

马传染性贫血病毒 N-连接糖基化回复突变的感染性克隆构建

韩秀娥, 全滢平, 高旭, 相文华*, 周建华*

(中国农业科学院哈尔滨兽医研究所, 兽医生物技术国家重点实验室大动物病室, 哈尔滨 150001)

摘要: 根据马传贫强毒株 EIAV-L 和疫苗株 EIAV-FDD 表面蛋白 gp90 的 N-连接糖基化的变化规律, 采用 PCR 定点突变的方法, 对全长感染性克隆 pLGFD3-8 上的 N-连接糖基化的差异区域进行改造后, 构建成含有 3 个 N-连接糖基化位点突变的感染性克隆 pLGN191N236N246。将其转染驴胎皮肤细胞 (FDD), 通过用逆转录酶活性、间接免疫荧光和 RT-PCR 方法检测而确定其感染性。结果表明, 在 FDD 细胞中盲传三代后, 在细胞培养物中可检测到逆转录酶活性, RT-PCR 和间接免疫荧光检测均呈阳性, 电镜下见到典型的 EIAV 颗粒。这一结果可能对 N-连接糖基化在我国马传贫弱毒疫苗致弱机理的作用研究而奠定良好的基础。

关键词: 马传染性贫血病毒; N-连接糖基化; 定点突变; 感染性克隆

中图分类号: S852.65, Q78 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2008) 03-0287-06

马传染性贫血病毒(Equine infectious anemia virus, EIAV)与人免疫缺陷病毒(Human Immunodeficiency Virus Type 1 HIV-1)同属反转录病毒科慢病毒属^[1], 两者具有非常相似的基因组结构、复制方式以及蛋白种类和功能。这两种病毒都通过血液方式传播, 特异性感染白细胞, 并能整合于染色体而形成持续感染。因此, 无论是 EIAV 还是 HIV 的研究结果都会对阐明慢病毒的生物学特性起到重要的借鉴作用。近年研究表明, HIV 囊膜基因 N-连接糖基化与病毒的嗜性、感染性和抗体中和作用密切相关^[2-7]。据此, 用于研究 N-连接糖基化在我国 EIAV 弱毒疫苗株的细胞嗜性、感染性和病毒中和的作用, 以进一步揭示我国马传贫弱毒疫苗的致弱和保护机理, 可能拓展 HIV 等慢病毒免疫研究的视野, 或许会突破其他慢病毒不能免疫的屏障。

本试验对中国 EIAV 强毒辽宁株(L 株)及弱毒株的序列(DLV 株和 FDD 株)进行了测定和分析, 我国

马传染性贫血病毒强、弱毒囊膜基因 gp90 之间差异很大, 具有明显的规律性。在病毒基因的 V3 到 V5 区, 变异规律尤为明显, 且与推定的 N-连接糖基化的个数密切相关。经序列分析与氨基酸比较发现, 在 gp90 基因 V3 到 V5 区, 强毒存在 3 个 N-连接糖基化位点, 对应的位置是 N-191 位, N-236 位, N-246 位, 而弱毒的对应区域不存在 N-连接糖基化位点。为此, 我们将感染性克隆 pLGFD3-8 株进行了糖化突变, 构建了含有 3 个 N-连接糖基化突变的分子克隆, 并获得相应的衍生病毒。其结果为进一步研究 N-连接糖基化在我国马传贫弱毒疫苗的致弱过程中的作用奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验材料: EIAV 全基因克隆质粒 pLGFD3-8 是基于低拷贝载体 pLG338 的基础上构建的 EIAV 驴

基金项目: 国家“973 项目”(2001CCA00600); 黑龙江省发展高新技术产业专项资金项目(FW05B007)

*通讯作者。相文华: Tel: +86-451-85935072; Fax: +86-451-85935024; E-mail: xiangwenhua1@yahoo.com; 周建华: Tel: +86-451-85935040; Fax: +86-451-85935024; E-mail: jianhua_uc@126.com

