

抗 SARS 人源单链抗体 H12 的表达及复性 Expression and Renaturation of a Novel Human Single-chain Fv Antibody Against SARS-CoV

段金柱^{1,2}, 齐 财³, 韩 伟², 王战会³, 靳 刚^{2,3}, 阎锡蕴^{2,*}

DUAN Jin-Zhu^{1,2}, QI Cai³, HAN Wei², WANG Zhan-Hui³, JIN Gang^{2,3} and YAN Xi-Yun^{2,*}

1. 中国科学院微生物研究所微生物资源前期开发国家重点实验室, 北京 100080

2. 中国科学院生物物理研究所生物大分子国家重点实验室, 北京 100101

3. 中国科学院力学研究所微重力国家实验室, 北京 100080

1. State Key Laboratory of Microbial Resources, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences (CAS), Beijing 100080, China

2. National Laboratory of Biomacromolecules, Institute of Biophysics, CAS, Beijing 100101, China

3. National Microgravity Laboratory, Institute of Mechanics, CAS, Beijing 100080, China

摘 要 从 SARS 免疫抗体库获得的一株抗 SARS-CoV 人源单链抗体 H12 亟待鉴定。为了快速制备大量具有生物活性的单链抗体 H12 构建了 pET28a-H12 原核高表达载体, 表达量占菌体总蛋白质 30% 以上。采用稀释复性和分子筛柱复性两种方法对包涵体蛋白进行复性与纯化, 结果显示两种方法都能使得单链抗体复性。与稀释复性法相比, 柱复性效果更好, 其抗原结合活性是稀释复性法的 1.51 倍。柱复性后的单链抗体亲和力测定的解离常数 K_d 为 73.5nmol/mL。为进一步研究单链抗体 H12 的功能奠定了基础。

关键词 单链抗体, 原核表达, 包涵体, 复性, SARS-CoV

中图分类号 Q786, R373 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2005)05-0692-06

Abstract A novel human ScFv H12 against SARS-CoV has been selected from a SARS immune library. In order to produce a large amount of ScFv H12, pET28a-H12 expression vector was constructed and ScFv H12 was expressed at yield about 30% of total proteins in *E. coli*. Here two different refolding procedures were used to refold ScFv H12 from inclusion body: gel filtration chromatography and dilution. The results showed that ScFv H12 could be efficiently refolded by both procedures. However, the refolding via gel filtration was 1.5 time more effective than that of dilution. The affinity of ScFv H12 to SARS-CoV virion was detected as $K_d = 73.5\text{nmol/mL}$.

Key words single-chain Fv antibody, refolding, SARS-CoV

随着抗体工程技术的发展, 人源抗体越来越多的用于疾病的治疗。单链抗体(Single chain Fv, ScFv)是由抗体重链可变区(V_H)和轻链可变区(V_L)

经连接肽拼接后形成的小分子抗体。这种新的抗体片段在保持原有抗体结合特异性的基础上, 由于分子量小, 易于原核表达、快速大量制备, 对于新抗体

Received: March 29, 2005; Accepted: May 13, 2005.

This work was supported by a grant from the National Basic Research Program of China(973) Specific for SARS Prevention and Therapy (No. 2003CB514114).

* Corresponding author. Tel: 86-10-64888583; E-mail: yanxy@sun5.ibp.ac.cn

国家 973 重点基础研究发展规划项目 SARS 治疗专项基金资助 (No. 2003CB514114) 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

相关性质的快速鉴定及疾病的治疗具有重要意义。

SARS 是一种由 SARS 冠状病毒(SARS-CoV)引起的严重传染性疾病^[1-3],尚无有效的治疗药物。尽管 SARS 的大规模流行已经得到控制,然而加强 SARS 预防和治疗试剂的研制不仅可以对 SARS 的复燃进行有效的技术和物质储备,而且对 SARS-CoV 致病机理的研究以及预防其他突发事件的发生具有重要意义^[4-6]。本室利用噬菌体展示技术构建了 SARS 免疫抗体库,成功筛到多株单链抗体,其中一株单链抗体 H12 显示了更高的特异性和亲和力,为了大量获得有活性的单链抗体 H12,我们对其进行了表达及纯化。

