

# 重叠延伸 PCR 克隆三孢布拉霉 *carRA* 基因及其功能活性检测系统的构建

汤晖, 石楠, 于淼, 刘龙, 刘静, 贾颖, 牛宏彦, 张利平

河北大学生命科学学院 河北省微生物多样性研究与应用实验室, 保定 071002

**摘要:** 三孢布拉氏霉菌 CarRA 蛋白, 既有番茄红素环化酶功能活性又有八氢番茄红素合成酶功能活性, 为了对 CarRA 蛋白进行双功能活性分析, 及探测 CarRA 蛋白的番茄红素环化酶功能活性位点, 构建了在大肠杆菌体内通过颜色互补检测两种酶活性的系统。通过重叠延伸 PCR 的方法克隆得到了 *carRA* 基因, 并构建原核表达载体 pET28a-*carRA*, 与携带 *crtI/crtB/crtE* 基因簇的质粒 pAC-LYC 共转化 BL21(DE3), 验证番茄红素环化酶功能活性; 与以 pAC-LYC 为基础构建的携带 *crtI/crtE* 基因簇的质粒 pAC-LYC $\Delta$ (*crtB*) 共转化 BL21(DE3), 验证八氢番茄红素合成酶功能活性。通过颜色互补的初步鉴定, 再以 HPLC 对代谢产物进行分析, 明确了实验中的 CarRA 蛋白功能活性检测系统的可靠性, 为定点突变番茄红素环化酶活性位点而不影响八氢番茄红素合成酶功能活性提供了筛选模型。

**关键词:** 重叠延伸 PCR, *carRA* 基因, 番茄红素环化酶, 八氢番茄红素合成酶

## Cloning of *Blakeslea trispora carRA* gene by PCR-driven overlap extension and construction of an activity detection system

Hui Tang, Nan Shi, Miao Yu, Long Liu, Jing Liu, Ying Jia, Hongyan Niu, and Liping Zhang

Key Laboratory of Microbial Diversity Research and Application of Hebei Province, College of Life Sciences, Hebei University, Baoding 071002, China

**Abstract:** *Blakeslea trispora* CarRA has both lycopene cyclase and phytoene synthase activity. In order to analyze the double functional activity of CarRA proteins and to detect the active sites of lycopene cyclase, we constructed two detection systems in *Escherichia coli* by color complementary. Through PCR-driven overlap extension we got *carRA* gene cDNA, then constructed prokaryotes expression vector pET28a-*carRA*. pET28a-*carRA* with plasmid pAC-LYC carrying *crtI/crtB/crtE* gene clusters were co-transformed to BL21(DE3) to validate lycopene cyclase activity. We constructed the plasmid pAC-LYC $\Delta$ (*crtB*) carrying *crtI/crtE* gene clusters, then co-transformed them with pET28a-*carRA* to BL21(DE3) to validate phytoene synthase activity. Based on

**Received:** December 6, 2010; **Accepted:** March 7, 2011

**Supported by:** Science Research Plan of Hebei Higher Schools (No. Z2010225).

**Corresponding author:** Liping Zhang. Tel/Fax: +86-312-5079696; E-mail: zhliping@hbu.edu.cn

河北省高等学校科学研究计划 (No. Z2010225) 资助。

color complementary, and HPLC analysis of metabolites, we confirmed that the CarRA protein activity detection system was reliable. Our study provides a screening model for specific mutation of lycopene cyclase without affecting phytoene synthase activity.

**Keywords:** PCR-driven overlap extension, *carRA* gene, lycopene cyclase, phytoene synthase

番茄红素 (Lycopene) 具有极强的清除自由基<sup>[1]</sup>、诱导细胞分化<sup>[2]</sup>、增加免疫力<sup>[3]</sup>、减少 DNA 损伤等功能, 对防癌抗癌<sup>[4]</sup>、预防心血管疾病、提高免疫功能和延缓衰老均有一定的疗效<sup>[5]</sup>, 因此, 具有极大的生产和消费潜力。番茄红素的生产开发项目已成为国际上功能性食品和新药研究的热点, 已被纳入我国的“十一五国家高技术研究发展计划”。

在全球范围内, 三孢布拉氏霉菌 *Blakeslea trispora* 是实现番茄红素工业化生产的主要菌株。它是一种产 β-胡萝卜素的高产菌, 番茄红素是其代谢的中间产物, 工业生产上通过添加阻断剂来抑制 β-胡萝卜素生物合成途径中番茄红素环化酶的活性, 从而积累番茄红素。番茄红素环化酶由 *carRA* 基因编码产生, 是否通过基因工程的手段敲除 *carRA* 基因, 菌体就会积累番茄红素? 研究表明: CarRA 为双功能蛋白, 既有环化酶活性又有八氢番茄红素合成酶的功能活性, 而八氢番茄红素合成酶是番茄红素合成途径中上游的关键酶<sup>[6]</sup>。因此, *carRA* 基因的完全敲除必然导致番茄红素的合成失败。

