

利用 *N*-乙酰葡萄糖胺糖苷酶在乳酸乳球菌 表面展示超氧化物歧化酶

黄新风 李小华 李林*

(华中农业大学农业微生物学国家重点实验室 湖北 武汉 430070)

摘要: 分别将乳酸乳球菌(*Lactococcus lactis*) *N*-乙酰葡萄糖胺糖苷酶基因(*acmA*)的信号肽序列(ss)、C-末端结构域(*cA*)及全长基因, 与来自大肠杆菌(*Escherichia coli*)的超氧化物歧化酶(SOD)基因 *sod* 构建成融合基因 *ss-cA-sod* 和 *acmA-sod*, 并连接于表达载体 pMG36K, 然后导入乳酸乳球菌 ATCC11454 菌株, 获得了能在细胞表面展示 SOD 的重组工程菌 MB193 和 MB194。经 SDS-PAGE 验证, 重组菌 MB193 和 MB194 可分别表达产生分子量约为 46 和 64 kD 的融合酶蛋白 cA-SOD 和 AcmA-SOD。通过黄嘌呤氧化酶法测定 MB193 和 MB194 菌株的全细胞 Mn-SOD 酶活力分别为 (2.63 ± 0.51) U/mL 和 (3.51 ± 0.64) U/mL, 明显高于仅在细胞内表达产生 SOD 的对照重组菌 MB192 的酶活性 (1.53 ± 0.38) U/mL, 且表达融合酶 AcmA-SOD 的重组菌 MB194 具有最大的表面展示效率(56.4%)。

关键词: 细胞表面展示系统, *N*-乙酰葡萄糖胺糖苷酶, 超氧化物歧化酶, 全细胞催化剂

Display of Superoxide Dismutase on the Surface of *Lactococcus lactis* by Use of the *N*-acetylglucosaminidase Anchor

HUANG Xin-Feng LI Xiao-Hua LI Lin*

(State Key Laboratory of Agricultural Microbiology, Huazhong Agricultural University, Wuhan, Hubei 430070, China)

Abstract: In the present study, we utilized a previously characterized *N*-acetylglucosaminidase (AcmA) to develop a whole-cell catalyst of bacterial superoxide dismutase (SOD) in *Lactococcus lactis*. The truncated C-terminal domain (cA) and the full-length AcmA from *L. lactis* wild-type strain MB191, were used as the anchoring motifs to immobilize an *Escherichia coli*-derived SOD onto the surfaces of *L. lactis* ATCC11454 cells. The PCR-amplified *cA* fragment, the signal and the full-length sequences of *acmA*, were fused with *sod* to generate the recombinant *ss-cA-sod* and *acmA-sod*, respectively, followed by ligating into the expression vector pMG36K, yielding the recombinant strain MB193 (harboring the *ss-cA-sod* fusion gene) and MB194 (harboring *acmA-sod*), respectively. SDS-PAGE analysis showed that the substantial expression profile of the fusion enzymes cA-SOD and AcmA-SOD in the recombi-

nant *L. lactis* MB193 and MB194, with the predicted Mr of 46 kD and 64 kD, respectively. The Mn-SOD activities of MB193 and MB194 cells were determined by using the standard xanthinoxidase assay procedure. It showed that MB193 and MB194 exhibited the higher whole-cell Mn-SOD activities [by (2.63 ± 0.51) U/mL and (3.51 ± 0.64) U/mL, respectively, compared to the control strain MB192 by (1.53 ± 0.38) U/mL] that expressing the intracellular SOD. In addition, the recombinant MB194 cells exhibited the higher cell-surface display efficiency (by 56.4%) compared to MB193 cells (by 41.9%).

Keywords: Cell surface display system, *N*-acetylglucosaminidase, Superoxide dismutase, Whole-cell catalyst

乳酸乳球菌(*Lactococcus lactis*)的 *N*-乙酰葡萄糖胺糖苷酶(*N*-acetylglucosaminidase)是一类肽聚糖水解酶, 主要参与该菌的细胞分裂分离和菌体自溶过程^[1-2], 已报道有 AcmA、AcmB、AcmC 和 AcmD 四种^[3], 其中 AcmA 为其主要的胞内自溶素^[2,4]。利用其细胞壁锚定活性, AcmA 类的多种肽聚糖水解酶已被用作锚定模块(Anchoring motif)来构建细胞表面展示系统^[5-8], 受到广泛重视。超氧化物歧化酶(Superoxide dismutase, SOD)是广泛存在于各类生物细胞中的, 能够特异性清除超氧自由基的抗氧化酶, 已分别应用于食品工业中作为添加剂或保健剂, 来改善食品风味和增加食品的保健作用; 在医学上作为延缓衰老、抗炎症和增加自身免疫能力的医药品, 用于高血压、辐射病、骨髓损伤、组织缺血后综合

