

枯草芽胞杆菌 fmbj SrfAC-A 结构域的活性测定

刘丽霞, 陆兆新, 吕凤霞, 张充, 别小妹*

南京农业大学食品科技学院, 南京 210095

摘要: 【目的】在体外研究 surfactin 合成酶的 A 结构域, 为获得新的 surfactin 类似物奠定基础。【方法】本文从枯草芽胞杆菌 (*Bacillus subtilis*) fmbj 中克隆出 surfactin 合成酶第 7 个模块的 A 结构域基因 (*SrfAC-A*), 与表达质粒 pET-23a 相连后在大肠杆菌表达系统中表达, 用 Ni-NTA 亲和柱对重组蛋白 SrfAC-A 进行分离纯化后测定其活性。【结果】克隆所得的 A 结构域对 Ile 有选择活性, 而对其他氨基酸基本无活性。【结论】Surfactin 合成酶中的 A 结构域能在体外独立行使其选择底物氨基酸的功能。

关键词: Surfactin 合成酶, A 结构域, 克隆表达, 活性测定

中图分类号: **文献标识码:** **文章编号:** 0001-6209 (2013)05-0437-07

Surfactin 是芽胞杆菌 (*Bacillus*) 产生的次级代谢产物, 具有抗细菌^[1-2]、抗支原体^[3-4]、抗病毒^[5]、抗肿瘤^[6-7]和溶解血栓^[8-10]等多种生物活性, 由一条 β -羟基脂肪酸链和具有不同手性 (LLDLLDL) 的七氨酸缩肽通过内酯键连接成环状, 它通过非核糖体多肽合成酶 (nonribosomal peptide synthetases, NRPS) 催化而得, 合成酶中模块的顺序和类型决定了产物中氨基酸的顺序^[11-15]。

Surfactin 合成酶由 3 个酶亚基 SrfAA、SrfAB 和 SrfAC 组成, 共包含 7 个模块: SrfAA 和 SrfAB 各包含 3 个模块, SrfAC 只包含 1 个模块, 每个模块中有 3 个核心的结构域, C (缩合结构域)、A (腺苷酰化结构域)、T (硫醇化结构域, 也称肽酰-载体蛋白 PCP), 其中 A 结构域对底物氨基酸有着特异的选择活性, 因此决定了 surfactin 中的氨基酸种类^[13-16]。已有实验证明, 独立的 A 结构域在体外具有完整的催化活性^[16-18]。对 A 结构域基因进行克隆和表

达, 在体外实现 A 结构域的活性测定, 可以为 A 结构域的分子改造提供检测手段, 在体外分析改造后酶功能的改变, 为产生新型的 surfactin 类似物奠定基础。

本实验室保存的枯草芽胞杆菌 fmbj 已确定产 surfactin, 本研究从该菌株中克隆 surfactin 合成酶第 7 个模块中的 A 结构域基因 (*srfAC-A*), 并对其表达和活性测定, 旨在进一步探索 Surfactin 合成酶结构与功能之间的关系。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌种和质粒: 枯草芽胞杆菌 fmbj、*Escherichia coli* DH5 α 克隆宿主、*Escherichia coli* BL21 (DE3) pLysS 表达宿主, 南京农业大学酶工程实验室保存。*Escherichia coli* T-A 克隆载体 pMD19-T, 购自

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31271828)

* 通信作者。E-mail: bxm43@njau.edu.cn

作者简介: 刘丽霞 (1987 -), 女, 浙江龙游人, 硕士研究生, 专业方向食品生物技术。E-mail: hzdaxia@126.com

收稿日期: 2012-09-24; 修回日期: 2013-02-15

TaKaRa(大连)公司。*Escherichia coli* 表达载体 pET-23a 购自 Novagen 公司,带有组氨酸标签。

1.1.2 工具酶和试剂:基因组提取试剂盒,购自 OMEGA 公司。RNAase、蛋白酶 K、DNA 凝胶回收试剂盒、PCR 产物纯化试剂盒、DNA Marker、琼脂糖,购自上海生工生物工程公司。限制性内切酶 *Hind*III 和 *Eco*RI、X-Gal、IPTG、pMD19-T 连接试剂盒、Taq DNA 聚合酶、*pfu* DNA 聚合酶、T4 连接酶,购自大连宝生物公司。Tryptone、Yeast Extract 等购自英国 Oxoid 公司。孔雀石绿磷酸检测试剂盒 Malachite Green Phosphate Assay kits (POMG-25H) 购自 Bioassay Systems。Imidazole、氨苄青霉素 (Amp)、Ap(过硫酸铵)、TEMED(四甲基乙二胺),购自 Sigma 公司。丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺、SDS(十二烷基磺酸钠)购自 Bio-Rad。蛋白 Marker 购自 Fermentas 公司。考马斯亮蓝 G-250 购自中国医药集团上海化学试剂公司。其他试剂为国产分析纯。

