

假单胞菌株 M18 *gacA* 基因的克隆、 表达及蛋白纯化

任慧娟 许煜泉 董德贤 李荣秀*

(上海交通大学生命科学技术学院 生物制造实验室 上海 200240)

摘 要: GacA 是 GacS/A 二元调控系统的一个组分, 克隆假单胞菌株 M18 中的 *gacA* 基因。测序结果同 *Pseudomonas* sp. PAO1 比较, 该基因 2 个碱基的改变未引起氨基酸的改变。将该基因克隆到表达质粒 pET28b (+) 中, 将重组质粒经热激转化至大肠杆菌 BL21 (DE3) 中, IPTG 诱导表达。表达产物经金属螯合层析柱纯化, 蛋白纯度约为 98%, 质谱鉴定证明纯化的蛋白为 GacA 蛋白。CD 谱分析 GacA 包含了 4% α -helix, 48% β -sheet 和 48% 无规则卷曲。GacA 蛋白的获得为进一步研究其晶体结构、生物学性能以及 GacS/A 二元调控系统奠定了基础。

关键词: GacA, 克隆, 表达, 纯化, 质谱鉴定, 圆二色谱

Cloning and Expression of *Pseudomonas* sp. M18 *gacA* Gene and Its Purification

REN Hui-Juan XU Yu-Quan DONG De-Xian LI Rong-Xiu*

(Key Laboratory of Microbial Metabolism of Ministry of Education, College of Life Science and Biotechnology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China)

Abstract: GacA is a component of GacS/GacA two-component system. In this study, *Pseudomonas* sp. M18 *gacA* gene had been successfully cloned and expressed in vector pET28b (+). Plasmid sequencing showed that two bases were different from *Pseudomonas* sp. PAO1 but did not change the amino acid sequence. The constructed recombinant plasmid was transformed to *E. coli* BL21 (DE3) by heat shock method and expressed under induction of IPTG. Ni-NTA was used to purify this his-tag GacA. Its purity reached to 98%. By Peptide Mass Fingerprinting, the obtained protein was confirmed as GacA. Circular dichroism data showed that GacA contained 4% α -helix, 48% β -sheet and 48% random coil. Purified GacA protein could be used for further analysis such as crystal structure, biological characteristics and GacS/A two-component system.

Keywords: GacA, Cloning, Expression, Purification, PMF, CD

感受激酶(Sensor kinase) GacS (Global activator
sensor kinase)和反应调控因子(Response regulator)

GacA (Global antibiotic and cyanide control)是二元
调控系统(Two-component regulatory system)。

基金项目: 国家 863 计划项目(No. 2006AA02Z228)

*通讯作者: Tel: 86-21-34204207; 信箱: rxli@sjtu.edu.cn

收稿日期: 2009-09-28; 接受日期: 2010-01-04

GacS/GacA 系统调控胞外生防因子和致病因子的合成,是抗生素等次级代谢产物合成所必需的。在许多革兰氏阴性菌中,保守的双元调控系统 GacS/GacA 对细菌胞外产物的合成与分泌具有决定性的控制作用。

假单胞菌(*Pseudomonas* sp. M18)是从上海郊区甜瓜根际土壤中分离到的促进植物生长的根际细菌,能同时分泌藤黄绿菌素(Pyoluteorin, Plt)和吩嗪-1-羧酸(Phenazine-1-carboxylic acid, PCA)两种抗生素,对农作物病害具有广泛的抑制作用。迄今为止的文献中, M18 是唯一能同时分泌 Plt 和 PCA 的荧光假单胞菌株^[1]。*gacA* 突变菌株 M18G 合成 Plt 的能力受到完全抑制,而 PCA 的积累约比野生型提高 31 倍左右,两种抗生素的生物合成与积累受 *gacA* 的差异性调控^[2]。*GacA* 可能通过多条途径调控 PCA 的生物合成^[3]。

GacA 最早是由生防菌 *P. fluorescens* CHAO 的研究中提出的^[4]。在这一菌株中, *GacA* 作为抗生素和氰化物产生的整体激活因子,是抗真菌活性和生态适应性所必需的因子^[4-5],其具有整体水平上调节细菌次生代谢物的功能。*P. syringae* pv. *syringae* 的遗传学最早证实了 *GacS* 和 *GacA* 是双元系统的两个组分,随后又在其他几种细菌上得到证明^[6-8]。