症和溃疡性结肠炎等多种疾病的治疗; 以及作为化妆品添加剂和用于农业转基因植物中提高植物抗逆性能等方面^[9-11]。在先前的研究中, 我们已证实全长 AcmA 蛋白可作为活性锚定模块而用于在乳酸乳球菌细胞表面展示外源水解酶^[7]。在本研究中, 我们以细菌源 SOD 作为目标蛋白, 通过构建和表达不同组合的融合酶, 对单独 AcmA 的 C-末端锚定结构域(cA)以及全长 AcmA 作为锚定单元的性能进行了比较分析。

1 材料与方法

1.1 细菌菌株、质粒和培养基

1.1.1 菌株和质粒: 本研究所用的菌株与质粒见表 1。

表 1 本研究所用的菌株与质粒
Table 1 Strains and plasmids used in this study

菌株和质粒 Strains and plasmids	特征 Characteristics	来源 Sources
Strains		
<i>L. lactis</i> MB191	Em ^r Kan ^r ; Wild-type strain	[12]
<i>L. lactis</i> ATCC11454	Em ^r Kan ^r ; Wild-type strain	Presented by Prof. Chen SW
<i>L. lactis</i> MB192	Em ^r Kan ^r ; Transformed <i>L. lactis</i> ATCC11454 harboring pMB192	This study
<i>L. lactis</i> MB193	Em ^r Kan ^r ; Transformed <i>L. lactis</i> ATCC11454 harboring pMB193	This study
<i>L. lactis</i> MB194	Em ^r Kan ^r ; Transformed <i>L. lactis</i> ATCC11454 harboring pMB194	This study
<i>E. coli</i> DH5α	<i>supE44</i> Δ <i>lacU169</i> (Φ80 <i>lacZ</i> Δ <i>M15</i>) <i>hdsR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1</i>	Lab collection
<i>E. coli</i> K-12	<i>supE44</i> Δ <i>lacU169</i> (Φ80 <i>lacZ</i> Δ <i>M15</i>) <i>hdsR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1</i>	Lab collection
Plasmids		
pMD18-T	Amp ^r ; <i>E. coli</i> TA cloning vector	TaKaRa
pMG36k	Kan ^r Em ^r ; <i>E. coli</i> - <i>L. lactis</i> shuttle expressing vector, 5.1 kb	[7]
pMB137	Kan ^r Em ^r ; pMG36k derivative harboring the <i>acmA-gfp</i> fusion gene, 7.1 kb	[7]
pMB192	Kan ^r Em ^r ; pMG36k derivative harboring the <i>sod</i> gene, 5.7 kb	This study
pMB193	Kan ^r Em ^r ; pMG36k derivative harboring <i>cA-sod</i> fusion gene, 6.5 kb	This study
pMB194	Kan ^r Em ^r ; pMG36k derivative harboring <i>acmA-sod</i> fusion gene, 7.0 kb	This study

