

# 火球菌 8-氧鸟嘌呤 DNA 糖苷酶基因克隆、表达纯化和酶学性质研究

周欢 杨敏 陈亚星 刘亚辉 孙丽华 徐春艳 郁峰 何建华\*

(中国科学院上海应用物理研究所 上海 201204)

**摘要:**【目的】在大肠杆菌中表达火球菌 8-氧鸟嘌呤 DNA 糖苷酶, 纯化得到重组火球菌 8-氧鸟嘌呤 DNA 糖苷酶, 在此基础上系统研究火球菌 8-氧鸟嘌呤 DNA 糖苷酶的酶学特征。【方法】构建 8-氧鸟嘌呤 DNA 糖苷酶重组表达质粒, 将重组质粒转化 *Escherichia coli* Rosetta (DE3), 利用 IPTG 诱导表达重组蛋白, 通过  $\text{Ni}^{2+}$  亲和层析柱纯化重组蛋白; 最后利用含 8-氧鸟嘌呤损伤的寡核苷酸作为底物, 测定 8-氧鸟嘌呤 DNA 糖苷酶的酶学性质。【结果】在大肠杆菌中成功诱导表达了重组火球菌 8-氧鸟嘌呤 DNA 糖苷酶, 经  $\text{Ni}^{2+}$  亲和纯化后蛋白纯度大于 95%。在体外鉴定了重组火球菌 8-氧鸟嘌呤 DNA 糖苷酶的酶学性质。结果表明重组火球菌 8-氧鸟嘌呤 DNA 糖苷酶可以切除 DNA 中的 8-氧鸟嘌呤(8-Oxo-G, GO)损伤碱基, 并且具有 AP 裂解酶活性。重组火球菌 8-氧鸟嘌呤 DNA 糖苷酶催化反应的最适 pH 值和温度分别是 pH 8.5 和 55 °C。除  $\text{Zn}^{2+}$  对火球菌 8-氧鸟嘌呤 DNA 糖苷酶的酶促反应有明显的抑制作用外, 实验中测定的其它二价离子( $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ )对其没有明显的影响。离子强度在 50–100 mmol/L 范围内对其酶促反应影响不大, 超过 100 mmol/L 时有明显的抑制作用。与 8-氧鸟嘌呤互补的碱基差异对火球菌 8-氧鸟嘌呤 DNA 糖苷酶切除 8-氧鸟嘌呤损伤的效率影响不大; 但与单链 DNA 相比, 双链 DNA 是优选底物, 切割效率如下:  $\text{GO/C} \approx \text{GO/G} \approx \text{GO/T} \approx \text{GO/A} > \text{GO/-}$ 。【结论】在大肠杆菌中成功表达, 并  $\text{Ni}^{2+}$  亲和纯化了火球菌 8-氧鸟嘌呤 DNA 糖苷酶, 生化研究表明制备的重组蛋白具有 8-氧鸟嘌呤 DNA 糖苷酶活性, 可能负责切除火球菌基因组 DNA 中的 8-氧鸟嘌呤损伤。

**关键词:** 火球菌, 8-氧鸟嘌呤 DNA 糖苷酶, 碱基切除修复

## Cloning expression and biochemical characterizations of 8-oxoguanine DNA glycosylase from *Pyrococcus furiosus*

ZHOU Huan YANG Min CHEN Ya-Xing LIU Ya-Hui SUN Li-Hua XU Chun-Yan  
YU Feng HE Jian-Hua\*

(Shanghai Institute of Applied Physics, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 201204, China)

**Abstract: [Objective]** Express and purify the *Pyrococcus furiosus* (*P. furiosus*) 8-oxoguanine DNA

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金项目(No. 31100528)

\*通讯作者: Tel: 86-21-33933186; 信箱: hejh@sinap.ac.cn

收稿日期: 2013-01-20; 接受日期: 2013-03-18; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2013-10-11

glycosylase; characterize the enzymatic properties of the recombinant *P. furiosus* 8-oxoguanine DNA glycosylase. **[Methods]** First, *pfogg* gene was cloned into an expression vector. Second, the expression of the recombinant protein was induced in *Escherichia coli* Rosetta (DE3) by IPTG. Third, the recombinant protein was purified through  $\text{Ni}^{2+}$  affinity chromatography. Finally, the enzymatic reaction of PfOgg was biochemically characterized using different oligonucleotides as substrates. **[Results]** The recombinant *P. furiosus* 8-oxoguanine DNA glycosylase was successfully expressed in *E. coli* and the purity was up to 95%. The enzymatic characterizations of recombinant *P. furiosus* 8-oxoguanine DNA glycosylase were assayed *in vitro*. The results showed that (1) the recombinant *P. furiosus* 8-oxoguanine DNA glycosylase could efficiently remove the 8-oxoguanine damage from both single-stranded and double-stranded DNA and the excision efficiency of 8-oxoguanine from various DNA substrates was the following order:  $\text{GO/C} \approx \text{GO/G} \approx \text{GO/T} \approx \text{GO/A} > \text{GO/-}$ ; (2) the optimal pH value and temperature for the reaction were pH 8.5 and 55 °C, respectively; (3)  $\text{Zn}^{2+}$  clearly inhibited the removal of 8-oxo-G by PfOgg, and the other divalent ions, such as  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$  and  $\text{Cu}^{2+}$  had no significant effect on the enzymatic reaction; (4) the removal of 8-oxo-G was highly efficient with the ionic strength ranging from 50 to 100 mmol/L, but was clearly inhibited by higher ionic strength (above 100 mmol/L). (5) the PfOgg is highly heat-resistant, with a half life-time of 5 min at 100 °C. **[Conclusion]** *P. furiosus* 8-oxoguanine DNA glycosylase was successfully expressed in *E. coli*, and had the typical enzymatic activities of removing the 8-oxoguanine damaged base from single-stranded and double-stranded DNA.