1.2 SrfAC-A 结构域基因的克隆和重组表达载体的构建

枯草芽胞杆菌 *fmbj* 基因组 DNA 的提取参照 OMEGA 基因组提取试剂盒说明书。

根据枯草芽胞杆菌 168 菌株的 *srfAC* 基因序列 (GenBank 登录号为 938308) 和 Alan Tanovic 等人^[19] 所分析的 SrfAC 模块的晶体结构,利用 DNAMAN 软件设计出引物,以枯草芽胞杆菌 *fmbj* 基因组 DNA 为模板,扩增出包含 10 个核心序列在内的 A 结构域基因^[20] (还包括 A 结构域上、下游的一部分序列,以确保 A 结构域的完整)。以 *fmbj* 基因组 DNA 为模板的引物序列如下,引物由上海生工生物工程公司合成。上游引物 F: 5'-CCTCTGACGTATTGGTTCAAGGAAG-3'; 下游引物 R: 5'-TGGGAGCAGCCGTTTATTGACT-3'。

PCR 反应体系 (50 μ L) 为: 10 \times PCR Buffer 5.0 μ L, 上下游引物 (10 μ mol/L) 各 2.0 μ L, dNTP (2.5 mmol/L) 4.0 μ L, 基因组 DNA 1.0 μ L, ddH₂O 35.0 μ L, *pfu* 聚合酶 (5 U/ μ L) 1.0 μ L。PCR 反应参数为 94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min 30 s, 94 $^{\circ}$ C 变性 50 s, 53 $^{\circ}$ C 退火 50 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 3 min, 共 33 个循环,最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。取 5 μ L PCR 产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳、溴化乙锭染色后检测。

将适量的 PCR 产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳后,参照上海生工胶回收试剂盒说明书回收目的产

物。将洗脱下来的目的片段用 Taq 酶加 A 尾,与 pMD19-T 载体连接后转化入 DH5 α 。通过蓝白斑筛选获得阳性克隆子,命名为 *srfAC-A-T*,送金斯特生物技术有限公司进行核苷酸序列测定,并对其进行基因分析。

将 *srfAC-A-T* 和 pET-23a 分别用 *Hind*III 和 *Eco*RI 进行酶切和酶连,获得重组表达载体 pET-23a-*srfAC-A*,转化入 DH5 α 中。通过 PCR 和酶切验证获得阳性克隆,送出测序。

1.3 *srfAC-A* 的外源表达和表达形式分析

将测序正确的质粒转化入 BL21 中,挑取单菌落在含 Amp (100 μ g/mL) 的 LB 液体培养基中 37 $^{\circ}$ C、180 r/min 培养 10 h,以 1% 体积接种于 50 mL LB 培养基 (含 Amp) 中,37 $^{\circ}$ C、180 r/min 培养至 $A_{600\text{nm}}$ 达 0.4-0.6 时,加入 IPTG 使其终浓度为 100 μ g/mL。低温 15 $^{\circ}$ C, 150 r/min 诱导 15 h, 4 $^{\circ}$ C, 10000 \times g 离心 5 min,收集菌体,用细胞裂解缓冲液 (pH 8.0, 25 mmol/L Tris-HCl, 400 mmol/L NaCl, 10% glycerol) 重悬后进行超声波破碎 (400 W, 超声 3 s, 间隔 7 s, 共超声 15 min)。分别将细胞总蛋白、细胞破碎液上清及沉淀部分 (用 pH 8.0, 25 mmol/L Tris-HCl, 400 mmol/L NaCl 重悬) 进行 SDS-PAGE 分析,并用含有空表达载体 pET23a 的重组菌作为对照。SDS-PAGE 条件参照 Laemmli UK^[21] 报道的方法进行,浓缩胶浓度为 5%,分离胶浓度为 10%,胶厚 1.0 mm。

