

苏云金杆菌 4.0718 菌株杀虫晶体蛋白的 双向电泳-飞行时间质谱分析

宋 晟 夏立秋 黄江丽 孙运军 丁学知*

(湖南师范大学生命科学学院 湖南省高校微生物学重点实验室 长沙 410081)

摘 要 根据苏云金杆菌 4.0718 菌株杀虫晶体蛋白的特性,对裂解液组成、上样量、聚焦时间等相关技术进行了比较研究和条件优化,首次获得苏云金杆菌杀虫晶体蛋白双向电泳图谱,并对部分蛋白质点进行胰酶酶解,基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry, MALDI-TOF-MS)测定肽质量指纹图谱, Mascot 软件查询 Swiss-Prot 数据库,最终鉴定出苏云金杆菌 4.0718 菌株伴孢晶体中所含的 Cry1Ac 和 Cry2Aa 蛋白,其精确分子量分别为 134160Da 和 71097Da。

关键词 苏云金杆菌,蛋白质组,杀虫晶体蛋白,双向电泳,基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱

中图分类号:Q936 文献标识码:A 文章编号:0001-6209(2005)03-0467-05

苏云金杆菌(*Bacillus thuringiensis*,简称 Bt)是一种革兰氏阳性芽孢杆菌,它在芽孢形成期间形成杀虫晶体蛋白(Insecticidal crystal proteins,简称 ICPs),能够毒杀包括鳞翅目(Lepidoptera)、双翅目(Diptera)、鞘翅目(Coleoptera)等 9 个目的 500 多种昆虫,是世界上应用最为广泛的一种微生物杀虫剂^[1]。杀虫晶体蛋白种类繁多,杀虫专一性很强,其组成以及各组分的含量决定了其杀虫活性^[2,3]。因此,研究 Bt 杀虫晶体蛋白性质,阐述其杀虫分子机制,对采用生物防治方法,控制农林害虫具有重要指导性作用。我室选育的苏云金杆菌 4.0718 新菌株,在生产应用中表现出高效、快速的杀虫特点^[4,5]。为了探讨苏云金杆菌 4.0718 菌株杀虫晶体蛋白与其杀虫活性的相关性,本研究立足于蛋白质组学的研究方法,根据杀虫晶体蛋白分子量大、疏水性强和含二硫键多的特点,对裂解液组成、上样量、聚焦时间进行了实验,获得了杀虫晶体蛋白的双向电泳图谱。进一步对大分子蛋白质点进行 MALDI-TOF-MS 分析,鉴定出对鳞翅目幼虫有特异毒性的 Cry1Ac 蛋白和对鳞翅目、双翅目幼虫都有毒性的 Cry2Aa 蛋白,为阐述苏云金杆菌 4.0718 菌株杀虫晶体蛋白高毒力提供了依据,并对建立以蛋白质组学的研究方法研究苏云金杆菌杀虫晶体蛋白性质奠定了重要基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 供试菌株 :Bt 4.0718 菌株(*Bacillus thuringiensis*)由本室选育和保藏,菌种保藏号: CCTCC No. M 200016。

1.1.2 培养基 :每升含牛肉膏 5g, NaCl 2g, MnSO₄ 0.05g, 蛋白

胨 10g, MgSO₄·7H₂O 0.3g, 葡萄糖 3g, K₂HPO₄ 0.3g, 琼脂 1.8g, pH7.3。

1.1.3 主要试剂和仪器 固相 pH 梯度干胶条(IPCstrip pH3~10L, 18cm)和 IPG 缓冲液(pH3~10L)为 Pharmacia 公司产品;脲、二硫苏糖醇(DTT)、CHAPS 和 Bio-lyte(pH3~10)为 Bio-RAD 公司产品;硫脲、甲苯磺酰苯丙氨酸氯甲酮-胰蛋白酶(TPCK-trypsin)、基质 α -氰基-4-羟基肉桂酸(CCA)和铁氰化钾[K₃Fe(CN)₆]均为 Sigma 公司产品;次高分子量标准蛋白质为北京华美公司产品。IPGphor 等电聚焦仪(Pharmacia 公司产品);ProTEAN 垂直电泳槽、PDQuest 2D 胶分析软件(Bio-RAD 公司产品);Voyager-DE™ STR 质谱仪(ABI 公司产品)。

