

聚球藻 7002 嗜铁素的检测与分离

高风正 赵元晖 赵剑光 曾名湧*

(中国海洋大学 食品科学与工程学院 山东 青岛 266003)

摘要:【目的】探究聚球藻 7002 嗜铁素的检测和分离方法,为深入研究海洋嗜铁素提供科学依据。【方法】在缺铁 Medium A 中培养聚球藻 7002,利用双层平板法、混合平板法和传统铬天青 S (CAS)平板法定性检测嗜铁素,用 CAS 蓝色液体检测液定量检测嗜铁素。采用大孔树脂 XAD-2 和固定化金属离子亲和层析(IMAC)对嗜铁素进行分离,IMAC 采用降低 pH 和竞争性洗脱两种洗脱方式。【结果】混合平板定性检测法更快速、高效、便捷。缺铁培养的聚球藻 7002 发酵液中,嗜铁素的相对含量高达 93.50%。大孔树脂分离,上样液 pH 调为 2.0 时,嗜铁素吸附充分,分离效果较好。试验发现,分离得到的聚球藻 7002 嗜铁素在 254 nm 紫外下具有明显的荧光特性。【结论】试验得到了聚球藻 7002 嗜铁素定性检测和分离的有效方法。

关键词: 聚球藻 7002, 铬天青 S, 大孔树脂 XAD-2, 固定化金属离子亲和层析

Detection and separation of the siderophores from *Synechococcus* sp. PCC 7002

GAO Feng-Zheng ZHAO Yuan-Hui ZHAO Jian-Guang ZENG Ming-Yong*

(College of Food Science and Engineering, Ocean University of China, Qingdao, Shandong 266003, China)

Abstract: [Objective] In order to provide a scientific basis for further research of marine siderophores, detection and separation methods of the siderophores from *Synechococcus* sp. PCC 7002 were investigated. [Methods] *Synechococcus* sp. PCC 7002 was cultivated in iron-limited Medium A. We used two-layer plate, mixture plate and traditional chromazurol S plate to detect the siderophores qualitatively. The relative amount of siderophores was detected by the chromazurol S shuttle assay. Amberlite XAD-2 resin and immobilized metal-chelating affinity chromatography were used for siderophores separation. Two different elution methods (pH reduced elution and competitive elution) were utilized in immobilized metal-chelating affinity chromatography. [Results] Mixture plate was more rapid, efficient and convenient among the three qualitative detection methods. The relative amount of siderophores from the iron-limited culture was up to 93.50%. Siderophores adsorbed sufficiently into Amberlite XAD-2 resin and the separating efficiency was relatively high when the sample pH was adjusted to 2. Strong fluorescence of siderophores from *Synechococcus* sp. PCC 7002 was observed at 254 nanometer ultraviolet light. [Conclusion] In present study, we got the effective

基金项目: 高等学校博士学科点专项科研基金项目(No. 20120132110022); 山东省科技发展计划项目(No. 2013GGE29003)

*通讯作者: Tel: 86-532-66782783; 信箱: mingyz@ouc.edu.cn

收稿日期: 2014-05-28; 接受日期: 2014-07-25; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2014-08-19

detection and separation methods of siderophores from *Synechococcus* sp. PCC 7002.

Keywords: *Synechococcus* sp. PCC 7002, Chromazurol S, Amberlite XAD-2 resin, Immobilized metal-chelating affinity chromatography

