



## 甲硫氨酸 $\gamma$ -裂解酶基因在大肠杆菌中的高效表达和活性

胡海艳<sup>1</sup> 杜少平<sup>1</sup> 夏枫耿<sup>1</sup> 黄魁英<sup>1</sup> 周世宁<sup>\*2</sup>

1 广州市微生物研究所 广东 广州 510663

2 中山大学生命科学学院 生物防治重点实验室 广东 广州 510275

**摘要:**【背景】为了开发海洋蕴藏的新型微生物资源,本研究团队采用不依赖培养的宏基因组技术,构建了深海宏基因组文库,并对其中的重要基因进行后续研究。【目的】使用来自深海宏基因组文库中的甲硫氨酸  $\gamma$ -裂解酶基因(*mgl*)在大肠杆菌中高效表达并对其活性进行检测。【方法】将 *mgl* 基因克隆到表达载体 pET-28a(+)并转化大肠杆菌 BL21(DE3),经异丙基- $\beta$ -D-硫代半乳糖苷(IPTG)诱导,并对表达条件进行优化,获得甲硫氨酸  $\gamma$ -裂解酶(Methionine-lyase, rMGL)的大量表达。亲和层析纯化重组蛋白后对酶的活性进行研究。【结果】亲和纯化后获得大量表达蛋白 rMGL,大小与预测的 46 kD 相符合,并具有很高的裂解 L-甲硫氨酸的活性。rMGL 能催化 L-甲硫氨酸和 DL-同型半胱氨酸的裂解,但几乎不作用于 L-半胱氨酸和 L-胱氨酸,其中对 DL-同型半胱氨酸的催化效率比对 L-甲硫氨酸的催化效率高,相对活性约为对 L-甲硫氨酸催化效率的 1.4 倍。【结论】来自深海宏基因组文库中的 *mgl* 基因能够利用 pET-28a(+)/BL21(DE3)高效表达 rMGL。

**关键词:** 宏基因组文库, *Idiomarina*, 甲硫氨酸  $\gamma$ -裂解酶, 诱导表达, 重组蛋白纯化

## High expression and activity of an L-methionine $\gamma$ -lyase gene in *Escherichia coli*

HU Hai-Yan<sup>1</sup> DU Shao-Ping<sup>1</sup> XIA Feng-Geng<sup>1</sup> HUANG Kui-Ying<sup>1</sup> ZHOU Shi-Ning<sup>\*2</sup>

1 Guangzhou Institute of Microbiology, Guangzhou, Guangdong 510663, China

2 State Key Laboratory for Biocontrol, School of Life Sciences, Sun Yat-sen University, Guangzhou, Guangdong 510275, China

**Abstract:** [Background] In order to develop new microbial resources in the ocean, our laboratory constructed a deep sea metagenomic library by adopting the culture-independent metagenomic technology, and carried out follow-up studies on the important genes. [Objective] To identify and highly express the methionine  $\gamma$ -lyase gene in *Escherichia coli* from the DNA library of deep-sea sediments. [Methods] The gene *mgl* was overexpressed by pET-28a(+) system in *E. coli* BL21(DE3), which was induced by isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside, and the expression conditions were optimized to obtain the high expression of methionine-lyase (rMGL). The recombinant protein was purified by affinity chromatography and the enzyme activity was studied. [Results] The product rMGL was consistent with the predicted 46 kD, with high L-methionine lyase activity. rMGL could use L-methionine and DL-homocysteine as substrate, but had little

**Foundation item:** Special Scientific Research Project of Guangzhou Science and Technology Plan (201607010326)

\*Corresponding author: E-mail: lsszsl@mail.sysu.edu.cn

Received: 14-02-2019; Accepted: 13-05-2019; Published online: 20-06-2019

基金项目: 广州市科技计划科学研究专项(201607010326)

\*通信作者: E-mail: lsszsl@mail.sysu.edu.cn

收稿日期: 2019-02-14; 接受日期: 2019-05-13; 网络首发日期: 2019-06-20

activity on L-cysteine and L-cystine. Its relative activity on DL-homocysteine was 1.4 times of that on L-methionine. [Conclusion] *mgl* gene from the deep sea metagenomic library can efficiently express rMGL using pET-28a(+)/BL21(DE3).

