

微生物核糖体工程研究进展

谢庶洁^{1,2}, 肖静¹, 徐俊^{1*}

(¹国家海洋局生物遗传资源重点实验室, 第三海洋研究所, 厦门 361005)

(²厦门大学生命科学学院, 厦门 361005)

摘要: 微生物获得特定类型的抗性突变, 不仅反映了其核糖体或 RNA 多聚酶上相关靶位点结构的改变, 也对突变菌株次级代谢产物(抗生素等)的生物合成能力产生深刻影响, 因此筛选抗性突变株可作为微生物推理选育的途径之一。“核糖体工程”是利用微生物的各类抗性突变为筛选标记, 高效获得次级代谢产物合成能力提高的突变株的推理育种新方法。本文综述了微生物“核糖体工程”的概念、各类突变的作用机理, 并着重介绍组合抗性突变在提高出发菌株次级代谢产物产量方面的应用。

关键词: 核糖体工程; 抗生素抗性; 次级代谢; 微生物育种

中图分类号: Q933 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2009)08-0981-06

微生物产生种类繁多的酶、抗生素等生物活性物质, 是人类利用最广泛的生物资源。在野生型菌株中各类目标代谢产物的产量通常很低, 微生物菌株改良一直是重要的应用微生物学课题。常规的微生物诱变育种随机性高、耗时费力, 通过基因工程手段已可实现单基因编码的酶类的定向进化并进行超量表达, 但对需要成簇基因编码的抗生素等天然产物的产量提高则困难重重。

Shima 等于 1996 年发现在变铅青链霉菌 (*Streptomyces lividans*) 核糖体 S12 蛋白的编码基因 *rpsL* 中引入某些点突变, 可激活该菌株中沉默的抗生素生物合成基因, 导致放线紫红素的超量合成^[1]。随后大量的研究表明, 向微生物核糖体或 RNA 聚合酶中引入特定的突变有助于其次级代谢产物产量的提高。由于这些突变与出发菌株获得的药物抗性有关, 故可以抗性突变为指针, 建立一种简单易行的微生物定向育种新方法—核糖体工程^[2-3]。本文综述了核糖体工程的原理及其研究进展。

1 核糖体工程概要

抗生素生物合成一般发生在微生物细胞进入稳定生长期时, 其合成的启动与细菌中最重要的生长速率调节机制“严谨反应”密切相关^[4]。以 GDP 和 ATP 为底物, 与核糖体 L11 蛋白结合的 ppGpp 合成酶(RelA)在相应生理条件下合成诱导“严谨反应”发生的信号分子 ppGpp。已有实验证明 ppGpp 通过结合于 RNA 多聚酶来行使其在转录水平上的全局性调控^[5], 且与核糖体的功能密切相关。因此, 对作用于 RNA 多聚酶上的利福平等抗生素的抗性变化所反映的 RNA 多聚酶功能突变必然会影响到细胞的次级代谢过程。

核糖体是蛋白质的合成机器, 也是细胞感知营养水平和对生长速率进行调控的重要位点。在稳定生长期, 与次级代谢产物生物合成相关基因的大量表达取决于此时核糖体的功能。因此核糖体突变(包括核糖体蛋白和 rRNA)带来的蛋白合成能力的

基金项目: 国家自然科学基金(40606031); 国家“863 计划”(2006AA09Z437); 中国大洋专项(DYXM-115-02-2-8)

* 通信作者。Tel: +86-21-34207169; E-mail: xu.junn@sju.edu.cn

作者简介: 谢庶洁(1983-), 女, 江西宜春人, 硕士研究生, 主要从事海洋微生物学及分子生物学研究。E-mail: xieshujie40@163.com

收稿日期: 2009-01-08; 修回日期: 2009-03-20

改变,对次级代谢产物生物合成的影响必然是十分深刻的。某些核糖体突变可以反映为作用于核糖体上的抗生素的抗性变化,因此通过筛选或构建相应的抗性突变,可获得核糖体功能突变的菌株,进而获得次生代谢产物合成能力提高的菌株。

微生物核糖体工程以胞内最主要的两个细胞器

即核糖体和 RNA 多聚酶为对象,以引入的抗生素抗性突变为外在表征,定向筛选次生代谢产物合成能力提高的突变菌株(图 1)。常用于抗性筛选的抗生素主要包括链霉素(Str)、利福平(Rif)、硫链丝菌素(Tsp)、夫西地酸(Fus)、庆大霉素(Gen)、巴龙霉素(Par)、林肯霉素(Lin)、遗传霉素(Gnt)等。

