

研究报告

过表达 TatAdCd 转位酶对枯草芽孢杆菌脂肪酶分泌的影响

白雷雷 马然静 杨绍梅 班睿*

(天津大学化工学院 系统生物工程教育部重点实验室 天津 300072)

摘要:【目的】研究过表达枯草芽孢杆菌 Tat 运输途径的 TatAdCd 转位酶对促进脂肪酶分泌的影响。【方法】用 *cdd* 基因的串联启动子和前导区, 替换 *tatAD-CD* 操纵子的启动子和前导区, 并在染色体 *sacB* 基因位点整合表达; 采用 qRT-PCR 方法表征 *tatAD-CD* 操纵子的表达水平; 用脂肪酶表达质粒 pHP13L 转化 TatAdCd 转位酶过表达菌株, 构建产脂肪酶重组菌。通过测定脂肪酶活性, 以及聚丙烯酰胺凝胶电泳, 考察 TatAdCd 转位酶过表达对脂肪酶分泌的影响。【结果】*tatAD-CD* 操纵子被过表达, 其胞内 mRNA 相对水平提高了 185 倍。TatAdCd 转位酶的过表达, 使脂肪酶发酵单位提高了 40%。【结论】使用 *cdd* 基因的串联启动子和前导区, 能够有效地过表达目的基因; 枯草芽孢杆菌脂肪酶可以同时经由 Sec 途径和 Tat 途径分泌; 过表达 TatAdCd 转位酶, 能够显著提高脂肪酶的分泌量。

关键词: 枯草芽孢杆菌, 脂肪酶发酵, Tat 分泌途径, *tatAD-CD* 操纵子, 基因表达

Effect of TatAdCd translocases overexpression on the secretion of lipase in *Bacillus subtilis*

BAI Lei-Lei MA Ran-Jing YANG Shao-Mei BAN Rui*

(Key Laboratory of Systems Biotechnology of the Ministry of Education, School of Chemical Engineering and Technology, Tianjin University, Tianjin 300072, China)

Abstract: [Objective] This study focuses on the influence of overexpression of TatAdCd translocases in Tat pathway on the secretion of LipA in *Bacillus subtilis*. [Methods] The promoter and mRNA leader region of the operon *tatAD-CD* were replaced by the tandem promoter and mRNA leader region of *cdd* gene and this modified gene was inserted into *sacB* gene. The expression level of the *tatAD-CD* operon was characterized by qRT-PCR. We transformed the plasmid pHP13L which can express *lip* gene of *Bacillus subtilis* excessively into the recombinant strain. The influence of overexpression of TatAdCd translocases on the secretion of LipA was assessed by SDS-PAGE and measuring the enzyme activity of the recombinant in fermentation broth. [Results] The modified *tatAD-CD* operon was expressed successfully. Compared with the control strain, the relative transcription level was improved by 185 times. The enzyme activity of recombinant in fermentation broth was increased by 40% due to

Foundation item: National High-Tech R&D Program of China (863 Program) (No. 2012AA02A701)

*Corresponding author: E-mail: banrui@tju.edu.cn

Received: April 14, 2015; **Accepted:** May 15, 2015; **Published online** (www.cnki.net): June 03, 2015
基金项目: 国家高技术研究发展计划(863 计划) (No. 2012AA02A701)

*通讯作者: E-mail: banrui@tju.edu.cn

收稿日期: 2015-04-14; 接受日期: 2015-05-15; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2015-06-03

overexpression of TatAdCd translocases. **[Conclusion]** The tandem promoter and mRNA leader region of the *cdd* gene can increase the expression level of the target gene effectively. LipA can be secreted to extracellular through Sec pathway and Tat pathway in *Bacillus subtilis*. The overexpression of *tatAD-CD* operon can promote the secretion of LipA.

