

## 外源 *glnA* 基因干扰大肠杆菌的代谢

杜娟, 吴健, 戴桂馥, 王春阳, 周新钦, 宋明辉, 李珏, 李季伦

郑州大学生物工程系, 郑州 450001

**摘要:** 采用分子生物学的方法构建了含 *Bacillus subtilis glnA* 基因的重组菌株 *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ (pMD19-*glnA*), 用毛细管电泳和核磁共振对重组菌株的转化谷氨酸的产物进行定性鉴定, 并进一步通过荧光定量 RT-PCR 测定谷氨酰胺合成酶基因(*glnA*)mRNA 水平的相对表达量, 最后用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳对蛋白的相对表达情况进行了分析。结果表明重组菌株并没有增加谷氨酰胺的产量, 而是明显增加了 $\gamma$ -氨基丁酸(GABA)的产量。实验表明重组菌株中的 *glnA* 基因可以正常转录, 但是谷氨酰胺合成酶的蛋白表达量并没有增加。这种外源基因干扰大肠杆菌代谢的现象值得进一步研究。

**关键词:** 谷氨酰胺合成酶, 毛细管电泳, 荧光定量 RT-PCR, SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳

## Metabolism of *Escherichia coli* is interfered by *Bacillus subtilis glnA* gene

Juan Du, Jian Wu, Guifu Dai, Chunyang Wang, Xinqin Zhou, Minghui Song, Jue Li, and Jilun Li

Department of Biotechnology, Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, China

**Abstract:** A recombinant strain *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ (pMD19-*glnA*) including *Bacillus subtilis glnA* gene was constructed. Capillary electrophoresis and nuclear magnetic resonance were used to determine qualitatively the product of transformation by recombinant strain, and the relative level of mRNA expression of *glnA* was also determined by fluorescence quantitative RT-PCR. Subsequently, SDS-PAGE (polyacrylamide gel electrophoresis) was used to analysis the relative level of protein. Surprisingly, there was no increase of glutamine production in this recombinant strain, but an obvious increase in the GABA ( $\gamma$ -aminobutyric acid) production. It was showed in the experiment that protein expression of the glutamine synthetase did not increase, although *glnA* gene can be transcribed normally in this recombined strain. The phenomenon of exogenous *glnA* gene interfering metabolism of *Escherichia coli* was worthy of further study.

**Keywords:** glutamine synthetase (GS), capillary electrophoresis, fluorescence quantitative RT-PCR, SDS-PAGE

谷氨酰胺合成酶(L-谷氨酸: 氨连接酶, GS)是生物体中最古老也是最广泛存在的酶之一<sup>[1]</sup>。由它催化生成的谷氨酰胺不仅在细菌和真核生物中参与了生物体碳和氮的代谢, 而且在多种氨基酸合成时作为氮源的供体。因此, 该酶及其基因已被广泛研究<sup>[2-6]</sup>。

在大肠杆菌内, GS 酶的表达系统受多重调控, 不仅受腺苷酰化共价修饰<sup>[7]</sup>, 而且受末端产物的反馈抑制和金属离子的调节<sup>[8]</sup>。在基因内部 GS 酶基因也受很多基因的调控, 主要由 *glnALG* 操纵子控制, *glnA* 编码 GS, *glnL* 编码 TnrB(tnr=nitrogen-regulated)蛋白, *glnG* 编码 TnrC 蛋白。它的氮源调控系统相当

Received: September 27, 2008; Accepted: February 4, 2009

Supported by: Key Science and Technology Program of Henan Province (No. 0624240002).