**Keywords:** Metagenomic library, *Idiomarina*, L-methionine  $\gamma$ -lyase, Induced expression, Purification of recombinant protein

海洋蕴藏着极其丰富的微生物资源和新颖的生物代谢方式,在陆地微生物新型活性物质资源日益枯竭的今天,海洋微生物及其代谢产物成为现今新型生物催化剂和药物开发的一个研究热点。迄今为止绝大部分深海微生物难以在实验室的条件下获得纯培养,成为研究和开发深海微生物资源的一大瓶颈。本研究采用不依赖培养的宏基因组技术,对深海微生物资源进行研究。

甲硫氨酸  $\gamma$ -裂解酶(L-methionine  $\gamma$ -lyase, MGL, 又称METase, EC 4.4.1.11),是一种5'-磷酸吡哆醛(Pyridoxal 5' phosphate, PLP)依赖型的多功能酶,属于 $\gamma$ -蛋白家族。它能催化L-甲硫氨酸及同型半胱氨酸的 $\alpha,\gamma$ -裂解反应。通过MGL来消耗肿瘤组织的L-甲硫氨酸,使具有L-甲硫氨酸依赖性的癌细胞停止分裂,可达到肿瘤治疗的目的。同时,它可以作为同型半胱氨酸血症诊断的一种检测试剂。

在前期工作中,本实验室构建了一个约含39 600个克隆的中国南海深海沉积物 Fosmid 宏基因组文库,并对其中一个能产生黑色素的克隆子 *fss6* 进行了亚克隆,对其中一个片段大小为4 406 bp,含有4个ORF的亚克隆进行了深入研究<sup>[1]</sup>。在研究过程中,通过对该亚克隆所含ORF的氨基酸序列分析发现,所有ORF的最相近序列均来自 *Idiomarina* 属的细菌,该属是2001年由Ivanova等提出的一个新属<sup>[2]</sup>。在本研究中,对这个宏基因组文库克隆子进行了插入片段全长测序分析,并对其中一个预测的甲硫氨酸 $\gamma$ -裂解酶基因进行了生物信息学分析。

目前不少研究者已经从一些生物体内成功分离提取到MGL,并对其酶学性质进行了初步的研究,然而受产酶条件及产酶水平的影响,限制了天然来源的MGL在实验研究及商业化生产中的有效应用,因此MGL的异源表达成为研究热点。此

研究使用本实验室构建好的深海宏基因组文库中的甲硫氨酸 $\gamma$ -裂解酶基因(*mgl*),克隆至大肠杆菌中并优化表达条件,以达到高效表达的目的。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌种、质粒

*fss6* 为本实验室构建的南海深海沉积物宏基因组文库的一个克隆子,对其插入的片段进行了全长测序,本文克隆表达的基因 *mgl* 为其插入片段中的一个基因。

大肠杆菌 DH5 $\alpha$ 、BL21(DE3)以及原核表达载体 pET-28a(+)均由本实验室保存。

### 1.2 主要试剂和仪器

*Nde* I、*Xho* I酶、蛋白质Marker SM0431, MBI Fermentas 公司;质粒小量提取试剂盒(MiniBEST Plasmid Purification Kit)、DNA片段纯化试剂盒(DNA Fragment Purification Kit),宝生物工程(大连)有限公司;DNA回收试剂盒,天根生化科技(北京)有限公司。

SONICS 超声波破碎仪,南京新辰生物科技有限公司;Biologic LP 低压蛋白层析系统, Bio-Rad 公司;TGRADIENT96 温度梯度PCR仪, Biometra 公司;DYY-6C 型双稳定恒压恒流电泳仪,北京六一生物科技有限公司。

### 1.3 表达载体的构建与鉴定

PCR 扩增 *mgl* 基因,用1% (质量体积比)琼脂糖凝胶电泳检测,在紫外线下观察到目的片段后进行回收纯化,分别对回收纯化产物和载体 pET-28a(+)进行 *Nde* I 和 *Xho* I 双酶切。酶切产物用1% (质量体积比)琼脂糖凝胶进行电泳分离,用DNA回收试剂盒回收目的基因。将纯化的目的 *mgl* 基因和线性化的 pET-28a(+)用 T4 连接酶过夜连接,连接产物转化 *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  感受态细

菌。对在含有抗生素的 LB 平板上长出的单菌落用菌落 PCR 的方法进行鉴定, 经初步鉴定为阳性的重组子, 再次培养后进行测序, 以确认克隆的基因是否与原序列一致。

#### 1.4 重组载体 pET-mgl 转化 *E. coli* BL21(DE3) 及表达

取鉴定正确的携带 pET-mgl 重组质粒的 *E. coli* DH5 $\alpha$  接种培养, 提取质粒, 转化感受态表达宿主菌 *E. coli* BL21(DE3), 转化后进行菌落 PCR 鉴定。选取鉴定过的克隆子命名为 pET-mgl/BL21, 作为基因 *mgl* 的大肠杆菌工程菌株。