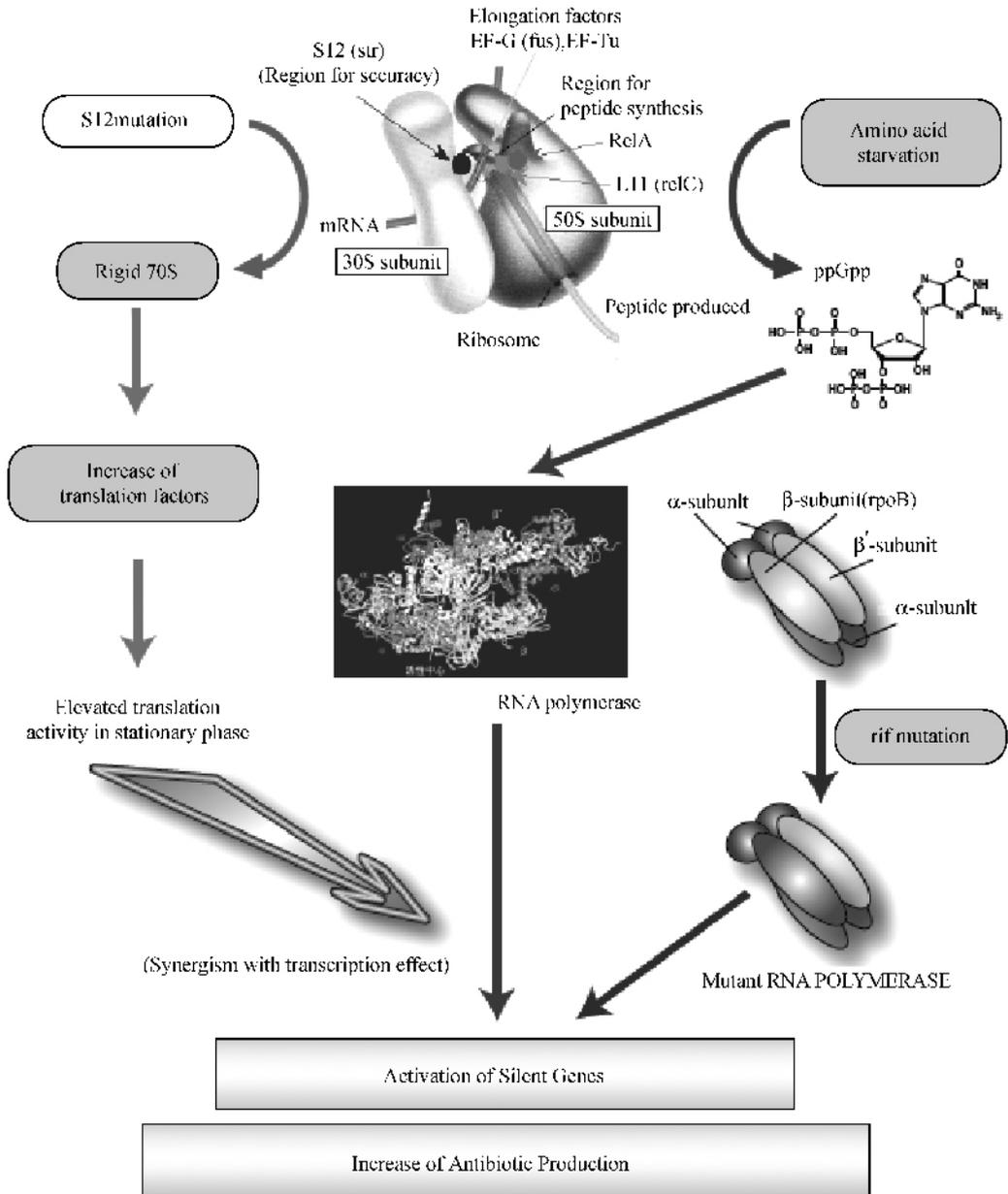


图 1 核糖体工程激活细胞功能示意图^[3]

Fig.1 Scheme of ribosome engineering to activate cellular function^[3].