本研究将构建体外检测番茄红素环化酶和八氢番茄红素合成酶功能活性的筛选模型, 为通过定点突变探测 CarRA 蛋白番茄红素环化酶活性位点、而不影响八氢番茄红素合成酶功能活性提供检测系统。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 菌株与质粒

所用质粒及其主要遗传特性如表 1 所示。大肠杆菌菌株 DH5α、BL21, 三孢布拉氏霉菌菌株 ATCC14272 及质粒 pET28a 为本实验室保存,

pMD18-T 载体购自 TaKaRa 公司, 质粒 pAC-LYC 由美国马里兰大学 Elisabeth Gantt 教授馈赠。

#### 1.1.2 主要试剂

*pfu* DNA 聚合酶、*Ex-Taq* 聚合酶、T4 DNA 连接酶、限制性内切酶、dNTPs、凝胶回收试剂盒均购自 TaKaRa 公司。

#### 1.1.3 PCR 扩增引物及序列

引物由北京三博远志生物技术有限责任公司合成 (表 2)。

表 1 本实验所用质粒及特性

Table 1 Plasmids used in this work, and their relevant characteristics

Plasmids	Relevant characteristics	Reference
pET28a	Kanamycin resistance	
pAC-LYC	<i>crtE</i> , <i>crtI</i> , <i>crtB</i> , Cm <sup>r</sup> ,	[7]
pAC-LYC( <i>crtB</i> )	<i>crtE</i> , <i>crtI</i> , Cm <sup>r</sup>	This work
pET28a- <i>carRA</i>	pET28a:: <i>B.trispora carRA</i> cDNA, Kan <sup>r</sup>	This work
pET28a- <i>crtB</i>	pET28a:: <i>B.trispora crtB</i> cDNA, Kan <sup>r</sup>	This work

*crtE*: geranylgeranyl pyrophosphate (GGPP) synthase; *crtB*: phytoene synthase; *crtI*: phytoene dehydrogenase; *crt* genes from *Erwinia uredovora*; Cm: chloramphenicol resistance; Kan: kanamycin resistance.

表 2 PCR 扩增引物及序列

Table 2 Primer and primer sequence

Gene	Primer name	Primer sequence (5'-3')
<i>carRA</i>	1(up)	GAATTCATGTCAATACTCACTTATCTGG
	1(down)	CAGTGTCAAGTGCCAAGCATGATAAG
	2(up)	CTTATCATGCTTGGCACTTGACACTG
	2(down)	GAATTCCTAATCAACAAAAAACTCTTAATC
<i>cm<sup>r</sup></i>	P1	CCATGGCATACCCACGCCGA
	P2	CCATGGGCAAATAATATACG
<i>crtB</i>	<i>crtB</i> 1	GAATCCATGAGCCAACCGCCGC
	<i>crtB</i> 2	GAATCCCTAAACGGGACGCTGC

## 1.2 方法

### 1.2.1 重叠延伸 PCR 法克隆 *carRA* 基因的 cDNA 序列

以番茄红素环化酶基因 DNA 序列 (GenBank Accession No. AY884174.1) 设计引物, 扩增上游 (1~405 bp) 和下游 (476~1 897 bp) 序列, 并分别于相应引物 5'端添加 *EcoR* I 酶切位点。SDS-CTAB 法提取三孢布拉霉基因组 DNA 为模板, 分别以 1(up)/1(down) 和 2(up)/2(down) 为引物对, *pfu* DNA 聚合酶扩增 *carRA* 基因的 2 个外显子片段。扩增反应条件均为: 94 °C 预变性 5 min; 98 °C 10 s, 61 °C 10 s, 72 °C 2 min, 30 个循环。分别回收上轮 PCR 的 2 个产物, 等摩尔比例混合适当稀释后作为模板, 以 1 (up)/2(down) 为引物对, 进行第 2 轮 PCR: 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 30 s, 56 °C 30 s, 72 °C 1 min, 30 个循环; 72 °C 延伸 10 min。扩增产物连接至 pMD18-T 载体, 转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$ 。PCR 初步鉴定后, 送上海生工生物技术有限公司进行测序, 测序结果用 Blastn 程序比对。

### 1.2.2 大肠杆菌表达载体 pET28a-*carRA* 的构建和重组子的筛选

提取质粒 pMD18-T-*carRA*, *EcoR* I 完全酶切, 回收小片段连接至表达载体 pET28a, 重组表达载体 pET28a-*carRA* 转化大肠杆菌 BL21(DE3), 卡那霉素抗性基因筛选并 PCR 初步鉴定后测序验证。

