

毛竹阿拉伯糖-5-磷酸异构酶的基因克隆、原核表达及纯化

屈亚平, 张智俊, 王超莉, 王 蕾, 吴林军

(浙江农林大学 亚热带森林培育国家重点实验室培育基地, 浙江 临安 311300)

摘要: 毛竹 *Phyllostachys edulis* 阿拉伯糖-5-磷酸异构酶(*PeKdsD*)是 2-酮-3-脱氧辛糖酸(KDO)生物合成途径的第 1 个关键酶。采用逆转录实时聚合酶链式反应(qRT-PCR)克隆得到毛竹 *KdsD* 基因。该基因 cDNA 全长 1 038 bp, 编码 346 个氨基酸; 对不同物种来源的 *KdsD* 氨基酸序列进行比对和系统进化树分析。结果表明: 毛竹的 *KdsD* 与玉米 *Zea mays* 等植物来源的 *KdsD* 有很高的序列一致性, 而与微生物来源的 *KdsD* 序列一致性较低。毛竹不同组织实时荧光定量聚合酶链式反应(qRT-PCR)结果表明: *PeKdsD* 基因在叶中表达量远远高于其他组织。在大肠埃希菌 *Escherichia coli* 原核表达系统中获得了 *KdsD* 的可溶性高表达蛋白, 将大量表达的重组蛋白经过 Ni-NTA 亲和层析和分子筛层析(SEC)进行纯化, 发现 *KdsD* 在溶液(30 mmol·L⁻¹ 三羟甲基氨基甲烷 pH 8.0, 200 mmol·L⁻¹ 氯化钠)中以多种聚体的形式存在; 酶学性质测定的结果表明: 毛竹 *KdsD* 酶最适 pH 值为 pH 8.5, 最适作用温度为 37 ℃。此结果为后期研究植物 *KdsD* 蛋白的结构与功能奠定了基础。图 7 参 17

关键词: 林木育种学; 毛竹; 阿拉伯糖-5-磷酸异构酶; 基因克隆; 原核表达; 蛋白纯化

中图分类号: S722 **文献标志码:** A **文章编号:** 2095-0756(2016)06-0928-07

Gene cloning, expression, and purification of the arabinose-5-phosphate isomerase from *Phyllostachys edulis*

QU Yaping, ZHANG Zhijun, WANG Chaoli, WANG Lei, WU Linjun

(The Nurturing Station for the State Key Laboratory of Subtropical Silviculture, Zhejiang A & F University, Lin'an 311300, Zhejiang, China)

Abstract: *Phyllostachys edulis* arabinose-5-phosphate isomerase (*PeKdsD*) is the first key enzyme in the biosynthesis of 3-deoxy-D-manno-octulosonate (KDO). The full length cDNA of the *KdsD* gene (1 038 bp with 346 amino acids) was cloned using reverse transcription polymerase chain reaction (qRT-PCR) followed by protein Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) and phylogenetic tree analysis of the amino acid sequence. Then a qRT-PCR analysis of diverse tissues in *Ph. edulis* was conducted, and a mass of soluble *KdsD* protein was obtained through a prokaryotic expression system in *Escherichia coli*. The recombinant protein was further purified through Ni-NTA affinity and size exclusion chromatography (SEC) in a buffer of 30 mmol·L⁻¹ Tris-HCl pH 8.5, 200 mmol·L⁻¹ NaCl to determine enzymatic properties. Results of the amino acid sequence among different species indicated that the *PeKdsD* isomerase had a high sequence similarity with *KdsD* in *Zea mays* but was low in microorganisms. The qRT-PCR analysis of diverse tissues in *Ph. edulis* revealed that *PeKdsD* had its highest expression level in the leaf. SEC results showed that the recombinant *KdsD* protein existed as protein polymers, and for enzymatic properties of *PeKdsD* the optimum reaction temperature was 37 ℃ with a pH of 8.5. This work provides a basis for determining the structure and function of plant *KdsD*. [Ch, 7 fig. 17 ref.]

Key words: forest tree breeding; *Phyllostachys edulis*; arabinose-5-phosphate isomerase (*PeKdsD*); gene

收稿日期: 2015-11-03; 修回日期: 2015-12-09

基金项目: 浙江省自然科学基金资助项目(Y14C160039)

