

趋化因子受体 CXCR4b 在大肠杆菌中的 高效表达、增溶及纯化

孙海翔^{1*} 葛保胜² 许耀¹

(1. 中国石油大学(华东)化学化工学院 山东 青岛 266555)
(2. 中国石油大学(华东)生物工程与技术中心 山东 青岛 266555)

摘要: 膜蛋白在细胞分化、信号转导等生理活动中发挥着重要作用, 然而膜蛋白结构与功能的研究却受到高质量蛋白制备的严重制约。将斑马鱼趋化因子受体 CXCR4b 基因克隆到 pMAL-p4x 表达载体中, 在大肠杆菌 TB1 中表达麦芽糖结合蛋白(MBP)-CXCR4b 融合蛋白。通过系统优化其发酵表达条件, 实现了 CXCR4b 的过量表达。最佳表达条件为: 宿主菌选用大肠杆菌 TB1, TB 培养基, 诱导剂 IPTG 浓度为 0.5 mmol/L, 诱导时机为对数中后期。通过对 10 种不同表面活性剂的筛选, 发现 DM、FC-14 和 Brij35 等表面活性剂对 CXCR4b 有较好的增溶效果。利用 Ni²⁺亲和色谱和 S200 凝胶色谱两步纯化, 得到 CXCR4b 的纯度可达 90%以上。圆二色谱检测显示纯化的 CXCR4b 呈典型的 α 螺旋结构。

关键词: G 蛋白偶联受体, 趋化因子受体 CXCR4b, 表达优化, 纯化, 表面活性剂

High-level Expression, Solubilization and Purification of Chemokine Receptor CXCR4b in *Escherichia coli*

SUN Hai-Xiang^{1*} GE Bao-Sheng² XU Yao¹

(1. College of Chemistry and Chemical Engineering, China University of Petroleum, Qingdao, Shandong 266555, China)
(2. Center for Bioengineering and Biotechnology, China University of Petroleum, Qingdao, Shandong 266555, China)

Abstract: Membrane protein plays a vital role in cellular differentiation and signal transduction. However, the study of structure and function of membrane protein is still limited due to lack of the efficient preparation for enough high quality membrane proteins. In this paper, zebrafish CXCR4b gene was cloned into pMAL-p4x vector, then was expressed as a fusion of MBP-CXCR4b in *E. coli* TB1. Over-expression of CXCR4b was achieved after optimizing expression conditions systematically. The optimal expression conditions were obtained as: *E. coli* TB1 as host strain, TB medium, concentration of IPTG 0.5 mmol/L, inducing at the late mid-logarithmic growth phase. Totally 10 surfactants were screened for their ability to successfully solubilize CXCR4b from cell membranes. As a result, DM, FC-14 and Brij35 exhibited good solubilizing ability for CXCR4b. CXCR4b was then purified using Ni²⁺ chelating affinity chromatography followed with gel filtration S200. The purified protein showed cor-

基金项目: 中国石油大学(华东)博士基金项目(No. Y060418)

* 通讯作者: ✉ sunhaixiang@upc.edu.cn

收稿日期: 2009-11-03; 接受日期: 2010-02-26

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

rect apparent molecular weight on SDS-PAGE and the purity was up to 90%. A typical α helical structure was determined with circular dichroism analysis, which means that the purified CXCR4b had folded into a reasonable conformation.

Keywords: G protein coupled receptor, Chemokine receptor CXCR4b, Expression optimization, Purification, Surfactant

CXCR4 属于具有 7 次跨膜螺旋的 G 蛋白偶联受体(GPCR)超家族^[1], 它与基质生长因子(SDF-1)相结合在胚胎发育、肿瘤迁移、血管生成等重大生理活动中发挥着重要作用。大量研究结果表明, 关于 CXCR4 结构与功能的研究对于人们理解多种疾病的发病机理, 以及寻找更有效的治疗药物都具有重要的指导意义^[2]。但由于 CXCR4 在体内表达量很低, 所以靠天然提取基本上是不可能的, 只能通过异源表达获取^[3]。

目前常见的膜蛋白表达系统有大肠杆菌^[4-7]、酵母^[8]、动物细胞^[9-10]或病毒^[11]以及无细胞表达体系。其中后两种表达体系已被证明可以成功表达具有生物活性的膜蛋白, 但由于其表达成本昂贵, 大部分局限于膜蛋白的功能分析及药物筛选等方面的研究。