1.2 菌体的培养和伴孢晶体的分离

菌体斜面活化 24 h, 30℃, 200 r/min 液体摇瓶培养 72h。参考王瑛等^[6]的液体双相法分离晶体。

1.3 蛋白样品的制备

称取分离的伴孢晶体蛋白冻干粉 3mg, 加入不同组成的裂解液 300 μ l(表 1)振荡处理 1h, 13000r/min 4℃离心 30min, 收集上清液, Bradford 法测定蛋白含量^[7], 样品存放于 -70℃。

1.4 电泳

1.4.1 第一向固相 pH 梯度等电聚焦电泳: 主要按 Bergman^[8]方法进行。蛋白上样量 300 μ g, 重泡胀与等电聚焦在 20℃自动进行, 总电压时间积为 44110Vh, 其中水化在 30V 低电压进行 12h, 然后经过 500V 1h、1000V 1h, 最后稳定在 8000V 下。

基金项目: 国家自然科学基金(30270037, 30470043); 国家“863 计划”(2002AA245021); 湖南省自然科学基金重点项目(04JJ2003); 湖南省教育厅重点项目(02C017)

* 通讯作者。Tel 86-731-8872298; Fax 86-731-8872260; E-mail: szding123@tom.com

作者简介: 宋 晟(1979-)男, 湖南湘阴人, 硕士研究生。E-mail: ecosystem2000@tom.com

收稿日期: 2004-09-10, 修回日期: 2005-01-09

表 1 裂解液的种类及组成

Table 1 Composition of lysis solution

No.	Composition							
	Urea(mol/L)	Thiourea(mol/L)	CHAPS/ %	NP-40/ %	DTT(mmol/L)	Bio-lyte/ %	IPG buffer/ %	Tris(mmol/L)
A	8	/	4	/	65	0.5	/	/
B	9	/	4	/	65	0.5	/	/
C	8	2	4	/	65	0.5	/	40
D	8	2	4	/	65	/	0.5	40
E	8	2	4	1	65	/	0.5	40

1.4.2 第二向垂直平板 SDS-PAGE :参照文献 [8] 进行 ,采用分离胶浓度为 8% 的不连续 SDS-PAGE 垂直板电泳。

1.4.3 银染 :参照文献 [9] 进行。

1.5 凝胶图谱分析

凝胶通过 Remote Capture2.2 获得图像后 ,经过 Gel-Pro Analyzer 初步处理后 ,用 PDQuest 7.3 软件对二维凝胶图谱进行背景消减 ,斑点匹配 ,斑点统计等分析。

1.6 质谱分析

1.6.1 蛋白质的原位酶解 :蛋白质的原位酶解参照 Fernandez 等^[10]和 Gharahdaghi 等^[11]的方法。

1.6.2 MALDI-TOF 肽质谱指纹分析 (1) 样品制备 :吸取 1 μ L 样品与 9 μ L 左右的 CCA 饱和和基质溶液(用含 0.1% TFA 的 50% ACN 配制)混合均匀 ,取 1 μ L 点于不锈钢点样板上 ,置空气中自然风干。(2) 质谱分析 :制备好的样品使用美国 ABI 公司的 Voyager-DETM STR 质谱仪进行分析 ,反射模式 ,正离子谱测定 ,离子源加速电压为 20kV ,N₂ 激光波长 337nm ,离子延迟提取 500ns ,真空度 4 \times 10⁻⁷ Torr ,质谱信号单次扫描累加 50 次 ,并用基质峰和胰酶自动降解离子峰作为内标校正质谱峰 ,获得了肽质量指纹图。

1.7 质谱数据的数据库查询

获得的混合物肽片段质量数据使用 ExPASy 网站提供的 Mascot 软件 ,以 Peptide Mass Fingerprint 的方式在 SWISS-PROT

