

来源于 *Bacillus subtilis* 的中性植酸酶基因的克隆及在大肠杆菌中的表达

姚 斌^{1*} 袁铁铮¹ 王元火¹ 操时树¹ 王亚茹¹ 史秀云¹ 范云六²

(¹ 中国农业科学院饲料研究所和² 中国农业科学院生物技术中心, 北京 100081)

摘 要 通过 PCR 的方法从 *Bacillus subtilis* 基因组中克隆了中性植酸酶基因 *nphy*, DNA 全序列分析表明其结构基因全长 1152 个核苷酸(编码 383 个氨基酸), 5'端有一编码 26 个氨基酸的信号肽序列。去除信号肽编码序列的 *nphy* 克隆到大肠杆菌 IPTG 诱导表达载体 pTYB40 上, 在大肠杆菌中得到了高效表达, 表达量达到大肠杆菌可溶性蛋白的 40% 以上, 表达产物具有生物学活性, 证实了克隆到的中性植酸酶的编码基因有正常的生物学功能。

关键词 中性植酸酶 基因克隆 高效表达

中图分类号 Q78 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2001)01-0011-05

磷是动物生长、繁殖、骨骼矿化及代谢所必需的矿物因素之一。作为动物饲料主要成分的植物性饲料中虽含有相当数量的总磷, 但其中 50% 以上以植酸磷(六磷酸肌醇)的形式存在, 单胃动物缺乏分解植酸所必需的酶而不能有效地利用植酸磷, 从而造成许多问题^[1]。主要有: 1) 磷源浪费。一方面饲料中的磷源不能得到有效利用, 另一方面为了满足动物对磷的需求, 又必须在饲料中额外添加无机磷, 从而提高了饲料成本。添加磷酸氢钙等无机磷还易引起动物的氟中毒或其它重金属中毒。2) 形成高磷粪便造成环境污染。植物性饲料中 85% 左右的磷会被单胃动物直接排出体外, 粪便中大量的磷使水源和土壤受严重污染, 目前许多欧洲国家如荷兰等因此问题已开始限制畜禽的养殖数量。3) 植酸磷还是一种抗营养因子, 它在动物肠胃道的消化吸收过程中会与多种金属离子 Zn^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Fe^{2+} 等以及蛋白质螯合成相应的不溶性复合物, 从而降低了动物对这些营养元素的有效利用^[2]。

植酸酶(EC3.1.3.8, *myo*-Inositol-hexaphosphate phosphohydrolase) 可使植酸磷降解成肌醇和磷酸, 其对单胃动物的饲喂效果已得到了广泛的确证^[3]。它可使植物性饲料中磷的利用率提高 60%, 粪便中磷的排出量减少 40%, 还可降低植酸盐的抗营养作用, 因此对提高畜牧生产效益及降低其对环

境的污染有重要意义。

以往的研究主要集中在应用于单胃畜禽饲料中的酸性植酸酶上, 并利用高效表达酸性植酸酶的基因工程菌株实现了商品化生产^[4, 5]。但这种酸性植酸酶却不适用于淡水养殖的鲤鱼科鱼类的饲料, 因为鲤鱼科鱼类无胃, 只有 pH 呈中性的肠道, 必需使用最适 pH 为中性的中性植酸酶。目前对中性植酸酶还未得到深入研究。

我们从土壤中筛选到了一株产中性植酸酶的枯草芽孢杆菌, 其所产植酸酶的最适 pH 值为 7.5, 最适温度为 55℃, 表观分子量约为 45kD, 成熟酶的 N 端氨基酸序列为 Lys-His-Lys-Leu-Ser-Asp-Pro-Tyr-His-Phe-Thr。本文进一步报道了从此枯草芽孢杆菌中分离克隆中性植酸酶基因及此基因在大肠杆菌中高效表达, 表达产物具有正常的生物学活性。