由于重组蛋白在大肠杆菌中的高水平表达经常导致无活性的蛋白聚集体——包涵体。包涵体蛋白需经过一个适合的复性过程才能成为具有天然构象的活性蛋白。尽管国内外对于融合蛋白的复性已取得了许多经验^[7-9],但是由于蛋白质的个体差异较大,使得每种蛋白质适用的复性方法不同。本实验采用两种复性方法对 SARS 免疫抗体库获得的一株单链抗体 H12 进行了复性研究,我们筛到的 H12 这株单链抗体与传统单链抗体不同,为 V_L-Linker-V_H 形式,并且 Linker 区采用了特殊设计的 21 肽(SGGSTIITSYNYVYTKLSSSGT),对于这种形式的单链抗体表达、复性国内外少有报道,因此,研究单链抗体 H12 复性,增加个案分析,对于促进单链抗体的复性研究具有重要启示意义。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 质粒与菌种 pET28a(+)表达载体及表达菌株 BL21(DE3) 购自 Novagen 公司,含有单链抗体 H12 基因的载体 pDNA5^[10]由本室从 SARS 免疫抗体库筛选得到。

1.1.2 试剂与仪器:限制酶与 T4 连接酶(NEB);DNA 凝胶纯化试剂盒(QIAGEN);抗 His-Tag 抗体、凝胶 Sephacryl S-200HR 和 Chelating Sepharose™ Fast Flow His 亲和柱(Pharmacia);HRP 标记的羊抗鼠(Pierce);Bio-Rad 液相层析系统 Biologic LP 及酶联免疫检测仪 Model 550 Microplate Reader;变角度光谱椭圆仪 Variable Angle Spectroscopic Ellipsometers(J. A. Woollam Co. Inc.)

1.2 方法

1.2.1 单链抗体的表达载体构建:根据 H12 序列,设计了一对带有酶切位点的引物 5'-GGT CGC GGA

TCC GAC ATC CGG GTG ACC CAG TCT CC-3' 5'-TGC GGC CGC AAG CTT TGA GGA GAC AGT GAC CGT TG-3'。PCR 扩增获得带有酶切位点 BamH I 和 Hind III 的单链抗体基因片段,酶切插入表达载体 pET28a(+)相应酶切位点,重组 pET28a(+)转化表达菌 BL21(DE3),挑取单克隆 PCR 鉴定,并测序,命名为 pET28a-H12。

1.2.2 单链抗体的表达:pET28a-H12 单克隆 37℃ 过夜培养,次日 10% 接种新鲜 LB 培养基,37℃ 生长至 OD₆₀₀ 约 0.6~0.8,加入 IPTG 至终浓度 1mmol/L,诱导表达 4h,离心收集菌体,超声破碎菌体,分别收集可溶及不溶部分,SDS-PAGE 分析表达形式。

1.2.3 包涵体纯化:超声破碎后,离心收集包涵体沉淀,分别用含 2.5mol/L NaCl,0.5% Triton X-100 和 2mol/L 尿素的 50mmol/L Tris-HCl,pH8.7,2mmol/L EDTA 溶液洗涤,最后离心沉淀即为纯化后的包涵体。

1.2.4 单链抗体的复性:A. 稀释复性:将洗涤纯化后的包涵体 13000g 离心 30min 称取沉淀重量,用变性液(6mol/L 盐酸胍,25mmol/L Tris-HCl,pH8.7,10mmol/L EDTA,10mmol/L DTT)溶解变性,为保证盐酸胍 6mol/L 浓度,加入与沉淀同重量的固体盐酸胍,复性前离心去除不溶物。取 1mL 溶解变性液,逐滴加入 300mL 复性液(3mol/L 尿素,25 mmol/L Tris-HCl,pH8.1,0.1mmol/L 还原型谷胱甘肽,1mmol/L 氧化型谷胱甘肽,0.4mol/L L-精氨酸)至终浓度 0.1 mg/mL,4℃ 放置 24h,先对 0.25mmol/L 尿素,25mmol/L Tris-HCl,pH8.0,0.15mol/L NaCl 溶液缓慢透析,然后以 25mmol/L Tris-HCl,pH8.0,0.15mol/L NaCl 溶液透析,除去 L-精氨酸及残余 DTT,复性产物过 His 亲和柱纯化浓缩。