作者简介: 屈亚平, 从事生物技术与种质创新研究。E-mail: 1173714002@qq.com。通信作者: 张智俊, 副教授, 博士, 从事生物技术与种质创新研究。E-mail: 397942805@qq.com

cloning; prokaryotic expression; protein purification

果胶类多糖广泛分布于高等植物的根、茎、叶、果实等的细胞初生壁和细胞间隙,对细胞组织起着软化和黏合作用,同时还是抵御病原体微生物入侵的天然屏障^[1]。2-酮-3-脱氧辛糖酸(KDO)是果胶类多糖鼠李半乳糖醛酸聚糖-II(Rhamnogalacturonans II, RG-II)成分中很少见的八碳糖^[2],在进化过程中非常保守,对花粉管的伸长和生长具有一定的作用^[3-4]。KDO 合成过程中涉及到 5 种酶^[5],其中阿拉伯糖-5-磷酸异构酶(D-arabinose 5-phosphate isomerase, KdsD)是 KDO 生物合成过程中的第 1 个关键酶,可以催化核酮糖-5-磷酸(D-ribulose 5-phosphate, Ru5P)的异构化,以产生在 KDO 生物合成途径中的第 1 个中间产物 D-阿拉伯糖-5-磷酸(D-arabinose 5-phosphate, A5P)。KDO 最初是在革兰氏阴性菌中发现的,它连接 O-特异侧链与类脂 A 共同嵌入细胞壁外膜上^[6]。细胞壁中 KDO 合成的阻断会导致类脂 A 物质的累积和细胞生长停滞^[7]。研究发现, KDO 生物合成途径也存在于藻类植物与高等植物中^[2,8]。大肠埃希菌 *Escherichia coli* 中的 KdsD 晶体结构已经被解析,它是一个同源四聚体^[9-11]。每个 KdsD 亚基包含 2 个不同的结构域: N-末端糖异构酶(SIS)结构域,主要参与磷酸异构化作用,以及 1 对未知功能的胱硫醚- β -合酶(CBS)结构域。通过定点突变确定了大肠埃希菌的 Lys59, His88 和 His193 对应于绿脓杆菌 *Pseudomonas aeruginosa* 的 Lys56, His85 和 His190^[12-14]分别是其活性重要的保守残基。目前,植物中 KdsD 的研究很少,其晶体结构也尚不清楚,植物来源的 KdsD 酶功能及催化作用机制、酶的催化特性等科学问题仍需要更加深入研究。毛竹 *Phyllostachys edulis* 是中国广泛分布的一种经济价值很高的植物,在林业生产中的地位至关重要。本研究拟克隆毛竹 *KdsD* 基因,分析它在不同组织的表达特异性,进行生物信息学分析和原核表达,经过 Ni-NTA 亲和层析和分子筛层析(SEC)纯化获得高纯度的蛋白,并对其酶学性质进行分析,为后续 KdsD 晶体学结构和植物 *KdsD* 基因功能的研究打下理论基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

毛竹采自浙江农林大学亚热带森林培育国家重点实验室培育基地,取半年生毛竹实生苗新鲜的根、茎、叶分装于冻存管中,于液氮中速冻,放-80℃冰箱备用。

1.2 实验方法

1.2.1 总 RNA 提取和 cDNA 合成 取毛竹新鲜的根、茎、叶在液氮中迅速研磨成粉末,用 Trizol 法^[15]提取总 RNA,用脱氧核糖核酸酶 I (DNase I)消除 DNA 污染。分别以毛竹约 1.0 μg 的根、茎、叶 RNA 为模板,利用逆转录试剂盒合成 cDNA。

1.2.2 *PeKdsD* 基因克隆 通过美国生物技术信息中心(NCBI)数据库获得拟南芥 *Arabidopsis thaliana* 的 *KdsD* 基因序列,检索毛竹数据库,得到一条同源序列。根据该基因的开放读码框(ORF)设计引物。上游 *BamH* I 酶切位点引物 5'-CGGGATCCATGGGCTCGCTCCCCGTGCCCT-3'; 下游 *Hind* III 酶切位点引物 5'-CCAAGCTTTTATAATCCAGCAGAGACCAAT-3'(酶切位点用下划线显示)。引物由上海生工生物工程股份有限公司合成。以反转录后的 cDNA 为模板进行聚合酶链式反应(PCR)扩增。将 PCR 扩增产物电泳分析后经 DNA 胶回收试剂盒回收,获得的目的 DNA 片段插入经同样酶切后的 pE-SUMO 表达载体,得到 1 个 N-末端含有 6 个 His 亲和标签的重组质粒。将重组质粒转化到大肠杆菌 DH5 α 中,提取阳性克隆质粒进行双酶切和单酶切验证。

1.2.3 定量反转录聚合酶链式反应(qRT-PCR)分析 根据毛竹 *KdsD* 基因的保守序列设计 qRT-PCR 引物(正向引物: GTGTTGGATTCTGGATGGTTC; 反向引物: CAGCCGTAGTGGTGAATGAGTAAC)。内参 *Actin* (正向引物: CGACATTGGCTCGCTCTTC; 反向引物: CGGCAGAGGTGAGGGAGAT),使用荧光定量 PCR 仪对 *PeKdsD* 基因在根、茎、叶不同组织的表达量进行分析。

