

定点突变技术研究苏云金杆菌 Cry1 类晶体蛋白 结构与功能的进展

张春艳, 胡胜标, 单世平, 夏立秋*

(湖南师范大学 生命科学学院 微生物分子生物学湖南省重点实验室, 中国湖南 长沙 410081)

摘要:近年来利用定点突变技术研究苏云金杆菌(*Bacillus thuringiensis*, Bt) 杀虫晶体蛋白(Insecticidal crystal proteins, ICP)作用机制已取得良好进展. 杀虫晶体蛋白不同结构域上氨基酸残基的突变将影响其稳定性, 与受体的结合, 不可逆的昆虫中肠膜插入及离子通道活性的强弱等. 突变研究表明, 结构域 I 参与不可逆结合及插入昆虫中肠膜过程;结构域 II 参与受体结合, 包括初始结合与不可逆结合;结构域 III 在杀虫特异性和维持三维结构的稳定性方面起重要作用, 同时, 可能参与离子通道的形成, 受体结合和插入昆虫中肠膜过程. 利用各种定点突变技术对各位点进行突变可以研究单一位点的功能, 到目前为止, 已有很多关于这方面的研究, 并且筛选到了毒力提高的工程菌株.

关键词: 苏云金杆菌;杀虫晶体蛋白;定点突变

中图分类号: Q933

文献标识码: A

文章编号: 1007-7847(2007)02-0095-05

Progress on the Structure and Function of *Bacillus thuringiensis* Cry1 Insecticidal Proteins by Site-directed Mutagenesis

ZHANG Chun-yan, HU Sheng-biao, SHAN Shi-ping, XIA Li-qiu*

(Molecular Microbiology Key Lab of Hunan Province, College of Life Sciences, Hunan Normal University, Changsha 410081, Hunan, China)

Abstract: Using site-directed mutagenesis to investigate the structure and function of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins have made great progresses. Mutations on different domains can have effects on toxin stability, binding to receptors, irreversible insertion into membrane, the ion channel activity and so on. The research of mutation proved that domain I is involved in irreversible binding and insertion into membrane; domain II is involved in binding to receptors, concluding initial binding and irreversible binding; domain III is important in maintaining the stability of structure, and it is also involved in ion channel formation, binding to receptors and insertion into membrane. Some sites were mutated by different site-directed mutagenesis, to explore the function of single sites. Many researches in this field have been made and some combinant strains with higher toxicity were selected out.

Key words: *Bacillus thuringiensis*; insecticidal crystal proteins; site-directed mutagenesis

(Life Science Research, 2007, 11 (2) : 095-099)

收稿日期: 2007-04-08; 修回日期: 2007-05-31

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30670052); 国家“863计划”项目(2006AA02Z187, 2006AA10A212); 湖南省自然科学基金重点项目(06jj2009)

作者简介: 张春艳(1981-), 女, 湖南浏阳人, 湖南师范大学微生物基因工程专业硕士研究生 E-mail: zhangchy95@yahoo.com.cn; 夏立秋(1955-), 男, 湖南安乡人, 湖南师范大学教授, 博士生导师, 通讯作者, 主要从事微生物分子生物学和酶工程方面的研究, E-mail: xialq@hnu.edu.cn

苏云金芽孢杆菌 (*Bacillus thuringiensis*, Bt) 是一种革兰氏阳性菌, Bt 制剂被广泛应用于害虫防治, Bt 在形成芽孢期间, 能形成伴孢晶体. 伴孢晶体在杀虫过程中起主要作用, 它被昆虫吞食后, 在中肠液碱性环境下被溶解, 原毒素被肠液中蛋白酶降解成活性肽段, 然后与中肠上皮细胞刷状缘膜 (brush border membrane vesicles, BBMV) 受体结合, 再插入中肠上皮细胞, 形成离子通道, 使渗透压失衡, 导致昆虫死亡^[1-3]. 在杀虫过程中, 原毒素分子各结构域所起作用不同, 为了探讨其作用机理, 人们尝试利用各种技术如二步 PCR 法、寡核苷酸引物法及结构域的杂交等方法突变预期位点以研究其功能, 目前应用最广泛的是定点突变法. 定点突变 (site-directed mutagenesis) 技术可以在已知 DNA 序列中任意取代、插入或缺失一定长度的核苷酸片段. 该方法比使用化学因素、自然因素导致突变的方法具有突变率高、简单易行、重复性好的特点; 除用于改变核苷酸序列获得突变基因、研究基因的结构与功能的关系之外, 还能够通过改变特定的氨基酸获得突变蛋白质, 研究蛋白质的结构与功能, 从微观水平上阐明正常状态下基因的调控机理、疾病的病因和机理.

