

利用基因芯片技术区分禽流感病毒主要亚型

杨忠苹¹, 王秀荣^{1*}, 田丽娜¹, 王煜², 陈化兰^{1*}

(¹ 中国农业科学院哈尔滨兽医研究所, 农业部动物流感重点开放实验室, 兽医生物国家重点开放实验室, 哈尔滨 150001)
(² 重庆出入境检验检疫局, 重庆 400020)

摘要:【目的】研制可同时区分 AIV 的 H5、H7、H9 血凝素亚型及 N1、N2 神经氨酸酶亚型的基因诊断芯片。【方法】分别克隆了禽流感病毒的 M 基因, H5、H7、H9 亚型 HA 基因, N1、N2 亚型 NA 基因以及看家基因 GAPDH 的重组质粒。以重组质粒为模板, 用 PCR 方法扩增制备探针, 纯化后点于氨基修饰的片基上, 制备基因芯片。在 PCR 过程中对待检样品进行标记, 然后与芯片杂交, 洗涤, 扫描并进行结果分析。【结果】结果显示检测探针可特异性的与相应的标记样品进行杂交, 呈现较强的杂交信号, 且无交叉杂交。同时用 RT-PCR、鸡胚接种和基因芯片方法对 H1-H15 亚型 AIV 参考毒株、30 份人工感染样品、21 份现地疑似样品进行检测, 结果发现, 对人工感染样品芯片检测方法方法与鸡胚接种和 RT-PCR 的符合率分别为 100% 和 96%, 现地样品符合率为 100%。【结论】研究表明该方法可用于同步鉴别部分主要流行的禽流感亚型, 是一种有效的新技术。

关键词: 基因芯片; 禽流感; 亚型区分

中图分类号: Q936 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2008) 07-0935-06

禽流感病毒 (Avian influenza virus, AIV) 亚型众多, 变异频繁, 现已发现 16 种不同的血凝素抗原型 (HA) 和 9 种不同的神经氨酸酶抗原型 (NA)^[1], 一般认为 H5、H7 抗原型具有高致病力, 并且发现 H5、H7 和 H9 亚型逐渐对人有致病性^[2-4]。目前家禽体内以 H5N1、H9N2 为主要流行亚型, 并且 H5 亚型 AIV 已经具备感染人的能力。世界卫生组织提供的数据显示, 截至到 2008 年 1 月有 350 人感染高致病性禽流感, 其中 218 人死亡, 专家担心, H5N1 病毒继续变异, 可能具备人际间传染的能力, 引发大规模流行病, 因此建立迅速、有效的 H5N1 亚型及其它亚型禽流感病毒的鉴别检测方法对于防制禽流感具有重要意义。传统的病原分离及血清学诊断方法操作繁琐, 无法实现对不同亚型的同步检测, RT-PCR 方法也无法实现对该病毒进行快速、准确、高通量检测分型的目的, 因而需要研究一种能够对流感病毒进行高

通量快速排查、准确鉴别亚型的集成化诊断技术。

生物芯片技术是 20 世纪 90 年代初伴随着人类基因组计划的实施而产生的一门新技术, 经过十多年的发展, 已成为大规模高效获取相关信息的重要手段。它是通过微加工和微电子技术, 将成千上万与生命相关的核酸或蛋白信息集成在硅、玻璃、塑料等材料制成的芯片载体上, 以实现基因、配体、细胞、蛋白质、抗原以及其他生物组分准确、快速地分析和检测。基因芯片在疾病诊断方面具有一定的优势, 与传统检测方法相比, 它可以在一张芯片上同时对多种疾病进行检测, 待测样品用量小并且能特异性检测病原微生物的亚型及变异。

本研究通过制备基因芯片, 进行靶基因扩增和杂交, 建立了 AIV 主要亚型鉴别诊断基因芯片检测方法, 该方法具有很好的特异性、敏感性, 现将研究结果报道如下。

基金项目: 防禽流感高效生物制剂试生产开发(2007DFR30360)

*通讯作者。Tel: +86-451-85935080; Fax: +86-451-82733132; E-mail: wxr@hvri.ac.cn

作者简介: 杨忠苹(1981-), 女, 黑龙江人, 硕士研究生, 从事禽流感分子诊断技术。E-mail: yangzhongping19812@126.com

收稿日期: 2008-01-24; 修回日期: 2008-04-14

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 种毒和病料: A/Goose/Guangdong/1/96 (H5N1), A/African/starling/983/7(H7N1), A/chicken/Heibei/1/2002 (H7N2) and A/Turkey/Wisconsin/1/66 (H9N2) 及本实验所用的其它亚型流感病毒由中国农业科学院哈尔滨兽医研究所农业部动物流感重点开放实验室提供。