作者简介: 韩秀娥(1978-), 女, 黑龙江省佳木斯人, 博士生研究生, 研究方向为病毒分子生物学与免疫学研究。

E-mail: hanxiue_2005@163.com。

收稿日期: 2007-07-09; 修回日期: 2007-11-06

胎皮肤细胞疫苗株全基因感染性克隆、驴胎皮肤细胞 (FDD)、驴胎皮肤细胞弱毒 (FDDV)、大肠杆菌 (*Escherichia coli*)DH5 α 、马传染性贫血病毒阳性血清和阴性血清均由哈尔滨兽医研究所慢病毒研究组提供。

1.1.2 主要试剂和仪器：FITC 标记兔抗马 IgG 购自 Solarbio 公司；脂质体转染试剂盒 (LipofectamineTM2000 reagent)、鼠源反转录试剂盒 (M-MLV Reverse Transcriptase) 购自 Invitrogen 公司；Reverse Transcriptase Assay

Colorimetric kit 购自 Roche 公司；前病毒 DNA 及病毒 RNA 提取试剂盒均购自 Qiagen 公司。低温高速离心机 (SIGMA,PK-15)、PTC-100TM Programmable Thermal Controller PCR 仪 (PTC-100TM, MJResearch. INC)、紫外分光光度计 (UltraspecR3000, Pharmacia Biotech INC)、透射电子显微镜 (JEM-1200EX, 上海)、CO₂ 恒温培养箱 (WMZK-01, 上海医用仪表厂)。

1.1.3 引物：表 1 为本实验所用到的引物。

表 1 引物序列
Table 1 Primer sequence

Primers	Sequence (5'→3')	Position in proviral nucleotides of fdd
1F	ACAAAGGGAGGGAAAGTATG	4861-4880
1R	TCGCGATGCATGTCTGTGAT	7347-7328
2F	ATGGTCAGCATTGCATTCTA	5319-5338
2R	TCTCTTGTGTCTGACTAATC	6643-6662
N-191-F	GCAAGTACAGTTGAGGAGAACAGCAGTAACATTA	5858-5892
N-191-R	TAATGTTACTGCTGTCTCTCTCAACTGTACTTGC	5892-5858
N-236-F	GAAGTAGAAATGCAGCAAAGCGATAATAACACTTGGATTCC	5991-6031
N-236-R	GGAATCCAAGTGTATTATCGCTTTGCTGCATTCTACTTC	6031-5991
N-246-F	GATTCAAAAAGGTGTAATGAACTTGGGCTAGGG	6032-6066
N-246-R	CCCTAGCCCAAGTTTCATTACACCTTTTGGAAATC	6066-6032

1.2 基因突变

利用 PCR 技术进行定点突变, PCR 反应体系为 50 μ l, 反应条件: 95 2min; 95 30s, 55 30s, 75 16min, 18 个循环; 75 16min。PCR 反应结束后, 加入 DpnI(20U), 37 消化 1h, 将消化后产物直接转化大肠杆菌 DH5 α , 依据氨苄青霉素抗性初步判断是否完成突变, 将初步筛选的阳性克隆送上海生物工程技术有限公司进行序列测定。

1.3 全基因组突变型嵌合质粒的构建

以 1F、1R 为引物, 以 pLGF3-8 为模板进行 PCR。回收 PCR 产物 2486bp 的片段。将其连入 pMD18-T 中得到克隆 pMD18-Tenv。在 pMD18-Tenv 上利用 overlap PCR 进行突变操作, 以 N-191-F、N-191-R 为引物, 获得了克隆 pMD18-T-N191; 以 pMD18-T-N191 为模板, 以 N-236-F、N-236-R 为引物进行突变, 获得了克隆 pMD18-T-N191N236; 以 pMD18-T-N191N236 为模板, 以 N-246-F、N-246-R 为引物进行突变, 获得了克隆 pMD18-T-N191N236N246。用 *Nco*、*Nru* 双酶切 pMD18-T-N191N236N246, 并与 pLGF3-8 的 *Nco*、*Nru* 双酶切的大片段相连获得了全基因克隆 pLGN191N236N246。