**Keywords:** *Pyrococcus furiosus*, 8-Oxoguanine DNA glycosylase, Base excision repair

在生物体内正常的有氧代谢和氧化应激反应都会产生活性氧自由基(Ractive oxygen species, ROS)以及其他一些高反应活性的代谢产物, ROS会造成 DNA 的碱基氧化损伤, 在 4 种碱基中, 鸟嘌呤和胸腺嘧啶最容易被氧化形成 8-氧鸟嘌呤(8-Oxoguanine, GO)和胸腺嘧啶乙二醇(Thymidine glycol, Tg)<sup>[1]</sup>。GO 的顺式构象能与胞嘧啶形成正常的 Watson-Crick 碱基配对, 但当 GO 处于反式构象时, 它能与腺嘌呤形成稳定的 Hoogsteen 碱基配对, 从而会导致在下一轮复制中产生 G:C→T:A 碱基颠换突变<sup>[2-4]</sup>。氧化产生的 GO 主要由碱基切除修复途径修复, 修复过程由甲酰嘧啶 DNA 糖苷酶(Formamidopyrimidine-DNA glycosylase, Fpg)或者 8-氧鸟嘌呤 DNA 糖苷酶(8-Oxoguanine DNA glycosylase, Ogg)引发, Fpg 主要作用于细菌中的 GO 修复, 而 Ogg 则主要在真核生物和古生菌中切除 GO<sup>[5-6]</sup>。Fpg 或 Ogg 切除 GO 后, 形成无碱基的脱氧核糖磷酸(俗称 AP site), Fpg 或 Ogg 的 AP 裂解酶(AP lyase)活性进一步断裂 AP 位点上的糖环, 最终形成 3'与 5'带磷酸基团的单链 DNA 缺口。

AP 内切核酸酶(AP endonuclease)负责移除 3'磷酸基团, 形成 3'OH, 为 DNA 聚合反应提供有效引物; 然后 DNA 聚合酶、DNA 连接酶、Flap 内切核酸酶等分别负责合成新的 DNA、连接 DNA 缺口等, 共同完成整个修复反应。

近年来, 随着基因组测序的迅猛发展, 已经测序完成了大量生物体的全基因组序列。第一个完成全基因组测序的古细菌是詹氏甲烷球菌(*Methanocaldococcus jannaschii*), 通过检测它的基因组发现一个编码 Ogg 基因的开放阅读框(Open reading frame, ORF)<sup>[7-8]</sup>。随后在其他古生菌中也发现了相应的 Ogg, 比如硫磺矿硫化叶菌(*Sulfolobus solfataricus*)和闪烁古生球菌(*Archeoglobus fulgidus*)<sup>[9-10]</sup>。

激烈火球菌(*Pyrococcus furiosus*)是 1986 年在意大利武尔卡诺海滩发现的一类极端嗜热古生菌, 它的生长温度介于 70–103 °C 之间, 最适生长温度为 100 °C<sup>[11]</sup>。我们在激烈火球菌的全基因组中确定了一个编码 242 个氨基酸蛋白的基因, 该基因编码的蛋白是 Ogg 的同源物。本研究将该基因在大

肠杆菌中成功表达,同时测定了表达蛋白的酶学特征,确定其具有 8-氧鸟嘌呤 DNA 糖苷酶活性。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒: 大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5 $\alpha$ 、Rosetta (DE3)菌株购自 Novagen, 表达载体 pDEST17 购自 Invitrogen。

1.1.2 主要试剂: 质粒小提试剂盒购自天根生物科技有限公司; HisTrap<sup>TM</sup> HP 亲和层析柱购自 GE 公司, 其它生化试剂购自上海生工生物工程公司。

1.2 火球菌 8-氧鸟嘌呤 DNA 糖苷酶的诱导表达  
PfOgg 重组表达载体构建基于参考文献[12]。将 PfOgg 重组表达质粒转化 *E. coli* Rosetta(DE3)感受态细胞, 涂布在含有 100 mg/L 氨苄青霉素的固体 LB 培养基平板, 于 37  $^{\circ}$ C 培养 12–16 h 挑取单菌落接种到 4 mL 含有 100 mg/L 氨苄青霉素的 LB 液体培养基中, 37  $^{\circ}$ C 培养过夜。过夜培养物按 1:100 比例接种到 400 mL 含有 100 mg/L 氨苄青霉素的 LB 液体培养基中, 37  $^{\circ}$ C 培养至 OD<sub>600</sub> 达到 0.6, 加入终浓度为 0.5 mmol/L IPTG, 25  $^{\circ}$ C 诱导 6 h。