1.4 外源蛋白 SrfAC-A 的分离纯化

大量发酵得到重组菌体,超声波破碎获得破碎上清液即重组蛋白粗酶液。在粗酶液中加入适量 500 mmol/L 的咪唑,使咪唑终浓度为 5 mmol/L,以利于重组蛋白与树脂结合。

将 10 mL 上清液上样于 2 mL 的 Ni-NTA 亲和柱。层析柱预先用结合缓冲液 (pH 8.0, 25 mmol/L Tris-HCl, 400 mmol/L NaCl, 20 mmol/L 咪唑) 平衡 10 个柱体积,上样速度为 1 mL/min。上样后用 10 个柱体积结合缓冲液洗去未吸附的杂蛋白,再用 5 倍柱体积含有 100 mmol/L (pH 8.0, 25 mmol/L Tris-HCl, 400 mmol/L NaCl, 100 mmol/L 咪唑) 咪唑的洗脱缓冲液洗去杂蛋白。再用 10 倍柱体积含有 250 mmol/L 咪唑的洗脱缓冲液洗下目的蛋白,最终用含有 500 mmol/L 咪唑的洗脱缓冲液洗去剩余蛋白。

1.5 重组蛋白 SrfAC-A 的活性测定

将已纯化并合并后的重组蛋白利用紫外分光光度计,测得其在280 nm处的吸光值。将每次所得蛋白用 1 × 反应缓冲液 (pH 7.5, 50 mmol/L Tris-HCl, 100 mmol/L NaCl, 10 mmol/L MgCl₂) 调整至 A₂₈₀ 相同后,取15 mL置于 pall 超滤离心管中,加入 1 × 反应缓冲液作为透析液至最高刻度处,4500 × g 离心至体积不再减少为止 (5 mL),弃去下层液体。重复此操作 3 次,得到透析并浓缩后的重组蛋白 5 mL。SrfAC-A 结构域的活性测定参照 Thomas J. McQuade 等人 [22] 的方法。

2 结果和分析

2.1 目的基因的克隆及重组表达载体的构建

以枯草芽胞杆菌 fmbj 基因组 DNA 为模板, F 和 R 为引物,进行 PCR 反应,扩增得到1473 bp 的 DNA 片段,与预期结果相符。PCR 扩增片段的序列测定和分析表明,该序列包含 A 结构域的 10 个核心结构域,编码 491 个氨基酸。该基因编码的蛋白分子量为55 kDa 左右,通过与其他 SrfAC-A 结构域氨基酸序列比对 (图 1),发现本研究得到的蛋白序列与解淀粉芽胞杆菌 (Bacillus amyloliquefaciens) (NCBI

