微生物功能基因组学研究

黄留玉 王恒樑 史兆兴 朱厚础 苏国富

(军事医学科学院生物工程研究所 北京 100071)

Microbial Functional Genomics

Huang Liuyu Wang Hengliang Shi Zhaoxing Zhu Houchu Su Guofu

(*Institute of Biotechnology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071, China*)

关键词 微生物功能基因组学, 药物靶位, 疫苗, 生物功能图谱

中图分类号: Q933 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2003)03-0432-07

自从 1995 年流感嗜血杆菌的基因组序列测定完成之后^[1], 目前已有 75 种(株)微生物的基因组完成测序, 160 多种(株)微生物的基因组测序正在进行中^[2]。随着各种微生物基因组测序工作的不断完成和序列信息的积累, 微生物基因组学研究的重点已由结构基因组学向功能基因组学转移。微生物功能基因组学研究不仅要阐明微生物基因组内每个基因的作用或功能, 还要研究基因的调节及表达谱, 进而从整个基因组及其全套蛋白质产物的结构、功能、机理的高度去了解微生物生命活动的全貌, 揭示微生物世界的各种前所未有的规律, 并使之为人类和社会服务。

与真核生物相比, 虽然微生物的基因组相对简单, 但微生物基因组学研究仍具有重大的科学和经济意义。在细菌基因组中, 既有编码在极端环境下起催化作用的酶的基因, 也有编码分解化学污染物的酶的基因, 这些基因在真核细胞是不存在的。通过微生物功能基因组学研究, 还能发现药物靶位和疫苗抗原。微生物基因的功能及表达研究结果也能为研究复杂生物的基因功能提供参考。

近些年微生物功能基因组学研究受到了普遍重视。日本组织了十几所大学和研究机构, 计划用 5 年时间完成大肠杆菌的功能基因组研究^[3]。日本还与欧洲联合正在开展枯草杆菌功能基因组学研究^[4]。其它微生物的功能基因组学研究也在进行中。由于微生物的种类繁多, 功能基因组研究的内容又较丰富, 要全面介绍微生物功能基因组学研究是困难的。本文仅从未知功能基因的鉴定、药物靶位及疫苗抗原研究、致病机制研究、生物功能图谱研究 4 个方面进行简要的评述。

1 未知功能基因的鉴定

一株微生物的基因组序列测定完成后, 虽然对其基因组进行了功能注释, 但仍有许多开放阅读框(Open Read Form, ORF)的功能不明确。例如, 到序列发表时, 仍有 42% 的流感嗜血杆菌、38% 大肠杆菌、36% 的肺炎链球菌的基因组编码区的功能未知^[5]。对这些未知功能基因进行功能鉴定, 是微生物功能基因组学研究的重要方面, 也是深入开展微生物功能基因组学研究的基础。

基金项目: 国家重大基础研究发展规划(973)项目(G1999054103)和首都二四八重大创新工程项目(H010210360119)

作者简介: 黄留玉(1962-)男, 河南省平舆县人, 研究员, 硕士, 主要从事基因工程及微生物学研究。Tel/Fax 36-10-83821044; E-mail huangly@nic.bmi.ac.cn