### 1.2.3 番茄红素环化酶活性的检测

提取质粒 pAC-LYC, 转化含有表达载体 pET28a-*carRA* 的 BL21(DE3) 感受态细胞, Kan 和 Cm 双抗筛选转化子。pAC-LYC 含有细菌来源的类胡萝卜素代谢途径中的 3 个基因 *crtE/crtI/crtB*, 在大肠杆菌中能积累番茄红素, 环化酶可以催化番茄红素生成类胡萝卜素, 菌体将由粉红色变为黄色, 因此可以利用颜色的改变初步检测和鉴定环化酶活性。阳性克隆子于含 Kan 和 Cm (终浓度 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 的 LB 培养基中 37 °C 振荡培养至  $OD_{600}$  为 0.4~0.6

时加入终浓度为 1 mmol/L 的 IPTG 诱导, 继续培养至  $OD_{600}$  为 0.8 时, 室温振荡培养 12~24 h, 离心收集菌体观察菌体颜色。以空载体 pET28a 转化含质粒 pAC-LYC 的 BL21(DE3) 菌株作为阴性对照。

### 1.2.4 八氢番茄红素合成酶活性体外检测载体的构建

以载体 pAC-LYC 为基础进行构建。pAC-LYC 中有 2 个 *Nco* I 酶切位点, 分别位于 *crtB* 基因和 *cm* 抗性基因内部。根据 Tn9 转座子上的氯霉素抗性基因序列 (GenBank Accession No. V00622.1) 设计引物, 扩增 *cm* 基因被 *Nco* I 切下的约 500 bp 的片段 *cm'*, 用来补全 *cm* 基因提供质粒 Cm 抗性。以引物 P1 和 P2、质粒 pAC-LYC 为模板扩增, 产物 *Nco* I 完全酶切后与 pAC-LYC *Nco* I 完全酶切后的大片段连接, 转化感受态细胞 BL21(DE3), 氯霉素抗性平板 (终浓度 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 筛选。挑取单克隆菌落, PCR 初步鉴定后测序验证, 重组质粒命名为 pAC-LYC $\Delta$ (*crtB*)。

为进一步验证构建的 pAC-LYC $\Delta$ (*crtB*) 载体的可靠性, 进行 *crtB* 基因互补试验。依据质粒 pAC-LYC 中的 *crtB* 基因序列设计引物, 并添加 *EcoR* I 酶切位点, 以引物 *crtB*1 和 *crtB*2 进行扩增, 回收 930 bp 左右的扩增产物连接到 pMD18-T 载体上, 将正向连入的 T+*crtB* 质粒进行 *Sac* I / *Hind* III 双酶切, 连接到质粒 pET28a 上, 转化大肠杆菌 BL21(DE3), 卡那抗性平板 (终浓度 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 培养, 提取质粒。通过 PCR 鉴定和测序验证插入的序列及方向是否正确, 构建成功的重组质粒命名为 pET28a-*crtB*。将 *crtB* 基因缺失的质粒 pAC-LYC $\Delta$ (*crtB*) 与重组质粒 pET28a-*crtB* 共转化大肠杆菌 BL21(DE3), 用 Kan 和 Cm 双抗平板 (终浓度 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 筛选, 阳性克隆子的颜色鉴别实验同环化酶活性检测, 同时分别以含有质粒 pAC-LYC $\Delta$ (*crtB*) 和 pET28a-*crtB* 的 BL21(DE3) 菌株为阴性对照。载体构建和基因互补实验的技术路线如图 1 所示。