嗜铁素(Siderophore)是一类由禾本科植物、细菌、真菌以及蓝细菌分泌的,用来对抗环境中铁元素缺乏状况的次级代谢产物,其分子量一般较小(1–2 kD)^[1]。它们通常含有能螯合 Fe^{3+} 的去质子化的异羟肟酸功能基团和儿茶酚残基的配位基团^[2]。迄今为止已有 500 多种化合物被定义为嗜铁素。嗜铁素从分子结构上可以分为三类:邻苯二酚类、羟肟酸类和 α -羟基羧化物类嗜铁素^[3]。含有两类及以上螯合基团的嗜铁素被称为混合型嗜铁素,如假单胞菌能产生一种复合缩氨酸并具有紫外荧光特性的嗜铁素 Pyoverdine^[4]。海洋嗜铁素是海洋原核细菌对抗铁缺乏环境的一种策略^[5],蓝藻嗜铁素的研究较少,目前报道的仅有聚球藻 7002 和蓝细菌 7120 等,缺铁环境中蓝藻会产生多种嗜铁素^[6]。Ito 等^[7]从 2.5 L 聚球藻发酵液中分离得到 7.5 mg Synechobactin A、1.5 mg Synechobactin B 和 0.3 mg Synechobactin C 三种嗜铁素。董妍玲等也报道了蓝细菌 7120 的铁吸收机制^[8]。

嗜铁素的应用潜力巨大, Schneider 等从一株诺卡氏菌中分离得到两种嗜铁素,并确定它具有在低浓度下抑制胃腺癌、胸腺癌和肝癌细胞活性的作用^[9]。此外,嗜铁素在生物防治、致毒、植物营养学、载体等领域也有相关应用^[10]。嗜铁素的结构复杂,因此人工化学合成的步骤多、产率低,成本难以下降。生物发酵生产嗜铁素的研究国内外已经开始起步, Sarma 等也报道了通过优化荧光假单胞菌发酵条件来生产嗜铁素^[11]。聚球藻 7002 (*Synechococcus* sp. PCC 7002)是一株高光适应性和广盐性的海洋聚球藻,其细胞倍增时间是目前发现的蓝细菌中最短的,其全基因组序列也已得到破译,是一个非常理想的“工程微藻”构建平台^[12]。

嗜铁素的分离方法有多种,大孔树脂分离是比较迅速、便捷的一种方法;IMAC 是根据蛋白质表面氨基酸与固定化金属离子亲和力不同进行分离

的一项比较新颖的技术。Braich 等^[13]建议用镍离子亲和层析来纯化嗜铁素,得到的嗜铁素纯度相对较高。

本试验研究了聚球藻 7002 嗜铁素的不同定性检测方法。嗜铁素采用大孔树脂 XAD-2 和 IMAC 进行快速分离,并用 CAS 蓝色液体检测液检测相应洗脱组分的嗜铁素活性。试验中发现了聚球藻 7002 嗜铁素的紫外荧光特性,为聚球藻 7002 嗜铁素结构和性质的进一步研究提供了科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验藻株:聚球藻 7002 (*Synechococcus* sp. PCC 7002)由北京大学生命科学学院赵进东院士惠赠。

1.1.2 培养基和培养条件:聚球藻 7002 在 32 °C 培养于 Medium A^[14]中,培养基 pH 7.5,以照明日光灯作为光源,光强 100 $\mu\text{E}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 。液体采用摇瓶培养,装瓶量不高于最大容量的 40%,摇速 150 r/min;固体培养,Medium A 添加终浓度为 1.2%的琼脂粉。

1.1.3 主要试剂和仪器:铬天青 S (CAS)、十六烷基三甲基溴化铵(HDTMA)、Sephacrose-6B、大孔树脂 XAD-2 购自 Sigma 公司;亚氨基二乙酸(IDA)、咪唑、PIPES 购自生工生物工程(上海)有限公司;无水哌嗪购自国药集团化学试剂有限公司。

1.2 聚球藻 7002 缺铁培养

Medium A 中不添加含铁组分,接种处于对数期的聚球藻 7002 进行培养,培养至少 10 d。

1.3 聚球藻 7002 嗜铁素的平板检测

1.3.1 双层平板法检测:双层平板的制作参考文献[15]。平板下层按照每 100 mL 1.2%的琼脂添加 5 mL CAS 蓝色检测液的比例,将过 0.22 μm 无菌滤膜的 CAS 蓝色检测液与冷却到 65 °C 的琼脂混合均匀。下层琼脂凝固后,在上层倾倒含 1.2%琼脂的

