

螺旋霉素 3-O-酰基转移酶基因的删除和主要产生螺旋霉素组分 I 菌株的获得

Deletion of Spiramycin 3-O-acyltransferase Gene from *Streptomyces spiramyceticus* F21 Resulting in the Production of Spiramycin I as Major Component

武临专¹, 马春燕², 王以光^{1*}, 戴剑澍¹, 李京艳¹, 夏焕章²

WU Lin-Zhuan¹, MA Chun-Yan², WANG Yi-Guang^{1*}, DAI Jian-Lu¹, LI Jing-Yan¹ and XIA Huan-Zhang²

1 中国医学科学院/中国协和医科大学医药生物技术研究所, 北京 100050

2 沈阳药科大学制药工程学院, 沈阳 110015

1 Institute of Medicinal Biotechnology, CAMS & PUMC, Beijing 100050, China

2 School of Pharmaceutical Engineering, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110015, China

摘 要 螺旋霉素(SP)为 16 元环大环内酯类抗生素,含有螺旋霉素 I、II 和 III 个组分,其结构的差异为 16 元内酯环的 C₃ 上分别连接羟基(SP I)、乙酰基(SP II)和丙酰基(SP III);SP II 和 SP III 是在相同的 3-O-酰基转移酶催化下 SP I 进一步酰化的产物。SP I、SP II 和 SP III 在生物学活性方面无大差异。为简化螺旋霉素组分,便于今后对其结构进行进一步改造,根据碳霉素和麦迪霉素生物合成中的 3-O-酰基转移酶序列,设计了简并性 PCR 引物,并采用 SON-PCR(single oligonucleotide nested PCR)方法,从螺旋霉素产生菌 *S. spiramyceticus* F21 中进行特异性扩增,获得了螺旋霉素 3-O-酰基转移酶基因(*sspA*)及其侧翼序列,共约 4.3k(其中的 3457nt DNA 序列已被 Genbank 收录, DQ642742)。采用 DNA 同源双交换技术对 *S. spiramyceticus* F21 中的 *sspA* 进行了删除。对螺旋霉素原株和 *sspA* 缺失变株进行发酵产物提取和 HPLC 分析表明:原株中 SP I、SP II 和 SP III 的相对含量分别为 7.8%、67%和 25%,变株中则分别为 72%、18%和 9.6%,变株主要组分为 SP I。螺旋霉素 *sspA* 缺失变株的获得为螺旋霉素组分简化及其衍生物的结构改造奠定了基础。

关键词 螺旋霉素链霉菌,螺旋霉素,螺旋霉素 I,3-O-酰基转移酶,基因删除

中图分类号 Q781 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2007)04-0612-06

Abstract Spiramycin (SP) belongs to the 16-member macrolide antibiotics. It contains three components, namely SP I, SP II and SP III, which differ structurally in the acylation moieties on the C₃ of the lactone. The SP I component contains a hydroxyl group at C₃. SP II, and SP III are formed by further acetylation or propionylation of the C₃ of SP I, by the same 3-O-acyltransferase (3-O-AT). The study focused on simplifying spiramycin components. Theoretically, disruption/deletion of the 3-O-AT gene will reduce/stop the acylation of SP I to SP II and SP III. In this study, degenerated primers were designed according to the conserved regions of 3-O-acyltransferase, MdmB and AcyA in the medicamycin and carbomycin producers of *S.*

Received: November 30, 2006; Accepted: January 4, 2007.

This work was supported by the grant from the Foundation of the National Department of Sciences and Technology under 863 project (No.2006AA02Z230).