1.4 质粒转染和病毒传代

用 QIAprep Spin Miniprep Kit 试剂盒, 纯化质粒 DNA 至 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 比值为 1.7~1.8, -70 保存备

用。转染前, 将 FDD 细胞消化至 35mm 6 孔细胞培养板中, 每孔 4 \times 10⁵ 个细胞, 2mL 培养液在 37 $^{\circ}$ C、体积分数 5%CO₂、饱和湿度条件下培养, 当 FDD 细胞生长至 60%~80% 汇合度, 取 4 μ g 质粒转染细胞, 转染方法参照脂质体转染试剂盒 (LipofectamineTM2000 reagent) 说明书进行, 转染细胞培养 6h 后, 弃去培养物, 换成 3%BCS、1%SP 的新培养液继续培养; 10~15d 后待细胞出现明显细胞病变 (cytopathiceffect, CPE), 将细胞培养物反复冻融 2 次作为毒种在 FDD 细胞上继续传代, 每代 10~15d 收毒。

1.5 病毒 RNA 提取及 RT-PCR

细胞接毒后培养 10~15d, 收集培养上清 140 μ l 按照试剂盒说明书操作提取病毒 RNA 并用 DNA 酶消化去除质粒污染。以 2R 为引物进行反转录合成第一链 cDNA。以其为模板用 2F、2R 为引物进行 PCR, 其产物大小为 1347bp。PCR 反应条件: 95 5min; 95 30s, 49 30s, 72 1min, 30 个循环; 72 10min。取 5 μ l PCR 产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳分析。

1.6 免疫荧光检测

将 FDD 细胞传至 96 孔细胞培养板, 24h 后, 接种 vpLGF3-8、vpLGN191N236N246, 设立正常的 FDD 细胞和 FDDV 感染细胞作对照; 37 $^{\circ}$ C 培养 10d 后, 吸弃培养液, 无水乙醇固定 10min; 0.5% PBST 洗涤 3 次, 每次 3min, 分别加入 EIAV 感染马阳性血清、马

阴性血清(1:100 稀释), 37 °C 孵育 1h 后, 加入 FITC 标记鼠抗马 IgG 50 μ L(1:50 稀释), 37 °C 孵育 30min; 用 PBST 洗 3 遍, 荧光显微镜下观察。

1.7 逆转录酶活性检测

细胞培养上清 4 mL、8000 \times g 离心 10min; 将上清转移至新离心管, 按每 2mL 悬浮物中加 1mL PEG 溶液比例加入 PEG 试剂, 充分混合后于冰上孵育过夜; 次日, 混合样品用 Reverse Transcriptase Assay Colorimetric kit 测定培养物中的逆转录酶活性。

1.8 电镜观察

在 FDD 细胞上接毒后, 37 °C 培养至细胞出现明显 CPE 变化, 即细胞皱缩, 变圆, 脱落, 形态改变时, 收取细胞制备电镜切片, 用透射电镜观察其病毒颗粒。

2 结果和分析

2.1 gp90 基因 V3-V5 区 N-连接糖基化的突变

根据我国 EIAV 强、弱毒 N-连接糖基化位点的差异,

以 EIAV 弱毒感染性分子克隆 pLGFD3-8 为基础进行突变, 最终获得了全基因克隆 pLGN191N236N246。突变前后核苷酸序列变化。其中 N-191 位糖基化的变异包含 3 个碱基的突变, 这 3 个碱基的突变引起了 3 个氨基酸的改变: 在强毒中这 3 个氨基酸是 Lys、Gln、Ser, 在弱毒中对应的这 3 个氨基酸依次是 Gln、Lys、Asn; N-236 位糖基化的变异包含 3 个碱基的缺失和一个碱基的突变, 这 3 个碱基的缺失和一个碱基的突变导致 1 个氨基酸的缺失和 1 个氨基酸的突变: 强毒中的 Asp 在弱毒中缺失, 强毒中的 Asp 变异为弱毒中 Lys; N-246 位糖基化的变异包含 2 个氨基酸的改变。