1.2.4 *PeKdsD* 的原核表达 将构建好的重组表达质粒转化到表达菌株 *E. coli* (Ril)中,挑取单克隆,接入 2 mL 溶菌肉汤(LB)培养基(A⁺)37℃培养,当菌体吸光度 *D*(600)达到 0.5~0.8 时,加入终浓度为 0.4 mmol·L⁻¹ 的异丙基硫代半乳糖苷(IPTG)诱导,分别在 37℃摇床上诱导 3 h,在 20℃摇床上过夜诱导,最后收集菌体,超声破碎,用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)检测蛋白表达情况。

1.2.5 PeKdsD 的纯化 在确定的最佳温度表达条件下, 将菌株接种于 1.0 L LB 培养基中进行扩大培养。加入诱导剂后, 菌液在 20 ℃, 220 r·min⁻¹ 条件下过夜培养。离心收集菌体, 将裂解液[1.0 mol·L⁻¹ 氯化钠, 30.0 mmol·L⁻¹ 三羟甲基氨基甲烷(Tris-HCl), 体积分数为 5%的甘油]加入到收集的菌体中, 超声破碎细胞后, 20 000 r·min⁻¹, 4 ℃条件下离心 45 min, 将上清转移至镍柱, 置于摇床缓慢结合 1 h, 后分别用低浓度咪唑缓冲液洗脱杂蛋白, 用高浓度咪唑缓冲液洗脱目的蛋白。将目的蛋白收集在 10 kDa 浓缩柱中离心进行浓缩, 至体积为 500.0 μL 左右。使用分子筛层析柱 Superose™ 12 10/300 GL 上样, 根据蛋白的出峰顺序收集蛋白, 用 SDS-PAGE 胶检测蛋白的纯度, 将较高纯度的蛋白收集浓缩, 置于-80 ℃保存。

1.2.6 酶活性测定 酶活力测定采用半胱氨酸-咪唑法^[16-17]。25.0 μL 的酶用 100.0 mmol·L⁻¹ Tris-HCl, pH 8.5 配制, 37 ℃保温 3 min, 加入 25.0 μL 2.0 mmol·L⁻¹ 阿拉伯糖-5-磷酸(A5P), 37 ℃反应 5 min, 加入 50.0 μL 12.5 mol·L⁻¹ 硫酸终止反应, 采用半胱氨酸-咪唑法显色, 测定 D(540) nm 吸光度。酶活力单位(1 U=16.67 nkat)定义为: 以 A5P 为底物, 每分钟催化产生 1.0 μmol 的核酮糖-5-磷酸(Ru5P)所需的酶量。所有酶活测定结果均为 3 次重复平行试验数据的平均值。

1.2.7 最适 pH 值和最适温度对酶活性的影响^[17] 最适 pH 值的测定, 将样品 KdsD 稀释在 100.0 mmol·L⁻¹ 不同 pH 值缓冲液中, MES 缓冲液从 pH 6.0~6.5, Tris-HCl 缓冲液从 pH 7.0~9.0。37 ℃反应 5 min, 测定酶活。最适温度则是在测定的最适 pH 值下, 将反应温度控制在 25~65 ℃, 隔 10 ℃进行酶促反应, 然后测定酶活性。