收稿日期: 2002-11-07, 修回日期: 2003-02-12

未知功能基因的鉴定方法可分为两大类。一类是高通量的初步鉴定技术,另一类是系统分析技术。高通量的鉴定方法主要是生物信息学技术、基因芯片技术和蛋白质组学技术等。利用生物信息学技术研究未知功能的基因,主要依靠两个途径:一是在 DNA 层面上进行比较分析,根据该基因与已知功能基因的同源性,可以初步明确基因的功能;二是比较该基因编码产物(蛋白质)的序列和结构,对基因进行功能分类。基因芯片技术主要是通过检测环境因素对未知功能基因表达的影响,推测基因的可能功能。Richmond 等^[6]应用大肠杆菌的 4290 个预测的 ORF 制备一个高密度芯片,比较了热休克处理前后大肠杆菌的基因表达变化,结果显示 30 多个未知功能的基因可能与热休克有关。Ye 等^[7]应用 DNA 芯片研究枯草杆菌在厌氧条件下 mRNA 表达的变化,找到了一些与能量代谢、铁摄取、碳代谢及应激反应相关的基因。蛋白质组学技术主要是研究未知蛋白的物理特性和在不同生长条件下的蛋白表达的变化,对未知功能的基因进行初步的功能分类。Perrot 等^[8]应用蛋白质组学技术比较了大肠杆菌生长在 37℃ 和 4℃ 时蛋白表达谱的变化,发现在 4℃ 时 60% 的蛋白表达被抑制,但同时有 69 个蛋白高表达,提示这些基因与冷休克相关。这些方法因其高通量,常被用作研究基因功能的首选方法,但这些方法只能对基因的功能进行初步的描述,真正确定基因的功能还需要应用其它方法进行综合分析。

克隆、突变体构建及表型分析等是鉴定未知功能基因的有效方法。通过克隆一方面能够纯化靶基因编码的蛋白,通过研究基因产物的功能及定位来确定基因的功能;另一方面通过克隆,可以为芯片制备等研究提供 DNA。例如,为了研究大肠杆菌基因的功能,Mori 等^[3]计划将大肠杆菌基因组的所有 ORF 逐一进行克隆。构建基因突变体并分析每个突变体的表型,已被用来系统分析大肠杆菌、枯草杆菌、脑膜炎球菌等微生物基因的功能^[9]。Ogasawara 等^[4]利用质粒 pMUTIN 整合入目的基因,构建了 2000 多个枯草杆菌的突变体,用于枯草杆菌基因组的功能分析研究。我们实验室应用自杀质粒构建突变体研究痢疾杆菌的体内表达基因的功能,也取得了较好的结果。在微生物功能基因组学研究中,最简单的表型分析是监测在不同条件下突变体在平板培养基上的生长状态。如在枯草杆菌的功能基因组学研究中,他们观察了温度、抗菌素、营养等对突变体的影响,在实验的 789 个突变体中,有 328 个有表型变化^[4]。Ross 等^[10]用 20 种不同的生长条件对 8000 株酵母菌突变体进行表型分析,明确了 300 多个未知基因的功能。

B 型链球菌细胞分裂蛋白(Protein for cell separation of GBS, pcsB)基因的功能鉴定是一个研究未知功能基因的较好实例。pcs 基因是 B 型链球菌基因组中的一个未知功能的基因。通过比较基因组学研究,发现它与单核细胞增生李斯特菌中的胞壁质水解酶有同源性。Northern blot 分析显示,该基因是单顺反子转录结构。应用插入失活突变体研究其在细胞中的作用,表型分析发现该突变体对抗生素及渗透压敏感。综合上述研究结果,最后将 pcs 基因的功能确定为编码与细菌分裂有关的胞壁质水解酶^[11]。

由此可以看出,鉴定未知基因的功能是一项复杂的工作,需要多种技术综合应用。我国比较重视疾病相关基因的研究,在微生物基因的研究上相对较薄弱。我国虽然自己也进行了几个微生物基因组序列的测定,同时国家自然科学基金等基金管理部门都把微生物功能基因组研究放在优先资助的位置,但很少有单位开展大规模的微生物基因功能的研究工作。

2 药物靶位及疫苗抗原研究

抗生素是控制传染病的有效武器,对传染病的治疗发挥了积极的作用。但随着耐药菌株的增多,特别是多抗性菌株的出现,给抗生素的应用提出了严峻的挑战。由于技术的限制及对微生物认识的局限,虽然世界各国都投入了大量的人力、物力开展新型抗生素研究,但近 30 年来仍没有新型的抗菌素出现。微生物基因组的研究,尤其是微生物功能基因组学研究为抗菌素研究提供了新的发展机遇。一方面是抗菌素的研究提供了新的靶标和技术,更重要的是为抗菌素研究提供了新的研究思路。