Corresponding author: Jian Wu. Tel/Fax: +86-371-67781690; E-mail: Jianwu@zzu.edu.cn

河南省重点科技攻关项目(No. 0624240002)资助。

复杂, 有十多个基因共同起作用, 其中包括一些编码 tRNA 的基因<sup>[9]</sup>。

在大肠杆菌中, 谷氨酸在谷氨酰胺合成酶的作用下生成谷氨酰胺, 而在谷氨酸脱羧酶的作用下生成  $\gamma$ -氨基丁酸。本研究向大肠杆菌中转入枯草芽孢杆菌 *glnA* 基因, 在复杂的调控系统下, 尽管 *glnA* 基因表达水平很高, 但谷氨酰胺合成酶和谷氨酰胺的产量没有增加, 而  $\gamma$ -氨基丁酸的产量却明显提高。目前关于这方面的研究还未见报道。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌种及质粒

枯草芽孢杆菌 168 菌株和 *E. coli* DH5 $\alpha$  由本实验室保存; pMD-19T 载体购自大连 TaKaRa 公司。

### 1.2 工具酶及试剂盒

DNA 回收试剂盒、*Sal* I 与 *kpn* I 内切酶、胰 RNA 酶、*Taq* DNA 聚合酶、RNAiso 试剂、One Step SYBR<sup>®</sup> PrimeScript<sup>™</sup> RT-PCR 和 DEPC 均为 TaKaRa 公司产品。

### 1.3 培养基及试剂

酵母提取物和蛋白胨为 Oxoid 公司产品; 氨苄青霉素、IPTG 及 X-gal 均购自上海生物工程公司, 其他均为国产分析纯试剂。

### 1.4 仪器

所用的仪器为 Bruker 公司的 Avance DPX 400 型超导核磁共振波谱仪; 美国 Millipore 公司的毛细管电泳仪 Waters Quanta 4000。

### 1.5 重组质粒的构建

#### 1.5.1 *Bacillus subtilis* 168 基因组 DNA 的提取

按常规方法进行<sup>[10]</sup>。

#### 1.5.2 *Bacillus subtilis* 168 *glnA* 基因片段的扩增

根据 *B. subtilis* 168 的 *glnA* 基因序列(GenBank Accession No. NC\_000964.2), 利用 Primer 5.0 设计引物。引物设计的位点包含有 *glnA* 基因的调控序列约 300 bp, 以期用自身的启动子表达<sup>[11]</sup>。上游引物 P286 为 5'-TAGTCGACTAAACAGATTCTGGCGAAG-3', 下划线处为 *Sal* I 酶切位点, 下游引物 P287 为 5'-CGGGTACCCATAGAATTATTAGTGAC-3', 下划线处为 *Kpn* I 酶切位点, 片段长度为 1722 bp, 引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。以 *B. subtilis* 168 的 DNA 为模板, 以 P286 和 P287 为引物进行 PCR 扩增。PCR 条件为: 95°C 5 min; 94°C 1 min,

51°C 1 min, 72°C 2 min, 30 个循环; 72°C 延伸 10 min。

#### 1.5.3 目的片段的回收

PCR 产物计 50  $\mu$ L, 1%琼脂糖凝胶电泳后, 用 TaKaRa 公司的 DNA 快速回收试剂盒回收, 方法参考产品说明书。

#### 1.5.4 pMD-*glnA* 重组质粒的构建及序列测定

回收的 PCR 目的片段再与 pMD-19T 载体在 16°C 连接过夜。用连接产物转化 *E. coli* DH5 $\alpha$ , 涂布于含 100  $\mu$ g/mL Amp 的 LB 琼脂平板上, 37°C 培养过夜后, 利用蓝白斑筛选挑取少许白色单克隆, 在含 Amp 的 LB 液体培养基中培养过夜。碱裂解法从菌液中提取质粒, 用 *Sal* I 和 *Kpn* I 酶切进行鉴定。验证为阳性质粒的由上海生物工程技术有限公司测序。

### 1.6 毛细管电泳对菌体和酶液转化产物的检测

先培养细菌至对数末期, 4000 r/min 离心 10 min, 留菌体, 菌体分成 2 份: 一份加入转化液(5 g/L 葡萄糖, 6.33 g/L NH<sub>4</sub>Cl, 10 g/L 谷氨酸钠), 3 h、7 h 后将转化好的菌液 12 000 r/min 离心 3 min 后, 取上清; 另一份菌体加入 pH 7.2 的磷酸缓冲液超声破碎, 离心取上清液即得到粗酶液, 取一定量的粗酶液加入 5.35 g/L NH<sub>4</sub>Cl、8.45 g/L 谷氨酸钠、22 g/L ATP, 在 37°C 水浴中温浴 15 min、30 min 后取上清。以 Fmoc-Cl 作为衍生剂在硼酸/硼砂缓冲体系中衍生 20 min, 加扁桃酸做内标, 然后进行毛细管电泳, 数据的处理主要采用手动积分计算峰面积, 用扁桃酸作内标校正每次上样量误差, 相关公式如下:

校正后的氨基酸吸收峰数值 = 原始氨基酸吸收峰面积/内标的吸收峰面积

### 1.7 *glnA* 基因表达量的检测

#### 1.7.1 细菌总 RNA 的提取

采用总 RNA 提取试剂 RNAiso 分别提取 *E. coli* DH5 (pMD19-*glnA*) 和 *E. coli* DH5 (pMD19) 菌株的总 RNA。所有用于 RNA 提取的塑料器皿均用 DEPC(0.1%) 在 37°C 处理 12 h 左右, 然后在  $1 \times 10^5$  Pa 高压灭菌 30 min 除去残留的 DEPC, 玻璃器皿于 180°C 干烤 8 h 以上。

#### 1.7.2 总 RNA 的 OD 值及浓度测定

RNA 浓度 =  $(A_{260} - A_{280}) \times \text{稀释倍数} \times 0.04 \mu\text{g}/\mu\text{L}$

#### 1.7.3 反转录反应

反转录反应体系在冰上配制, 按下列体系进行反应:  $5 \times \text{PrimeScript}^{\text{™}}$  Buffer(for real time) 4  $\mu$ L,

PrimeScript™ RT Enzyme Mix I 1 μL, Random 6 mers(100 μmol/L)1 μL, Total RNA14 μL, 反转录反应液总体积 20 μL, 在 37°C 条件下反转录 15 min; 85°C 条件下 5 s 反转录酶的失活反应, 反转录好的 cDNA 保存于-20°C 备用。

#### 1.7.4 荧光定量 RT-PCR

引物为自行利用 Primer 5.0 设计, 以大肠杆菌内稳定表达的看家基因甘油醛-3-磷酸脱氢酶基因(*gapA*)380 bp 片段作为内参, 扩增 *glnA* 的基因内部 435 bp 的序列(*glnA-R*, *glnA-F* 表示 *glnA* 基因的正反向引物)。引物由上海生物工程技术服务有限公司合成。目的基因和看家基因的引物特征见表 1。

以 *E. coli* DH5α(pMD19)对照株和 *E. coli* DH5α(pMD19-*glnA*)重组株 cDNA 为模板, 扩增 *glnA* 基因片段及 *gapA* 基因片段。每个样品重复做 3 管, 反应体系 25 μL 包括 SYBR® Premix Ex Taq™ (2 ×) 12.5 μL, 正反引物各 0.5 μL, cDNA 2 μL, ddH<sub>2</sub>O 9.5 μL。荧光定量 PCR 条件: 95°C 预变性 30 s; 95°C 10 s, 60°C 20 s, 72°C 20 s, 进行 40 个循环并于 60°C 收集记录荧光, 然后测定熔解曲线。反应结束后进入 Rotor-Gene 3000 软件分析界面, 采用相对定量的 Comparative Delta-delta Ct 方法, 得到目的基因和看家基因的平均 Ct 值和熔解曲线, 以及目的基因相对的拷贝数。

#### 1.8 SDS-PAGE 测定蛋白的含量

分别挑取单克隆接种于 5 mL 含 100 μg/mL Amp 的 LB 培养液中, 在恒温振荡摇床内 37°C、220 r/min 振荡过夜。按 1:50 的比例接种于新鲜的含 100 μg/mL Amp 的 LB 培养液中 37°C 振荡培养至 *OD*<sub>600</sub> 0.5, 加入 IPTG 0.2 mmol/L 于每个试管, 培养至 *OD*<sub>600</sub> 1 时, 离心收集菌体加入裂解液重悬, 超声波破碎菌体 12 000 r/min 离心 3 min 后收集上清, 上样(每次的上样量相同且蛋白含量相等的情况下), SDS-PAGE 观察结果。

