

兔多杀性巴氏杆菌铁调节外膜蛋白(IROMPs)抗原交叉性试验

顾宏伟 陆承平*

(南京农业大学农业部疾病诊断与免疫重点开放实验室 南京 210095)

摘 要 :分别以含铁培养基和限铁培养基培养 4 株兔多杀性巴氏杆菌 JS、C51-2、C51-3 及 C51-17 株,用刚果红结合试验初步分析铁调节外膜蛋白(IROMPs)表达情况,同时破碎菌体,提取外膜蛋白,经 SDS-PAGE 比较这 4 株细菌在正常培养条件、富铁培养条件及限铁培养条件时外膜蛋白的表达差异,结果表明:限铁培养时,细菌表现出对刚果红染料较强结合性,且这 4 株巴氏杆菌均表达数种高分子量的 IROMPs,主要有 147 kD、135 kD、99 kD、94 kD、82 kD 及 72 kD 蛋白带,4 株之间存在一定的差异,而正常或富铁条件培养时均不表达上述条带。免疫印迹结果显示,正常条件培养的全菌(C51-17 株)抗血清中不含有针对 IROMPs 的抗体,限铁培养的 C51-17 株 IROMPs 可诱导机体产生相应抗体,并且能与 JS、C51-2 及 C51-3 株的 IROMPs 发生抗原交叉性反应。同时用间接 ELISA 检测 C51-17 株 3 种 IROMP(99 kD、94 kD 和 87.6 kD)的交叉抗体效价,结果这 3 种抗血清均与其它 3 株的产生较高的交叉抗体滴度。

关键词 :兔多杀性巴氏杆菌,铁调节外膜蛋白,交叉抗原性

中图分类号 :Q936 文献标识码 :A 文章编号 :0001-6209(2004)05-0667-05

兔巴氏杆菌病(Pasteurellosis)是由多杀性巴氏杆菌(*Pasteurella multocida*)感染引起的呼吸道疾病,为家兔的主要传染病之一。目前国内外主要使用灭活疫苗来预防和控制该病,但用体外培养的细菌制成的灭活苗只对同种血清型具有一定的保护力,而对异种血清型不能产生保护力或较弱,迄今为止,巴氏杆菌的重要免疫原还不甚清楚。自上世纪 80 年代以来,人们相继研究了荚膜、脂多糖及外膜蛋白等的免疫原性,但其免疫保护力均不甚理想^[1]。

Rimler 等^[2]报道,患禽霍乱康复的禽类动物可获得交叉保护力,能抵抗异种血清型的感染;Rebers 等^[3]报道,巴氏杆菌弱毒苗也可使禽类获得交叉保护力,而体外培养菌灭活苗则不能,由此可推测巴氏杆菌在体内增殖时表达了某些抗原成分,并诱导机体产生交叉保护性,故被称为交叉保护性因子(CPF);Ikeda 和 Hirsh^[4]研究发现,体内增殖时交叉保护性抗原的表达与体内游离铁含量极低密切相关;Keumhwa 等^[5]研究了禽多杀性巴氏杆菌铁调节外膜蛋白与体内增殖时外膜蛋白之间的关系,发现体内增殖时新增表达的几种高分子量外膜蛋白(或为某种蛋白的几个亚基)可在体外限铁条件下表达,并且弱毒苗的抗血清或康复血清均能与这些 IROMPs 发生结合反应,这为研究铁调节外膜蛋白与交叉保护因子之间的关系打下基础。

本试验以兔多杀性巴氏杆菌 C51-17 株为主要研究对象,分析其不同条件下外膜蛋白的表达差异,并初步探索铁调节外膜蛋白的抗原交叉性,为寻找交叉保护性抗原成分提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 菌株、试剂和实验动物

兔巴氏杆菌 C51-2、C51-3 及 C51-17 购自中国兽药监察所,血清型分别如下:C51-2 为 A:1, C51-3 为 A:3, C51-17 为 A 但菌体抗原型未定,JS 株系江苏农业科学院兔病组惠赠。本实验以 C51-17 为主要研究对象。