新的研究思路是以微生物基因组为基础,利用微生物功能基因组学研究技术,高通量寻找药物靶标。主要技术路线是:首先应用生物信息学技术寻找微生物的保守基因,再用基因灭活技术从保守基因

中寻找微生物生长必需基因,并以此作为候选药物靶标,最后应用综合方法对这些靶标进行筛选,寻找新微生物药物的候选分子或化合物^[12]。

从药物研究的角度,微生物的保守基因有3类^[13]。一类是革兰氏阳性和阴性菌共有而人类没有的基因。这类基因是广谱候选靶标,用于广谱抗微生物药物的研究。可通过多种微生物基因组的比较而获得。第二类是在宿主体内有相同生长或感染部位的微生物共有的基因,如上呼吸道感染菌——肺炎球菌、流感杆菌、脑膜炎球菌等,用于治疗该部位感染的抗菌药物的候选靶标研究。这类基因可通过比较这些菌的基因组而获得。第三类是同一种属菌共有的基因,用于抗该微生物感染的药物研究候选靶标。这类基因可通过比较一个种内不同菌株的基因组而获得。后两种靶标既有利于防止耐药性的产生,又不影响人体的正常菌群。保守基因的寻找工作主要由生物信息学研究完成,目前已开发出了BLAST、COGs、HMM等多种软件和方法。

必需基因也包括两种,一是微生物在体外生长必需的基因,另一是微生物在体内感染必需的基因。必需基因的常规研究方法是应用插入失活及基因敲除构建突变体等。Elitra公司开发出了一种高通量寻找细菌必需基因的技术——“鸟枪反义(Shotgun antisense)”技术^[14]。该技术是用一个诱导表达质粒构建细菌染色体的随机文库,然后将这些重组质粒导入到待研究的细菌(可以是和文库相同的细菌,也可以是其它细菌)这些质粒表达产生的mRNA可以阻断相反序列(与原基因相同的序列)的表达,进而抑制细菌的生长。该公司应用这一方法,在一个细菌的染色体中平均一个月可发现100个必需基因,已经从微生物基因组中得到了4000多个必需基因。

对于筛选到的必需基因要明确其功能或作用。这主要依靠前面介绍的微生物功能基因组研究技术来完成。虽然有多种研究基因功能的方法,但仍有许多基因的功能尚不能确定。对于功能明确的基因,可直接用于生物活性抑制剂(候选药物)的筛选。对于暂时还不能确定其功能的基因,可用核磁共振技术、虚拟扫描技术以及基因扫描(Gene-to-Screen)技术等进行药物筛选。Elitra公司研究出了一种高通量基因筛选方法^[15],其基本原理是,通过反义表达或直接调节启动子,选择性减少细胞内的必需靶蛋白的量,使其对靶蛋白抑制剂非常敏感,通过与野生株对抑制分子的敏感性进行比较,筛选出对靶蛋白具有抑制作用的化合物。该公司正在应用这一方法开展工作,也许是由于专利的原故,研究的结果尚不清楚。

疫苗是控制传染病的最有效措施。传统的疫苗主要是死疫苗、减毒活疫苗、类毒素等,这些疫苗在传染病预防方面发挥了较好的作用。但这类疫苗的研究本身存在着许多问题。基因工程技术的发展开辟了现代疫苗研究的新天地。基因工程疫苗研究的关键是选择有效的保护性抗原。传统上应用病人血清或动物免疫血清来筛选抗原存在着两个明显的不足:一是免疫原不一定都是有保护作用的抗原,即有的抗原能刺激抗体产生,但不具有预防作用。即使是保护性抗原,亦可因序列变异、表达纯化困难、或成本太高,而不能作为疫苗研究的抗原。二是这种方法一次只能研究分析少数抗原,研究周期又比较长(一般需要数年),一旦出现阴性研究结果,重新开始新的研究需要较长时间。