挑选单菌落, 接种于含 50  $\mu$ g/mL Kan 的 LB 液体培养基中, 37  $^{\circ}$ C、200 r/min 培养过夜。取培养菌液按 1:100 的比例进行放大培养, 至菌体密度  $OD_{600}$  达到 0.6–0.8 (大致需要 3 h), 加入 100 mmol/L IPTG 至终浓度为 1 mmol/L。仍在 37  $^{\circ}$ C、200 r/min 振荡诱导培养 9–10 h。收集诱导培养的菌体超声破碎, 破碎液于 4  $^{\circ}$ C、22 000 $\times$ g 离心 20 min, 取上清液作为粗酶液, 对重组蛋白(命名为 rMGL, 以区别其他文献报道的未经克隆重组表达的 MGL)进行 SDS-PAGE 检测以及蛋白质含量和酶活测定。

#### 1.5 重组蛋白表达条件的优化

参照 1.3 方法, 分别对诱导温度(37、30、25、20、15  $^{\circ}$ C), 诱导剂浓度(0、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.8、1.0 mmol/L), 诱导时间(8、10、12、14、16、18 h)等表达条件进行优化, 通过 SDS-PAGE 分析, 同时测试各诱导培养时间的粗酶液的可溶性蛋白含量、酶活和比活。确定最佳表达条件。

#### 1.6 重组蛋白提取条件的优化

采用  $Ni^{2+}$ -亲和层析的方法进行纯化。将层析柱固定在铁架台上, 用 0.2 mol/L 的  $NiSO_4$  溶液过柱后, 用起始缓冲液(40 mmol/L 磷酸钾缓冲液, 0.1 mmol/L PMSF, pH 7.2)平衡层析柱。将制备的粗酶上清液以 1.0 mL/min 的流速加入预处理的层析柱, 分别用含 40、80、160、200、300、400 mmol/L 咪唑的洗涤缓冲液进行洗脱, 分部收集洗脱液, 进行 SDS-PAGE 检测。

#### 1.7 重组蛋白酶含量及活性测试

可溶性蛋白含量用蛋白质定量试剂盒进行测定, 按照说明书的步骤进行操作。酶活性测定按照 Tanaka 等的方法进行<sup>[3]</sup>, pH 8.0、37  $^{\circ}$ C 反应条件下, 每分钟催化 L-甲硫氨酸生成 1.0  $\mu$ mol  $\alpha$ -丁酮酸的酶量定义为 1 酶活单位(U), 酶的比活(Specific activity, SA)定义为: 每毫克蛋白所含的酶活单位, 单位为 U/mg。

## 2 结果与分析

### 2.1 基因 *mgl* 在 BL21(DE3)宿主菌中的鉴定

随机挑取抗性平板上的若干个菌落, 采用菌落 PCR 扩增的方法, 大部分克隆子获得与预期目标编码基因 *mgl* 大小相符的片段(约 1 300 bp)。经测序证实所获得的 PCR 片段与 *mgl* 序列完全一致, 说明 *mgl* 已经正确连接至 pET-28a(+)载体, 并成功转入 *E. coli* DH5 $\alpha$  中。菌落 PCR 鉴定结果如图 1 所示。

将测序证实的 *E. coli* DH5 $\alpha$  克隆子培养, 提取质粒, 转化 BL21(DE3)表达宿主, 随机挑取抗性平板上的若干个 BL21(DE3)克隆子进行菌落 PCR 验证, 菌落 PCR 鉴定如图 2 所示, 所有克隆子均有目标条带, 这些阳性克隆子则为携带 pET-mgl 重组质粒的工程表达菌株(命名为 pET-mgl/BL21(DE3))。

### 2.2 重组 rMGL 的表达与纯化

由 pET-mgl/BL21 表达的重组蛋白 rMGL 带有 His-Tag, 用  $Ni^{2+}$ -亲和层析的方法进行纯化, 通过咪唑浓度梯度洗脱回收, 获得纯度较高的蛋白(图 3), 可用于下一步的实验。

### 2.3 重组 rMGL 表达条件的优化

#### 2.3.1 诱导温度对表达的影响

在酶液的 SDS-PAGE、可溶性蛋白含量及酶活性测定中可知, 在 25–37  $^{\circ}$ C 温度范围内, 随着诱导温度的降低, 粗酶液中的可溶性蛋白含量、酶活及比活均有明显增加。而当诱导培养温度继续降低, 由于菌体生长速度减缓, 粗酶液中的可溶性蛋白含量、酶活及比活有所下降。综合菌体生长速度和蛋白表达量来考虑, 选择 25  $^{\circ}$ C 作为 rMGL 诱导表达的最适温度(图 4)。