Medium A。双层平板在 30 °C 环境中隔夜放置后, 接种缺铁培养的聚球藻 7002 进行检测。

1.3.2 混合平板法检测: 按每 100 mL 固体 Medium A 添加 5 mL CAS 蓝色检测液的比例, 将过 0.22 μm 无菌滤膜的 CAS 蓝色检测液直接与冷却到 65 °C 的 Medium A 混合均匀, 倒板, 同样 30 °C 环境中隔夜放置后, 接种缺铁培养的聚球藻 7002 进行检测。

1.3.3 传统平板法检测: 参照 1987 年 Schwyn 等^[16] 的方法, 制作传统的 CAS 检测平板, 为保证聚球藻 7002 的生长, 调整培养基的 NaCl 浓度与 Medium A 一致, 相同条件下接种进行检测。

1.4 聚球藻 7002 嗜铁素相对含量的测定

CAS 蓝色液体检测液的配制方法参考文献^[16]。聚球藻 7002 藻悬液 10 000 r/min 离心 15 min, 取 3 mL 上清液与等体积的 CAS 蓝色液体检测液混合均匀, 暗处放置 1 h, 检测 630 nm 处的吸光值记为 A 。取 3 mL 空白培养基与等体积 CAS 蓝色液体检测液混合均匀, 相同条件下测 630 nm 处的吸光值记为 A_r , 嗜铁素的相对含量为: $(A_r - A)/A_r \times 100\%$ ^[17]。

1.5 聚球藻 7002 嗜铁素大孔树脂 XAD-2 分离

本试验采用离心上清液过膜后直接上样和调整 pH 后再上样两种上样条件。聚球藻 7002 藻悬液 10 000 r/min 离心 15 min, 离心液过 0.22 μm 的滤膜, 过膜后直接上样到经双蒸水冲洗充分的大孔树脂层析柱中, 先用两个柱体积的双蒸水洗脱, 再分别用 60% 和 100% 的甲醇洗脱。测定 280 nm 处的吸光值, 进行相应峰组分的收集。

聚球藻 7002 藻悬液经离心、过膜后, 用 1 mol/L H_2SO_4 调 pH 为 2.0 后上样, 相同条件下进行洗脱。

1.6 检测平板和不同分离峰组分的荧光检测

将检测平板和不同峰组分的浓缩液、未经任何处理的上样液放置在 254 nm 紫外中, 观察荧光现象, 定性研究其是否具有荧光特性^[4]。

1.7 聚球藻 7002 嗜铁素 IMAC 分离

1.7.1 竞争性洗脱: Sepharose-6B 经活化、IDA 交联^[18-19]后, 装柱, 充入 Ni^{2+} , 制备镍离子层析柱^[20]。

平衡 Buffer 为 20 mmol/L pH 8.0 的 PBS 缓冲液, 洗脱 Buffer 为平衡 Buffer 加入 150 mmol/L 的咪唑。先用平衡 Buffer 平衡 2 个柱体积, 上样后平衡 Buffer 平衡至少 5 个柱体积, 然后洗脱 Buffer 洗脱至少 5 个柱体积, 收集 280 nm 下洗脱出来的峰组分。

1.7.2 降低 pH 洗脱: 平衡 Buffer 为 20 mmol/L pH 8.0 的 PBS 缓冲液, 洗脱 Buffer 为 20 mmol/L pH 5.7 的 PBS 缓冲液。同样条件下进行洗脱, 收集 280 nm 下洗脱出来的峰组分。

2 结果与分析

2.1 不同平板方法的检测结果

双层平板法、混合平板法、传统 CAS 平板法检测聚球藻 7002 嗜铁素晕圈结果如图 1 所示。形成图中比较清晰的晕圈, 双层平板法、传统 CAS 平板法所需时间为 14 d, 而混合平板法仅需 3 d。双层平板法由于显色层在底层, 晕圈形成时间较长, 晕圈不明显; 混合平板法, 检测初期晕圈边缘颜色加深, 晕圈清晰可辨, 且晕圈形成时间短; 传统的 CAS 检测方法, 平板制作较为复杂, 矿物质离子含量相对较少, 聚球藻生长较慢, 晕圈形成时间较长。以上结果证明混合平板法更快速、高效、便捷, 是定性检测聚球藻 7002 嗜铁素的最优平板检测方法。