1 突变对 Cry1 类毒素的结构和功能的确定

1.1 结构域 的突变

结构域 包括 N 端 200 多个氨基酸, 大多具疏水特性, 由 8 个反平行的螺旋扭成一束, 5 位于中央, 被其它螺旋所包围, 结构域 在中肠膜插入和孔道形成中发挥作用. 毒素在细胞膜上形成孔道是先插入由疏水性的 5 和两亲性的 4 螺旋组成的发夹. Vincent Vachon 等人曾报道 Cry1Aa 3 上突变 E101C、E101Q、E101K、E116K、E116Q、E118C 离子通道形成能力都大大降低, 说明结构域 上突变明显影响了离子通道的形成^[4]. 在结构域 上 Cry1Aa R28V、R87A, Cry1Ac R93 和 Cry1Aa R99 对毒力影响较大, 且 R99 突变为其他氨基酸后失去了离子通道形成能力. Cry1Aa 4 上带电氨基酸残基突变后, pH 7.5 时, 离子通道形成能力大大降低, T142D 和 T143D 活性几乎完全丧失, R127E、R127N、R131H 对蔗糖、棉子糖通透性大, 而 R131D 和 R131H 形成的孔道直径比野生型 Cry1Aa 要小^[5]. Nunez Valdez 等人电压

钳实验表明: A (不带电荷) 92E (带负电荷) 和 Y (不带电荷) 153D (带负电荷) 离子通道形成能力降低, 解离结合实验中这两个突变子与 BBMV 的不可逆结合明显降低, 毒力也明显降低, 而 Y (不带电荷) 153A (不带电荷) 和 Y (不带电荷) 153R (带正电荷) 没有影响可逆结合和毒力. A (不带电荷) 92D (带负电荷) 对烟草天蛾 (*Manduca sexta*) 毒力大大降低, 可能这个位点的突变能影响毒素从毒素受体复合物中解离的能力, 92、153 位只有引入带负电荷的氨基酸才会导致毒力的降低, 所以带正电荷或者不带电荷的氨基酸是与带负电荷的中肠膜结合过程中必不可少的^[6]. 5 和 7 是高度保守的, Nunez Valdez 等人还实验证明其在离子通道形成中起关键作用. 5 上突变 H168R 毒力稍有提高, 但 K⁺通透性比野生型降低了 24 倍, R173L、R173N 则降低了 2~3 倍, 毒力也降低^[7]. 7 为富含螺旋结构的结构域 上最后一个螺旋, 它连接结构域 和结构域 . 利用白喉毒素 B 片段替换 Cry1Ac 7 上疏水片段, 发现与野生型相比, 其对棉铃虫 (*H. armigera*) 一龄幼虫毒力提高 8 倍之多, LC₅₀ 值为 2.5 ng/cm², 而野生型 Cry1Ac 则为 20 ng/cm², 对棉铃虫三龄幼虫 LC₅₀ 值为 3.2 ng/cm², 而野生型为 27.3 ng/cm². 电压钳分析表明, 与野生型相比, 在 pH 9.0 时, 其离子通道形成水平分别为 40, 25 和 11 ps, 比野生型 Cry1Ac 强, 野生型仅为 16, 11 和 8 ps, 并且 7 被替换后所形成的离子通道孔径比野生型要大, 说明疏水片段被替换后产生了正效应^[8]. 7 上其它氨基酸突变, 如 Cry1Ab 上 D225A、W226A、Y229A、N230A、R233A、R234A、D242A 和 F247A 不能产生原毒素, 并对胰蛋白酶处理敏感, 而另外的突变 R224A、R228A、E235A 对胰蛋白酶处理有抗性, 并对烟草天蛾的毒力分别降低了 8、30、12 倍, R224A、R228A 则对短环电流抑制减弱^[9].