革兰氏阴性细菌中,当菌体生长达到一定密度时, *GacS* 能接收某种胞外信号,使 *GacA* 磷酸化, *GacA* 被激活后,在转录或转录后水平上全局性地调控各种细菌生命活动,如次生代谢产物合成、蛋白质分泌、菌体移动及色素的生成等^[9-10]。在致金色假单胞菌 30-84 中, *gacA* 的突变抑制 PCA 的合成,而 M18G 促进 PCA 的合成,这表明双元调控系统 *GacS/GacA* 是合成 PCA 所必需的^[10]。在 M18 和 PAO1 菌株中, *GacA* 对吩嗪类产物合成的调控方式相反,对菌群传感系统的调控也存在着差异性^[11]。

在 *P. fluorescens* CHAO 中存在的一类小 RNA 编码基因 *RsmX*、*RsmY* 和 *RsmZ* 的转录受到 *GacS/GacA* 双元调控系统的正调控^[10], *RsmZ*、*RsmY* 能结合次生代谢物阻抑蛋白 *RsmA*、*RsmE*。在 *P. aeruginosa* 中, *GacA* 通过 *RsmY* 和 *RsmZ* 调节控制菌群传感以及胞外产物的表达。小基因 *rsmZ* 在菌株 2P24 中受到多个基因的调控,并不是只受 *GacA* 的控制^[12]。目前有很多关于 *GacS/GacA* 双元调控系统的信号传导途径的推测^[13-16],关于 *GacA* 的研究报告也均是从分子水平突变 *gacA* 基因进行实验研究,

尚无 *GacA* 蛋白水平的研究。本实验克隆 M18 *gacA* 基因并对 *GacA* 表达和纯化,为下一步研究获得 *GacA* 蛋白的晶体结构奠定了基础。有研究推测 *GacS/GacA* 系统对靶标基因的影响是间接的^[17], *GacA* 蛋白的获得有利于下一步的 *GacA* 与蛋白、或 *GacA* 与 DNA 相互作用的实验研究。*GacS/GacA* 系统作为目前为止研究最为深入的双元组分调控系统,对 *GacA* 的研究将有利于进一步深入了解双元调控机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种与质粒: 原核表达载体 pET28b (+)、假单胞菌株 M18; BL21(DE3) 购自北京全式金生物技术有限公司。

1.1.2 主要试剂: 限制性内切酶、T4 DNA 连接酶购自纽英伦生物技术(北京)有限公司, PCR 试剂、DNA 片段纯化试剂盒均购自天根生化科技(北京)有限公司、其他常用试剂均为国产分析纯。

1.1.3 仪器: 2720 Thermal Cycler PCR 仪和 4700 Proteomics Analyzer 质谱仪是美国 Applied Biosystems 公司产品。

1.1.4 培养基: LB 液体培养基(g/L): 蛋白胨 10, 酵母提取物 5, NaCl 5, 完全溶解于 950 mL 去离子水中,以 5 mmol/L 的 NaOH 调节 pH 至 7.4,定容至 1 L, 1×10^5 Pa 灭菌 20 min。基因工程菌在培养前加入卡那霉素至终浓度 100 μ g/mL。

1.2 方法

1.2.1 引物设计与合成: 根据 GenBank 中 *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 *gacA* 基因序列 (NC_002516),设计合成 2 条引物,上下游引物分别引入 *EcoR* I、*Not* I 酶切位点(下划线部分),由上海英骏生物技术有限公司合成。

PrimerF: 5'-CCGGAATTTCGGTGATTAAGGTGC TGGTGGTCGACG-3';

PrimerR: 5'-ATAAGAATGCGGCCGCCTAGCT GGCGGCATCGACCATGC-3'。

从融化的 M18 假单胞菌细胞悬液中提取基因组 DNA 作为模板,利用上述合成的引物进行 PCR 扩增。反应体系: long *Taq* E (2.5 U/ μ L) 1 μ L, $10 \times$ long *Taq* buffer I 5.2 μ L, dNTP mixture (各 10 mmol/L) 2 μ L, 模板 2 μ L, Primer F 0.5 μ L, Primer R 0.5 μ L, ddH₂O 加至 50 μ L。反应条件: 95°C 4 min;