大肠杆菌和酵母表达体系由于操作简单、成本低廉和易于大规模培养等优点而在蛋白质结构生物学研究中被广泛采用。其中由大肠杆菌表达的蛋白占到了 PDB 中获得解析结构蛋白总量的 90% 左右。由于 CXCR4 属于真核膜蛋白, 对细菌具有一定的毒性, 所以表达量偏低, 且容易形成包涵体。如何通过系统优化发酵表达条件, 实现其过量正确表达, 是获得大量 CXCR4 的重要前提。Marullo^[5]将 $\beta 2$ 肾上腺素受体与麦芽糖结合蛋白(MBP)融合表达, 以增强细菌中膜蛋白的可溶性表达, 同时 MBP 还可以牵引目的蛋白到周质空间进行充分折叠, 并插入到质膜上。采用上述方式首次在大肠杆菌中表达出了具有配基结合活性的 GPCR 受体, 证明了利用大肠杆菌表达活性 GPCR 的可行性。继而 5-羟色胺受体(5HT1a)也用同样的方式表达成功, 且表达量有了进一步的提高^[6]。Grisshammer 等^[7]将鼠神经降压素受体(NTR)的 N 末端删去, 代之以 MBP, 以增强其可溶性表达并帮助其顺利运转到质膜, 可以表达得到毫克级的活性 MBP-NTR 融合蛋白。

本研究通过将斑马鱼 CXCR4b 基因与 MBP 基因相融合, 在大肠杆菌中表达 MBP-CXCR4b 融合蛋白, 通过系统优化 CXCR4b 表达条件, 成功实现了 CXCR4b 的高效表达。同时还对 CXCR4b 最适去污

剂进行了筛选, 建立了 CXCR4b 简便快速的纯化技术路线, 并对纯化后的重组蛋白进行了初步表征。

1 材料与方法

1.1 菌株、质粒和试剂

表达载体 pMAL-p4x、宿主菌 TB1 购自 New England Biolabs, 大肠杆菌感受态菌株 BL21 (DE3)、BL21 (DE3) pLysS、Top10 和抗 $6 \times \text{His tag}$ 单克隆抗体购自天根生物工程公司。

Dodecyl Maltoside (DM, 十二烷基麦芽糖)、Octyl-D-Glucopyranoside (OG, 辛烷基吡喃葡萄糖)、Triton X-114 (Trx-114)、Tween 80 (TW-80)、Tween 20 (TW-20)和 SDS 均购自 Sigma 公司, Triton X-100 (Trx-100)购自 Promega 公司, Brij35 (聚氧乙烯月桂醚)购自上海生物工程公司, Zwittergent 3-16 (ZW3-16)购自 EMD 公司, FC-14 购自 Anatrance 公司, 其余试剂均为国产分析纯。

1.2 实验方法

1.2.1 CXCR4b 融合表达质粒的构建: 斑马鱼 CXCR4b 基因由南京金斯特生物工程公司合成。设计基因时在 CXCR4b C-末端融合 $6 \times \text{His tag}$, 便于下游纯化。将 CXCR4b 基因通过亚克隆的方式克隆到 pMAL-p4x 质粒 Ptac 启动子控制的麦芽糖结合蛋白基因(*malE* 基因)下游 *EcoR* I 和 *Hind* III 位点处, 使 CXCR4b 基因的 N-末端与 *malE* (MBP)融合表达, 形成 MBP-CXCR4b 融合蛋白, 以帮助膜蛋白的正确折叠并增强其可溶性表达。

1.2.2 CXCR4b 表达条件优化: 上述构建的 pMAL-p4x/CXCR4b 质粒经测序验证正确后, 分别转入大肠杆菌 TB1、TOP10、BL21 (DE3)和 BL21 (DE3) pLysS 菌株中。挑取单菌落加入到含终浓度 100 mg/L 氨苄青霉素的 5 mL LB 培养基中, 37°C 恒温摇床培养过夜。按 1:100 (*V/V*)的比例, 将上述过夜培养菌液分别接种到新鲜的 LB、TB 和 2YT 培养基中(含终浓度为 100 mg/L 的氨苄青霉素), 37°C、170 r/min 恒温摇床培养至 OD_{600} 值为 0.6–0.8, 将培养温度降至 18°C, 分别加入终浓度为 0.5 mmol/L 的诱导剂