* Corresponding author. Tel: +86-10-63038137; Fax: +86-10-63176489; E-mail: wangyh456@yahoo.com.cn

国家科技部 863 研究项目资助 (No.2006AA02Z230)

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

mycarofaciens and *S. thermotolerans*, respectively, and an 878bp DNA fragment was amplified from the spiramycin-producer of *S. spiramyceticus* F21. Blast analysis of the 878bp DNA fragment suggested that it encoded the 3-O-acyltransferase (3-O-AT, *sspA*) gene for spiramycin biosynthesis. The flanking regions of this 878bp DNA fragment were then amplified by single-oligonucleotide-nested PCR, and a total of 4.3kb DNA was obtained (3457nt among the 4.3kb fragment was sequenced, and deposited in GenBank DQ642742), covering the whole putative 3-O-acyltransferase gene, *sspA*. The *sspA* was then deleted from the *S. spiramyceticus* F21 genome by double cross-over homologous recombination, mediated by temperature-sensitive plasmid pKC1139. A comparison was done of the components of spiramycins produced by the *sspA*-deleted mutant strain with that of the parent strain by HPLC analysis, which showed that *sspA*-deleted mutant produced SP I (72%), SP II (18%), and SP III (9.6%), whereas parent strain produced SP I (7.8%), SP II (67%), and SP III (25%), respectively, demonstrating the role of *sspA* in the acylation of SP I into SP II and SP III. The *sspA*-deleted mutant strain obtained in this study may be used for the production of SP I, or may serve as a good starter for the construction of spiramycin derivatives.

Key words *S. spiramyceticus* spiramycin spiramycin I 3-O-acyltransferase gene deletion

大环内酯类抗生素在临床上占有重要地位,它们对革兰氏阳性菌和支原体有很好的活性,对部分革兰氏阴性菌也有作用,且对一些日趋流行的弓形体、军团菌等难以控制的病原体有良好的抗菌活性和组织渗透性,口服吸收快,不良反应少,对肝、肾功能基本无影响,还有潜在的免疫调节作用。20世纪90年代已被认为在治疗成人呼吸道感染上将 β -内酰胺类药物竞争。近年,世界各国通过对十四元环红霉素分子结构的化学改造研制新的衍生物已在临床上得到广泛的应用。

16元环大环内酯类抗生素构效关系的研究显示,碳霉糖 4''位亲脂酰基团对于分子向细胞的渗透有重要作用,因而可以提高抗生素对核糖核蛋白体的结合能力和体内抗菌活性;而且酰基碳链越长亲脂性越高,体内抗菌活性越好。现有对16元环大环内酯类抗生素结构改造主要集中在用化学半合成方法使碳霉糖 4''或/和 3''羟基的酰基化,如乙酰螺旋霉素、乙酰麦迪霉素等。近年,采用基因工程技术通过碳霉糖 4''位异戊酰基转移酶基因在螺旋霉素或泰乐菌素产生菌中的表达,使产生菌能够发酵直接产生 4''异戊酰螺旋霉素或 4''异戊酰泰乐菌素,药效学显示异戊酰化产物在体内的活性明显优于乙酰化产物。目前国内已完成的基因工程必特霉素 II 临床试验研究表明,必特霉素治疗上呼吸道感染总有效率为 93%,与对照药阿奇霉素无差异,而且不良反应少;同时,由于必特霉素对肺炎支原体、解脲支原体和衣原体具有高活性,表明它在治疗上述菌感染和抗泌尿道感染中有潜在的应用价值。

螺旋霉素(spiramycin, SP)属16元大环内酯类抗生素,由螺旋霉素链霉菌(*S. spiramyceticus*, 国内菌株)或生二素链霉菌(*S. ambofaciens*, 国外菌株)产

生。螺旋霉素为多组分抗生素,含有 I、II 和 III 三个组分(化学结构见图 1),其结构差异表现在 16 元内酯环的 3 位 C 上分别连着一个羟基(SP I)、乙酰基(SP II)或丙酰基(SP III)。螺旋霉素生物合成的研究表明,SP II 和 SP III 是由 SP I 经 3-O-酰基化酶(3-O-acyltransferase, 3-O-AT)酰化产生的。

