

## 以经过转染的乳腺上皮细胞生产克隆羊

袁玉国, 丁国梁, 安礼友, 赵俊辉, 曹玉娟, 缪明星, 成勇

扬州大学兽医学院 江苏省转基因动物制药工程研究中心, 扬州 225009

**摘要:** 为研究转基因乳腺上皮细胞发育的全能性, 利用电转染方法将人乳铁蛋白(hLF)乳腺特异性表达载体电转染山羊乳腺上皮细胞, 经 G418 和 PCR 筛选获得阳性克隆细胞株, 经催乳素诱导的细胞株上清液用 Western blotting 方法检测 hLF 的表达。以转基因与上清液中表达 hLF 均为阳性的细胞为核供体细胞, 进行山羊体细胞核移植。结果为: 16 株细胞表达重组 hLF, 分子质量为 75 kD; 将 144 枚重构胚移入 16 只同步发情的山羊输卵管中, 在移植后的 30 d、60 d 和 90 d 的妊娠率分别为 87.5%、81.3%和 62.5%; 最终 3 只受体妊娠足月, 产下 3 只克隆羊, 克隆效率为 2.1%, PCR-RFLP 分析表明克隆羊均来自供体羊细胞, 但没有整合外源基因。结果表明, hLF 转基因乳腺上皮细胞能分泌 hLF; 乳腺上皮细胞经转染、筛选和长期培养的条件下, 能保持发育的全能性。

**关键词:** 乳腺上皮细胞, 山羊, 核移植, 人乳铁蛋白, 转基因

## Production of cloned goats by transfer of nuclei from transfected caprine mammary gland epithelial cells

Yuguo Yuan, Guoliang Ding, Liyou An, Junhui Zhao, Yujuan Cao, Mingxing Miao, and Yong Cheng

Jiangsu Provincial Research Center for Animal Transgenesis and Biopharming, College of Veterinary Medicine, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China

**Abstract:** In this study, we evaluated the development potential of caprine mammary gland epithelial cells (CMGECs) after transfection and nuclear transfer into enucleated, ovulated oocytes. We first isolated CMGECs from udders of lactating goats which were transfected with expression plasmid for human lactoferrin and selected by G418. Then we chose sixteen neomycin resistant lines and induced them with prolactin for the expression of human lactoferrin checked by Western blotting. The donor cells, expressing human lactoferrin of 75 kD, were fused and activated with enucleated ovulated oocytes. Pronuclear-stage reconstructed embryos were transferred into the oviducts of 16 recipient goats. There were fourteen (87.5%), thirteen (81.3%), and ten (62.5%) pregnancies confirmed pregnant by ultrasound on Day 30, 60, and 90, respectively. Three recipients carried the pregnancies to term and delivered one goat each. Nested PCR-RFLP analysis confirmed that all of the kids were clones of the donor cells. These results demonstrated that CMGECs after transfection remain totipotent for nuclear transfer.

**Keywords:** mammary gland epithelial cell, goat, nuclear transfer, human lactoferrin, transgene

人乳铁蛋白(Human lactoferrin, hLF)是一种分子量约为 80 kD 的糖蛋白, 属于转铁蛋白家族成员, 具有广泛的生物学活性<sup>[1]</sup>, 被认为是一种新型抗菌、抗癌药物和极具开发潜力的食品、化妆品和饲料添

**Received:** May 17, 2009; **Accepted:** June 26, 2009

**Supported by:** National Major Special Program of Breeding of Transgenic Organisms New Variety (Nos. 2008ZX08008-004, 2009ZX08008-009B), High Technology Research Program of Jiangsu Province (No. BG-98501-12).