微生物基因组学研究给疫苗研究提供了新的发展机遇,同时也改变了保护性抗原筛选的研究策略^[16]。一般来说,保护性抗原多是毒力因子、分泌及膜相关蛋白。因此这种新策略是以微生物基因组为平台,应用生物信息学技术预测毒力因子、分泌及表面相关抗原,应用蛋白质组学技术寻找外膜抗原,应用体内表达技术(IVET)、信号标签诱变技术(STM)、DNA芯片等寻找侵袭及毒力相关抗原。对上述抗原基因进行高通量克隆、表达、纯化重组蛋白。然后,再对纯化后的抗原进行体内、体外评价,筛选出保护性抗原,进行疫苗研究。

Pizza等^[17]对B型脑膜炎球菌的基因组进行生物信息学分析,选出了600个编码表面蛋白的基因。把这些基因克隆到大肠杆菌,有350个基因成功表达,并得到了纯化的表达产物。小鼠免疫保护实验表明,有25个抗原具有较好的保护作用。Rappuoli等^[18]也用类似方法在肺炎衣原体中筛选出了58个能激发保护性免疫反应的疫苗候选分子。利用微生物基因组,国外还正在对结核杆菌、幽门螺杆菌、流感杆

菌等疫苗研究^[19]。

这一类研究的基本特点可以概括为高通量、大规模。也有人形象地说这一研究是“撒大网,捞小鱼”。国外就是通过对成千上万个基因进行研究,才从中筛选到少量的药物靶位或疫苗抗原。我国开展这方面的研究明显不足,就疫苗研究来看,大部分还停留在已知功能的、有限的几个抗原上,很少有单位开展大规模的保护性抗原筛选研究。鉴于国外筛选到的基因都进行了专利保护,我们如不加强这方面的研究,将严重影响我国的抗菌药物及疫苗的发展。

3 致病性研究

病原菌致病性研究是微生物功能基因组学研究的重要领域。尤其是通过比较基因组学及微生物与宿主的相互作用研究,极大地加深了对微生物致病性的认识。

3.1 提出了分子 Koch 氏原则

Koch 氏原则自 1890 年提出以来,一直是发现病原微生物的基本标准。随着许多微生物基因组序列的完成和功能基因组学技术的发展,为适应致病基因的寻找,提出了分子 Koch 氏原则^[20]。(1)这些基因的表型或特征必须与病原微生物有关;(2)特异性失活这些基因能使病原菌减毒或失去毒力;(3)修复或等位置换这些突变的基因,能使病原菌恢复毒力。对于遗传操作较难的基因,可以修改为(4)这些基因的产物能诱导产生中和性抗体。

3.2 更新了毒力基因的概念

过去认为毒力基因就是编码直接引起宿主损伤因子的基因,因此认识的毒力基因非常有限。根据分子 Koch 氏原则及功能基因组学研究,有人把毒力基因被分为 3 类^[20]。(1)真毒力基因(True virulence genes),这些基因的编码产物既能与宿主相互作用,又能直接引起宿主损伤,且在非致病菌不存在。如各种毒素基因。(2)毒力相关基因(Virulence-associated genes),这些基因的编码产物能调节毒力基因的表达,或参与毒力因子的修饰、加工及分泌,或为真毒力因子发挥作用所必需。(3)毒力辅助基因(Virulence life-style genes),这些基因的编码产物有利于病菌在宿主体内定居,或抵抗宿主的免疫系统,或使其能在细胞内生存,或有利于病菌和宿主内的其它微生物竞争。