辣根过氧化物酶标记的兔抗大鼠 IgG 购自南京生兴生物技术有限公司, Hepes 缓冲液、SLS、弗氏佐剂购于 Sigma 公司,清洁级小鼠(20~25g/只)购自南京医科大学动物房,大鼠(♂,成年)购自南京医科大学动物房。

1.2 培养条件控制

为尽量减少培养基中铁离子含量,实验所用的所有玻璃器皿均用 0.5% EDTA 浸泡过夜处理,然后以去离子水反复冲洗 10 遍晾干待用。实验用水均为去离子水,实验操作过程避免使用一切铁制物品。培养基 A 为 THB + 2% 犊牛血清,培养基 B 为 THB + 2% 犊牛血清 + 2'-联吡啶(200 μ mol/L),培养基 C

* 通讯作者。Tel:86-25-84396517; E-mail:lucp@njau.edu.cn

作者简介:顾宏伟(1978-)男,江苏如东人,硕士,主要从事兽医学微生物学与免疫学研究。

收稿日期:2004-01-16,修回日期:2004-04-28

为 THB + 2% 犊牛血清 + FeCl₃ (1.25mmol/L)。

1.3 OMPs 和 IROMPs 的提取

参照 Zhao 等^[6]的方法略作改动。挑取单菌落分别接种培养基 A、B 及 C, 37℃ 振荡培养过夜, 按 1:50 比例分别接种上述的 3 种培养基, 37℃ 继续振荡培养 18h。8000r/min 离心 10min 收获菌体, 用灭菌的生理盐水洗涤两次, 接着用 10mmol/L pH7.4 的 Hepes (N-2-羟乙基哌嗪-N'-2-乙磺酸) 缓冲液重悬沉淀, 置冰浴超声破碎细胞, 以 1700g 离心 20min, 收集上清。以 100000g 超速离心机 (BECMAN XL-80) 4℃ 离心 60min, 弃上清, 用 2% SL₉ (十二烷基肌氨酸钠, 溶于 10mmol/L pH7.4 的 Hepes 缓冲液) 重悬沉淀, 于 22℃ 水浴作用 60min, 接着 100000g 4℃ 离心 60min, 弃上清, 沉淀物用 10mmol/L pH7.4 的 Hepes 洗涤两次, 最后溶于灭菌双蒸水, -20℃ 冻存。蛋白浓度用紫外分光光度计 (BIO-RAD Smartspec™ 3000) 测定。

1.4 刚果红结合实验

参照 Keumhwa 等^[5]的方法来检测铁调节蛋白的摄铁能力, 略作改进: 分别以培养基 A 和 B 培养多杀性巴氏杆菌 C51-17 离心收集菌体, 以 PBS (0.01mol/L pH7.2) 洗涤两次, 并以此 PBS 重悬沉淀, 调节菌体浓度到 A₆₀₀ 为 1.5, 向菌体悬液中加入刚果红至终浓度为 30μg/mL 混匀, 立即吸出 1mL 离心取上清, 测 A₄₉₀ 值, 余下的含刚果红的菌悬液于 37℃ 振荡温育, 每隔 30min 取出 1mL 按上述步骤离心取上清, 测 A₄₉₀ 值。重复该实验 4 次, 计算出平均值, 然后绘出曲线图。

1.5 外膜蛋白的 SDS-PAGE

SDS-PAGE 参照文献[8]的方法, 分离胶为 12%, 积层胶为 5%。加样前将 IROMPs 及 OMPs 提取物浓度调至 1mg/mL。然后与等体积上样缓冲液混合, 煮沸 5min 后加样。积层胶电压以 8V/cm 电泳, 恒压; 分离胶以 15V/cm 电泳恒压。电泳结束后以 0.25% 考马斯亮蓝染色显示蛋白条带。蛋白条带分子量是经复日 FR-980 生物电泳图像分析系统分析获得。

1.6 抗血清的制备

全菌抗血清: 将 C51-17 株细菌培养物(经培养基 A 培养)以 0.8% (V/V) 福尔马林灭活 48h, 浓度调节至 1 × 10⁹ CFU, 经无菌检验合格后免疫小鼠获得。