95°C 1 min, 50°C 2 min, 72°C 3 min, 30 个循环; 72°C 10 min。

1.2.2 重组质粒 pET/*gacA* 的构建: PCR 产物和 pET28b (+), 在 *EcoR* I 缓冲液中进行 *EcoR* I 和 *Not* I 双酶切, 将纯化的 DNA 片段与线性化的 pET28b (+) 载体连接, 热激转化 *E. coli* BL21(DE3)感受态细胞。筛选阳性克隆, 提取质粒, 酶切及 PCR 鉴定并测序。鉴定正确的重组质粒命名为 pET/*gacA*。将 *gacA* 基因序列资料输入 DNAsis 分析软件进行序列分析, 并分别输入 BLASTn 和 BLASTp, 与基因库中的其他同源株核苷酸和蛋白质进行同源性比较。

1.2.3 融合蛋白的诱导表达: 挑选阳性菌株的单菌落, 接种于 3 mL LB 培养基, 37°C 培养 12 h, 2% 的接种量转接至 50 mL 新鲜 LB 培养基, 37°C 培养至 OD_{600} 为 0.7, 加入 IPTG 至终浓度为 1 mmol/L, 37°C 诱导 4 h, 离心收集细菌。在冰上超声波破碎菌体, 180 W、5 min, 收集上清与沉淀, 进行 SDS-PAGE, 以未诱导菌液及 DE3 菌液为对照。

1.2.4 融合蛋白的纯化: Ni-NTA 树脂(2.5 mL)预先用 5 倍树脂体积的裂解缓冲液(12.5 mL)在 4°C 平衡 1 h。将细胞悬浮于裂解缓冲液(20 mmol/L pH 8.0 的 Tris-HCl, 300 mmol/L NaCl, 5 mmol/L 咪唑, 1 mmol/L PMSF, 10%甘油), 1 L 细胞培养液的菌体悬浮于 30 mL 裂解缓冲液。在冰上用超声波裂解菌体。细胞裂解液在 4°C、12000 r/min 条件下离心 1 h, 收集上清液。将收集的细胞裂解上清液, 以 15 mL/h 的流速流过预先平衡的 Ni-NTA 树脂, 使重组蛋白结合在树脂上。用洗涤缓冲液(20 mmol/L pH 8.0 的 Tris-HCl, 300 mmol/L NaCl, 20 mmol/L 咪唑, 1 mmol/L PMSF, 10%甘油)以 20 mL/h 的流速洗涤树脂, 除去非特异性结合的杂蛋白, 直至 OD_{280} 低于 0.01。用洗脱缓冲液(20 mmol/L pH 8.0 的 Tris-HCl, 300 mmol/L NaCl, 200 mmol/L 咪唑, 10%甘油)以 10 mL/h 的流速洗涤树脂, 分步收集(1.0 mL/管)含有目标蛋白的洗脱液。12% SDS-PAGE 检测。

1.2.5 MALDI-TOF-MS 及数据库检索: SDS-PAGE 凝胶上纯化的蛋白条带进行割胶回收, MALDI-TOF-MS 由复旦大学生物医学研究院完成, 获得肽混合物的肽质量指纹谱(Peptide mass fingerprinting, PMF)。应用 Mascot (<http://www.matrixscience.com>) 搜索引擎在 SwissProt 蛋白数据库中进行检索。结果的可靠性用肽段匹配率的得分值(Score)和匹配肽段

在对应蛋白内序列的覆盖率(Sequence coverage)进行评价。

1.2.6 圆二色谱分析: 使用圆二色谱分析, 预测纯化得到 GacA 的二级结构。圆二色谱分析在 Jasco J-715 spectropolarimeter 上进行, 纯化得到的蛋白以 219 μ g/mL 的浓度溶解于水中, 以水溶液校基线; 比色池路径为 1 mm, 从 190 nm 扫描到 250 nm, 3 次测试并取平均数据, 数据提交到 K2d online server (<http://www.emblheidelberg.de/~andrade/k2d.html>) 进行蛋白质二级结构的预测。