Keywords: *Bacillus subtilis*, Lipase fermentation, Tat secretion pathway, *tatAD-CD* operon, Gene expression

约有 65 属的微生物能够产生脂肪酶, 枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)是其中之一^[1]。*B. subtilis* 的脂肪酶(LipA)属于纯脂肪酶(True lipase), 是已知分子量最小的脂肪酶之一^[2]。由于 LipA 没有 α 螺旋构成的“盖子”结构, 所以没有界面活化特性。LipA 的结构特性赋予其底物范围广、稳定性好、适应极端碱性条件(pH>9.5)等特性, 使其具有重要的工业应用价值^[3-4]。

同源或异源脂肪酶在 *B. subtilis* 中的表达与分泌已被广泛研究, 但所构建的菌株脂肪酶发酵能力, 几乎都不超过 100 U/mL^[5-7]。只有来自普通变形杆菌(*Proteus vulgaris*)的脂肪酶在 *B. subtilis* WB800 中被诱导表达, 发酵单位能够达到 356.8 U/mL^[8]。能够达到较高的发酵单位, 主要归因于 WB800 菌株 8 个胞外蛋白酶的缺失。

B. subtilis 能够分泌约 300 种胞外蛋白, 其中绝大多数蛋白经 Sec 途径分泌, 只有 PhoD、YwbN、YkuE 等少数胞外蛋白, 已鉴定为经 Tat 途径分泌^[9]。Tat 分泌途径由包括 2 个蛋白的转位酶系统构成, 主要存在两个底物专一性的转位酶系统: TatAdCd

转位酶系统^[10-12]和 TatAyCy 转位酶系统^[13-14]。它们分别由 *tatAD-CD* 和 *tatAY-CY* 操纵子编码, 前者只在磷酸盐饥饿条件下表达^[15], 后者在多数培养条件下都能表达^[16]。

早先的研究显示, LipA 依赖 Sec 途径分泌, 似乎不是 Tat 途径的底物。但是, LipA 的信号肽是 RR 模式, 符合典型的 Tat 途径信号肽特征。随后的研究显示, Tat 途径是 LipA 分泌的溢流途径, 主要是 TatAdCd 转位酶系统发挥作用^[13,17]。

本研究在产 LipA 的菌株 *B. subtilis* NA/pHP13L 中, 过表达编码 TatAdCd 转位酶的 *tatAD-CD* 操纵子, 考察过表达 TatAdCd 转位酶对提高 LipA 分泌量的影响, 并探讨在 *B. subtilis* 中同时利用两个蛋白分泌途径, 从而实现提高胞外蛋白产量的可能性。

1 材料与方法

1.1 菌株、质粒和引物

菌株(表 1) LipA 表达质粒 pHP13L 为本实验室构建和保藏。PCR 引物(表 2)由北京奥科鼎盛生物科技公司合成。

表 1 菌株
Table 1 Strains

菌株 Strains	遗传标记及说明 Genetic markers and instructions	来源 Source
<i>B. subtilis</i> NA	<i>trpC2</i> , Δ <i>araR::P_{ara-neo}</i> , Δ <i>nprE</i> , Δ <i>aprE</i>	Laboratory stock
<i>B. subtilis</i> LXZm	<i>trpC2</i> , Δ <i>araR::P_{ara-neo}</i> , Δ <i>sacB::P_{cdd-ribA-DN*}-cat-araR</i>	Laboratory stock
<i>B. subtilis</i> NA/pHP13L	<i>trpC2</i> , Δ <i>araR::P_{ara-neo}</i> , Δ <i>nprE</i> , Δ <i>aprE</i>	Laboratory stock
<i>B. subtilis</i> DB104NC	<i>His</i> , <i>nprR2</i> , <i>nprE18</i> , <i>apr</i> Δ 3, Δ <i>araR::P_{ara-neo}</i> , <i>lip::P_{A1}</i>	Laboratory stock
<i>B. subtilis</i> NAT	<i>trpC2</i> , Δ <i>araR::P_{ara-neo}</i> , Δ <i>nprE</i> , Δ <i>aprE</i> , Δ <i>sacB::P_{cdd-tatAD-CD}</i>	This study
<i>B. subtilis</i> NAT-2/pHP13L	<i>trpC2</i> , Δ <i>araR::P_{ara-neo}</i> , Δ <i>nprE</i> , Δ <i>aprE</i> , Δ <i>sacB::P_{cdd-tatAD-CD}</i>	This study

注: DN*: *sacB* 基因下游的一段 958 bp 序列, 用于内部同源重组。

Note: DN*: The 958 bp fragment downstream of *sacB* gene, used for homologous recombination.