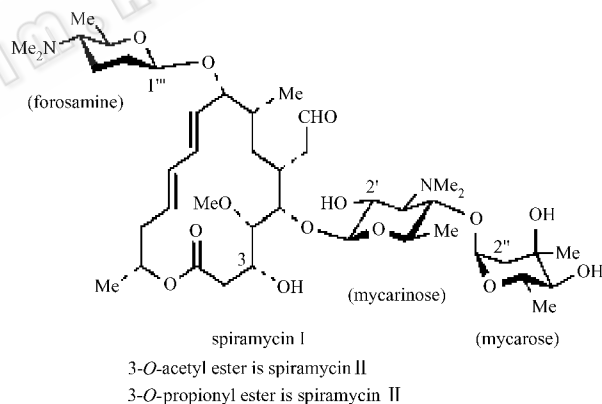


图 1 螺旋霉素的化学结构

Fig.1 Chemical structure of spiramycin

虽然 *S. spiramyceticus* 和 *S. ambofaciens* 均可以产生螺旋霉素,但是所产生的三个组分的比例却不相同:*S. spiramyceticus* 产生的螺旋霉素中 SP I 含量很少,SP II 和 SP III 之和超过 75%;而 *S. ambofaciens* 产生的螺旋霉素中 SP I 含量超过 90%。

对螺旋霉素三个组分的体外抗菌活性研究表明:SP I 分别高于 SP II 和 SP III 的 50% 和 30% 左右^[1],但在体内,SP II 和 SP III 的组织浓度高于 SP I。因此,总体上认为螺旋霉素三个组分的体内抗菌活性是相同的。

药典对螺旋霉素的组分比例是有明确规定的。例如,欧洲药典就规定 SP I 的比例不低于 90%,SP II 和 SP III 的比例分别不高于 5% 和 10%。我国药典

虽然没有收录螺旋霉素,但是根据其乙酰螺旋霉素的质量标准规定,也可以推测出对螺旋霉素组分比例的要求:SP II 和 SP III 均不低于 35%,二者之和不低于 75%。

长期以来,抗生素发酵产品的多组分问题给药品质量标准的制定以及生产工艺的控制带来了很大的困难和挑战。同一抗生素由于生产菌种、发酵条件和提取工艺的不同,常常也会导致质量控制与分析的复杂化。因此,在不影响生物学活性的前提下,减少组分数量、甚至获得单一组分产生菌,以简化质控标准,进而简化生产提取工艺,降低能耗和生产成本,减少对环境的污染等,一直是抗生素研发和生产面临的重要课题。

江苏微生物所经过多年的努力利用诱变技术,获得了产生单一组分的庆大霉素 Cla 菌种^[2];沈阳药科大学熊宗贵等通过诱变及添加前体的方法,获得了产生麦迪霉素 A 组分为主的菌种。然而,采用诱变技术获得单一组分菌种的方法存在一定的机遇性,并且筛选工作量大,辅之以添加前体的方法,需要额外化学合成小分子前体,又增加了生产成本。

本研究采用基因工程技术,对 *S. spiramyceticus* 中负责螺旋霉素内酯环 3 位羟基酰化酶基因进行定向删除,获得了主要产生 SP I 组分的螺旋霉素产生菌。

表 1 本研究所用引物

Table 1 Primers used in this study

Name	Oligonucleotide sequences of primers (5'-3')	Restriction enzyme site added
1	ATTA <u>GGATCCT</u> GCCACATCGG (G/C) XAGCAG	<i>Bam</i> H I
2	TATA <u>GGATCCT</u> CGGTG (G/C) XCGTA (G/C) XGGAT	<i>Bam</i> H I
3	CGTAACTCGGGCGGAGCAGCAGCGTGCAGGTC	-
4	GATGCTGGTGGCGCTGGGCCAGTGGTCTTTCG	-
5	CGACAACACGCTGTTCTTCGGCCGGGTGGCCG	-
6	AGTG <u>TCTAGA</u> CGGGCGGGCACGGGTGAACTC	<i>Xba</i> I
7	GACA <u>AGCTT</u> TGGATTCTCGCTCTCTTTCGGGATGG	<i>Hind</i> III
8	GACA <u>AGCTT</u> TGAGCGTGGCAGACCAGACCGCTCT	<i>Hind</i> III
9	AGTG <u>GAATT</u> CCACCAGGGCAAGGTGGCGTGCCTCTG	<i>Eco</i> R I