B. 柱复性:将洗涤纯化后的包涵体 13000g 离心 30min,沉淀用 8mol/L 尿素,50mmol/L Tris-HCl,pH8.7,2mmol/L EDTA,10mmol/L DTT 变性液溶解过夜,离心过 0.45μm 膜。凝胶柱采用 Sephacryl S-200HR 层析柱(10mm × 1000mm),复性平衡液为 50mmol/L Tris-HCl,pH8.3,0.15mol/L NaCl,0.4mol/L L-精氨酸,2mmol/L EDTA,0.1mol/L 尿素,0.4mmol/L 还原型谷胱甘肽,1mmol/L 氧化型谷胱甘肽,流速 0.2mL/min,收集单链抗体目标峰。

1.2.5 SDS-PAGE 电泳及 Western blot 检测:SDS-PAGE 电泳,用 12% 分离胶;Western blot 分析:SDS-PAGE 电泳后的凝胶于电转印装置中 70V 转 3h,取出转有蛋白质的硝酸纤维素膜,5% 脱脂奶粉封闭,分

别用鼠抗 His6-Tag 抗体为二抗,辣根过氧化物酶(HRP)标记羊抗鼠为三抗,加入 HRP 发光底物, X 光片曝光分析结果。

1.2.6 ELISA 鉴定活性:用纯化的灭活 SARS 病毒颗粒^[11](包被液 1:50 稀释)包被 96 孔酶联板,4℃过夜。封闭液(1% BSA 溶于 PBS 中)37℃封闭 2h,把抗体加入到包被的酶联板中,37℃温育 1h。用 PBST 及 PBS 分别洗板 4 次。分别加鼠抗 His6-Tag 抗体为二抗,HRP-羊抗鼠为三抗,OPD-H₂O₂ 显色,2mol/L H₂SO₄ 终止反应,在 490 nm 处检测每孔的 OD 值(光吸收值)。

1.2.7 单链抗体的亲和力测定:单链抗体 H12 亲和力采用变角度光谱椭圆仪 Variable Angle Spectroscopic Ellipsometers (J. A. Woollam Co. Inc.)测定。首先将纯化的灭活 SARS 病毒颗粒共价结合在蛋白芯片上的特定区域,牛血清封闭后,蛋白芯片放入含有 PBS 的小槽里,迅速加入等体积抗体溶液,抗体特异结合后,待测区域的表面蛋白灰度随之增加,通过仪器实时监测待测区域的表面蛋白灰度变化,绘制出抗体实时结合曲线,从而计算出亲和力^[12-14]。

2 结果

2.1 构建 SARS 单链抗体高效表达载体

基于 Bradbury 等^[10]构建的体内重组载体 pDNA5,我们构建了 SARS 免疫抗体库,并从中筛选出 SARS 特异单链抗体 H12。单链抗体 H12 的轻链和重链可变区的连接肽(linker)是为了适应 pDNA5 重组载体而特殊设计的 21 肽(SGGSTITSYNVYYTKLSSSGT)。这种 ScFv H12 / pDNA5 重组载体能够在大肠杆菌 HB2151 中可溶表达,但是表达量较低,不能满足该单链抗体的功能实验。因此,为了大量获得有活性的单链抗体 H12,我们将单链抗体 H12 基因克隆到表达载体 pET28a(+)上,构建 pET28a-H12 表达质粒(图 1)。重组载体经 PCR(图 2)和测序鉴定,证明 H12 基因序列正确。