## 2 结果

### 2.1 *glnA* 基因的 PCR 扩增

用所合成的一对引物 PCR 扩增枯草芽孢杆菌 *glnA* 基因, 扩增产物经 1%琼脂糖凝胶电泳分析, 在约 1700 bp 处有一特异扩增条带, 分子量大小与理论扩增值相符。

### 2.2 pMD-*glnA* 重组质粒的鉴定

用 *Sal* I 和 *Kpn* I 双酶切对所提质粒进行鉴定, 经 1%琼脂糖凝胶电泳后, 外源基因与扩增片段大小一致, 约为 1700 bp 左右。重组质粒经测序鉴定, 与 GenBank 所报道序列完全一致。

### 2.3 毛细管电泳对重组菌株转化产物的检测

在硼酸(0.1 mol/L)和 SDS(1%)作为电泳运行缓冲液的条件下, 用毛细管电泳对重组菌株和对照菌株的转化产物进行测定。毛细管电泳测定时以 Fmoc-Cl 作为衍生剂, 衍生后的标准样品(含有衍生剂、谷氨酸、谷氨酰胺、γ-氨基丁酸)毛细管电泳图谱见图 1(上), 衍生后的样品毛细管电泳图谱见图 1(下), 测定结果表明产物不是谷氨酰胺, 而可能是 γ-氨基丁酸。

### 2.4 转化产物结构的鉴定

为进一步确认产物结构, 对转化产物进行阳离子树脂纯化、分离、结晶, 根据茚三酮反应、熔点和核磁共振氢谱测定, 确认产物确实为 γ-氨基丁酸。核磁共振氢谱(D<sub>2</sub>O)δ 2.909(2H,t,J=7.6,15.2Hz,H-4), 2.192(2H,t,J=3.4,14.8Hz,H-2), 1.796(2H,m,H-3)(图 2)。

### 2.5 重组菌株产物的产量测定

尽管产物不是谷氨酰胺, 然而有趣的是携带 pMD19-*glnA* 的重组菌株, 相对于携带空 pMD19 的大肠杆菌菌株, γ-氨基丁酸的产量却有了明显提高(图 3)。

表 1 目的基因和看家基因的引物特征

Table 1 Primers of the target gene and house-keeping gene

Primer	Length (bp)	Sequence (5'-3')	GC (%)	Product size (bp)
<i>glnA-F</i>	20	TTAGCTCCAAGTGAATTTAGG	40	435
<i>glnA-R</i>	18	ATAGCCAGGAACAAGACG	50	
<i>gapA-F</i>	21	CTGGTCCGTCTAAAGACAACA	47.6	380
<i>gapA-R</i>	20	ACGAACGGTCAGGTCAACTA	50	