2 与核糖体工程相关的几种重要抗性突变

2.1 链霉素抗性突变

链霉素通过作用于核糖体 30S 亚基而抑制

mRNA 翻译起始,最终影响细菌的生长。现已知核糖体蛋白或 rRNA 突变与下述两类链霉素抗性相关。

2.1.1 高浓度链霉素抗性突变:天蓝色链霉菌(*S. coelicolor*)和变铅青链霉菌(*S. lividans*)是链霉菌遗

传学研究的模式菌株,其基因组中都存在放线紫红素生物合成基因,但通常只有 *S. coelicolor* 能够产生放线紫红素。对 *S. lividans* 的一个链霉素抗性突变株 TK24 的遗传分析表明,其 *rpsL* 基因中发生的点突变(K88E)激活了该菌株中放线紫红素的产生。其他作用于核糖体 S12 蛋白的链霉素抗性突变,如 K88R 和 R86H 等也能引起放线紫红素产量的提高^[1]。研究表明在低镁离子浓度下核糖体 70S 复合体稳定性的提高及与核糖体-mRNA-tRNA 终止复合体解离密切相关的核糖体循环因子水平的上升导致了该突变株在生长稳定期出现异常的蛋白合成活性,最终引发抗生素的超量表达^[6-7]。

Hosoya 等使用定点突变构建了非链霉素抗性的 L90K 和 R94G,并将其引入核糖体 S12 蛋白中,获得两株合成放线紫红素能力比 K88E 更高的突变株^[8]。该结果表明对核糖体 S12 蛋白进行饱和和定点诱变可进一步扩展核糖体 S12 蛋白在定性育种中的靶区域。

2.1.2 低浓度链霉素抗性突变:低浓度链霉素抗性突变亦引发 *S. lividans* 放线紫红素产量的大幅度提高,但其相关突变分析十分困难。通过比较基因组测序发现低水平的链霉素抗性突变是由编码 16S rRNA 甲基转移酶(包含了一个 S-腺苷甲硫氨酸的结合域)的 *rsmG* 基因发生突变引起,该甲基转移酶功能突变导致了 16S rRNA 上一个保守的鸟苷甲基化位点 G527 的甲基化缺失。*rsmG* 突变株中 S-腺苷甲硫氨酸水平的上升介导了抗生素的超量表达。与上述 *rpsL* 突变类似,*rsmG* 缺失突变株在生长稳定期同样显示了异常的蛋白合成活性,但 *rsmG* 突变并未引起核糖体 70S 复合体稳定性提高和核糖体循环因子水平的上升。因此,不同水平的链霉素抗性突变(*rpsL* 和 *rsmG*)中异常的蛋白合成活性可能由不同的机制介导^[9-11]。

rsmG 自发突变引起的低浓度链霉素抗性突变频率达到 10^{-6} ,是 *rpsL* 自发突变对应的高浓度链霉素抗性突变的 100~1000 倍。以临床分离的链霉素抗性结核分枝杆菌为例,*rsmG* 突变占 33% 且能使高浓度链霉素抗性突变的频率提高 2000 倍^[11]。*rsmG* 突变的发现不仅揭示了特定 rRNA 修饰对核糖体功能和链霉菌次生代谢的影响,而且对理解病原微生物抗性水平变化的分子机制有重要意义。

2.2 利福平抗性突变

ppGpp 作为控制细胞生长速度的重要信号分子,与细菌次级代谢过程的启动密切相关。在 RNA

多聚酶的 β 亚基中,利福平结合域(*rif*)与 ppGpp 敏感域相邻^[12],且其自身(*rif*-cluster I)也处于 RNA 多聚酶活性中心^[13]。可以推测 *rif* 中的某些突变必然会影响到邻近的 ppGpp 敏感域的功能,进而影响受 ppGpp 调控启动的次级代谢过程。

研究证实 *S. lividans* 中 Rif 抗性突变提高了放线紫红素生物合成途径特异性调节基因 *actII-ORF4* 的转录水平,进而激活了该抗生素的合成^[14]。更为惊奇的是向 ppGpp 合成受限的 *S. coelicolor* *relA* 和 *S. lividans* *relC* 的松弛型突变株中引入 Rif 抗性突变也可恢复其放线紫红素产生能力。对 RNA 合成速率的分析表明,携带 Rif 抗性突变的 RNA 多聚酶的行为与结合有 ppGpp 的 RNA 多聚酶的行为类似,从而揭示了一类 Rif 突变激发的、不依赖于 ppGpp 的次级代谢途径起始机制^[14-15]。

rif 突变能有效地激活细菌中沉默基因的表达。例如野生的枯草芽胞杆菌通常不能或者只能合成少量的 3,3-neotrehalosadiamine(NTD),通过引入 *rif* 突变 40% 的抗性突变株(16/40 株)的 NTD 合成量较野生菌株有显著地提高^[16]。