2 结果与分析

2.1 *gacA* 融合基因的克隆、鉴定

采用 PCR 法, 扩增 *gacA* 基因片段, PCR 扩增产物经 0.8% 的琼脂糖凝胶电泳鉴定, 在 500–750 bp 处可见 1 条与预期大小(645 bp)相符的条带(图 1)。提取 pET/*gacA* 重组质粒进行酶切鉴定, 结果呈现出与预期结果(5369 bp 和 645 bp)相符的 2 条带(图 1)。DNA 序列分析显示插入的 *gacA* 基因片段与 GenBank (No. NC_002516)中已报道的序列大小一致, 有 2 个碱基不同, 但它们的改变均未引起氨基酸的改变, 二者的基因同源性为 99.69%, 氨基酸序列一致性为 100%。

2.2 目的蛋白的表达与纯化

工程菌 BL21 (DE3)经 IPTG 诱导 3 h 后, 菌体裂解物进行 SDS-PAGE, 在相对分子质量约 27 kD 处

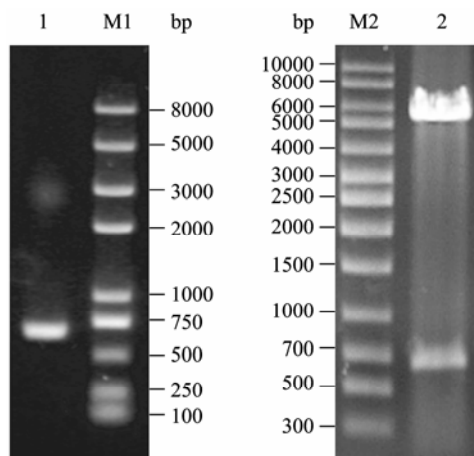


图 1 *gacA* 基因的 PCR 扩增、重组质粒酶切电泳图

Fig. 1 Electrophoresis results of PCR amplification of *gacA* fragment and restriction analysis of recombinant plasmid

注: M1: DNA marker DL2000; 1: *gacA* 片段; M2: 1 kb marker; 2: *EcoR* I/*Not* I 酶切 pET/*gacA* 产物。

Note: M1: DNA marker DL2000; 1: *gacA* fragments; M2: 1 kb marker; 2: pET/*gacA* digested by *EcoR* I and *Not* I.

出现一特异条带,与预期的 GacA-His6 融合蛋白理论大小数值相符(融合端约占 2 kD),而对照(DE3 菌液)无特异条带出现。菌体超声破碎后,离心收集上清,通过 Ni^{2+} 螯合琼脂糖亲和纯化,经 SDS-PAGE 显示,纯化的蛋白为单一条带, GelPro3 软件分析,蛋白纯度达 98% 以上,如图 2 所示。

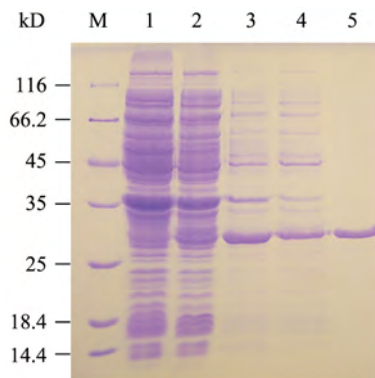


图2 GacA纯化电泳图

Fig. 2 SDS-PAGE analysis of purified GacA protein

注: M: 蛋白中分子质量 Marker; 1: DE3 (对照); 2: 未诱导 pET/gacA; 3: pET/gacA 诱导超声波裂解后的上清; 4: 流穿; 5: 洗脱。

Note: M: Protein marker (Middle); 1: DE3 (Control); 2: Uninduced pET/gacA; 3: Supernatant of induced pET/gacA after sonication; 4: Wash; 5: Elution.

2.3 纯化蛋白的鉴定

纯化的蛋白肽指纹图谱,数据库查询结果为: Protein scores greater than 79 are significant (0.05), Match to: gi|15597782 Score: 344 Expect: 1.7e-028 response regulator GacA [*Pseudomonas aeruginosa* PAO1], Nominal mass (M_r): 23593; Calculated pI value: 5.83, Sequence Coverage: 66%。通过数据库检索(图 3)该蛋白为 GacA。

2.4 GacA 的圆二色谱(CD)分析

圆二色谱分析在水溶液中进行,在测试前,以水为基线校零,200 nm 到 240 nm 之间的数据被取做有效数据(图 4)。有效数据被提交到 K2d online server 来模拟蛋白质二级结构。GacA 包含了 4% α -helix、48% β -sheet 和 48% 无规则卷曲,也就是说 GacA 的二级结构基本上是由 β -sheet 和无规则卷曲构成的。