1 材料与方法

1.1 *Bacillus subtilis* 总 DNA 的分离

菌株在 LB 培养基中 28℃ 摇床培养 24h, 取 50mL 培养液离心沉淀菌体, 沉淀重悬于 25mL 1.0mol/L 的 NaCl 中, 4℃ 下剧烈振荡 1h, 离心后沉淀用 25mL 预冷的 TES 缓冲液(0.01mol/L Tris, pH8.0, 0.025mol/L EDTA, 0.15mol/L NaCl)洗一次, 沉淀再悬浮于 5mL TE 缓冲液(不含 NaCl 的

收稿日期 2000-05-15, 修回日期 2000-08-22。

基金项目 国家高技术发展与计划资助项目(101-03-05-01)。

* 通讯作者。Tel 86-10-68975126; Fax 86-10-68975127; E-mail yao@cimr.ac.cn 中国微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

TES)中,加入 0.5mL 2mg/mL 的溶菌酶,37℃ 保温 15min,再加入 0.6mL 的肌氨酸-蛋白酶溶液(10% 肌氨酸和 5mg/mL 的蛋白酶溶于 TE 中),37℃ 保温 1h,细胞裂解液用苯酚、苯酚-氯仿、氯仿依次抽提,酒精沉淀 DNA 后溶于 pH8.0 的 TE 中备用。

1.2 中性植酸酶基因的克隆

主要根据 Maniatis 手册^[6]进行。大肠杆菌菌株 *E. coli* DH5 α 、克隆载体 pGEM-T 等均为本室保存。限制酶、连接酶、Taq 酶为 Boehringer 公司产品。

根据测定的此中性植酸酶 N 端氨基酸序列合成简并引物,分别与 20 个随机引物组对 PCR 扩增中性植酸酶成熟蛋白编码序列。PCR 反应参数为:94℃ 变性 1min、50℃ 退火 45s、72℃ 延伸 1min,循环 30 轮后 72℃ 保温 10min。含有成熟酶编码序列的 PCR 片段电泳回收后分别克隆到 pGEM-T 载体上,进行序列分析。根据序列分析的结果,再合成反向 PCR 引物,分别与随机引物组对后扩增基因 5' 端信号肽编码序列。

1.3 中性植酸酶在大肠杆菌中的表达

大肠杆菌表达载体 pTYB40(由 BioLabs inc. 的 pTYB4 C-末端融合载体去除 Intein 融合蛋白编码序列后得到)为本室保存。重组载体构建根据文献[6]进行。

1.4 中性植酸酶的诱导表达

大肠杆菌重组子于 5mL LB 培养液(含 100 μ g/mL Ap)中 37℃ 培养过夜,按 0.1% 接种到 20mL LB 培养液(含 100 μ g/mL Ap)中,37℃、300r/min 培养至 OD 值达到 0.6~0.8,加入 IPTG 至终浓度为 1mmol/L,30℃ 下诱导培养 3h。

1.5 表达产物的 SDS-PAGE

取 1mL 诱导培养物离心收集菌体,用双蒸水洗 2 遍后重悬于 100 μ L 双蒸水中,加入等体积的 2 \times SDS 加样缓冲液(100mmol/L Tris-HCl, pH6.8、200mmol/L DTT、4% SDS、0.2% 溴酚蓝、20% 甘油),100℃ 煮 3min,取 5 μ L 上 12% 的聚丙烯酰胺凝胶。

1.6 表达产物的生物学测定

用超声波破碎诱导后的菌体,15000r/min 离心去除细胞碎片,上清液用来检测植酸酶活性。酶活性测定方法如下:上述上清液适当稀释后,取 0.2mL,加入 0.8mL 1.25mmol/L 的植酸钠[用含 1mmol/L CaCl₂ 的 0.25mmol/L Tris-HCl(pH7.5)配制],37℃ 保温 30min,加入 1mL 10% TCA 终止酶活反应,然后加入 2mL 硫酸亚铁-钼酸铵显色液,700nm 测定无机磷含

