研究论文

毕赤酵母分泌表达华根霉脂肪酶(r27RCLC)的糖基化鉴定

杨 敏，喻晓蔚*，吴厚军，徐 岩
(江南大学 工业生物技术教育部重点实验室，江苏 无锡 214122)

摘要：研究了毕赤酵母GS115中能够高效分泌表达的华根霉脂肪酶(r27RCLC)的糖基化情况。运用糖基化抑制剂衣霉素处理表达目的蛋白的毕赤酵母细胞，通过SDS-PAGE比较分析经衣霉素处理后的脂肪酶r27RCLC分泌表达量的变化，结果显示酶的分泌表达受到很大的抑制，说明脂肪酶r27RCLC在表达时候很可能发生了糖基化，且糖基化对其有重要影响。通过生物化学方法，利用内切糖苷酶PNGaseF和EndoHf酶切处理脂肪酶r27RCLC，SDS-PAGE和Western Blot，结果显示r27RCLC未发生糖基化。将样品r27RCLC通过胰蛋白酶酶解等步骤处理，进行MADLI-TOF-MS质谱分析，结果发现MADLI-TOF-MS鉴定结果与内切糖苷酶酶切处理结果一致，进一步证明毕赤酵母分泌表达的华根霉脂肪酶r27RCLC未发生糖基化。

关键词：毕赤酵母；华根霉脂肪酶；糖基化；MADLI-TOF-MS
中图分类号：Q 814　**文献标志码**：A　**文章编号**：1673—1689(2014)10—1018—07

Glycosylation Identification of *Rhizopus chinensis* Lipase (r27RCLC) Expressed in *Pichia pastoris*

YANG Min, *YU Xiaowei**, *WU Houjun*, *XU Yan*
(Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: In this study, we identified the glycosylation situation of *Rhizopus chinensis* lipase CCTCC M201021 expressed in *P. pastoris*. At first, the yeast cells expressing lipase r27RCLC were treated with inhibitor tunicamycin and SDS-PAGE was conducted to analyze the effect of tunicamycin on the expression level of lipase. Results showed that lipase r27RCLC maybe occur glycosylation when formed in yeast cells. Then, lipase r27RCLC was digested with endoglycosidase PNGaseF and EndoHf. SDS-PAGE and Western Blot analysis showed that r27RCLC is not a glycoprotein. Finally, the sample of r27RCLC was digested by trypsin and detected by MADLI-TOF mass spectrometry. The results of MADLI-TOF-MS identification were consistent with the results of endoglycosidase treatement, which further proved that lipase r27RCLC expressed in *P. pastoris* did not occur glycosyaltion.

收稿日期：2014-03-13
基金项目：国家863计划项目(2012AA022207)；国家973计划项目(2011CB710800)；国家自然科学基金项目(20802027)。
* **通信作者**：喻晓蔚(1978—)，女，上海人，工学博士，教授，硕士研究生导师，主要从事脂肪酶研究。E-mail：bioyuxw@aliyun.com

Keywords: *Pichia pastoris*, *Rhizopus chinensis* lipase, MADLI-TOF-MS, glycosylation

脂肪酶(EC 3.1.1.3)又称甘油三酯水解酶,是常用的工业用酶之一,参与的催化反应具有生产的高效性,高选择性和对环境无污染等优点,在轻工、医药、食品、环境、能源等行业有广泛的用途[1-2]。脂肪酶广泛地存在于动物组织、植物种子和微生物体中,其中微生物脂肪酶因种类多,酶学性质优异,适合工业化生产等优势,一直是工业脂肪酶最重要的来源,在理论研究方面也具有重要的意义[3]。根霉属微生物是脂肪酶的重要生产菌,该属脂肪酶之间都有约 60%~90%的相似性,从一级结构上来说,它们大部分都由 3 部分组成,即信号肽序列、前序列及成熟脂肪酶基因区域[4]。