**Corresponding author:** Yong Cheng. Tel: +86-514-87979228; E-mail: yz.dxy@public.yz.js.cn

国家“转基因生物新品种培育”重大专项(Nos. 2008ZX08008-004, 2009ZX08008-009B), 江苏省农业高新技术项目(No. BG-98501-12)资助。

加剂。目前, 重组 hLF 已在动物<sup>[2]</sup>、昆虫<sup>[3]</sup>和植物<sup>[4]</sup>等中表达, 并表现出与天然人乳铁蛋白相似的生物学功能。

源于胎儿组织的细胞增殖旺盛、传代周期短, 并具有在体外长时间培养保持遗传稳定性的潜能, 从而能满足转染、筛选等需要, 因此, 国内外普遍采用胎儿成纤维细胞作为生产转基因克隆动物的供体细胞<sup>[5-8]</sup>。但胎儿成纤维细胞不具有分泌功能, 无法在细胞水平上预测目的蛋白的表达情况, 这就可能造成出生的转基因克隆动物虽然整合外源基因但不表达目的蛋白的情况发生。乳腺上皮细胞具有合成和分泌乳汁的功能, 是乳腺生物反应器的靶细胞, 可以用体外培养的乳腺上皮细胞来检验乳腺特异性表达载体的有效性和合理性, 并具有操作方法简单而又真实反应表达载体在体内表达水平。因此, 乳腺上皮细胞转染乳腺特异性表达载体后, 能合成并分泌目的蛋白到培养液中, 通过检测诱导表达目的蛋白产物来筛选高效表达的细胞, 再结合其他筛选方式(G418 和 GFP)能提高转基因效率和成本, 并有可能得到高表达转基因动物<sup>[9]</sup>。但目前还没有用转基因乳腺上皮细胞作供核细胞获得克隆羊的报道。本实验用山羊乳腺上皮细胞转染人乳铁蛋白乳腺特异性表达载体, 以诱导表达检测阳性的细胞克隆株为供核细胞进行核移植实验, 检验了经过转染、筛选和长时间体外培养条件下的乳腺上皮细胞所构建的重构胚发育潜能, 并获得了存活的克隆羊。

## 1 材料与方法

### 1.1 化学试剂与实验材料

DMEM/F12 购自 Gibco 公司; FCS 购自 Hyclone 公司; 电转染液(Hypoosmolar Buffer)购自 eppendorf 公司; FSH, LHRH 和 PG 购自宁波激素厂; 其他试剂除特殊说明外, 均购自 Sigma 公司; 实验羊购自徐州地区。

### 1.2 hLF 表达载体转染乳腺上皮细胞

#### 1.2.1 乳腺上皮细胞的培养

无菌手术切取大约 5 g 左右的泌乳期(第 5 天)山羊乳腺实质组织, 将腺泡组织剪成约 1 mm<sup>3</sup> 大小, 用 I 型胶原酶消化液(含 I 型胶原酶 200 IU/mL, 透明质酸酶 100 IU/mL)振荡消化 1.5 h, 收集悬液离心后,

用 D-hank's 离心洗涤 3 次, 细胞计数并用培养液(含 DMEM/F12, 10% FCS, 乙酸钠 5 mmol/L, 转铁蛋白 5 μg/mL, 乙醇胺 0.5 mmol/L, 胰岛素 10 μg/mL, 氢化可的松 5 μg/mL)调整密度至 4×10<sup>5</sup> 个/mL 接种于六孔板中, 置 CO<sub>2</sub> 培养箱中, 37 °C、5% CO<sub>2</sub>、饱和湿度下静置培养。根据成纤维细胞对消化液敏感性不同, 贴壁生长的细胞用 0.05% 胰蛋白酶 + 0.02% EDTA 消化 3 min 后, 弃去含脱壁成纤维细胞的消化液, 重新加入培养液培养, 传代重复 3 次可获得较纯的乳腺上皮细胞<sup>[9]</sup>。

#### 1.2.2 细胞转染、筛选

用 Sal I 和 Not I 双酶切 pBLC-14 质粒(本室保存)获得线性化 hLF 乳腺特异性表达载体(图 1), 经 QIAEX 试剂盒回收后溶于超纯水中, -20 °C 保存。收集对数期乳腺上皮细胞, 用电转染液洗涤离心后重悬细胞密度至 1×10<sup>6</sup> 个/mL, 加入 DNA 使终浓度为 10 μg/mL, 以 2.0 kV/cm、100 μs 的条件电击 1 次, 48 h 后加入 400 μg/mL G418 筛选, 每 2 天换 1 次液, 14 d 后挑取克隆细胞以 200 μg/mL G418 筛选扩增传代, 用 DMEM/F12 + 10% DMSO + 20% FBS 的冷冻液冻存。