IROMPs 抗血清: 将从 C51-17 株(经培养基 B 培养)提取的 IROMPs (20μg/只) 与弗氏佐剂乳化免疫小鼠。共免疫 4 次, 间隔时间为 2 周, 经间接 ELISA

检测达到一定的效价采血而获取。

C51-17 株 99kD、94kD 及 87.6kD IROMP 的抗血清: 用胶中回收的 99kD、94kD 及 87.6kD IROMP 经背部皮下免疫大鼠, 100μg/只。每隔 2 周免疫 1 次, 连续免疫 5 次。末次免疫后 9d, 股动脉放血, 收集血清, -20℃ 冻存。

1.7 免疫转印

OMPs 及 IROMPs 样品经 SDS-PAGE 后以 50V 恒压转移 2h, 将蛋白转移到硝酸纤维膜上, 用丽春红 S 染膜, 标记出蛋白 Marker (Pharmacia) 位置, 紧接着用去离子水漂洗膜脱染料, 以 5% 脱脂奶粉封闭, 封闭后与 1:100 倍稀释的抗血清结合, 随之加入酶标二抗 (江苏科威) 作用 60min, 以 DAB 显示转印结果。

1.8 间接 ELISA 检测交叉抗体效价

将 JS、C51-2、C51-3 及 C51-17 株的 IROMPs 分别包被 ELISA 板, 1μg/孔。以 C51-17 株的 99kD、94kD 及 87.6kD IROMP 抗血清为第一抗体, 分别与上述 IROMP 交叉反应, 然后加入辣根过氧化物酶标记的酶标二抗, 最后用 OPD-H₂O₂ 显色。

2 结果

2.1 SDS-PAGE 分析

4 株巴氏杆菌在正常培养条件下表达的外膜蛋白 SDS-PAGE 图谱基本一致 (图 1), 主要有 87.6kD、68.4kD、63.9kD、45kD、28kD 及 14kD 的蛋白条带。除 JS 株外, C51-2、C51-3 和 C51-17 均表达 72 kD 的

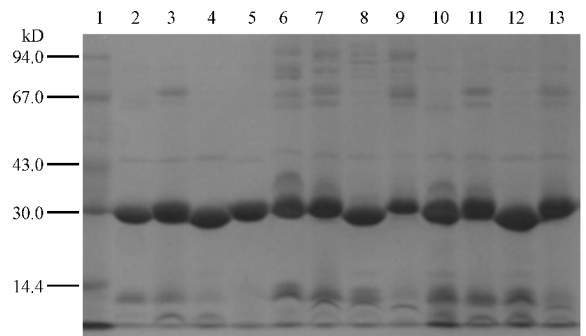


图 1 OMPs 和 IROMPs 的 SDS-PAGE 图谱

Fig. 1 Comparison of SDS-PAGE profiles of OMPs and IROMPs extracts from different strains grown in three conditions

1. Protein marker 2. Strain JS in THB 3. Strain C51-2 in THB 4. Strain C51-3 in THB 5. Strain C51-17 in THB 6. Strain JS in THB + 200μmol/L dipyrindyl 7. Strain C51-2 in THB + 200μmol/L dipyrindyl 8. Strain C51-3 in THB + 200μmol/L dipyrindyl 9. Strain C51-17 in THB + 200μmol/L dipyrindyl 10. Strain JS in THB + 1.25mmol/L FeCl₃ 11. Strain C51-2 in THB + 1.25mmol/L FeCl₃ 12. Strain C51-3 in THB + 1.25mmol/L FeCl₃ 13. Strain C51-17 in THB + 1.25mmol/L FeCl₃

