduction strains by resistance of substrate analogue . *Acta Microbiologica Sinica* (微生物学报) ,1995 ,**35** (5) 342 ~ 345
- [16] SUN W R (孙万儒) . Screening of strains producing dihydropyrimidinase and fermentation conditions . *Acta Microbiologica Sinica* (微生物学报) ,1983 ,**23** (2) :133 ~ 142
- [17] Bergey 's Manual of Systematic Bacteriology . 1984 , Vol. 1 , pp141 ~ 199 .
- [18] Yubuunchi E *et al.* Proposal of *Burkholderia* gen. nov. and transfer of seven species of the genus *Pseudomonas* homology group II to the new genus with the type species *Burkholderia cepacia* comb. nov. *Microbiol Immunol* ,1992 ,**36** :1251 ~ 1275
- [19] Sambrook J , Fritsch E F , Maniatis T . Molecular Cloning :A Laboratory Manual . 2nd ed , New York : Cold Spring Harbor Laboratory Press , 1989

Cloning , Sequencing and High Expression in *Escherichia coli* of D-hydantoinase Gene from *Burkholderia pickettii*

XU Zhen JIANG Wei-Hong JIAO Rui-Shen YANG Yun-Liu*

(Shanghai Institute of Plant Physiology and Ecology , Shanghai Institute for Biological Science , Chinese Academy of Sciences , Shanghai 200032 , China)

Abstract A strain , MMR003 , used for D-p-HPG production in industry was classified as *Burkholderia pickettii* by morphological observation and biochemical characterization . The gene encoding the D-hydantoinase enzyme was cloned , sequenced and expressed in *Escherichia coli* . The nucleotide sequence of the 5.0kb insert of subclone pXZ-total was determined . One open reading frame of 1374bp was found and predicted to encode a polypeptide consisting of 458 amino acids in size of 50kD . The amino acid sequence alignment of D-hydantoinase from *Burkholderia pickettii* shows the 85% homologous with the corresponding enzyme from *Agrobacterium radiobacter* NRRL B11291 . The D-hydantoinase gene (*dha*) harboured in the plasmid pXZPH2 in *E. coli* BL21(DE3) was highly expressed by IPTG induction . The D-hydantoinase activity for D , L-p-hydroxyphenylhydantoin is 0.66u/ mL broth , which is 2-fold increase compared to the parent strain *Burkholderia pickettii* .

Key words *Burkholderia pickettii* , D-hydantoinase , cloning , expression

Received : 2001-09-21

* Corresponding author . Tel 86-21-64042090 ; Fax 86-21-64042385 ; E-mail ylyang@iris.sipp.ac.cn

本期广告索引

企 业	版 位	企 业	版 位
Amersham Biosciences 公司	封底	杭州大和公司	中心彩插 I
Roche 诊断公司	封二	北京东方科技公司	中心彩插 II
Agilent 公司	封三	扬中威柯特公司	文后彩插 I , p. 256
Promege 公司	文前彩插 I, II	上海保兴生物设备公司	文后彩插 II
扬中韦宁科仪公司	文前彩插 III	Promege 公司	文后黑白插 I
江苏达森集团	文前彩插 IV	江苏大学生物工程所	文后黑白插 II
常州三环生物工程公司	文前彩插 V	宁波星普基因技术公司	p. 255
镇江东方生物工程公司	文前彩插 VI	宁波新芝生物科技公司	p. 254