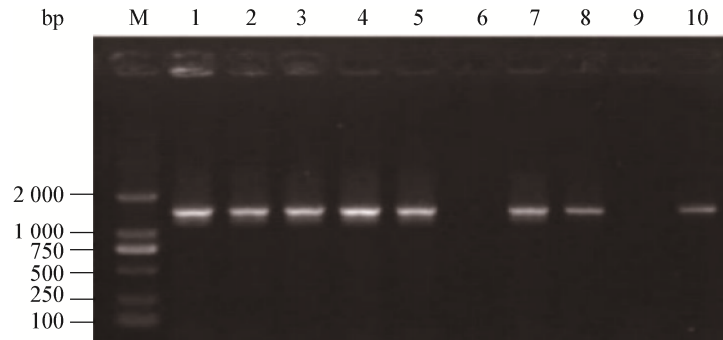


图 1 部分 pET-mgl-DH5 $\alpha$  转化子的 PCR 鉴定

Figure 1 Colony PCR of random selected pET-mgl-DH5 $\alpha$  transformants

注: M: DL2000; 1-10: 随机挑选的转化子 PCR 测试.

Note: M: DL2000; 1-10: PCR products of random selected transformants.

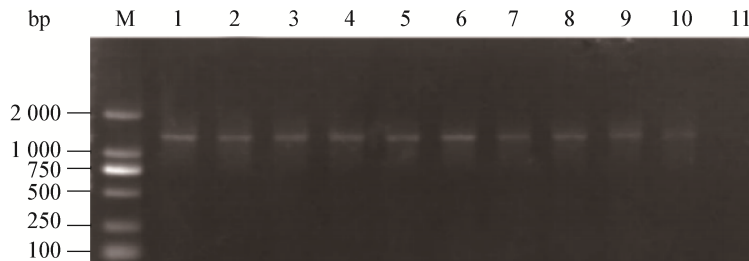


图 2 部分 pET-mgl/BL21(DE3)转化子 PCR 鉴定

Figure 2 Colony PCR of random selected pET-mgl-BL21(DE3) transformants

注: M: DL2000; 1-10: 随机挑选的转化子 PCR 测试; 11: 阴性对照.

Note: M: DL2000; 1-10: PCR products of random selected transformant; 11: Negative control.

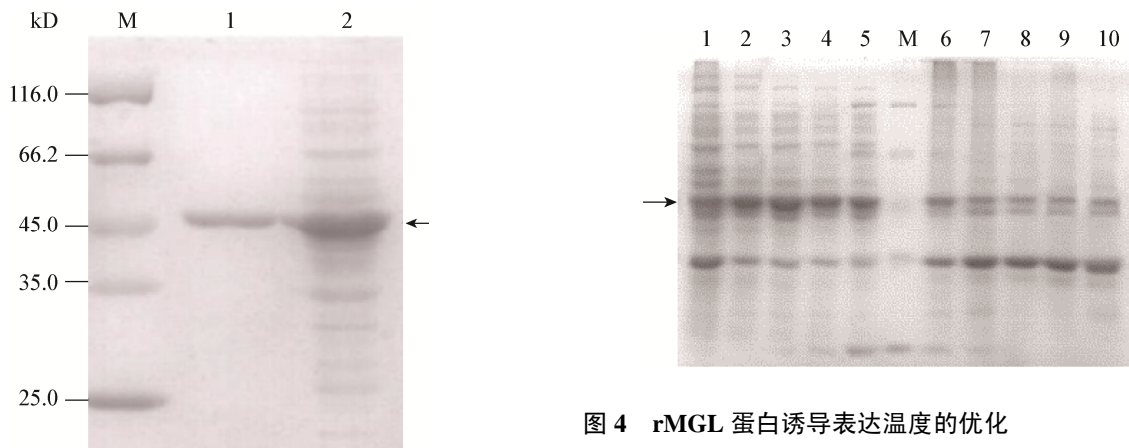


图 3 重组蛋白 rMGL 的纯化

Figure 3 The purification of rMGL protein

注: M: 蛋白标记 SM0431; 1: Ni<sup>2+</sup>亲和提取纯化的 rMGL; 2: pET-mgl 发酵后的可溶性蛋白. 箭头指示部位为 46 kD 的 rMGL.

Note: M: Protein marker SM0431; 1: Purified rMGL protein by Ni<sup>2+</sup>-affinity column; 2: The soluble extract fractions of cells transformed with pET-mgl. The arrow points to the rMGL protein band of 46 kD.

图 4 rMGL 蛋白诱导表达温度的优化

Figure 4 Optimization of induction temperature for rMGL overexpression

注: M: 蛋白标记 SM0431; 1-5: pET-mgl/BL21 在 37、30、25、20、15 °C 分泌表达的粗酶液; 6-10: pET-mgl/BL21 在 37、30、25、20、15 °C 菌体碎片上的蛋白. 箭头所示部位为 rMGL.