1.1.2 培养基:用于培养乳酸乳球菌、大肠杆菌和筛选其转化子的培养基均参照文献[7]。

1.2 方法

1.2.1 引物设计, *acmA* 和 *sod* 基因的扩增:用于从质粒 pMB137 中扩增 *acmA* 的上游引物(AcmA-F₂)为: 5'-GATCGAGCTCGAAATGGCAGTTTCTCGTATT-3'; 下游引物(AA₂)为: 5'-TAAGATCTAATACGAAGATATTGACC-3'。PCR 反应(I)程序为 94°C 5 min; 94°C 30 s, 55°C 30 s, 72°C 90 s, 30 个循环。以 pMB137 质粒 DNA 作模板。用于扩增 *acmA* 的信号肽序列的引物为 AcmA-F₂ (上游引物)和 SOE₁ (下游引物): 5'-CCAGCAGAAGAAGCACCAGCCTGAACCATTTGGGCTTGTT-3', PCR 反应(II)程序为 94°C 5 min; 94°C 30 s, 55°C 30 s, 72°C 30 s, 30 个循环。以 pMB137 质粒 DNA 作模板。用于扩增 *acmA* 的 C-末端细胞壁结合结构域序列的引物为 SOE₂ (上游引物): 5'-GCCCAATGGTTCAGGCTGGTGCTTCTTCTGCTGGTACTT-3'和 AA₂ (下游引物), PCR 反应(III)程序为 94°C 5 min; 94°C 30 s, 55°C 30 s, 72°C 60 s, 30 个循环。以 pMB137 质粒 DNA 作模板。用于连接 *acmA* 基因的信号肽序列和细胞壁结合结构域序列的 *cA* 融合基因的 PCR-SOE (Splicing by overlap extension)反应程序为 94°C 5 min; 94°C 30 s, 55°C 30 s, 72°C 60 s, 30 个循环。采用反应(II)和反应(III)的扩增产物作为模板, 按照标准方法进行^[13]。另根据 GenBank 数据库中大肠杆菌 *Mn-sodA* 基因序列 (GenBank 序列号为 NC_000913)设计上游引物 SOD-U: 5'-ATTAGATCTATGAATATGAGCTATACCTG-3'和下游引物 SOD-D: 5'-ACTCTGCAGTTATTTTTTCGCCGCAAACGTGC-3', 用于从大肠杆菌 K-12 菌株中扩增超氧化物歧化酶编码基因 *sod*, 其 PCR 反应程序(IV)为: 94°C 5 min; 94°C 30 s, 60°C 30 s, 72°C 40 s, 30 个循环。PCR 扩增产物经纯化回收后连接于 pMD-18T, 由北京三博远志生物技术有限公司进行双向测序。

1.2.2 DNA 操作:细菌总 DNA 和质粒 DNA 的小量制备、DNA 酶切、电泳、连接和大肠杆菌常规转化等均按分子克隆标准方法进行^[13]。DNA 凝胶电泳产物纯化回收均按试剂盒(北京博大泰克生物基因技术有限公司)描述的方法进行。乳酸乳球菌的电转化使用 GenePulser™ 电转化仪(Bio-Rad), 参照文

献[14]的方法进行。

1.2.3 SDS-PAGE 分析:取 1 mL 过夜培养物于 4°C、13000 r/min 离心 5 min, 然后将菌体悬浮于 Laemmli 缓冲液[20 mmol/L Tris-HCl (pH 6.8), 2% β-巯基乙醇, 1 mmol/L EDTA, 1% SDS]并置沸水中 5 min。冷却后离心, 取上清液进行 SDS-PAGE。凝胶浓度为 10%。

1.2.4 重组菌株 Mn-SOD 酶活测定:通过黄嘌呤氧化酶法按照反应试剂盒(南京建成生物工程研究所)描述的方法进行。通过黄嘌呤及黄嘌呤氧化酶反应系统产生超氧阴离子自由基, 后者氧化羟胺形成亚硝酸盐, 在显色剂的作用下呈现紫红色。由于 SOD 对超氧阴离子自由基有专一性的抑制作用, 使形成的亚硝酸盐减少, 从而可通过测定吸光度的变化来测定 Mn-SOD 的活性。全细胞表面展示 SOD 活力单位定义为每毫升($OD_{600} = 1$)细菌悬浮液在 SOD 反应液中 SOD 抑制率达 50%时反应的 SOD 量为一个活力单位(U/mL)。其计算公式为: 总 Mn-SOD 活力(U/mL) = [(对照管吸光度 - 测定管吸光度)/对照管吸光度] / 50% × 反应体系的稀释倍数 × 样本测试前的稀释倍数。样品管与测定管均测 6 份, 取平均值并用 SPSS 软件(V13.0)进行误差分析。另根据公式: 细胞表面展示酶活效率% = [(表面展示重组菌的全细胞 Mn-SOD 酶活 - 表达细胞内 SOD 的重组菌的全细胞 Mn-SOD 酶活) / 表面展示重组菌全细胞 Mn-SOD 酶活] × 100%, 来计算重组细菌细胞表面展示 Mn-SOD 酶活的效率。

2 结果与分析

2.1 *acmA* 截短融合基因的扩增与序列分析

对先前从乳酸乳球菌 MB191 菌株中所克隆的 *acmA* 基因^[7]的编码蛋白, 利用 NCBI 数据库在线工具 CDART 进行了分析, 发现该 AcmA 蛋白在一级结构上可明显分为 1 个 N-末端结构域和 1 个 C-末端结构域(图 1A)。同时, 在其 C-末端结构域中存在 3 个 LysM (Lysin motif)重复序列, 分别由 41、44 和 42 个氨基酸残基组成。进一步对 AcmA 的二级结构用在线工具“PSIPRED” (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>)进行了分析, 发现其 C-末端的 3 个 LysM 结构模块均具有特征性的“βααβ”型结构(图 1B), 每一