1.2 结构域 的突变

结构域 由 200 多位氨基酸残基组成, 是一个高度可变区, 具有 3 个反平行的 片层结构, 并形成 3 个暴露在外的 loop 结构, 突变其上氨基酸残基可以确定 loop 是否与受体结合有关. Mi Kyong Lee 等人曾报道 Cry1Ac Domain 8 loop 上 275~293 位的 Arg 被 Ala 替换后, R281A 和 R289A 对烟草天蛾和舞毒蛾 (*Lymantria dispar*) 毒力都大大降低, 与 BBMV 的结合亲和力也降低^[10]. 还有研究表明 R368、R369 很大程度上影响毒力

的发挥, 与 BBMV 结合及对烟草天蛾和舞毒蛾 APN 的结合, 双突变子 R368/R369 表明带正电荷的氨基酸在与 BBMV 的初始识别中起重要作用^[11]. Florence Coux 等人实验证明: Cry1Aa 的 4 个盐桥对毒蛋白的结构和功能是很重要的, R265A 和 D242A/R265A 对胰蛋白酶处理敏感, R233A、R234A、D242A pH 10.5 和 D222A pH 7.5 时离子通道形成能力比野生型强, 说明盐桥的去除有利于中肠膜插入, 却使毒力下降, 离子通道活性的增强使毒素对胰蛋白酶处理更敏感, 尤其 Asp242~Arg265 盐桥, 对毒蛋白稳定性作用显著, 说明 Domain 在离子通道形成, 中肠膜插入过程中也起到一定作用^[12]. Francis Rajamohan 等人突变 Cry1Ab Domain 370~375 位残基 FNIGI), 结果 N372A 和 N372G 对吉普赛蛾 (Gypsy Moth) 的 LC_{50} 值分别为 34 ng/cm² 和 35 ng/cm², 比野生型毒力提高 8 倍之多, 而与 BBMV 的结合亲和力比野生型分别提高了 4 倍, 然而去除 N372 将会大大降低其毒力和亲和力, 说明 N372 在受体结合中起作用. 三突变子 N372A/A282G/L283S LC_{50} 值为 8.0 ng/cm², 比野生型毒力提高了 36 倍, 其毒力的提高与高结合亲和力及结合时浓度有关, 解离结合实验也表明三突变子毒素结合力比野生型和 N372 高出 4 倍之多. 除 I373A 外, 其它突变子都对中肠液和胰蛋白酶处理稳定. D2 (删除 370 和 375)、F371A 和 G374A 毒力丧失很大, N372A 和 I375A 则只降低 2 倍. 同源、异源竞争结合实验表明, 不可逆结合中具有毒力的 N372A、I375A 只有 20%~25% 与 BBMV 解离, 而毒力降低的 D2、F371A 和 G374A 则 50%~55% 与 BBMV 解离. 电压钳实验也进一步证明杀虫特异性直接与 BBMV 的不可逆反应有关. F371A 不影响初始结合, 但是不可逆结合减少, 说明 Cry1Ab Domain 上突变不会影响毒蛋白的整体结合, 但会影响不可逆结合^[13]. Cristopher Padilla 等人实验证明: 117、219、226 和 455 位高疏水性残基被 Cys 替换后影响了晶体的形成, 与被 Phe 替换相比毒力更低, 此外 219、316、455 位氨基酸残基突变影响了与 BBMV 的结合^[14]. Munah Abdul Rauf 等人将 Cry1C Domain loop2, loop3 上残基突变, 发现杀虫特异性和初始结合都受到影响, Q374N、P375A、W376Y、P377A 对海灰翅夜蛾 (*Slittoralis*) 毒力变化不大, 而对埃及伊蚊 (*A.aegypti*) 毒力则大大降低. 另外这些突变子与受体结合力的差别

很大, 对于不同靶标昆虫的毒力也不同^[15]. 以上实验结果表明 Domain 主要影响毒蛋白与受体的结合, 也在蛋白酶水解, 中肠膜插入和杀虫特异性方面起到一定作用. 一般来说毒力的改变与受体结合存在一定关系, 但也有特例. 以上某些位点的突变可以证明这点, 毒力的改变并不一定与受体结合成正相关. 相对保守的盐桥的突变实验结果也表明 Domain 在维持蛋白结构的稳定性和中肠膜插入方面起到重要作用.