2.2 转染和感染性结果

2.2.1 转染及细胞病变: 将获得的全长嵌合克隆 pLGN191N236N246 质粒以 4 μ g 质粒转染六孔板培养 FDD 细胞, 设立阴性对照和阳性对照(pLGFD3-8)。经过 FDD 细胞连续传代后病变明显, 细胞变暗、圆缩或变成线状, 部分细胞脱落(图 1)。



图 1 pLGFND191N236N246 衍生病毒在 FDD 细胞上 CPE 变化(40 \times)

Fig. 1 CPE phenomenon of pLGN191N236N246-derived virus displayed on FDD(40 \times). A: FDD cell culture; B: FDD cell culture infected with pLGN191N236N246-derived virus; C: FDD cell culture infected with pLGFD3-8-derived virus.

2.2.2 RT-PCR 鉴定: 于转染后不同盲传细胞代次接种 10~15d 后取细胞上清进行 env 基因的 RT-PCR 检测, 结果显示, 在 pLGN191N236N246 转染组的细胞中第三代可检测到特异性扩增产物, 其大小为 1347bp, 其它对照转染组均未发现有扩增现象。这些结果表明获得了具

有感染性的全长质粒, 并通过细胞转染得到了相应的衍生病毒(图 2)。

2.2.3 间接免疫荧光检测: 衍生病毒感染 FDD 细胞 10~15d 后, 进行间接免疫荧光检测, 结果感染的 FDD 细胞膜表面和细胞浆内均显示强烈绿色荧光信号, 而未感染 FDD 细胞则无荧光信号(图 3)。

2.2.4 逆转录酶活性分析: 在 FDD 细胞上收集 pLGN191N236N246 第三代衍生病毒培养上清进行 RT 酶活性检测, 设立阴性对照和阳性对照(pLGFD3-8)。结果表明: 在 FDD 细胞上所显示的逆转录酶活性与其父本相似(表 2)。

2.3 衍生病毒在 FDD 细胞上的电镜观察

用质粒 pLGN191N236N246 转染获得的衍生病毒接种 FDD 细胞, 通过透射电镜在细胞浆以及细胞间隙可观察到有大量呈球形的病毒粒子, 直径约为

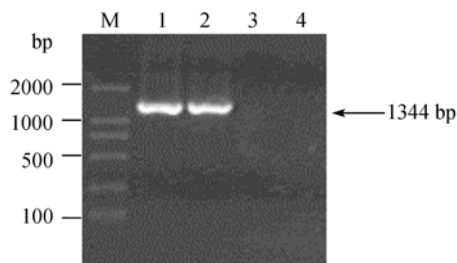


图 2 细胞转染后传代细胞中 env 片段 RT-PCR 检测
Fig. 2 RT-PCR for env fragment in the supernatant. M:DL 2000 Marker; 1. pLGN191N236N246 cultured in FDD; 2. pLGFD3-8 cultured in FDD; 3. cell negative control; 4. PCR negative control.

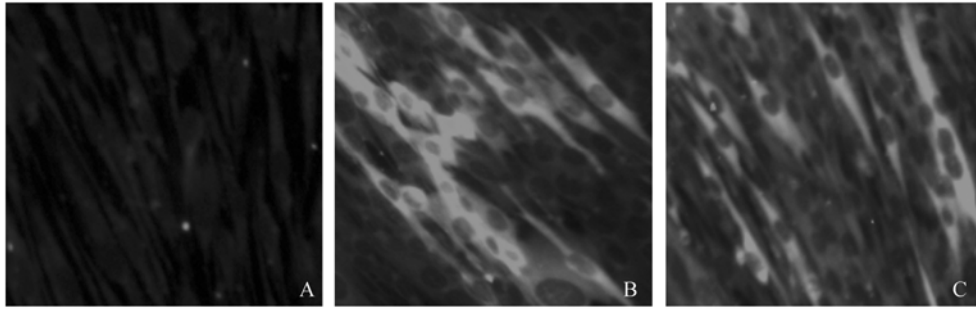


图 3 pLGFND191N236N279 与 pLGFD3-8 感染 FDD 细胞免疫荧光变化(200×)

Fig. 3 Indirect immune fluorescence assay of pLGFND191N236N246 and pLGFD3-8(200×). A: FDD cell negative control; B: FDD cell infected with pLGN191N236N246-derived virus; C: FDD cell infected with pLGFD3-8-derived virus.