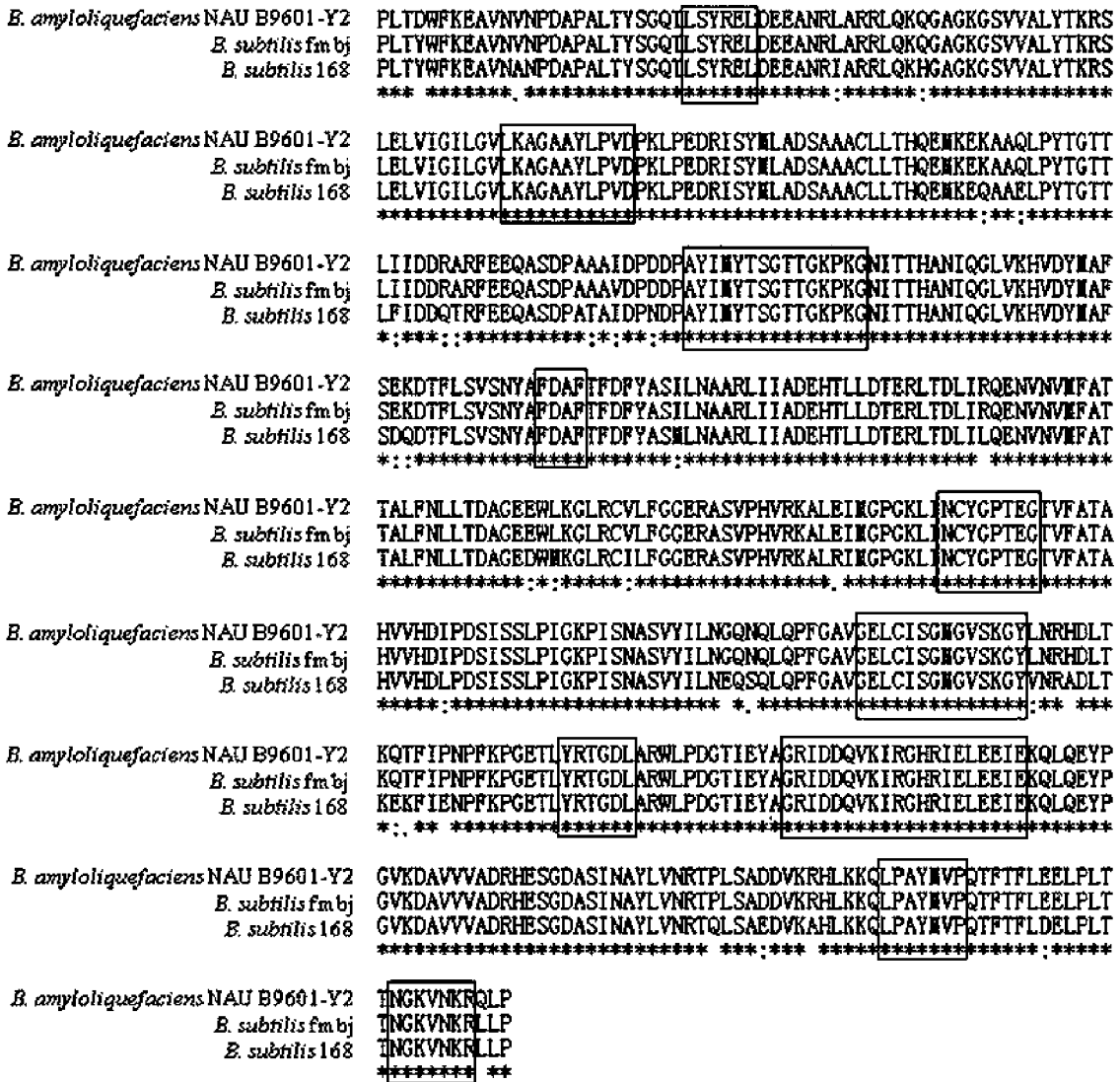


图 1. 枯草芽胞杆菌 fmbj 与枯草芽胞杆菌 168、解淀粉芽胞杆菌 NAU B9601-Y2 的 SrfAC-A 结构域氨基酸序列比对
Figure 1. Amino sequence comparison of SrfAC-A domain from *B. subtilis* 168, *Bacillus amyloliquefaciens* NAU B9601-Y2 and *B. subtilis* fmbj. The sequences inside the boxes are the core sequences.

Reference Sequence: YP_005419646.1) 的亲缘关系最近,相似性达到 99%,而与枯草芽胞杆菌 168 (NCBI Reference Sequence: NP_388233.2) 的同源性只有 94%。但是此三者 A 结构域内的核心序列高度一致,由此可以推测,基因之间的差异是源于不同菌株之间的进化差异。

构建好的重组表达质粒 pET23a-srfAC-A,经 *EcoRI* 和 *HindIII* 双酶切后,1% 琼脂糖凝胶电泳检测,结果显示(图 2)有 2 条 DNA 条带,一条与质粒 pET23a 相对分子质量相符,约为 3600 bp,另一条与 PCR 产物相对分子质量一致,约为 1500 bp,且 DNA 测序结果与 *srfAC-A-T* 一致,证明重组表达质粒 pET23a-srfAC-A 已构建成功。

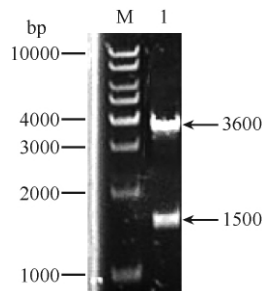


图 2. 重组质粒的双酶切鉴定

Figure 2. Identification of recombinant plasmid by double restriction enzymes digestion. Lane 1, the digestion result of pET23a-srfAC-A. M, marker.