1.3 结构域的突变

结构域具有两个反平行的片层的三明治结构, 主要在维持毒蛋白结构的稳定性上起作用, 同时还与杀虫特异性有关, 在与受体的结合、离子通道的形成、中肠膜插入中也起一定作用. J.L.Schwartz 等用 Ala 替换 Cry1Ac Domain 上 503~525 位的氨基酸残基检测其在毒力和受体结合方面的作用. 发现 509QNR511、509Q、511R、513Y 突变为 Ala 后毒力及与 BBMV 的结合亲和力降低, 所有突变子在胰蛋白酶或中肠液处理时都能产生稳定的毒素片段, 结果表明 509Q、511Q、513Y 在与受体的初始结合中起作用^[16]. Luke Masson 等人将 Cry1Ac Domain 上一个高度保守的 Arg 区域突变, 525、527、529、531 位 Arg 突变为 Gly 或 Asp 后毒力都下降, 在磷脂双层结构实验中, 突变子与野生型呈现不同曲线, 说明这些保守序列对维持结构的完整性和离子通道形成中发挥作用^[17]. 突变 Cry1Aa Domain 上胰蛋白酶和胰凝乳蛋白酶作用位点后发现 R543S、R566G、F570S、F576S 毒力稍有提高, LD_{50} 值分别为 3.8、3.2、3.9、1.8 ng, 与野生型 7.9 ng 相比, F576S 毒力提高了 4 倍, R543S、R566G、F570S 也都分别提高了 2 倍, 但各突变子对胰蛋白酶处理的敏感性与野生型相似, 加入 Ser 蛋白酶抑制剂后, 原毒素还能被中肠液继续降解, 说明中肠液中其他蛋白酶被激活而产生了正效应^[18]. Camilo 等人证实, 杂交体 CryAAC 1Ac/1Ac/1Ca 对棉铃虫 (*M.brassicae*) 和大菜粉蝶 (*Pieris brassicae*) 一龄幼虫毒力与野生型相比有很大提高, 但是 R423 位点对蛋白酶处理很敏感, 而杂交体 CryAAC R423S 毒力大大提高, 在中肠液稳定性实验和晶体溶解性实验中, 由 R423S 引起的 CryAAC loop 7/8 流动性增强, 而使毒力得到提高, 说明蛋白酶作用位点的改变有利于毒力的提高^[19]. Cry1Aa Domain block4 521~527 序列为

RYRVRIR, 是一个富含 Arg 的高度保守的区域, 形成一个带正电的高度疏水表面, 它通过侧链和 R525 形成的氢键和与 254 位的羰基氧原子而与 Domain 发生分子内相互作用, 从而起到连接 Domain 和 Domain 的作用. 在这一区域的突变子中, R521H 离子通道形成能力大大降低, 其它突变子 R521K、R521Q、R527K 离子通道形成能力也都稍有降低. 在磷脂双层结构实验中, R521H、R527K 的中肠膜插入能力降低, 有趣的是, 最保守的 R521K 和最不保守的 R521E 对离子通道形成能力的影响相似, 而 R521H 替换则无影响, 说明 Arg 区域突变只是 Cry1Aa 通道形成能力的一个小的决定因子, 其它因素如残基大小、侧链位置、分子内或分子间相互作用也会产生一系列影响^[20]. 这些结果表明 Domain 和 Domain 上 Arg 的相互作用很大, 并且其作用也不仅仅依赖于这些突变的残基.

2 结语

根据以上实验结果, 我们可以得知杀虫晶体蛋白作用机制:

1) 毒素是通过先插入由疏水性的 5 和两亲性的 4 螺旋组成的发夹插入昆虫中肠膜, 形成孔道, 位于 Domain block4 上残基与 17 上残基形成的氢键和羰基氧原子, 连接了 Domain 和 Domain, 从而在离子通道形成中发挥作用.

2) Domain 参与受体结合, 包括初始结合和不可逆结合, 并且在一定程度上影响杀虫特异性, 其上的保守区域对维持杀虫晶体蛋白三维结构的稳定性具有一定作用.

3) Domain 上 17 在离子通道和插入中肠膜的过程中起作用, 由此推断 Domain 参与了离子通道形成和插入中肠膜过程.

随着利用定点突变技术对苏云金杆菌研究的深入, 对改变其杀虫谱窄, 对昆虫致死时间长, 诱导昆虫产生抗性的问题将有可能得到解决, 很有希望研究开发出高效、广谱、速杀、抗抗性的 Bt 杀虫剂. 本研究室根据突变胰蛋白酶和胰凝乳蛋白酶作用位点, 可以激活中肠液中其他蛋白酶的作用, 产生正效应, 而选取突变位点, 目前已筛选到高毒力的突变菌株, 杀虫效果比野生型菌株好. 随着对杀虫晶体蛋白结构和作用机理的不断深入研究, 通过各种途径改造杀虫晶体蛋白分子结构, 构建高效、广谱的工程菌株是完全有可能的.