#### 1.2.3 细胞整合和表达产物的检测

在冷冻细胞同时, 每孔留一半扩增至 80% 的丰度后, 在培养液中加入催乳素(5 μmol/L)诱导人乳铁蛋白的表达, 48 h 后收集培养液进行 SDS-PAGE 电泳和 Western blotting 检测, 具体步骤详见文献 [9-10]。收集经过诱导的细胞, 提取 DNA 进行 PCR 检测, 跨接头引物序列如下: 上游: 5'-ATGGGCGTGGATAGCGGTTTGAC-3'; 下游: 5'-CCACCA TCAAGGGTCACAG CATCG-3'。阳性细胞孔作供核细胞。

### 1.3 供体羊与受体羊的准备

供体羊和受体羊均为波尔山羊与长江白山羊杂

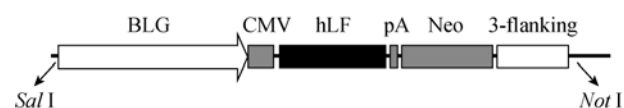


图 1 乳腺表达载体 pBLC-14 结构

Fig. 1 Structure of hLF expression pBLC-14. BLG: goat β-lactoglobulin promoter; CMV: human cytomegalovirus immediate early promoter; hLF: human lactoferrin cDNA; pA: SV40early mRNA polyadenylation; Neo: neomycin resistance gene; 3'-flanking: β-lactoglobulin untranslated flanking sequence.

交羊。供体羊注射 PG, 于发情后第 9~13 天开始超排。连续 3 d 注射 FSH, 每天 2 次, 总剂量 260~300 单位。第 4 天下午注射 PG, 第 5 天注射 50 单位 LHRH。受体羊的同步除不注射 FSH 外均同供体羊。

#### 1.4 供核细胞与卵母细胞的准备

冷冻乳腺上皮细胞解冻后培养至 80% 汇合后, 在 0.5% FCS 培养液中饥饿 48 h, 于核移植前 2 h 胰蛋白酶消化处理, 用 M2 悬浮细胞备用。卵母细胞在注射 LHRH 后 26~30 h 输卵管手术冲取, 用透明质酸酶消化并吹打去除颗粒细胞。

#### 1.5 核移植、融合和激活

卵母细胞预先置于含 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Hoechst33342 和 7.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  CB 的 M2 中处理 20 min, 在荧光下确定纺锤体位置并去核, 同时吸取中等大小光滑的乳腺上皮细胞, 移入卵周隙中。一批结束后, 重构胚移入 M16 中培养 30~60 min 后开始融合(融合液: 0.3 mmol/L 甘露醇、0.05 mmol/L 氯化钙、0.1 mmol/L 硫酸镁、3% BSA), 条件为 2.1 kV/cm、40  $\mu\text{s}$ 、2 个脉冲。融合后在 M16 中培养 30~60 min 后观察, 未融合卵按以上条件重复 1 次。融合卵在 M16 中培养 5 h; 在激活液(5  $\mu\text{mol}/\text{L}$  离子霉素 + 7.5 mg/mL CB)中 5 min; 然后在含有 2 mmol/L 6-DMAP 和 7.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  CB 的 M16 中培养 5 h, 然后移入 M16 中短暂培养直到胚胎移植<sup>[11-13]</sup>。