2.3 夫西地酸抗性突变

夫西地酸(Fus)是一类甾体结构的抗生素,它通过抑制细菌翻译延伸因子(EF-G)与 GTP 的复合物(EF-G-GTP)的解离而抑制蛋白质的合成。Fus 抗性突变通常是由 EF-G 的编码基因 *fusA* 的点突变引起的。研究证明 Fus 抗性突变干扰 ppGpp 的累积^[17],在沙门氏菌中 RpoS(σ^s)作为其在营养缺乏、渗透压改变等逆境下基因表达的调控因子,与 ppGpp 水平正相关。Fus 抗性突变带来沙门氏菌毒力及其它适应性相关变化^[18]。而在链霉菌的 Fus 抗性突变菌株中可以观察到大量的抗生素超量表达的菌株,但对 *fusA* 基因进行分析却无法找到对应的突变位点,这些 Fus 突变体的 70S 核糖体复合体在低镁环境中稳定性也并无增强。因此可推测 Fus 突变和 Str 抗性突变对链霉菌次级代谢途径表达的刺激效应存在不同的机制^[19]。

2.4 硫链丝菌素抗性突变

硫链丝菌素(Tsp)抗性突变通常由 *rplK*(编码核糖体蛋白 L11)和 *rnn*(编码 rRNAs)点突变引起,但 K. Ochi 等在 4 株抗生素产量提高的 Tsp 抗性突变株中并没有检测到 *rnn* 和 *rplK* 突变。通过选取 2 个 Tsp 抗性突变株进行杂交和遗传作图,在链霉菌基因组上与 *strA* 基因邻近的位置发现了一个点突变,这可能是一类新型的 Tsp 抗性突变机制^[19]。

3 核糖体工程的应用

链霉菌、芽孢杆菌、假单胞菌等属包含有许多在工业、农业、环保等方面具有重要应用价值的菌株,核糖体工程技术可用于这些菌株生物合成潜能的提高及其他性状的改良。

Str 抗性突变在选育抗生素高产菌株中应用的最多。例如,从每 50 至 100 个随机挑取的 *str* 突变株中选取 1 个进行产量测定,约有一半的查塔努加链霉菌(*S. chattanoogensis*)突变株合成弗德利卡霉素(Fredericamycin)的能力有了明显地提高,产量最高可达野生菌株的 26 倍。抗生链霉菌(*S. antibioticus*)和浅紫灰链霉菌(*S. lavendulae*)的 *str* 突变株中抗生素产量提高的比率为(3%~4%)^[20]。此外,在蜡状芽孢杆菌和吡诺尼群假单胞菌的 *str* 突变株中出现高产菌株的比率为 7% 到 30%,且有枯草芽孢杆菌 *str* 突变株抗生素产量比野生菌株提高了 50 倍的例子^[20]。

不同抗生素抗性对应靶位点的分散性,使得组合抗性选育的菌株的高产性状具有叠加性。Tamehiro 等对一株工业生产用白色链霉菌进行了组合抗药性突变选育,在其 *str*、*gen*、*rif* 突变株中盐霉素产量提高的高产菌株比率都介于 7%~12% 之间,而通过这 3 种抗生素的组合抗性突变,其盐霉素的产量比改造前提高了 2.3 倍^[21]。在经过多轮诱变选育、遗传背景复杂的工业菌株中取得如此突破是一个惊人的事件。Wang 等利用 Str、Gen、Rif、Par、Gnt、Fus、Tsp 和 Lin 这 8 种抗生素的组合突变使 *S. coelicolor* A3(2)放线紫红素的产量提高到 1.63 g/L,为野生菌株的 180 倍^[22]。