参考文献 (References):

- [1] 夏立秋, 孙运军, 莫湘涛. 苏云金杆菌杀虫晶体蛋白毒性片段的结构域在毒杀昆虫中的作用[J]. 生物工程进展 XIA Li-qiu, SUN Yun-jun, MO Xiang-tao. The function for the toxic fragment of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins to cause death of larve[J]. *Progress in Biotechnology*, 2002, 22 (1): 73-76.
- [2] 邹先琼, 夏立秋, 孙运军. 苏云金杆菌 4.0718 菌株杀虫晶体性质的研究[J]. 生命科学 ZOU Xian-qiong, XIA Li-qiu, SUN Yun-jun. Studies on the properties of insecticidal crystals from *Bacillus thuringiensis* strain 4.0718[J]. *Life Science Research*, 2001, 3 (3): 242-245.
- [3] JEFFREY W S. The role of a conserved histidine-tyrosine interhelical interaction in the ion channel domain of δ -endotoxins from *Bacillus thuringiensis*[J]. *Proteins*, 2006, 63: 385-390.
- [4] VINCINET V, GABRIELE P, FLORENCE C, et al. Role of helix 3 in pore formation by the *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxin Cry1Aa[J]. *Biochemistry*, 2002, 41: 6178-6184.
- [5] VINCENT V, GABRIELLE P, CECIL E, et al. Helix 4 mutants of the *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxin Cry1Aa display altered pore-forming abilities[J]. *Applied Environment Microbiology*, 2004, 70: 6123-6130.
- [6] NUNEZ V M, SANCHEZ J, LINA L, et al. Structural and functional studies of alpha-helix 5 region from *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab delta-endotoxin[J]. *Applied Environment Microbiology*, 2005, 56: 5485-5490.
- [7] NUNEZ V M, SANCHEZ J, LINAL G L, et al. Structural and functional studies of alpha-helix 5 region from *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab delta-endotoxin[J]. *Biochemistry Biophysics Acta*, 2001, 1546: 122-131.
- [8] ARTI C, PARAMITA G, AJIN D M, et al. Amino acid substitution in δ -Helix 7 of Cry1Ac δ -endotoxin of *Bacillus thuringiensis* leads to enhanced toxicity to *Helicoverpa armigera* Hubner [J]. *Federation of European Microbiological Societies Microbiology Letters*, 1999, 458: 175-179.
- [9] EOLWIN P A, OSCAR A, MI K L, et al. Role of δ -Helix seven of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab δ -endotoxin in membrane insertion, structural stability, and ion channel activity[J]. *Biochemistry*, 2001, 40: 2540-2547.
- [10] MI K L, JEREMY L J, TENKINS T H Y, et al. Mutations at the arginine residues in δ loop of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin Cry1Ac affect toxicity and binding to *Manduca sexta* and *Lymantria dispar* aminopeptidase N[J]. *The Federation of European Biochemical Societies Letters*, 2001, 497: 108-112.
- [11] MI K L, FRANCIS R, JENKINS J L, et al. Role of two arginine residues in domain δ , loop2 of Cry1Ab and Cry1Ac *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin in toxicity and binding to *Manduca sexta* and *Lymantria dispar* aminopeptidase N[J]. *Molecular Microbiology*, 2000, 38: 289-298.
- [12] FLORENCE C, VINCENT V, CECILE R, et al. Role of interdomain salt bridges in the pore-forming ability of the *Bacillus thuringiensis* toxins Cry1Aa and Cry1Ac[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2001, 276: 35546-35551.
- [13] FRANCIS R, OSCAR A, JEFFREY A C, et al. Protein engineering of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin: Mutations at domain