表 2 SON-PCR 参数

Table 2 SON-PCR parameters

Number of cycles	Thermal settings
1	96°C - 3min
5 ~ 10	96°C - 30s, 69°C - 30s, 72°C - 3.5min
1	96°C - 30s, 29°C - 3min, 29°C ramping to 72°C in 3min, 72°C - 3.5min
45 ~ 60	96°C - 20s, 69°C - 20s, 72°C - 3min

1.3 链霉菌操作

S. spiramyceticus F21 原生质体形成与转化方法

1 材料与方法

1.1 链霉菌及其发酵培养和产物的提取分析

S. spiramyceticus F21,为我国螺旋霉素产生菌,本实验室保存;L3-O-ATΔ 为 *sspA* 基因缺失变株,SP I 组分产生菌,本研究构建。菌株斜面经种子培养接种于发酵培养基(含葡萄糖、淀粉、碳酸钙、氯化钠、鱼粉等)28°C 摇瓶培养 5d。发酵上清液经乙酸乙酯提取后,吹干,甲醇溶解,进行 HPLC 检测。

1.2 分子克隆载体与 DNA 操作

温敏型大肠杆菌-链霉菌穿梭载体 pKC1139^[3],携带阿泊拉霉素(Am)抗性,本实验室保存。PCR 引物(序列见表 1)由北京赛百盛基因技术有限公司合成。DNA 测序由宝生物工程(大连)有限公司完成。*S. spiramyceticus* F21 基因组 DNA 提取方法参照文献[4]。PCR 产物的纯化与连接、感受态细胞的制备、DNA 连接产物的转化、重组质粒的筛选参照文献[5]进行。常规 PCR 主要技术参数为反应体积 25μL(TaKaRa LA Taq 2×GC Buffer I);基因组 DNA 取 50~100ng 作模板;退火温度 58°C,延伸时间为 1min;进行 30 个循环。单寡核苷酸巢式 PCR^[6](single oligonucleotide nested PCR, SON-PCR)主要参数见表 2,反应体积 50μL。

参照文献[7,8];DNA 同源双交换转化子的筛选分离,首先在 Am 抗性平板上获得单交换转化子,然后在 37°C、无抗性平板上连续传 3~4 代,获得分离良好的单菌落,对已经丢失 Am 抗性的单菌落进行基因组 DNA 提取和 PCR 鉴定,得到发生 DNA 同源双交换的转化子。

1.4 变株发酵产物的 HPLC 检测

岛津 LC-10ATvp 液相色谱仪,二级管阵列检测器,色谱柱为 Kromasil C18 4.5×150mm,流动相为甲醇/1%磷酸二氢钠溶液(53/47),流速为 1mL/min,ac.cn

2 结果

2.1 螺旋霉素 3-O-AT 基因及其上下游序列的克隆

鉴于螺旋霉素、麦迪霉素和碳霉素三者化学结构的相似性^[9],我们根据 NCBI 数据库中麦迪霉素和碳霉素的 3-O-AT^[9,10,11]——mdmB (来自 *S. mycarofaciens*)和 *acyA* (来自 *S. thermotolerans*)——保守序列,设计了简并性上、下游引物两条(引物 1 和 2),以螺旋霉素产生菌(*S. spiramyceticus* F21)总 DNA 为模板进行常规 PCR 扩增,获得一条 878bp 大小的特异性 DNA 条带(见图 2A)。测序后经 Blast 分析表明其与 *mdmB* 和 *acyA* 基因高度相似。在此基础上设计合成外向引物两条(引物 3 和 4),采用 SON-PCR 方法,扩增其上下游两翼序列(图 2B 和 C);为获得更长下游序列,设计了引物 5,同样采用 SON-PCR 方法,扩增下游序列约 1.0kb(图略)。通过克隆、测序、拼接,获得了完整的螺旋霉素 3-O-AT 基因(*sspA*)及其上下游序列,共约 4.3kb。PCR 扩增策略示意图见图 3,完成了其中的 3457bp 测序。