2 结果与分析

2.1 PeKdsD 基因克隆及原核表达载体的构建

PeKdsD 基因经 PCR 扩增重组后测序, 得到 1 条开放读码框(ORF)为 1 038 bp 的目的片段。该基因编码 346 个氨基酸(图 1)。将 PCR 产物与 pE-SUMO 表达载体连接, 产物转化到 DH5α, 挑取阳性菌落进行菌检测出, 成功构建原核表达载体。

```

1      ATGGGCTCGCTCCCGCTGCGCTCTCGTGGGAATGCGCGCGCAGCGGACGCTGGGGCGG
1      M G S L P V P S S S E C A P Q P T L G R
61     GTGGCGGCGTGGACCTGGCGCGCGCTGTTCGACGCGCAGCGCGCCACCTGGAGCACTTC
21     V A A S D L A P L F D A Q R R H L E H F
121    TTCGAGCGGCTCGACCTGTTCGAGCGCGCGCGCTTCGCGCAGCGCTGCTCGACCGCGCC
41     F E R L D L S Q A A A F A Q A L L D A P
181    GCGCGCGTGTCTTCACCGCGCTCGGCAAGTCGCGCATGTCGCGAGCAAGCTCGCGCAG
61     G A V F F T G V G K S G I V A S K L A Q
241    ACGCTTGCCTCGCTGGGCTTCGCGCGCGCGGCTTCCTCGCTCCGCTCGACCGCTCCAT
81     T L A S L G F A R A G F L A P V D A L H
301    GCGGACATTGGCTCGCTCTTCCCGCGGAGTCTCTGCTCTCTCAAGTCGCGCGCGC
101    G D I G S L F P G D V L V L L S K S G A
361    TCGGACGAGCTGCTCGCGCTCGCGCGCTGCGCGCGCGCAAGGTGCGCTACCTCATCTCC
121    S D E L L A L A P C A R A K G A Y L I S
421    CTCACCTCTGCGCGCTCGCGCGCGGACTGCGCTCTGCGCGCGCGCTGCGACCTCAAGTG
141    L T S A A S G A D C P L A A A C D L N V
481    CACCTGCGCGCTGCGCGGAGGTGTGCGCTTCGCGCTGCGCGCGCTGCGCTCCTCCACGG
161    H L P L Q G G E V C P F G L A P V T S T A
541    ATACAGATGGTGTTCGCGGACACCGTGTGCGAGCATCATGGAGGCGCGCGCTCACC
181    I Q M V F G D T V V A A I M E A R R L T
601    AGGGACAGTACGCGGCAACCCCGCGCGCAAGATCGGCAAGACCTCATCTTCAAG
201    R D Q Y A A N H P A G K I G K T L K
661    GTTAAGGATGTTATGAAGAAACAAATGAGCTTCTTTGTGCAAGGAGGTGATATGATA
221    V K D V M K K Q N E L P L C K E G D M I
721    ATGGATCACTCACTGAGCTAGTAAAGGTTCGCGGGGCTACTTGTGTTGATGAT
241    M D Q L T E L T S K G C G G L L V V D A S
781    GAGCTTCATTGATTGGGACCTTCACTGACGGTGACCTTCGCGGTACACTCAAGGCAAGC
261    E L H L I G T F T D G D L R R T L K A S
841    GGGCCAGCTATTTCAATCTCACAGTTGGAGAGATGTGCAACAGGAACCAAGAACAATC
281    G P A I F N L T V G E M C N R N P R T I G
901    ACTGCAGATGCAATGGCGGTGCGGCGCATGGAGAAGATGGAATCGCGCGCTTCACTGTG
301    T A D A M A V V A M E K M E S P P S P V
961    CAGTCTTGTGCTGTGTGCAAGGACAAAGTGTGTGTGGGATCATAACATTGCATGGA
321    Q F L P V V D D D N V V C G I I T L H G
1021   TTGGTCTCTGCTGATTATAA
341   L V S A G L *

```

图 1 毛竹 *PeKdsD* 基因开放读码框区及预测的氨基酸序列

Figure 1 ORF of *PeKdsD* gene and the corresponding amino acid sequence

2.2 PeKdsD 氨基酸序列比较与系统进化树分析

通过 blast 在线软件分析, 结果显示, *PeKdsD* 含有 2 个不同的结构域: SIS 结构域和 CBS 结构域, 大肠埃希菌序列中关键的催化残基 Lys59, His88 和 His193 在毛竹中是完全保守的。*PeKdsD* 编码的氨基酸序列与玉米 *Zea mays*, 高粱 *Sorghum bicolor* 和水稻 *Oryza sativa* 具有较高的一致性, 均为 91.00%, 与杨树 *Populus trichocarpa* 和拟南芥的一致性分别为 69.00%和 66.38%, 而与大肠埃希菌和脆弱拟杆菌

Bacteroides fragilis 的一致性分别只有 29.21%和 31.12%(图 2)。采用 MEGA6 软件构建不同物种 KdsD 氨基酸序列的系统进化树(图 3)，结果表明：毛竹与玉米位置较近，位于同一个分支上；与杨树、水稻位于同一大分支上，与拟南芥和脆弱拟杆菌分支较远。