2.2 聚球藻 7002 嗜铁素相对含量的测定

嗜铁素可以使 CAS 蓝色液体检测液由蓝色变为橙黄色, 不同浓度的嗜铁素使其变色程度不一样, 如图 2 所示。聚球藻 7002 培养初期不产生嗜铁素, 培养时间越长, 藻密度越大, 嗜铁素的分泌量越多。图 2 中, 第 1、2 组聚球藻 7002 分别培养 14 和 12 d, 聚球藻发酵液中嗜铁素的相对含量分别达到 43.67% 和 33.26%, 第 3、4 组培养 20 d, 嗜铁素的相对含量高达 93.50%, 第 5 组为加入空白培养基的对照组。

2.3 大孔树脂分离及各峰组分嗜铁素活性和荧光性质检测

直接上样和调 pH 上样的洗脱谱图如图 3 所示,

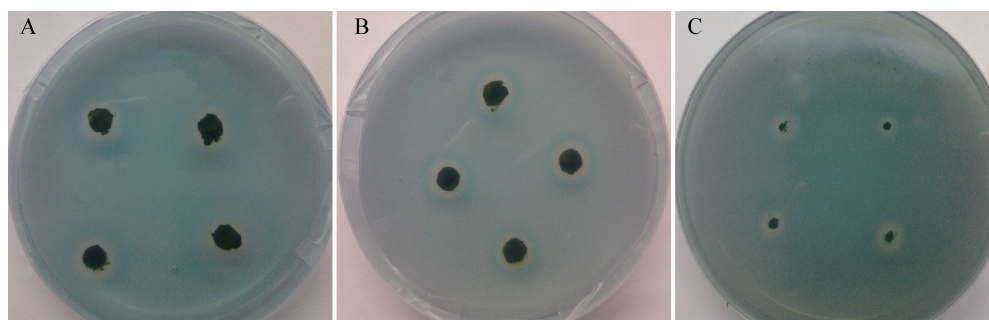


图 1 3 种检测方法比较

Figure 1 The comparison of three detection methods

注: A: 双层平板法; B: 混合平板法; C: 传统 CAS 平板法。

Note: A: Two-layer plate; B: Mixture plate; C: Traditional chromazurol S plate.

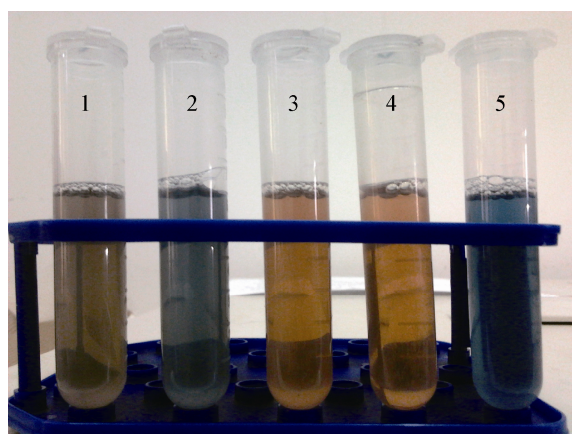


图 2 嗜铁素的定量检测

Figure 2 Quantitative detection of siderophores

注: 1: 培养 14 d; 2: 培养 12 d; 3、4: 培养 20 d; 5: 对照组。

Note: 1: 14 days cultured; 2: 12 days cultured; 3, 4: 20 days cultured; 5: Control group.