表2 PCR引物
Table 2 PCR Primers

Primers	Primer sequence (5'→3')	Size (bp)
SacBup1	CTCCTCCAGCAAGATGATT	19
Cdd2	GTGTAAATTCCTCCCTTACCT	21
Adcd1	AGGTAAGGGAGGAATTTACACATGTTCTCAAACATTGGAATAC	43
Adcd2	TGACTGCTAAGATGAAGGAA	20
SacBdn1	GTTCTTCATCTTAGCAGTCCTTGATCCTAACGATGTAACC	41
SacBg2	GGAGTCAGTGAACAGGTAC	19
RTcepA1	ACGAGCATGTGGCGGAAT	18
RTcepA2	CGATAGCGACTGACGGTGT	19
RTTat1	GCTGTGCTAGGACCGAGTGAA	21
RTTat2	CGAAGGAGATGCCCGCCAAA	20

1.2 酶和化学试剂

Taq 酶购自北京索莱宝科技有限公司; *Hifi* 酶购自北京全式金生物技术有限公司; DNA 胶回收试剂盒、PCR 产物纯化试剂盒, 购自上海生工生物工程有限公司; dNTPs、限制性内切酶和 cDNA 第一链合成试剂盒购自 Thermo scientific 公司; 细菌总 RNA 提取试剂盒购自 TIANGEN 公司; iQTM SYBR Green supermix 购自 Bio-Rad 公司; 对硝基苯酚 (4-Nitrophenol) 购自天津希恩思生化科技有限公司; 对硝基苯酚辛酸酯 (4-Nitrophenyl octanoate), 购自阿法埃莎 (天津) 化学有限公司; 酵母浸粉和玉米浆干粉购自中发麦迪尔生物科技江苏有限公司; 其它试剂均为分析纯试剂。

1.3 培养基

LB 培养基 (g/L): 蛋白胨 10.0, 酵母抽提物 5.0, NaCl 10.0, pH 7.5, 琼脂粉 15.0 (固体培养基)。需要时加入氯霉素 6 mg/L 或新霉素 15 mg/L。

筛选培养基 (g/L): 酵母抽提物 24, 酸水解酪素 12, 甘油 5, K_2HPO_4 8.187, KH_2PO_4 0.422, pH 自然。

发酵培养基 (g/L): 甘油 40, 酵母浸粉 8, 玉米浆干粉 24, K_2HPO_4 4.912, KH_2PO_4 0.245, $MgSO_4$ 0.2, pH 7.2。

1.4 常规分子生物学操作

所有 DNA 片段均来自于 PCR 扩增, DNA 片段的拼接采用重叠 PCR 方法^[18]。*B. subtilis* 感受态细胞的制备、DNA 片段和质粒的转化, 均采用标准的 Spizizen 方法^[19-20]。DNA 测序委托北京奥科鼎盛生物科技公司完成。CTAB 法提取质粒, 以及蛋白质 SDS-PAGE 电泳参照《分子克隆实验指南》。

1.5 *tatAD-CD* 操纵子的整合表达

B. subtilis 的 *cdd* 基因的启动子加前导区与 *tatAD-CD* 操纵子的编码序列, 拼接为 $P_{cdd-tatAD-CD}$ 片段, 记为 T 片段。然后采用无标记基因表达方法^[21], 整合到染色体 *sacB* 位点。为此, 需要通过重叠 PCR, 拼接 UTDCRG 片段。其中 U 和 G 为 *sacB* 基因位点的上下游同源片段, D 为内部同源片段, CR 为正向选择盒。以染色体上带有反向选择盒 $P_{ara-neo}$ 的 *B. subtilis* NA 为受体菌, 用 UTDCRG 片段转化感受态细胞, 用氯霉素抗性平板筛选抗性菌株。选择具有氯霉素抗性、没有新霉素抗性的菌株, 转接于装有 LB 培养基的试管, 37 °C、220 r/min 振荡培养 4 h, 以便正向选择盒弹出。稀释后的培养液涂布新霉素抗性平板, 反向选择恢复新霉素抗性, 失去氯霉素抗性的菌株。最后通过 PCR 验证和 DNA 测序验证, 而获得正确的转化子。