向微生物细胞中引入抗药性突变,还可提高芽孢杆菌的 α -淀粉酶及蛋白酶的产量^[23];Hosokawa 等发现臭真单胞菌的 *str*、*gen* 和 *rif* 突变株对 4-对羟基苯甲酸、甲苯等有机溶剂的耐受性提高^[24]。以上结果显示了核糖体工程技术在微生物育种方面的广泛性,值得注意的是核糖体工程在激发潜在沉默基因表达和提高次级代谢产物产量方面最具有理论基础。

4 国内研究进展

胡海峰等人组合应用庆大霉素和利福平筛选蜡状芽孢杆菌的庆大霉素抗性突变株及庆大霉素、利福平双抗突变株,获得抗生素(FR2900493)产量提高 5 至 6 倍的突变株^[25]。王耀耀等利用链霉素和利福平组合抗性筛选,结合高能电子诱变对东方拟无枝

酸菌的生产菌株进行改造,得到了去甲万古霉素效率提高 45.8% 的突变株^[26]。

海洋放线菌是潜在新天然产物的重要来源。海洋原栖生态环境的特殊性决定了海洋放线菌在次级代谢途径的起始和遗传调控上的特殊性。在常规培养条件下,海洋天然产物生物合成基因往往处于“沉默”状态。应用“核糖体工程”技术来激活海洋微生物中潜在“有用”次级代谢途径相关基因的表达,有望突破海洋微生物资源利用的瓶颈。于志斌等利用氯霉素和链霉素分别成功激发了一株海洋来源链霉菌产生抗肿瘤活性物质,并从其发酵液中分离得到了 4 个活性化合物,其中 1 个为新天然产物^[27]。

笔者所在的课题组从红树林和深海沉积物样品中分离得到一株链霉菌新种 1A01550^[28]及其近缘菌株 1A03344^T,这两株菌的 16S rRNA 基因序列同源性高达 99.26%,却在产孢、产色素、嗜盐性及抗生素产生等性状上有较大差异,其中后者(深海菌株)具有更强的嗜盐性但不产生活性物质。这一对因适应不同环境(海岸带湿地和深海)而形成的亲缘极近、表型迥异的海洋链霉菌,与链霉菌研究的模式菌株 *S. coelicolor* 和 *S. lividans* 情况相似。利用利福平、链霉素及庆大霉素对深海菌株 1A03344^T 进行抗性筛选,激活了其抗生素产生潜能。对 1A03344^T 的 Rif 突变靶基因(*rpoB*)进行分析发现了 F416L 和 S423P 两类新的突变位点。从其中一个 Rif 突变株的发酵产物中已分离获得 3 个化合物,经 NMR 结构鉴定可初步确定其中 1 个具有新结构。

5 结语

综上所述,“核糖体工程”利用各类抗性突变为筛选标记来表征核糖体和 RNA 多聚酶的功能变化,从“转录”和“翻译”两个水平来激活微生物细胞的生物合成潜能,从而能高效地获得次生代谢产物合成能力提高的新菌株。该技术简单易行、组合方便,在工业微生物育种及海洋微生物资源潜力挖掘等方面都有良好的应用前景。

参考文献

- [1] Shima J, Hesketh A, Okamoto S, et al. Induction of actinorhodin production by *rpsL* (encoding ribosomal protein S12) mutations that confer streptomycin resistance in *Streptomyces lividans* and *Streptomyces coelicolor* A3(2). *The Journal of Bacteriology*, 1996, 178(24): 7276 - 7284.