蛋白。外膜蛋白复合物中以 28 kD 蛋白含量最高 , 为主要外膜蛋白。

向培养基中添加 FeCl₃ 后 ,外膜蛋白的 SDS-PAGE 图谱与正常条件下的基本没有变化。而向培养基中添加 2,2'-联吡啶后 ,SDS-PAGE 图谱明显变化 ,主要表现在新增表达了几种高分子量的蛋白条带 :JS、C51-2 及 C51-17 株主要有 147kD、135kD、99kD、87.6kD、82kD、72kD、65kD、45kD、28kD 及 14kD 另 C51-2 和 C51-17 株还表达 94kD 蛋白。仅 C51-3 株的带谱差异较大 ,其主要表达 105kD、99kD、94kD、87.6kD、82kD、72kD、67kD、45kD、28kD 和 14kD。

2.2 免疫转印

C51-17 全菌灭活制备的抗血清能与 JS、C51-2、C51-3 及 C51-17 株的 38kD、32kD、28kD 和 14kD 蛋白带发生反应 ,而与 87.6kD、68.4kD、63.9kD 及 45kD 的蛋白不发生反应 ,但不能与几种高分子量的 IROMPs 等发生反应(图 2)。

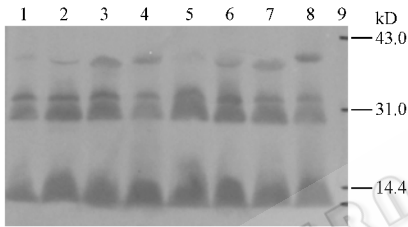


图 2 全菌抗血清免疫转印图谱

Fig.2 Western blots of OMPs and IROMPs extracts from four strains grown in two conditions reacted with whole-cells antisera

1. Strain JS in THB 2. Strain C51-2 in THB 3. Strain C51-3 in THB 4. Strain C51-17 in THB 5. Strain JS in THB + 200μmol/L dipyriddy 6. Strain C51-2 in THB + 200μmol/L dipyriddy 7. Strain C51-3 in THB + 200μmol/L dipyriddy 8. Strain C51-17 in THB + 200μmol/L dipyriddy 9. Protein marker.

C51-17 IROMPs 抗血清的带谱(图 3)如下 :与含铁条件下 4 株巴氏杆菌 OMPs 的 45kD、38kD、32kD、28kD 及 14kD 的蛋白带发生反应 ,且带型一致。与限铁条件下的 IROMPs 的反应各株之间有所差异 ,除该抗血清均能与这 4 株 45kD、38kD、32kD、28kD 及 14kD 的蛋白带发生反应之外 ,对高分子量的蛋白反应不尽一致 :如与 JS 株的 99kD、94kD、87.6kD 及 67kD 蛋白 ;与 C51-2 株的 94kD、87.6kD 和 67kD 蛋白 ;与 C51-3 的 99kD、94kD 和 87.6kD 蛋白 ;与 C51-17 的 99kD、94kD、87.6kD、82kD 及 67kD 蛋白。

2.3 刚果红结合试验

限铁条件下 ,4 株巴氏杆菌均表现出对刚果红染料强结合特性 ,而在含铁条件下 ,这几株巴氏杆菌

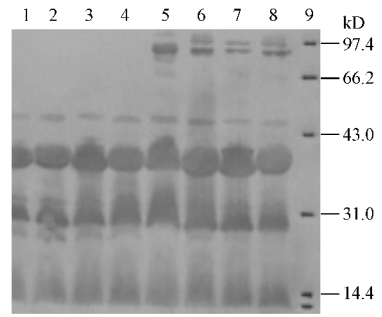


图 3 IROMPs 抗血清免疫转印图谱

Fig.3 Western blots of OMPs and IROMPs extracts from four strains grown in two conditions reacted with IROMPs antisera

1. Strain C51-17 in THB 2. Strain C51-3 in THB 3. Strain C51-2 in THB 4. Strain JS in THB 5. Strain C51-17 in THB + 200μmol/L dipyriddy 6. Strain C51-3 in THB + 200μmol/L dipyriddy 7. Strain C51-2 in THB + 200μmol/L dipyriddy 8. Strain JS in THB + 200μmol/L dipyriddy 9. Protein marker.