#### 1.6 胚胎移植

激活后培养的胚胎手术法移入同步发情受体的输卵管内, 每只受体移植 4~15 枚胚胎, 在胚胎移植后 30 d、60 d 和 90 d 进行 B 超诊断妊娠情况。

#### 1.7 克隆羊鉴定

克隆羊鉴定采用 PCR+RFLP(限制酶片段多态性分析)的方法<sup>[11]</sup>。扩增山羊 MHC 类 DRB 基因第二外显子的引物为: 1)DRB1.1: 5'-ATCCCGTCTC TGCAGCACATTTC-3'; 2)Gio: 5'-CGTACCCAGAG TGAGTGAAGTATC-3'; 3)DRB1.2: 5'-TCGCCGCT GCACACTGAAACTCTC-3'。常规方法提取克隆羊、寄母羊和供核细胞羊基因组 DNA。以样品 DNA 为模板进行 PCR 扩增, 第 1 轮以 1)、2)为引物, 进行 10 个循环; 用扩增产物为模板再加入 1)、3)引物进行第 2 轮扩增, 30 个循环。PCR 产物经 *Rsa* I 酶切、10%聚丙烯酰胺凝胶电泳后, 染色拍照观察结果。

## 2 结果

### 2.1 乳腺上皮细胞表达 hLF 和整合检测

纯化的山羊乳腺上皮细胞(图 2)转染人乳铁蛋白乳腺特异性表达载体, 经 G418 抗性筛选 14 d 后, 共挑取 54 个单克隆扩增传代, 细胞诱导液经 Western blotting 检测, 其中有 16 孔的单克隆细胞表达的重组乳铁蛋白与人乳铁蛋白相似, 分子量约为 75 kD(图 3), PCR 检测结果证明均成功整合外源基因(图 4)。

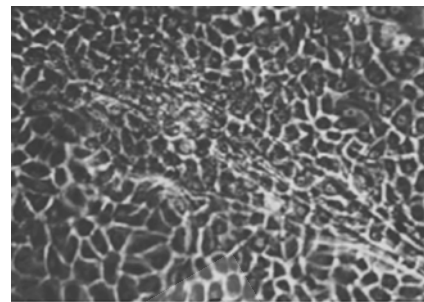


图 2 乳腺上皮细胞  
Fig. 2 Caprine mammary gland epithelial cells.

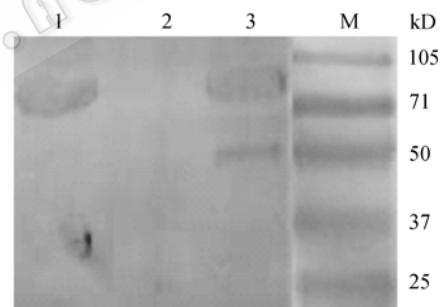


图 3 Western blotting 检测 hLF 的表达  
Fig. 3 Western blotting analysis of hLF in the induced culture medium of cell. 1: the induced culture medium; 2: control group; 3: standard hLF; M: protein marker.

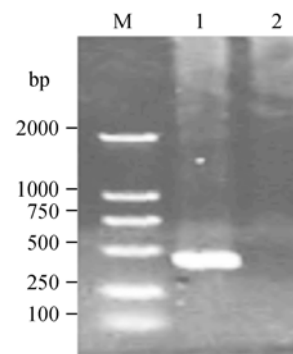


图 4 PCR 检测细胞整合情况  
Fig. 4 Analysis of DNA sample from cell. M: DNA marker; 1: transgenic caprine mammary gland epithelial cells; 2: the control.

表 1 长期培养的乳腺上皮细胞核移植效率

Table 1 Efficiency of nuclear transfer from long-term cultured caprine mammary gland epithelial cells

Cell type	Number of fused (%)	Number of transfers	Number of recipients	Number pregnant (%)				Number of offspring
				Day 30	Day 60	Day 90	Day 150	
CMGECs	156(64.7)	144	16	14(87.5)	13(81.3)	10(62.5)	3(18.8)	3

## 2.2 克隆胚的发育情况

如表 1 所示, 共融合 156 枚重构胚, 融合率为 64.7%; 激活后的 144 枚重构胚短暂培养后移入 16 只同步发情受体输卵管中, 在移植后的 30 d、60 d 和 90 d 进行 B 超诊断, 妊娠率分别为 87.5%、81.3%和 62.5%; 3 只受体妊娠足月生下 3 只克隆羊, 产羔率为 18.8%, 共 4 只受体在怀孕过程中流产, 其中 2 只流产胎儿表现为肝肿大。

