

辅助噬菌体在噬菌体展示中的应用及研究进展

杜东霞 张冉*

(湖南师范大学医学院 微生物学教研室 湖南 长沙 410081)

摘要: 噬菌体展示技术是一种将外源肽或蛋白质与特定噬菌体衣壳蛋白相融合, 展示于噬菌体表面来构建蛋白质或多肽文库, 并从中筛选目的蛋白、多肽或抗体的基因工程高新技术。噬菌粒/辅助噬菌体系统是最常用的噬菌体展示系统, 此系统中辅助噬菌体对噬菌粒的复制和组装发挥着至关重要的作用。本文结合当今该领域的最新研究动态, 概述了噬菌粒和辅助噬菌体双基因组系统, 着重介绍了不同辅助噬菌体的特点及其突变机制, 并对其应用前景进行了展望, 以期为该技术的进一步完善提供一定的借鉴作用。

关键词: 噬菌体展示, 辅助噬菌体, 噬菌粒, 超感染

Application and Progress of Helper Phage in Phage Display

DU Dong-Xia ZHANG Ran*

(Department of Microbiology, College of Medicine, Hunan Normal University, Changsha, Hunan 410081, China)

Abstract: Phage display is a widely used gene engineering high technology. Through the display of exogenous peptides or proteins fused specific coat protein on the surface of phages, it is possible to construct proteins or peptides libraries and screen interesting proteins, peptides and antibodies successfully. Most commonly used phage display technology is phagemid/helper phage system, in which helper phages are essential for the replication and assembly of phagemid particles. In this review, in combination with the newest research dynamic status, we summarize phagemid/helper phage double-genome system. We mainly emphasized the features and mutation mechanisms of different helper phages. We also made some prospects for the future directions, in the meanwhile, we also expect that our experience can provide some help for further maturity of the technology.

Keywords: Phage display, Helper phage, Phagemid, Superinfecting

近年来, 在肿瘤学、免疫学、蛋白质工程和配体、受体等研究领域, 噬菌体展示技术(Phage Display Techniques, PDT)逐渐发展成为这些领域的主流技术^[1]。该技术的最大特点是将基因型和表现

型直接偶联, 确保能够方便、快速地获得所展示的目的蛋白和编码此蛋白的基因。

通常用于噬菌体展示的载体有两类: 即噬菌体载体和噬菌粒(phagemid)载体^[2]。由于噬菌粒载体具

基金项目: 湖南省自然科学基金资助项目(No. 05JJ30065)

* 通讯作者: Tel: 86-731-8912422; ✉: zhangran008@yahoo.com.cn

收稿日期: 2008-06-24; 接受日期: 2008-09-11

有基因组较小、易于操作、可插入的片段较大、转化效率高、产生的重组体更加稳定等优点,目前最常用的就是噬菌粒载体。噬菌粒只含噬菌体的部分遗传信息,因而建库与筛库都需要辅助噬菌体(helper phage)为宿主细胞的噬菌粒 DNA 提供复制和包装所需的蛋白酶和外壳蛋白^[3]。

辅助噬菌体提供的复制和包装机制,不仅对噬菌粒基因组起作用,而且对辅助噬菌体自身的基因组也起作用。筛选时那些含有辅助噬菌体基因组的重组噬菌体可能会非特异性结合到选择靶分子上,严重降低筛选效率^[4],因此辅助噬菌体对噬菌粒文库的质量是非常重要的。通过对辅助噬菌体的不断改进,不仅可以有效地提高目的蛋白展示水平,而且可使从噬菌粒文库中筛选特异性结合子变得更加容易可靠,从而使噬菌体展示技术作为一种高通量的筛选技术也正变得日臻成熟和完善。

1 噬菌粒和辅助噬菌体的双基因组系统

噬菌粒实际上是带有丝状噬菌体大间隔区(intragenic region, IG),集质粒和丝状噬菌体有利特征于一身的载体,具有 ColE1 复制起点及抗生素抗性选择标记、以及丝状噬菌体的间隔区。研究时,可以将外源基因以双链的形式定向整合至噬菌粒,再将其转化至宿主菌。虽然噬菌粒载体携带有 M13 噬菌体的 IG 区,能够合成单链 DNA(ssDNA),但是它没有 M13 噬菌体的功能基因,没有 M13 噬菌体的 gII 产物存在,所以不能独立合成 ssDNA。在宿主菌中,若没有辅助噬菌体超感染,噬菌粒就像质粒一样进行基因扩增;若有,则辅助噬菌体的 gII 产物将启动噬菌粒的滚环复制,产生噬菌粒的单链拷贝,这些单链拷贝经切割后产生切口、环化,最后被装进完整的子代噬菌体颗粒中^[1,5]。