2.2 重组蛋白的诱导表达及可溶性分析

将空表达载体 pET23a (对照) 和 pET23a-srfAC-A 通过 CaCl_2 热激法转化入 *E. coli* BL21 (DE3) 后,低温 15°C 诱导 15 h,4°C,10000 × g 离心 5 min,收集菌体,超声破碎离心后分别取上清和沉淀进行 SDS-PAGE 分析。与对照比较可得,重组表达载体表达出了目的蛋白,其分子量在 55 kDa 左右,与预期结果相符,且外源蛋白大多存在于细胞的破碎上清液中(图 3,泳道 1-3 分别为 15°C 低温诱导表达后的全菌体、细胞破碎后上清和沉淀,4 为 pET23a 空载体表达对照),说明低温诱导达到了较好的效果。

2.3 表达产物的纯化

经上述 SDS-PAGE 分析,表明 pET23a-srfAC-A 重组质粒在大肠杆菌中可以实现可溶表达。上清液进行 Ni-NTA 亲和柱纯化回收。在 100 mmol/L 到 250 mmol/L 的咪唑浓度梯度下可以得到电泳纯的目的蛋白(图 4,泳道 1-3 的咪唑洗脱浓度为

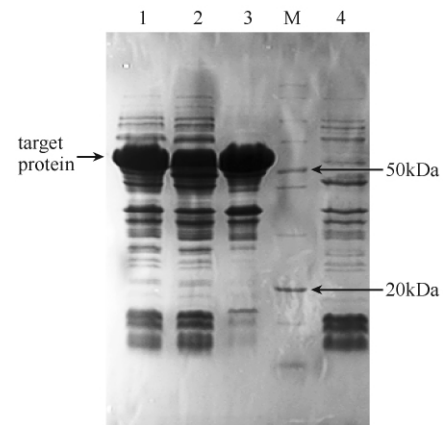


图 3. *E. coli* BL21 (DE3) / pET23a-srfAC-A 表达产物的可溶性分析

Figure 3. Solubility analysis of *E. coli* BL21 (DE3) / pET23a-srfAC-A expression products. Lane 1, the whole cells of *E. coli* BL21 (DE3) with pET23a-srfAC-A from induced expression, lane 2-3, the supernatant and precipitate of disrupted cells, lane 4, the control (the whole cells of *E. coli* BL21 (DE3) with pET23a from induced expression). Marker, from top to bottom, 250, 150, 100, 70, 50, 40, 30, 20, 15, 10, 5 kDa.

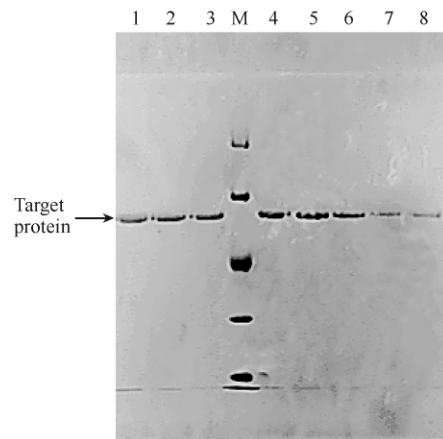


图 4. 亲和层析后 SrfAC-A 的 SDS-PAGE 图

Figure 4. SDS-PAGE of recombinant protein SrfAC-A after affinity chromatography. The concentrations of imidazole in eluent are as follows, lane 1-3, 150 mmol/L, lane 4-7, 200 mmol/L, lane 8, 250 mmol/L. M, from top to bottom, 116.0, 66.2, 45, 35, 25 kDa.

150 mmol/L,4-7 为 200 mmol/L,8 为 250 mmol/L。

2.4 目的蛋白 SrfAC-A 的活性测定

根据 Thomas J. McQuade 等^[22] 的方法测定 SrfAC-A 的活性,作出重组酶与各氨基酸反应后 A_{600} 相对于时间的曲线,斜率反应酶活大小,以不添加氨基酸为对照。从图 5 可以看出,对照曲线也有一定

斜率,可知 ATP 本身不稳定,自然状态下也会有部分降解,故要现配现用。将各曲线的斜率相比较,可知表达出的重组蛋白对 Ile 有选择活性;而对以 Leu 为底物的样品测定值与对照斜率数据差别较小,因此推测对 Leu 只有较小的选择活性,而对其他氨基酸基本无活性。