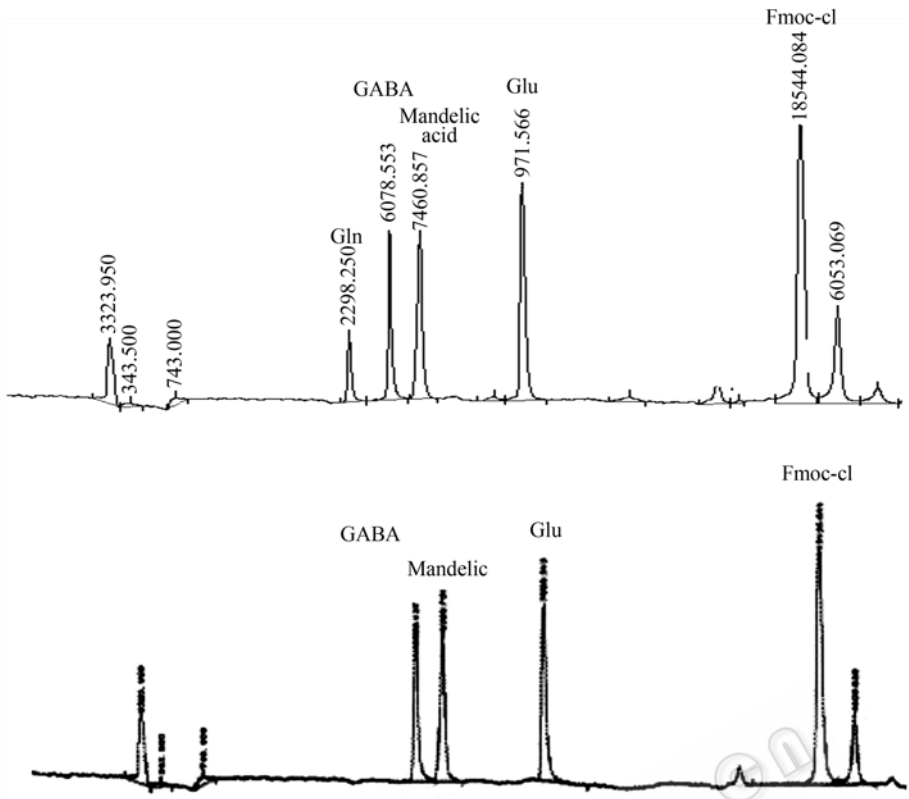


图 1 标准样品和重组菌株转化产物毛细管电泳图  
Fig. 1 Capillary electrophoresis results of standard sample and the test sample.

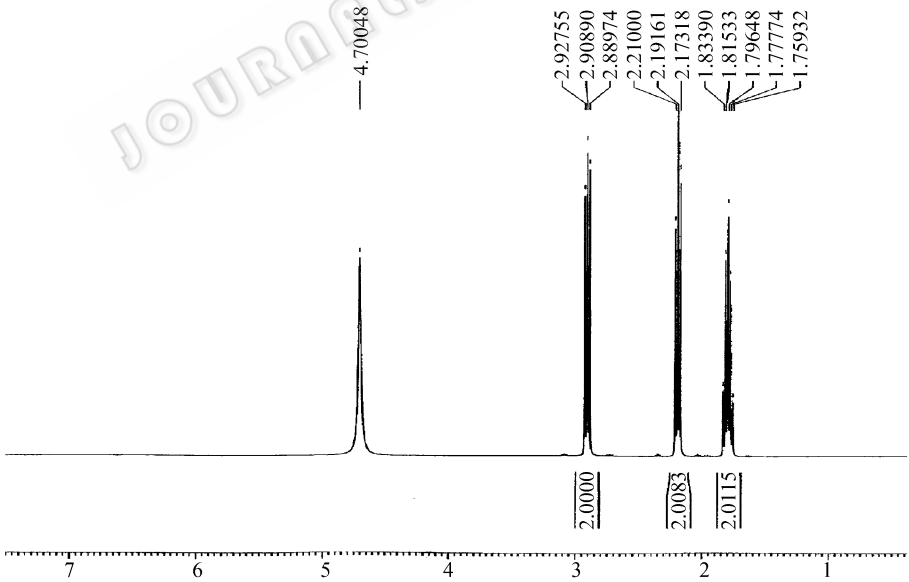


图 2 样品的核磁共振图谱  
Fig. 2 Nuclear magnetic resonance spectrum of the test sample.

2.6 *glnA* 基因的表达

为进一步寻找原因，通过荧光定量 RT-PCR 对 *glnA* 基因在 *E. coli* DH5 $\alpha$ (pMD19)、*E. coli* DH5 $\alpha$

(pMD19-*glnA*)菌株的表达情况进行了测定，得到了 *glnA* 基因和看家基因 *gapA* 的荧光定量扩增曲线和融解曲线。在融解曲线中未检测到引物二聚体和其