“ $\beta\alpha\alpha\beta$ ”结构之间的间隔序列中富含亲水性的丝氨酸残基, 这 3 个 LysM 模块是一种存在于较多细胞壁结合蛋白中的、主要与细胞壁肽聚糖中的 *N*-乙酰葡萄糖胺发生结合的特异性功能结构域^[15]。此外, 经信号肽预测工具 SignalIP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalIP>)分析, 在 AcmA 的 N-末端结构域中含有 1 个由 57 个氨基酸残基组成的信号肽序列(图 1A)。这些分析结果表明, AcmA 蛋白的 C-末端结构域是一种该蛋白与细胞壁相结合的锚定结构域, 具有用作细胞表面展示系统的运载蛋白的

潜能。

根据 *acmA* 测序的序列和上述分析结果, 用引物对 AcmA-F₂/AA₂ 从质粒 pMB137 (携带全长 *acmA* 基因)中扩增得到不含终止子序列的全长 *acmA* 基因, 另设计和使用引物对 AcmA-F₂/SOE₁、SOE₂/AA₂ 从 pMB137 分别扩增得到该基因的信号肽序列 *ss* 和 C-末端结构域编码序列 *cA*, 再通过 SOE 方法拼接得到 849 bp 的 *ss-cA* 融合基因。经测序分析, 全长 *acmA* 基因(无终止子)和融合基因 *ss-cA* 均与预期序列完全一致。

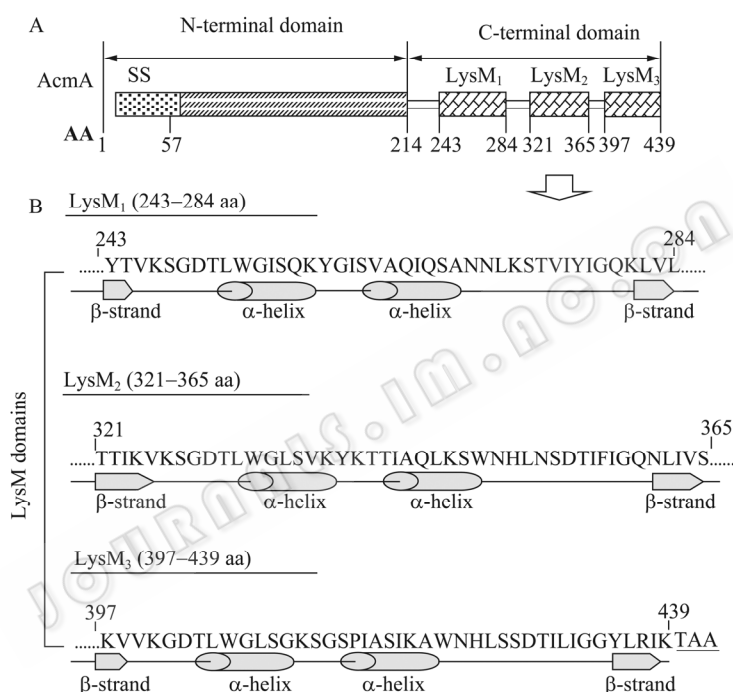


图1 乳酸乳球菌AcmA蛋白质结构示意图与C-末端LysM结构域的二级结构

Fig. 1 Schematic map of *L. lactis* AcmA and the predicted secondary structure of LysMs among its C-terminal domain

Note: A: General map of AcmA; B: The predicted secondary structure of LysM₁, LysM₂ and LysM₃. aa: Amino acid; LysM: Lysin motif; SS: Signal sequence.