## 2.3 克隆羊鉴定

出生的 3 只克隆羊表型为黑白花色, 与供核羊表型一致。分别提取克隆羊、寄母羊和供核羊基因组 DNA, 采用 PCR+RFLP 的方法分析表明, 克隆羊条带与供核羊一致, 而与寄母羊不同, 从而证明克隆羊来自于供核羊细胞(图 5、图 6)。



图 5 Nested PCR-RFLP 法分析克隆羊

Fig. 5 Nested PCR-RFLP analysis of the cloned goats. 1-3: the cloned goats; 4: donor goats; 5-7: foster mother of cloned goats.



图 6 克隆羊

Fig. 6 Cloned goats.

## 3 讨论

目前已有多种类型的体细胞用来生产克隆动物<sup>[14]</sup>。但是, 用乳腺上皮细胞为供核细胞生克隆羊研究的报道较少, 至今还没有出生克隆山羊的相关报道。并且, 乳腺上皮细胞作为转基因小鼠的替代品, 可用来评估目的基因在转基因克隆动物中的表达效率, 若结合其他适当的筛选方式, 以诱导表达目的蛋白的转基因乳腺上皮细胞为供核细胞, 能提高生产转基因动物的效率和降低成本<sup>[9,15-16]</sup>。本实验以表达人乳铁蛋白的转基因乳腺上皮细胞系进行核移植, 共生产了 3 只克隆羊, 从而在国内外首次证明山羊乳腺上皮细胞经过转染和长期筛选的条件下, 能保持发育的全能性, 为应用乳腺上皮细胞生产转基因克隆动物提供了一定的实验依据。

在 G418 抗性筛选过程中, 整合 Neo<sup>r</sup> 基因而产生抗性的细胞分泌基因产物到培养液中, 使其周围或接触的非整合细胞获得抗性而存活下来<sup>[5-6,14,17]</sup>。因此, 在挑选克隆时很难获得高度纯化的转基因细胞, 使得在转基因克隆中, 利用抗性细胞生产的克隆动物并非全部整合外源基因<sup>[5,17]</sup>。在本实验过程中也存在同样的情况, 出生的 3 只克隆羊没有检测到外源基因, 其原因可能是在挑选单克隆细胞时混有多量的非整合细胞在 G418 筛选后存活, 使得在核移植时挑选用的供核细胞为非整合细胞, 从而导致出生的克隆羊没有整合外源基因。在以后实验中, 考虑结合荧光蛋白标记基因筛选转基因细胞来提高生产转基因动物的效率。

本研究中山羊乳腺上皮细胞表达的人乳铁蛋白分子量约为 75 kD, 与标准分子量有一定差异, 这可能是基因整合到细胞染色体中, 由于受到细胞内核酸酶等影响, 使得表达产物在加工、分泌和运送到胞外过程中受到影响, 导致乳铁蛋白的分子量变小, 这种现象在其他重组蛋白的表达研究中也经常发

生<sup>[16]</sup>。

胎儿成纤维细胞由于生长快、易分化等特点而被广泛用作转基因动物的供核细胞<sup>[5-8]</sup>。本实验用的供核细胞是来自泌乳期的山羊乳腺上皮细胞,是经过基因转染和 G418 长期筛选条件下获得的,但重构胚的融合率(64.7%)、怀孕率和克隆效率(2.1%)都较高,与用胎儿成纤维细胞获得的结果相差不大<sup>[8,18]</sup>,高于用转基因胎儿成纤维细胞的结果<sup>[7,19]</sup>,从而在一定程度上表明山羊乳腺上皮细胞同样具有和胎儿成纤维细胞相近的优点,可用于转基因动物的供核细胞。在 14 只怀孕受体羊中,有 10 只流产或胎儿吸收发生在妊娠后期(60 d),且流产胎儿器官发育异常,与其他报道的结果一致<sup>[18,20]</sup>。