辅助噬菌体是一类自身 DNA 复制效率极低的丝状噬菌体的突变型,其基因组 DNA 具有 M13 噬菌体的所有功能基因,但是 IG 区是缺陷的,因而其 pII 蛋白对这个序列不能有效识别,辅助噬菌体本身的 DNA 也就不能进行单链复制,于是能够为噬菌粒提供 pII 蛋白和包装蛋白。辅助噬菌体的 IG 区的失活,同时使得其本身的基因不能表达。为使辅助噬菌体的所有功能基因都能表达,必须在辅助噬菌体的基因组中导入新的复制起点,一般间隔区中插入的是 lac Z 序列。当含有重组基因的噬菌粒转染至

大肠杆菌后,再用辅助噬菌体进行超感染,辅助噬菌体合成的 pII 蛋白就会优先识别噬菌粒上的正常基因间隔区,启动滚环复制,产生 ssDNA,这样所产生的子代噬菌体外壳蛋白所包装的 ssDNA 主要是来自含有重组基因的噬菌粒的 DNA,并同时展示噬菌粒编码的 pIII 或 pVIII 与外源肽段的融合蛋白和辅助噬菌体编码的野生型的 pIII 或 pVIII 蛋白,确保重组噬菌体能正常感染、组装和增殖^[5-7]。

2 辅助噬菌体的突变机制及特点

通过不同的机制构建的辅助噬菌体主要有两大类,即含全长 gIII 的辅助噬菌体、gIII 删除或 gIII 缺陷的辅助噬菌体。

2.1 含全长 gIII 的辅助噬菌体

含全长 gIII 的辅助噬菌体主要包括 M13KO7、R408 和 VCSM13,它们是最广泛使用的辅助噬菌体,通常称之为标准的辅助噬菌体。

辅助噬菌体 M13KO7^[8]是 M13 噬菌体的一个突变体,带有一个质粒复制起点、卡那霉素抗性基因以及 G6125T 的突变基因 II。当 M13KO7 超感染含有噬菌粒的菌株时, M13KO7 突变的 gII 产物将优先作用于噬菌粒载体上的复制起始区,使得噬菌粒产生的(+)链多于辅助噬菌体产生的(+)链,因而保证了感染细胞产生的病毒颗粒中来源于噬菌粒的单链 DNA 占优势。当 M13KO7 生长在没有噬菌粒载体的条件下时,突变 gII 的产物又能与其被损坏的复制起始区作用,产生足量的噬菌体,用于超感染。Vieira J 等用辅助噬菌体 M13KO7 超感染含有噬菌粒 pUC 的菌株 MV1184 和 MV1190 时,结果包装单链质粒 DNA 的噬菌体滴度即达 10^{11} CFU/mL \sim 5×10^{11} CFU/mL。

VCSM13 (Stratagene, La Jolla, CA, USA)是 M13KO7 的一个突变体。

R408^[9]是由 Russe M 等构建的,是 f1 噬菌体的一个突变体,删除了其 IG 中的 24 bp 的区段,从而使其包装带有完整信号的单链 DNA 优于其自身单链 DNA。另外,它还带有一个称为 IRI 的突变,使得它对缺陷病毒的干扰不敏感。与 M13KO7 不同的是, R408 不带抗生素抗性标记基因。用辅助噬菌体 R408 超感染含有 pEMBL19 的菌株 HB101,结果大大提高了单链质粒 DNA 的产量。

这些含全长 gIII 基因的辅助噬菌体进行超感染

的优点是:产生的辅助噬菌体和重组噬菌粒颗粒的滴度均较高;单价展示所产生的目的蛋白的特异性强。其缺点是:虽然这些辅助噬菌体基因组不具有包装信号,但是超感染后所产生的辅助噬菌体的数目有时与噬菌粒颗粒的数目相同,有时甚至超过噬菌粒颗粒的数目,这种表现型和基因型的不一致严重降低了筛选效率;而且由噬菌粒编码的融合蛋白同辅助噬菌体编码的野生型 pIII 相比,在噬菌体组装时噬菌粒编码的融合蛋白嵌入噬菌体的效率低,因此展示水平较低,仅为单价展示(图 1A)。展示水平和筛选效率的降低,很有可能共同导致分离特异性结合子阳性克隆的失败^[3,10,11]。