巴斯德毕赤酵母具有高效表达外源蛋白的表达系统,其遗传稳定,表达水平高,蛋白可翻译后加工,产物可高密度发酵等,应用十分广泛,已有数百种外源蛋白在该系统中获实现表达[5]。毕赤酵母表达体系具有许多真核表达系统所特有的特点,如蛋白酶加工、折叠、二硫键形成和糖基化作用等[6],其中糖基化是非常重要的蛋白质翻译后修饰之一,而毕赤酵母表达蛋白发生糖基化是一种常见现象[7]。研究发现:许多蛋白质功能的实现多与糖基化修饰密切相关,蛋白质糖链的各种作用已经被阐述[8-9],如能够稳定蛋白质的成熟构象, 对蛋白质的折叠、运输、定位也起着重要作用,其中 N-糖基化对于许多蛋白质的正确折叠分泌都是必需的,人们对其研究也相对深入[7]。另外,毕赤酵母表达系统具有广泛的表达载体,如 pPIC9K,pPICZα,pGAPZ 等,并且具有多种启动子,如 AOX,GAP,FLD 等[10]。近年来,毕赤酵母表达蛋白糖基化研究引起了越来越多学者的兴趣。

作者在前期研究中,从一株酿造浓香型大曲酒曲中筛选得到的华根霉(*Rhizopus chinensis* CCTCC M201021)中克隆得到其脂肪酶基因 *proRCL*(GenBank 登录号 No. EF405962),在毕赤酵母中实现了克隆与高效表达,并对其发酵条件控制和酶学特性进行了比较系统的研究, 随后构建含有 His 标签的重组华根霉脂肪酶,创建高通量华根霉脂肪酶筛选方法[11],以及进一步采取定向进化改造等手段提高了华根霉脂肪酶酶活力[12]。但对于华根霉脂肪酶(RCLC)能够在毕赤酵母中高效表达的原因还在探究中,作者从 *RCL* 基因序列分析中发现其存在 4 个潜在的糖基化位点,其中 3 个潜在位点位于其前序列上,1 个位于成熟肽序列(图 1)。推测糖基化对 RCLC 在毕赤酵母中的高效分泌表达有重要作用。为此,首先对脂肪酶 RCLC 是否发生糖基化进行鉴定,随后进一步分析糖基化对酶的作用。但是由于毕赤酵母自身分泌一种 Kex2 酶[13],RCLC 在该体系中表达时前导肽部分被切割掉一部分,包括 3 个潜在糖基化位点,因此分泌表达的蛋白只保留了前导肽的 27 个氨基酸及完整的成熟肽区域, 剩下唯一的糖基化位点(N-263),在 3'末端含有 6 个 His 标签,命名为 r27RCLC[11]。

目前, 随着质谱技术的快速发展,ESI-MS,MALDI-TOF 等质谱方法被广泛用于糖基化分析[14-15]。作者主要采用 MADLI-TOF 质谱方法, 并结合生物化学方法来鉴定毕赤酵母表达的华根霉脂肪酶 r27RCLC 是否发生糖基化。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株与质粒 华根霉 *Rhizopus chinensis* CCTCCM201021: 重组质粒 pPIC9K-*proRCLC*,带 His 标签的重组菌 GS115/pPIC9K-*proRCLC*:均由作者所在实验室保存。

1.1.2 酶与试剂 Endo Hf、PNGaseF 酶:NEB 公司产品;衣霉素:上海生工产品;Anti-His Antibody、辣根过氧化物酶标记羊抗小鼠 IgG,Pro-Light HRP 化学反光检测试剂:Tiangen 公司产品; 普通蛋白 Marker:Taraka 产品;Western-Bot Marker、硝酸纤维素膜(PVDF,BIO-RAD)。

1.1.3 培养基 酵母培养基 BMGY,BMMY,按"Invitrogen 公司操作手册"方法配制。

1.1.4 主要仪器设备 高速冷冻离心机 3K15:美国 Sigma-aldrich 公司产品;UV-3102 PC 型分光光度仪:尤尼柯仪器有限公司产品;pH 计:梅特勒-托利多仪器有限公司产品;电泳仪,凝胶成像仪,转膜仪:Bio-Rad 公司产品;MADLI-TOF-MS 质谱分析仪仪:Bmker 公司产品。