1.1.2 主要仪器和试剂: TaKaRa pMD18 T Vector 购自宝生物工程(大连)有限公司, 氨基化和醛基化载玻片购自上海百傲生物工程有限公司, CY3-dUTP 为 Amersha Biosciences 产品, TRIzol LS RNA 提取试剂盒购于 Invitrogen 公司, 琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒、质粒提取试剂盒、SDS、甲酰胺、二甲基亚砜 (DMSO) 购自上海华舜生物工程有限公司, 反转录 PCR 试剂盒为 Promega 公司的 Access RT-PCR System。紫外分光光度计为 Eppendorf 公司的 BioPhotometer。芯片点样仪为 Bio-Rad 公司的 VersArray Compact system, 空心点样针 (SMP3) 购自 TeleChem International Inc, 共聚焦扫描仪为 Bio-Rad 公司的 VersArray chipReader™。

1.2 RT-PCR 及 cDNA 克隆

根据 GenBank 上公布的流感各亚型的序列, 设计用于制备禽流感血凝素 H5, H7, H9 亚型及神经氨酸酶 N1, N2 亚型鉴别探针的引物, 同时设计了 AIV 的 M 基因和看家基因 GAPDH 引物。用 SPF 鸡胚培养流感种毒^[5], 提取 RNA 作为克隆探针基因的模板, 提取鸡肺脏 RNA 作为克隆内参基因的模板, 用特异性引物进行 RT-PCR 扩增。扩增后将其连接到 pMD18-T Vector, 进行 PCR 鉴定和序列分析测定, 获得的阳性重组质粒分别命名为 pMD18-T-H5、pMD18-T-H7、pMD18-T-H9、pMD18-T-N1、pMD18-T-N2、pMD18-T-M 及 pMD18-T-GAPDH。

1.3 制备探针

PCR 扩增含探针及内参基因的质粒 DNA, PCR 产物用 2.5 倍体积的无水乙醇和 1/10 体积的 3 mol/L 醋酸钠至于 -20℃ 沉淀, 然后用紫外分光光度计测定浓度, 并将浓度调整到 1 μg/μL, 等体积加入点样液后小心加入到 384 孔板中, 准备点样或于 -20℃ 存放备用。

1.4 芯片的制备及后处理

在芯片点样仪中用 SMP3 点样针在 60% 湿度条件下点样。点完的片子置于室温干燥 20 h 以上, 显

微镜下观看点样矩阵样点的形态, 弃去有漏点或连点的片子。65℃ 再水合 10 s 后立即放到 80℃ 干燥, 紫外交联仪(能量值设定 65 mJ/cm²)交联 25 min, 0.2% SDS 洗 1 min, 超纯水清洗 2 次, 然后将片子浸没在含 75% PBS、25% 乙醇、0.1 mol/L NaBH₄ 的封闭液中封闭 5 min, 接着用 0.2% SDS 洗 1 min, 超纯水洗能 1 min, 沸水中, 变性 3 min, 存放于避光干燥处待用。

1.5 杂交与结果判定

按试剂盒说明书操作, 用 Trizol LS 提取病毒 RNA, 反转录成 cDNA^[6], 按照如下组分进行 PCR 扩增: 3.5 U 的 rTaq, 0.16 mmol/L 的 dNTP, 2 pmol/L CY3-dUTP 浓度, 1× PCR buffer, 4 μg 的 unit12 and unit13 通用引物, 总体积 50 μL。程序为 94℃ 2 min, 94℃ 1 min、40℃ 2 min、72℃ 3 min, 25 个循环, 72℃ 10 min^[7], 同时扩增并标记内参基因。PCR 产物用异丙醇沉淀法进行浓缩、纯化。

取处理好的片子, 在点样区加上预杂交液 (25% 甲酰胺、5× SSC、0.1% SDS), 在 42℃ 杂交炉中预杂交 1 h 后水洗 4 次, 每次 2 min, 异丙醇脱水, 取 5 μL 处理好的样品与 5 μL 杂交液 (50% 甲酰胺、10× SSC、0.2% SDS), 2 μL 内参基因混合, 95℃ 变性后加到点样区, 在 42℃ 杂交炉中杂交 8 h。42℃ 预热的 2× SSC-0.1% SDS 洗 15 min, 0.2× SSC-0.1% SDS 中洗 10 min, 0.1% SDS 中洗 5 min, 无水乙醇洗 1 min, 10000× g 离心 5 min 干燥片子, 用共聚焦扫描仪扫描芯片, 用 GenePix Pro6.0 软件分析结果。荧光信号以 SNR532>3 且 B532+2SD>55 判为结果阳性。