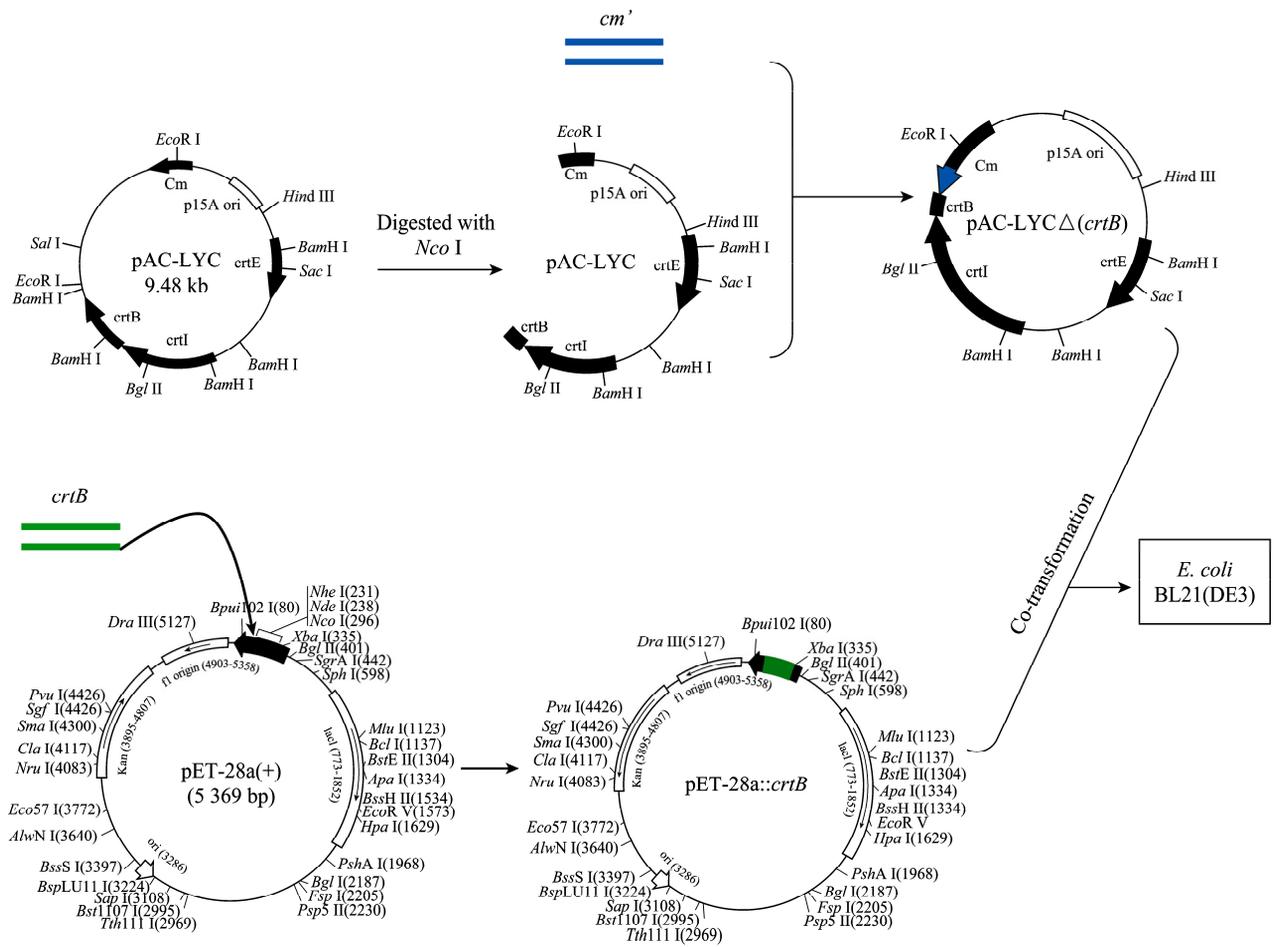


图 1 八氢番茄红素合成酶活性体外检测载体的构建和基因互补实验的技术路线  
Fig. 1 Construction of phytoene synthase activity detection vector and gene complementary.

### 1.2.5 八氢番茄红素合成酶活性的检测

提取质粒 pAC-LYCΔ(*crtB*), 转化含有表达载体 pET28a-*carRA* 的大肠杆菌 BL21(DE3) 感受态细胞, Kan 和 Cm 双抗筛选转化子, 进一步的颜色互补实验同环化酶活性检测。

### 1.2.6 番茄红素含量测定

将恒重后的菌体研碎, 称取 0.5 g, 加入少量丙酮: 石油醚 (1:1) 混合液, 在研钵中研磨萃取至提取液完全无色, 将萃取液过滤定容至 10 mL 容量瓶, 高效液相色谱法 (HPLC) 测定。色谱仪为 waters1525 高效液相色谱仪、UV-VLS Detee-tor2487 双通道紫外检测器; 分离柱为 Lichrospher-5-Cu,

5 μm, 250 mm×4.6 mm; 流动相为甲醇: 乙腈: 二氯甲烷 (7:7:2, V/V/V); 检测波长 472 nm, 柱温 35 °C, 流速 1 mL/min; 进样量 10 μL。

## 2 结果与分析

### 2.1 *carRA* 基因的克隆及测序

经过 2 次 PCR 扩增, 得到了三孢布拉霉番茄红素环化酶基因的 2 个外显子片段。从图 2 可看出泳道 1 大小为 400 bp 左右, 和第一外显子大小一致; 泳道 2 大小为 1 400 bp 左右, 和第二外显子大小一致, 由此可初步确定扩增到了两个外显子片段。经重叠延伸 PCR 后, 泳道 3、4 是拼接产物的检测,

大小为 1 800 bp 左右处有扩增条带, 和番茄红素环化酶 cDNA 大小基本一致, 可以初步确定克隆出番茄红素环化酶 cDNA 片段。

将拼接产物胶回收后连接至 pMD18-T 载体, 进行测序, 结果表明克隆的基因和该序列完全一致, 同源性达 100%。表明克隆得到的三孢布拉霉番茄红素环化酶 cDNA 序列完全正确。