量。对照为先在 0.2mL 的酶稀释液中加入 1mL TCA 使酶灭活,再加入同体积的底物保温。酶活性单位(u)定义为:在一定条件下,每分钟释放出 1 μ mol 无机磷所需的酶量为一个酶活性单位。

表达的中性植酸酶在不同的 pH 值下进行酶促反应测定其最适 pH。底物植酸钠用不同 pH 的含 1mmol/L CaCl₂ 的 0.2mmol/L 缓冲液配制(pH1.0、pH2.0 为 HCl-KCl 缓冲液;pH3.0 为 HCl-甘氨酸缓冲液;pH4.0、5.0、5.6 为 HAc-NaAc 缓冲液;pH6.0、6.4、6.8 为 Tris-Maleate 缓冲液;pH7.2、7.5、8.0、8.6、9.0 为 Tris-HCl 缓冲液;pH10 为甘氨酸-NaOH 缓冲液),37℃ 和 55℃ 测定酶活性。

表达的中性植酸酶的最适温度定为在 Tris-HCl(pH7.5)缓冲液体系及不同温度下进行酶促反应。

2 结果

2.1 中性植酸酶编码基因的分离克隆

根据此成熟植酸酶 N 端氨基酸序列 Lys-His-Lys-Leu-Ser-Asp-Pro-Tyr-His-Phe-Thr,合成简并引物,考虑到序列中第 4 和第 5 个氨基酸是由 6 个密码子编码的氨基酸,因而合成的引物从第 6 个,即 Asp 的密码子开始,设计的简并引物为:P1 5' GA(T/C)CC(A/T/G/C)TA(T/C)CA(T/C)TT(T/C)AC 3',另一端的引物采用 20 个随机引物,分别与引物 P1 组对,以枯草芽孢杆菌总 DNA 为模板,进行 PCR 扩增。其中一组引物扩增到了约 1.4kb 的 PCR 片段。根据测定的此蛋白的分子量,推断此酶蛋白氨基酸个数在 400 个以下,相应的基因长度不超过 1.2kb,如果此 PCR 片段为中性植酸酶编码基因,应该包括完整的结构基因 3' 端。挑取此 1.4kb 的 PCR 片段,将它克隆到 pGEM-T 载体上,进行序列测定。结果表明,在此片段有一个长 1059bp 的阅读框架,5' 端编码的 6 个氨基酸与氨基酸序列测定结果相一致,初步判断为我们拟克隆的目的基因。

为了克隆酶蛋白 N-端的信号肽编码序列,我们根据上述测定的序列结果,设计合成一段反向 PCR 引物 P2 5' CAAGGCTGTAAACGAC3',此引物序列与成熟酶基因的 +162~+178 序列配对。同样与随机引物组对,进行 PCR 扩增,得到一约 600bp 的 PCR 片段,将它克隆到 pGEM-T 质粒上,进行序列分析。

综合这两段序列的结果,得到完整的中性植酸酶的结构编码基因 *ipaA* (图 1)。此基因全长 1152

个核苷酸,编码 383 个氨基酸,根据信号肽序列的结构规则^[7]推断,N-端的 26 个氨基酸为信号肽,信号肽的切割位点在 + 26 位的 Ala 之后,这一结果与成熟酶的 N 端氨基酸序列测定结果一致。此中性植