Note: M: Protein marker SM0431; 1-5: The cells extraction of pET-mgl/BL21 incubated at 37, 30, 25, 20, 15 °C; 6-10: The cells fragments of pET-mgl/BL21 incubating at 37, 30, 25, 20, 15 °C. The arrow points to the position of rMGL.

### 2.3.2 诱导剂浓度对表达的影响

与不加 IPTG 的对照相比, 加入终浓度为 0.1 mmol/L 的 IPTG 即可获得明显的诱导效果, 重组子表达出大量可溶的 rMGL 蛋白, 而在细胞破碎物沉淀中 rMGL 的含量较低。在 IPTG 终浓度在 0.1–0.5 mmol/L 的范围内, rMGL 的表达量在 SDS-PAGE 中没有呈现出明显的变化; 而当 IPTG 的终浓度达到 0.8 mmol/L 和 1.0 mmol/L 时, rMGL 表达量略有下降。综合考虑, 确定添加至培养物中 IPTG 的终浓度为 0.2 mmol/L (图 5)。

### 2.3.3 诱导时间对表达的影响

从粗酶液的 SDS-PAGE 和可溶性蛋白含量及酶活性测定来看, rMGL 的表达量在 8–12 h 的诱导时间内随时间的延长而增加, 到达 12 h 后表达量基

本达到稳定。酶活性单位则随诱导时间延长而呈先提高后降低的趋势, 在 12 h 时达到最大值: 每 100 mL 培养物产酶 623.9 U。根据实验数据, 确定最佳诱导时间为 12 h (图 6)。

### 2.4 重组蛋白的提取条件优化

采用  $\text{Ni}^{2+}$ -亲和层析的方法对重组蛋白进行纯化, 重点对不同浓度咪唑缓冲液进行了洗脱的优化。从图 7 可得出, 40、80 mmol/L 咪唑浓度洗脱液进行洗脱时, 主要是去除杂蛋白; 160、200、300、400 mmol/L 均能洗脱目的蛋白, 500 mmol/L 咪唑浓度洗脱液在  $OD_{320}$  已经检测不出数据, 证明目的蛋白已被完全洗脱。所以最终洗脱条件为: 起始缓冲液中加入 40 mmol/L 咪唑浓度, 用 80 mmol/L 咪唑浓度洗脱杂蛋白, 用 400 mmol/L 咪唑浓度梯度洗脱目的蛋白。

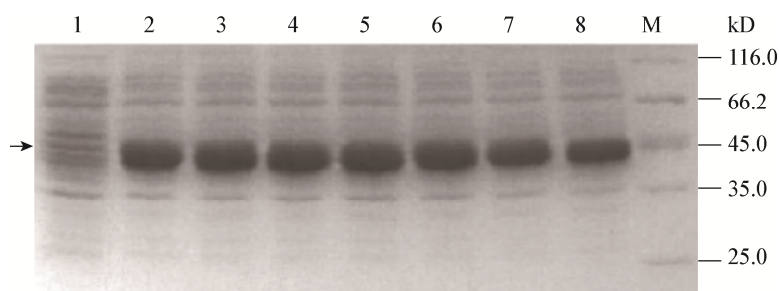


图 5 rMGL 表达 IPTG 诱导浓度的优化

#### Figure 5 Optimization of IPTG concentration for rMGL overexpression

注: 经不同浓度 IPTG 诱导 pET-mgl/BL21 产生蛋白的 SDS-PAGE 图。1–8 分别表示 0、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.8、1.0 mmol/L IPTG 的浓度。M: 蛋白标记 SM0431; 箭头所示部位为 rMGL。

Note: SDS-PAGE of the cells extraction of pET-mgl/BL21 induced by different concentration of IPTG. 1–8 represent the concentration of IPTG are 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.8, 1.0 mmol/L. M: Protein marker SM0431; The arrow points to the position of rMGL.

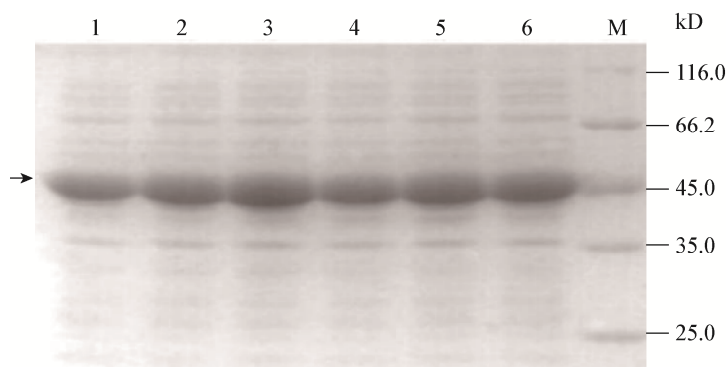


图 6 rMGL 表达最佳诱导时间的优化

#### Figure 6 Optimization of induction time for rMGL overexpression

注: M: 蛋白标记 SM0431; 1–6 分别表示 pET-mgl/BL21 经 8、10、12、14、16、18 h 诱导产生的蛋白图; 箭头所示部位为 rMGL。

Note: M: Protein marker SM0431; 1–6 represent the cells extraction of pET-mgl/BL21 incubated for 8, 10, 12, 14, 16, 18 h. The arrow points to the position of rMGL.