数据库上查询鉴定。查询参数如下 :肽片段质量控制在 1000 ~ 3000 Da 范围 ,最大允许的肽质量误差为 0.7 ,每个肽允许有 0 个不完全裂解位点 ,半胱氨酸为脲甲基半胱氨酸 (carbamidomethyl-Cys) ,物种来源选择 Other Firmicutes ,离子选择 [M + H]⁺ 和 Monoisotopic。

2 结果

2.1 苏云金杆菌 4.0718 菌株杀虫晶体蛋白的双向电泳图谱

采用 5 种裂解液溶解杀虫晶体蛋白 ,双向电泳分离。其中图 B 与图 A 相比 ,在背景清晰度和蛋白聚焦两方面有很好效果 (图 1)。PDQuest 7.3 软件分析双向电泳图谱 ,图 A 中可识别 120 个蛋白质点 ,图 B 中可识别 174 个蛋白质点 ,主要分布在分子量 10 ~ 130kD ,等电点 pH 4 ~ 7 的范围内。130kD 左右的高分子量蛋白 ,等电点在 pH5 左右 ;65kD 左右的蛋白 ,等电点分布在 pI 3.4 ,pI4.2 ~ 4.5 ,pI5.1 ~ 6.0 ,pI7.2 ~ 8.3。图 A 与图 B 平均匹配的斑点数为 43 ,均为大分子量蛋白。

2.2 MALDI-TOF-MS 质谱分析双向电泳图谱上的部分蛋白质点

在图 2-A 中 ,对分子量较高 ,重复性较好的 5 个蛋白质点 ,经胶内胰酶酶解后 ,用 MALDI-TOF-MS 测得肽质量指纹图 (图 2-B)。

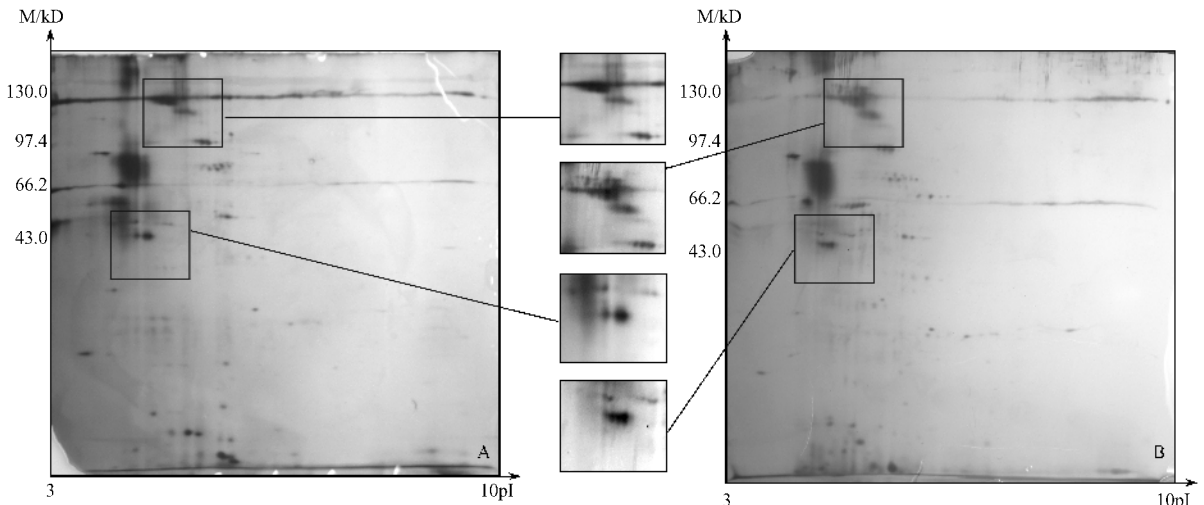


图 1 Lysis C、Lysis D 处理 Bt 4.0718 杀虫晶体蛋白的双向电泳图谱

Fig. 1 The 2-DE maps of ICPs from *Bacillus thuringiensis* strain 4.0718 prepared by Lysis C and Lysis D

A. Preparation of ICPs from *Bacillus thuringiensis* strain 4.0718 using Lysis C ; B. Preparation of ICPs from *Bacillus thuringiensis* strain 4.0718 with Lysis D.