表 2 嵌合克隆 pLGFND191N236N246 第五代衍生病毒在细胞培养上清中逆转录酶活性检测

Table 2 Comparison of Reverse transcriptase activity of pLGFND191N236N246 in the 5th passage of cells culture

Samples	Cell control (FDD)	pLGFD3-8 (FDD)	pLGN191N236N246
RT activity	-	+++	+++

90~120nm, 具有锥形的核心, 为典型的马传染性贫血病毒粒子(图 4), 证实 pLGN191N236N246 衍生毒对驴胎皮肤细胞具有感染性, 可以在驴胎皮肤细胞中很好增殖。

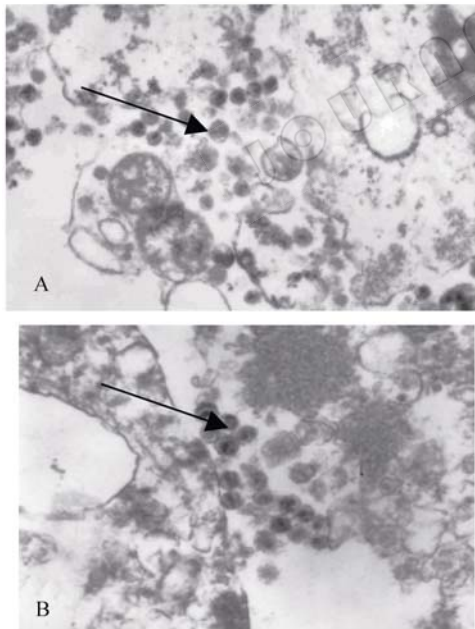


图 4 感染性克隆衍生病毒电镜观察结果(40×)

Fig. 4 Electron micrograph of EIAV infectious molecular clone (40×). A: FDD cell infected with pLGN191N236N246-derived virus; B: FDD cell infected with pLGFD3-8-derived virus.

3 讨论

马传染性贫血病毒(equine infectious anemia virus, EIAV)、人免疫缺陷病毒(Human Immunodeficiency Virus Type 1 HIV-1)以及猴免疫缺陷病毒(Simian immunodeficiency virus SIV)等慢病毒均能逃逸宿主的免疫监控并呈持续性感染, 其可能原因之一是病毒表面蛋白的高度糖基化结果^[8, 9]。在这些慢病毒蛋白中存在的高度糖基化结构即可遮掩潜在的抗原表位, 又能保护病毒蛋白免受蛋白酶的降解, 致使其不易被抗原提呈细胞提呈, 不能被机体的免疫系统所识别, 从而得以长期潜伏于机体内。EIAV gp90 是高度糖化的蛋白, 根据毒株不同分别含有 13-21 个 N-连接糖基化位点, 还有几个 O-连接糖基化位点, 糖侧链分子量几乎占 gp90 总分子量的一半。糖侧链掩盖着糖蛋白抗原表位, 同时糖蛋白也像面罩一样掩盖病毒逃避免疫系统的识别^[10]。我们研究发现: 我国 EIAV L 株 gp90 有 21 个 N-连接糖基化位点, DA 株有 19 个, DLV 株有 15 个; 强毒 wenv17 和 wenv16 均有 17 个 N-连接糖基化位点, 其亲本非致病性 PSPEIAV19 有 12 个, 1369 株有 13 个^[11]。在同一毒株系列内, N-连接糖基化位点增多病毒毒力随之增强。这一现象提示我们, 在相同毒株背景下, 糖侧链越多所遮蔽的抗原表位越多, 越难以激发机体免疫系统的有效应答, 机体不能迅速清除病毒, 受到的损害越严重, 表现为病毒毒力增强。同时, 其它慢病毒的糖侧链对病毒抗原也有遮蔽作用, 对 SIV 的研究中也发现伴随着 N-连接糖基化位点增多病毒毒力增强^[12]。对我国 EIAV 疫苗制备过程中的不同代次的病毒基因序列比较发现, 由于基因序列突变而导致的 N-连接糖基化