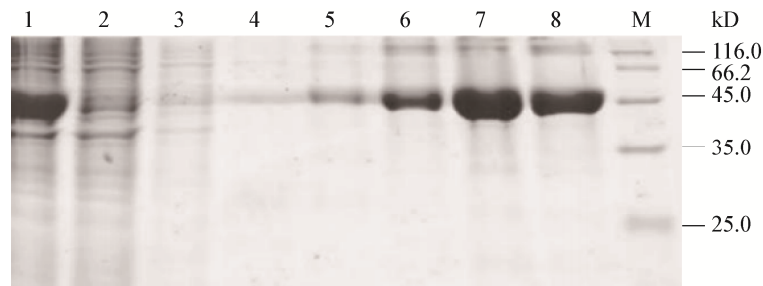


图7 不同咪唑洗脱浓度洗脱 rMGL 的优化

Figure 7 Optimization of imidazole concentration for rMGL purification

注: 1: 粗酶液; 2: 40 mmol/L 咪唑流穿液; 3-8: 40、80、160、200、300、400 mmol/L 咪唑洗脱液.

Note: 1: Crude enzymes; 2: 40 mmol/L imidazole washing fluid penetration; 3-8: 40, 80, 160, 200, 300, 400 mmol/L imidazole washing collection solution.

## 2.5 重组蛋白的活性测定

以 rMGL 对 L-甲硫氨酸的活性为 100%，对 DL-同型半胱氨酸、L-半胱氨酸及 L-胱氨酸的相对活性如图 8 所示。rMGL 不仅能作用于 L-甲硫氨酸，也能催化 DL-同型半胱氨酸的  $\gamma$ -裂解，而且对 DL-同型半胱氨酸的活性约为对 L-甲硫氨酸活性的 1.4 倍；但几乎不能作用于 L-半胱氨酸及 L-胱氨酸（相对活性分别为 3.59% 和 0.38%）。

## 3 讨论

对 MGL 的研究已经有 30 多年，主要来源是微生物，包括细菌和某些原生动物。此类酶最早于 1951 年在 *E. coli* 中发现，并将它最初命名为“甲硫氨酸酶” (Methionase, METase)<sup>[3]</sup>。随后几十年间又陆续报道了从细菌 *Pseudomonas putida* (=ovalis)、*Clostridium sporogenes*、*Aeromonas* sp.、*Citrobacter*

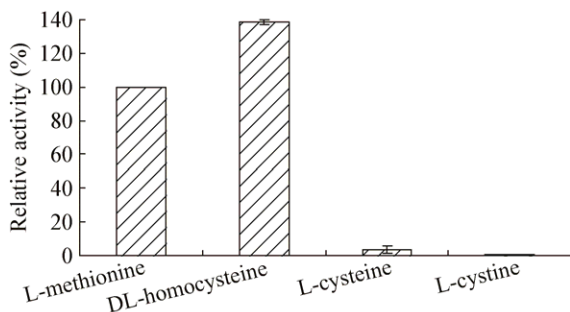


图8 rMGL 对不同底物的相对活性

Figure 8 Relative activity of rMGL on different substrates

*intermedius*、*Citrobacter freundii*、*Brevibacterium linens*、*Porphyromonas gingivalis* 等和原生动物的 *Entamoeba histolytica* 和 *Trichomonas vaginalis* 中发现了该类酶<sup>[4-12]</sup>，如今将其命名为甲硫氨酸  $\gamma$ -裂解酶。最近，在植物 *Arabidopsis thaliana* 中也发现了 MGL 的存在<sup>[13]</sup>。但是至今在酵母、高等哺乳动物和人中缺乏有生物活性的 MGL 的报道。之后的研究表明，虽然来源不同，但该酶几乎都是由 4 个相同亚基组成的四聚体。2 个亚基单体聚合成有活性的二聚体，2 个二聚体通过对称结合在一起形成全酶，四聚体的形成可以增加酶的稳定性，便于 PLP 的结合，并形成 4 个活性位点。