2.2 完全删除 gIII 的辅助噬菌体

辅助噬菌体 M13MDD3.2、R408d3、VCSM13d3 是通过分别删除辅助噬菌体 M13KO7、R408 和 VCSM13 的 gIII 而构建的。

Marta Dueñas 等将 M13KO7 的 gIII(1579-2851) 删除但保留完整的 IG, 用携带 gIII 的辅助质粒提供 pIII 蛋白, 构建了辅助噬菌体 M13MDA3.2^[12], 并将 M13MDA3.2 和 fKN16、fCA55 及 M13MDA3 四种辅助噬菌体在感染力和对重组噬菌体扩增和选择能力上进行了比较。结果, M13MDA3.2 无论是感染力还是对重组噬菌体的扩增和选择能力都是最强的。

Rakonjac J 等通过分别删除 R408 和 VCSM13 的 gIII, 用携带有 gIII 的辅助质粒 pJARA 110 提供 pIII 蛋白而构建了辅助噬菌体 R408d3 和 VCSM13d3^[13]。用 R408d3 和 VCSM13d3 感染含有噬菌粒 pComb3 的菌株 XL1-Blue, 检测它们包装噬菌粒的能力。结果他们都能高效率的包装噬菌粒, 但 R408d3 包装辅助质粒的水平比 VCSM13d3 低得多, 有数据显示用 R408d3 援救所产生的重组噬菌体的感染背景比 VCSM13d3 低 1800 倍。

在这些删除 gIII 基因的辅助噬菌体援救系统中, 将此辅助噬菌体的基因组导入通过辅助质粒提供 pIII 蛋白的大肠杆菌细胞内, 并通过由此产生的具有感染性的辅助噬菌体用来援救重组的噬菌粒载体, 这就使得噬菌体组装时 pIII 的唯一来源仅是由噬菌粒编码的融合蛋白, 由于丝状噬菌体的 pIII 蛋白有 3~5 个拷贝, 这种多价展示在一定程度上提高了重组噬菌体的展示水平(图 1B), 但所展示目的蛋白的平均亲和力降低了, 当要求得到高亲和力的目的蛋白时, gIII 删除的辅助噬菌体的使用就受到了限

制^[14]。而且, 尽管辅助质粒不含有包装信号, 但其基因组也被低水平包装, 这在一定程度上造成了污染。另外, gIII 的缺失或许会对噬菌体的其他基因产生极性效应, 造成 gIII 缺陷的辅助噬菌体产量非常低, 这也严重限制了删除 gIII 的辅助噬菌体的使用^[2,3,15]。

2.3 gIII 缺陷的辅助噬菌体

2.3.1 部分删除 gIII 的辅助噬菌体:最近, Rondot S 等人对 gIII 删除的辅助噬菌体又进行了进一步创造性的改进, 从辅助噬菌体 M13KO7 基因组中删除 gIII 的开放阅读框(ORF), 仅留启动子和信号肽, 并在信号肽后加一个短肽, 同时构建大肠杆菌细胞包装系(DH5a/pIII)来提供 pIII 蛋白的, 构建了新的辅助噬菌体 hyperphage^[16]。这同完全删除 gIII 的辅助噬菌体相比, 避免了极性效应导致的噬菌体产量的降低, 从而使得 hyperphage 的滴度大大提高, 但仍略低于辅助噬菌体 M13KO7 的滴度。同时还避免了通过辅助质粒来提供 pIII 在噬菌体进行包装时所造成的污染。Rondot S 等分别用辅助噬菌体 hyperphage 和 M13KO7 超感染携带有噬菌粒 pSEX81-phox 的菌株 Top10F'时, 通过感染力和抗原的结合能力实验来检测重组噬菌体颗粒的装配及其功能, 结果二者在重组噬菌体的装配及其感染力方面没有什么不同。接着又对来自 pSEX/M13KO7 和 pSEX/hyperphage 系统的相同滴度的重组噬菌体进行了免疫印迹分析, 结果后者展示 scFv-pIII 融合蛋白的量是较多的。在用破伤风毒素筛选由 hypercharge 包装产生的人类 scFv 库时, 特异性的结合子有了明显的增加。经两轮筛选后, 50%以上的噬菌体都结合到抗原上, 而用普通的 M13KO7 仅有 3%的噬菌体结合到抗原上。