1.2 方法

1.2.1 华根霉脂肪酶(r27RCLC)的表达与纯化 将菌株 GS115/pPIC9k-*proRCLC* 接种至 25 mL BMGY 培养基中,30 ℃振荡培养 16~20 h 至 $A_{600\ nm}$=6.0,无菌条件下操作,6 000 r/min 离心 10 min,收集菌体并重悬于 100 mL BMMY 培养基中,每隔 24 h 添加体积分数 1% 的甲醇诱导表达,培养 3.5 d 后,发酵液 4 ℃,8 000 r/min,离心 30 min 取上清作为粗酶液。粗酶液过 0.22 μm 滤膜后用于纯化,将 30 mL 样品加入镍柱蛋白分离纯化系统,方法按镍柱使用手册进行。由于毕赤酵母表达分泌的华根霉脂肪酶为加工过的前导肽保留了 27 个氨基酸的脂肪酶,故命名为 r27RCLC。

1.2.2 衣霉素处理表达脂肪酶 r27RCLC 的酵母细胞 将诱导型 GS115/pPIC9k-*proRCLC* 接种至在 25 mL BMGY 培养基中培养 16 h 左右后,转入 50 mL BMMY 培养基(含有 10 μg/mL 衣霉素)中培养 48 h。以同样培养的未加衣霉素培养的菌株为对照,表达脂肪酶 r27RCLC。

1.2.3 内切糖苷酶 EndoHf 和 PNGaseF 处理毕赤酵母表达华根霉脂肪酶 (r27RCLC) 用内切糖苷酶 EndoHf 和 PNGaseF 酶切处理毕赤酵母表达的重组脂肪酶 r27RCLC。方法:首先将 20 μg 纯化蛋白在糖蛋白变性缓冲液中(质量分数 5% SDS,0.4 mol/L DTT),100 ℃煮沸 10 min,反应总体积为 10 μL,然后加入内切酶反应体系,使反应总体积为 20 μL,37 ℃反应 3 h。

1.2.4 SDS-PAGE 分析 配制 SDS-PAGE 凝胶,其中浓缩胶质量浓度为 2.5 g/dL,分离胶质量浓度为 12 g/dL,加样量为 10 μL。将粗酶液和糖苷酶处理后酶液进行电泳检测,Quantity One 软件观察分析。

1.2.5 Western Blotting 验证 首先将纯化的脂肪酶 r27RCLC 加入 12 g/dL SDS-PAGE 凝胶进行电泳,电泳结束后将目的条带切成合适大小,用转膜缓冲液(20 mmol/L Tris,192 mmol/L 甘氨酸,体积分数 20%甲醇溶液)浸泡 5 min。然后将裁剪的和胶条同样大小的滤纸和硝酸纤维素酶膜(PVDF),浸泡转膜缓冲后与胶条按顺序排放放入转膜仪进行转印 10 min。转印完成后取出 PVDF 膜浸于 B 液(质量分数 5%脱脂奶粉)中封闭 1 h(室温脱色摇床),封闭后的 PVDF 膜放于按 1:5 000 比例用 D 液(0.05% tween-20,PBS,pH 7.4)稀释的一抗 (Anti-His Antibody)溶液中,室温反应 1 h 后,用 D 液洗 5 次,每次 5 min,随后将膜浸泡于 1:500 用 D 液稀释的二抗(辣根过氧化物酶标记羊抗小鼠 IgG)溶液中,室温反应 1 h,重复清洗步骤。洗涤后的 PVDF 膜浸于显色液中显色 30 min,最后用双蒸水洗膜终止反应,仪器拍照观察。

1.2.6 MADLI-TOF-MS 分析 将脂肪酶 r27RCLC 样品进行 12 g/dL SDS-PAGE 凝胶电泳后,切下目的条带,放入 EP 管中,加入 200~400 μL 100 mmol/L NH_4HCO_3 溶液 ACN 脱色,清洗至透明,去除上清,冻干。然后加入 90 μL 100 mmol/L NH_4HCO_3,10 μL 200 mmol/L DTT,56 ℃孵化 30 min,还原蛋白质,去掉上清,加入 100 μL 100 mmol/L NH_4HCO_3,室温放置 15 min,去上清,加入 100 μL 100% ACN,放置 5 min,去除上清冻干。冻干后加入 5 μL 2.5~10 ng/μL Trypsin 溶液,置 4 ℃放置 60 min 然后加入 25 μL 25 mmol/L NH_4HCO_3 缓冲液,pH 7.8~8.0,37 ℃反应过夜,20 h 左右。吸出酶解液,转移至新的 EP 管中,原管中加入 10 μL 体积分数 60% ACN/体积分数 0.1% TFA,超声 15 min,吸出溶液,并入前次溶液,样品制备完成。点样进行质谱分析,质谱结果利用软件 Flexanalysis 分析。