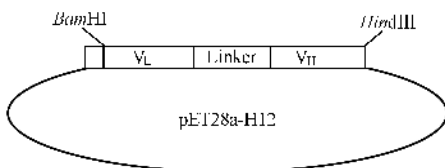


图 1 pET28a-H12 重组表达载体示意图

Fig. 1 Schematic diagram of pET28a-H12 expression vector

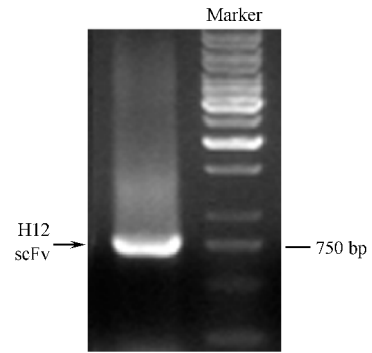


图 2 PCR 鉴定重组质粒中的 ScFv H12 基因
Fig. 2 PCR identification of ScFv H12 gene in the pET28a-H12 expression vector

2.2 单链抗体 H12 的诱导表达

将 pET28a-H12 基因导入大肠杆菌 BL21(DE3)中表达。经 IPTG 诱导 4h 后,对菌体超声破碎。用 SDS-PAGE 电泳分析表达产物。结果表明,在大约 29kD 出现一条明显增粗的蛋白带,即为单链抗体 H12 表达产物,表达量占总蛋白的 30% 以上,且主要表达形式为包涵体(图 3)。通过进一步降低诱导温度,包涵体表达形式未获得明显改变。

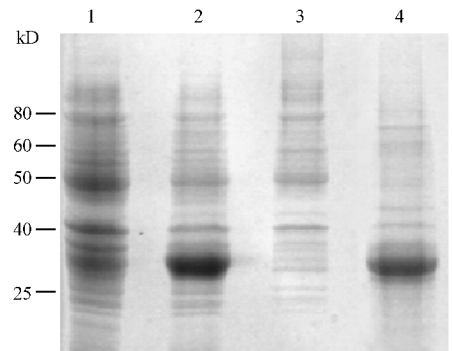


图 3 SDS-PAGE 电泳分析单链抗体 H12 的诱导表达

Fig. 3 SDS-PAGE analysis of the expression of ScFv H12 in *E. coli*

1 non-IPTG induced cell lysate; 2 ~ 4: IPTG-induced cell lysate (2) supernatant (3) and inclusion body (4).

2.3 包涵体纯化

根据文献报道 pH 值偏碱的变性液有利于复性^[15]我们采用了 pH 8.7 变性缓冲液对单链抗体 H12 包涵体进行洗涤纯化。SDS-PAGE 分析显示,洗涤后包涵体纯度可达 90% 以上,这为复性奠定了基础。

2.4 稀释法复性单链抗体 H12

传统复性通常采用两种方式,稀释复性或缓慢透析复性,但效果通常不好。为了研究单链抗体

H12 传统复性效果,为将来生产应用提供依据,我们通过对传统复性方法改进,尝试了单链抗体 H12 稀释、透析复性的效果。由于 ScFv 含有链内二硫键,二硫键的正确形成对于单链抗体复性至关重要^[16-17]因此,我们应优先考虑二硫键的正确形成。由于随盐酸胍浓度下降到 0.5mol/L 以下,折叠迅速发生并完成,这易造成错误的折叠,而随尿素浓度减少,折叠发生较缓慢,在 3~3.5mol/L 时处于 50% 折叠与非折叠的动态中间过程^[18]。利用单链抗体随盐酸胍与尿素浓度减少的蛋白质折叠动力学差异,结合稀释复性和缓慢透析复性二者优缺点,我们将包涵体盐酸胍变性后先缓慢稀释到 3mol/L 尿素复性液,使蛋白终浓度为 0.1mg/mL,低温放置,利用 GSH/CSSG 氧化,使链内二硫键易于正确形成。此外,为了更有效地防止中间体聚集,使分子内二硫键正确形成,加入了 0.4mol/L 精氨酸。透析时先利用含 0.25mol/L 尿素缓冲液缓慢透析过渡,然后利用 His 亲和柱结合缓冲液快速透析,并直接用 His 亲和柱浓缩纯化,获得高浓度单链抗体,经 SDS-PAGE 和 Western blot 分析纯度 >95%,且没有多聚体产生(图 4),以复性后 ScFv 蛋白量与复性前包涵体蛋白量之比计算回收率为 11.1%。