IPTG, 继续低温诱导培养。每小时取出 2 mL 菌液, $10000 \times g$ 离心 1 min 收集菌体, -20°C 保存, 以备后续检测, 总培养时间为 48 h。将收集到的菌体用含 1% (V/V) Trx-100 的磷酸盐缓冲液悬浮后, 超声破碎, 取 3 μL 清液点于硝酸纤维素膜(Protrean BA85, Whatman)上, 封闭后分别用鼠抗 His tag 单克隆抗体为一抗, HRP 标记的山羊抗鼠 IgG 为二抗, 利用点杂交技术(Dot blot)分析 CXCR4b 在不同宿主菌和培养基中的表达情况。点杂交技术检测在 FLA-5100 多功能成像仪(富士, 日本)上进行, 斑点灰度分析利用该仪器自带的 MultiGauge Ver.3.X software 进行。

在获得最适宿主菌和培养基的基础上进行诱导时机和诱导剂浓度的优化。诱导时机分别选择在 OD_{600} 值为 1.372、1.750、2.328 和 2.510 时, 诱导剂 IPTG 的终浓度分别设为 0.1、0.2、0.3、0.5 和 1.0 mmol/L。其他诱导培养条件及分析方法同上。

1.2.3 去污剂筛选: 在上述最适条件下诱导培养 CXCR4b 工程菌 50 mL, $10000 \times g$ 离心 5 min 收集菌体, 加入不含去污剂的磷酸盐缓冲液悬浮, 超声破碎。将破碎液均匀分成 10 份, 分别加入 DM、OG、Brij 35、FC-14、ZW3-16、Trx-100、Trx-114、TW-80、TW-20 和 SDS 等去污剂, 使其终浓度为 1% (V/V, 除 OG 为 2% 外), 于 4°C 振荡增溶 1 h。 $13000 \times g$ 离心 5 min。取上清液 3 μL , 点于硝酸纤维素膜上, 利用点杂交技术检测上清液中目的蛋白的含量。

1.2.4 CXCR4b 的纯化: 将优化培养的 pMAL-p4x/CXCR4b 菌液 2 L, 离心收集菌体, 再加入悬浮缓冲液[PBS pH 7.4, 1 mmol/L 苯甲基磺酰氟(PMSF)]充分悬浮, 超声破碎。先 $12000 \times g$ 离心 30 min, 上清液再经 $100000 \times g$ 超速离心 1 h, 收集粗膜组分。将粗膜组分溶于增溶缓冲液(PBS pH 7.4, 1 mmol/L PMSF, 1% FC-14)中, 4°C 增溶过夜, 离心去除未溶解蛋白。将上清液以一定流速通过预先用缓冲液 A (PBS pH 7.4, 0.5 mol/L NaCl, 0.02% FC-14, 25 mmol/L 咪唑)平衡的 Ni^{2+} 螯合亲和柱, 然后用 10 倍体积的缓冲液 A 洗涤未结合的蛋白。最后用洗脱缓冲液(缓冲液 A 含 500 mmol/L 咪唑)洗脱目标蛋白。将 Ni^{2+} 柱洗脱组分浓缩后, 用 S200 凝胶过滤层析柱进一步纯化, 收集洗脱蛋白。

将上述收集样品与 $2 \times \text{SDS-PAGE}$ 上样缓冲液 1:1 混合, 室温放置 5–10 min 后直接加样到 Invitrogen 4%–16% 的 NuPAGE 电泳预制胶内, 140 V 电泳 50 min。Western blot 检测利用鼠抗 His tag 单

克隆抗体为一抗, HRP 标记的山羊抗鼠 IgG 为二抗, 转膜后杂交步骤同点杂交技术。

1.2.5 CXCR4b 的圆二色光谱分析: 收集上述 S200 洗脱蛋白组分, 利用 Bio-Logic MOS-450 圆二色光谱仪检测蛋白的二级结构。测定条件: 狭缝宽度为 5 nm, 扫描速度 0.5 s/点, 扫描范围 190 nm–250 nm, 采用 1 mm 的石英比色皿。