2 结果与分析

2.1 毕赤酵母表达的华根霉脂肪酶 r27RCLC 的纯化

脂肪酶 r27RCLC 粗酶液的镍柱纯化效果如表 1,可以看出蛋白纯化后回收率较高,足以用于进行下一步实验。粗酶液和纯酶液的 SDS-PAGE 对比如图 1,可以看出蛋白条带单一,纯化效果较好。

表 1 脂肪酶 r27RCLC 镍柱纯化效果

Table 1 Purification results of lipase r27RCLC

脂肪酶 r27RCLC	总活力/U	总蛋白质/mg	比活力/(U/mg)	纯化倍数	回收率/%
纯化前	400	5	80	1	100
纯化后	350	0.5	700	9	87.5

2.2 衣霉素处理表达华根霉脂肪酶 r27RCLC 的毕赤酵母细胞结果

衣霉素是一种常见的糖基化抑制剂,能在细胞内抑制毕赤酵母表达蛋白的糖基化修饰,且其并不影响酵母细胞的生长[16]。因此在培养基中加入衣霉

素培养后,能够使原来发生糖基化的蛋白去糖基化,在表达脂肪酶 r27RCLC 的基因工程菌诱导培养基中加入衣霉素培养 48 h 后,取样检测菌体生长情况,结果表明加有衣霉素摇瓶与未加入衣霉素摇瓶中的酵母生长情况大体一致。培养基样品的 SDS-PAGE 检测如图 2 所示:加入衣霉素诱导表达的蛋白量(图 2:泳道 2)明显低于未加入衣霉素处理的蛋白表达量(图 2:泳道 1),表明糖基化抑制剂极大的抑制了脂肪酶 r27RCLC 的分泌。这一结果表明脂肪酶在表达过程中很可能发生了糖基化,且糖基化对该酶的分泌表达有重要影响。

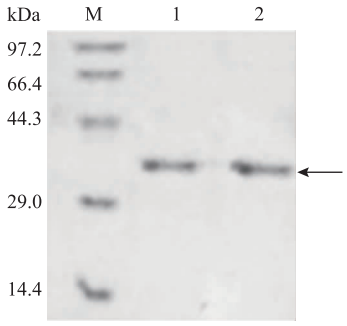


图 1 脂肪酶 r27RCLC 纯化前(泳道 1)和纯化(泳道 2)后的 SDS-PAGE 分析

Fig. 1 SDS-PAGE analysis of purified r27RCLC and unpurified r27RCLC

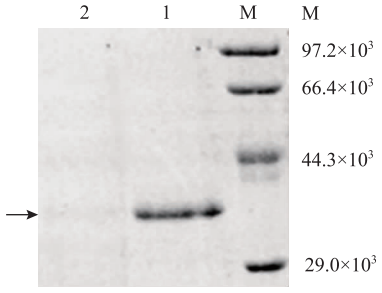
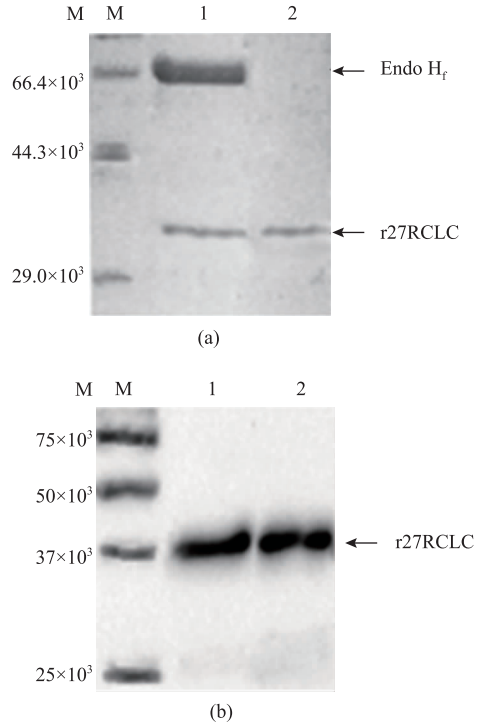