他非特异性荧光信号。*glnA* 基因的熔点峰出现在 86.5℃±0.3℃, 内参 *gapA* 基因的熔点峰出现在 90℃±0.1℃, 与理论值相符合。检测结果得出 *E. coli* DH5α(pMD19-*glnA*)菌株 *glnA* 基因的相对表达量为 *E. coli* DH5α(pMD19)菌株 *glnA* 基因的 238 倍, 结果见表 2。样品的相对表达量计算公式是:

$$F=2^{-[(\text{对照组的基因平均 } Ct \text{ 值} - \text{对照组看家基因平均 } Ct \text{ 值}) - (\text{待检样品目的基因平均 } Ct \text{ 值} - \text{待检样品看家基因平均 } Ct \text{ 值})]}$$

2.7 重组质粒的蛋白表达结果

*E. coli* DH5α(pMD19-*glnA*)和 *E. coli* DH5α(pMD19)的 SDS-PAGE 电泳检测表明(图 4), 谷氨酰胺合成酶的蛋白量没有增加。可能存在某种机制抑制外源基因的表达, 从而导致这种结果的产生。

表 2 *glnA* 基因的相对表达量  
Table 2 Relative expression of *glnA* detected by flourescence quantitation RT-PCR

Rep name	GOI CT	Norm. CT	Delta CT	Delta CT	Relative concentration	Calibrator
pMD	13.54	15.41	-1.87	0.00	1.00	Yes
<i>glnA</i>	3.47	13.24	-9.77	-7.90	238.64	

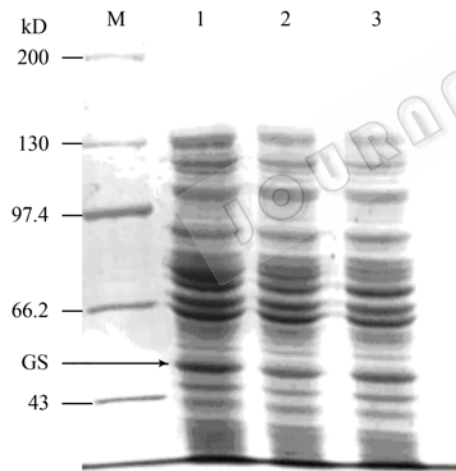


图 4 基因表达的 SDS-PAGE 结果  
Fig. 4 Results of gene expression SDS-PAGE. M: marker; 1: *E. coli* DH5α; 2: *E. coli* DH5α(pMD19-*glnA*); 3: *E. coli* DH5α(pMD19).

3 讨论

微生物具有生长速度快、易于培养等特点, 利用微生物的谷氨酰胺合成酶生产谷氨酰胺具有显著优点。其中通过构建含 *glnA* 基因的大肠杆菌提高谷氨酰胺产量的研究已有很多报道。2002 年南京师范

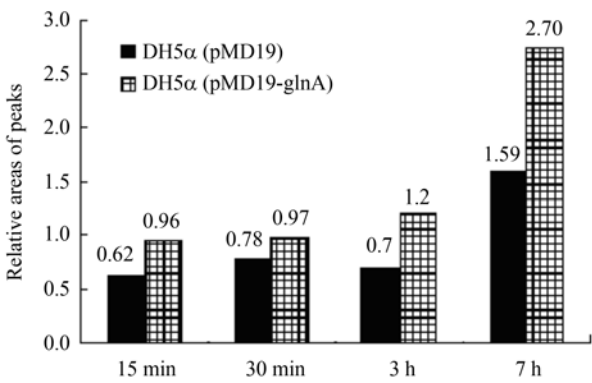


图 3 菌体转化(3 h 和 7 h)和酶液转化(15 min 和 30 min)毛细管电泳结果  
Fig. 3 Capillary electrophoresis results of recombinant strain transformation and recombinant strain enzyme conversion. The relative areas of peaks are of the relative peak areas of GABA and the subject.