3 讨论

GacS 将磷酸基团转移到 GacA 保守的天冬氨酸上^[18]。磷酸化的 GacA 激活或阻遏调控元件的转录,从而控制目标基因的表达。GacA 磷酸化使之形成二聚体,而二聚体化正是与靶标 DNA 高亲和力结合所需要的^[19]。GacS/GacA 突变体有两个非常突出的特

Matched peptides shown in grayness

1 MIKVLVDDH DLVRTGITRM LADIEGLQVY QADCGEDCL KLARELKPQV						
51 VLMDVKMPGI GLEATRKLL RSQPDIKVVV VTYCEDPFP TRMQAGAAG						
101 YMTKGAGLEE MVQATROVFA GRYISQIA QQLALKSFQP QHDSFPDSL						
151 SERETQIALM IANCHKVQSI SDKLCLSPKT VNTYRIRIFE KLSITSDVEL						
201 ALLAVRHGMV DAAS						
Start - End	Observed	Mr (expt)	Mr (calc)	Delta	Miss	Sequence
4 - 14	1279.7070	1278.6997	1278.6932	0.0066	0	K. VLVVDDHDLVR. T
4 - 19	1807.9816	1806.9743	1806.9951	-0.0208	1	K. VLVVDDHDLVRTGITR. M
45 - 56	1385.7788	1384.7715	1384.7635	0.0080	0	R. ELKPDVVLMDVK. M
45 - 56	1401.7732	1400.7659	1400.7585	0.0075	0	R. ELKPDVVLMDVK. M
45 - 67	2484.3740	2483.3667	2483.3127	0.0541	1	R. ELKPDVVLMDVKMPGIGGLEATR. K
57 - 67	1101.5789	1100.5716	1100.5648	0.0069	0	K. MPGIGGLEATR. K
57 - 67	1101.5789	1100.5716	1100.5648	0.0069	0	K. MPGIGGLEATR. K
57 - 67	1117.5747	1116.5674	1116.5597	0.0077	0	K. MPGIGGLEATR. K
57 - 68	1229.6647	1228.6574	1228.6597	-0.0023	1	K. MPGIGGLEATR. L
57 - 68	1245.6584	1244.6511	1244.6546	-0.0035	1	K. MPGIGGLEATR. L
78 - 92	1689.8712	1688.8639	1688.8443	0.0196	0	K. VVVVTYCEDPFPTR. L
93 - 104	1241.6206	1240.6133	1240.5944	0.0190	0	R. LMQAGAAGYMTK. G
93 - 104	1257.6360	1256.6287	1256.5893	0.0394	0	R. LMQAGAAGYMTK. G
105 - 116	1273.6643	1272.6570	1272.6496	0.0075	0	K. GAGLEEMVQAIR. Q
105 - 116	1273.6643	1272.6570	1272.6496	0.0075	0	K. GAGLEEMVQAIR. Q
105 - 116	1289.6584	1288.6511	1288.6445	0.0067	0	K. GAGLEEMVQAIR. Q
105 - 123	2060.1072	2059.0999	2059.0632	0.0367	1	K. GAGLEEMVQAIRQVFAGQR. Y
117 - 123	805.4434	804.4361	804.4242	0.0119	0	R. QVFAGQR. Y
124 - 136	1472.8560	1471.8487	1471.8398	0.0089	0	R. YISPIQAQLALK. S
137 - 153	2004.9415	2003.9342	2003.8973	0.0369	0	K. SFQPPQHDSFPDSLSE. E
137 - 153	2004.9415	2003.9342	2003.8973	0.0369	0	K. SFQPPQHDSFPDSLSE. E
180 - 185	753.3979	752.3906	752.3817	0.0089	0	K. YNTYR. Y
186 - 191	855.4838	854.4765	854.4650	0.0115	1	R. YRIFEK. L
188 - 206	2117.2659	2116.2586	2116.2143	0.0443	1	R. IFEKLSITSDVELALLAVR. H
192 - 206	1599.9541	1598.9468	1598.9243	0.0226	0	K. LSITSDVELALLAVR. H