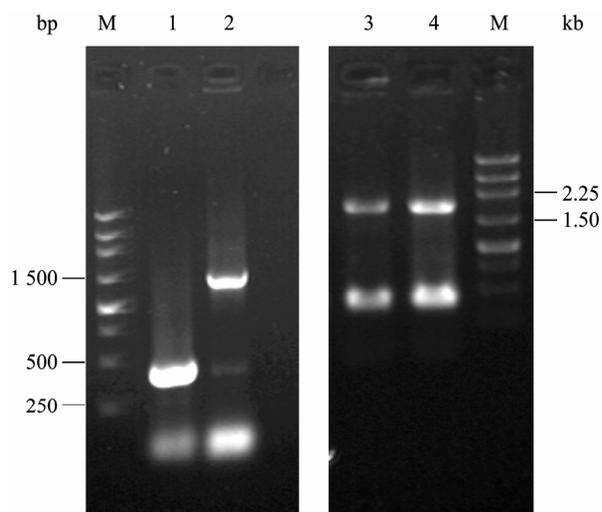


图 2 重叠延伸 PCR 扩增 *carRA* 基因

Fig. 2 PCR amplification of two exons of *carRA* gene. 1: the first exon of *carRA* gene; 2: the second exon of *carRA* gene; 3,4: splicing results of two exons; M: DNA marker.

## 2.2 表达载体 pET28a-*carRA* 的鉴定

将番茄红素环化酶基因的 cDNA 序列导入原核表达载体 pET28a, 构建原核表达质粒 pET28a-*carRA*, 经 PCR 扩增初步检测 (图 3) 和测序验证, 表明质粒中 *carRA* 序列为正向插入多克隆位点, 表明原核表达载体 pET28a-*carRA* 构建成功。

## 2.3 八氢番茄红素合成酶活性检测载体 pAC-LYCΔ(*crtB*) 的鉴定

扩增 *cm* 基因中 *Nco* I 酶切位点下游的序列, 与质粒 pAC-LYC *Nco* I 完全酶切后的大片段相连, 通过 Cm 抗性筛选及 PCR 鉴定 (图 4), 表明 pAC-LYCΔ(*crtB*) 构建正确。

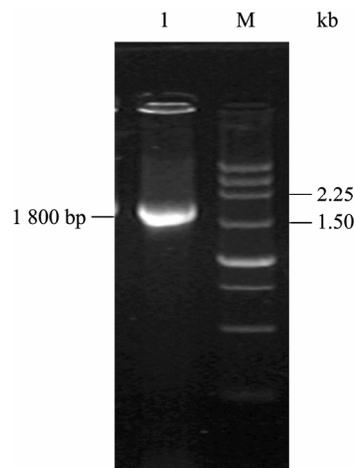


图 3 表达载体 pET28a-*carRA* 的 PCR 鉴定

Fig. 3 Identification of pET28a-*carRA* by PCR. 1: PCR products of pET28a-*carRA*; M: DNA marker.

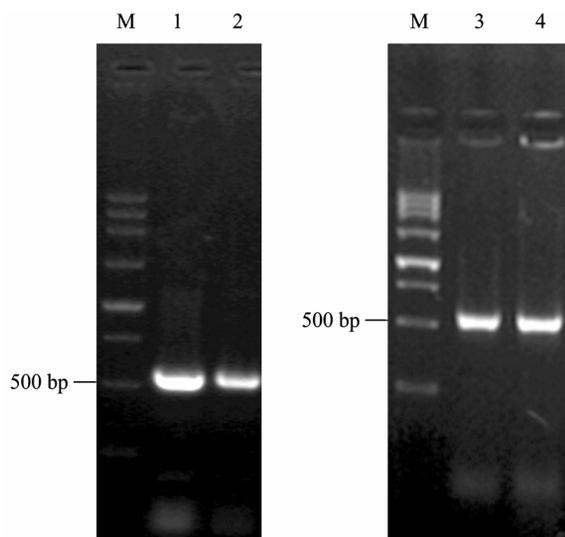


图 4 *cm'* 序列的 PCR 扩增

Fig. 4 PCR products of *cm'*. 1,2: PCR products of pAC-LYC; 3,4: PCR products of pAC-LYCΔ(*crtB*); M: 250 bp ladder.