R Arjen Kramer 等通过删除 VCSM13 基因组上 gIII 的具感染力的 N1 和 N2 区而保留 CT 区, 用辅助质粒 pUC19-gIII 提供 pIII 蛋白而成功构建了 CT 辅助噬菌体^[17]。由于 CT 辅助噬菌体编码的是一个截短的 pIII 蛋白, 缺乏负责感染的 N1 和 N2 结构域, 因此用 CT 辅助噬菌体援救的重组噬菌体必须是嵌入了融合蛋白(外源蛋白与 pIII 蛋白的融合), 才具有感染性。同时由于 pIII 的 CT 结构域可以稳定噬菌体的完整性和促进噬菌体的释放, 并且 CT 结构域和 VCSM13 的全长 gIII 编码量相当, 因而 CT 辅助噬菌体的装配就少于依赖辅助质粒编码的 pIII 蛋

<http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>

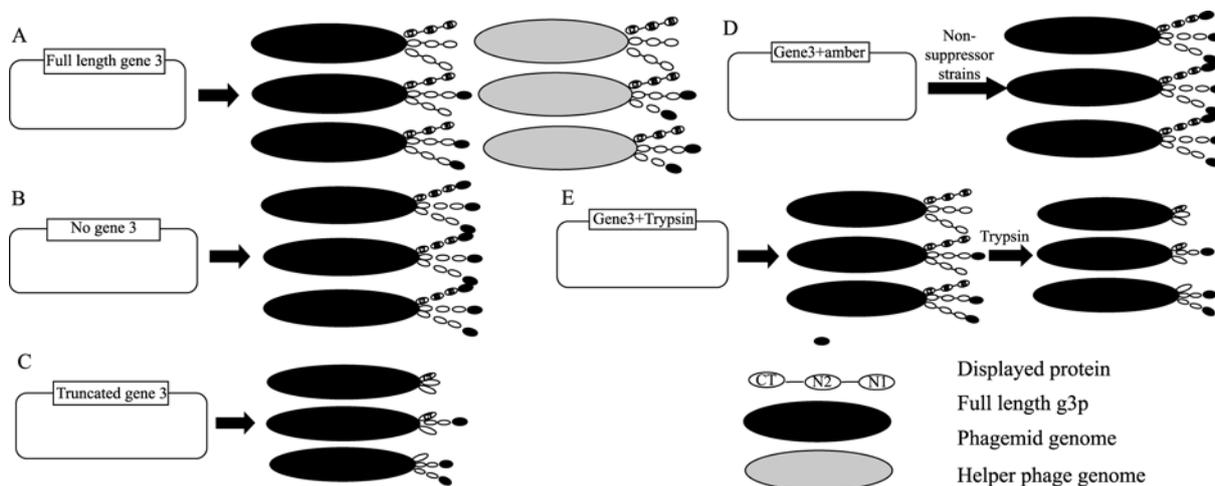


图 1 不同辅助噬菌体援救的重组噬菌体的特征

Fig. 1 The features of recombinant phage of different helper phage rescue

白,这就提高了噬菌颗粒的有效包装(图 1C)。用 CT 辅助噬菌体和 VCSM13 辅助噬菌体分别援救 scFv 库 (pHEN-TG1、pHENC8、pHEN-BG 和 pHEN-BT),结果两者对 scFv 都显示出较高的展示水平,经过两轮筛选后也都筛选到大量的阳性克隆子,二者相比,CT 辅助噬菌体能使感染背景降低至少 100000 倍。

2.3.2 条件性删除 gIII 的辅助噬菌体: 辅助噬菌体 Ex-phage、Phaberge、Ex12 和 VCSM13N1 都在其 gIII 中引入了琥珀终止密码子(UAG)。在抑制性菌株 (suppressor strains)中,琥珀终止密码子可以发生通读,能够有效的编码 pIII,从而产生具感染性的辅助噬菌体;在非抑制性菌株(non-suppressor strains),琥珀终止密码子不能发生通读,使得辅助噬菌体自身不能编码 pIII,在重组噬菌体组装时,噬菌粒编码的目的蛋白与 pIII 的融合蛋白成为 pIII 的唯一来源(图 1D)。因而这类辅助噬菌体使用起来比其他的 gIII 缺陷的辅助噬菌体更加简单,其产量和展示水平也更高^[2,18]。