对刚果红结合相对较弱(图 4)。在限铁条件下培养的菌体表现出与刚果红染料较强的结合性 ,符合铁调节外膜蛋白的特性 ,佐证了 IROMPs 的表达。

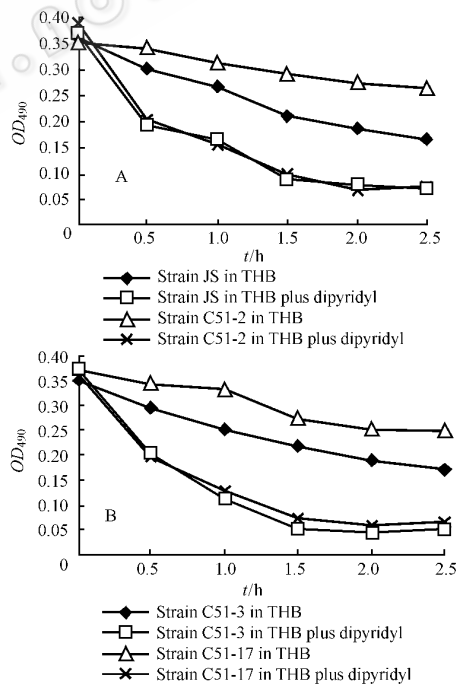


图 4 刚果红结合试验

Fig.4 Congo Red Binding Test

2.4 ELISA

C51-17 株 3 种 IROMP 抗血清分别与 JS、C51-2、C51-3 及 C51-17 株有不同交叉抗体滴度(表 1)。

3 讨论

铁离子是细菌生长繁殖所必需的营养因子之一 ,Griffith^[5] 研究发现一些病原菌之所以能在宿主

表 1 IROMP 的交叉抗体滴度

Table 1 Titers of anti-IROMP serum

Antiserum	Titer(\log_2)			
	JS	C51-2	C51-3	C51-17
Anti-C51-17 99kD IROMP	12	14	11	14
Anti-C51-17 94kD IROMP	11	15	13	15
Anti-C51-17 87.6kD IROMP	15	16	14	16

体内增殖,是因为限铁条件迫使细菌产生高亲和性的摄铁系统,主要有转铁蛋白受体、乳铁蛋白受体及铁载体^[7]等,其与宿主竞争摄取铁离子复合物,从而获取铁满足自身代谢需要,属于外膜蛋白家族。它们仅在限铁条件下表达,故被称之为铁调节外膜蛋白。研究表明,溶血性曼氏杆菌(*Mannheimia haemolytica*,旧称溶血性巴氏杆菌)^[9]、牛、禽及猪多杀性巴氏杆菌(*P. multocida*)^[1,6,10-12]、流感嗜血杆菌(*Haemophilus influenzae*)^[5]及脑膜炎奈瑟氏菌(*Neisseria meningitidis*)^[2]等在限铁条件下均能新增表达 IROMPs。Choi 和 Zhad^[6]指出,禽多杀性巴氏杆菌和猪多杀性巴氏杆菌在体内增殖时表达的 IROMPs 具有交叉免疫保护作用。兔多杀性巴氏杆菌在限铁条件下是否表达 IROMPs 及其交叉免疫原性如何,国外由于养兔不多,缺乏相应研究,国内目前则尚未见到这方面的报道。

本实验以兔多杀性巴氏杆菌 C51-17 株作为主要研究对象,表明在添加适当浓度铁离子螯合剂(2,2'-联吡啶)时,可诱导细菌表达 IROMPs;浓度过高时,细菌不能生长,从而肯定了游离铁含量对 IROMPs 表达的调控性。

Keumhwa 等^[5]研究表明,禽多杀性巴氏杆菌 P1059 株在体内增殖时新增表达的几种 OMPs 为 IROMPs,并在体外限铁条件下可模拟表达,且表达出的 IROMPs 能与含有 CPFs 抗体的康复血清发生免疫反应。Zhao 等^[6]用限铁条件培养猪多杀性巴氏杆菌 A52 株时,发现该株同样能表达 IROMPs,其 SDS-PAGE 图谱与体内增殖时外膜蛋白图谱一致。在本实验中,SDS-PAGE 分析表明,4 株兔多杀性巴氏杆菌在限铁培养时表达了 IROMPs,其表达情况与禽多杀性巴氏杆菌 P1059 株及猪多杀性巴氏杆菌 A52 株的基本一致。可见体内增殖时表达的交叉保护性抗原可在体外特定条件下模拟表达,从而为进一步研究交叉保护性抗原提供了方便。实验中不同菌株表达的 IROMPs 有所不同,可能与菌株差异相关。