本文首次从深海宏基因组文库中筛选得到 *mgl* 基因。基于测序的宏基因组文库筛选方法，是一种开放式的筛选策略，它能最大限度获得宏基因组文库中的各种序列信息，在环境微生物多样性的研究、新基因和基因簇的发现以及未培养微生物基因组的重建方面发挥着重要作用。MGL 最重要的应用在于它的抗肿瘤活性。关于其对多种肿瘤的抑制作用目前已经有不少报道<sup>[14-16]</sup>。

虽然目前已发现并纯化了多种 MGL，但真正能够作为药物使用的为数并不多，这主要是因为作为药物使用的 MGL 需要具有高活性和高纯度，获得大量表达。国内马百坤等使用来源于人阴道毛滴虫的甲硫氨酸裂解酶基因在大肠杆菌 DH5 $\alpha$  表

达, 获得的产量难以进一步提高<sup>[17]</sup>; 孔晨虹等同样使用人阴道毛滴虫的甲硫氨酸裂解酶基因在大肠杆菌 BL21(DE3)表达, 但会形成蛋白包涵体, 大大减少了产量<sup>[18]</sup>。在本实验中选择 pET-28a(+)载体和大肠杆菌 BL21(DE3)宿主表达 MGL 蛋白。pET 系统的高表达水平容易导致表达蛋白在大量表达时发生错误折叠, 形成没有活性的包涵体。在本研究中, 通过优化诱导温度和诱导剂浓度及诱导时间, 使目的蛋白在细胞内得到了大量表达, 且以四聚体的可溶性活性蛋白形式存在, 不需经过如孔晨虹等报道的蛋白酶需要复性处理, 根据优化后的诱导培养条件进行诱导培养, 通过 SDS-PAGE 的凝胶成像分析, 重组蛋白 rMGL 约占可溶性总蛋白的 53% (高于马百坤等<sup>[17]</sup>报道的 34%), 粗酶液在最终的优化条件下诱导表达的酶活值可达到近 900 U/100 mL 培养物, 其产量高于国内外报道<sup>[3,17-18]</sup>, 说明利用 pET-28a(+)/BL21(DE3)表达 rMGL 的有效性。

在酶活研究中, rMGL 能催化 L-甲硫氨酸和 DL-同型半胱氨酸的裂解, 但几乎不作用于 L-半胱氨酸和 L-胱氨酸, 其中对 DL-同型半胱氨酸的催化效率比对 L-甲硫氨酸的催化效率高, 相对活性约为对 L-甲硫氨酸催化效率的 1.4 倍。预示着该蛋白在高半胱氨酸血症的临床检测中同样具有十分重要的作用, 极具药物开发的价值。

#### 4 结论

来自深海宏基因组文库中的 *mgl* 基因能够利用 pET-28a(+)/BL21(DE3)高效表达。rMGL 能催化 L-甲硫氨酸和 DL-同型半胱氨酸的裂解, 但几乎不作用于 L-半胱氨酸和 L-胱氨酸, 在抗肿瘤和心血管疾病诊断试剂盒方面具有较好的开发前景。