- [2] Ochi K , Okamoto S , Tozawa Y , et al. Ribosome engineering and secondary metabolite production. *Advances in Applied Microbiology* , 2004 , 56 : 155 – 184 .
- [3] Ochi K. From microbial differentiation to ribosome engineering. *Bioscience , Biotechnology , and Biochemistry* , 2007 , 71(6) : 1373 – 1386 .
- [4] Cashel M , Gentry DR , Hernandez WJ , et al. The stringent response. // F. C. Neidhardt , R. Curtiss III , J. L. Ingraham , et al. *Escherichia coli* and *Salmonella* : cellular and molecular biology. American Society for Microbiology , Washington , D. C. 1996. 1458-1496 .
- [5] Artsimovitch I , Patlan V , Sekine S , et al. Structural basis for transcription regulation by alarmone ppGpp. *Cell* , 2004 , 117(3) : 299 – 310 .
- [6] Okamoto-Hosoya Y , Hosaka T , Ochi K. An aberrant protein synthesis activity is linked with antibiotic overproduction in *rpsL* mutants of *Streptomyces coelicolor* A3 (2). *Microbiology* , 2003 , 149(Pt 11) : 3299 – 3309 .
- [7] Hosaka T , Xu J , Ochi K. Increased expression of ribosome recycling factor is responsible for the enhanced protein synthesis during the late growth phase in an antibiotic-overproducing *Streptomyces coelicolor* ribosomal *rpsL* mutant. *Molecular Microbiology* , 2006 , 61(4) : 883 – 897 .
- [8] Okamoto-Hosoya Y , Okamoto S , Ochi K. Development of antibiotic-overproducing strains by site-directed mutagenesis of the *rpsL* gene in *Streptomyces lividans*. *Applied and Environmental Microbiology* , 2003 , 69(7) : 4256 – 4259 .
- [9] Nishimura K , Hosaka T , Tokuyama S , et al. Mutations in *rsmG* , encoding a 16S rRNA methyltransferase , result in low-level streptomycin resistance and antibiotic overproduction in *Streptomyces coelicolor* A3 (2). *The Journal of Bacteriology* , 2007 , 189(10) : 3876 – 3883 .
- [10] Nishimura K , Johansen SK , Inaoka T , et al. Identification of the *RsmG* methyltransferase target as 16S rRNA nucleotide G527 and characterization of *Bacillus subtilis* *rsmG* mutants. *The Journal of Bacteriology* , 2007 , 189(16) : 6068 – 6073 .
- [11] Okamoto S , Tamaru A , Nakajima C , et al. Loss of a conserved 7-methylguanosine modification in 16S rRNA confers low-level streptomycin resistance in bacteria. *Molecular Microbiology* , 2007 , 63(4) : 1096 – 1106 .
- [12] Ishihama A. Molecular assembly and functional modulation of *Escherichia coli* RNA polymerase. *Advances in Biophysics* , 1990 , 26 : 19 – 31 .
- [13] Severinov K , Mustaev A , Severinova E , et al. The beta subunit Rif-cluster I is only angstroms away from the active center of *Escherichia coli* RNA polymerase. *The Journal of Biological Chemistry* , 1995 , 270(49) : 29428 – 29432 .
- [14] Lai C , Xu J , Tozawa Y , et al. Genetic and physiological characterization of *rpoB* mutations that activate antibiotic production in *Streptomyces lividans*. *Microbiology* , 2002 , 148(11) : 3365 – 3373 .
- [15] Xu J , Tozawa Y , Lai C , et al. A rifampicin resistance mutation in the *rpoB* gene confers ppGpp-independent antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* A3 (2). *Molecular Genetics and Genomics* , 2002 , 268(2) : 179 – 189 .
- [16] Inaoka T , Takahashi K , Yada H , et al. RNA polymerase mutation activates the production of a dormant antibiotic 3 , 3'-neotrehalosdiamine via an autoinduction mechanism in *Bacillus subtilis*. *The Journal of Biological Chemistry* , 2004 , 279(5) : 3885 – 3892 .
- [17] Macvanin M , Johanson U , Ehrenberg M , et al. Fusidic acid-resistant EF-G perturbs the accumulation of ppGpp. *Molecular Microbiology* , 2000 , 37(1) : 98 – 107 .
- [18] Macvanin M , Bjorkman J , Eriksson S , et al. Fusidic acid-resistant mutants of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium with low fitness in vivo are defective in RpoS induction. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* , 2003 , 47(12) : 3743 – 3749 .
- [19] Ochi K. Genetics and physiology of ribosomal mutations that activate antibiotic production ; further development of ribosome engineering. *Waksman Foundation* , 2004 , 1 – 12 .
- [20] Hosoya Y , Okamoto S , Muramatsu H , et al. Acquisition of certain streptomycin-resistant (*str*) mutations enhances antibiotic production in bacteria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* , 1998 , 42(8) : 2041 – 2047 .
- [21] Tamehiro N , Hosaka T , Xu J , et al. Innovative approach for improvement of an antibiotic-overproducing industrial strain of *Streptomyces albus*. *Applied and Environmental Microbiology* , 2003 , 69(11) : 6412 – 6417 .
- [22] Wang G , Hosaka T , Ochi K. Dramatic activation of antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* by cumulative drug resistance mutations. *Applied and Environmental Microbiology* , 2008 , 74(9) : 2834 – 2840 .
- [23] Kurosawa K , Hosaka T , Tamehiro N , et al. Improvement of alpha-amylase production by modulation of ribosomal component protein S12 in *Bacillus subtilis* 168. *Applied and Environmental Microbiology* , 2006 , 72(1) : 71 – 77 .
- [24] Hosokawa K , Park N H , Inaoka T , et al. Streptomycin-resistant (*rpsL*) or rifampicin-resistant (*rpoB*) mutation in *Pseudomonas putida* KH146-2 confers enhanced tolerance to organic chemicals. *Environmental Microbiology* , 2002 , 4(11) : 703 – 712 .
- [25] 胡海峰 , 张琴 , 朱宝泉 , 等 . 组合庆大霉素和利福平二种抗性突变提高蜡状芽孢杆菌2045合成抗生素