酸酶的基因序列与以往大量报道的来源于丝状真菌和植物的植酸酶基因均无同源性,也不含有丝状真菌和植物来源的植酸酶蛋白中均存在的高度保守序列:RHGARYPT^[8]。

| | |
|---|------|
| ATG AAT CAT TCA AAA ACA CTT TTG TTA ACC GCG GCG GCC GGA CTG ATG CTC ACA | 54 |
| M N H S K T L L L T A A A G L M L T | 18 |
| TGC GGT GCG GTG TCT TCC CAG GCA AAG CAT AAG CTG TCC GAT CCT TAT CAT TTT | 108 |
| C G A V S S Q A↑K H K L S D P Y H F | 36 |
| ACC GTG AAT GCA GCG GCG GAA ACG GAA CCG GTT GAT ACG GCC GGT GAC GCG GCT | 162 |
| T V N A A A E T E P V D T A G D A A | 54 |
| GAT GAT CCT GCG ATT TGG CTG GAC CCC AAG ACT CCT CAG AAC AGC AAA TTG ATT | 216 |
| D D P A I W L D P K T P Q N S K L I | 72 |
| ACG ACC AAT AAA AAA TCA GGT TTA GTC GTT TAC AGC CTT GAT GGT AAG ATG CTT | 270 |
| T T N K K S G L V V Y S L D G K M L | 90 |
| CAT TCC TAT AAT ACC GGG AAG CTG AAC AAT GTC GAT ATC CGT TAT GAT TTT CCG | 324 |
| H S Y N T G K L N N V D I R Y D F P | 108 |
| TTG AAC GGC AAA AAA GTC GAT ATC GCG GCA GCA TCC AAT CGG TCT GAA GGA AAA | 378 |
| L N G K K K V D I A A A S N R S E G K K | 126 |
| AAT ACC ATT GAG ATT TAC GCT ATT GAT GGA AAA AAC GGC ACA TTA CAA AGC ATG | 432 |
| N T I E I Y A I D G K N G T L Q S M | 144 |
| ACA GAT CCA GAC CAT CCG ATT GCA ACA GCA ATT AAT GAG GTA TAC GGT TTT ACC | 486 |
| T D P D H P I A T A I N E V Y G F T | 162 |
| TTA TAC CAC AGT CAA AAA ACA GGA AAA TAT TAC GCG ATG GTG ACA GGA AAA GAG | 540 |
| L Y H S Q K T G K Y Y A M V T G K E | 180 |
| GGT GAA TTT GAA CAA TAC GAA TTA AAG GCG GAC AAA AAT GGA TAC ATA TCC GGC | 594 |
| G E F E Q Y E L K A D K N G Y I S G | 198 |
| AAA AAG GTA CGG GCG TTT AAA ATG AAT TCC CAG ACG GAA GGG ATG GCA GCA GAC | 648 |
| K K V R A F K M N S Q T E G M A A D | 216 |
| GAT GAA TAC GGC AGG CTT TAT ATC GCA GAA GAA GAT GAG GCC ATT TGG AAG TTC | 702 |
| D E Y G R L Y I A E E D E A I W K F | 234 |
| AGC GCC GAG CCG GAC GGC GGC AGT AAC GGA ACG GTT ATC GAC CGT GCG GAC GGC | 756 |
| S A E P D G G S N G T V I D R A D G | 252 |
| AGG CAT TTA ACT CGT GAT ATT GAA GGA TTG ACG ATT TAC TAC GCT GCT GAC GGG | 810 |
| R H L T R D I E G L T I Y Y A A D G | 270 |
| AAA GGC TAT CTG ATG GCA TCA AGC CAG GGA AAC AGC AGC TAC GCC ATT TAT GAC | 864 |
| K G Y L M A S S Q G N S S Y A I Y D | 288 |
| AGA CAA GGA AAG AAC AAA TAT GTT GCG GAT TTT CGC ATA ACA GAC GGT GCT GAA | 918 |
| R Q G K N K Y V A D F R I T D G P E | 306 |
| ACA GAC GGG ACA AGC GAT ACA GAC GGA ATT GAC GTT CTG GGT TTC GGA CTG GGG | 972 |
| T D G T S D T D G I D V L G F G L G | 324 |
| CCT GAA TAT CCG TTC GGT ATT TTT GTC GCA CAG GAC GGT GAA AAT ATA GAT CAC | 1026 |
| P E Y P F G I F V A Q D G E N I D H | 342 |
| GGC CAA AAG GCC AAT CAA AAT TTT AAA ATC GTG CCA TGG GAA AGA ATT GCT GAT | 1080 |
| G Q K A N Q N F K I V P W E R I A D | 360 |
| CAA ATC GGT TTC CGC CCG CTG GCA AAT GAA CAG GTT GAC CCG AGA AAA CTG ACC | 1134 |
| Q I G F R P L A N E Q V D P R K L T | 378 |
| GAC AGA AGC GGA AAA TAA | 1152 |
| D R S G K - | 383 |