以 C51-17 株全菌抗血清转印时,未检测到针对 IROMPs 的条带,进一步说明细菌在正常条件及富铁条件下不表达 IROMPs,同时也表明全菌抗血清中不含有 IROMPs 抗体,因此 IROMPs 与 OMPs 之间不存在抗原交叉性。C51-17 株新增表达的 IROMPs 中部分蛋白(或部分亚基),如 99kD、94kD、87.6kD 及 67kD IROMP,可诱导机体产生相应抗体,免疫转印图谱显示,针对 C51-17 株的 IROMPs 抗血清能与 JS、C51-2 及 C51-3 株相应的 IROMPs 结合,表明 IROMPs 在这 4 株之间存在抗原交叉性,推测它们之间存在相同或相似的线性表位或空间表位。免疫转印时未检测到一些高分子量的 IROMPs(如 147kD 和 135kD)抗体,可能是因为这些蛋白在总 OMP 中的含量较低,或因其自身的抗原性较弱。

Simons 等^[13]研究表明,针对溶血性巴氏杆菌单个外膜蛋白抗体效价的高低与抗感染力呈正相关性,Confer^[14]研究发现此种方法可用于预测巴氏杆菌的重要免疫原。本实验用间接 ELISA 法分别定量分析了 C51-17 的 99kD、94kD 及 87.6kD IROMP 交叉抗体滴度,结果表明这 3 种蛋白在不同的菌株之间存在良好的抗原交叉性,从而推测这 3 种 IROMP 为重要的保护性抗原。至于 IROMPs 在动物试验中的交叉保护力如何,有待进一步试验证实。

参 考 文 献

- [1] Ruffolo C G, Jost B H, Adler B. Iron-regulated outer membrane proteins of *Pasteurella multocida* and their role in immunity. *Vet Microbiol*, 1998, **59**(2~3): 123-137.
- [2] Rimler R B. Cross-protection factors of *Pasteurella multocida* passive immunization of turkeys against fowl cholera caused by different serotypes. *Avian Dis*, 1987, **31**: 884-887.
- [3] Robers P A, Heddlston K L. Fowl cholera: induction of cross-protection in turkeys with bacterins prepared from host-passaged *Pasteurella multocida*. *Avian Dis*, 1976, **21**(1~4): 50-56.
- [4] Ikeda J S, Hirsh D C. Antigenically related iron-regulated outer membrane proteins produced by different somatic serotypes of *Pasteurella multocida*. *Infect Immun*, 1988, **56**(5~8): 2499-2502.
- [5] Keumhwa C K, Samuel K, Maheswaran, et al. Relationship between the iron regulated outer membrane proteins and the outer membrane proteins of in vivo *Pasteurella multocida*. *Vet Microbiol*, 1991, **28**: 75-92.
- [6] Zhao G, Pijoan C, Choi K, et al. Expression of iron-regulated outer membrane proteins by porcine strains of *Pasteurella multocida*. *Can J Vet Res*, 1995, **59**(1): 46-50.
- [7] Ogunnariwo J A, Schryvers A B. Characterization of a novel transferring receptor in bovine strains of *Pasteurella multocida*. *J Bacteriol*, 2001, **183**(3): 890-896.