图3 PMF结果

Fig. 3 PMF results

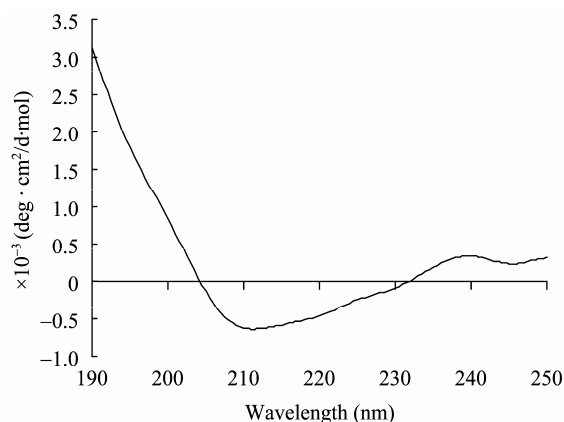


图4 GacA蛋白的圆二色谱

Fig. 4 CD spectra of GacA protein

征: 它导致植物有益假单胞菌部分或全部丧失生防能力; 导致植物或动物致病细菌的病原毒性显著下降。这些 GacS/GacA 控制的表现型的共同点是控制合成胞外产物、即酶和次生代谢产物。

本研究选用的是 pET-28b (+) 载体是一个高效表达载体。pET-28 系列载体具有组氨酸纯化标签, 表达的目的蛋白 N-端带有 6-His 序列, 可用于目的蛋白的亲纯化。表达的 6-His 融合蛋白以可溶性形式存在于胞浆中, 有利于蛋白形成正确的空间构象; 而且 6-His 一般不影响目的蛋白的分泌、构象和生物学活性, 因此不必切除, 可以直接用金属螯合层析柱对表达蛋白进行提取、纯化, 操作简便, 特异性高。

试验中曾尝试用 *Taq* DNA Polymerase、Super *Taq* DNA Polymerase 对 *gacA* 进行 PCR 扩增, 但未获得成功, 采用改变退火温度等反应条件, 仍未得到 PCR 产物。这可能是由于 *gacA* 基因 GC 含量高 (63%), 不易扩增。后采用可适应不同模板的扩增、扩增效率高、保真性能强的 Long *Taq* DNA Polymerase, 结果获得成功扩增。

本研究中采用大肠杆菌表达系统, 成功地表达了融合 GacA 蛋白, 为下一步研究获得 GacA 蛋白的晶体结构奠定了基础。有研究推测 GacS/GacA 系统对靶标基因的影响是间接的^[17], GacA 蛋白的获得为下一步的 GacA 与蛋白、或 GacA 与 DNA 的体外相互作用实验研究提供了基础。

参 考 文 献

- [1] 朱栋华, 徐汪节, 耿海峰, 等. 荧光假单胞菌 M18 *rpoD* 克隆及其对抗生素合成的影响. 微生物学报, 2003, 43(3): 315-323.
- [2] 葛宜和, 黄显清, 王素莲, 等. 假单胞菌 *gacA* 插入突变对藤黄绿脓菌素和吩嗪-1-羧酸合成代谢的差异性调控. 微生物学报, 2004, 44(6): 761-765.
- [3] 汤湘雍, 严安, 黄显清, 等. 假单胞菌株 M18 *gacA* 基因对 BHL 和 HHL 合成正调控及对 PCA 合成负调控无相关性. 微生物学报, 2006, 46(3): 478-481.
- [4] Laville J, Blumer C. Global control in *Pseudomonas fluorescens* mediating antibiotic synthesis and suppression of black root rot of tobacco. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992(89): 1562-1566.
- [5] Natsch A, Keel C. Contribution of the global regulator gene *gacA* to persistence and dissemination of *Pseudomonas fluorescens* biocontrol strains CHAO introduced into soil microcosms. *Appl Environ Microbiol*, 1994(60): 2553-2560.
- [6] Aarons S, Abbas A, Adams C, et al. A regulatory RNA (PrB RNA) modulates expression of secondary metabolite genes in *Pseudomonas fluorescens* F113. *J Bacteriol*, 2000(182): 3913-3919.
- [7] Altier C, Suyemoto M, Ruiz. Characterization of two novel regulatory genes affecting *Salmonella* invasion gene expression. *Mol Microbiol*, 2000b(35): 635-646.
- [8] Bull CT. Characterization of spontaneous *gacS* and *gacA* regulatory mutants of *Pseudomonas fluorescens* Biocontrol strain CHAO. *Antonie van Leeuwenhoek*, 2001(79): 327-336.
- [9] Blumer C, Heeb S, Pessi G, et al. Global GacA-steered control of cyanide and exoprotease production in *Pseudomonas fluorescens* involves specific ribosome binding sites. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999(96): 14073-14078.
- [10] Elisabeth K, Christophe D, Dieter H. Three small RNAs jointly ensure secondary metabolism and biocontrol in *Pseudomonas fluorescens* CHAO. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005(102): 17136-17141.
- [11] 史鸣奇, 李雅乾, 王沂, 等. GacA 对假单胞菌株 M18 两个 *phz* 基因簇和菌群传感的调控. 微生物学报, 2009, 49(10): 1306-1316.
- [12] 姜维芳, 吴小刚, 闫庆, 等. 荧光假单胞杆菌 2P24 中 *gacA*, *dsbA* 和 *phoP/phoQ* 基因对小 RNA 因子 RsmZ 的转录调控. 2008, 48(12): 1588-1594.
- [13] 王沂. 假单胞菌 M18 中全局性基因 *qscR* 和 *gacA* 对次生代谢的调控作用. 上海交通大学硕士学位论文, 2008.
- [14] 魏海雷. GacS/GacA 双因子调控系统和群体感应系统在生防荧光假单胞杆菌 2P24 中的作用. 中国农业大学硕士学位论文, 2004.