2 结果与讨论

2.1 CXCR4b 表达条件优化

2.1.1 宿主菌筛选: 由于表达的膜蛋白会插入到宿主菌细胞膜上, 对宿主菌的生长产生一定的毒性, 因此宿主菌的选择对膜蛋白的表达具有较大影响。良好的宿主菌应该与重组质粒相容性好, 并且对所表达膜蛋白的毒性具有一定的耐受性。我们考察了 CXCR4b 在 4 种常见大肠杆菌菌株 TB1、TOP10、BL21 (DE3)、BL21 (DE3) plysS 的诱导表达情况。由图 1A 可见, CXCR4b 在大肠杆菌 TB1 中表达效果最好, 其次为 TOP10, 而在 BL21 (DE3) 和 BL21 (DE3) plysS 中表达最差。

2.1.2 培养基筛选: 培养基对细胞生长和外源蛋白的表达都有显著影响。我们分别考察了 3 种常见细菌培养基 LB、TB、2YT 对 CXCR4b 诱导表达的影响。由图 1B 可见 CXCR4b 工程菌株在 TB 培养基中表达效果最好, 而在 LB 和 2YT 培养基中表达量都很低。对比 3 种培养基成分可知, TB 培养基营养丰富, 且含有磷酸盐缓冲体系, 可以有效稳定培养基 pH 值, 较好地保持质粒和表达蛋白的稳定性, 表达效果较好。而另外两种培养基所含营养物质较少, 而且没有像 TB 培养基一样的 pH 稳定体系, 这对本身 pH 逐渐降低的蛋白表达过程较为不利。

在 TB 培养基中, 经 0.5 mmol/L IPTG 诱导 3 h 时, CXCR4b 的表达量最大, 而后随着时间的延长表达量逐渐降低(图 1B)。由菌体在 3 种培养基中的生长情况来看, 菌株在 TB 培养基中生长情况良好, 诱导 3 h 后菌体 OD_{600} 最高可达 1.126, 其他两种培养基分别为 0.666 和 0.732。

2.1.3 诱导剂浓度优化: 图 1C 为不同诱导剂浓度对 CXCR4b 表达效果的影响。随着诱导剂浓度的增加, CXCR4b 的诱导表达效果逐渐增强, 在 0.5 mmol/L 时达到最佳诱导效果。当诱导剂浓度增加为 1 mmol/L 时, 表达量反而略有下降。这可能是由于高浓度诱导剂对大肠杆菌产生一定毒性所致。