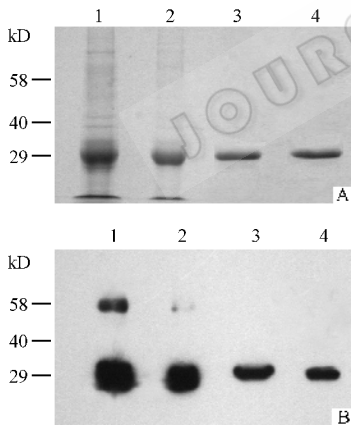


图 4 单链抗体 H12 表达与纯化分析

Fig. 4 Analysis of ScFv H12 before and after refolding

A SDS-PAGE; B Western blot; 1 inclusion body; 2 purified inclusion body; 3 H12 refolded by dilution; 4 H12 refolded by gel filtration on a column.

2.5 柱复性

柱复性近几年来被尝试用于包涵体蛋白的体外复性^[19],可以在高蛋白浓度下实现复性,且操作简便,复性率高,因此,我们也尝试了单链抗体 H12 的柱复性。用复性缓冲液平衡好 Sephacryl S-200HR 凝胶层析柱,将 4mL 变性蛋白(浓度 2mg/mL)上样,流速 0.2mL/min 进行洗脱,洗脱图谱见图 5,峰 1 为复

性蛋白,峰 2 及峰 3 分别为 DTT 及尿素,收集峰 1。先用 50mmol/L Tris · HCl, pH8.3, 0.15mol/L NaCl, 2mmol/L EDTA 缓冲液缓慢透析,然后用 PBS 透析,取透析后的蛋白 SDS-PAGE 及 Western blot 检测,证明复性后蛋白为 29kD 唯一一条带(图 4)。透析后以复性后单链抗体蛋白量与复性前包涵体蛋白量之比计算回收率,最高可达 70.5%。

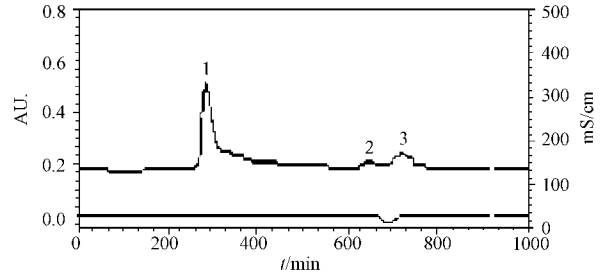


图 5 Sephacryl S-200HR 凝胶层析柱对单链抗体 H12 复性的洗脱图谱

Fig. 5 The refolding of ScFv H12 with Sephacryl S-200HR
1 ScFv H12 2 DTT 3 urea; - UV; ---conductivity.

2.6 ELISA 检测复性的单链抗体活性

不同的复性方法,由于复性率不同使得蛋白活性都有差别,为了选择活性最好的用于进一步的功能实验,我们检测了两种复性方法获得的单链抗体 H12 抗原结合活性。两种抗体均以 30μg/mL 作为起始浓度,10 倍系列稀释两个梯度进行检测(如图 6 所示),在高浓度时,由于抗体结合抗原处于饱和状态,二者 ELISA 的 OD 值区别不大,然而随着单链抗体浓度的稀释,两种复性方法获得的单链抗体抗原结合活性表现出差异,柱复性获得的单链抗体 H12 抗原结合活性约为稀释复性的 1.06~1.51 倍,显示二者蛋白浓度虽然相同,但复性率不同,即有活性的单链抗体 H12 的浓度不同,柱复性具有更高的复性