上样液为嗜铁素相对含量低于 50% 的聚球藻 7002 过膜液, 分别得到 3 个峰, 依次为双蒸水、60% 甲醇和 100% 甲醇的洗脱峰。收集相应峰组分, 浓缩检测嗜铁素活性, 结果如图 4 所示。试验结果显示, 峰 3' 是分离开来的活性峰。试验表明, 调整上样液的 pH 更有利于嗜铁素的吸附, 不调整 pH, 大量嗜铁素在双蒸水洗脱的峰 1 中随杂质一块流出。调整 pH, 峰 3' 组分嗜铁素的相对含量为 90.15%, 而不调 pH, 峰 3 组分嗜铁素相对含量低于 20%, 而含杂质的峰 1 具有较强的嗜铁素活性。大孔树脂在不同梯度洗脱液中的溶胀体积不同, 洗脱过程中均出现了正常的基线漂移现象。

将检测 10 d 的混合法平板和大孔树脂分离得到的峰组分直接放在 254 nm 紫外中观察, 可以看

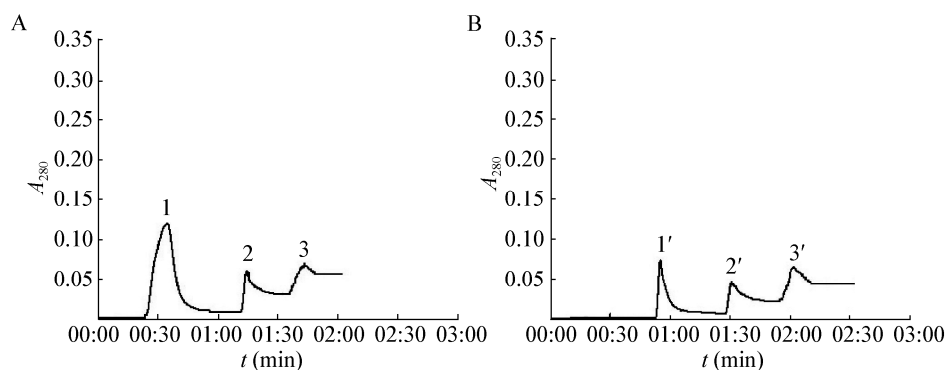


图 3 嗜铁素大孔树脂 XAD-2 洗脱谱图

Figure 3 Amberlite XAD-2 resin elution profile of siderophores

注: A: 上样液不调 pH; B: 上样液 pH 调为 2.0。

Note: A: The sample pH without being adjusted; B: The sample pH was adjusted to 2.0.

到非常明显的荧光现象, 如图 5 所示。结果表明, 初始上样液具有一定的荧光性, 活性峰 3' 组分具有强烈荧光, 不调 pH, 首先出现的峰 1 组分也具有强烈荧光, 说明嗜铁素随杂质流失严重。混合法检测平板晕圈部分有强烈荧光。

2.4 IMAC 分离

IMAC 分离, 竞争性洗脱和降低 pH 洗脱的洗脱谱图如图 6 所示。IMAC 分离, 特异性较好, 分离纯度高, 两种洗脱方式均出现 2 个峰, 分别为平衡 Buffer 和洗脱 Buffer 的洗脱峰。浓缩的 PBS 对

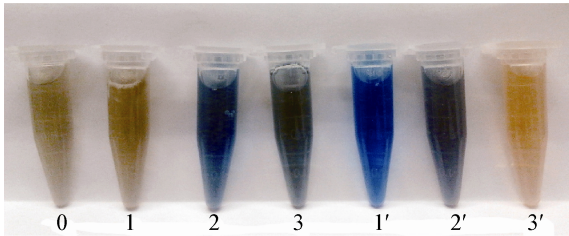


图 4 大孔树脂分离各峰组分的嗜铁素活性检测

Figure 4 Siderophores detection of each peak from Amberlite XAD-2 resin

注: 0: 初始上样液; 1: 峰 1; 2: 峰 2; 3: 峰 3; 1': 峰 1'; 2': 峰 2'; 3': 峰 3'.

Note: 0: The original samples; 1: Peak 1; 2: Peak 2; 3: Peak 3; 1': Peak 1'; 2': Peak 2'; 3': Peak 3'.