1.6 实时荧光定量 PCR 分析

采用实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 方法, 测定胞内 *tatAD-CD* 操纵子的 mRNA 相对水平, 用于表征 *tatAD-CD* 操纵子的相对表达水平。总 RNA 的提取、cDNA 第一链扩增和 RT-PCR 的操作方法和条件, 分别按照所用试剂盒的操作说明进行。选择持家基因 *ccpA* 作为参比基因, 每个样品 3 个平行, 以平均值按照公式 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 计算 mRNA 的相对水平。

1.7 摇瓶发酵和脂肪酶活性测定

使用 250 mL 摇瓶, 装入 25 mL 筛选培养基或发酵培养基, 37 °C、225 r/min 振荡培养 48 h。每间隔 12 h 取样 0.5 mL, 13 000 r/min 离心 1 min; 取上清液, 用 50 mmol/L 的 Tris-HCl 缓冲液(pH 8.5) 稀释 1 000 倍后测定脂肪酶活性。脂肪酶活性的测定参照 Ma 等^[5]的方法, 反应体系 10 mL, 由发酵上清液的稀释液 0.5 mL、50 mmol/L pH 8.5 的 Tris-HCl 缓冲液 9 mL、5 mmol/L 的对硝基苯基辛酸酯底物溶液 0.5 mL 组成。作为对照的反应体系, 则用 0.5 mL 的 Tris-HCl 缓冲液替代发酵上清液的稀释液。反应在 37 °C 进行 10 min, 然后加入 5 mL 乙醇终止反应。用分光光度计测定 A_{406} , 根据公式: 酶活性(U/mL)=($A_{406}-0.0438$) \times 1 860, 计算发酵液中的脂肪酶活性。1 个酶活力单位定义为: 在 37 °C, 1 min 内水解 4-硝基苯基辛酸酯产生 1 μ mol 的 4-硝基苯酚所需要的酶量。

2 结果与分析

2.1 *tatAD-CD* 操纵子的过表达

B. subtilis 的 *cdd* 基因编码胞苷脱氨酶, 其启动子(P_{cdd})由 3 个串联的启动子构成, 分别被 σ^E 、 σ^B 、 σ^A 识别^[22], 能够在不同的生理条件下持续表达。因此, 选择用 *cdd* 基因的启动子和前导区, 替换 *tatAD-CD* 操纵子的启动子和前导区, 表达 *tatAD-CD* 操纵子。选择常用的 *B. subtilis* 染色体 *sacB* 基因位点, 整合表达 $P_{cdd-tatAD-CD}$ 操纵子。以 *B. subtilis* LXZm 染色体为模板, 用引物 SacBup1/Cdd2, 扩增包括上游同源臂 U、 P_{cdd} 启动

子及前导区片段 T1 在内的 UT1 片段(1 311 bp); 用引物 SacBdn1/SacBg2, 扩增包括内部同源片段 D、反向选择盒 CR 及下游同源片段 G 在内的 DCRG 片段(3 628 bp)。以 *B. subtilis* NA 染色体为模板, 用引物 Adcd1/Adcd2, 扩增 *tatAD-CD* 操纵子的编码序列 T2 (1 291 bp)。采用重叠 PCR 方法, 将 UT1、T2 和 DCRG 片段拼接为 UTDCRG 片段。用 6 229 bp 的 UTDCRG 片段转化 *B. subtilis* NA 感受态细胞, 1 μ g 的片段转化 1 mL 感受态细胞, 大约能够获得 5–6 株失去新霉素抗性, 而带有氯霉素抗性的单菌落。选择一株上述单菌落, 用 LB 培养基培养 4 h 后, 取 1 μ L 涂布新霉素抗性平板, 得到 10 株恢复了新霉素抗性的单菌落。这些菌株经 PCR 扩增和电泳鉴定, 显示 $P_{cdd-tatAD-CD}$ 操纵子正确地整合到了 *sacB* 位点。挑选 2 株菌的 PCR 扩增产物进行测序鉴定, 结果显示整合的 $P_{cdd-tatAD-CD}$ 操纵子序列完全正确。因此, 该转化子被命名为 *B. subtilis* NAT。