1.3 火球菌 8-氧鸟嘌呤 DNA 糖苷酶的纯化  
大肠杆菌经 IPTG 诱导后, 在 6 000 r/min、4  $^{\circ}$ C 离心 5 min 收集菌体; 菌体沉淀用裂解缓冲液 (20 mmol/L Tris-HCl pH 8.0, 300 mmol/L NaCl, 10 mmol/L 咪唑, 5 mmol/L  $\beta$  巯基乙醇, 10%甘油) 重悬均匀, 置于冰上进行超声波破碎 15 min; 破碎

的细胞裂解液于 4  $^{\circ}$ C、12 000 r/min 条件下离心 1 h, 收集上清液。采用 HisTrap<sup>TM</sup> HP 亲和层析柱纯化, 先用含 30 mmol/L 咪唑的裂解缓冲液洗脱 50 mL, 去除杂蛋白, 最后用含 300 mmol/L 咪唑的裂解缓冲液洗脱目的蛋白, 并经无咪唑透析液 3 次透析操作 (每次 4 h) 除去咪唑。最后纯化蛋白的纯度通过 SDS-PAGE 电泳检测。

1.4 火球菌 8-氧鸟嘌呤 DNA 糖苷酶的酶学性质测定

1.4.1 火球菌 8-氧鸟嘌呤 DNA 糖苷酶活性测定底物: 用于酶活性测定的寡核苷酸片段见表 1, FAM 代表荧光标记。双链 DNA 底物制备方法如下: 将 5'FAM 标记寡核苷酸片段 (终浓度为 1.0  $\mu$ mol/L) 与不同的互补链以 2:3 摩尔比溶于含 50 mmol/L NaCl 的 TE 缓冲液中, 95  $^{\circ}$ C 加热 5 min, 缓慢冷却至室温。

1.4.2 火球菌 8-氧鸟嘌呤 DNA 糖苷酶活性测定方法: 在优化反应条件之前, 标准的反应缓冲液为: 50 mmol/L Tris-HCl pH 8.0, 50 mmol/L KCl, 1 mmol/L EDTA, 1 mmol/L DTT。反应体积、时间和温度分别是 20  $\mu$ L、15 min 和 55  $^{\circ}$ C。反应结束后加入 20  $\mu$ L 上样缓冲液 (8 mol/L 尿素, 0.6% SDS, 60 mmol/L EDTA, 0.5%溴酚蓝, 0.1%二甲苯菁) 终止反应。然后利用含 8 mol/L 尿素的 15%聚丙烯酰胺凝胶变性电泳 (PAGE) 检测反应产物。电泳完成后, 使用磷屏扫描仪 (Phosphor Imager FLA5000) 检测产物和底物的量, 并用相应软件进行定量分析。

表 1 火球菌 8-氧鸟嘌呤 DNA 糖苷酶活性测定底物	
Table 1 The substrates for the enzymatic assays of <i>P. furiosus</i> 8-oxoguanine DNA glycosylase	
寡核苷酸 Oligonucleotides	碱基序列 Base sequences (5'→3')
5'FAM-GO	CTCAGTAATGCGTGCA GTGCG <u>GO</u> GTCAAGATATCTGGCTATCG
Compl-A	CGATAGCCAGATATCTTGACAGCACTGCACGCATTACTGAG
Compl-T	CGATAGCCAGATATCTTGACTGCACTGCACGCATTACTGAG
Compl-C	CGATAGCCAGATATCTTGACCGCACTGCACGCATTACTGAG
Compl-G	CGATAGCCAGATATCTTGACGGCACTGCACGCATTACTGAG

## 2 结果与分析

### 2.1 重组火球菌 8-氧鸟嘌呤 DNA 糖苷酶的表达纯化

重组的火球菌 8-氧鸟嘌呤 DNA 糖苷酶在 Rosetta(DE3)菌株中, 经过 IPTG 诱导 6 h 后, 表达的 8-氧鸟嘌呤 DNA 糖苷酶蛋白量很高。经过  $\text{Ni}^{2+}$  亲和层析纯化后, 产量达 10 mg/L, 蛋白纯度达到 95%以上(图 1)。

### 2.2 火球菌 8-氧鸟嘌呤 DNA 糖苷酶的酶学和生化特性

**2.2.1 火球菌 8-氧鸟嘌呤 DNA 糖苷酶的生化性质:** 所用火球菌 8-氧鸟嘌呤 DNA 糖苷酶活性测定底物为含 GO 损伤碱基的 41 nt 单链寡核苷酸, GO 损伤碱基被 8-氧鸟嘌呤 DNA 糖苷酶切除后, 产生无碱基的 AP 位点, AP 裂解酶会进一步切断 AP 位点, 生成两条短的 DNA 分子, 通过变性 PAGE 电泳来区分长度不同的产物和底物 DNA 分子。