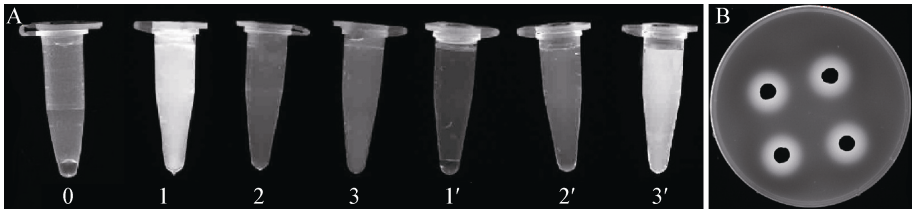


图 5 254 nm 紫外下荧光检测

Figure 5 The fluorescence of siderophores at 254 nm

注: A: 各洗脱峰荧光现象; 0: 初始上样液; 1: 峰 1; 2: 峰 2; 3: 峰 3; 1': 峰 1'; 2': 峰 2'; 3': 峰 3'. B: 混合法检测平板荧光现象.

Note: A: The fluorescence of each peak; 0: The original samples; 1: Peak 1; 2: Peak 2; 3: Peak 3; 1': Peak 1'; 2': Peak 2'; 3': Peak 3'. B: The fluorescence of siderophores in mixture plate.

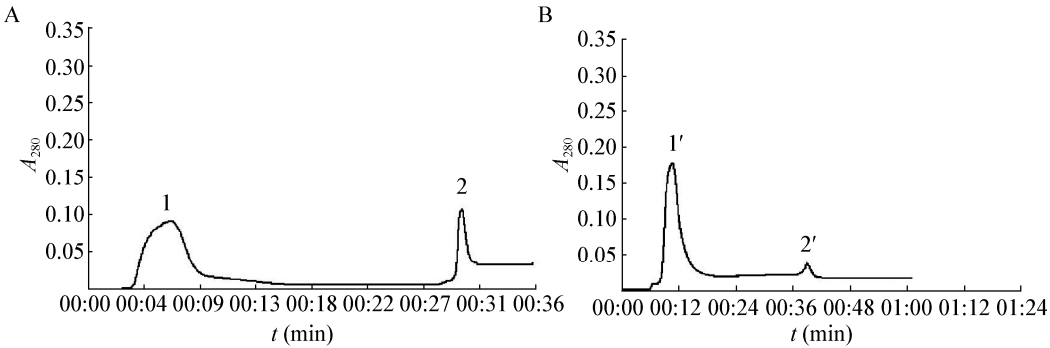


图 6 嗜铁素 IMAC 洗脱谱图

Figure 6 Immobilized metal-chelating affinity chromatography elution profile of siderophores

注: A: 竞争性洗脱; B: 降低 pH 洗脱.

Note: A: Competitive elution; B: pH reduced elution.

CAS 蓝色液体检测液存在干扰, IMAC 洗脱液不能进行浓缩, 直接进行嗜铁素相对含量的检测。峰 1 和峰 1' 没有嗜铁素活性, 为平衡 Buffer 冲洗出的杂质峰, 峰 2 和峰 2' 为活性峰, 不浓缩的情况下, 嗜铁素的相对含量均在 30% 以上。竞争性洗脱的效率更高, 洗脱出的嗜铁素的量更多。试验表明, IMAC 是一种分离效率更高、纯化效果更好的分离方式。

3 讨论

本试验以聚球藻 7002 为研究对象, 利用双层平板法、混合平板法、传统 CAS 平板法 3 种方法均检测到了嗜铁素。试验结果显示, 混合平板法是定性检测聚球藻 7002 嗜铁素的最优方法。检测前期, 晕圈边缘的颜色明显加深, 辨识度很高, 晕圈有一定的透明度, 符合海洋嗜铁素的特征。缺铁条件下聚球藻密度较大的发酵液中, 嗜铁素的相对含量很高, 为聚球藻 7002 嗜铁素的进一步研究提供了科学依据。

利用蓝藻进行嗜铁素工程化生产的潜力巨大, 高产蓝藻的诱导及条件优化可以保证嗜铁素的产量, 有待进一步研究。聚球藻 7002 嗜铁素的产生需要缺铁环境的刺激, 铁含量充足的环境中, 聚球藻几乎不产生嗜铁素。试验中 Medium A 不添加含铁组分, 有利于聚球藻 7002 嗜铁素的快速产生。聚球藻经滤纸片吸附培养后的检测效果也会明显提高, 是一种可以尝试的研究方法。