2.2 *sod* 基因的扩增与携带融合基因重组质粒的构建

以大肠杆菌 K-12 菌株总 DNA 为模板, 用引物对 SOD-U/SOD-D 扩增得到 1 条大小约 630 bp 的条带。将纯化的 PCR 产物连接到 pMD18-T 载体后进行双向测序, 结果扩增产物序列与 GenBank 数据库中的 *E. coli* K-12 substr. MG1655 基因组 DNA (GenBank 登录号为 NC_000913) 序列中 *sod* 的基因序列完全一致, 从而证实所扩增的产物为 *sod* 基因。用 *Bgl* II/*Sph* I 双酶切扩增产物, 并将其连接于经相

同酶切的乳酸乳球菌表达载体 pMG36K, 筛选得到重组质粒 pMB192。另将融合基因 *ss-cA* 和全长 *acmA* 基因(不含终止子序列)用 *Sac* I/*Bgl* II 双酶切, 再分别连接至经同样酶切的重组质粒 pMB192, 分别得到重组质粒 pMB193 (携带“*ss-cA-sod*”融合基因)和 pMB194 (携带“*acmA-sod*”融合基因), 其质粒构建过程见图 2。将重组质粒 pMB192、pMB193 和 pMB194 分别电转化乳酸乳球菌野生菌株 ATCC11454, 分别筛选得到重组菌株 MB192、MB193 和 MB194。

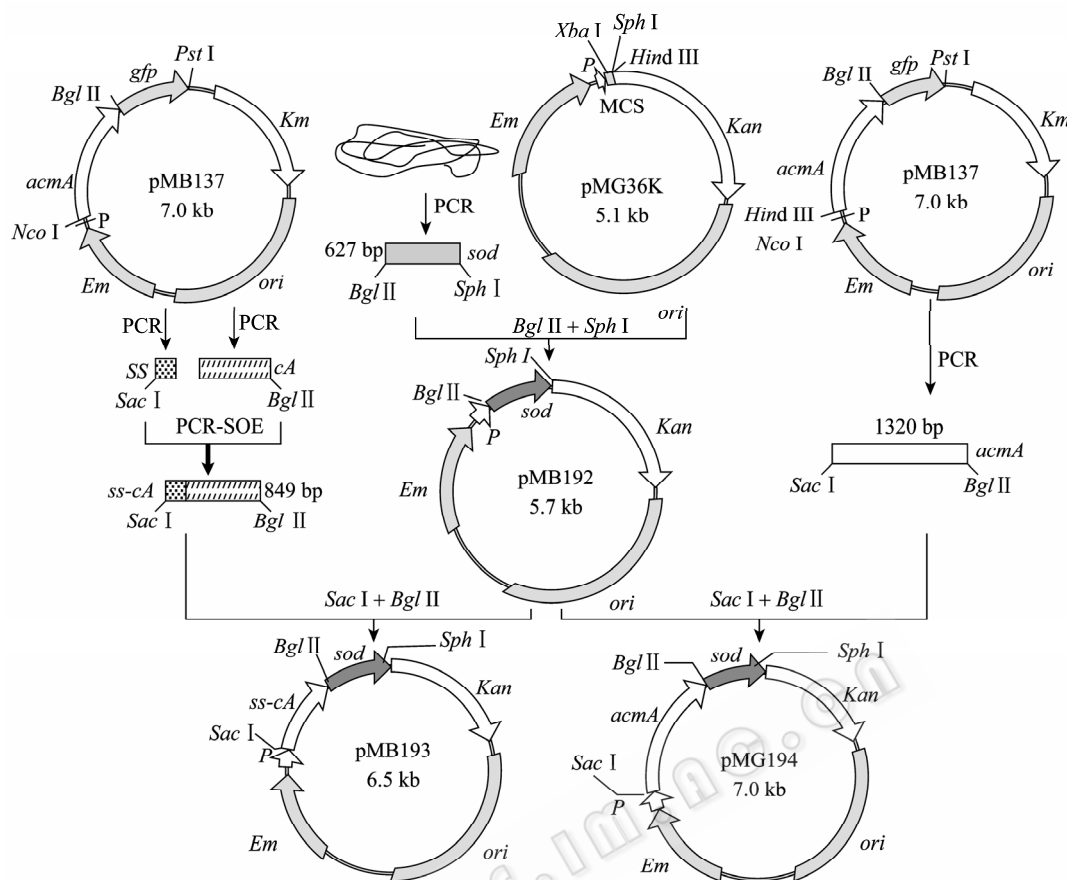


图2 重组质粒 pMB192、pMB193 和 pMB194 构建流程图

Fig. 2 Construction of the recombinant plasmid pMB192 harboring *sod* gene, pMB193 harboring *ss-cA-sod* fusion gene and pMB194 harboring *acmA-sod* fusion gene