图 1 来源于 *Bacillus subtilis* 的中性植酸酶结构基因序列及推导出的氨基酸序列

Fig.1 The DNA sequence of phytase gene *nphy* from *Bacillus subtilis* and deduced aa sequence

Signal peptide encoding sequence is indicated by sequence underlined.

Signal peptide cleavage site indicated vertical arrows

2.2 中性植酸酶基因在大肠杆菌中的表达

为了了解此基因是否是中性植酸酶基因,我们将其转入大肠杆菌进行表达研究。

重组质粒的结构见图 2。我们将去除了信号肽

编码序列的中性植酸酶结构基因以正确的阅读框架克隆到载体 pTYB40 上紧接起始密码子 ATG 之后的 *Nde*I 位点上,得到重组质粒 pTYB41,转化到大肠杆菌 BL21 中,挑取阳性克隆子进行诱导表达。

由于 pTYB40 上已去除了融合蛋白 Intein 的编码序列,这样表达的中性植酸酶蛋白不带融合蛋白。

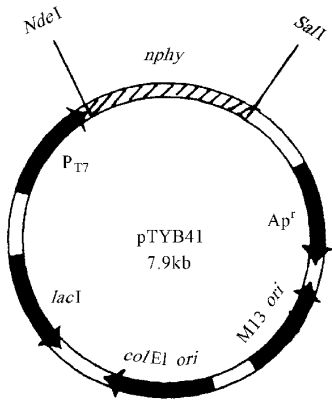


图 2 重组表达质粒 pTYB41 的物理图谱

Fig.2 Physical map of recombinant expression plasmid pTYB41

在大肠杆菌中表达的中性植酸酶蛋白的 SDS-PAGE(图 3)结果表明,中性植酸酶在大肠杆菌中得到了高效表达。在约 40kD 处有一特异蛋白带,与根据氨基酸序列推导出来的理论分子量相一致,其表达量达到大肠杆菌可溶性蛋白的 40% 左右。

2.3 表达的中性植酸酶的生物学测定

取包含表达产物的菌体破碎液,稀释后进行酶活性的生物学测定,结果表明,在含空载体的菌株中检测不到植酸酶酶活性,而在阳性克隆子的细胞破碎液中检测到植酸酶活性,酶学性质研究结果(图 4)

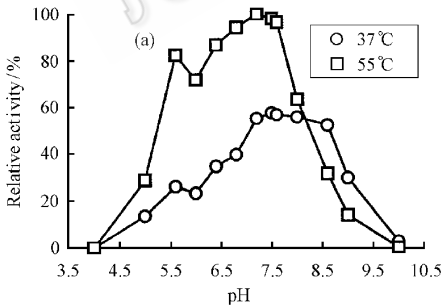


图 4 表达的中性植酸酶的最适 pH(a)和最适反应温度(b)

Fig.4 The optimal pH(a) and the optimal temperature(b) of expressed phytase

3 讨 论

许多植酸酶基因已从多种微生物中分离到,尤其是丝状真菌^[9~11],它们所产的植酸酶均是酶反应最适 pH 为酸性的酸性植酸酶,酶反应的最适 pH 基本都在 6.0 以下。来源于植物的植酸酶其最适 pH 也在 5.0 左右^[12]。也有报道从原核瘤胃细菌中分离到植酸酶基因^[13],其编码的植酸酶反应最适 pH 为 5.0,也在酸性的范围内。而我们从枯草芽孢杆