图 2 衣霉素处理(泳道 2)和未处理(泳道 1)毕赤酵母细胞表达的脂肪酶 r27RCLC 的 SDS-PAGE 电泳图

Fig. 2 SDS-PAGE analysis of lipase 27RCLC from culture supernatant of GS115/pPIC9k-*proRCLC* with tunicamycin (Lane 2) or without tunicamycin(Lane 1)

2.3 PNGaseF 和 EndoHf 酶切处理毕赤酵母表达的华根霉脂肪酶 r27RCLC 结果

EndoHf 酶切后脂肪酶 r27RCLC 后 SDS-PAGE 检测如图 3 (a) 和 PNGaseF 酶切 r27RCLC 后 Western Blot 验证如图 3(b)。两种内切糖苷酶处理脂肪酶 r27RCLC 后,蛋白条带在凝胶电泳上移动大小都仍在 37 000 左右处。糖苷酶处理前后酶未发生变化,由此初步判断毕赤酵母表达的脂肪酶 r27RCLC 未发生糖基化修饰。



(a) M:DNA marker;1:EndoH$_f$ 处理后的 r27RCLC;2:未酶切处理的 r27RCLC;(b) 1:PNGaseF 酶切处理 3 h 后的 r27RCLC;2:未被糖苷酶 EndoH$_f$ 处理的 r27RCLC 对照

图 3 EndoHf 处理脂肪酶 r27RCLC 的 SDS-PAGE 图(a)和 PNGaseF 处理脂肪酶 r27RCLC 的 Western-Blot 图(b)

Fig. 3 SDS-PAGE (a)and Western-Blot (b)analysis of lipase 27RCLC treated with EndoHf or PNGaseF

2.4 脂肪酶 r27RCLC 的 MADLI-TOF 质谱分析结果

华根霉脂肪酶 (RCLC) 一级结构的 MADLI-TOF 质谱分析结果如图 4 所示,P1,P2 部分为胰酶酶解后 MADLI-TOF-MS 检测到的序列。其成熟肽上唯一潜在的糖基化位点序列为 NLS,毕赤酵母表达的脂肪酶 r27RCLC 质谱分析过程中,经胰酶酶解所成肽段搜库结果(Mascot Search Results),NLS 糖基化位点恰好位于检测到的胰酶酶解所成的肽段上(*m/z* 1 279.638 3),便于后期软件分析糖基化位点是否发生糖基化。