大学将耐热嗜酸古细菌谷氨酰胺合成酶基因转入大肠杆菌<sup>[12]</sup>。2004 年南京大学与南京师范大学、江南大学合作, 将 *Bacillus subtilis glnA* 转入大肠杆菌, 合成谷氨酰胺<sup>[13]</sup>。本实验室也构建了含枯草芽孢杆菌的谷氨酰胺合成酶基因的大肠杆菌重组体。但实验结果却出乎意料之外: 转化产物是 γ-氨基丁酸, 而且在重组菌中产量有明显提高。本实验通过荧光定量 RT-PCR 测定 *glnA* 基因 mRNA 水平的相对表达量, 确认此工程菌中 *glnA* 基因可正常转录, 其相对表达量约为 *E.coli* DH5α(pMD19)的 *glnA* 基因的 238 倍; 同时用 SDS-PAGE 电泳对蛋白的相对表达情况进行了分析, 显示谷氨酰胺合成酶蛋白表达量没有明显变化。在实验中用两组不同引物克隆的基因都得到类似结果。这种现象令人感兴趣, 是什么原因阻止了蛋白的翻译, 又为什么会导导致γ-氨基丁酸的产量提高? 一般认为在原核生物中基因的表达与蛋白的产量有很好的一致性<sup>[14]</sup>, 在本实验中却显示了复杂的关系: 不但基因的表达与蛋白的产量没有相关性, 而且其他代谢产物也受到明显干扰, 揭示了代谢网络调控的复杂性。

引入外源基因提高代谢产物产量, 是基因工程的重要应用方向之一, 这种“种瓜得豆”的现象是一种障碍, 也是一种可利用的现象, 然而目前还未见此方面的报道, 应当给予重视, 积累实例, 深入研究其原理与规律。

## REFERENCES

- [1] Kumada Y, Benson DR, Hillemann D, *et al.* Evolution of the glutamine synthetase gene one of the oldest existing and functioning genes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, **90**(7): 3009–3013.
- [2] Prusiner S, Stadtman ER. On the regulation of glutaminase in *E. coli*: Metabolite control. *Biochem Biophys Res Commun*, 1971, **45**(6): 1474–1481.
- [3] Alef K, Burkardt HJ, Horstmann HJ, *et al.* Molecular characterization of the glutamine synthetase from the nitrogen fixing phototrophic bacterium *Rhodospseudomonas palustris*. *Z Naturforsch*, 1981, **36**(3-4): 246–254.
- [4] Streicher SL, Tyler B. Purification of glutamine synthetase from a variety of bacteria. *J Bacteriol*, 1980, **142**(1): 69–78.
- [5] Sampio MJ, Rowell P, Stewart WDP. Purification and some properties of glutamine synthetase from nitrogen fixing cyanobacteria *Nostoc cylindrica* and *Nostoc* sp. *Gen Microbiol*, 1979, **111**(1): 181–191.
- [6] Stacey G, van BC, Tabita FR. Nitrogen and ammonia assimilation in the cyanobacteria: regulation of the glutamine synthetase. *Arch Biochem Biophys*, 1979, **194**(2): 457–467.
- [7] Mangum JH, Magni G, Stadtman ER. Regulation of glutamine synthetase adenylylation and deadenylylation by the enzymatic uridylylation and deuridylylation of the P II regulatory protein. *Arch Biochem Biophys*, 1973, **158**(2): 514–525.
- [8] Sokolovsky M, Riordan JF, Vallee BL. Tetranitromethane. A reagent for the nitration of tyrosyl residues in proteins. *Biochemistry*, 1966, **5**(11): 3582–3589.
- [9] Jayakumar A, Schulman I, MacNeil D, *et al.* Role of the *Escherichia coli* *glnALG* operon in regulation of ammonium transport. *J Bacteriol*, 1986, **166**(1): 281–284.
- [10] Jiang B, Zhang YL, Zhou DY. Common Methods of Molecular Biology Experiments. Beijing: People's Medical Publishing House, 1996.  
姜泊, 张亚利, 周殿元. 分子生物学常用实验方法. 北京: 人民军医出版社, 1996.
- [11] Nishino K, Yamauchi A. Analysis of a complete library of putative drug transporter genes in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 2001, **183**(20): 5803–5812.
- [12] Yin ZM, Yan SZ, Dai G, *et al.* The cloning, induction and activity assay of glutamine synthetase gene from thermoacidophilic archaeobacterium *Sulfolobus acidocaldarius*. *Prog Biochem Biophys*, 2002, **29**(5): 745–748.  
殷志敏, 闫淑珍, 戴谷, 等. 耐热嗜酸古细菌谷氨酰胺合成酶基因的克隆、诱导表达和活性测定. 生物化学与生物物理进展, 2002, **29**(5): 745–748.
- [13] Chen QY, Chen GA, Xue B, *et al.* High efficiency of L-glutamine production by coupling genetic engineered bacterial glutamine synthetase with yeast alcoholic fermentation system. *Chin J Biotech*, 2004, **20**(3): 456–460.  
陈群英, 陈国安, 薛彬, 等. 基因工程酶法结合酵母能量偶联高效合成谷氨酰胺的研究. 生物工程学报, 2004, **20**(3): 456–460.
- [14] Yoneda K, Chikumi H, Murata T, *et al.* Measurement of *Pseudomonas aeruginosa* multidrug efflux pumps by quantitative real-time polymerase chain reaction. *FEMS Microbiol Lett*, 2005, **243**(1): 125–131.