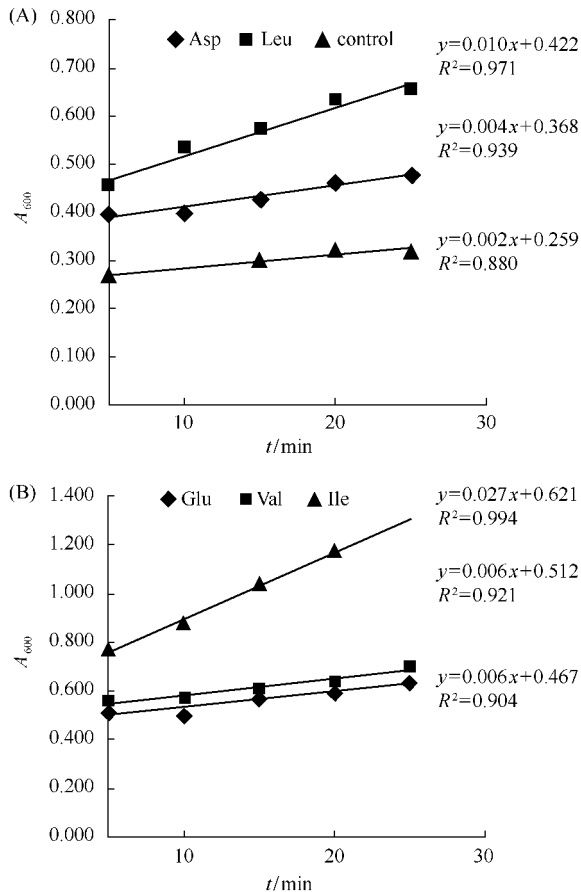


图 5. SrfAC-A 结构域酶活测定

Figure 5. Detection of enzyme activity of SrfAC-A. The curve slope is correlated to enzyme activity. (A) The curve slope of non-specific amino acid is almost the same as the control. (B) The curve slope of Ile is much higher than other amino acids.

3 结论和讨论

本文从实验室保存的枯草芽胞杆菌 fmbj 克隆得到了包含有 10 个核心序列的 SrfAC-A 结构域基因 *srfAC-A*,其所编码的氨基酸序列与解淀粉芽胞杆菌 NAU B9601-Y2 的相似度为 99%,与枯草芽胞杆菌 168 的相似度为 94%。虽然基因序列之间有部分差异,但将其氨基酸序列相对比可以发现,此三者

A 结构域内的核心序列高度一致。将 *srfAC-A* 与表达质粒 pET23a 进行酶切和连接,得到了可用于大肠杆菌表达系统的重组表达质粒 pET-23a-srfAC-A,并在 *Escherichia coli* BL21 (DE3) 进行原核表达。利用重组蛋白中的 His 标签对其进行分离纯化,测定了重组蛋白 SrfAC-A 结构域的活性,证实此重组酶对 Ile 有选择活性,而对其他氨基酸基本无活性。

文献报导 SrfAC-A 可选择 Leu、Ile 和 Val^[23-24],与本研究结果有一定差异。可能的原因有两点,一为不同菌株之间的差异,并不是每种能产生 surfactin 的菌株,其都能合成多种 surfactin 同系物;二为该酶活测定方法灵敏度不够,说明该法今后还需要进一步完善。

脂肽合成酶分子量大、结构复杂,酶活性测定比较困难。传统的复合酶活性测定方法为 ATP-PPi 试验^[25],但是因其需要放射性磷元素,故不适合在一般实验室中使用。Thomas J. McQuade 等人^[22]对此方法进行了改进,创造了该种不需放射元素的酶活测定方法。本研究在国内首次对 surfactin 合成酶 *srfAC-A* 结构域活性进行了测定,对于 *srfAC-A* 分子改造,改变其对底物氨基酸的选择性,从而改变产物 surfactin 的氨基酸组成,获得新的 surfactin 类似物具有重要意义。