- of Cry1Ab enhance receptor affinity and toxicity toward gypsy moth larvae [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 1996, 93: 14338-14343.
- [14] CRISTOPHER P, LILIANA P L, de la RIVA G, et al. Role of tryptophan residues in toxicity of Cry1Ab toxin from *Bacillus thuringiensis*[J]. Applied Environment Microbiology, 2006, 72: 901-907.
- [15] MUNAH A R, DAVID J E. Mutations of Loop2 and Loop3 residues in domain of *Bacillus thuringiensis* Cry1C₂ endotoxins affect insecticidal specificity and initial binding to *Spodoptera littoralis* and *Aedes aegypti* midgut membranes[J]. Current Microbiology, 1999, 39: 94-98.
- [16] MI K L, TAEK H Y, GOULD F L, et al. Identification of residues in domain of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin that affect binding and toxicity[J]. Applied Environment Microbiology, 1999, 65: 4513-4520.
- [17] LUKE M, BRUCE E, TABASHNIK A M, et al. Mutagenic analysis of a conserved region of domain in the Cry1Ac toxin of *Bacillus thuringiensis*[J]. Applied Environment Microbiology, 2002, 68: 194-200.
- [18] ALIOU B, FRANKEN K, BROUSSEAU R, et al. The *Bacillus thuringiensis* Cry1Aa toxin: effects of trypsin and chymotrypsin site mutations on toxicity and stability[J]. Journal of Invertebrate Pathology, 2004, 85: 120-127.
- [19] CAMILO A P, PAUL D, DAVID J E, et al. The mutation R423S in the *Bacillus thuringiensis* hybrid toxin CryAAC slightly increases toxicity for *Mamestra brassicae* L[J]. Journal of Invertebrate Pathology, 2007, 52: 808-815.
- [20] SCHWARTZ J L, POTVIN L, CHEN X J, et al. Single-site mutations in the conserved alternating-arginine region affect ionic channels formed by Cry1Aa, a *Bacillus thuringiensis* toxin[J]. Applied Environment Microbiology, 1997, 63: 3978-3984.

《生命科学研究》2007 年征稿启事

《生命科学研究》是由中华人民共和国新闻出版署、科技部批准创办的, 国内外公开发行的反映生命科学领域中最新研究成果的综合性学术期刊。本刊是被中国科学引文数据库(CSCD)核心库及中国科技论文统计源期刊数据库全文收录的中国科技核心期刊, 国内公开刊号为 CN43-1266/Q, 国际标准刊号为 ISSN1007-7847, CODEN: SKYAFL, 国内邮发代号: 42-172, 国外发行代号: DK43008。本刊主要刊登国内外生命科学领域中的具有创造性的学术论文及少量反映国内外重大进展或热点问题的快讯或综述性文章, 覆盖的主要学科是: 生物化学与分子生物学、发育生物学、细胞生物学、生物技术、遗传学、植物学、动物学、微生物学、解剖学、生理学、基因工程、农业工程、病理学、毒理学、药理学、免疫学、基础医学等等。开设“研究进展与综述”、“研究论文”等栏目。本刊诚邀反映国内外生命科学相关领域最新研究成果的中英文论文, 国家自然科学基金等国家级科研课题资助论文将优先发表。

投稿要求:

1) 文稿内容具有创新性、科学性或实用性。要求论点明确, 条理清晰, 设计合理, 结果可靠, 文字精炼, 用词规范, 图表清晰。文稿请用电脑单面打印(自留录入文件), A4 版型纸 5 号字体通栏排版, 用字规范, 计量单位符合国家标准。

2) 请以 word 格式将稿件通过 E-mail 附件的方式发送至本刊编辑部信箱或寄送打印稿。在来稿的首页, 请写明以下内容: 文章标题、作者单位、作者个人信息(内容包括: 姓名(出生年)、性别、民族、籍贯、职称、学位及研究方向)、作者详细通讯地址、邮编、手机号码、办公电话、传真号码及 E-mail。

3) 单位介绍信, 加盖单位公章, 注明无一稿两投, 所有作者对署名的顺序无异议, 请邮寄至本刊编辑部。

4) 投稿时须向本刊缴纳审稿费 50 元(请通过邮局汇款, 并在留言栏注明第一作者姓名)。

来稿请寄:

长沙市湖南师范大学《生命科学研究》编辑部, 邮编: 410081, 投稿 E-mail: life@hunnu.edu.cn; smky6688@yahoo.com.cn; 咨询 E-mail: sky@hunnu.edu.cn; 网址: <http://smky.chinajournal.net.cn>; 咨询电话: 0731-8872616; 传真: 0731-8872616。

本刊承诺“特快通道”修回稿件 3 个月内出版, 一般稿件修回后 6 个月内出版。

热忱欢迎国内外各大专院校、科研院所生命科学相关领域的研究人员投稿!