3.3 寻找新的毒力基因

以微生物基因组序列为基础,应用表型分析、比较基因组学、蛋白质组学技术、体内表达技术(IVET)、信号标签诱变技术(STM)、免疫学技术等寻找毒力基因和毒力相关基因。Hayashi 等^[21]比较分析了大肠杆菌 O157:H7 与 K12 株的基因组,发现 O157:H7 的基因组比 K12 多 859kb,且多编码 1632 个蛋白质,其中至少有 131 个蛋白质可能与致病相关。本研究室应用 IVET 研究了痢疾杆菌福氏 2a 的体内表达基因,也找到了一些新的毒力相关基因。如果以“毒力因子和细菌”为关键词,在 PubMed 中收寻,可以得到 1 000 多个靶分子^[20]。这在一定程度上说明了毒力基因寻找研究的丰硕成果。Ⅲ型分泌系统的发现是微生物功能基因组学研究的重要成果^[22],Ⅲ型分泌系统是一种多成分分泌系统,在革兰氏阴性菌中高度保守,和细菌的致病性有关。当病原菌与宿主细胞接触时,病原菌才启动Ⅲ型分泌系统,分泌效应分子。Ⅲ型分泌系统的建立需要 25 个左右的基因,且受多种因素的调节。如,温度、盐浓度、与宿主细胞接触等都能调节Ⅲ型分泌系统。在痢疾杆菌,当温度上升到 37℃时,类似于 AraC 的转录激活因子 VirF 激活另一个调节因子 VirB,再由 VirB 激活Ⅲ型分泌系统^[23]。

3.4 毒力作用机制研究

主要是利用功能基因组学等综合手段研究病原菌与宿主的相互作用。关于病原菌如何影响宿主细胞,Orth 等^[24]研究发现了一个很有意义的结果。YopJ 是鼠疫杆菌的毒力因子,它的类似蛋白广泛存在于动植物细菌中,它具有类似泛素的蛋白酶活性。当病原菌与宿主细胞接触时,病原菌通过Ⅲ型分泌系统将其分泌到宿主细胞内,YopJ 通过阻断 MAPK(Mitogen-activated protein kinase)、NFκB(Nuclear factor kappa B)等多条信号通路,抑制宿主的免疫反应,引起宿主细胞凋亡。关于宿主细胞对病原菌的反应,Cohen

等^[25]应用含有 6800 条人类基因的高密度芯片研究了人的单核细胞 HHP1 对单核细胞增生李斯特菌感染的反应,发现在单核细胞中不仅与非特异免疫反应相关的基因发生了变化,而且一些与细胞动员相关的肌动蛋白结合蛋白和微管蛋白基因也有变化。

对微生物的致病性研究,过去主要是重视对微生物本身的研究分析,研究的重点主要集中到少量的毒力因子和传统的致病基因。由于研究对象有限,我国许多的微生物学工作者转向了免疫学、甚至肿瘤学研究。目前,致病微生物学研究的重点已转移到微生物与宿主的关系研究。利用微生物基因组和人类基因组的研究成果,开展微生物致病机理研究,使这一古老的研究领域“枯木逢春”,一个崭新的学科——细胞微生物学也应运而生。

4 微生物生物学功能图谱研究

生物体是由成千上万个分子组成的复杂系统。基因组序列的完成及高通量技术的发展,使我们能够从整体上研究生物分子的作用和功能,从而全面揭示细胞的生命活动,这一直是生物学家的梦想。要在分子水平上了解生命活动,不仅需要知道单个分子的功能,更重要的是知道一个特定生命过程所涉及的全部分子的作用和功能。也就是说,要绘制出一张张生命的功能图谱。目前的研究现状是只给出了一个电子元件的清单,虽然一些元件的功能已经知道,但还没有联成电路图。生物学功能图谱研究,就是研究一个特定的生命活动,如蛋白合成、能量代谢、应激调节等所涉及的全部分子以及这些分子之间的相互联系。开展微生物的生物学功能图谱研究,不仅能推动微生物学的发展,也为高等生物的功能基因组学研究提供模型。