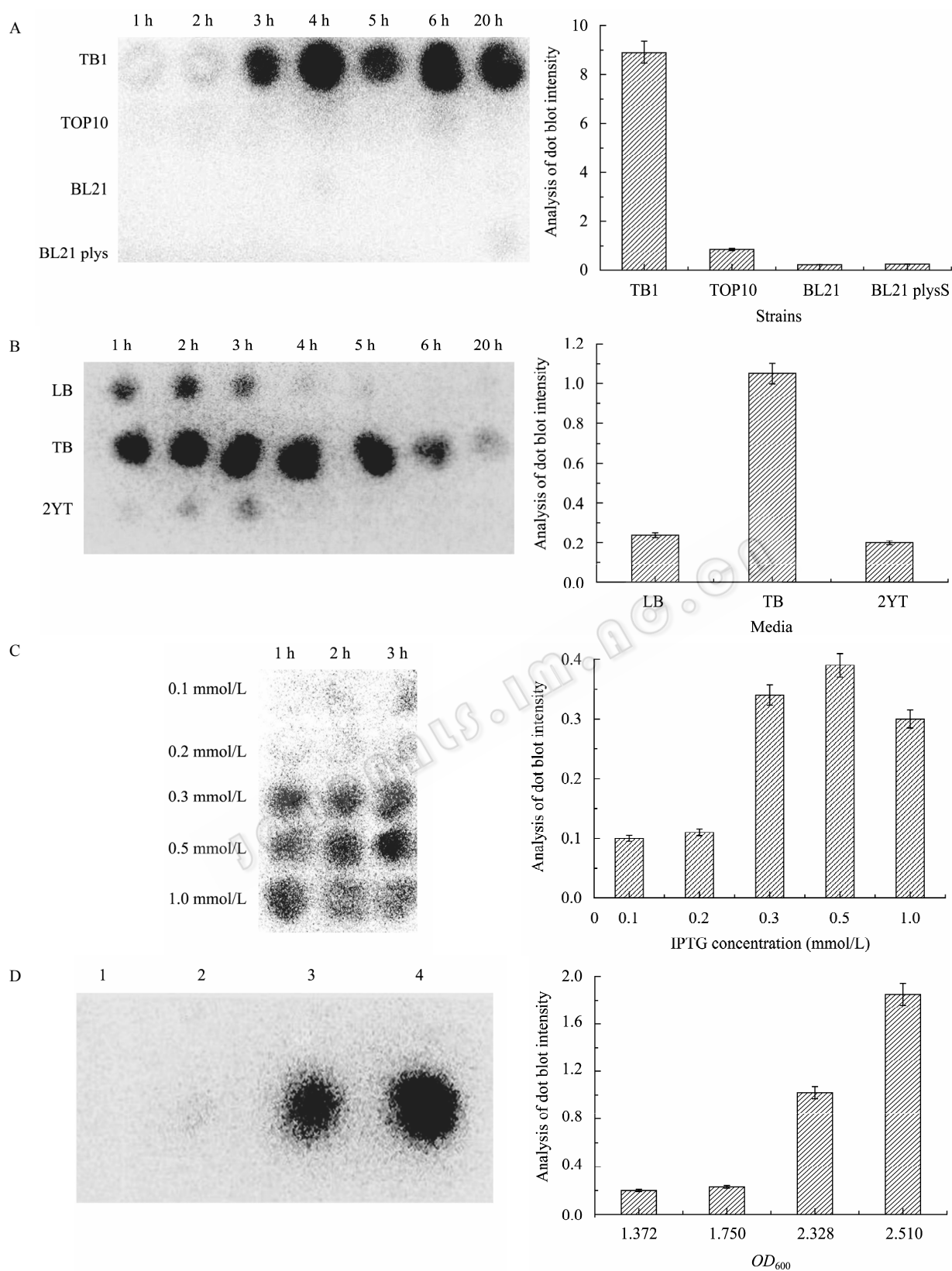


图 1 CXCR4b 表达条件的优化

Fig. 1 Optimization of CXCR4b expression conditions

注: 图中 A、B、C 和 D 分别为宿主菌、培养基、诱导剂 IPTG 浓度和诱导时机对 CXCR4b 表达量的影响(左边为点杂交图, 右边为相应的光密度分析图)。

Note: Influence of (A) host strains, (B) culture media, (C) IPTG concentration and (D) induction phase on high level expression of CXCR4b in *E. coli* (Left: image of dot blot; Right: analysis of dot blot intensity).

2.1.4 诱导时机优化: 诱导时机过早或者过晚都会导致外源蛋白表达量的下降, 甚至检测不到目的蛋白表达。对于可溶性蛋白来说, 最佳诱导时机往往在对数生长期中期, 即 OD_{600} 值在 0.6–0.8 之间加入诱导剂诱导最有利于蛋白的表达。研究发现, 诱导培养 3 h 菌体 OD_{600} 基本保持不变, 甚至缓慢下降。如果诱导过早将会导致单位体积菌体生长量较低, 从而降低单位体积的蛋白表达量。而诱导过晚, 菌体出现老化现象往往导致外源蛋白表达量过低, 因此对诱导时机的选择就显得尤为重要。

我们选择了 4 个不同菌体浓度(OD_{600} 分别为 1.372、1.750、2.328 和 2.510)进行诱导, 考察诱导培养 3 h 后 CXCR4b 在大肠杆菌中的表达情况。如图 1D 所示, CXCR4b 的表达量随着加入诱导剂时菌液 OD_{600} 的增加而增加。这就提示我们对于毒性较大的蛋白来说, 当培养菌体达到一定浓度时再进行诱导, 往往可以获得较高表达量的目的蛋白。本研究确定在 37°C 培养 5 h 后(菌体 OD_{600} 达到 2.51 左右)进行诱导, 可以获得大量的目的蛋白。

2.2 表面活性剂筛选

由于膜蛋白一般具有较强的疏水性, 因此在膜蛋白的纯化及结构与功能研究中需要加入表面活性剂帮助其在水溶液中保持溶解和充分折叠。然而到目前为止, 还没有任何一种成功的表面活性剂可以适用于各种膜蛋白, 不同表面活性剂的选择也还没有任何现成的规律可循。对于特定膜蛋白来说, 还需进行系统的筛选来确定最适表面活性剂^[12–14]。