脂肪酶 r27RCLC 质谱分析一级峰图如图 5(a)。一级峰图中 *m/z* 1 279.638 3 的二级峰图如图 5

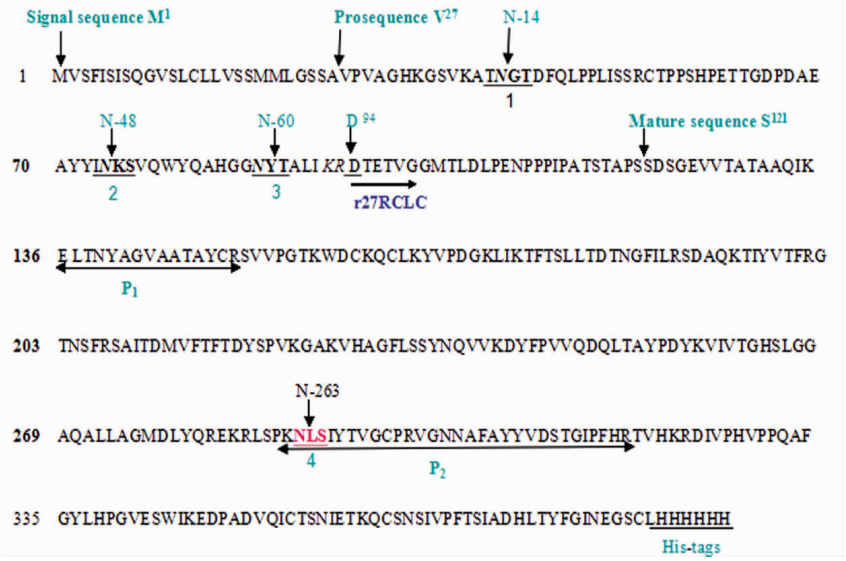


图 4　华根霉脂肪酶一级结构

Fig. 4　Primary structure of *Rhizopus chinensis* lipase

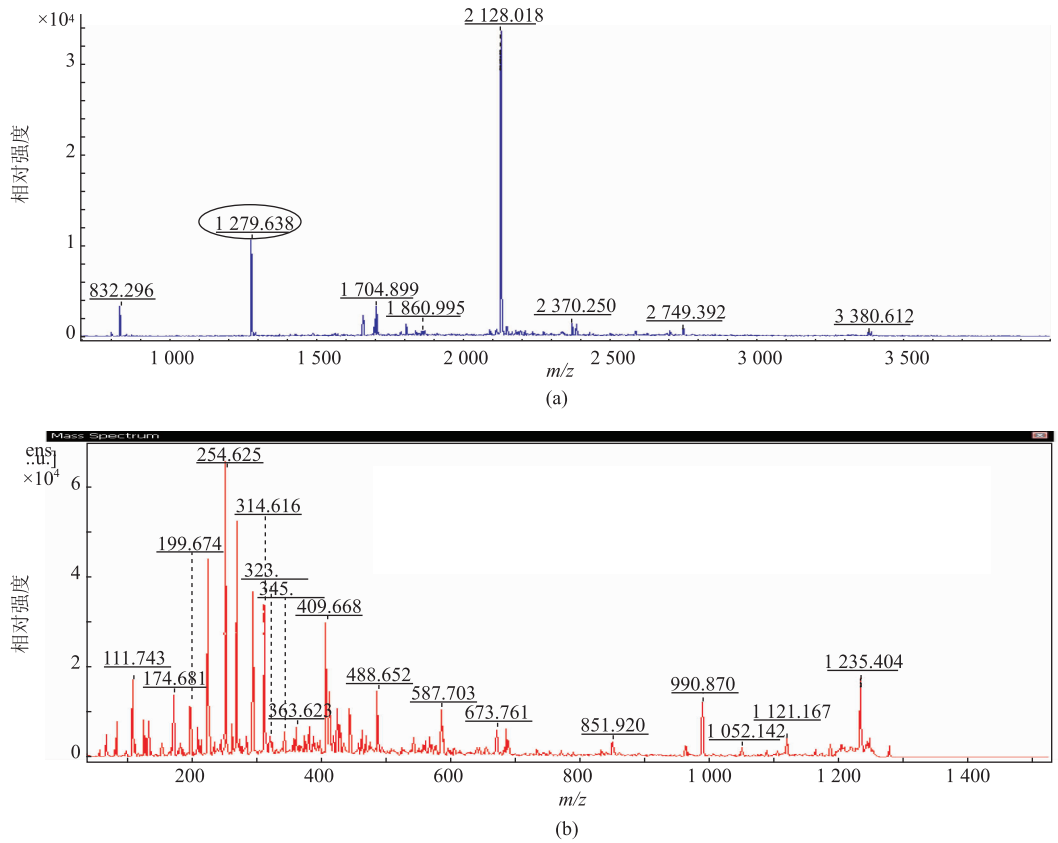


图 5　(a) 脂肪酶 r27RCLC 的 MADLI–TOF–MS 一级峰图;(b) 脂肪酶 r27RCLC 样品 MADLI–TOF–MS 一级峰图中 *m/z* 1 279.638 3 二级峰图分析

Fig. 5　MADLI–TOF mass spectra of lipase r27RCLC. *m/z* 1 279.638 containing the glycosylation site NLS is indicated. (b) Analysis of *m/z* 1 279.638 3. Results of analysis of flex Analysis is indicated in rectangular

(b),质谱图分析软件 Flexanalysis 具有识别肽段糖基化特征峰的功能,利用该软件分析 *m/z* 1 279.638 3 的二级峰图中是否有糖基化特征峰,结果表明样品无糖基化。这一结论与用内切糖苷酶酶切处理样品结果一致,进一步说明脂肪酶 r27RCLC 成熟肽未发生糖基化。