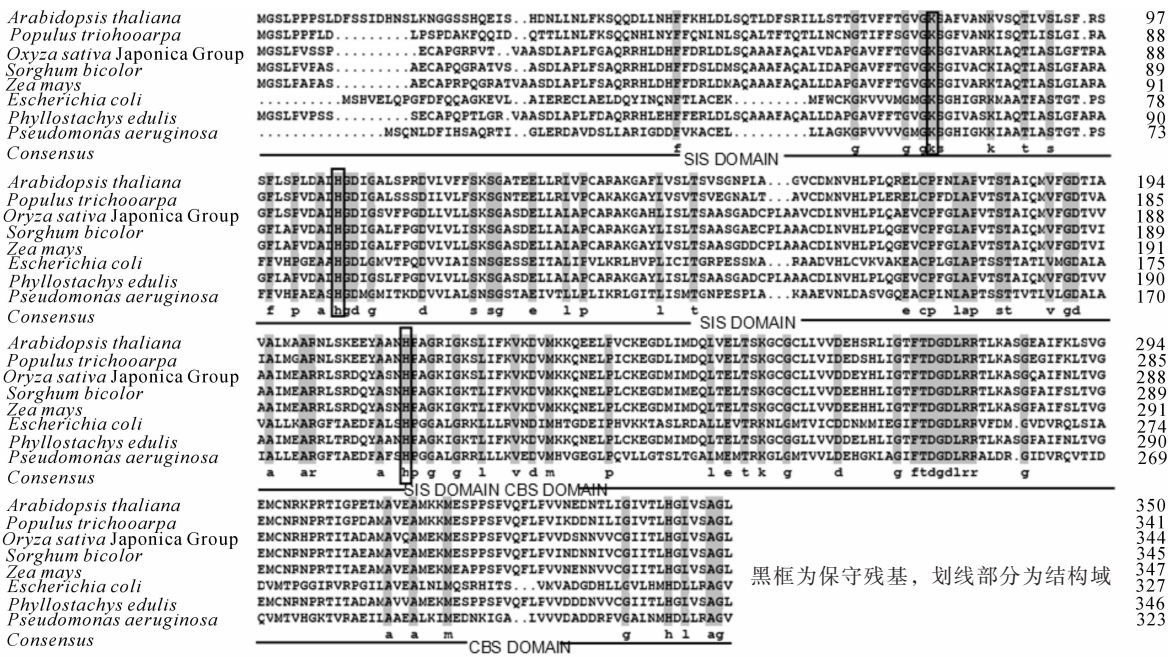


图 2 不同物种 KdsD 氨基酸多序列比对

Figure 2 Sequence multiple alignment of KdsD from different species

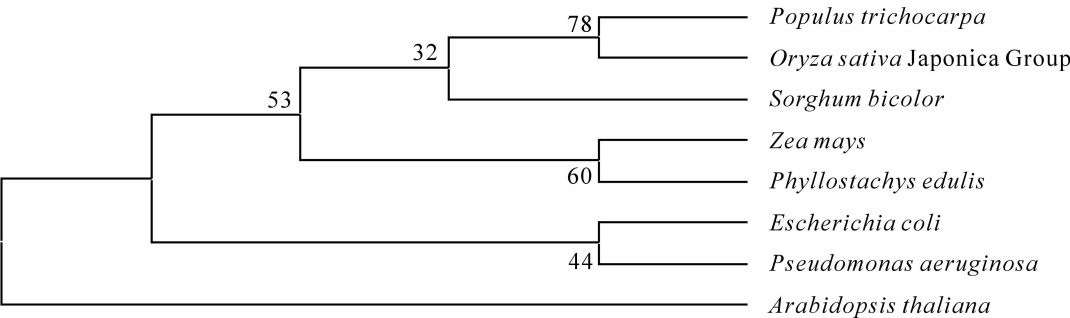


图 3 不同物种 KdsD 氨基酸序列构建的分子系统进化树

Figure 3 Molecular phylogenetic tree of KdsD from different species

2.3 *PeKdsD* 在不同组织中的表达分析

PeKdsD 不同组织 qRT-PCR 结果显示：*PeKdsD* 在毛竹的根、茎、叶中均有表达，但在表达量上存在较大的差异，在叶中的表达量远远大于根与茎(图 4)。

2.4 *PeKdsD* 重组蛋白的纯化及表达检测

将 *PeKdsD* 重组载体转化到表达菌株 *E. coli* (Ril)感受态细胞，使用 IPTG 诱导表达，SDS-PAGE 检测蛋白表达及可溶性情况(图 5A)。对比发现表达菌株 Ril 在 20 ℃培养温度下表达量相对较高，故在后续试验中确定重组蛋白诱导表达的最佳温度为 20 ℃。

2.5 *PeKdsD* 蛋白 Ni-NTA 纯化与分子筛层析

将收集的菌体超声破碎离心后，上清加入 Ni-NTA 柱，冰上结合后，采用咪唑梯度洗脱蛋白，SDS-PAGE 检测(图 5B)。结果显示：条带出现的位置与目的蛋白大小一致，目的蛋白被成功地纯化出来。将