以菌株 NA 为对照, 采用 qRT-PCR 方法, 测定菌株 NAT 胞内 $P_{cdd-tatAD-CD}$ 操纵子的 mRNA 相对水平。分别用筛选培养基培养 NA 和 NAT 菌株至 24 h, 取 1 mL 培养液离心收集细胞, 然后提取总 RNA。qRT-PCR 扩增位点选择在 *tatCD* 基因内, 引物为 RTTat1 和 RTTat2; 因 *ccpA* 基因是编码介导分解代谢物阻遏作用的全局调控蛋白, 是一个持家基因, 因此选择作为参比基因, *ccpA* 的扩增引物为 RTccpA1 和 RTccpA2。表 3 结果显示, 菌株 NAT 胞内 $P_{cdd-tatAD-CD}$ 操纵子的 mRNA 水平, 是对照菌株 NA 的 185 倍。结果表明, $P_{cdd-tatAD-CD}$ 操纵子在菌株 NAT 中被成功过表达。

2.2 质粒 pHP13L 的转化和转化子筛选

pHP13L 是 LipA 表达质粒, 它是在质粒 pHP13 基础上, 插入了 P_{A1-lip} 基因构成。*lip* 为来自 *B. subtilis* 168 菌株脂肪酶基因编码序列, P_{A1} 由噬菌体 ϕ 29 的 A1 启动子和 *aprE* 基因的前导区构成。其中 A1 启动子属于组成型表达的强启动子, *aprE* 基因的前导区具有 mRNA 稳定子的作用, 使 P_{A1-lip} 基

表3 *tatAD-CD* 基因的 qRT-PCR 转录分析
Table 3 The transcription analysis of *tatAD-CD* using qRT-PCR

	NA <i>ccpA</i>	NA <i>tatAD-CD</i>	ΔC_T	NAT <i>ccpA</i>	NAT <i>tatAD-CD</i>	ΔC_T
C_T1	21.00	21.43	–	24.09	17.59	–
C_T2	21.83	22.43	–	24.14	17.78	–
C_T3	22.63	25.02	–	24.22	17.92	–
Mean	21.82	22.96	1.14	24.15	17.76	–6.39
$\Delta\Delta C_T$						–7.53
$2^{-\Delta\Delta C_T}$						185

因能够在 *B. subtilis* 中组成型高水平表达。将质粒 pHP13L 转化 *B. subtilis* NAT, 用氯霉素抗性平板筛选抗性菌落。随机选择 6 株抗性菌落, 以菌株 *B. subtilis* NA/pHP13L 为对照, 用筛选培养基进行发酵培养, 通过测定发酵液中的脂肪酶活性, 初步鉴定转化子及其脂肪酶发酵能力, 结果如图 1 所示。

图 1 结果显示, 所鉴定的 6 株抗性菌株, 其发酵液中脂肪酶活性均高于对照菌 NA/pHP13L。表明这些菌株都是带有 pHP13L 质粒的转化子。其中的 No. 2 菌株的脂肪酶活性为 28.2 U/mL, 明显高于对照菌的 22.2 U/mL。因此, 将其命名为 *B. subtilis* NAT-2/pHP13L, 作为进一步实验的菌株。