位点的改变与传代过程中病毒对动物的毒力关系密切。其中 N-191 位糖基化位点的改变出现在 29 代以前, 病毒毒力由原始毒株的 100% 发病降为 67%; N-236 位糖基化位点的变异出现在 106 代以前, 而此时病毒毒力下降为 8%~0% 发病。可见 N-236 位糖基化位点变异对于病毒毒力有较大影响, 属于影响病毒毒力的关键性变异。这一结果将 N-连接糖基化位点的变异与病毒的生物学特性的改变联系起来, 对于确定 N-连接糖基化位点变异引起的生物学意义具有重要指导作用。

近年来, 尤其是 1983 年人类发现 HIV-1 以后, 世界范围内广泛开展了对 EIAV 分子生物学的研究并取得了很多成果, 尤其是反向遗传技术的发展为慢病毒的研究提供了新的思路和手段。到目前为止已经构建了多个 EIAV 感染性克隆用于病毒各基因功能及其与病程之间关系的研究^[13-15]。本研究在马传贫强毒株 EIAV-L 和疫苗株 EIAV-FDD 囊膜基因序列分析的基础上, 以弱毒疫苗株全长感染性克隆 pLGF3-8 为亲本, 选取囊膜基因 gp90 的 N-连接糖基化的差异区域, 利用反向遗传技术对其进行 PCR 体外定点突变, 首次成功构建了含有 3 个 N-连接糖基化位点突变的感染性克隆 pLGN191N236N246, 转染 FDD 细胞并传代后, 经逆转录酶活性、RT-PCR 和间接免疫荧光检测, 证明成功拯救出相应的衍生病毒。电镜观察表明, 嵌合病毒克隆可在细胞传代培养中产生典型的 EIAV 病毒颗粒。这一结果为进一步研究 N-连接糖基化在我国马传染性贫血病毒致弱过程中的作用奠定了良好的基础, 同时将有助于解释马传染性贫血病毒的减毒机制, 也为 HIV 疫苗研制提供直接的理论依据。

参 考 文 献

- [1] Leroux C, Cadorea J, Montellaro RC. Equine infectious anemia virus (EIAV): what has HIV's country cousin got to tell us? *Vet Res*, 2004, 35: 485-512.
- [2] Losman B, Biller M, Olofsson S, et al. The N-linked glycan of the V3 region of HIV-1 gp120 and CXCR4-dependent multiplication of a human immunodeficiency virus type 1 lymphocyte-tropic variant. *FEBS Lett*, 1999, 454: 47-52.
- [3] Losman B, Bolmstedt A, Schonning K, et al. Protection of neutralization epitopes in the V3 loop of oligomeric human immunodeficiency virus type 1 glycoprotein 120 by N-linked oligosaccharides in the V1 region. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 2001, 17: 1067-1076.
- [4] Mellquist JL, Kasturi L, Spitalnik SL, et al. The amino acid following an asn-X-Ser/Thr sequon is an important determinant of N-linked core glycosylation efficiency. *Biochemistry*, 1998, 12: 6833-6837.
- [5] Ohgimoto ST, Shioda K, Mori E, et al. Location-specific, unequal contribution of the N glycans in simian immunodeficiency virus gp120 to viral infectivity and removal of multiple glycans without disturbing infectivity. *J Virol*, 1998, 72: 8365-8370.
- [6] Schonning K, Jansson B, Olofsson S, et al. Rapid selection for an N-linked oligosaccharide by monoclonal antibodies directed against the V3 loop of human immunodeficiency virus type 1. *J Gen Virol*, 1996, 77: 753-758.
- [7] Sjolander S, Bolmstedt A, Akerblom L, et al. N-linked glycans in the CD4-binding domain of human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein gp160 are essential for the in vivo priming of T cells recognizing an epitope located in their vicinity. *Virology*, 1996, 215: 124-133.
- [8] Desrosiers RC. Strategies used by human immunodeficiency virus that allow persistent viral replication. *Nat Med*, 1999, 5: 723-725.
- [9] Kahler S. Immunologic response to EIAV offers hope for AIDS treatment. *J Am Vet Med Assoc*, 1992, 201(11): 1672-1673.
- [10] Stephen DJ, Embretson DC, Anderson JL, et al. Sequence analysis and acute pathogenicity of molecular cloned SIV_{SMM-PBJ14}. *Nature*, 1990, 345: 636-639.
- [11] Payne SL, XM Qi, H Shao, et al. Disease induction by virus derived from molecular clones of equine infectious anemia virus. *J Virol*, 1998, 72: 483-487.
- [12] Marthas ML, RA Ramos, Lohman K, et al. Viral determinants of simian immunodeficiency virus(SIV) virulence in rhesus macaques assessed by using attenuated and pathogenic molecular clones of SIV_{MAC}. *J Virol*, 1993, 67: 6047-6055.
- [13] Payne SL, Qi XM, Shao H, et al. Disease induction by virus derived from molecular clones of equine infectious anemia virus. *J Virol*, 1998, 72 (1): 483-487.
- [14] Cook RF, Leroux C, Cook SJ, et al. Development and characterization of an in vivo pathogenic molecular clone of equine infectious anemia virus. *J Virology*, 1998, 72 (2): 1383-1393.
- [15] Leroux C, Craig J K, Issel C J, et al. Equine infectious anemia virus: genomic evolution in progressor and nonprogressor ponies. *J Virol*, 2001, 75 (10): 4570-4583.