Soltes G 等用琥珀终止密码子替代辅助噬菌体 M13KO7 基因组中 gIII 的 3'端密码子 Q350 并且诱导密码子 S351 发生沉默突变,成功构建了辅助噬菌体 Phaberge^[19],同时构建了噬菌粒 pMAB66、pMAB77 和 pMAB87,其中 pMAB66 和 pMAB77 整合了抗破伤风毒素的人全长 Fab 片段($V_H C_{H1} + V_k C_k$)基因,而 pMAB87 未整合此基因,并且 gIII 被提前终止。Glenn Soltes 等用辅助噬菌体 Phaberge 和 M13KO7 分别超感染含有噬菌粒 pMAB66、pMAB77

和 pMAB87 的非抑制性菌株 TOP10F'。结果二者援救的重组噬菌体的滴度相当,但与 M13KO7 相比,Phaberge 可使 Fab 片段的展示水平提高 5-20 倍。而且 Phaberge 仅仅包装含目的基因的噬菌粒 pMAB66 和 pMAB77,不包装未整合目的基因的噬菌粒如 pMAB87,从而保证了噬菌粒文库的质量。

Baek H 等人用密码子 UAG 替代辅助噬菌体 M13KO7 基因组中 gIII 5'端的第一和第三个密码子 GAA,成功构建了辅助噬菌体 Ex-phage^[20],同时也构建了噬菌粒 pIGT3,并使它只有在非抑制性菌株中才表达抗体和 pIII 的融合蛋白。用 Ex-phage 和 M13KO7 超感染含有噬菌粒 pIGT3 的非抑制性菌株 JS5,检测了他们包装产生的重组噬菌体的滴度、scFv-pIII 的展示水平、结合抗原的敏感性以及两轮筛选后富集能力。结果除了在包装产生的重组噬菌体的滴度方面 Ex-phage 要低于 M13KO7 之外,在其他方面 Ex-phage 显示出了极大的优势。在非抑制性菌株中,由于辅助噬菌体 Ex-phage 的琥珀终止密码不能有效通读,因而不能表达 pIII,这就使得噬菌粒 pIGT3 编码的抗体-pIII 的融合蛋白是 pIII 的唯一来源。

2006 年 Mi-young Oh 等用密码子 UAG 替代辅助噬菌体 M13KO7 基因组中 gIII 5'端的第一和第二个密码子 GAA 成功构建了辅助噬菌体 Ex12^[21]。同 M13KO7 相比,辅助噬菌体 Ex12 在抑制性菌株中能产生 10%的野生型 pIII。将二者分别超感染含有噬菌粒 pCMTG-SP112Fab(抗丙酮酸脱氢酶 Fab 抗体片段)的抑制性菌株 XL-1 Blue MRF'。结果表明,与

M13KO7 相比, Ex12 的展示水平提高了 50 倍, 对抗原的结合能力提高了 100 倍并且大大提高了特异性抗原的淘选效率。

高荣凯和王琰等采用重叠延伸 PCR 技术对辅助噬菌体 VCSM13 的 gIII N1 区的 Q 位点进行琥珀突变构建了辅助噬菌体 VCSM13NI^[22]。在抑制性菌株 XL1-Blue 中其滴度达到 2.5×10^{11} CFU/mL, 与野生型 VCSM13 相似(4×10^{11} CFU/mL), 而在非抑制性菌株 HB2151 中, 其滴度降低了数万倍。因而用辅助噬菌体 VCSM13NI 在抑制性菌中制备 HBsAg 噬菌体抗体, 可以得到与野生型相似的结果。