火球菌 8-氧鸟嘌呤 DNA 糖苷酶在很广的 pH 值范围内(5.0–10.0)都有切除 GO 碱基的活性, 且反应的最适 pH 值是 8.5, 当反应缓冲液的 pH 值高于 9.0 或者低于 5.5 时, 酶活性显著下降(图 2)。NaCl 的浓度对酶的活性也有一定的影响, 当 NaCl 的浓

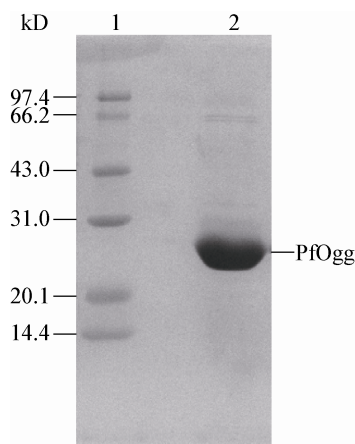


图 1 蛋白表达纯化结果

**Figure 1 The results of expression and purification of the protein**

注: 1: 标准蛋白; 2: 纯化得到的重组蛋白。

Note: 1: Marker; 2: Purified recombinant protein.

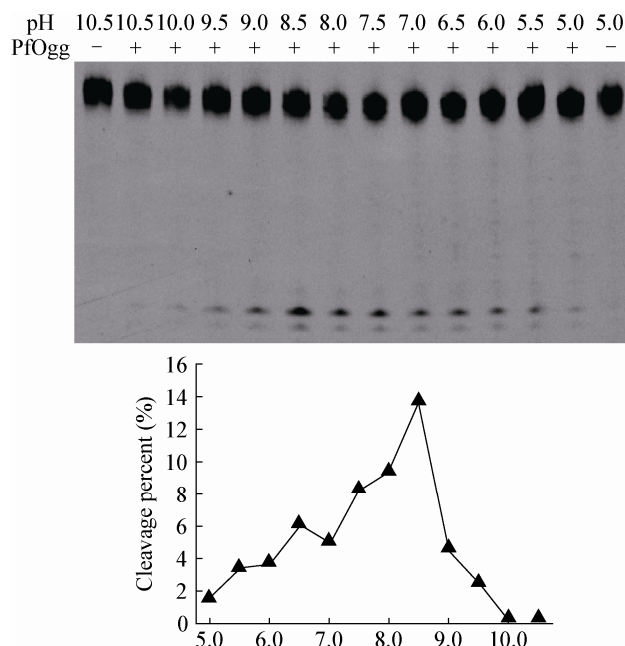


图 2 反应缓冲液 pH 值对火球菌 8-氧鸟嘌呤 DNA 糖苷酶活性的影响

**Figure 2 Effect of pH value on GO excision by PfOgg**

注: 将 1 ng 火球菌 8-氧鸟嘌呤 DNA 糖苷酶与 1 pmole 含 GO 的双链 DNA (GO/C) 加入到含不同 pH 值的反应缓冲液中, 在 55 °C 条件下反应 15 min.

Note: 1 ng PfOgg and 1 pmole GO-carrying dsDNA (GO/C) were incubated at 55 °C for 15 min in assay buffer with various pH values.

度大于 100 mmol/L 时, 火球菌 8-氧鸟嘌呤 DNA 糖苷酶切除 GO 碱基的活性开始降低, 而在 50–100 mmol/L NaCl 浓度范围内活性变化不大(图 3)。除了  $\text{Zn}^{2+}$  有明显的抑制作用外, 其它二价阳离子 ( $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ) 对火球菌 8-氧鸟嘌呤 DNA 糖苷酶的活性影响不大(图 4)。火球菌 8-氧鸟嘌呤 DNA 糖苷酶在 37–95 °C 的温度范围内都有活性, 最适反应温度是 55 °C (图 5), 其中 95 °C 活性略高于 85 °C 属于单次实验误差。