总之,本实验表明山羊乳腺上皮细胞经过长期培养筛选后,能保持发育全能性,且重构胚的融合率、怀孕率和克隆效率都较高,可为制备转基因动物提供另一种供体细胞的选择。

致谢 感谢郭磊、徐冬兰、柏亚军在实验中提供的帮助,感谢汤胜花在克隆羊护理饲养方面的工作。

## REFERENCES

- [1] Lgrand D, Ellass E, Carpentier M, *et al.* Lactoferrin: a modulator of immune and inflammatory responses. *Cell Mol Life Sci*, 2005, **62**(5): 2549–2559.
- [2] Van Berkel PHC, Welling MM, Geerts M, *et al.* Large scale production of recombinant human lactoferrin in the milk of transgenic cows. *Nat Biotechnol*, 2002, **20**: 484–487.
- [3] Liu T, Zhang YZ, Wu XF. High level expression of functionally active human lactoferrin in silkworm larvae. *J Biotechnol*, 2005, **118**(3): 246–256.
- [4] Stefanova G, Vlahova M, Atanassov A. Production of recombinant human lactoferrin from transgenic plants. *Bio Plant*, 2008, **52**(3): 423–428.
- [5] Gong GC, Dai YP, Fan BL, *et al.* Production of transgenic blastocyst by nuclear transfer from different types of somatic cells in cattle. *Sci China Ser C*, 2003, **33**(6): 532–538.  
龚国春, 戴蕴平, 樊宝良, 等. 以不同类型的转基因细胞为核供体生产的转基因克隆胚胎. *中国科学 C 辑*, 2003, **33**(6): 532–538.
- [6] Keefer CL, Baldassarre H, Keyston R, *et al.* Generation of dwarf goat (*Capra hircus*) clones following nuclear transfer with transfected and nontransfected fetal fibroblasts and *in vitro*-matured oocytes. *Biol Reprod*, 2001, **64**: 849–856.
- [7] Reggio BC, James AN, Green HL, *et al.* Cloned transgenic offspring resulting from somatic cell nuclear transfer in the goat: oocytes derived from both follicle-stimulating hormone-stimulated and nonstimulated abattoir-derived ovaries. *Biol Reprod*, 2001, **65**: 1528–1533.
- [8] Baguisi A, Behboodi E, Melican DT, *et al.* Production of goats by somatic cell nuclear transfer. *Nat Biotechnol*, 1999, **17**(5): 456–461.
- [9] Zhao MT, Lin H, Liu FJ, *et al.* Efficiency of human lactoferrin transgenic donor cell preparation for SCNT. *Theriogenology*, 2009, **71**(2): 376–384.
- [10] Cheng Y, Huang YZ, Yuan YG, *et al.* Casein and cytomegalovirus chimeric promoters for expression of human lactoferrin in the mammary gland of transgenic mice. *J Nanjing Agri Univ*, 2009, **32**(1): 78–84.  
成勇, 黄玉政, 袁玉国, 等. 酪蛋白和巨细胞病毒复合启动子激活人乳铁蛋白 cDNA 基因在转基因小鼠乳腺中的表达. *南京农业大学学报*, 2009, **32**(1): 78–84.
- [11] Cheng Y, Wang YG, Luo JP, *et al.* Cloned goats produced from the somatic cells of an adult transgenic goat. *Chin J Biotech*, 2002, **18**(1): 79–83.  
成勇, 王玉阁, 罗金平, 等. 由成年转基因山羊体细胞而来的克隆山羊. *生物工程学报*, 2002, **18**(1): 79–83.
- [12] Zou X, Chen Y, Wang Y, *et al.* Production of cloned goats from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei or fused with cumulus cells. *Cloning*, 2001, **3**(1): 31–37.
- [13] Zou X, Wang Y, Cheng Y, *et al.* Generation of cloned goats (*Capra hirus*) from transfected foetal fibroblasts cells, the effect of donor cell cycle. *Mol Reprod Dev*, 2002, **61**(2): 164–172.
- [14] Cho J, Bhuiyan MM, Shin S, *et al.* Development potential of transgenic somatic cell nuclear transfer embryos according to various factors of donor cell. *J Vet Med Sci*, 2004, **66**(12): 1567–1573.
- [15] Kumura H, Tanaka A, Abo Y, *et al.* Primary culture of porcine mammary epithelial cells as a model system for evaluation of milk protein expression. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2001, **65**(9): 2098–2101.
- [16] Sun YL, Lin CS, Chou YC. Gene transfection and expression in a primary culture of mammary epithelial cells isolated from lactating sows. *Cell Biol Int*, 2005, **29**(7): 576–582.
- [17] Denning C, Burl S, Ainslie A, *et al.* Deletion of the alpha(1,3)galactosyl transferase (GGTA1) gene and the prion protein (PrP) gene in sheep. *Nat Biotechnol*, 2001, **19**(6): 559–562.
- [18] Lan GC, Chang ZL, Luo MJ, *et al.* Production of cloned goats by nuclear transfer of cumulus cells and long-term cultured fetal fibroblast cells into abattoir-derived oocytes. *Mol Reprod Dev*, 2006, **73**(7): 834–840.
- [19] Melican D, Butler R, Hawkins N, *et al.* Effect of serum