- [15] Isabelle V, Andrew L, Isabelle V, *et al.* Multiple sensors control reciprocal expression of *Pseudomonas aeruginosa* regulatory RNA and virulence genes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006(103): 171–176.
- [16] Yang S, Peng Q, San Francisco M, *et al.* Type III secretion system genes of *dickeya dadantii* 3937 are induced by plant phenolic acids. *PLoS ONE*, 2008, 3(8): e2973.
- [17] Stephan Heeb, Caroline Blumer, Dieter Haas. Regulatory RNA as mediator in GacA/RsmA-dependent global control of exoproduct formation in *Pseudomonas fluorescens* CHAO. *J Bacteriol*, 2001(184): 1046–1056.
- [18] Pernestig AK, Melefors O, Georgellis D. Identification of UvrY as the cognate response regulator for the BarA sensor kinase in *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, 2001(276): 225–231.
- [19] Da Re S, Schumacher J, Rousseau P, *et al.* Phosphorylation-induced dimerization of the FixJ receiver domain. *Mol Microbiol*, 1999(34): 504–511.

(上接 p.380)

征 稿 简 则

3.4 摘要写作注意事项

3.4.1 英文摘要:

1) 建议使用第一人称, 以此可区分研究结果是引用文献还是作者得出的; 2) 建议用主动语态, 被动语态表达拖拉模糊, 尽量不用, 这样可以避免好多长句, 以求简单清晰; 3) 建议使用过去时态, 要求语法正确, 句子通顺; 4) 英文摘要的内容应与中文摘要一致, 但可比中文摘要更详尽, 写完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。5) 摘要中不要使用缩写语, 除非是人人皆知的, 如: DNA, ATP 等; 6) 在英文摘要中, 不要使用中文字体标点符号。

3.4.2 关键词: 应明确、具体, 一些模糊、笼统的词语最好不用, 如基因、表达……

4 特别说明

4.1 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登录号 (Accession No.) 后再投来。

4.2 关于版权

4.2.1 本刊只接受未公开发表的文章, 请勿一稿两投。

4.2.2 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。

4.2.3 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。

4.2.4 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。

4.3 审稿程序及提前发表

4.3.1 来稿刊登与否由编委会最后审定。对不录用的稿件, 一般在收稿 2 个月之内通过 E-mail 说明原因, 作者登陆我刊系统也可查看。稿件经过初审、终审通过后, 作者根据编辑部返回的退修意见进行修改补充, 然后以投稿时的用户名和密码登陆我刊网址上传电子版修改稿, 待编辑部复审后将给作者发送稿件录用通知单, 请作者将修改稿纸稿和签字盖章后的承诺书一并寄回编辑部, 按照稿号顺序进入排队发表阶段。

4.3.2 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、赠送样刊及单行本。

6 联系我们

地址: 北京市朝阳区北辰西路 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(100101)

Tel: 010-64807511

E-mail: tongbao@im.ac.cn

网址: <http://journals.im.ac.cn/WSWXTBCN>