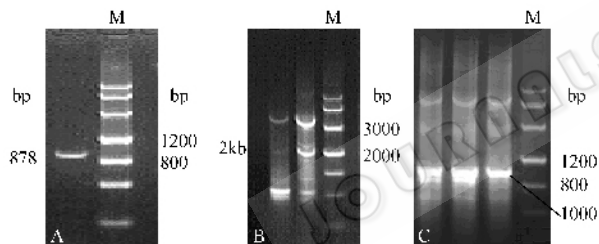


图 2 *sspA* 基因及其侧翼序列 PCR 产物电泳图

Fig. 2 Electrophoresis representation of PCR amplifications of *sspA* gene and its flanking regions

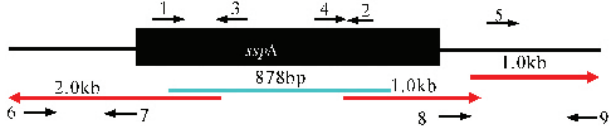


图 3 PCR 扩增 *sspA* 基因(包括侧翼序列)片段引物设计及产物的相对位置示意图

Fig. 3 The relative positions of primers used and the schematic representation of four DNA fragments (colored) obtained by PCR

对 3457nt 的 DNA 序列(GenBank Accession number DQ642742)进行开放阅读框架(ORF)分析(FramePlot 2.3.2),结果显示,其中含有一个完整的 ORF(1594 ~ 2820nt),氨基酸序列保守性结构域(conserved domain)搜索表明其属于乙酰转移酶,Blast 分析表明其与 MdmB (Identity = 80%, $E = 1e^{-167}$)和 *AcyA* (Identity = 66%, $E = 2e^{-143}$)高度同源,说明该

ORF 为编码螺旋霉素的 3-O-AT,即 *sspA* 基因。

2.2 *S. spiramyceticus* F21 中 3-O-AT 基因的删除

采用 DNA 同源双交换技术,对 *S. spiramyceticus* F21 中的 *sspA* 基因进行了删除。

根据上述序列分析结果,设计并合成了两对引物(引物 6 和 7 以及引物 8 和 9)进行常规 PCR 扩增,获得了用于删除 *sspA* 的两个同源双交换片段(左臂 L_1 , 1.0kb;右臂 L_2 , 1.5kb)。 L_1 两端携带 *Xba*I 和 *Hind*III 酶切位点, L_2 两端携带 *Hind*III 和 *Eco*R I 位点。将 L_1 、 L_2 和温敏型 pKC1139 载体根据相应的酶切位点进行连接,获得重组载体 pKCL1-2(构建过程见图 4)。

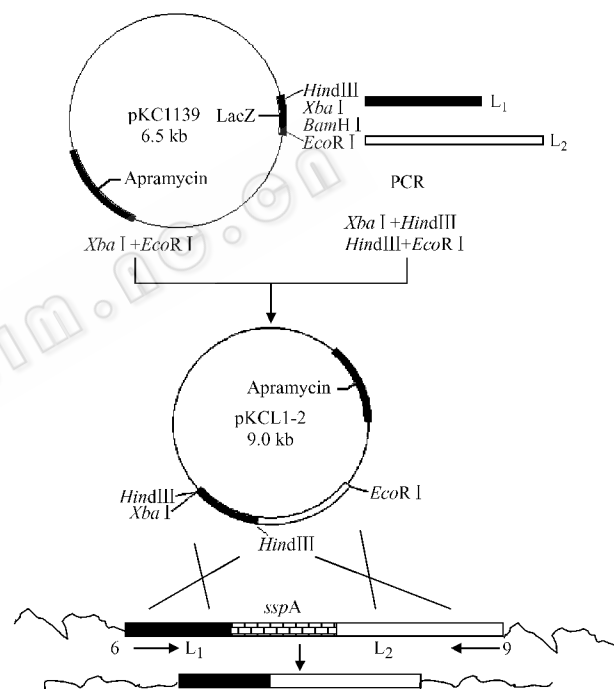


图 4 用于 *sspA* 基因缺失的重组载体 pKCL1-2 构建示意图

Fig. 4 Construction of the recombinant plasmid pKCL1-2 used for the *sspA* deletion in *S. spiramyceticus* F21