1.6 点样方阵

图 1 为点布的微阵列, 每张片子上点布 4 个方阵, 每个方阵 12 个探针。

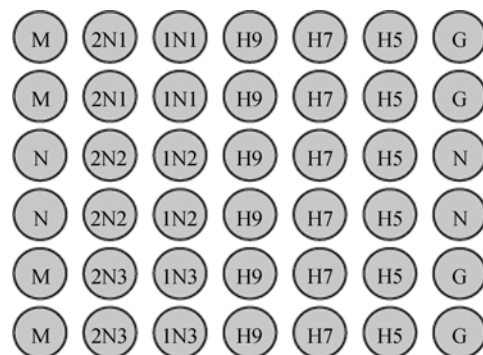


图 1 禽流感诊断芯片点样方阵

Fig. 1 The AIV diagnostic DNA microarray layout. N negative control; G positive control.

1.7 芯片的特异性和敏感性检测

在相同条件下,将 AIV 1-15 亚型、传染性法氏囊病毒 (IBDV)、传染性支气管炎病毒 (IBV)、新城疫 (NDV) 以及 SPF 鸡胚尿囊液对照,分别按照 1.6 的方法进行 RT-PCR,将 PCR 产物与芯片进行杂交、扫描来检测芯片的特异性。将已知病毒尿囊液,测定血凝价,稀释不同滴度,处理后与芯片进行杂交、扫描来检测所制备芯片的敏感度。

1.8 芯片的重复性和保存期实验

H5N1 亚型禽流感病毒按照 1.7 的方法处理,同时与不同批次点制处理的片子杂交以检测芯片的批间重复性。在一张片子上点制 4 个相同的探针区,杂交相同的样品以检测芯片的批内重复性。将同一批点制、

处理好的片子分别于室温密闭存放 10、20、30、40、50、60、70 d,杂交相同的样品以检测芯片的保存期。

1.9 临床及现地样品的检测

检测临床棉拭子及组织样品 30 份,与 RT-PCR 方法、鸡胚分毒做比较。对来自不同地区的 21 份送检样品进行检测,以考察本实验建立的方法对现地标本检测的可行性。

2 结果和讨论

2.1 探针及内参基因的克隆与结果鉴定

本实验所用的引物序列见表 1。扩增获得了 10 个探针基因及一个内参基因片段的重组基因质粒,通过重组质粒 PCR 和序列测定,鉴定为正确克隆。

表 1 实验中所用引物序列
Table 1 Used primers in this experiment

Primer name	Primer sequence(5' 3')	PCR products longs/bp
5H-up	GGAATATGGTAACTGCAACACCA	372
5H-low	AACTGAGTGTTTCATTTGTCAATG	
7H-up	AATGCACAAGGAGGAGGAAC	501
7H-low	TGACGCCCGAAGCTAAACCA	
9H-up	TCAACAACTCCACCGAACTGT	732
9H-low	TCCCGTAAGAATGTCATACCA	
1N1-up	CTACTTGTCAATGGTGAATG	614
1N1-low	CAGTCGAGTTGAATGCTCT	
1N2-up	CACAAGCTGCCTGTTCCATCAT	624
1N2-low	AATGCACTTTCTTTCTGA	
1N3-up	ACCAAGCAACTGACTCAAACC	537
1N3-low	TGAATCCAAATCAAAAGATAAT	
2N1-up	GCAAAAGCAGGAGTG/AAAA/GATGAA	567
2N1-low	ACAACTTGAGCTGGACCATGCTA	
2N2-up	TTTGCA/TCCTTTTCT/CAAGGACA	617
2N2-low	ACGGGCCTATTA/GGAGCCT/CTTC	
2N3-up	GCCCATGTCAGGAAGTGCTCAG	599
2N3-low	ATTGATGTTCCGCCCATCAGG	
M-up	TTCTAACCGAGGTCGAAAC	229
M-low	AAGCGTCTACGCTGCAGTCC	
Gapdh-up	ACCATCTCCAGGAGCGAGATC	340
Gapdh-low	GCCATCCACAGTCTTCTGAGTG	

2.2 特异性检测

用 1-15 亚型 AIV,分别与芯片杂交,结果显示,流感各亚型在 M 探针上均可见明显的杂交信号,其中 H5、H7、H9、N1、N2 可与芯片内相应的探针基因进行杂交,而与其它的探针基因无非特异性交叉

(图 2)。用 NDV、IBDV、IBV 以及 SPF 鸡胚尿囊液制备的荧光标记样品与芯片杂交后,除了内参基因外无肉眼可见的杂交信号,表明检测芯片的检测特异性良好。