2.3.3 gIII 中插入胰蛋白酶位点的辅助噬菌体: Kristensen P 和 Winte G 将编码蛋白酶切位点的序列插入噬菌体载体 fd-DOG 的 N 端(N1-N2 区)和 CT 区构建了噬菌体载体 fd-K108, 将辅助噬菌体 VCSM13 的 BamH I-ClaI 片段插入噬菌体载体 fd-K108 中, 即得到辅助噬菌体 KM13^[23]。由于 pIII 的 N-端区域是噬菌体感染所必需的, 因此在 N 端(N1-N2 区)和 CT 区插入蛋白酶裂解位点, 在筛选时用胰蛋白酶处理就使得辅助噬菌体 KM13 的 pIII 失去了感染力(图 1E)。尽管使用辅助噬菌体 KM13 没有改变展示效率, 但是通过破坏辅助噬菌体 pIII 的感染力的调节, 可以使得仅仅展示有 pIII 融合蛋白的噬菌体才具有感染力, 因此有效地降低了感染背景, 提高了筛选效率。

3 问题与展望

现已证明通过对辅助噬菌体的改进不但提高了展示水平, 而且有效地降低了感染背景, 特别是 gIII 缺陷的辅助噬菌体的构建不仅提高了展示水平, 而且为实现选择感染性噬菌体技术(SIP)^[24]提供了一个有效手段, 从而使得从噬菌粒文库中筛选特异性的结合子变得更加容易、有效。

尽管这些系统已经克服了辅助噬菌体的一些缺点, 但不能避免使用辅助噬菌体的主要问题, 即将辅助噬菌体加至细菌生长培养基上, 就相对限制了细菌的生长周期。Chasteen L 发展了不使用辅助噬菌体的噬菌体展示技术, 但需要构建辅助质粒, 并建立含有辅助质粒的细菌包装细胞系^[25]。

噬菌体展示技术本身还有许多可改进的空间, 随着该技术的发展与完善, 人们可以根据需要, 在更大程度上改造和制备各种生物分子, 从而更好地

开发噬菌体展示技术的应用潜力^[26]。可以预见, 噬菌体展示技术作为一项极为高效的表达、筛选体系, 将会在蛋白质组学研究、生物制药、疾病的预防诊断治疗等各领域成为一种更为有效的方法。

参考文献

- [1] Pini A, Bracci L. Phage display of antibody fragments. *Current Protein and Peptide Science*, 2000, **1**: 155-169.
- [2] Paschke M. Phage display systems and their applications. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2006, **70**: 2-11.
- [3] Soltes G, Hust M, Bansal A, *et al.* On the influence of vector design on antibody phage display. *Journal of Biotechnology*, 2007, **127**: 626-637.
- [4] Kirsch M, Zaman M, Meier D, *et al.* Parameters affecting the display of antibodies on phage. *Journal of Immunological Methods*, 2005, **301**: 173-185.
- [5] 萨姆布鲁克. 分子克隆实验指南. 第三版. 北京: 科学出版社, 2002, p.288.
- [6] de Bruin R, Spelt K, Mol J, *et al.* Selection of high-affinity phage antibodies from phage display libraries. *Nature Biotechnology*, 1999, **17**: 397-399.
- [7] McCafferty J, Griffiths AD, Winter G, *et al.* Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains. *Nature*, 1990, **348**: 552-554.
- [8] Vieira J, Messing J. Production of single-stranded plasmid DNA. *Methods Enzymol*, 1987, **153**: 3-11.
- [9] Russel M, Kidd S, Kelley MR. An improved filamentous helper phage for generating single-stranded plasmid DNA. *Gene*, 1986, **45**: 333-338.
- [10] 王辉, 王琰, 沈倍奋. 抗体库技术中辅助噬菌体的研究进展. *军事医学科学院院刊*, 2008, **32**(2): 168-171.
- [11] Lee CM, Iorno N, Siervo F, *et al.* Selection of human antibody fragments by phage display. *Nature Protocols*, 2007, **2**: 3001-3008.
- [12] Dueñas M, Borrebaeck CA. Novel helper phage design: intergenic region affects the assembly of bacteriophage and the size of antibody libraries. *FEMS Microbiol Lett*, 1995, **125**: 317-321.
- [13] Rakonjac J, Jovanovic G, Model P. Filamentous phage infection-mediated gene expression: construction and propagation of the gIII deletion mutant helper phage R408d3. *Gene*, 1997, **198**: 99-103.
- [14] Kuba H, Furukawa A, Okajima T, *et al.* Efficient bacterial production of functional antibody fragments using a phagemid vector. *Protein Expr Purif*, 2008, **58**(2): 292-300.
- [15] Shi B, Wang H, Guo S, *et al.* Protein III-based single-chain antibody phage display using bacterial cells bearing an additional genome of a gene-III-lacking helper phage. *Biotechniques*, 2007, **42**(6): 760-765.