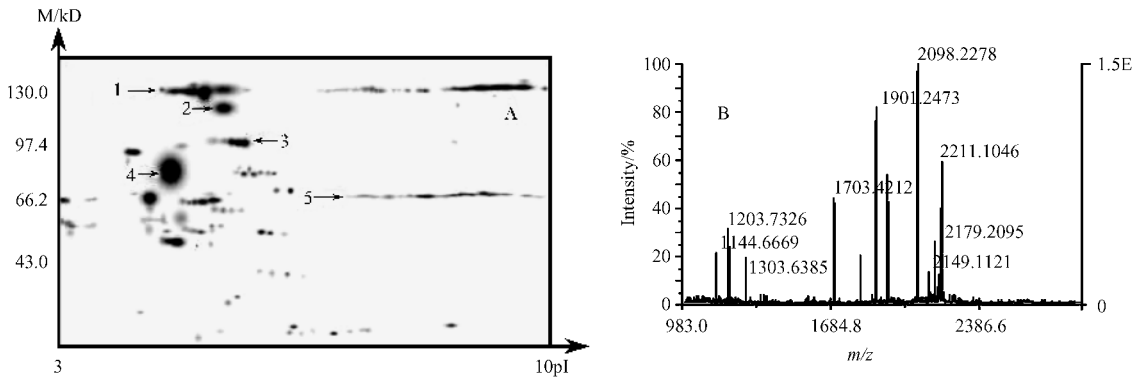


图 2 Bt 4.0718 杀虫晶体蛋白的 gel spot 图及其 1 号点的肽质量指纹图

Fig.2 2-D electrophoresis pattern of ICPs from *Bacillus thuringiensis* strain 4.0718 (A) and Peptides mass fingerprint of spot 1 (B)

2.3 MALDI-TOF-MS-PMF 数据的数据库查询结果

覆盖情况见表 2。2 号点、3 号点和 4 号点的鉴定结果和 1 号

1 号点和 5 号点的鉴定结果可信度高,蛋白质的匹配和

点一致,均属于 Cry1Ac 蛋白。

表 2 Bt 4.0718 杀虫晶体蛋白部分蛋白质点的鉴定结果

Table 2 Proteins from ICPs of Bt4.0718 identified by MALDI-TOF-MS

Spot No.	Protein name	Database accession No.	Peptide matched	Mass/Da	pI	Peptide masses	Residue
1	Cry1Ac	Swiss-prot P05068 , 23% sequence coverage	19	134160	5.03	1238.16	182 ~ 192
						1285.20	199 ~ 209
						1039.16	210 ~ 217
						2179.17	235 ~ 253
						1901.09	266 ~ 281
						2197.10	293 ~ 311
						1204.27	350 ~ 360
						2149.07	404 ~ 423
						1145.17	450 ~ 458
						2118.10	459 ~ 478
						2211.10	479 ~ 500
						1704.18	512 ~ 526
						1827.15	754 ~ 768
						2098.21	861 ~ 879
						2606.16	942 ~ 965
						1304.22	966 ~ 976
						1425.13	995 ~ 1006
						1956.15	1007 ~ 1023
						5	Cry2Aa
1410.77	113 ~ 125						
1843.79	190 ~ 206						
1915.30	218 ~ 232						
1492.57	413 ~ 424						
1067.91	425 ~ 434						
1768.51	435 ~ 448						
1058.54	462 ~ 470						

3 讨论

3.1 杀虫晶体蛋白双向电泳图谱的获得

1994 年 Marc Wilkins 和 Keith Williams 提出蛋白质组这一概念,并于 1995 年首次发表^[12],之后蛋白质组在生物学界得

到了充分关注,药物、毒物、农作物蛋白质组等概念相继被提出,蛋白质组分析的核心技术——双向电泳也随之成为生物研究的热点技术之一。但迄今为止,国内外很少见把双向电泳技术应用于苏云金杆菌杀虫晶体蛋白性质研究的报道。因此,对于苏云金杆菌伴孢晶体中杀虫晶体蛋白的种类组