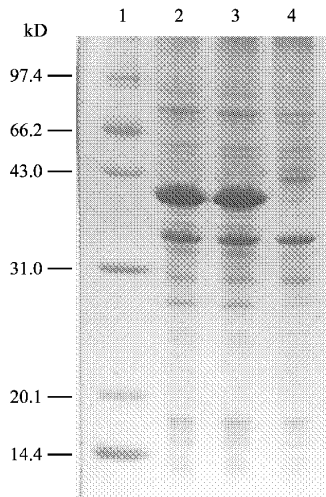
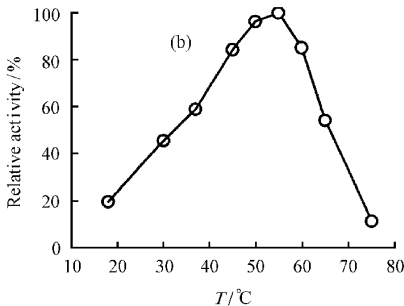


图 3 在大肠杆菌中表达的中性植酸酶的 SDS-PAGE

Fig.3 SDS-PAGE analysis of the neutral phytase expressed in *E. coli*

1. Standard protein molecular weight ;
2,3. Two *E. coli* recombinants with plasmid pTYB41 ,
respectively ;4. *E. coli* with plasmid pTYB40

表明,在 37℃ 下其酶反应的最适 pH 值为 7.5,55℃ 下为 7.0,最适温度 55℃,37℃ 下以植酸钠为底物的 km 值为 0.2mmol/L。表达的中性植酸酶在 pH 特性、温度特性等酶学性质与来源于枯草芽孢杆菌的中性植酸酶基本一致,这证明我们克隆到的这一基因是中性植酸酶的编码基因。



菌中分离到的这一植酸酶基因所编码的植酸酶在 37℃ 下最适 pH 为 7.5,属于中性植酸酶。

从编码中性植酸酶的结构基因来看,它与以往分离到的酸性植酸酶基因均无同源性,而来源于丝状真菌的酸性植酸酶相互之间的同源性在 50% 以上。在它编码的氨基酸序列中,也未发现在植酸酶中高度保守的活性位点序列 RHGARYPT^[8],这说明我们分离到的这种植酸酶属于另一类植酸酶。

中性植酸酶在大肠杆菌中表达后,通过 SDS-

PAGE 分析,它的分子量约为 40kD,与通过氨基酸序列推导出的理论分子量(39.08kD)相当,而枯草芽孢杆菌分泌的原始植酸酶在 SDS-PAGE 上表现出的表观分子量约为 45kD,这之间存在一些差异,原因还需进一步深入研究。

在大肠杆菌中表达的中性植酸酶具有生物学活性,酶学性质也与枯草芽孢杆菌分泌的原始植酸酶基本一致,但从大肠杆菌表达的植酸酶蛋白的绝对量来说,其表现的酶活性不到理论酶活性的 5%。进一步的研究发现,其原因有两个:第一,在大肠杆菌中表达的植酸酶 70% 左右以包含体的形式存在,这部分的植酸酶没有活性。我们将重组子表达植酸酶时的诱导温度从 37℃ 降低到 30℃,包含体的比例可降低 50% 左右,在植酸酶总表达量一致的情况下,检测到的酶活性也有所提高。第二,在大肠杆菌中表达的植酸酶其可溶性部分的比活性($\mu\text{g}/\text{mg}$ 可溶性酶蛋白)为 105.2,而原始酶为 150.8,低了约 30%,确切的原因正在进一步研究之中。

REFERENCES(参考文献)