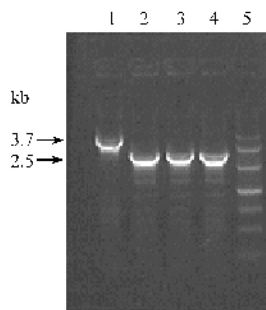


图 5 基因组 PCR 产物电泳以鉴定 *sspA* 缺失菌株

Fig. 5 Electrophoresis of PCR products from genomic DNA to identify *sspA*-deleted mutants

霉素产生菌 *S. spiramyceticus* F21 中,以 Am 抗性作为选择性标记获得转化子;经无抗性平板在 37℃ 条件下培养传代、单菌落分离,获得了 Am 敏感菌株(称为 L3-O-AT Δ)。以变株和原株基因组 DNA 为模板,引物 6 和 9 配对,进行 PCR 扩增和产物的电泳鉴定。由图 5 可见,由于 *S. spiramyceticus* F21 基因组 L₁ 和 L₂ 基因片段发生了双交换,使变株中 3-O-AT 基因缺失,使其基因组扩增片段(约 2.5kb)比原株

(约 3.7kb)小 1.2kb,缺失的大小与 3-O-AT 基因大小相符,表明该菌株的 3-O-AT 基因已被删除,定名为 L3-O-AT Δ 。原株与 L3-O-AT Δ 变株经发酵培养并对其产物提取后,进行 HPLC 检测(结果见图 6),发现二者所产生的螺旋霉素组分比例(以峰高计算)发生显著变化:原株中 SP I、SP II 和 SP III 分别为 7.77%、67.28% 和 24.95%,L3-O-AT 变株中为 71.80%、18.59% 和 9.61%。