2.3 *tatAD-CD* 操纵子过表达对脂肪酶发酵的影响

使用发酵培养基分别对菌株 NA/pHP13L 和

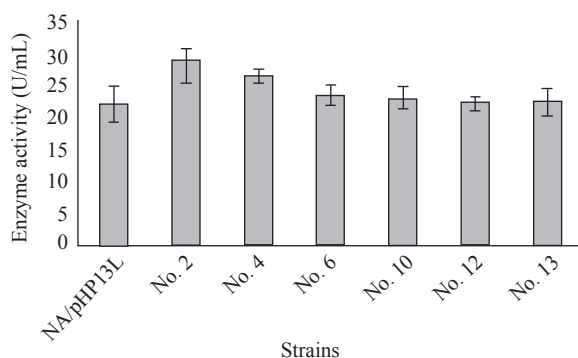


图 1 菌株 NA/pHP13L 及转化子摇瓶发酵 36 h 的脂肪酶活性

Figure 1 The enzyme activity of strains NA/pHP13L and transformants after shake culture 36 h

NAT-2/pHP13L 进行摇瓶发酵, 并测定发酵液中脂肪酶活性, 结果如图 2 所示。

发酵结果显示, 在发酵 18 h 后, NA/pHP13L 和 NAT-2/pHP13L 发酵液的脂肪酶活性开始出现显著差别, 二者的脂肪酶活性峰值都出现在发酵 36 h, 但最大脂肪酶活性相差了 1.4 倍, 分别为 174 U/mL 和 243 U/mL。结果说明, 过表达 *TatAdCd* 转位酶能够显著提高 *LipA* 的分泌量。

2.4 发酵液的聚丙烯酰胺凝胶电泳分析

分别取 NA/pHP13L 和 NAT-2/pHP13L 菌株 36 h 的发酵液, 13 000 r/min 离心 1 min; 然后取 20 μ L 上清液上样, 进行聚丙烯酰胺凝胶电泳。同时以不带 pHP13L 质粒的受体菌 NA 和 NAT, 以及染色体上带有单拷贝 P_{A1-lip} 基因的菌株 *B. subtilis* DB104NC 作为对照。电泳结果如图 3 所示, 只有

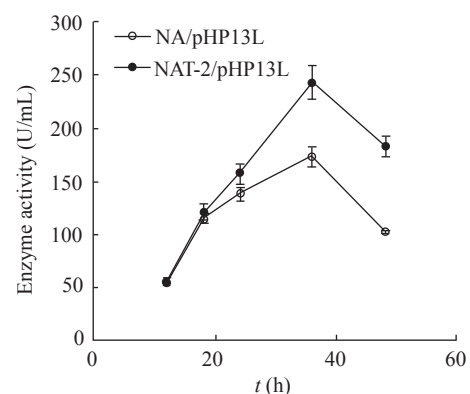


图 2 发酵培养基摇瓶发酵液中的脂肪酶酶活

Figure 2 The enzyme activity curve of strains in fermentation broth

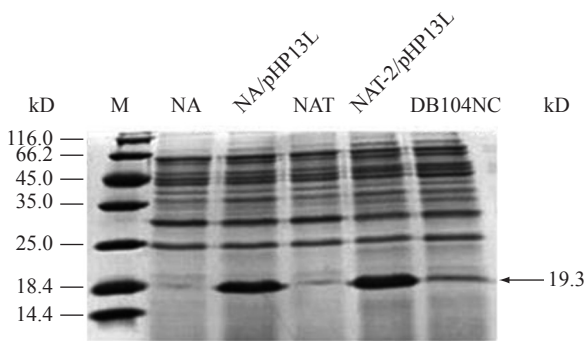


图3 不同菌株发酵液的 SDS-PAGE 对比

Figure 3 Comparison of fermentation broth in different strains by SDS-PAGE

带有 pHP13L 质粒的菌株, 在 18.4 kD 附近有粗大的条带, DB104NC 菌株有较明显的条带, 而 NA 和 NAT 菌株仅有极浅的条带。LipA 的大小为 19.3 kD, 据此判断, 电泳图上显示的 18.4 kD 左右的条带, 就是 LipA 的条带。另外, NAT-2/pHP13L 菌株的 LipA 条带, 比 NA/pHP13L 菌株的明显粗大, 表明前者发酵液中的 LipA 含量要高于后者。这一结果证明, 过表达 TatAdCd 转位酶能够显著提高 LipA 的分泌水平。