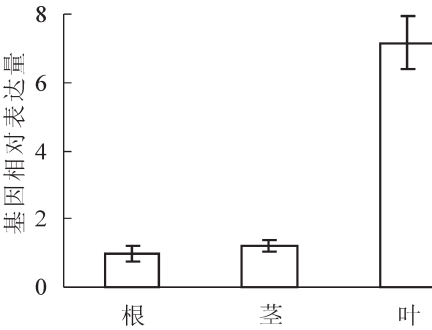
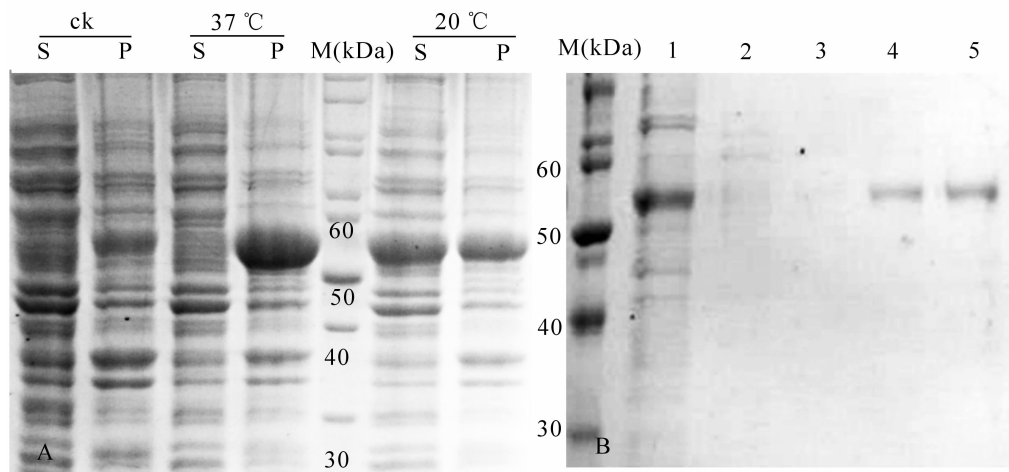


图 4 *PeKdsD* 在毛竹不同组织中的表达分析
Figure 4 Relative expression of *PeKdsD* in the root, shoot and leaf of *Phyllostachys edulis*



M 为蛋白标记物; ck 为未诱导的上清(S), 沉淀(P); 20 °C 诱导的上清(S), 沉淀(P); 37 °C 诱导的上清(S), 沉淀(P)。泳道 1,2,3,4,5 分别为 20/30/40/100/200 mmol·L⁻¹ 咪唑, 200 mmol·L⁻¹ 氯化钠, 30 mmol·L⁻¹ Tris-HCl pH 8.0 溶液洗脱后的 SDS-PAGE 电泳结果。

图 5 *PeKdsD* 在表达菌株 *E. coli* (Ril) 中的表达(A)和 *PeKdsD* 的 Ni-NTA 亲和层析纯化的 SDS-PAGE 检测(B)

Figure 5 Prokaryotic expression of *PeKdsD* in *Escherichia coli* (Ril) cell (A) and SDS-PAGE analysis from Ni-NTA affinity chromatography of *PeKdsD* (B)

目的蛋白进一步经 Superose™ 12 10/300 GL 分子筛层析后, 出现 2 个明显的吸收峰。对比小牛血清 BSA 出峰位置(二聚体 C 峰对应分子量为 132.86 kDa, 单聚体 D 峰对应分子量为 66.43 kDa), A 峰对应是 KdsD 多聚体, B 峰对应的是 KdsD 单体(图 6), 说明 KdsD 蛋白在溶液中存在多种聚体形式。2 步纯化 Ni-NTA 结合 SEC 可分离纯化得到不同状态的高纯度 KdsD 蛋白, 可满足今后酶学特性的研究和蛋白晶体生长的要求。

2.6 重组酶的酶学性质

酶活性测定结果表明: 纯化的 KdsD 酶最适温度为 37 °C, 在 35~45 °C 范围内酶活力较高, 45 °C 以上酶活力急剧下降, 而在 25 °C 时仍保持在 60% 以上(图 7A); 不同的 pH 值条件也会影响酶的活性, 最适作用 pH 值为 pH 8.5, 此时活性较高, 过酸或过碱环境都会对酶活性有较大的抑制作用(图 7B)。