### 2.2.2 火球菌 8-氧鸟嘌呤 DNA 糖苷酶的热稳定性

**热稳定性:** 作为一个来自极端嗜热古生菌的蛋白, 火球菌 8-氧鸟嘌呤 DNA 糖苷酶具有耐高温的性质。它在 70–100 °C 的温度范围内都具有一定的热稳定性, 其活性在 90 °C 以下加热 40 min 后依然

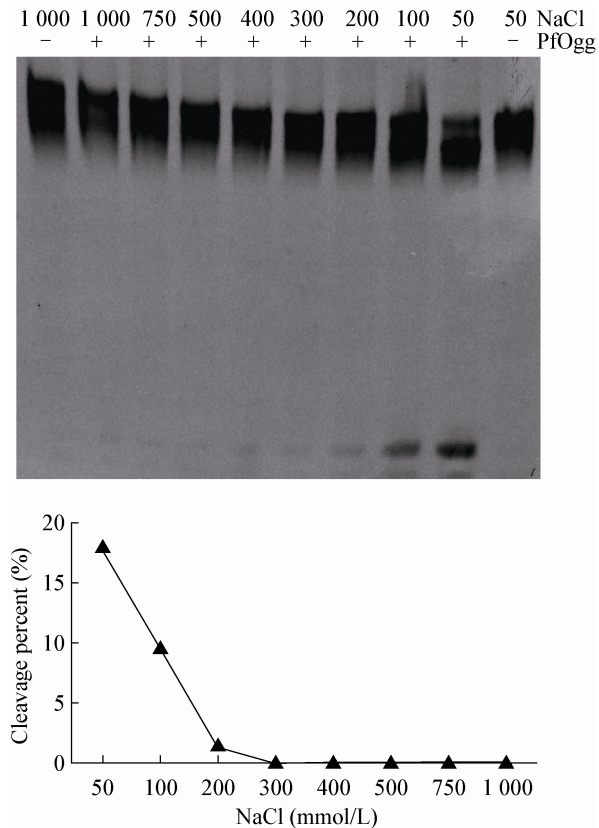


图3 NaCl 浓度对火球菌 8-氧鸟嘌呤 DNA 糖苷酶活性的影响

Figure 3 Effect of NaCl concentration on GO excision by PfOgg

注: 将 1 ng 火球菌 8-氧鸟嘌呤 DNA 糖苷酶与 1 pmole 含 GO 的双链 DNA (GO/C) 加入到含不同 NaCl 浓度的反应缓冲液中, 在 55 °C 条件下反应 15 min.

Note: 1 ng PfOgg and 1 pmole GO-carrying dsDNA (GO/C) were incubated at 55 °C for 15 min in assay buffer with various NaCl concentrations.

保持酶切活性, 100 °C 下的半衰期为 5 min (图 6)。所有热稳定性(加热残余活性为 3 次试验平均值)。除了热稳定性测定外, 其它酶活测定均为单次实验结果。

**2.2.3 火球菌 8-氧鸟嘌呤 DNA 糖苷酶的底物特异性:** 重组火球菌 8-氧鸟嘌呤 DNA 糖苷酶既可以切除双链 DNA 上的 GO 碱基也可以切除单链 DNA 上的 GO 碱基, 但是切除双链 DNA 的效率要比切除单链 DNA 的效率, 说明在生物体内双链 DNA 是

火球菌 8-氧鸟嘌呤 DNA 糖苷酶的最优底物, 在双链 DNA 中互补链上与 GO 配对的碱基种类对酶的活性影响不大(图 7), 表明 GO 损伤碱基是决定火球菌 8-氧鸟嘌呤 DNA 糖苷酶底物特异性和切割效率的主要因子。

### 3 讨论

氧化损伤会极大的损害基因组的完整性, 随着温度的升高氧化损伤对 DNA 损害的频率会随之增加, 因此对于生长在高温环境的极端嗜热微生物而言, 会有一套更高效的修复系统来切除 DNA 中被氧化的碱基<sup>[10]</sup>。与正常的 G 相比, GO 在 DNA 的

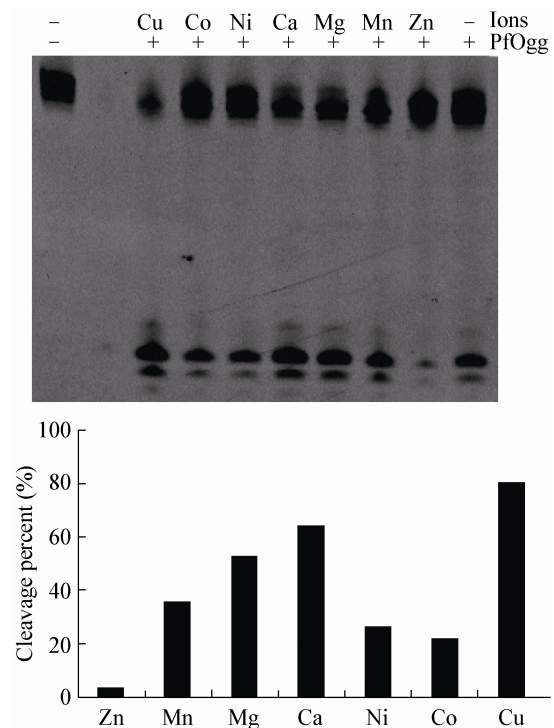


图4 二价离子对火球菌 8-氧鸟嘌呤 DNA 糖苷酶活性的影响

Figure 4 Effect of divalent ions on GO excision by PfOgg

注: 将 1 ng 火球菌 8-氧鸟嘌呤 DNA 糖苷酶与 1 pmole 含 GO 的双链 DNA (GO/C) 加入到含不同二价离子的反应缓冲液中, 在 55 °C 条件下反应 15 min.

Note: 1 ng PfOgg and 1 pmole GO-carrying dsDNA (GO/C) were incubated at 55 °C for 15 min in assay buffer with various divalent ions.