代谢网络图是微生物生物学功能图谱之一。重建代谢网络的基本实验策略是^[26] (1)寻找构成某一代谢网络或通路的所有基因、蛋白及其它小分子,尽可能地根据以前的研究结果,画出这一代谢通路的草图。(2)利用遗传学手段或改变生长条件等干扰该代谢通路中的某些成分,检测细胞的相应反应。(3)结合代谢草图及细胞的其它已知的相互作用网络,综合分析 mRNA 及蛋白的变化。(4)提出新的假设或设计新的干扰实验。半乳糖代谢是研究基因调控机制的经典模型,因为转运和催化半乳糖的酶只在半乳糖存在时才表达。在利用酿酒酵母研究半乳糖代谢网络时,设计了 20 个系统干扰实验,检测出了 997 个 mRNA 有相关变化,在检测的 289 个蛋白中,有 15 个蛋白参与了转录后调控,通过研究分子的相互作用,提出了半乳糖利用的调节网络,以及与其它相关代谢通路相互作用的假设。在大肠杆菌、流感噬血杆菌及枯草杆菌,已成功地重建了 20 种氨基酸的生物合成通路^[27]。通过生物信息学技术可以直接对基因组进行扫描分析,重建代谢网络,MIT 系统或 KEGG 等软件都能从基因组中分析描述代谢通路,这种方法不仅可用于有完整基因组序列的微生物,也能用于仅有部分基因组序列的微生物的代谢通路重建。目前已建成了几个代谢通路数据库,如 EcoCyc、MPW 等^[28]。

微生物要生存就要对复杂的环境变化做出迅速的反应。这些反应是受基因控制的。从理论上讲,微生物中的每个基因都有自己的调节物,换句话说,调节物控制着许多基因,有时还控制着其它调节物。因此细胞对环境变化的反应存在着一个复杂的调控网络^[29]。研究调控网络有 3 个主要任务,一是要研究调控网络的组成,二是要研究其相互作用,三是要研究反应的时间顺序。虽然环境的变化大多是多因素的,但为了便于研究,多采用单一因素刺激来研究微生物的反应。氮饥饿是研究反应调节网络的较好例子。当大肠杆菌感受到氮缺少时,将增加亮氨酸调节蛋白(Lrp)的合成,Lrp 将激活或抑制相关靶操纵子的转录,进而影响其它基因、mRNA 和蛋白质,引起细胞的功能和代谢发生相应的变化。如 Lrp 将调节膜蛋白 K(OmpF)的合成,使细胞膜孔道加大。

还有多种微生物功能图谱正在研究中,如核酸—核酸相互作用图、蛋白—核酸相互作用图等。Rain 等^[30]构建了幽门螺杆菌的蛋白质与蛋白质相互作用图。他们以 261 个幽门螺杆菌的蛋白基因构建诱饵文库,以该菌的随机染色体文库作为捕获文库,进行酵母双杂交试验,检测出了 1200 多个相互作用蛋白。

这一工作是相对基础性的研究工作,我国从事代谢工程研究的人员很多,但主要集中在工程菌的发酵培养上,对发酵培养条件及工艺研究较多,真正在微生物的代谢研究方面做的工作不多。结合微生物功能基因组研究,国外十分重视这一领域的研究。这一研究不仅具有理论意义,也能进一步推动我国代谢工程的发展,建议我国相关领域的研究者应重视这方面的研究工作。

5 结束语

以目前的测序规模,估计在近5年内,主要病原微生物的基因组序列及其它有代表性的非病原微生物的基因组序列将完成测序工作。这将使微生物学研究全面进入后基因组学时代,即功能基因组学研究时代。一般来说,科学的发展要靠需求牵引和技术推动。虽然在实验及生物信息学方面已经发展了一系列的高通量功能研究方法,但方法学在一定程度上仍是制约功能基因组学发展的“瓶颈”。进一步发展高通量、尤其是自动化的基因组学研究方法(包括实验方法和计算方法)将是微生物功能基因组学研究的重点之一。在应用方面,虽然目前还没有真正的基因组学抗生素及疫苗问世,但可以确信,这只是个时间问题。利用微生物基因组研究药物靶标及疫苗,在相当长的一个时期内都将是微生物功能基因组学最诱人的研究领域。对于病原微生物来说,研究其致病性将是一个永恒的研究主题,这方面的研究将主要从基因及其产物的水平围绕微生物与宿主的相互作用开展工作,以发现新的毒力基因及致病机理,为传染病的防治提供更多的理论依据。微生物的代谢、调控、进化等研究也将更加深入,开展这方面的研究,不仅可以加深对微生物的认识,也为研究高等生命提供好的参考模型,为最终揭开生命的奥秘作出贡献。