3 讨论

自 2010 年大肠埃希菌的 KdsD 结构公布后, 又陆续有其他

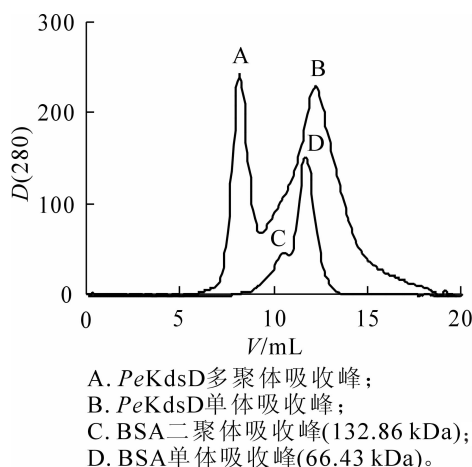


图 6 *PeKdsD* 分子筛层析图

Figure 6 Purification of *PeKdsD* by size exclusion chromatography

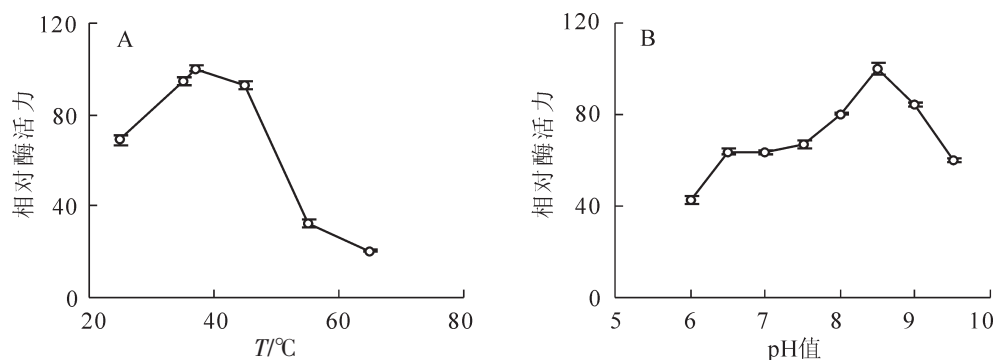


图 7 温度(A)和 pH 值(B)对酶活性的影响

Figure 7 Effect of temperature and pH value on activity of enzyme

微生物的 KdsD 结构报道。2014 年 CHIU 等^[14]解析出了脆弱拟杆菌 API(bfAPI)的晶体结构, 为四聚体。但是植物来源的 KdsD 相关研究甚少, 其结构和功能至今仍未被解析。本研究首次成功克隆到了毛竹 *KdsD* 基因, 该基因具有一个完整的开放阅读框(ORF), 编码 346 个氨基酸。生物信息学分析预测其含有 2 个不同的结构域: N-末端糖异构酶(SIS)结构域和胱硫醚- β -合酶(CBS)结构域。尽管大肠埃希菌序列中关键的催化残基 Lys59, His88 和 His193 在毛竹中是完全保守的, 但是毛竹 KdsD 蛋白序列与大肠埃希菌 KdsD 蛋白序列相似度不足 30%, 因此, 推测植物 KdsD 与微生物中的 KdsD 蛋白空间结构和功能可能存在一定的差异。为进一步了解植物 KdsD 和微生物 KdsD 结构上的差异, 还需进一步纯化获得高纯度的蛋白, 进行蛋白结晶, 通过 X 射线等方面的研究进一步分析验证结构与功能的关系。实时定量 PCR 在根、茎、叶中均检测到有表达, 尤其在叶中表达量比其他组织高约 5~8 倍, 表现出明显的组织特异性现象。Ni-NTA 纯化显示所得的目的蛋白大小与预测的蛋白分子量相一致, 成功纯化出了 *PeKdsD* 蛋白。进一步的 SEC 纯化结果表明: 毛竹 KdsD 在 30 mmol·L⁻¹ Tris-HCl pH 8.0, 200 mmol·L⁻¹ 氯化钠溶液条件, 以多聚体混合的形式存在, SEC 中 KdsD 的多聚体究竟是几聚体还需分析超速离心(AUC)等实验做进一步的分析验证。酶学性质初步测定结果表明: *PeKdsD* 的最适温度为 37 °C, 最适 pH 值为 pH 8.5。最适 pH 值与预测的 pH 值有所偏差, 故后期试验采用 pH 8.5 为宜。当然, 要揭示毛竹 KdsD 酶功能及催化作用机制, 还有待于后续晶体结构与功能等方面的进一步深入研究。