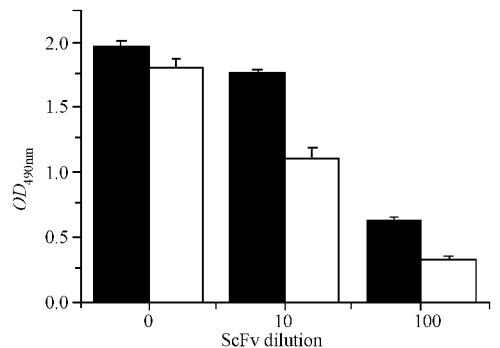


Fig. 6 ELISA 检测单链抗体 H12 的活性

Fig. 6 ELISA analysis the activity of ScFv H12

■ H12 refolded by gel filtration on a column; □ H12 refolded by dilution

率,这使得 ELISA 实验中,柱复性获得的单链抗体 H12 需稀释更多倍数,与抗原结合反应才进入对数下降期,从而表现为柱复性获得的单链抗体 H12 随

抗体的稀释,抗原结合活性变化相对小一些。总结两种复性结果如表 1。

表 1 两种复性方法的复性效果

Table 1 The comparison of ScFv H12 with two refolding methods

Refolding method	Protein recovery	Purity	Activity ratio ($OD_{\text{refolding by gel filtration}}/OD_{\text{refolding by dilution}}$)
Refolded by dilution	11.1%	> 95%	1
Refolded by gel filtration	70.5%	> 95%	1.06 ~ 1.51

Note: Protein recovery is the ratio of the quantity of the refolded ScFv protein per quantity of inclusion body before refolding; activity ratio is the ratio of ELISA OD value of ScFv refolded by two different procedures in the same protein concentration.

2.7 单链抗体亲和力测定

利用柱复性获得的单链抗体,我们进一步测定了对灭活 SARS 病毒颗粒的亲和力。椭扁仪是利用椭扁光学成像技术研究生物分子之间相互作用的一种新型的光学检测技术,可以像表面等离子波共振 (SPR) 传感器技术一样实时检测蛋白分子间结合作用,获得抗体对抗原的实时结合曲线,从而计算出分子间亲和力的大小。利用该技术测定单链抗体 H12 具有高亲和力, K_d 为 73.5nmol/L (表 2)。

表 2 柱复性单链抗体 H12 动力学参数及结合亲和力
Table 2 Kinetic rates and binding affinity of ScFv H12

$K_{\text{on}} [(\text{mol/L})^{-1} \cdot \text{s}^{-1}]$	$K_{\text{off}}/\text{s}^{-1}$	$K_a (\text{L/mol})$	$K_d (\text{mol/L})$
7.5×10^3	6.6×10^{-4}	1.36×10^7	7.35×10^{-8}

3 讨论

噬菌体抗体库技术的快速发展,使得利用基因工程获得的治疗性人源抗体越来越多。面对 SARS 对人类的威胁,快速获得治疗性抗体在临床上非常迫切。本文研究的单链抗体 H12 是一株对 SARS 病毒特异的单链抗体,在临床上具有潜在的应用价值。

单链抗体的原核表达多以包涵体形式表达,它的复性研究虽已有报道,然而融合蛋白复性的复杂性使得我们必须对每一种蛋白特殊对待。H12 在单链抗体的形式上与传统的单链抗体有极大的区别,除了 V_L -Linker- V_H 取向 V_L 在前 V_H 在后,与通常单链抗体不同,特殊设计的 Linker 区必然影响到单链抗体的折叠特性,因此,研究单链抗体 H12 复性特点十分必要,不仅有利于单链抗体 H12 的大量生产,而且对于其它类似单链抗体的复性也有启示作用。

稀释复性与透析复性是两种最简便的复性方法,但通常难以成功,复性率低,为 5% ~ 20%^[20]。通过对稀释复性有效的修饰,虽然获得了 11.1% 的蛋白回收率,但是活性的回收率却不及柱复性的单