## 《生物工程学报》“代谢工程和细胞工厂”专刊征稿通知

代谢工程自 1991 年诞生以来, 倍受科研工作者的关注, 成为研究热点。随着生物技术的发展, 代谢工程作为一门改善细胞性能的新兴学科, 在植物、动物、微生物乃至人体组织细胞的基因治疗及代谢分析方面得到了广泛的应用, 发挥了重要的作用。为了展现代谢工程科研工作者取得的最新进展, 促进我国代谢工程的进步和发展, 本刊拟于 2009 年 9 月出版一期主题为“代谢工程和细胞工厂”的专刊。

为缩短审稿时间、加快专刊稿件的出版速度, 本刊将专门组织 6~10 人的专家评委会, 严格按照《生物工程学报》评审要求对稿件进行认真评审。对所收稿件进行快速处理, 最终择优筛选出一定数量的稿件以专刊出版, 具体安排如下:

### 一、征文范围

本专刊收录代谢工程领域所取得的最新研究成果和技术成果, 包括研究论文和综述, 但不限于此:

1 基因组学和基因组尺度的代谢网络模型; 2 代谢组学和代谢控制分析; 3 生物转运系统; 4 代谢途径工程; 5 进化代谢工程; 6 系统生物技术和反向代谢工程; 7 代谢工程方法学; 8 用于代谢工程的遗传工具。

### 二、投稿要求

1. 投稿方式: 通过《生物工程学报》投稿系统在线投稿, 详见主页(<http://journals.im.ac.cn/cjbcn/ch/index.aspx>)/投稿须知/投稿方式。

注意事项: 投稿时, 请在稿件标题栏注明“代谢工程和细胞工厂专刊”字样, 否则将以普通稿件进行处理。

2. 稿件格式: 参照《生物工程学报》论文格式, 详见主页/投稿须知/书写要求。

3. 投稿文章应未在正式出版物上发表过, 也不在其他刊物或会议的审稿过程中, 不存在一稿多投现象; 应保证投稿文章的合法性(无抄袭、剽窃、侵权等不良行为)。

### 三、本专刊几个关键的时间:

1. 收稿截止日期: 2009 年 4 月 30 日

2. 决定是否录用日期: 2009 年 6 月 10 日

3. 录用后作者修回截止日期: 2009 年 6 月 30 日

4. 出版日期: 2009 年 9 月 25 日

### 四、特别说明:

1. 本专刊不是增刊, 而是在 2009 年第 9 期《生物工程学报》正刊上刊出。

2. 由主编邀请的专刊投稿文章免收审理费; 录用后正式刊发的文章将请作者提交版权转让协议, 并按照《生物工程学报》相关规定收取版面费和支付作者稿酬, 同时赠送样刊及单行本。

### 五、联系方式:

电话: 010-64807509; 传真: 010-64807327; E-mail: [cjb@im.ac.cn](mailto:cjb@im.ac.cn)

邮寄地址: 北京市朝阳区北辰西路 1 号院 3 号中科院微生物研究所 B401 (邮编: 100101)

欢迎您的来稿!

《生物工程学报》编辑部

2009-2-9