3 结论

B. subtilis 的 *cdd* 基因编码胞苷脱氨酶, 催化胞苷脱氨形成尿苷。*cdd* 基因的串联启动子能够保证 *cdd* 基因在多种生理条件下的有效表达。用 *cdd* 基因的串联启动子及前导区表达 *tatAD-CD* 操纵子, 收到了良好的效果, 其 mRNA 胞内水平提高了 185 倍。这一结果显示, *cdd* 基因的串联启动子及前导区, 或许能够作为一个可选择的强表达元件, 在基因工程中有一定的应用价值。

以 *B. subtilis* 为平台菌株, 通过基因工程构建脂肪酶或其它胞外蛋白的生产菌株, 是目前研究的热点。如何提高胞外蛋白的产量, 依然是有待解决的问题。本研究显示, LipA 可以同时经由 Sec 和 Tat 途径分泌; 过表达 TatAdCd 转位酶, 能够显著提高 LipA 的分泌量。显然, 过表达 TatAdCd 转位

酶, 克服了细胞生理条件对 Tat 分泌途径功能的制约, 为 LipA 的分泌, 提供了另一个组成型的通路。Sec 途径担负了百种以上胞外蛋白的分泌, 当这些蛋白中的大多数都表达和分泌时, Sec 途径可能会变得“拥堵”和竞争。在 Sec 途径处于“拥堵”或竞争状态下, LipA 的分泌很可能受到不利影响。Sec 途径的“拥堵”和竞争难以避免, 所以同时利用 Tat 途径分泌, 是解决问题的途径。LipA 具有 RR 模式的信号肽, 决定了其能够利用两种途径分泌到胞外。因此, LipA 的信号肽或许能够用于提高其它同源或异源蛋白的分泌量。但是, TatAdCd 转位酶的过表达是必要条件。

参考文献

- [1] Fariha H, Ali SA, Abdul H. Industrial applications of microbial lipases[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2006, 39(2): 235-251
- [2] Lesuisse E, Schanck K, Colson C. Purification and preliminary characterization of the extracellular lipase of *Bacillus subtilis* 168, an extremely basic pH-tolerant enzyme[J]. *European Journal of Biochemistry*, 1993, 216(1): 155-160
- [3] Eggert T, Pencreach G, Douchet I, et al. A novel extracellular esterase from *Bacillus subtilis* and its conversion to a monoacylglycerol hydrolase[J]. *European Journal of Biochemistry*, 2000, 267(21): 6459-6469
- [4] Eggert T, van Pouderooyen G, Dijkstra BW, et al. Lipolytic enzymes LipA and LipB from *Bacillus subtilis* differ in regulation of gene expression, biochemical properties, and three-dimensional structure[J]. *FEBS Letters*, 2001, 502(3): 89-92
- [5] Ma JS, Zhang ZM, Wang BJ, et al. Overexpression and characterization of a lipase from *Bacillus subtilis*[J]. *Protein Expression and Purification*, 2006, 45(1): 22-29
- [6] Han ZL, Zhu CH, Zhao MM, et al. Cloning and expression of *Pseudomonas aeruginosa* lipase gene in *Bacillus subtilis*[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2006, 32(1): 11-14 (in Chinese)
韩振林, 朱传合, 赵明明, 等. 铜绿假单胞菌脂肪酶基因在枯草芽孢杆菌中的克隆与表达[J]. *食品与发酵工业*, 2006, 32(1): 11-14
- [7] Hu YH, Li M, Shi AQ, et al. Expression and properties of a *Bacillus licheniformis* lipase in *Bacillus subtilis*[J]. *Journal of Zhejiang Sci-Tech University*, 2009, 26(5): 757-763 (in Chinese)
胡艳华, 李敏, 石爱琴, 等. 胞外脂肪酶在枯草芽孢杆菌中的表达及其性质[J]. *浙江理工大学学报*, 2009, 26(5): 757-763
- [8] Lu YP, Lin Q, Wang J, et al. Overexpression and characterization in *Bacillus subtilis* of a positionally nonspecific lipase from *Proteus vulgaris*[J]. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 2010, 64(3): 919-925
- [9] Tjalsma H, Bolhuis A, Jongbloed JDH, et al. Signal peptide-dependent protein transport in *Bacillus subtilis*: a genome-based survey of the secretome[J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2000, 64(3): 515-547
- [10] Jongbloed JDH, Grieger U, Antelmann H, et al. Two minimal Tat translocases in *Bacillus*[J]. *Molecular Microbiology*, 2004, 54(5): 1319-1325