对重组菌 MB192、MB193 和 MB194 表达外源蛋白的活性用 SDS-PAGE 进行了测定。通过在线分析工具 Compute pI/Mw tool (http://www.expasy.org/tools/pi_tool.html) 预测得到 SOD、cA-SOD 和 AcmA-SOD 的理论 MW 分别为 23.3、46.4 和 63.5 kD。SDS-PAGE 图谱显示(图 3), 除 MB192 所表达合成的单一 SOD 蛋白具有较为明显的预期条带外, 由 MB193 所表达合成的融合蛋白 cA-SOD 和由 MB194 所表达合成的融合蛋白 AcmA-SOD 谱带均不明显, 且为其他胞内蛋白谱带所屏蔽, 反映出这 2 种融合蛋白在乳酸乳球菌 ATCC11454 细胞中的表达水平均较低。

2.3 表面展示 SOD 重组菌株的全细胞 Mn-SOD 酶活性的测定

采用黄嘌呤氧化酶法对重组菌株 MB192、MB193 和 MB194 的全细胞 Mn-SOD 酶活性进行了测定(图 4)。结果表明, 野生型菌株 ATCC11454 几

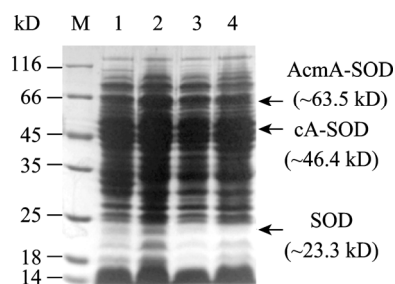


图3 重组菌株 MB192、MB193 和 MB194 表达外源蛋白的 SDS-PAGE 分析

Fig. 3 SDS-PAGE analysis of expressed heterologous proteins by the recombinant strain MB192, MB193 and MB194
Note: M: protein MW marker; 1: *L. lactis* ATCC11454 (Control); 2: MB192; 3: MB193; 4: MB194.

乎未检测出全细胞 Mn-SOD 酶活, 表面展示 SOD 的重组菌 MB193 和 MB194 的全细胞 Mn-SOD 酶活分别是仅在细胞内合成 SOD 的 MB192 菌株 Mn-SOD 酶活的 1.7 倍和 2.3 倍, 而以全长 AcmA 作为运载和锚定单元的 MB194 菌株的全细胞 Mn-SOD 酶活是

以 C-末端结构域(cA)作为运载和锚定单元的 MB193 菌株全细胞 Mn-SOD 酶活的 1.3 倍, 但 3 个重组菌株的全细胞 Mn-SOD 酶活性均处于较低的水平。另计算得到 MB193 菌株和 MB194 菌株表面展示 Mn-SOD 酶活的效率分别为 41.9%和 56.4%。

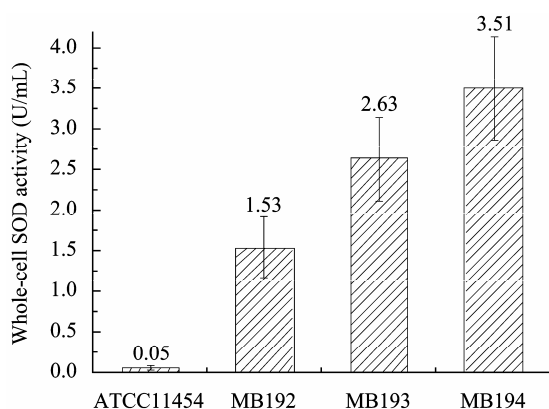


图4 乳酸乳球菌菌株的全细胞 Mn-SOD 酶活测定结果
Fig. 4 Determined whole-cell Mn-SOD enzymatic activity of *L. lactis* wild-type strain ATCC11454 and the recombinant strain MB192, MB193 and MB194

3 讨论

细菌细胞表面展示(Bacterial cell surface display)是指通过遗传操作手段将外源靶蛋白表达并定位于细菌受体菌表面的一项蛋白质应用技术, 已成功用于蛋白质与多肽文库筛选、活体疫苗开发、抗体合成、全细胞解毒剂、催化剂和吸附剂等多个生物技术领域^[16]。细胞表面展示体系通常由运载蛋白(Carrier protein)、靶蛋白和受体菌三者组成, 其中运载蛋白与靶蛋白以融合蛋白的方式交联于受体菌细胞的表面, 因此运载蛋白的性能直接影响着展示系统的效率。运载蛋白的功能是将靶蛋白引导并锚定于细胞表面特定部位, 因此一般应具有以下特性: (1) 在结构上具有锚定单元, 使靶蛋白能固定在细胞表面; (2) 一般具有信号肽或转运信号, 藉此引导表达的融合蛋白穿越细胞质膜; (3) 与外源蛋白融合后其本身的锚定特性不发生改变; (4) 展示的靶蛋白不易被胞内蛋白酶降解等^[17]。乳酸乳球菌是已知的对人体及动物无致病性和无定殖力的、在食品和医药医疗领域具有重要应用价值的食品级微生物。由于该菌具有突出的安全性能, 使其成为各种疫苗的良好运载工具。在前一研究中, 我们已证实