本试验研究了大孔树脂和 IMAC 两种分离聚球藻 7002 嗜铁素的方法。大孔树脂分离, 嗜铁素的纯度不高, 可以用高效液相色谱法进行纯化, 但是大孔树脂分离方法简单, 填料成本低, 且洗脱液为甲醇, 易于分离, 便于进行性质研究。IMAC 与嗜铁素的结合能力强, 结合容量大, 可以改装各种金属离子。本试验中, IMAC 洗脱液为 PBS, 峰组分中含有大量的盐, 进一步研究需要脱盐; 竞争性洗脱时, 峰组分含咪唑, 有毒性, 需要通过透析等方法除去。试验发现, 高浓度的磷酸根离子会干扰 CAS 检测体系的稳定性, PBS 洗脱液不能进行浓缩, 应该直接进行活性检测。本试验结果表明, 快

速制备嗜铁素粗品, 可以选择将上样液的 pH 调为 2.0, 用大孔树脂 XAD-2 进行分离, 收集 100% 甲醇洗脱出的组分, 进行浓缩, 4 °C 保存备用; 制备纯度相对较高的嗜铁素用于后续分析, 可以考虑采用 IMAC 分离。

聚球藻 7002 嗜铁素在 254 nm 紫外下的荧光现象, 说明其含有紫外发光的相关基团。目前仅有假单胞菌嗜铁素等少数嗜铁素被报道具有紫外荧光特性, 海洋嗜铁素紫外发光的现象还未见报道。该发现为聚球藻嗜铁素结构和功能的进一步研究提供了参考, 有待进一步探索和研究。聚球藻 7002 嗜铁素的检测和分离研究, 为海洋嗜铁素的研究提供了理论支持, 为微藻功能物质研究提供了新方向。

致谢: 感谢北京大学生命科学学院赵进东院士、董春霞老师、刘贤伟老师等在藻种提供、培养等方面的帮助和指导!

参考文献

- [1] Payne SM. Detection, isolation and characterization of siderophores[J]. *Methods in Enzymology*, 1994, 235: 329-344
- [2] Neilands JB. Microbial iron compounds[J]. *Annual Review of Biochemistry*, 1981, 50: 715-731
- [3] Hider RC, Kong X. Chemistry and biology of siderophores[J]. *Natural Products Report*, 2010, 27(5): 637-657
- [4] Cornelis P, Matthijs S. Diversity of siderophore-mediated iron uptake systems in fluorescent *Pseudomonads*: not only pyoverdines[J]. *Environmental Microbiology*, 2002, 4(12): 787-798
- [5] Butler A, Theisen RM. Iron(III)-siderophore coordination chemistry: Reactivity of marine siderophores[J]. *Coordination Chemistry Reviews*, 2010, 254(3/4): 288-296
- [6] Wilhelm SW, Trick CG. Iron-limited growth of cyanobacteria: multiple siderophore production is a common response[J]. *Limnology and Oceanography*, 1994, 39(8): 1979-1984
- [7] Ito Y, Butler A. Structure of synechobactins, new siderophores of the marine cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 7002[J]. *Limnology & Oceanography*, 2005, 50(6): 1918-1923
- [8] Dong YL, Pan XW. Iron uptake by *Anabaena* sp. strain PCC 7120[J]. *China Biotechnology*, 2012, 32(9): 107-112 (in Chinese)
董妍玲, 潘学武. 鱼腥蓝细菌 PCC7120 铁吸收机制[J]. *中国生物工程杂志*, 2012, 32(9): 107-112
- [9] Schneider K, Rose I, Vikineswary S. Nocardichelins A and B, siderophores from *Nocardia* strain acta 3026[J]. *Journal of Natural Products*, 2007, 70(6): 932-935
- [10] Liang JG, Hao ZN, Wang LP, et al. Research progress on the function of siderophore[J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2011, 27(5): 284-287 (in Chinese)
梁建根, 郝中娜, 王连平, 等. 嗜铁素功能研究概述[J]. *中国农学通报*, 2011, 27(5): 284-287
- [11] Sarma MVRK, Sahai V, Bisaria VS. Genetic algorithm-based medium optimization for enhanced production of fluorescent *Pseudomonad* R81 and siderophore[J]. *Biochemical*