成、分子量及其等电点性质, 这些信息有待进一步了解。本研究对裂解液组成、上样量、聚焦时间等相关技术进行了试验, 建立了苏云金杆菌杀虫晶体蛋白的双向电泳分析方法。

苏云金杆菌伴孢晶体蛋白中所含的蛋白质种类较少^[13], 但主要蛋白 Cry1 和 Cry2 含量很高(约占细胞干重的 25%)^[14], 且分子量大, 疏水性强, 含二硫键多, 在进行双向电泳时, 蛋白质聚焦困难^[15], 要解决 Cry1 和 Cry2 类杀虫晶体蛋白聚焦的问题, 首先应该研究溶解蛋白的裂解液, 尽可能的溶解和解聚蛋白质, 是晶体蛋白双向电泳技术的关键。

3.1.1 裂解液的组成 本研究设计了 A、B、C、D 和 E 共 5 种裂解液。B 与 C 主要比较硫脲的作用。图谱结果表明, 加入硫脲后, 减少了横竖条纹, 使胶面清晰, 并导致 130 kD 蛋白双向电泳转移增加。说明硫脲不仅能够促进蛋白的溶解, 还大大提高了大分子蛋白入胶的能力^[16]。D 与 C 相比较, 用 IPG buffer 代替 Bio-lyte, 极大地提高了蛋白质的溶解度, 使蛋白质聚焦过程完成得更好, 显示出了聚焦效果最好的图谱。E 是在 D 裂解液的基础上, 增加了 1% 的 NP-40。NP-40 是非离子去垢剂, 能够与蛋白质暴露出来的疏水中心结合, 减少蛋白质之间的聚合, 但结果却与预期相反。NP-40 的增加并没有提高 Cry1 和 Cry2 蛋白的聚焦情况, 其他大分子蛋白聚焦情况也不理想, 显示出晶体蛋白特殊的化学性质。

3.1.2 上样量 不同的上样量对于杀虫晶体蛋白双向电泳非常重要。上样量过高, 高丰度蛋白聚焦困难, 同时还影响其他蛋白质点的检测。上样量过低, 一些低丰度的蛋白质点显现不出来。在本实验条件下, 经过反复摸索, 最终采用 300 μ g 的上样量, 能达到理想效果。

3.1.3 IPG 等电聚焦 在 IPG 胶条的选用上, 使用较长和 pH 范围较宽的胶条, 收到了很好的效果。在等电聚焦上, 根据 Cry1 和 Cry2 类蛋白难以聚焦的特点, 将总电压时间积延长到 44110 Vhs。但进一步提高总电压时间积, 并不能够收到更好的效果。

3.2 PMF 鉴定结果的分析

Spot 1 :Cry1Ac 是对鳞翅目幼虫总体上毒力高的晶体蛋白, 能够毒杀鳞翅目的棉铃虫 (*Helicoverpa armigera*), 烟青虫 (*H. assulta*), 烟草夜蛾 (*H. virescens*) 和谷食夜蛾 (*Heliothis zea*)^[17, 18]。Cry1Ac 由 1178 个氨基酸组成, 其中 C 半段第 660 ~ 1150 个氨基酸残基, 部分表现为 β 折叠的二极结构, 主要用来维持晶体形成, N 半段形成抗胰蛋白酶核心片段, 部分表现为 α -螺旋结构, 是发挥毒力所必需的功能区域。在 Spot 1 的检索结果中, 我们既能够得到 N 端降解片段, 也能够得到 C 端降解片段。说明 Cry1 类原毒素经过样品裂解液处理后, 原毒素 N 半段的抗胰蛋白酶核心片段在结构上发生了变化, 能够被胰蛋白酶降解, 而 C 端结构也相应发生变化, 对胰蛋白酶的敏感性降低, 不再从 C 端开始降解成小片段。

Spot 5 :Cry2Aa 是对鳞翅目和双翅目幼虫都有毒力的晶体蛋白, 由 633 个氨基酸组成。根据晶体结构分析可知, Cry2Aa 与 Cry1Ac 毒素核心片段整体构造相似, 由三个结构域组成, 但 Cry2Aa 与 Cry1Ac 相比, 结构域 II 的第二个 β 折叠