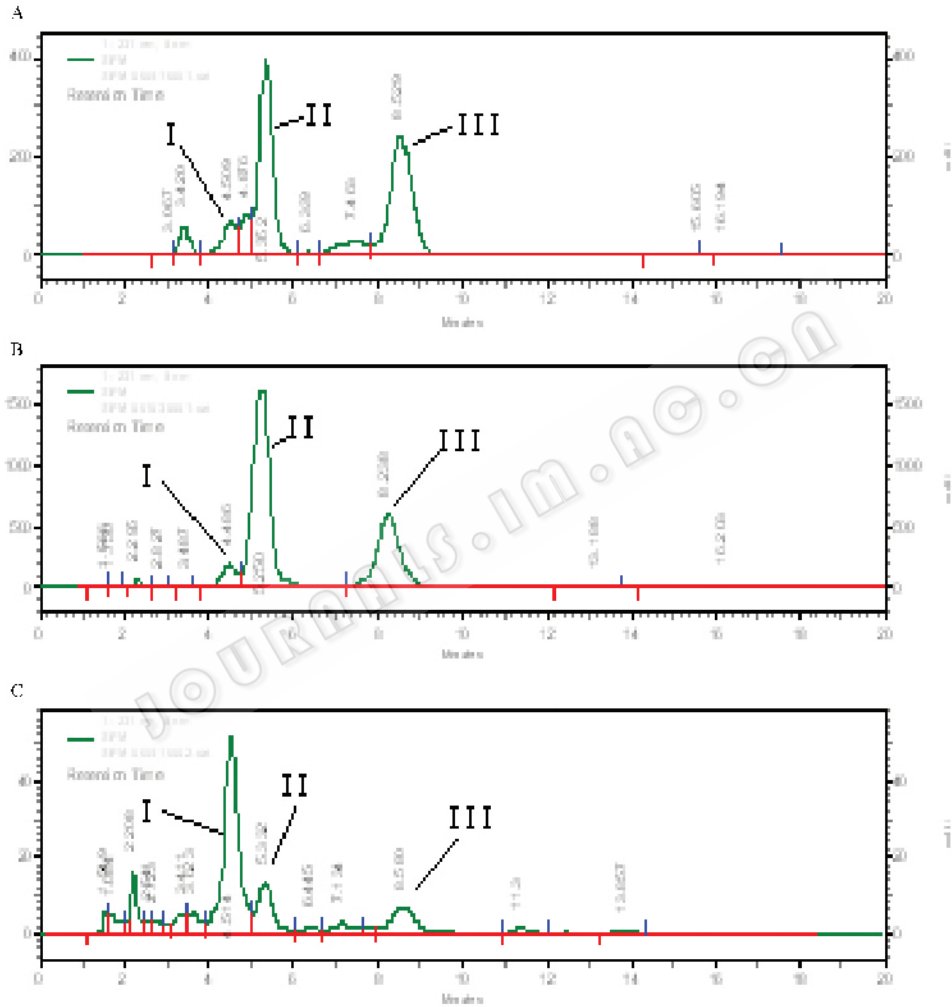


图 6 螺旋霉素标准品(A)螺旋霉素原株(B)和 L3-O-AT Δ (变株(C))发酵产物的 HPLC 检测图(I = SP I; II = SP II; III = SP III)
Fig.6 HPLC analysis of standard spiramycin(A) spiramycin by parent strain(B) and L3-O-AT Δ (C)(I = SP I; II = SP II; III = SP III)

3 讨论

本研究通过基因生物信息学分析,利用功能相似同源基因序列在获得螺旋霉素 3-O-酰基转移酶基因基本序列基础上,采用 SON-PCR 技术获得了其两翼的上、下游序列,进而通过 DNA 同源双交换定向删除 *S. spiramyceticus* F21 基因组中的 3-O-AT 基因,使该菌株从主要产生 SP II 和 SP III 组分转为主要产生 SP I 组分,从分子生物学角度证实了我们所获

得的位于 1594-2820nt 的 ORF(*sspA*)确实为编码螺旋霉素 3-O-酰基转移酶基因。

L3-O-AT Δ 变株的获得为螺旋霉素结构的进一步改造和单一衍生物的研制奠定了基础。所获得的主要产生 SP I 组分的 L3-O-AT Δ 变株,还产生少量的 SP II 和 SP III,推测可能是该菌株内可能存在的其他酰基转移酶非专一性催化所致。

通过 PCR 技术克隆一段已知 DNA 序列的未知侧翼序列,在方法学上正在不断发展与成熟,包括反

向 PCR(inverse PCR, iPCR) 锚定 PCR(anchored PCR) 交错式热不对称 PCR(thermal asymmetric interlaced PCR, TAIL-PCR)^[2]及其多种改良方法(如本研究中的 SON-PCR^[6]等)。本研究采用 SON-PCR 技术,成功地得到了阳性扩增 DNA 片段。链霉菌基因组 DNA 的 GC% 比较高(70%左右),普通 PCR 扩增与 DNA 测序相对比较困难;本研究为 SON-PCR 成功地用于高 GC% DNA 基因组的扩增提供了一个实例。

REFERENCES(参考文献)

- [1] Liu L, Saevels J, Louis P, et al. Interlaboratory study comparing the microbiological potency of spiramycins I, II and III. *J Pharm Biomed Anal*, 1999, **20**(1-2): 217-24.
- [2] Zhao M (赵敏), Fan J (范瑾), Hu XL (胡小玲), et al. Screening and studies on *Micromonospora echinospora* JIM-202, producer of gentamicin C1a. *Chinese J Antibiotics* (中国抗生素杂志), 1997, **22**(1): 12-15.
- [3] Bierman M, Logan R, O'Brien K, et al. Plasmid cloning vectors for the conjugal transfer of DNA from *Escherichia coli* to *Streptomyces* spp. *Gene*, 1992, **116**: 43-49.
- [4] Xu P (徐平), Li WJ (李文均), Xu LH (徐丽华), et al. A microwave-based method for genomic DNA extraction from actinomycetes. *Microbiology* (微生物学通报), 2003, **30**(4): 73-75.
- [5] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: A*

Laboratory Manual, 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999.