- [11] Pop OI, Westermann M, Volkmer-Engert R, et al. Sequence-specific binding of prePhoD to soluble TatAd indicates protein-mediated targeting of the Tat export in *Bacillus subtilis*[J]. Journal of Biological Chemistry, 2003, 278(40): 38428-38436
- [12] Schreiber S, Stengel R, Westermann M, et al. Affinity of TatCd for TatAd elucidates its receptor function in the *Bacillus subtilis* twin arginine translocation (Tat) translocase system[J]. Journal of Biological Chemistry, 2006, 281(29): 19977-19984
- [13] Kouwen TRHM, van der Ploeg R, Antelmann H, et al. Overflow of a hyper-produced secretory protein from the *Bacillus* Sec pathway into the Tat pathway for protein secretion as revealed by proteogenomics[J]. Proteomics, 2009, 9(4): 1018-1032
- [14] Monteferrante CG, Miethke M, van der Ploeg R, et al. Specific targeting of the metallophosphoesterase YkuE to the *Bacillus* cell wall requires the twin-arginine translocation system[J]. Journal of Biological Chemistry, 2012, 287(35): 29789-29800
- [15] Jongbloed JDH, Martin U, Antelmann H, et al. TatC is a specificity determinant for protein secretion via the twin-arginine translocation pathway[J]. Journal of Biological Chemistry, 2000, 275(52): 41350-41357
- [16] Baichoo N, Wang T, Ye R, et al. Global analysis of the *Bacillus subtilis* Fur regulon and the iron starvation stimulon[J]. Molecular Microbiology, 2002, 45(6): 1613-1629
- [17] Jongbloed JDH, Antelmann H, Hecker M, et al. Selective contribution of the twin-arginine translocation pathway to protein secretion in *Bacillus subtilis*[J]. Journal of Biological Chemistry, 2002, 277(46): 44068-44078
- [18] Shevchuk NA, Bryksin AV, Nusinovich YA, et al. Construction of long DNA molecules using long PCR-based fusion of several fragments simultaneously[J]. Nucleic Acids Research, 2004, 32(2): e19
- [19] Spizizen J. Transformation of biochemically deficient strains of *Bacillus subtilis* by deoxyribonucleate[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1958, 44(10): 1072-1078
- [20] Anagnostopoulos C, Spizizen J. Requirements for transformation in *Bacillus subtilis*[J]. Journal of Bacteriology, 1961, 81(5): 741-746
- [21] Liu SH, Endo K, Ara K, et al. Introduction of marker-free deletions in *Bacillus subtilis* using the AraR repressor and the *ara* promoter[J]. Microbiology, 2008, 154(9): 2562-2570
- [22] Song BH, Neuhaud J. Chromosomal location, cloning and nucleotide sequence of the *Bacillus subtilis* *cdd* gene encoding cytidine/deoxycytidine deaminase[J]. Molecular and General Genetics, 1989, 216(2/3): 462-468

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、显微世界、专栏、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”。

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 参考文献

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

3.2 脚注(正文首页下方)

Foundation item:

*Corresponding author: Tel: ; Fax: ; E-mail:

Received: January 01, 20xx; Accepted: March 01, 20xx; Published online (www.cnki.net): March 31, 20xx

基金项目: 基金项目(No.)

*通讯作者: Tel: ; Fax: ; E-mail:

收稿日期: 20xx-00-00; 接受日期: 20xx-00-00; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 20xx-00-00

(下转 p.25)