- Engineering Journal, 2009, 47(1/3): 100-108
- [12] Ludwig M, Bryant DA. Transcription profiling of the model cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC 7002 by Next-Gen (SOLiD™) sequencing of cDNA[J]. Frontiers Microbiology, 2011, 2(41): 1-23
- [13] Braich N, Codd R. Immobilised metal affinity chromatography for the capture of hydroxamate-containing siderophores and other Fe(III)-binding metabolites directly from bacterial culture supernatants[J]. Analyst, 2008, 133(7): 877-880
- [14] Casteholz RW. Culturing methods for cyanobacteria[J]. Methods of Enzymology, 1988, 167: 68-93
- [15] Chen SX, Zhao X, Xie ZX. Detection of siderophore from halophilic archaea with two-layer plate[J]. Microbiology China, 2008, 35(1): 142-144 (in Chinese)
陈绍兴, 赵翔, 谢志雄. 双层平板法检测嗜盐古菌铁载体[J]. 微生物学通报, 2008, 35(1): 142-144
- [16] Schwyn B, Neiland JB. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores[J]. Analytical Biochemistry, 1987, 160(1): 47-56
- [17] Machuca A, Milagres AM. Use of CAS-agar plate modified to study the effect of different variables on the siderophore production by *Aspergillus*[J]. Letters in Applied Microbiology, 2003, 36(3): 177-187
- [18] Matsumoto I, Mizuno Y, Seno N. Activation of sepharose with epichlorohydrin and subsequent immobilization of ligand for affinity adsorbent[J]. Journal of Biochemistry, 1979, 85(5): 1091-1098
- [19] Kim JH, Hwang WS, Kim IH. Simple preparation of immobilized-metal affinity chromatography media[J]. Korean Journal of Chemical Engineering, 2009, 26(6): 1693-1695
- [20] Xia HF, Zhang X, Jin XH, et al. Preparation of Ni affinity chromatographic adsorbent and its application on purification of His-tagged protein[J]. Journal of Jiangnan University (Natural Science Edition), 2010, 9(6): 685-689 (in Chinese)
夏海峰, 张显, 金雄华, 等. 镍离子亲和层析介质的制备及其用于组氨酸标记蛋白质的纯化[J]. 江南大学学报: 自然科学版, 2010, 9(6): 685-689

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/wwxtbcn>, 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:

- [1] Marcella C, Claudia E, Pier GR, et al. Oxidation of cystine to cysteic acid in proteins by peroyacids as monitored by immobilized pH gradients[J]. Electrophoresis, 1991, 12(5): 376-377
- [2] Wang BJ, Liu SJ. Perspectives on the cultivability of environmental microorganisms[J]. Microbiology China, 2013, 40(1): 6-17 (in Chinese)
王保军, 刘双江. 环境微生物培养新技术的研究进展[J]. 微生物学通报, 2013, 40(1): 6-17
- [3] Shen T, Wang JY. Biochemistry[M]. Beijing: Higher Education Press, 1990: 87 (in Chinese)
沈同, 王镜岩. 生物化学[M]. 北京: 高等教育出版社, 1990: 87
- [4] Liu X. Diversity and temporal-spatial variability of sediment bacterial communities in Jiaozhou Bay[D]. Qingdao: Doctoral Dissertation of Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, 2010 (in Chinese)
刘欣. 胶州湾沉积物细菌多样性及菌群时空分布规律[D]. 青岛: 中国科学院海洋研究所博士学位论文, 2010

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: 2015-00-00; 接受日期: 2015-00-00; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2015-00-00

(下转 p.392)