Construction of an Infectious Clone of Equine Infectious Anemia Virus by N-glycosylation Revers-mutations

Xiu e Han, Yanping Quan, Xu Gao, Wenhua Xiang^{*}, Jianhua Zhou^{*}

(National Key Laboratory of Veterinary Biotechnology, Harbin Veterinary Research Institute,
Chinese Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150001, China)

Abstract: To elucidate the role of N-glycosylation in fetal donkey dermal cell (FDD)-attenuated equine infectious anemia virus (EIAV), we constructed an N-glycosylation reverse-mutation molecular clone, pLGN191N236N246. This viral molecular clone was derived from the infectious clone pLGFD3-8 by site-directed mutagenesis. This clone was used to transfect fetal donkey dermal (FDD) cells. Infectious characteristics of transfectants were monitored by RT-PCR, indirect immune fluorescence and reverse transcriptase activity assay. After three passages in FDD cells, viral replications in the supernatant of cell cultures were detected by all the above three methods and viral particles were clearly observed by electron microscopy. The construction of the N-glycosylation reverse-mutation infectious clone provides a solid basis for further study of the mechanism of attenuated pathogenesis and increased immune protection of EIAV attenuated vaccines.

Keywords: equine infectious anemia virus (EIAV); N-glycosylation; site-directed mutagenesis; infectious clone

Supported by the Major Project of China National Programs for Fundamental Research and Development(2001CCA00600) and the Program for Outstanding Scientists from Chinese Academy of Agricultural Sciences in Harbin(2006AA3ASO40)

^{*}Corresponding author. Wenhua Xiang, Tel: +86-451-85935072, Fax: +86-451-85935024, E-mail: xiangwenhua1@yahoo.com; Jianhua Zhou, Tel: +86-451-85935040, Fax: +86-451-85935024, E-mail: jianhua_uc@126.com

Received: 9 July 2007/ Revised: 6 October 2007

2008年起《微生物学报》改为月刊

自2004年《微生物学报》改为大开本(8个印张128页)以来,已经连续两次扩版(2005~2006年为160页,2007年为176页),发表周期有了明显的缩短。但是,由于近年来稿量不断增长,发表周期不得不再度延长,目前的双月刊已无法满足广大作者和读者的需要。为了加快科技信息更新速度,与国际接轨,在编辑部提议下,经主办单位同意并报主管部门正式批准,本刊自2008年开始将1989年以来一直沿用了19年的双月刊改为月刊(9个印张144页),发行日还是4日。

希望广大作者和读者一如既往地支持《微生物学报》!