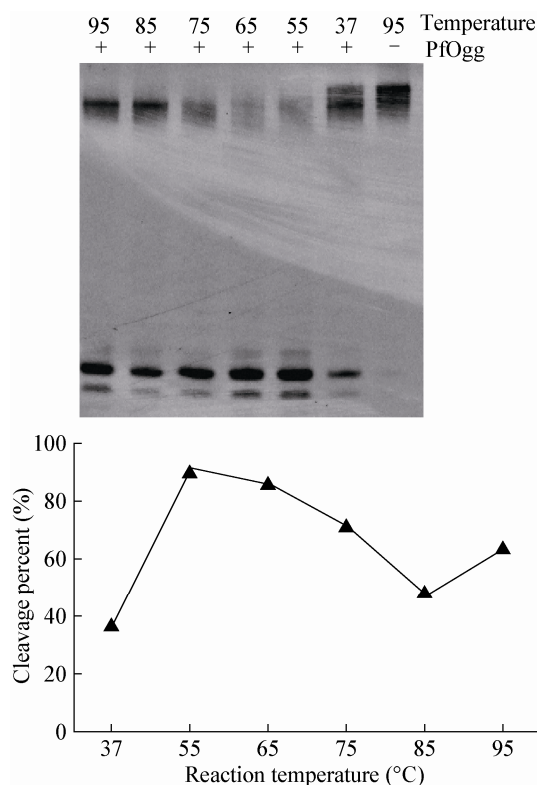


图 5 温度对火球菌 8-氧鸟嘌呤 DNA 糖苷酶活性的影响

**Figure 5 Effect of temperature on GO excision by PfOgg**

注：将 1 ng 火球菌 8-氧鸟嘌呤 DNA 糖苷酶与 1 pmole 含 GO 的双链 DNA (GO/C) 加入到反应缓冲液中，在不同的温度条件下反应 15 min.

Note: 1 ng PfOgg and 1 pmole GO-carrying ds DNA (GO/C) were incubated at various temperatures for 15 min in assay buffer.

复制中除了可以与 C 配对，还可以与 A、T 及 G 配对<sup>[1]</sup>。在 *E. coli* 中，GO 损伤主要由 Fpg (MutM) 从 DNA 上切除<sup>[13]</sup>，Fpg 倾向于切除与 G、C 和 T 配对而不是与 A 配对的 GO<sup>[14]</sup>。在极端嗜热古细菌 *Archaeoglobus fulgidus* 中，8-氧鸟嘌呤 DNA 糖苷酶切除双链 DNA 中 GO 碱基的活性顺序是：GO/C>GO/G>GO/T>GO/A<sup>[10]</sup>。在此我们证明火球菌 8-氧鸟嘌呤 DNA 糖苷酶可以有效切除 GO 损伤碱基，其双链 DNA 底物特异性与 *Archaeoglobus fulgidus* 略有差异。

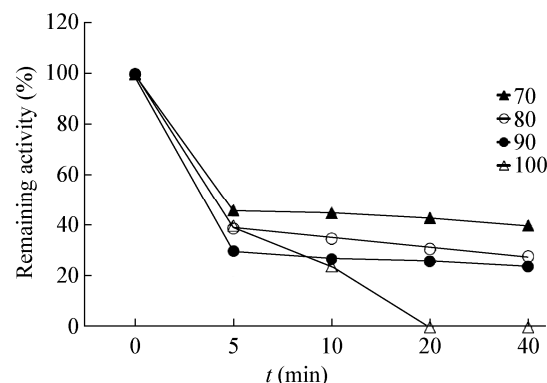


图 6 火球菌 8-氧鸟嘌呤 DNA 糖苷酶活性的热稳定性

**Figure 6 Thermal stability of PfOgg**

注：火球菌 8-氧鸟嘌呤 DNA 糖苷酶分别在 70、80、90、100 °C 温度下加热 0、5、10、20、40 min，然后再跟 1 pmole 含 GO 的双链 DNA (GO/C) 一起加入到反应缓冲液中，55 °C 条件下反应 15 min.

Note: The PfOgg was heated at 70 °C, 80 °C, 90 °C, 100 °C for different time (0, 5, 10, 20, 40 min), then incubated with 1 pmole GO-carrying ds DNA (GO/C) at 55 °C for 15 min in assay buffer.

火球菌是一类极端嗜热严格厌氧古生菌，它的最适生长温度为 100 °C<sup>[11]</sup>。虽然火球菌严格厌氧，细胞内代谢活动产生氧自由基的频率有待确定，但火球菌 8-氧鸟嘌呤 DNA 糖苷酶为其对付可能的氧化损伤提供了可能。同时细胞内代谢活动可能会对 DNA 产生其他氧化损伤，一种可能是火球菌 8-氧鸟嘌呤 DNA 糖苷酶负责修复这些氧化损伤，虽然有关这些非 GO 损伤的研究还是空白，但却是一个重要的潜在研究问题。

另外火球菌 8-氧鸟嘌呤 DNA 糖苷酶如何准确地特异性识别切割 GO 损伤碱基，是回答酶的催化特异性的一个很好的问题。为了回答这一问题，我们下一步将进行含 GO 损伤的 DNA 底物与火球菌 8-氧鸟嘌呤 DNA 糖苷酶的共结晶，并解析三维结构。最终获得 DNA 底物，特别是 GO 损伤，与火球菌 Ogg 各个必需氨基酸残基间的相互作用数据。将来这些结构数据的获得将阐明火球菌 8-氧鸟嘌呤 DNA 糖苷酶切割 GO 酶促反应的分子机制。