参考文献

- [1] Bernheimer AW, vigad Lois S. Nature and properties of a cytolytic agent produced by *Bacillus subtilis*. *Microbiology*, 1970, 61 (3): 361-369.
- [2] Goldberg J. Cyclic peptide antibiotics; self-assembly required. *Trends in Biotechnology*, 2001, 19 (10): 379-380.
- [3] Fassi Fehri L, Wróblewski H, Blanchard A. Activities of Antimicrobial peptides and synergy with enrofloxacin against *Mycoplasma pulmonis*. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 2007, 51 (2): 468-474.
- [4] Vollenbroich D, Pauli G, Ozel M, Vater J. Antimycoplasmal properties and application in cell culture of surfactin, a lipopeptide antibiotic from *Bacillus subtilis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 1997, 63 (1): 44-49.
- [5] Vollenbroich D, Özel M, Vater J, Kamp RM, Pauli G. Mechanism of inactivation of enveloped viruses by the biosurfactant surfactin from *Bacillus subtilis*. *Biologicals*, 1997, 25 (3): 289-297.

- [6] Kameda Y, Oira S, Matsui K, Kanatomo S, Hase T, tsusaka T. Antitumor activity of *Bacillus natto* V. Isolation and characterization of surfactin in the culture medium of *Bacillus natto* KMD 2311. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* (Tokyo), 1974, 22 (4): 938-944.
- [7] Kim S-y, Kim JY, Kim S-H, Bae HJ, Yi H, Yoon SH, Koo BS, Kwon M, Cho JY, Lee C-E, Hong S. Surfactin from *Bacillus subtilis* displays anti-proliferative effect via apoptosis induction, cell cycle arrest and survival signaling suppression. *FEBS Letters*, 2007, 581 (5): 865-871.
- [8] Kikuchi T, Hasumi K. Enhancement of plasminogen activation by surfactin C: augmentation of fibrinolysis in vitro and in vivo. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*. 2002, 1596 (2): 234-245.
- [9] Wu W, Narasaki R, Maeda F, Hasumi K. Glucosyldiacylglycerol enhances reciprocal activation of prourokinase and plasminogen. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 2004, 68 (7): 1549-1556.
- [10] Kim SD, Park SK, Cho JY, Hwa Jin Park, Lim JH, Yun H I, Park SC, Lee KY, Kim SK, Rhee MH. Surfactin C inhibits platelet aggregation. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 2006, 58 (6): 867-870.
- [11] Peypoux F, Bonmatin JM, Wallach J. Recent trends in the biochemistry of surfactin, *Applied Microbiology and Biotechnology*. 1999, 51 (5): 553-563.
- [12] Ishigami Y, Osman M, Nakahara H, Sano Y, Ishiguro R, Matsumoto M. Significance of β -sheet formation for micellization and surface adsorption of surfactin. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 1995, 4 (6): 341-348.
- [13] Menkhaus M, Ullrich C, Kluge B, Vater J, Vollenbroich D, Kamp RM. Structural and functional organization of the surfactin synthetase multienzyme system. *Journal of Biological Chemistry*, 1993, 268 (11): 7678-7684.
- [14] Ullrich C, Kluge B, Palacz Z, Vater J. Cell-free biosynthesis of surfactin, a cyclic lipopeptide produced by *Bacillus subtilis*. *Biochemistry*, 1991, 30 (26): 6503-6508.
- [15] Bruner SD, Weber T, Kohli RM, Schwarzer D, Marahiel MA, Walsh CT, Stubbs MT. Structural basis for the cyclization of the lipopeptide antibiotic surfactin by the thioesterase domain SrfTE. *Structure*, 2002, 10 (3): 301-310.
- [16] Stachelhaus T, Mootz HD, Marahiel MA. The specificity-conferring code of adenylation domains in nonribosomal peptide synthetases. *Chemistry & Biology*, 1999, 6 (8): 493-505.
- [17] Stachelhaus T, Marahiel MA. Modular structure of peptide synthetases revealed by dissection of the multifunctional enzyme GrsA. *Journal of Biological Chemistry*, 1995, 270 (11): 6163-6169.
- [18] Mootz HD, Marahiel MA. The tyrocidine biosynthesis operon of *Bacillus brevis*: complete nucleotide sequence and biochemical characterization of functional internal adenylation domains. *Journal of Bacteriology*, 1997, 179 (21): 6843-6850.
- [19] Tanovic A, Samel SA, Essen L-O, Marahiel MA. Crystal structure of the termination module of a nonribosomal peptide synthetase. *Science*, 2008, 321 (5889): 659-663.
- [20] Marahiel MA. Protein templates for the biosynthesis of peptide antibiotics. *Chemistry & Biology*, 1997, 4 (8): 561-567.
- [21] Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 1970, 227 (5259): 680-685.
- [22] McQuade TJ, Shallop AD, Sheoran A, Delproposito JE, Tsodikov OV, Garneau-Tsodikova S. A nonradioactive high-throughput assay for screening and characterization of adenylation domains for nonribosomal peptide combinatorial biosynthesis. *Analytical Biochemistry*, 2009, 386 (2): 244-250.
- [23] Baumgart F, Kluge B, Ullrich C, Vater J, Ziessow D. Identification of amino acid substitutions in the lipopeptide surfactin using 2D NMR spectroscopy. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1991, 177 (3): 998-1005.
- [24] Peypoux F, Bonmatin J-M, Labbé H, Das BC, Ptak M, Michel G. Isolation and characterization of a new variant of surfactin, the [Val7] surfactin. *European Journal of Biochemistry*, 1991, 202 (1): 101-106.
- [25] Santi DV, Webster RW Jr, Cleland WW. Kinetics of aminoacyl-tRNA synthetases catalyzed ATP-PPi exchange. *Methods in Enzymology*, 1974, 29: 620-627.