- [6] Antal Z, Rasclé C, Fèvre M, et al. Single oligonucleotide nested PCR: a rapid method for the isolation of genes and their flanking regions from expressed sequence tags. *Curr Genet*, 2004, **46**(4): 240-246.
- [7] Shang GD (尚广东), Dai JL (戴剑澹), Wang YG (王以光). Construction of a stable bioengineered strain of biotechnycin. *Chinese J Biotechnology* (生物工程学报), 1999, **15**(2): 171-175.
- [8] Tobias K, Bibb MJ, Mark JB, et al. *Practical Streptomyces Genetics*. Norwich: The John Innes Foundation 2000.
- [9] Osamu Hara, Huchimson CR. A macrolide 3-O-acyltransferase gene from the midecamycin-producing species *Streptomyces mycarofaciens*. *J Bacteriol*, 1992, **174**(15): 5141-5144.
- [10] Arisawa A, Kawamura N, Takeda K, et al. Cloning of the macrolide antibiotic biosynthesis gene *acyA*, which encodes 3-O-acyltransferase, from *Streptomyces thermotolerans* and its use for direct fermentative production of a hybrid macrolide antibiotic. *Appl Environ Microbiol*, 1994, **60**(7): 2657-2660.
- [11] Arisawa A, Tsunekawa H, Okamura K, et al. Nucleotide sequence analysis of the carbomycin biosynthetic genes including the 3-O-acyltransferase gene from *Streptomyces thermotolerans*. *Biosci Biotechnol Biochem*, 1995, **59**(4): 582-588.
- [12] Huang LY (黄留玉). Recent Advances in the Principle, Method and Application of PCR. Beijing: Chemical Engineering Press (化学工业出版社), 2005.

(上接第 617 页)

3.1 篇幅

以 A4 纸 5 号字计算,综述最好在 3 页以内,简报不超过 4 页,研究报告 5~7 页(以上均包括图表)。英文稿请附中文题目及中文摘要。

3.2 图表

文中的图表须清晰简明,文字叙述应避免与图表重复。黑白及彩色图片均须提供原版照片及电子版图片。所有小图的宽度应小于 8cm(占半栏),大图的宽度应小于 17cm(通栏)。图上、表内文字及图表释注一律用英文,图表题应中英对照。

3.3 参考文献及脚注

参考文献按文内引用的先后排序,未公开发表的资料请勿引用。我刊的参考文献需要注明著者(列出 3 人)、文题、刊名、年卷期及页码,全部文献以英文列出。其中中文文献的刊名、人名用括弧列出对照,请严格按下列格式整理文献。关于论文、专著及专利等的引用格式举例如下:

- [1]Wen Y(文莹),Song Y(宋渊),Li J(李季伦), *et al.* The effects of *Vitreoscilla* hemoglobin expression on growth and antibiotic production in *Streptomyces cinnamonensis*. *Chinese Journal of Biotechnology*(生物工程学报),2001,17(1):30-35.
- [2]Sambrook J,Fritsch EF,Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed,New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press,1989.
- [3]Fleming GL,Martin RT. Ger Par. US patent, C08g,139291. 1972-02-07.

脚注(正文首页下方):

Received :May 24 ,2004 ; Accepted :June 18 ,2004.

This work was supported by Grant from...

* Corresponding author. Tel :+ 86- E-mail :

基金项目(中文书写):

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、笼统的词语最好不要,如基因、表达.....

(上接第 633 页)

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。坚持文稿质量为唯一标准,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,可予以提前刊出。

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

(100101) 北京市朝阳区大屯路 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) 64807509

E-mail: cjb@im.ac.cn;

Http://journals.im.ac.cn