来自乳酸乳球菌的全长 AcmA 能作为有活性的运载蛋白, 将外源蛋白定位于细胞表面^[7]。鉴于运载蛋白分子大小必定对整个融合蛋白的分泌和锚定活性产生影响, 本研究进一步研究了仅保留 C-末端结构域的截短 AcmA 作为运载蛋白展示外源蛋白的可行性和展示效率, 结果表明, 虽然截短 AcmA 可作为功能性的细胞表面展示系统的运载蛋白, 但展示效率低于全长 AcmA。这一结果说明虽然 AcmA 的 N-末端结构域为该酶的催化结构域, 但仍可能在酶蛋白的分泌、或者在引导酶蛋白向细胞壁分子进行锚定等方面具有一定的辅助活性, 甚至可能直接参与细胞壁的锚定过程。进一步对 AcmA 的 N-端结构域的一级结构进行分析时发现, 该结构域中含有较多的亲水氨基酸。在总共 157 个氨基酸的 N-末端中, 共发现有 14 个 Ser 和 13 个 Thr, 分别占 8.9%和 8.3%, 另外还含有 4 个 Asp。在丁香假单胞菌(*Pseudomonas syringae*)中, 其冰晶核蛋白(Ice nucleation protein, INP)的细胞壁锚定机制已被深入研究, 发现其是通过亲水性氨基酸残基(Ser, Thr)与糖基之间的 O-glycan 连接方式, 以及通过 Asp 残基与细胞壁上的糖基磷脂酰肌醇之间的 N-glycan 连接, 来使其固着在外膜的糖基上^[18]。推测这样的连接方式或许也存在于乳酸乳球菌 AcmA 蛋白与该菌细胞壁的联接中。

本研究构建的重组菌仅表现较低的全细胞 SOD 活性, 其原因可能有: (1) 表达载体的启动子活性低, 导致 SOD 及其融合酶在细胞内的低水平表达; (2) 胞内所表达的外源蛋白被部分降解; (3) 对于表面展示重组菌来说, 融合蛋白形式的 SOD 酶活性受到一定程度的影响等。另外, 本研究所构建的工程菌还携带有抗生素抗性基因。对这些方面存在的问题, 我们正在开展诸如使用强启动子表达载体、构建串联重复的锚定单元以期增加运载和锚定性能、使用缺陷型受体菌以及利用无抗性筛选途径筛选重组菌株等方面的工作来加以改进。

参考文献

- [1] Buist G, Karsens H, Nauta A, *et al.* Autolysis of *Lactococcus lactis* caused by induced overproduction of its major autolysin, AcmA. *Appl Environ Microbiol*, 1997, 63(7): 2722-2728.
- [2] Buist G, Kok J, Leenhouts KJ, *et al.* Molecular cloning