- FR2900493 的水平. 中国抗生素杂志(*Chinese Journal of Antibiotics*), 2003, 28(1): 53 - 54.
- [26] 王耀耀, 刘云清, 朱研研, 等. 组合链霉素和利福平抗性突变去甲基万古霉素高产菌株的选育. 中国抗生素杂志(*Chinese Journal of Antibiotics*), 2006, 31(4): 243 - 246.
- [27] 于志斌, 朱天骄, 崔承彬, 等. 用核糖体工程技术二次开发海洋微生物菌株资源的研究. 高技术通讯(*The Journal of High Technology Letters*), 2006, 16(11): 1190 - 1194.
- [28] Xu J, Wang Y, Xie SJ, et al. *Streptomyces xiamenensis* sp. nov., a novel actinomycete isolated from a mangrove sediment sample. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2009, 59: 472 - 476.

Advance in microbial ribosome engineering

Shujie Xie^{1, 2}, Jing Xiao¹, Jun Xu^{1*}

(¹ Key Laboratory of Marine Genetic Resources, The Third Institute of Oceanography, State Oceanic Administration, Xiamen 361005, China)

(² College of Life Science, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Abstract: Drug-resistance mutation of microorganisms reflects structure and function changes of the ribosome and RNA polymerase. These changes can have significant effects on secondary metabolism in the mutant strain. Thus, ribosome engineering is an effective approach to develop mutant strains that overproduce secondary metabolites (i. e. antibiotics) by screening various drug-resistance mutations. We introduced the concept and the mechanisms of the ribosome engineering. The efficacy of the strain improvement was highlighted in *Streptomyces* spp. by introducing combinatory drug-resistances. The applications of the method in the strain-breeding of various bacteria were also summarized.

Keywords: ribosome engineering; drug-resistance; secondary metabolism; strain improvement

(本文责编: 张晓丽, 谷志静)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (40606031), the National High Technology R&D Program of China (2006AA09Z437) and China Ocean Mineral Resources Research and Development Association Fund (DYXM- 115-02-2-8)

* Corresponding author. Tel : + 86-21-34207169 ; Fax : + 86-592-2085376 ; E-mail : xu.junn@gmail.com

Received 8 January 2009/Revised : 20 March 2009

本 刊 声 明

经核实, 发表在《微生物学报》2009年49卷3期357—362页的论文“免疫共刺激分子OX40L对乙型肝炎核酸疫苗的免疫佐剂作用”的内容是第一作者在中国农业大学读博士期间进行的, 毕业后在通讯作者不知情的情况下投稿, 并提供了通讯作者的错误 email, 致使编辑部无法准确联系到通讯作者; 而且文章的大部分结果已经发表在2007年的 *Journal of Gene Medicine* 上。

为了加强我国科技界精神文明建设、提高科技工作者职业道德水平、保护我国科学研究成果的知识产权、维护《微生物学报》的声誉, 参照中国科协对我国科技工作者职业道德公约(中国科协网页 <http://www.cast.org.cn/> 出版管理/出版政策法规), 《微生物学报》编委会决定撤消发表在本刊2009年49卷3期357—362页的论文。

《微生物学报》在此重申反对重复发表、一稿多投及一切伪造、欺骗和抄袭行为! 同时向维护《微生物学报》声誉的读者和作者表示衷心感谢, 希望广大读者和作者继续监督。

《微生物学报》编委会

2009年7月