我们选择了膜蛋白研究中常用的 10 种表面活性剂, 包括 DM、OG、FC-14、Brij 35、ZW3-16、Trx-100、Trx-114、TW-80、TW-20 和 SDS。其中 DM 和 OG 已被成功应用于膜蛋白结晶学研究, FC-14 已被报道广泛应用于 G 蛋白偶联受体的研究中。由图 2 可见, FC-14 对膜蛋白 CXCR4b 的增溶作用最好, 然后是 DM > Brij35 > TW-20 > TW-80 > Trx-100 > SDS。总的来说, FC-14、DM 和 Brij35 对 CXCR4b 的增溶效果比较好。基于成本考虑, 在后继实验中我们选择用 Brij35 作为增溶 CXCR4b 的表面活性剂。

2.3 膜蛋白 CXCR4b 的纯化

将增溶后的 CXCR4b 溶液利用 Ni^{2+} 螯合亲和柱进行纯化, 分别经 50 mmol/L 咪唑和 500 mmol/L 咪唑洗脱得到两个洗脱峰(图 3A), 经点杂交检测发现 50 mmol/L 咪唑洗脱组分为杂蛋白, 500 mmol/L

咪唑洗脱组分为目的蛋白。收集 500 mmol/L 咪唑洗脱组分, 经离心超滤浓缩后, 上样到 S200 凝胶过滤层析, 分离出两个峰(图 3B)。

用 SDS-PAGE 分析 S200 凝胶过滤层析分离出的两个峰, 结果发现峰 1 主要为 CXCR4b 聚集体和多体的混合物, 其中趋化因子受体 CXCR4b 单体的分子量在 55 kD (图 4), 与预测分子量基本一致。纯化后的 CXCR4b 在 102 kD 处也有一明显条带, 根据文献报道, GPCR 容易形成二聚体或多聚体, 并且利用 SDS-PAGE^[10,15–16]、免疫共沉淀^[17]、荧光共振能量转移^[18]等多种技术检测到了二聚体或多聚体的存在, 我们推测该 102 kD 条带为 CXCR4b 的二聚体条带, 峰 2 主要为小分子降解体。经两步纯化后, CXCR4b 的电泳纯度达到 90% 以上, 得率约为 1.6 mg/L 发酵液。

2.4 CXCR4b 的圆二色谱分析

圆二色谱分析(图 5)表明, 纯化后的趋化因子受体 CXCR4b 在 196 nm 处有一正峰, 在 210 nm 和 219 nm 处分别有一负峰, 为典型的 α 螺旋结构。据预测, 天然 CXCR4 为具有 7 次跨膜 α 螺旋结构的膜蛋白, 其 α 螺旋结构含量约为 50%^[15]。这预示着纯化得到的 CXCR4b 已折叠为较合理的构象, 可以用于进一步的结构与功能分析。

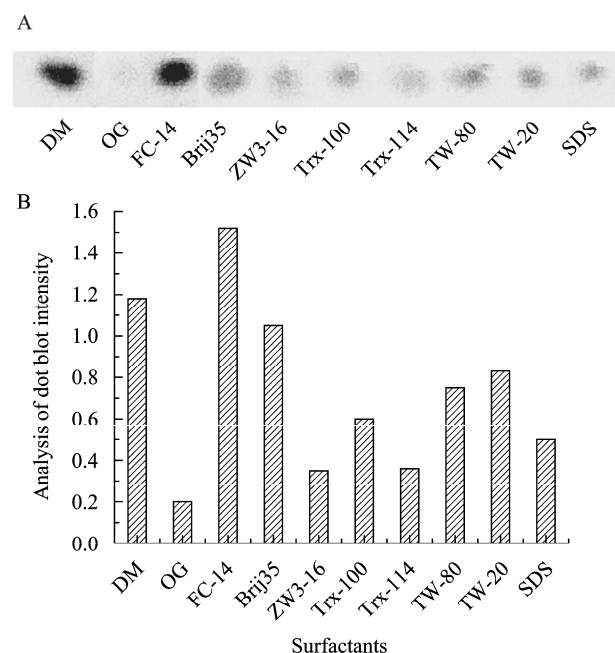


图2 表面活性剂对膜蛋白 CXCR4 增溶效果图(A 为点杂交图, B 为相应的光密度分析图)

Fig. 2 Surfactant screening for successfully solubilization of CXCR4 fused with MBP (A: Image of dot blot; B: Analysis of dot blot intensity.)