链抗体 H12,更重要的是,柱复性可以在高蛋白浓度下实现复性与纯化一步完成,且操作简便,复性率高,如本文试验所示,正是由于柱复性较高的复性率,使得柱复性纯化的单链抗体 H12 与抗原的结合活性相应的高于稀释复性,因此,对于单链抗体 H12 柱复性依然是优先于稀释透析复性的选择,柱复性获得单链抗体 H12 不仅具有对灭活 SARS 病毒颗粒的特异性,而且具有 73.5nmol/L 高亲和力(单链抗体通常的 K_d 值 1000 ~ 1nmol/L, K_d 值越低,亲和力越高),这对于抗病毒研究与应用将具有重要意义。

REFERENCES (参考文献)

- [1] Peiris JS, Lai ST, Poon LL *et al.* Coronavirus as a possible cause of severe acute respiratory syndrome. *Lancet*, 2003, **361**:1319 - 1325
- [2] Drosten C, Gunther S, Preiser W *et al.* Identification of a novel coronavirus in patients with severe acute respiratory syndrome. *New England Journal of Medicine*, 2003, **348**:1967 - 1976
- [3] Ksiazek TG, Erdman D, Goldsmith CS *et al.* A novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. *New England Journal of Medicine*, 2003, **348**:1953 - 1966
- [4] Holmes KV. SARS coronavirus: a new challenge for prevention and therapy. *Journal of Clinical Investigation*, 2003, **111**:1605 - 1609
- [5] Pearson H, Clarke T, Abbott A, Knight J & Cyranoski D. SARS: what have we learned? *Nature*, 2003, **424**:121 - 126
- [6] Yan XY (阎锡蕴), Zhang JX (张锦彬). Severe acute respiration syndrome. *Acta Biophysica Sinica*, 2003, **19**(2):120 - 124
- [7] Fang M (方敏), Huang HL (黄华珺). The development of inclusion body refolding *in vitro*. *Chinese Journal of Biotechnology (生物工程学报)*, 2001, **17**(6):608 - 612
- [8] Luo YM (罗元明), Mou Y (牟颖), Wei JY (魏景艳) *et al.* Studies on the optimal expression condition, purification and its characterization of ScFv-2F3. *Chinese Journal of Biotechnology (生物工程学报)* 2002, **18**(1):74 - 78
- [9] Feng XL (冯小黎). Refolding of recombinant inclusion body proteins. *Progress in Biochemistry and Biophysics (生物化学与生物物理进展)* 2000, **28**(4):482 - 485

- [10] Sblattero D , Bradbury A. Exploiting recombination in single bacteria to make large phage antibody libraries. *Nature Biotechnology* , 2000 , **18** : 75 - 80
- [11] Lin Y , Yan X , Cao W *et al.* Probing the structure of the SARS coronavirus using scanning electron microscopy. *Antiviral Therapy* , 2004 , **9** : 287 - 289
- [12] Elwing H. Protein absorption and ellipsometry in biomaterial research. *Biomaterial* , 1998 , **19** : 397 - 406
- [13] Wang ZH , Jin G. A label-free multisensing immunosensor based on imaging ellipsometry. *Analytical Chemistry* , 2003 , **75** : 6119 - 6123
- [14] Malmberg AC , Michaelsson A , Ohlin M *et al.* Real time analysis of antibody-antigen reaction kinetics , *Scand. Journal of Immunology* , 1992 , **35** : 643 - 650
- [15] Zhu H (朱慧) , Liu W (刘伟) , Shi W (史蔚) *et al.* Research on renaturation of recombinant human pro-urokinase expressed from *E. coli*. *Chinese Journal of Biotechnology* (生物工程学报) , 2000 , **16** (2) : 150 - 154
- [16] Middelberg AP. Preparative protein refolding. *Trends Biotechnol.* 2002 , **20** (10) : 437 - 443
- [17] Wang X (王雪) , Song C (宋长征) . Impact factor and condition of protein refolding. *Foreign Medicine Molecular Biology Fascicule* (国外医学分子生物学分册) , 2003 , **25** (6) : 358 - 360
- [18] Carl AK , Borrebaeck. *Antibody Engineering*. New York : Oxford University Press. 1995
- [19] Batas B , Chaudhuri JB. Protein refolding at high concentration using size-exclusion chromatography. *Biotechnol Bioeng* , 1996 , **50** (1) : 16 - 23
- [20] Marston FAO. The purification of eukaryotic polypeptides synthesized in *Escherichia coli*. *Biochem. J.* 1986 , **240** (1) : 1 - 12