层中的一条 β 链被一段 α 螺旋取代, 这可能直接导致它与 Cry1Ac 之间毒性的差异。

目前对于苏云金杆菌杀虫晶体蛋白的分离纯化主要采用 SDS-PAGE 和层析柱, 这两种技术的分离效果都相当有限, SDS-PAGE 只能分离上十条蛋白带, 层析柱分离也只显示出少数几个峰, 直接影响了蛋白质的下游操作。为了提高蛋白质的分辨率, 本研究首次将双向电泳技术运用于杀虫晶体蛋白研究, 分离得到 170 多个蛋白质点, 大大提高了蛋白质的分辨率, 为 Bt 杀虫晶体蛋白的进一步鉴定奠定了重要的基础。

MALDI-TOF-MS 是近十多年来才发展起来的一种软离子化技术的新型质谱, 目前在蛋白质组研究中应用得比较广泛。但是 MALDI-TOF-MS 能否鉴定、分辨出序列同源率达到 95% 的杀虫晶体蛋白, 尚待研究。本研究对 5 个大分子量蛋白质点进行 MALDI-TOF-MS、PMF 分析, 成功的鉴定出对鳞翅目幼虫毒力高的 Cry1Ac 和对鳞翅目、双翅目幼虫都有毒力的 Cry2Aa, 为下一步对其他高毒力菌株的杀虫晶体蛋白鉴定以及新型的重组基因表达的融合毒蛋白的研究提供了重要的技术方法。

参考文献

- [1] Hofte H, Whiteley H R. Insecticide crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Micro Rev*, 1989, **53**(2): 242 - 255.
- [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. *生命科学研究*, 2001, **3**(3): 242 - 245.
- [3] 夏立秋, 邹先琼, 莫湘清. 苏云金杆菌 4.0718 菌株杀虫晶体 65kD 原毒素的质谱分析. *激光生物学报*, 2001, **10**(4): 281 - 284.
- [4] 丁学知, 夏立秋, 高必达. 苏云金杆菌 4.0718 高毒力杀虫菌株发酵条件的研究. *食品与发酵工业*, 2003, **29**(2): 26 - 29.
- [5] 丁学知, 夏立秋. 苏云金杆菌高毒力菌株 4.0718 的快速选育. *中国生物防治*, 2001, **17**(4): 163 - 166.
- [6] 王瑛, 白成, 温洁. 苏云金杆菌晶体与芽孢分离的研究. *微生物学报*, 1980, **20**(3): 285 - 288.
- [7] Bollag D, Edelstein S. *Protein Methods*. 2nd ed. New York: Wiley Liss, Inc, 1996 **50**: 50 - 55.
- [8] Bergman A C, Benjamin T, Alaiya A, et al. Identification of gel separated tumor make proteins by mass spectrometry. *Electrophoresis*, 2000, **21**(3): 679 - 686.
- [9] 郭尧君. 蛋白质电泳实验技术. 北京: 科学出版社, 1999, 141 - 142.
- [10] Fernandez J, Gharahdaghi F, Misehe S M. Routine. Identification of proteins from sodiumdodecyl sulfatepolyacrylamide gel electrophoresis (SDS - PAGE) gels or polyvinyl difluoridemembranes using matrix assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS). *Electrophoresis*, 1998, **19**: 1036 - 1045.
- [11] Gharahdaghi F, Weinberg C R, Meagher D A, et al. Mass spectrometric identification of proteins from silver stained polyacrylamide gel: A method for the removal of silver ions to enhance sensitivity. *Electrophoresis*, 1999, **20**: 601 - 605.