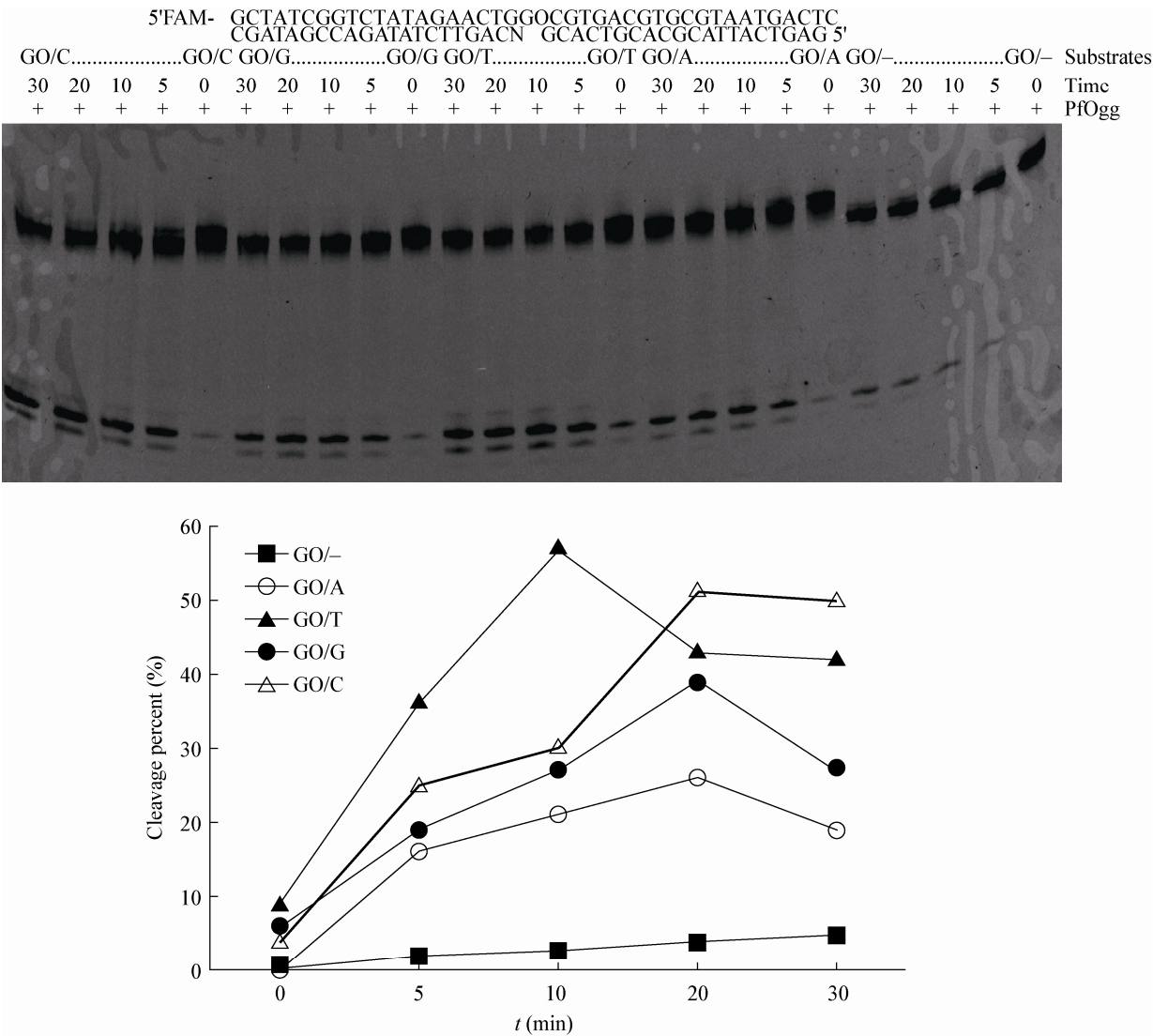


图 7 火球菌 8-氧鸟嘌呤 DNA 糖苷酶的底物特异性

Figure 7 Effect of the opposite base on the excision of GO by PfOgg

注：将 1 ng 火球菌 8-氧鸟嘌呤 DNA 糖苷酶与 1 pmole 含与 GO 互补的不同碱基的双链 DNA 加入到反应缓冲液中，在 55 °C 条件下反应不同的时间。  
Note: 1 ng PfOgg was incubated at 55 °C for different times in assay buffer, with 1 pmole dsDNA carrying GO and various opposite bases.

参 考 文 献

[1] Grollman AP, Moriya M. Mutagenesis by 8-oxoguanine an enemy within[J]. Trends in Genetics, 1993, 9: 246-249.

[2] Kuchino Y, Mori F, Kasai H, et al. Misreading of DNA templates containing 8-hydroxydeoxyguanosine at the modified base and at adjacent residues[J]. Nature, 1987, 327: 77-79.

[3] Wood ML, Dizdaroglu M, Gajewski E, et al. Mechanistic studies of ionizing radiation and oxidative mutagenesis: genetic effects of a single 8-hydroxyguanine (7-hydro-8-oxoguanine) residue inserted at a unique site in a viral genome[J]. Biochemistry, 1990, 29: 7024-7032.