3.4 中英文摘要

中文摘要应简洁明确,而英文摘要则可比中文摘要详尽些,内容上不必完全对应。本刊非常重视英文摘要的写作,具体要求如下:

3.4.1 字数 综述性文章要求不少于 200words,学术性文章要求 200~400words。

3.4.2 内容 综述性文章的文摘主要应对所述的研究课题或技术在某时期的发展情况进行简要概述,包括该技术在目前的发展水平、自己的评论及未来展望等。研究报告的文摘应主要从目的、过程与方法、结果等几方面来写(不用单列标题书写)。目的主要是说明作者写此文章的目的,或说明该研究要解决的问题,过程与方法应重点说明作者的主要工作过程及使用的方法,引用他人的方法勿在文摘中提出;结果和结论部分,应写明本文的创新之处,及作者在讨论部分表述的观点。对于应用性的文章,如果需要也可在文摘中适当提及实验条件、使用的主要设备和仪器,结论部分应尽可能提及本结果和结论的应用范围、应用情况或应用前景。

3.4.3 写法:

1)最好用重要的事实开头,避免用第一人称或辅助从句开头。2)用过去时态叙述作者工作,用现在时态叙述作者结论。3)关键词应明确、具体,一些模糊、笼统的词语最好不用,如基因、表达……

英文摘要完成后的最终效果应是,国外同行根据英文摘要及图表,就可以大致了解论文的全貌。文摘写完后,应请英文较好的专家审阅定稿后再寄至编辑部。

4 特别说明

4.1 关于综述

综述类稿件一定要结合自己的工作,应具备文献新,观点明,有评论,有展望,切忌资料堆砌。

4.2 关于测序类论文

凡涉及测定 DNA、RNA 或蛋白质序列的论文,请先通过计算机网络进入国际基因库 EMBL(欧洲)或 GenBank(美国)

或 DDBJ(日本),申请得到国际基因库接受号(Accession No.)后再投来。

4.3 关于版权

4.3.1 本刊只接受未公开发表的文章,请勿一稿两投。

4.3.2 凡在本刊通过审稿,同意刊出的文章,所有形式的(即各种文字、各种介质的)版权均属本刊编辑部所有。作者如有异议,敬请事先声明。

4.3.3 对录用的稿件编辑部有权进行文字加工,但如涉及内容的大量改动,将请作者过目同意。

4.3.4 文责自负。作者必须保证论文的真实性,因抄袭剽窃、弄虚作假等行为引发的一切后果,由作者自负。

4.4 审稿程序及提前发表

4.4.1 来稿刊登与否由编委会最后审定。凡被录用的稿件将及时发出录用通知,对不录用的稿件,一般在收到来稿 3 个月之内致函说明原因。打印及复印稿不退,请自留底稿及原图,特殊情况请在来稿时注明。

4.4.2 对投稿的个人和单位一视同仁。坚持文稿质量是唯一标准,对稿件采取择优先登的原则。如作者要求提前发表,请在投稿的同时提出书面报告,说明该研究成果的重要性、创新性、竞争性和提前发表的必要性,经过我刊的严格审查并通过后,可予提前刊出。

5 发表费及稿费

论文一经录用,将在发表前根据版面收取一定的发表费,并酌付稿酬,寄送样刊及单行本。发表费 200 元/面,彩版每面另加 800 元(发表费如有调整,以本刊所发通知为准)。

6 编辑部地址

(100080) 北京市海淀区中关村 中国科学院微生物研究所《生物工程学报》编辑部

电话/传真 (010) 62554303

E-mail: xjb@sun.im.ac.cn; shwu@china.journal.net.cn