- [8] Sambrook J , Fritsch E F , Maniatis T . 金冬雁 黎孟枫 等译 . 分子克隆实验指南 . 第二版 . 北京 : 科学出版社 , 1996 : 881 - 890 .
- [9] Confer A W , McCraw R D , Janet A , et al . Serum antibody responses of cattle to iron-regulated outer membrane proteins of *Pasteurella haemolytica* . *Vet Immunol and Immunopathol* , 1995 **47** : 101 - 110 .
- [10] Choi K H , Mahesaran S K , Felic L . Characterization of outer membrane protein-enriched extracts from *Pasteurella multocida* isolated from turkeys . *J Am J Vet Res* , 1989 **50** : 676 - 683 .
- [11] 孙银燕 胡绪敬 . B 群 Nm3407 株外膜蛋白复合物(OMPC)的提取及免疫原性 . 中华微生物学与免疫学杂志 , 1998 , **18**(6) : 423-427 .
- [12] Dabo S M , Confer A W , Murphy G L . Outer membrane proteins of bovine *Pasteurella multocida* serotypes A isolates . *Vet Microbiol* , 1997 **54**(2) : 167 - 183 .
- [13] Simons K R , Morton R J , Fulton R W , et al . Comparison of antibody responses in cattle to outer membrane proteins from *Pasteurella haemolytica* serotype 1 and from eight untypable strains . *Am J Vet Res* , 1992 **53** : 971 - 975 .
- [14] Confer A W . Immunogenes of *Pasteurella* . *Vet Microbiol* , 1993 **37** : 353 - 368 .

Cross Antigenicity Test of Iron-regulated Outer Membrane Proteins (IROMPs) of Leporid *Pasteurella multocida*

GU Hong-Wei LU Cheng-Ping*

(Key Lab Animal Disease Diagnostic & Immunology , Ministry of Agriculture , Nanjing Agricultural University , Nanjing 210095 , China)

Abstract : Leporid *Pasteurella multocida* strain JS , C51-2 , C51-3 and C51-17 were cultured in iron-replete , iron-restricted and normal conditions respectively . The bacterium cells grown under above conditions were measured to characterize iron-regulated outer membrane proteins (IROMPs) by the Congo Red binding test , all tested strains showed greater binding to Congo Red in case of the expression of IROMPs . The SDS-PAGE patterns of OMP extracts of these four strains grown under the iron-rich , iron-restricted or normal conditions , demonstrated that the IROMPs of 147kD , 135kD , 99kD , 94kD , 82kD and 72kD were expressed when grown in iron-restricted media , other than in iron-replete and normal conditions . Murine serum antibodies against the whole-cell bacterin of strain C51-17 grown in normal condition , couldn't react with the IROMPs . The IROMP extracts from strain C51-17 could elicit the hosts to produce antibodies , and antibodies could react with the IROMPs of the four strains by western blots . The bands of 99kD , 94kD or 87.6kD IROMP had the common antigens among the four strains in higher titers by ELISA . It showed that the IROMP extracts from *P. multocida* grown in iron-restricted condition , maybe had the epitopes of cross-protected factors (CPFs) .

Key words : *Pasteurella multocida* , Rabbit , IROMPs , Cross Antigenicity

* Corresponding author . Tel : 86-25-84396517 ; E-mail : lucp@njau.edu.cn

Received date : 01-16-2004

写 作 要 点

凡投送本刊的稿件 ,如涉及到以下内容 ,请作者按照本刊要求撰写。

1.摘要 :中英文摘要均采用第三人称叙述 ,不允许出现第一人称 ,如“本文、本研究、我们……”等。研究论文摘要包括目的、方法、结果和讨论 ;综述摘要包括论述内容的发展水平、自己的评论和展望。英文摘要中也可以加入自己的一些观点 ,用过去时态叙述作者工作 ,用现在时态叙述作者结论。要求语法正确 ,句子通顺 ,最好请英文较好且专业知识强的专家审阅定稿后再投来。

2.系统发育树 :系统树中菌名应列出全称及菌株号 ;名字后加括号 ,其内含序列号 ;图注应说明“树”上所有的内容 ,包括 :括号中的序列号、分支点上的数字涵义、比例尺代表的意义(如 0.01) [参见 :微生物学报 2004 **44**(2) : 143。]

3.测序结果 :因本刊版面紧张 ,所有测序结果(核酸、蛋白质) ,请作者先通过计算机网络进入国际基因库 EMBI(欧洲)或 GenBank(美国)或 DDB(日本) ,申请得到国际基因库接受号(Accession No.)后再投稿。

《微生物学报》编辑部