#### REFERENCES

- [1] Huang YL, Lai XT, He XC, et al. Characterization of a deep-sea sediment metagenomic clone that produces water-soluble melanin in *Escherichia coli*[J]. *Marine Biotechnology*, 2009, 11(1): 124-131
- [2] Ivanova EP, Mikhailov VV. A new family, *Alteromonadaceae* fam. nov., including marine proteobacteria of the genera *Alteromonas*, *Pseudoalteromonas*, *Idiomarina*, and *Colwellia*[J]. *Microbiology*, 2001, 70(1): 10-17
- [3] Tanaka H, Esaki N, Soda K. Properties of L-methionine  $\gamma$ -lyase from *Pseudomonas ovalis*[J]. *Biochemistry*, 1997, 16(1): 100-106
- [4] Ohigashi K, Tsunetoshi A, Ichihara K. The role of pyrroloxal in methylmercaptan formation, partial purification and resolution of methioninase[J]. *Medical Journal of Osaka University*, 1951, 2(2): 111-117
- [5] Kreis W, Hession C. Isolation and purification of L-methionine- $\alpha$ -deamino- $\gamma$ -mercaptomethane-lyase (L-methioninase) from *Clostridium sporogenes*[J]. *Cancer Research*, 1973, 33(8): 1862-1865
- [6] Nakayama T, Esaki N, Sugie K, et al. Purification of bacterial L-methionine  $\gamma$ -lyase[J]. *Analytical Biochemistry*, 1984, 138(2): 421-424
- [7] Lockwood BC, Coombs BH. Purification and characterization of methionine  $\gamma$ -lyase from *Trichomonas vaginalis*[J]. *The Biochemical Journal*, 1991, 279: 675-682
- [8] Faleev NG, Troitskaya MV, Paskonova EA, et al. L-Methionine- $\gamma$ -lyase in *Citrobacter intermedius* cells: stereochemical requirements with respect to the thiol structure[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 1996, 19(8): 590-593
- [9] Dias B, Weimer B. Purification and characterization of L-methionine  $\gamma$ -lyase from *Brevibacterium linens* BL2[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1998, 64(9): 3327-3331
- [10] Yoshimura M, Nakano Y, Yamashita Y, et al. Formation of methyl mercaptan from L-methionine by *Porphyromonas gingivalis*[J]. *Infection and Immunity*, 2000, 68(12): 6912-6916
- [11] Tokoro M, Asai T, Kobayashi S, et al. Identification and characterization of two isoenzymes of methionine  $\gamma$ -lyase from *Entamoeba histolytica*: a key enzyme of sulfur-amino acid degradation in an anaerobic parasitic protist that lacks forward and reverse trans-sulfuration pathways[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2003, 278(43): 42717-42727
- [12] Manukhov IV, Mamaeva DV, Rastorguev SM, et al. A gene encoding L-methionine  $\gamma$ -lyase is present in *Enterobacteriaceae* family genomes: identification and characterization of *Citrobacter freundii* L-methionine  $\gamma$ -lyase[J]. *Journal of Bacteriology*, 2005, 187(11): 3889-3893
- [13] Rébeillé F, Jabrin S, Bligny R, et al. Methionine catabolism in *Arabidopsis* cells is initiated by a  $\gamma$ -cleavage process and leads to S-methylcysteine and isoleucine syntheses[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2006, 103(42): 15687-15692
- [14] Miki K, Xu MX, An ZL, et al. Survival efficacy of the combination of the methioninase gene and methioninase in a lung cancer orthotopic model[J]. *Cancer Gene Therapy*, 2000, 7(2): 332-338
- [15] Kokkinakis DM. Methionine-stress: a pleiotropic approach in enhancing the efficacy of chemotherapy[J]. *Cancer Letters*, 2006, 233(2): 195-207
- [16] Peron K, Jones TN, Gauthier SA, et al. Targeting of a novel

- fusion protein containing methioninase to the urokinase receptor to inhibit breast cancer cell migration and proliferation[J]. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 2003, 52(4): 270-276
- [17] Ma BK, Wang HB. High expression of the L-methionine  $\gamma$ -lyase gene in *E. coli*[J]. *Journal of Medical Postgraduates*, 2008, 21(4): 353-355,359 (in Chinese)
- 马百坤, 王红兵. 蛋氨酸裂解酶基因在大肠杆菌中的高效表达[J]. *医学研究生学报*, 2008, 21(4): 353-355,359
- [18] Kong CH, Xia LL, Xu SL, et al. Expression, renaturation and activity of recombinant methionine  $\gamma$ -lyase expressed as inclusion body in *E. coli*[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2010(4): 189-193 (in Chinese)
- 孔晨虹, 夏立亮, 徐顺利, 等. 重组蛋氨酸裂解酶的表达、复性及活性研究[J]. *生物技术通报*, 2010(4): 189-193

## 征 稿 简 则

### 1 刊物简介与刊登内容

《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,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。本刊为月刊,中文核心期刊,中国科技核心期刊,CSCD 核心期刊,曾获国家优秀科技期刊三等奖,中国科学院优秀科技期刊三等奖,并在新闻出版署设立的“中国期刊方阵”中被列为“双效”期刊。从 2012 年至今,本刊以国内“微生物、病毒学类期刊”综合评价总分第一而蝉联“百种中国杰出学术期刊奖”,并入选 300 种“中国精品科技期刊”,成为“中国精品科技期刊顶尖学术论文(F5000)”项目来源期刊。

本刊刊登内容包括:工业、海洋、环境、基础、农业、食品、兽医、水生、药物、医学微生物学和微生物蛋白质组学、功能基因组、工程与药物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、专栏等。

### 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

3.1 来稿要求论点明确,数据可靠,简明通顺,重点突出。

3.2 英文摘要写作注意事项:(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所得;(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,写完务必请英文较好且专业知识强的专家审阅定稿后再投稿;(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。

3.3 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”等。

3.4 脚注(正文首页下方):

Foundation items:

\*Corresponding author: Tel: 86-; E-mail:

Received: 01-01-20xx; Accepted: 01-03-20xx; Published online: 31-03-20xx

基金项目: 基金项目(编号)

\*通信作者: Tel: ; E-mail:

收稿日期: 20xx-01-01; 接受日期: 20xx-03-01; 网络首发日期: 20xx-03-31

(下转 p.3324)