通过基因互补实验进一步验证 pAC-LYCΔ(*crtB*) 载体中 *CrtB* 酶活性丧失, 而 *crtE* 和 *crtI* 还保留相应功能。自质粒 pAC-LYC 中扩增得到 *crtB* 基因的编码区 (图 5), 正向插入 pET28a 的多克隆位点, PCR 反应结果 (图 5) 及测序结果表明 *crtB* 基因的表达载体 pET28a-*crtB* 构建正确。pET28a-*crtB* 和

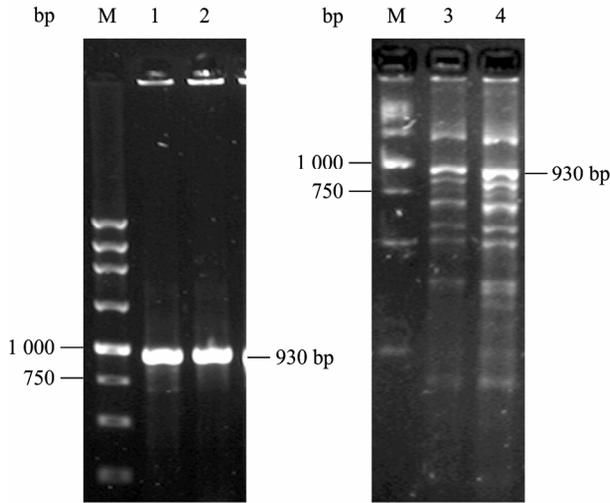


图5 *crtB* 基因的 PCR 扩增

Fig. 5 PCR products of *crtB*. 1,2: PCR products of pAC-LYC; 3,4: PCR products of pET28a-*crtB*. M: 250 bp ladder.

pAC-LYCΔ(*crtB*) 共转化大肠杆菌 BL21 感受态细胞, 37 °C 恒温培养 12~24 h 后转入室温暗处, 1 d 后菌体开始变为橘红色, 2 d 后颜色进一步加深。而阴性对照始终为大肠杆菌的本色。

### 2.4 三孢布拉霉 *carRA* 基因番茄红素环化酶和八氢番茄红素合成酶活性的验证

将表达载体 pET28a-*carRA* 转化到带有质粒 pAC-LYC 的大肠杆菌 BL21(DE3) 感受态细胞中, 菌体颜色由粉红色转变为黄色。通过这个酶活试验, 表明 *carRA* 基因的表达产物能够将工程菌中积累的番茄红素 (粉红色) 转化成 β-胡萝卜素 (黄色), 初步证明了 CarRA 蛋白具有番茄红素环化酶的功能与活性。

将表达载体 pET28a-*carRA* 转化到带有质粒 pAC-LYCΔ(*crtB*) 的大肠杆菌 BL21(DE3) 感受态细胞中, 菌体颜色由大肠杆菌本色转变为黄色。通过这个颜色互补试验, 表明 *carRA* 基因的表达产物能够合成番茄红素并进一步转化成 β-胡萝卜素 (黄色), 初步证明了 CarRA 蛋白亦具有八氢番茄红素合成酶功能与活性。

通过 HPLC 分析可定性和定量地确证筛选模型中 CarRA 蛋白的功能活性。如图 6 所示, *crtE/crtI/crtB* 基因簇正确的顺序作用将使菌体积累番茄红素; 当环化酶行使功能时菌体积累 β-胡萝卜素 (图 7)。

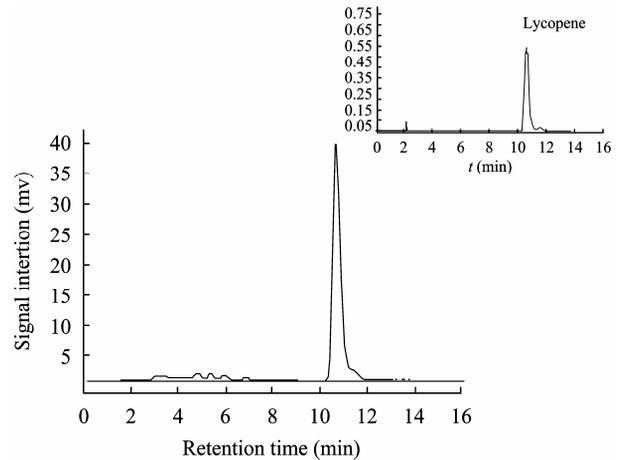


图6 HPLC 检测质粒 pAC-LYC 在大肠杆菌 BL21 中的表达

Fig. 6 HPLC analysis of pAC-LYC expressed in *E. coli* BL21.