<http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>

- [16] Rondot S, Koch J, Breitling F, *et al.* A helper phage to improve single-chain antibody presentation in phage display. *Nat Biotechnol*, 2001, **19**: 75–78.
- [17] Kramer RA, Cox F, van der HM, *et al.* A novel helper phage that improves phage display selection efficiency by preventing the amplification of phages without recombinant protein. *Nucleic Acids Res*, 2003, **31**: e59.
- [18] Shen Y, Yang X, Dong N, *et al.* Generation and selection of immunized Fab phage display library against human B cell lymphoma. *Cell Research*, 2007, **17**: 650–660.
- [19] Soltes G, Barker H, Marmai K, *et al.* A new helper phage and phagemid vector system improves viral display of antibody Fab fragments and avoids propagation of insert-less virions. *J Immunol Methods*, 2003, **274**: 233–244.
- [20] Baek H, Suk KH, Kim YH, *et al.* An improved helper phage system for efficient isolation of specific antibody molecules in phage display. *Nucleic Acids Res*, 2002, **30**: e18.
- [21] Mi-young Oh, Hyun-yoo Joo, Byung-ung Hur. Enhancing phage display of antibody fragments using gIII-amber suppression. *Gene*, 2007, **386**: 81–89.
- [22] 高荣凯, 王 琰. 琥珀突变型辅助病毒 VCSM13N1 的构建. 第二军医大学学报, 2005, **26** (12): 1340–1342.
- [23] Kristensen P, Winter G. Proteolytic selection for protein folding using filamentous bacteriophages. *Fold Des*, 1998, **3**: 321–328.
- [24] Jung S, Arndt KM, Muller KM, *et al.* Selectively infective phage(SIP)technology: scope and limitations. *J Immunol Methods*, 1999, **231**: 93–104.
- [25] L Chasteen, J Ayriss, P Pavlik, *et al.* Eliminating helper phage from phage display. *Nucleic Acids Res*, 2006, **34**(21): 145.
- [26] Huber D, Beckwith J. Phage display extends its reach. *Nature Biotechnology*, 2006, **24**: 793–794.

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高新技术创新为主的综合性学术期刊。刊登内容包括:微生物学、生物工程、病毒学、酶工程、发酵工程、细胞工程等领域的最新研究成果,产业化新技术和新进展。设置的栏目有:研究报告、专论与综述、生物实验室(原技术与方法)、高等院校教学、名师讲堂、教学与科研成果展示、显微世界、专题专栏、专家论坛、书讯、会讯等。

2 投稿方式

投稿时请登录我刊主页 <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、征稿须知”。

作者必须在网站投.doc 格式的电子稿,图与文字编好页码、图号后合成一个文件上传。凡不符合(投稿须知)要求的文稿,本部恕不受理。

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 篇幅

以 A4 纸 5 号字计算,综述、教学和方法类文章最好在 3 页以内,研究报告 4~6 页(以上均包括图表)。

3.2 图表

文中的图表须清晰简明,文字叙述应避免与图表重复。所有小图的宽度应小于 8 cm(占半栏),大图的宽度应小于 17 cm(通栏)。

3.3 参考文献及脚注

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。我刊的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。国外期刊名可以缩写,但必须标准,不加缩写点,斜体。参考文献数量不限。

参考文献格式举例:

期刊: [1] 刘 杰,成子强,史宣玲. SARS 冠状病毒 *nsp14* 基因的克隆和表达. 微生物学通报, 2007, **34**(2): 1–3.

[2] Kajiura H, Mori K, Tobimatsu T, *et al.* Characterization and mechanism of action of a reactivating factor for adenosylcobalamin-dependent glycerol dehydratase. *J Biol Chem*, 2001, **276**(39): 36514–36519.

图书: [3] 钱存柔,黄仪秀. 微生物实验教程. 北京: 北京大学出版社, 2000, p.4.

[4] 董志扬,张树政,方宣钧,等. 海藻的生物合成及抗逆机理. 见: 华 瑒等. 核农学进展. 北京: 中国农业出版社, 1996, pp.115–120.

脚注(正文首页下方):

基金项目: 基金资助(No.)

*通讯作者 Tel: ; Fax: ; E-mail:

收稿日期: 2009-00-00 ; 接受日期: 2009-00-00

(下转 p.284)