3 结 语

采用生物化学方法,利用糖基化抑制剂衣霉素处理表达脂肪酶r27RCLC 的酵母细胞,初步判断糖基化对酶的分泌表达影响。衣霉素能抑制酵母表达蛋白的糖基化而不影响细胞的生长 [16],SDS-PAGE 分析处理结果显示 r27RCLC 的分泌表达受到很大的抑制,表明 r27RCLC 很可能发生了糖基化。用内切糖苷酶 PNGaseF 和 EndoHf 处理脂肪酶 r27RCLC,根据 SDS-PAGE 和 Western Blot 检测结果判断出 r27RCLC 未发生糖基化。这两种结果表明脂肪酶 r27RCLC 在胞内形成过程中很可能发生了糖基化,因此糖基化抑制后酶的分泌表达被抑制,但发生糖基化的位点应该在 RCLC 的前导肽上,而脂肪酶 r27RCLC 上唯一潜在糖基化位点 (N-263) 未发生糖基化,因此表达的 r27RCLC 不是糖蛋白。为进一步验证这一结论,将脂肪酶 r27RCLC 样品做 MADLI-TOF-MS 质谱分析,鉴定结果表明脂肪酶 r27RCLC 未发生糖基化。质谱鉴定结论及内切糖苷酶处理 r27RCLC 结果相符合,充分说明在毕赤酵母中能够高效表达的华根霉脂肪酶 r27RCLC 未发生糖基化。这一结论为下一步鉴定 RCLC 前导肽上潜在糖基化位点是否发生糖基化以及糖基化对华根霉脂肪酶在毕赤酵母中分泌表达的影响奠定基础,也为进一步改良酶使其适应工业化生产奠定基础,为油脂加工工业提供性质优良的生物催化剂。

参考文献:

[1] Sharma R,Chisti Y,Banerjee U C. Production,purification,characterization,and applications of lipases [J]. **Biotechnol Adv**,2001,19(8):627-662.

[2] 王春雨,迟乃玉,张庆芳,等. 低温脂肪酶的分离纯化及酶学性质[J]. 食品与生物技术学报,2013,32(8):809-813.
WANG Chunyu,CHI Naiyu,ZHANG Qingfang,et al. Purification and enzymatic properties of cryogenic lipase [J]. **Journal of Food and Biological Technology**,2013,32(8):809-813.(in Chinese)

[3] 彭立凤. 微生物脂肪酶的研究进展[J]. 生物技术通报,1999,15(2):17-22.
PENG Lifeng. The study of Microbial lipase[J]. **Biotechnology Bulletin**,1999,15(2):17-22.(in Chinese)

[4] 颜兴和,王栋,徐岩. 根霉脂肪酶的研究进展[J]. 工业微生物,2005,35(3):45-49.
YAN Xinghe,WANG Dong,XU YAN. The study of *Rhizopus lipases* [J]. **Industrial Microorganism**,2005,35 (3):45-49.(in Chinese)

[5] Daly R,Hearn M T. Expression of heterologous proteins in *Pichia pastoris*:a useful experimental tool in protein engineering and production[J]. **Journal of Molecular Recognition**,2005,18(2):119-138.

[6] Yu X W,Tan N J,Xiao R,et al. Engineering a disulfide bond in the lid hinge region of *Rhizopus chinensis* lipase:Increased thermostability and altered acyl chain length specificity[J]. **PloS one**,2012,7(10):e46388.

[7] 顾园,诸欣平,王少华. 毕赤酵母表达蛋白质的糖基化[J]. 生命的化学:2004,24(4):353-355.
GU Yuan,ZHU Xinping,WANG Shaohua. The glycosylation of protein expressed in *Pichia pastoris* [J]. **Chemistry of Life**,2004,24(4):353-355.(in Chinese)

[8] Imperiali B,O'Connor S. Effect of N-linked glycosylation on glycopeptide and glycoprotein structure[J]. **Curr Opin Chem Biol**,1999,3(6):643.

[9] Lige B,Ma S,van Huystee R. The Effects of the Site-Directed Removal of N-Glycosylation from Cationic Peanut Peroxidase on Its Function[J]. **Arch Biochem Biophys**,2001,386(1):17-24.

[10] Macauley-Patrick S,Fazenda M L,McNeil B,et al. Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system [J]. **Yeast**,2005,22(4):249-270.

[11] 朱珊珊,喻晓蔚,徐岩. 毕赤酵母组成型表达脂肪酶及其高通量筛选方法[J]. 微生物学通报:2012,39(6):873-881.
ZHU Shanshan,YU Xiaowei,XU Yan. Constitutive expression of lipase in *Pichia pastoris* and the high throughput screening method[J]. **Microbiology**,2012,39(6):873-881.(in Chinese)

[12] 王睿,喻晓蔚,沙冲,等. 定向进化-易错 PCR 方法提高华根霉 *Rhizopus chinensis* CCTCC M201021 脂肪酶的活力[J]. 生物工程学报,2009,25(12):1892-1899.
WANG Rui,YU Xiaowei,SHA Chong,et al. Increasing activity of *Rhizopus chinensis* CCTCC M201021 lipase by directed evolution-error prone PCR[J]. **Journal of Biological Engineering**,2009,25(12):1892-1899.(in Chinese)

[13] Laemmli U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4[J]. **Nature**,1970,227(5259):680-685.