参 考 文 献

- [1] Fleischmann R D , Adams M D , White O , *et al.* Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* RD. *Science* ,1995 **269**(5223) :496 ~ 512.
- [2] <http://www.Tigr.org/tldb/mlb/mdbcomplete.html>
- [3] Mori H , Isono K , Horiuchi T , *et al.* Functional genomics of *Escherichia coli* in Japan. *Res Microbiol* , 2000 **151** :121 ~ 128.
- [4] Ogasawara N. Systematic function analysis of *Bacillus subtilis* genes. *Res Microbiol* , 2000 **151** :129 ~ 134.
- [5] Chalker A F , Lunsford R D , Rational identification of new antibacterial drug targets that are essential for viability using a genomics-based approach. *Pharmacology & therapeutics* , 2002 **95** :1 ~ 20.
- [6] Richmond C S , Glasner J D , Mau R , *et al.* Genome-wide expression profiling in *Escherichia coli* K-12. *Nucleic Acids Res* , 1999 **27** :3821 ~ 3835.
- [7] Ye R W , Tao W , Bedzyk L , *et al.* Global gene expression profiles of *Bacillus subtilis* grown under anaerobic conditions. *J Bacteriol* , 2000 **182** :4458 ~ 4465.
- [8] Perrot F , Hebraud M , Junt G A , *et al.* Protein synthesis in *Escherichia coli* at 4°C. *Electrophoresis* , 2000 **21** :1625 ~ 1629.
- [9] Bianchi M M , Ngo S , Vandenbol M , *et al.* Large-scale phenotypic analysis reveals identical contributions to cell functions of known and unknown yeast genes. *Yeast* , 2001 **18**(15) :1397 ~ 1412.
- [10] Ross M P , Coelho P S , Roemer T , *et al.* Large-scale analysis of yeast genome by transposon tagging and gene disruption. *Nature* , 1999 **402** :413 ~ 418.
- [11] Reinscheid D J , Gottschalk B , Schubert A , *et al.* Identification and molecular analysis of *pcsB* , a protein required for cell wall separation of Group B streptococcus. *J Bacteriol* , 2001 **183** :1175 ~ 1183.
- [12] Read T D , Gill S R , Tettelin H , *et al.* Finding drug targets in microbial. *DDT* , 2001 **6**(17) :887 ~ 892.
- [13] Loferer H. Mining bacterial genomes for antimicrobial targets. *Molecular Medicine Today* , 2000 **6** :470 ~ 474.
- [14] Forsyth R A , Haselbeck R J , Ohlsen K L , *et al.* A genome-wide strategy for the identification of essential genes in *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol* , 2002 **43**(6) :1387 ~ 1400.
- [15] Foulkes J G. Elitra pharmaceuticals : new paradigms for antimicrobial drug discovery. *Drug Discovery Today* , 2002 **7**(5) :s12 ~ s15.