4 参考文献

- [1] 孙元琳, 汤坚. 果胶类多糖的研究进展[J]. 食品与机械, 2004, **20**(6): 60 – 63.
SUN Yuanlin, TANG Jian. Research progress in pectic polysaccharides [J]. *Food Mach*, 2004, **20**(6): 60 – 63.
- [2] YORK W S, DARVILL A G, MCNEIL M, *et al.* 3-deoxy-d-manno-2-octulosonic acid (KDO) is a component of rhamnogalacturonan II, a pectic polysaccharide in the primary cell walls of plants [J]. *Carbohydr Res*, 1985, **138**(1): 109 – 126.
- [3] SÉVENO M, SÉVENO-CARPENTIER E, VOXEUR A, *et al.* Characterization of a putative 3-deoxy-D-manno-2-octulosonic acid (Kdo) transferase gene from *Arabidopsis thaliana* [J]. *Glycobiology*, 2010, **20**(5): 617 – 628.
- [4] LI Yi. *Studies of 3-Deoxy-D-manno-Octulosonate 8-Phosphate Phosphatase: Mechanistic Insights and a Gene Fusion Example* [M]. Ann Arbor: ProQuest, 2009.
- [5] DELMAS F, SÉVENO M, NORTHEY J G B, *et al.* The synthesis of the rhamnogalacturonan (II) component 3-deoxy-D-manno-2-octulosonic acid (Kdo) is required for pollen tube growth and elongation [J]. *J Exper Bot*, 2008, **59**(10): 2639 – 2647.
- [6] SMYTH K M, MARCHANT A. Conservation of the 2-keto-3-deoxymanno-octulosonic acid (Kdo) biosynthesis pathway between plants and bacteria [J]. *Carbohydr Res*, 2013, **380**(2): 70 – 75.
- [7] RAETZ C R. Biochemistry of endotoxins [J]. *Ann Rev Biochem*, 1990, **59**(1): 129 – 170.
- [8] BECKER B, LOMMERSE J P M, MELKONIAN M, *et al.* The structure of an acidic trisaccharide component from a cell wall polysaccharide preparation of the green alga *Tetraselmis striata* Butcher [J]. *Carbohydr Res*, 1995, **267**(2): 313 – 321.
- [9] MEREDITH T C, WOODARD R W. Identification of GutQ from *Escherichia coli* as a D-arabinose 5-phosphate isomerase [J]. *J Bacteriol*, 2005, **187**(20): 6936 – 6942.
- [10] SPERANDEO P, POZZI C, DEHÒ G, *et al.* Non-essential KDO biosynthesis and new essential cell envelope biogenesis genes in the *Escherichia coli* yrbG-yhbG locus [J]. *Res Microbiol*, 2006, **157**(6): 547 – 558.
- [11] MEREDITH T C, WOODARD R W. *Escherichia coli* YrbH is a D-arabinose 5-phosphate isomerase [J]. *J Biol Chem*, 2003, **278**(35): 32771 – 32777.
- [12] SOMMARUGA S, de GIOIA L, TORTORA P, *et al.* Structure prediction and functional analysis of KdsD, an enzyme involved in lipopolysaccharide biosynthesis [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009, **388**(2): 222 – 227.
- [13] AIROLDI C, SOMMARUGA S, MERLO S, *et al.* Targeting bacterial membranes: identification of *Pseudomonas aeruginosa* D-Arabinose-5P isomerase and NMR characterisation of its substrate recognition and binding properties [J]. *Chem BioChem*, 2011, **12**(5): 719 – 727.
- [14] CHIU H J, GRANT J C, FARR C L, *et al.* Structural analysis of arabinose-5-phosphate isomerase from *Bacteroides*

- fragilis* and functional implications [J]. *Acta Crystallogr*, 2014, **70**(10): 2640 – 2651.
- [15] 吴凯朝, 黄诚梅, 李杨瑞, 等. Trizol 试剂法快速高效提取 3 种作物不同组织总 RNA[J]. 南方农业学报, 2012, **12**(12): 1934 – 1939.
- WU Kaichao, HUANG Chengmei, LI Yangrui, *et al.* Fast and effective total RNA extraction from different tissues in 3 crops through the Trizol reagent method [J]. *J Southern Agric*, 2012, **12**(12): 1934 – 1939.
- [16] DISCHE Z, BORENFREUND E. A new spectrophotometric method for the detection and determination of keto sugars and trioses [J]. *J Biol Chem*, 1951, **192**(2): 583 – 587.
- [17] MOSBERG J A, YEP A, MEREDITH T C, *et al.* A unique arabinose 5-phosphate isomerase found within a genomic island associated with the uropathogenicity of *Escherichia coli* CFT073 [J]. *J Bacteriol*, 2011, **193** (12): 2981 – 2988.

《浙江农林大学学报》被评为 2016 年度中国高校百佳科技期刊

由中国高校科技期刊研究会组织的“2016 年度中国高校杰出·百佳·优秀科技期刊”评选结果揭晓,《浙江农林大学学报》被评为中国高校百佳科技期刊。

此次评选活动旨在不断提高高校科技期刊的学术影响力和编辑出版质量,对高校科技期刊的质量及在科研活动和学术交流中所起的作用做出客观全面的评价。参评期刊在编校差错率低于万分之三的前提下入围。由数十位评审专家组成的评委会就期刊学术质量和编辑出版质量进行严格的综合审查,利用全文数据库、检索数据库和评价机构的有关评价成果客观打分,并结合期刊的学术影响力、行业影响力进行遴选,共评选出中国高校杰出科技期刊 20 种、中国高校百佳科技期刊 104 种、中国高校优秀科技期刊 254 种、中国高校编辑出版质量优秀科技期刊 69 种。在浙江省出版的科技期刊中有《浙江农林大学学报》《高校化学工程学报》《浙江大学学报(工学版)》《浙江大学学报(农业与生命科学版)》《浙江大学学报(医学版)》被评为百佳科技期刊。

2016 年,《浙江农林大学学报》还获得了浙江省“2014–2016 年度优秀科技期刊”一等奖。《浙江农林大学学报》始终坚持办刊宗旨,创新办刊思路,彰显刊物特色,编校质量、学术美誉度和社会影响力稳步提升,获得了学术界的充分肯定。

吴伟根