- and nucleotide sequence of the gene encoding the major peptidoglycan hydrolase of *Lactococcus lactis*, a muremidase needed for cell separation. *J Bacteriol*, 1995, **177**(6): 1554–1563.
- [3] Huard C, Miranda G, Redko Y, *et al.* Analysis of the peptidoglycan hydrolase complement of *Lactococcus lactis*: identification of a third *N*-acetylglucosaminidase, AcmC. *Appl Environ Microbiol*, 2004, **70**(6): 3493–3499.
- [4] Steen A, Buist G, Horsburgh GJ, *et al.* AcmA of *Lactococcus lactis* is an *N*-acetylglucosaminidase with an optimal number of LysM domains for proper functioning. *FEBS J*, 2005, **272**(11): 2854–2868.
- [5] Raha AR, Varma NR, Yusoff K, *et al.* Cell surface display system for *Lactococcus lactis*: a novel development for oral vaccine. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2005, **68**(1): 75–81.
- [6] Okano K, Zhang Q, Kimura S, *et al.* System using tandem repeats of the cA peptidoglycan-binding domain from *Lactococcus lactis* for display of both N- and C-terminal fusions on cell surfaces of lactic acid bacteria. *Appl Environ Microbiol*, 2008, **74**(4): 1117–1123.
- [7] 李小华, 黄新风, 邵小虎, 等. 利用乳酸乳球菌 AcmA 表面展示 β -1,3-1,4-葡聚糖酶. 生物工程学报, 2009, **25**(1): 89–94.
- [8] Shao X, Jiang M, Yu Z, *et al.* Surface display of heterologous proteins in *Bacillus thuringiensis* using a peptidoglycan hydrolase anchor. *Microbial Cell Factories*, 2009, **8**(1): 48.
- [9] Valdivia A, Pérez-Alvarez S, Aroca-Aguilar JD, *et al.* Superoxide dismutases: a physiopharmacological update. *J Physiol Biochem*, 2009, **65**(2): 195–208.
- [10] Johnson F, Giulivi C. Superoxide dismutases and their impact upon human health. *Mol Aspects Med*, 2005, **26**(4/5): 340–352.
- [11] 林庆斌, 廖升荣, 熊亚红, 等. 超氧化物歧化酶(SOD)的研究和应用进展. 化学世界, 2006(6): 378–381.
- [12] 黄新风, 江梦天, 邵小虎, 等. 一株抗G⁻菌和酵母菌的乳酸乳球菌的分离鉴定与抗菌活性. 微生物学通报, 2009, **36**(9): 1356–1362.
- [13] Sambrook J, Russell DW. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- [14] Papagianni M, Avramidis N, Filioussis G. High efficiency electrotransformation of *Lactococcus lactis* spp. *lactis* cells pretreated with lithium acetate and dithiothreitol. *BMC Biotechnol*, 2007(7): 15.
- [15] Buist G, Steen A, Kok J, *et al.* LysM, a widely distributed protein motif for binding to (peptido) glycans. *Mol Microbiol*, 2008, **68**(4): 838–847.
- [16] Lee SY, Choi JH, Xu Z. Microbial cell-surface display. *Trends Biotechnol*, 2003, **21**(1): 45–52.
- [17] 邵小虎, 李林. 细菌运载蛋白及在表面展示技术中的应用进展. 生物技术通讯, 2008, **19**(6): 911–915.
- [18] Kozloff LM, Turner MA, Arellano F. Formation of bacterial membrane ice-nucleating lipoglycoprotein complexes. *J Bacteriol*, 1991, **173**(20): 6528–6536.

征订启事

欢迎订阅《微生物学通报》

《微生物学通报》创刊于 1974 年, 是中国微生物学会和中国科学院微生物研究所主办, 国内外公开发行, 以微生物学应用基础研究及技术创新与应用为主的综合性学术期刊。刊登内容包括: 基础微生物学研究; 农业微生物学研究; 工业微生物学研究; 医学微生物学研究; 食品微生物学研究; 环境微生物学研究; 微生物功能基因组研究; 微生物蛋白质学研究; 微生物模式菌株研究; 微生物工程与药物研究; 微生物技术成果产业化及微生物教学研究改革等。

本刊为中国生物科学类核心期刊。曾获国家级优秀科技期刊三等奖, 中国科学院优秀科技期刊三等奖, 北京优秀科技期刊奖, 2000 年再获中国科学院优秀期刊三等奖, 2001 年被选入新闻出版署设立的“中国期刊方阵”并被列为“双效”期刊。

自 2008 年本刊已经全新改版, 由双月刊改为月刊, 更换了彩色封面, 纸张改用铜版纸, 由原来的小 16 开本改为标准大 16 开本(210×297), 发表周期缩短, 内容更加丰富详实。欢迎广大读者到邮局订阅或直接与本刊编辑部联系购买, 2010 年的每册定价为 48 元, 全年 576 元, 我们将按期免费邮寄。

另, 本刊编辑部现存有少量过期期刊, 如有需要者可直接与编辑部联系, 款到即免费寄上。(请事先与编辑部联系, 获悉每册售价。敬请在汇款单上注明所购刊物的年代、卷、期和数量)

邮购地址: (100101)北京朝阳区北辰西路 1 号院 3 号中国科学院微生物研究所《微生物学通报》编辑部

Tel: 010-64807511; E-mail: tongbao@im.ac.cn; bjb@im.ac.cn; http://journals.im.ac.cn

国内邮发代号: 2-817; 国外发行代号: BM413