concentration, method of trypsinization and fusion/activation utilizing transfected fetal cells to generate transgenic dairy goats by somatic cell nuclear transfer. *Theriogenology*, 2004, **63**(6): 1549-1563.

[20] Jian-Quan C, Juan C, Xu-Jun X, *et al.* Effect of cytoplasm on the development of inter-species nuclear transfer reconstructed goat embryo. *Mol Reprod Dev*, 2007, **74**(5): 568-573.

## 《生物工程学报》“酶工程”专刊征稿通知

为了加速酶工程技术基础研究及成果的研发交流与互动步伐,加强酶制剂生产及应用技术的交流,促进酶工程科研、生产与应用的相互合作,沟通酶工程科研成果转化为生产力的渠道,以提高生物催化工业的先进水平,中国微生物学会酶工程专业委员会、中国食品科技学会酶制剂专业学会将共同主办第七届中国酶工程学术研讨会,会议将于2009年9月16~19日在合肥梅山饭店举办,本刊拟结合该会议于2009年12月出版一期主题为“酶工程”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

本专刊收录酶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. 国内外酶制剂生产及应用发展及前景; 2. 酶研究的基础问题、热点及新增长点; 3. 酶工程新技术、新工艺在新领域中的应用; 4. 基因工程及蛋白质工程优良菌种及工程酶; 5. 新酶、极端环境酶、抗体酶及核酶及其应用; 6. 有机相酶促催化及有机化合物、药物、手性物生物合成; 7. 环境监测与控制及洗涤剂用酶; 8. 化工、轻工、饲料生产用酶的开发; 9. 分析、临床诊断、医疗用酶的开发及生物传感器; 10. 生物反应器与后处理工艺。

### 二、投稿要求

1. 投稿方式:全文投稿请通过《生物工程学报》投稿系统在线投稿,详见主页(<http://journals.im.ac.cn/cjbncn/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“酶工程专刊”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)。

4. 会议将编印论文或成果摘要汇编,如果仅投稿摘要请 email 发到黎高翔老师的邮箱 [ligaox2003@yahoo.com.cn](mailto:ligaox2003@yahoo.com.cn)。论文摘要千万不要用传真发来。

### 三、本专刊几个关键的时间

1. 收稿截止日期:2009年9月25日

2. 决定是否录用日期:2009年10月25日

3. 录用后作者修回截止日期:2009年11月5日

4. 出版日期:2009年12月25日

### 四、特别说明

1. 本专刊不是增刊,而是在2009年第12期《生物工程学报》正刊上刊出。

2. 专刊投稿文章免收审稿费;录用后正式刊发的文章将请作者提交版权转让承诺书,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《生物工程学报》编辑部(邮编:100101)

欢迎您的来稿!

《生物工程学报》编辑部

2009-6-12