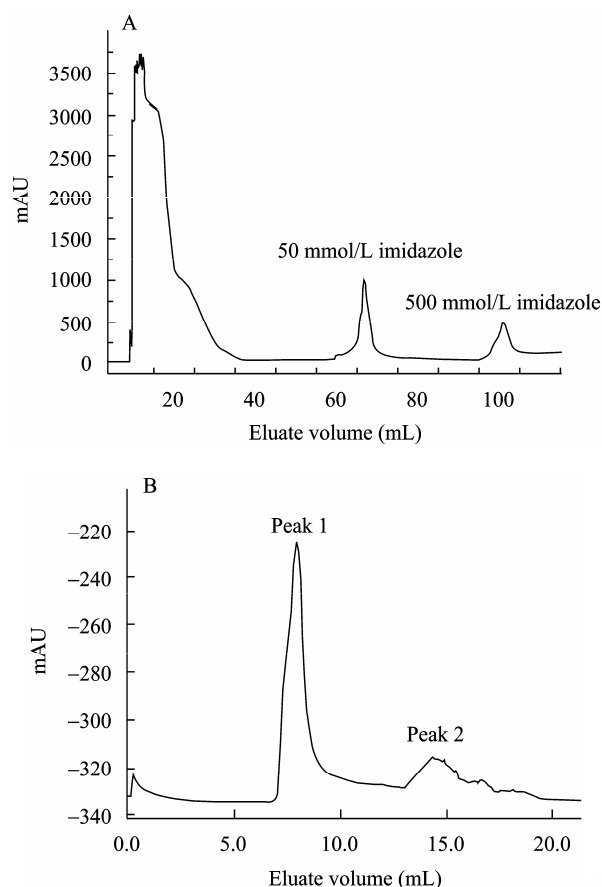


图 3 Ni^{2+} 亲和色谱柱(A)和 S200 凝胶过滤层析(B)纯化 CXCR4b 色谱图

Fig. 3 Purification of CXCR4b using Ni^{2+} chelating affinity chromatography (A) and S200 gel filtration chromatography (B)

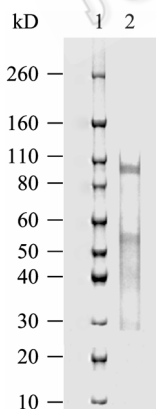


图 4 CXCR4b 的 SDS-PAGE 电泳图

Fig. 4 SDS-PAGE analysis of purified CXCR4b

Note: 1: Marker; 2: Purified CXCR4b.

3 结论

通过系统优化诱导表达条件, 在大肠杆菌体内实现了斑马鱼 CXCR4b 的高效表达, 得出了其最

佳表达条件为: 选用大肠杆菌 TB1 为宿主菌, TB 培养基, 诱导时机为对数生长中后期, 诱导剂浓度为 0.5 mmol/L IPTG。通过对 10 种表面活性剂的筛选, 发现 DM、FC-14 和 Brij35 等表面活性剂对 CXCR4b 具有较好的增溶效果。利用 Ni^{2+} 螯合亲和柱结合凝胶过滤 S200 初步建立了 CXCR4b 的纯化方法。圆二色谱检测结果显示纯化后的 CXCR4b 呈典型的 α 螺旋结构, 表明其已折叠成较为合理的构象。