[14] Burlingame A L. Characterization of protein glycosylation by mass spectrometry [J]. **Current opinion in biotechnology**,1996,7(1):4-10.

[15] Nilsson B. Analysis of protein glycosylation by mass spectrometry[J]. **Molecular biotechnology**,1994,2(3):243-280.

[16] Han Y,Lei X. Role of Glycosylation in the Functional Expression of an Aspergillus niger Phytase (phyA) in *Pichia pastoris*[J]. **Archives of Biochemistry and Biophysics**,1999,364(1):83-90.

会　议　信　息

会议名称(中文):第九届全国食品冷藏链大会暨第六届全国冷冻冷藏产业创新发展年会

开始日期: 2014-11-30

所在城市:广东省　广州市　　主办单位:中国制冷学会

联系人:王丹 010-68457336 尹从绪 010-68711410 张力 010-63565523

E-MAIL: coldchain@car.org.cn　　会议网站: http://www.car.org.cn/c/cn/news/2013-12/31/news_2383.html

会议背景介绍: "全国食品冷藏链大会"、"全国冷冻冷藏产业创新发展年会"系列会议已分别成功举办八届和五届,对推动冷链装备技术、食品贮藏工艺进步,提升冷链企业运营管理和服务水平,促进我国冷链产业的发展起到了重要的作用。第九届全国食品冷藏链大会和第六届全国冷冻冷藏产业创新发展年会计划于 2014 年 11 月底或 12 月初在广州召开。

该会议致力于搭建冷链"产、学、研、用"交流平台。会议将从技术、管理、运营多角度展开讨论,就冷链行业热点焦点问题进行探讨。大会将邀请政府管理机构、著名企业、专家学者就食品冷链的政策标准、产业升级、安全生产和运营管理进行广泛交流与研讨。会议将出版论文集,现向行业征集论文,优秀论文将推荐至《制冷学报》(核心期刊)、《冷藏技术》等期刊发表并参与中国制冷学会优秀论文奖评选。

会议名称(中文): 第四届长三角研究生论坛系列 ——生物学与现代生物技术研究生论坛

开始日期: 2014-11-16　　结束日期: 2014-11-18

所在城市: 浙江省　舟山市　　具体地点: 浙江海洋学院长峙岛校区

主办单位: 长三角研究生教育创新计划协作委员会

承办单位: 浙江省学位委员会办公室、浙江海洋学院

联系人: 喻莉丹 13567658366　　联系电话: 0580-2552606

E-MAIL: yjsc2015 @163.com　　会议网站: http://www.yjsy.ecnu.edu.cn/newsdetail.asp?id=3517

会议背景介绍:依据"长三角研究生教育创新计划合作协议"的要求,第四届"长三角生物学与现代生物技术研究生论坛"由长三角研究生教育创新计划协作委员会主办,浙江省学位委员会办公室、浙江海洋学院承办。论坛将于 2014 年 11 月中旬在浙江海洋学院长峙岛校区举行。论坛将分为两个阶段:第一阶段,论文征集与评审。采取征文形式,通过评审筛出优秀学术论文;第二阶段,学术交流与研讨。邀请优秀论文获奖作者、评审老师以及领域专家开展系列活动,包括学术讲座、学术报告和沙龙等。本次"生物学与现代生物技术研究生论坛" 以研究生论文宣讲和交流为核心,旨在为长三角地区研究生提供一个学术交流、思想碰撞的平台。通过交流互动,拓展学术视野,激发研究生的创新意识、创新思维和创新能力。论坛竭诚欢迎"长三角"各高等院校、科研院所的研究生踊跃参与。本次论坛的主题是:科技创新驱动下的生物学与现代生物技术研究。要求论文围绕与生物学、现代生物技术和生物工程等密切相关的问题展开研究,论坛视情况设立生物学、现代生物技术和生物工程等若干个分论坛。