[4] Shibutani S, Takeshita M, Grollman AP. Insertion of specific bases during DNA synthesis past the oxidation-damaged base 8-oxodG[J]. Nature, 1991, 349: 431-434.

[5] Barnes DE, Lindahl T. Repair and genetic consequences of endogenous DNA base damage in mammalian cells[J]. Annual Review of Genetics, 2004, 38: 445-476.

[6] David SS, O'Shea VL, Kundu S. Base excision repair of oxidative DNA damage[J]. Nature, 2007, 447(7147):

- 941-950.
- [7] Bult CJ, White O, Olsen GJ, et al. Complete genome sequence of the methanogenic archaeon, *Methanococcus jannaschii*[J]. Science, 1996, 273(5278): 1058-1073.
- [8] Gogos A, Clarke ND. Characterization of an 8-oxoguanine DNA glycosylase from *Methanococcus jannaschii*[J]. The Journal of Biological Chemistry, 1999, 274(43): 30447-30450.
- [9] She Q, Singh RK, Confalonieri F, et al. The complete genome of the crenarchaeon *Sulfolobus solfataricus* P2[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2001, 98(14): 7835-7840.
- [10] Chung JH, Suh MJ, Park YI, et al. Repair activities of 8-oxoguanine DNA glycosylase from *Archaeoglobus fulgidus*, a hyperthermophilic archaeon[J]. Mutation Research, 2001, 486(2): 99-111.
- [11] Fiala G, Stetter KO. *Pyrococcus furiosus* sp. nov. represents a novel genus of marine heterotrophic archaeobacteria growing optimally at 100 °C[J]. Archives of Microbiology, 1986, 145(1): 56-61.
- [12] Liu XP, Liu JH. The terminal 5' phosphate and proximate phosphorothioate promote ligation-independent cloning[J]. Protein Science, 2010, 19: 967-973.
- [13] Michaels ML, Pham L, Cruz C, et al. MutM, a protein that prevents G.C---T.A transversions, is formamidopyrimidine-DNA glycosylase[J]. Nucleic Acids Research, 1991, 19(13): 3629-3632.
- [14] Boiteux S, O'Connor TR, Lederer F, et al. Homogeneous *Escherichia coli* FPG protein. A DNA glycosylase which excises imidazole ring-opened purines and nicks DNA at apurinic/apyrimidinic sites[J]. The Journal of Biological Chemistry, 1990, 265(7): 3916-3922.

## 征 稿 简 则

### 1 刊物简介与栏目设置

《微生物学通报》是由中国科学院微生物研究所和中国微生物学会主办的,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:工业微生物学、海洋微生物学、环境微生物学、基础微生物学、农业微生物学、食品微生物学、兽医微生物学、药物微生物学、医学微生物学、病毒学、酶工程、发酵工程、代谢工程等领域的最新研究成果,产业化新技术和新进展,以及微生物学教学研究和改革等。设置的栏目有:研究报告、专论与综述、生物实验室、高校教改纵横、名课讲堂、教学与科研成果展示、显微世界、专题专栏、专家论坛、书讯、会讯等。

### 2 投稿方式

投稿时请登陆我刊主页 <http://journals.im.ac.cn/WSWXTBCN>, 点击作者投稿区,第一次投稿请先注册,获得用户名和密码,然后依照提示提交稿件,详见主页“投稿须知”。

作者必须在网站投.doc 格式的电子稿,凡不符合(投稿须知)要求的文稿,本部恕不受理。

### 3 写作要求

来稿要求论点明确,数据可靠,简明通顺,重点突出。

#### 3.1 图表

文中的图表须清晰简明,文字叙述应避免与图表重复。所有小图的宽度应小于 8 cm (占半栏),大图的宽度应小于 17 cm (通栏)。

#### 3.2 参考文献及脚注

参考文献按文内引用的先后顺序排序编码,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(文献作者不超过 3 人时全部列出,多于 3 人时列出前 3 人,后加“等”或“et al.”,作者姓前、名后,名字之间用逗号隔开)、文献名、刊名、年卷期及页码。国外期刊名必须写完整,不用缩写,不用斜体。参考文献数量不限。

参考文献格式举例:

期刊: [1] 刘杰, 成子强, 史宣玲. SARS 冠状病毒 *nsp14* 基因的克隆和表达[J]. 微生物学通报, 2007, 34(2): 1-3.

[2] Kajiura H, Mori K, Tobimatsu T, et al. Characterization and mechanism of action of a reactivating factor for adenosylcobalamin-dependent glycerol dehydratase[J]. Journal of Biological Chemistry, 2001, 276(39): 36514-36519.

图书: [3] 钱存柔, 黄仪秀. 微生物实验教程[M]. 北京: 北京大学出版社, 2000: 4.

[4] 董志扬, 张树政, 方宣钧, 等. 海藻的生物合成及抗逆机理//华路等. 核农学进展[M]. 北京: 中国农业出版社, 1996: 115-120.

脚注(正文首页下方):

基金项目: 基金项目(No. )

\*通讯作者: Tel: ; Fax: ; E-mail:

收稿日期: 2014-00-00; 接受日期: 2014-00-00

(下转 p.155)