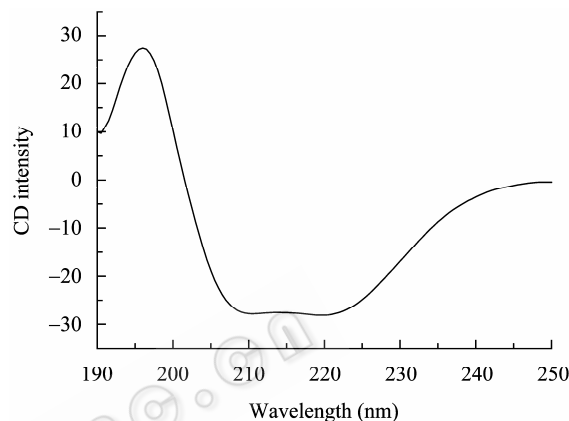


图 5 膜蛋白 CXCR4b 的圆二色谱检测图

Fig. 5 Circular dichroism analysis of purified CXCR4b expressed in *E. coli*

参考文献

- [1] Gether U. Uncovering molecular mechanisms involved in activation of G protein-coupled receptors. *Endocr Rev*, 2000, **21**(1): 90–113.
- [2] Bailey WJ, Vanti WB, George SR, *et al.* Patent status of the therapeutically important G-protein-coupled receptors. *Expert Opin Ther Patents*, 2001, **11**(12): 1861–1887.
- [3] Lundstrom K. Structural genomics of GPCRs. *Trends Biotechnol*, 2005, **23**(2): 103–108.
- [4] Mancia F, Hendrickson WA. Expression of recombinant G-protein coupled receptors for structural biology. *Mol Biosyst*, 2007, **3**(10): 724–734.
- [5] Marullo S, Delavier KC, Eshdat Y, *et al.* Human beta 2-adrenergic receptors expressed in *Escherichia coli* membranes retain their pharmacological properties. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1988, **85**(20): 7551–7555.
- [6] Bertin B, Freissmuth M, Breyer RM, *et al.* Functional expression of the human serotonin 5-HT1A receptor in *Escherichia coli*. Ligand binding properties and interaction with recombinant G protein alpha-subunits. *J Biol Chem*, 1992, **267**(12): 8200–8206.
- [7] White JF, Trinh LB, Shiloach J, *et al.* Automated large-scale purification of a G-protein-coupled receptor for neurotensin. *FEBS Lett*, 2004, **564**(3): 289–293.

- [8] Minic J, Sautel M, Salesse R, *et al.* Yeast system as a screening tool for pharmacological assessment of G protein coupled receptors. *Curr Med Chem*, 2005, **12**(8): 961–969.
- [9] Reeves PJ, Klein SJ, Getmanova EV, *et al.* Expression and purification of rhodopsin and its mutants from stable mammalian cell lines: application to NMR studies. *Biochem Soc Trans*, 1999, **27**(6): 950–955.
- [10] Brian LC, Karin EE, Hyeyoun C, *et al.* Study of a synthetic human olfactory receptor 17-4: Expression and purification from an inducible mammalian cell line. *PLoS ONE*, 2008, **3**(8): e2920.1–9.
- [11] Lundstrom K. Semliki Forest virus vectors for rapid and high-level expression of integral membrane proteins. *Biochim Biophys Acta*, 2003, **1610**(1): 90–96.
- [12] Tucker J, Grisshammer R. Purification of a rat neurotensin receptor expressed in *Escherichia coli*. *Biochem J*, 1996(317): 891–899.
- [13] Liitti S, Matikainen MT, Scheinin M, *et al.* Immunoaffinity purification and reconstitution of human α_2 -adrenergic receptor subtype C2 into phospholipid vesicles. *Protein Expr Purif*, 2001, **22**(1): 1–10.
- [14] Zhao XJ, Nagai Y, Reeves PJ, *et al.* Designer short peptide surfactants stabilize G protein-coupled receptor bovine rhodopsin. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, **103**(47): 17707–17712.
- [15] Ren H, Yu DY, Ge BS, *et al.* High-Level production, solubilization and purification of synthetic human GPCR chemokine receptors CCR5, CCR3, CXCR4 and CX3CR1. *PLoS ONE*, 2009, **4**(2): e4509. 1–15.
- [16] Kaiser L, Graveland BJ, Steuerwald D, *et al.* Efficient cell-free production of olfactory receptors: detergent optimization, structure, and ligand binding analyses. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, **105**(41): 15726–15731.
- [17] Lohse MJ. Dimerization in GPCR mobility and signaling. *Curr Opin Pharmacol*, 2010, **10**(1): 53–58.
- [18] Fung JJ, Deupi X, Pardo L, *et al.* Ligand-regulated oligomerization of β_2 -adrenoceptors in a model lipid bilayer. *EMBO J*, 2009, **28**(21): 3315–3328.

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; 微生物蛋白组学研究; 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