Activity of the SrfAC-A domain from *Bacillus subtilis* fmbj

Lixia Liu, Zhaoxin Lu, Fengxia Lv, Chong Zhang, Xiaomei Bie*

College of Food Science and Technology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China

Abstract: [Objective] We studied the A domain of surfactin synthase *in vitro* to obtain new surfactin analogues. [Methods] We cloned the *srfAC-A* gene from *Bacillus subtilis* fmbj by PCR, and constructed a recombinant expression vector named pET-23a-srfAC-A. Furthermore, the SrfAC-A domain was expressed in *E. coli* BL21 (DE3) and purified by Ni-NTA agarose column. Then the activity of *srfAC-A* domain was detected. [Results] The *srfAC-A* domain had specificity towards Ile, but almost no activity to other amino acids. [Conclusion] The independent A domain from surfactin synthase had selectivity to specific amino acids *in vitro*.

Keywords: Surfactin synthase, A domain, Cloning and expression, Activity analysis

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31271828)

* Corresponding author. E-mail: bxm43@njau.edu.cn

Received: 24 September 2012 / Revised: 15 February 2013

《微生物学报》EndNote Style

EndNote 文献管理软件能够帮助科研人员更好地进行学术研究、学习以及论文的撰写,这已经被越来越多的人熟悉、接受。为了方便作者写作与投稿,我们编制了“《微生物学报》EndNote Style”文件。利用 EndNote 轻松调取收集的文献,自动按照《微生物学报》的格式生成论文的参考文献。

1. 建议作者在投稿本刊时使用“《微生物学报》EndNote Style”文件,这会让您在写作过程中更加轻松快乐。请到本刊网站的“下载专区”中获取这个文件。

2. 将“《微生物学报》EndNote Style”文件下载后,复制到 EndNote 安装文件夹下面的 Style 子目录中。

3. 在使用 EndNote 文献管理软件插入文献后,投稿前,请用 EndNote 软件的“Convert to Plain Text”功能,将文章中的参考文献转化成 Plain Text 格式,以便于编辑修改。【注:本刊的这个文件是在 EndNote X5 环境下编制的,因此无法在低于 X5 版本的环境打开和使用。】

4. 因本刊是中文期刊,需要作者对 3 处手工调节。具体写法参见本刊网站“投稿须知”中的“参考文献”。

(1) 西文刊名:2009 年开始西文刊名需要全拼,为的是保证刊名的书写准确。

(2) 非英文的期刊:以尊重原始文种为主,2012 年底开始采用双语表述。先英文文献后原文文献,并在英文文献的后面标出“文种”。

(3) 译著:需要给出外国作者的原姓名。

致谢:“《微生物学报》EndNote Style”是在本刊副主编、中国军事医学科学院微生物流行病学研究所杨瑞馥先生的建议下开始的,杨老师实验室的崔玉军博士按照《微生物学报》的要求编辑了该文件。在此,谨向他们表示衷心地感谢!