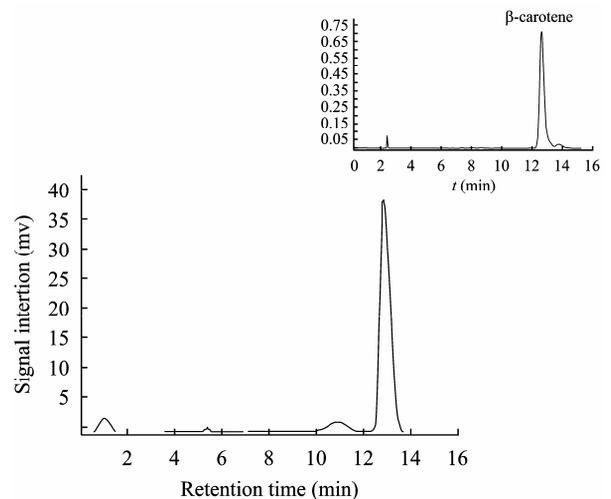


图7 HPLC 检测质粒 pAC-LYC 和 pET28a-*carRA*, 或 pAC-LYCΔ(*crtB*) 和 pET28a-*carRA* 在大肠杆菌 BL21 中的共表达

Fig. 7 HPLC analysis of pAC-LYC and pET28a-*carRA* or pAC-LYCΔ(*crtB*) and pET28a-*carRA* co-expressed in *E. coli* BL21.

### 3 讨论

在多数情况下扩增真核生物的目的编码基因都采取 RT-PCR 的策略, 而提取 RNA 的过程较烦琐且需要时刻防止 RNA 酶的污染。相比较而言, DNA 的提取及其 PCR 扩增则容易得多。采用重叠延伸 PCR 的方式, 能快速获得目的基因, 不仅克服了 RT-PCR 中必须依赖 mRNA 的问题, 而且有很高的效率<sup>[8]</sup>。

从 *carRA* 基因的扩增可以看出, 合理设计的引物可保证第 1 个外显子和第 2 个外显子的准确性, 使得融合位点正确拼接; 相连引物间的重叠区域达到了 26 个碱基, 亦避免富含 AT 的序列, 在片段合成过程中, 防止了错配发生。

重叠延伸 PCR 包括 2 个阶段, 第 1 个阶段分别扩增出 2 个外显子, 第 2 个阶段以上个阶段的 2 个产物为模板扩增出完整的 DNA 序列, 2 个产物的大小不同, 很容易导致模板量有较大的差异, 在扩增时候需要考虑引物和模板的比例关系。一般需要使模板的摩尔数相同, 并进行适当的稀释, 这样才能有效保证扩增到目标片段。

质粒 pAC-LYC 自构建以来, 对多种来源的环化酶如蓝细菌<sup>[7]</sup>、植物<sup>[9]</sup>、藻类<sup>[10]</sup>等, 通过菌体颜色变化, 即可简单直观地对蛋白的环化酶活性进行鉴定。本研究首次对三孢布拉霉来源的环化酶功能活性采用颜色互补实验进行初步筛查, 同时亦改造了 pAC-LYC 质粒, 使其仅具有细菌来源的类胡萝卜素代谢途径中的 2 个基因 *crtE/crtI*, 即质粒 pAC-LYC $\Delta$ (*crtB*)。当重组蛋白具有八氢番茄红素合成酶活性时, 在大肠杆菌中能积累番茄红素, 菌体呈现粉红色, 据此可鉴定蛋白的八氢番茄红素合成酶功能活性。此外, pAC-LYC $\Delta$ (*crtB*) 也可同时鉴定八氢番茄红素合成酶和番茄红素环化酶的功能活性, 即菌体呈现黄色。

三孢布拉霉是目前发酵法生产番茄红素的主要菌种, 但需要添加阻断剂抑制番茄红素环化酶活性

从而实现番茄红素的积累。阻断剂的添加不仅增加了生产工艺流程, 亦会对后续的提取质量产生影响, 因此通过基因工程的手段获得番茄红素环化酶活性缺失的工程菌是符合生产需求的。

卷枝毛霉 *Mucor circinelloides* 中的 CarRP 蛋白亦为双功能蛋白, 与三孢布拉霉 CarRA 蛋白为同功酶, Velayos 等<sup>[11]</sup>的研究表明, CarRP 蛋白 N 端某些氨基酸的突变会积累番茄红素, 说明番茄红素环化酶活性丧失而保留有八氢番茄红素合成酶活性。同样的现象在红法夫酵母 *Xanthophyllomyces dendrorhous* 中亦有发现<sup>[12]</sup>。番茄红素环化酶由 *carRA* 基因编码, 但 CarRA 蛋白为双功能蛋白, 又具有八氢番茄红素合成酶活性, 只有通过定点突变才可能缺失 CarRA 蛋白的番茄红素环化酶活性, 而不影响八氢番茄红素合成酶的正常功能。

本研究确立的酶活检测模型将为此提供简便、可靠的筛选方法: 利用质粒 pAC-LYC 检测番茄红素环化酶活性是否改变; 发生改变的用质粒 pAC-LYC $\Delta$ (*crtB*) 检测八氢番茄红素合成酶活性的变化, 最后通过 HPLC 进一步确证。