- [12] Wasinger V C , Cordwell S J , Cerpa-Poljak A , *et al.* Progress with gene-product mapping of the Mollicutes : *Mycoplasma genitalium*. *Electrophoresis* , 1995 , **16** (7) : 1090 - 1094.
- [13] 胡宏源, 夏立秋, 丁学知, 等. 苏云金芽孢杆菌伴孢晶体 20kbDNA 中 Cry1Ac 基因的克隆、高效表达和生物活性研究. *生物工程学报*, 2004 , **20** (5) : 656 - 661.
- [14] 黄大昉 林 敏. 农业微生物基因工程. 北京 : 科学出版社, 2001 : 210 - 211.
- [15] 陈主初 梁宋平. 肿瘤蛋白质组学. 湖南 : 湖南科学技术出版社 2002 : 8 - 9.
- [16] Pasquali C , Fialka I , Huber L A. Preparative two-dimensional gel electrophoresis of membrane proteins. *Electrophoresis* , 1997 , **18** (14) : 2573 - 2581.
- [17] 丁学知, 刘全兰, 夏立秋, 等. 苏云金芽孢杆菌 4.0718 菌株的杀虫晶体蛋白基因分析. *微生物学报*, 2003 , **43** (3) : 413 - 417.
- [18] 夏立秋, 孙运军, 莫湘涛, 等. 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. *生物工程进展* , 2002 , **22** (1) : 73 - 76.

Analysis of insecticidal crystal proteins from *Bacillus thuringiensis* strain 4.0718 through two-dimensional gel electrophoresis and MALDI-TOF-Mass spectrometry

SONG Sheng XIA Li-qiu HUANG Jiang-li SUN Yun-jun DING Xue-zhi*

(Microbiology Key Laboratory , Hunan Normal University , Hunan Province , Changsha 410081 , China)

Abstract : The present study analyses the insecticidal crystal proteins (ICPs) from *Bacillus thuringiensis* strain 4.0718 through two-dimensional electrophoresis and matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS). By comparing and optimizing the composition of lysis solution , the volume of sample loading and the protocol for isoelectric focusing , a well-focused 2-DE map with high resolution and reproducibility was achieved for the first time. And after an tryptic enzymolysis and a test of part of protein spots by means of MALDI-TOF-MS , the peptides mass fingerprint (PMF) was obtained and , by referring to Swiss-Prot , Cry1Ac and Cry2Aa contained in Bt 4.0718 were identified , with their molecular weights 134160 Da and 71097 Da respectively.

Key words : *Bacillus thuringiensis* , Proteome , Two-dimensional gel electrophoresis , Insecticidal crystal proteins , MALDI-TOF-MS

Foundation item : National Nature Science Foundation of China (30270037 , 30470043) ; National Programs for High Technology Research and Development of China (2002AA245021)

* Corresponding author. Tel 86-731-8872298 ; Fax 86-731-8872260 ; E-mail : xzding123@tom.com

Received date : 09-10-2004

《微生物学报》投稿要求

1. 投稿范围 : 凡有关微生物学基础研究、应用基础研究及其高技术创新等领域的研究成果, 包括普通微生物学、工业、农业、医学和兽医微生物学、免疫学以及与微生物学有关的生物工程等方面的研究报告、简报等, 本刊均欢迎投稿。
2. 应首次发表 : 所有来稿均应未在公开出版的刊物上发表过。要求论点明确、数据可靠、行文简练、用词规范、图表清晰、结论合理。
3. 投稿方式 : 本刊中英文稿件均收, 采用邮寄投稿, 并同时要求提供电子版 (附盘或 E-mail 传来 actamicro@sun.im.ac.cn), 要求五号宋体、A4 纸单面打印稿 2 份。(注 : 若事先已通过 E-mail 投稿, 请您在邮寄纸稿时注明字样——已 E-mail 投稿)
4. 介绍信 : 所有来稿要求一式两份。论文是否涉及保密、署名是否无误, 请出示研究内容所属单位 (通常为第一署名单位) 的介绍信。若是与国外作者合写的论文, 应出示国外作者同意以中文形式发表及署名顺序的信函说明。
5. 审稿费 : 投稿时请随寄 100 元审稿费, 可通过邮局汇来。(务请在汇款单上注明稿件第一作者、发票应开单位、发票抬头地址和收信人。)
6. 作者联系方式 : 请在投稿时提供通讯作者和第一作者的 Tel、Fax、E-mail 地址 (请不要提供“ sina 信箱”)。
7. 投稿及汇款地址 (100080) 北京中关村中国科学院微生物研究所内 《微生物学报》编辑部
欲知更详细的投稿要求请登陆我刊的网址 : [Http //www.im.ac.cn/journals](http://www.im.ac.cn/journals)