- [1] Nelson T S. The utilization of phytate phosphorus by poultry - a review. *Poult Sci* ,1967 **46** :862~871
- [2] Nelson T S, Shieh T R, Wodzinski R J *et al* . The availability of phytate phosphorus in soya bean meal before and after treatment with a mold phytase. *Poult Sci* ,1968 **47** :1842~1848
- [3] Sharma C B, Goel M, Irshad M. *Myo*-inositol hexaphosphate as a potential inhibitor of α -amylases of different origins. *Phyto-*

chemistry ,1978 **17** :201~204

- [4] Van Gorcom R F M. Cloning and expression of phytase from *Aspergillus*. US Patent 5436156 ,1995
- [5] Bin Y, Yunliu F, Jianhua W *et al* . Cloning and expression of phytase gene. CN Patent CN1184156A ,1998
- [6] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular cloning :A laboratory manual. New York :Cold Spring Harbor Laboratory Press ,1989
- [7] Von Heijne G. A new method for predicting signal cleavage sites. *Nucleic Acids Res* ,1986 **14** :4683~4690
- [8] Ullah A H J, Dischinger Jr H C. Identification of active-site residues in *Aspergillus ficuum* extracellular pH2.5 optimum acid phosphatase. *Biochem Biophys Res Comm* ,1993 **192** :754~759
- [9] Piddington C S, Houston C S, Paloheimo M *et al* . Paloheimo M *et al* . The cloning and sequencing of the genes encoding phytase (*phy*) and pH 2.5-optimum acid phosphatase (*aph*) from *Aspergillus niger* var. *awamori*. *Gene* ,1993 **133** :55
- [10] Mitchell D B, Vogel K, Weimann B J *et al* . The phytase subfamily of histidine acid phosphatases :isolation of genes for two novel phytases from the fungi *Aspergillus terreus* and *Myceliophthora thermophila*. *Microbiology* ,1997 **143** :245~252
- [11] Pasamontes L, Hailer M, Henriquez-Huecas M *et al* . Cloning of the phytases from *Emericella nidulans* and the thermophilic fungus *Talaromyces thermophilus*. *Biochim Biophys Acta* ,1997 **1353** (3) :217~223
- [12] Maugenest S, Martinez I, Lescure A-M. Cloning and characterization of cDNA encoding a maize seedling phytase. *Biochem J* ,1997 **322** :511~517
- [13] Cheng K J, Forsberg C W, Bae H D *et al* . DNA sequences encoding phytase of ruminal microorganisms. Wo 97/48812 ,1997

Cloning of Neutral Phytase Gene *nphy* from *Bacillus subtilis* and its Expression in *Escherichia coli*

YAO Bin^{1*} YUAN Tie-Zheng¹ WANG Yuan-Huo¹ CAO Shi-Shu¹

WANG Ya-Ru¹ SHI Xiu-Yun¹ FAN Yun-Liu²

¹(Feed Research Institute ,Chinese Academy of Agricultural Sciences ,Beijing 100081 ,China)

²(Biotechnology Research Center ,Chinese Academy of Agricultural Sciences ,Beijing 100081 ,China)

Abstract The gene encoding the neutral phytase *nphy* was cloned from *Bacillus subtilis* by polymerase chain reaction (PCR). Nucleotide sequence analysis of *nphy* revealed the presence of an open reading frame of 1152 bp coding for 383 aa. The start codon was followed by a sequence coding for a putative signal peptide of 26 aa in length. The *nphy* without original signal peptide encoding sequence was cloned into *E. coli* expression plasmid pTYB40. The result of SDS-PAGE of the phytase expressed in *E. coli* showed that the *nphy* had been overexpressed. The expressed phytase was over 40% of the total soluble protein of *E. coli* and has normal bioactivity.

Key words neutral phytase , gene cloning , overexpression

Received May 15 2000

This work was supported by the " 863 " Program ,National Sciences and Technology Commission of China (101-03-05-01) .

* Corresponding author. Tel 86-10-68975126 ; Fax 86-10-68975127 ; E-mail: yaobin@public3.bta.net.cn

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