### REFERENCES

- [1] Hadley CW, Clinton SK, Schwartz SJ. The consumption of processed tomato products enhances plasma lycopene concentration in association with a reduced lipoprotein sensitivity to oxidative damage. *J Nutr*, 2003, 133(3): 727-732.
- [2] Yilmaz S, Atessahin A, Sahna E, et al. Protective effect of lycopene on adriamycin induced cardiotoxicity and nephrotoxicity. *Toxicology*, 2006, 218(2/3): 164-171.
- [3] Blum A, Monir M, Wirsansky I, et al. The beneficial effects of tomatoes. *Eur Intern Med*, 2005, 16(6): 402-444.
- [4] Mein JR, Lian F, Wang XD. Biological activity of lycopene metabolites: implications for cancer prevention. *Nutr Rev*, 2008, 66(12): 667-83.
- [5] Omoni A, Aluko RE. The anti-carcinogenic and anti-atherogenic effects of lycopene: a review. *Trends Food Sci*

- Technol, 2005, 16(8): 344–350.
- [6] Rodríguez-Sáiz M, Paz B, de la Fuente JL, et al. *Blakeslea trispora* genes for carotene biosynthesis. Appl Environ Microbiol, 2004, 70(9): 5589–5594.
- [7] Francis XC Jr, Sun Z, Chamovitz D. Molecular structure and enzymatic function of lycopene cyclase from the cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC7942. Plant Cell, 1994, 6(8): 1107–1121.
- [8] Heckman KL, Pease LR. Gene splicing and mutagenesis by PCR-driven overlap extension. Nature, 2007, 2(4): 924–932.
- [9] Devitt LC, Fanning K, Dietzgen RG, et al. Isolation and functional characterization of a lycopene  $\beta$ -cyclase gene that controls fruit colour of papaya (*Carica papaya* L.). J Exp Bot, 2010, 61(1): 33–39.
- [10] Li T, Shi CL, Gan ZB, et al. Cloning and analysis of the gene encoding lycopene epsilon cyclase in *Chlorella protothecoides* CS-41. Acta Microbiol Sin, 2009, 49(9): 1180–1189.  
李婷, 施春雷, 淦志兵, 等. 原壳小球藻番茄红素  $\epsilon$  环化酶基因的克隆和分析. 微生物学报, 2009, 49(9): 1180–1189.
- [11] Velayos A, Eslava AP, Iturriaga EA. A bifunctional enzyme with lycopene cyclase and phytoene synthase activities is encoded by the *carRP* gene of *Mucor circinelloides*. Eur J Biochem, 2000, 267(17): 5509–5519.
- [12] Verdoes JC, Krubasik P, Sandmann G, et al. Isolation and functional characterisation of a novel type of carotenoid biosynthetic gene from *Xanthophyllomyces dendrorhous*. Mol Gen Genet, 1999, 262(3): 453–461.



## 《生物工程学报》对摘要的写作要求

1. 研究报告摘要: 基本要素包括研究目的、方法、结果和结论 (不用单列标题书写)。目的 (Purpose): 主要说明作者写此文章的目的, 或说明本文主要要解决的问题; 方法 (Methods): 重点说明作者的主要工作过程及使用的方法。应用性文章如需要, 可注明条件、使用的主要设备和仪器。结果 (Results): 本文最后得出的结果 (实验数据部分)。结论 (Conclusions): 如系基础研究, 应写明本文的创新之处, 及文章在讨论部分表述的观点; 如系应用性研究, 应尽可能提及本文结果和结论的应用范围和应用情况或应用前景。

2. 综述摘要: 包括论述内容的发展水平、自己的评论及展望, 尤其要注意结合自己的研究工作。

3. 英文摘要的撰写要点: 英文摘要的内容应与中文摘要一致, 但比中文摘要更详尽。英文摘要完成后, 务必请英文较好、且专业知识强的专家审阅定稿后再返回编辑部。凡不符合要求的, 即使学术上可以达到刊出的水平, 本刊也将推迟发表。

(1) 建议使用第一人称, 尽量不使用第三人称和被动语态。

(2) 建议用主动语态, 被动语态表达拖拉模糊尽量不用, 这样可以免好多长句, 以求简单清晰。

(3) 尽量使用清晰简练的短句, 避免很长的句子。注意正确使用英文写作习惯和语法。

(4) 摘要应当使用过去时态, 语法正确, 句子通顺。

(5) 摘要中避免使用缩写语, 除非是那些人人皆知的 (如 DNA、ATP 等), 或者确实是非常长, 而且出现多次的短语才允许用缩写语, 并且在第一次出现时要写出全称。

(6) 在英语摘要中, 不要使用任何汉字字符, 包括标点、括号、温度、希腊字母等。

(7) 句子的开头处最好不要使用数字。