- [16] Grandi G. Antibacterial vaccine design using genomics and proteomics. *TRENDS in Biotechnology*, 2001, **19** (5):181 ~ 188.
- [17] Tettelin H, Saunders N J, Heldelberg J, *et al.* Complete genome sequencing of *Neisseria Meningitidis* serogroup B strain MC58. *Science*, 2000 **287** :1809 ~ 1581.
- [18] Rappuoli R. Reverse vaccinology. *Curr Opin Microbiol* 2000 **3** :445 ~ 450.
- [19] Chakabari D N, Fiske M J, Fletcher L D, *et al.* Application of genomics and proteomics for identification of bacterial gene products as potential vaccine candidates. *Vaccine*, 2001 **19** :601 ~ 612.
- [20] Wassenaar T M, Gastra W. Bacterial virulence : can we draw the line ? *FEMS Microbiology Letters*, 2001 **201** :1 ~ 7.
- [21] Hayash T, Makino K, Ohnishi M, *et al.* Complete genome sequence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 :H7 and genomic comparison with laboratory strain K-12. *DNA Research*, 2001 **8** :11 ~ 22.
- [22] Cornelis G R, Rappuoli R. Host-microbe interactions : bacteria microbiology will never be the same again. . . *Current Opinion in Microbiology*, 2001 **4** :13 ~ 15.
- [23] Francis M S, Wolf W H, Forsberg A. Regulation of type III secretion systems. *Current Opinion in Microbiology*, 2002 **5** :166 ~ 172.
- [24] Orth K. Function of the yersinia effector YopJ. *Current Opinion in Microbiology*, 2002 **5** :38 ~ 43.
- [25] Cohen P, Bouaboula M, Bellis M, *et al.* Monitoring cellular responses to *Listeria monocytogenes* with oligonucleotide arrays. *J Biol Chem*, 2000 **275** :11181 ~ 11190.
- [26] Ideker T, Thorsson V, Ranihi J A, *et al.* Integrated genomic and proteomic analyses of a systematically perturbed metabolic network. *Science*, 2001 **292** (5) :929 ~ 934.
- [27] Bono H, Ogata H, Goto S, *et al.* Reconstruction of amino acid biosynthesis pathways from the complete genome sequence. *Genome Res*, 1998 **277** :1453 ~ 1474.
- [28] Overt M W, Schilling C H, Famili I, *et al.* Metabolic modeling of microbial. *Trend in Biochemical Sciences*, 2001 **26** (3) :179 ~ 186.
- [29] VanBogelen R A, Greis K D, Blumenthal R M, *et al.* Mapping regulatory networks in microbial cells. *Trends in Microbiology*, 1999 **7** (8) :320 ~ 328.
- [30] Rain J C, Selig L, Reuse H D, *et al.* The protein-protein interaction map of *Helicobacter pylori*. *Nature*, 2001 **409** :211 ~ 215.

微生物学报

(双月刊, 1953 年创刊)

第 43 卷 第 3 期 2003 年 6 月

ACTA MICROBIOLOGICA SINICA

(Bimonthly, Started in 1953)

Vol. 43 No. 3 June 2003

编辑 《微生物学报》编辑委员会
(北京海淀中关村中国科学院微生物研究所内, 邮政编码 100080)
电话: 010-62630422
E-mail: actamicro@sun.im.ac.cn

主编 李季伦
承办 中国科学院微生物研究所
出版 科学出版社
(北京东黄城根北街 16 号, 100717)

印刷装订 北京中科印刷有限公司
总发行处 北京报刊发行局
订购处 全国各邮电局
国外总发行 中国国际图书贸易总公司
(北京 399 信箱 邮政编码 100044)

广告经营许可证 京东工商广字第 0034 号

Edited by Editorial Board of Acta Microbiologica Sinica
(In the Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Zhongguancun, Beijing 100080, China)
Tel 86-10-62630422
Http://www.im.ac.cn/journals

Editor-in-Chief: Li Jilun

Sponsored by Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences

Printed by Science Press (16 Donghuangchenggen North Street, Beijing 100717, China)

Printed by Beijing Zhongke Printing Limited Company

Distributed by Beijing Bureau for Distribution of Newspapers and Journals

Domestic Subscription: All Local Post Offices in China

Foreign Distribution: China International Book Trading Corporation

(P. O. Box. 399, Beijing 100044, China)

国内外公开发行 中国标准刊号: ISSN 0001-6209 国内邮发代号 2-504 国外发行代号: BM67 定价 28.00 元
CN11-1995/Q