2.3 敏感性检测

选取 EID₅₀ 为 3.6×10^7 的 H5N1 病毒尿囊液,10

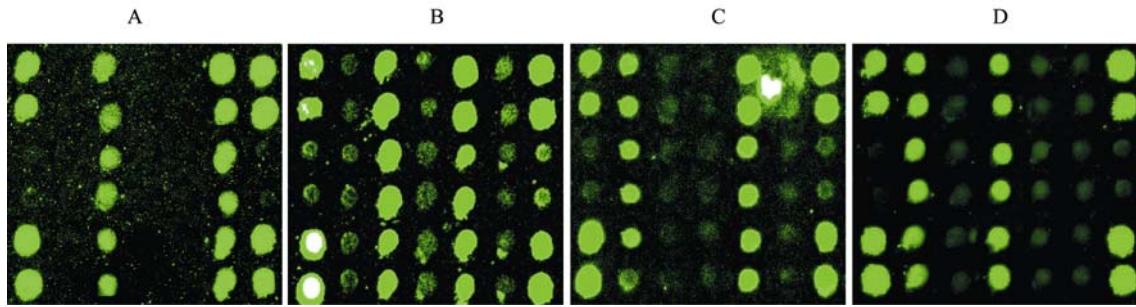


图 2 禽流感亚型诊断芯片的特异性检验

Fig. 2 The specificity of AIV diagnostic DNA microarray. A: The hybridization results of H5N1 subtype AIV with the DNA microarray, B: The hybridization results of H7N1 subtype AIV with the DNA microarray, C: The hybridization results of H9N2 subtype AIV with the DNA microarray, D: The hybridization results of H7N2 subtype AIV with the DNA microarray.

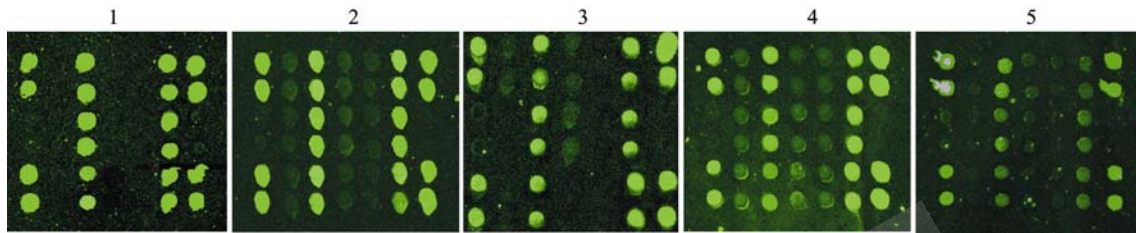


图 4 禽流感诊断芯片敏感性检测

Fig. 4 Sensitivity of AIV assays in detecting H5N1 subtype AIV. 1-5. 10^{-1} to 10^{-5} fold dilution of H5N1 AIV.

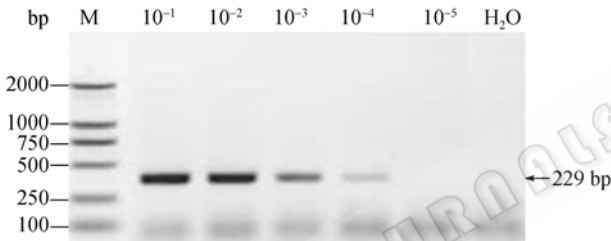


图 3 RT-PCR 敏感性检测

Fig. 3 The sensibility of RT-PCR. M.DL-2000; 1-5. 10^{-1} to 10^{-5} fold dilution of H5N1 AIV; 6. negative control.

倍梯度稀释至 10^{-5} 后提取病毒 RNA，反转录成 cDNA，在 PCR 的过程中进行荧光素标记，与芯片进行杂交，扫描。同时取相应梯度的 RNA 做 RT-PCR 检测。试验结果表明当 RNA 做 10^{-4} 稀释时，RT-PCR 的结果已不能给出准确的判断(图 3)，但基因芯片的杂交信号仍然很强(图 4)，表明基因芯片的敏感性高于 RT-PCR。

2.4 芯片的重复性和保存期试验

经过严格监控点样探针的质量，优化芯片后处理（再水合、紫外交联、封闭）环节，本试验制备的检测芯片重复性好，相同的样品与不同批次点制处理的片子以及同一张片子上的不同探针区杂交，经 GenePix Pro6.0 软件分析，结果显示 B532CV 值均在 20% 以内。芯片的保存期试验表明，点制并处理好的

芯片在室温密闭条件下可至少保存 2 个月的时间而不影响检测效果。

2.5 临床及现地样品的检测

检测临床棉拭子及组织样品的结果见表 2，芯片检测方法与鸡胚接种和 RT-PCR 的符合率分别为 100% 和 96%，证明该检测方法灵敏可靠。21 份现地送检样品中，应用基因芯片检测方法检出 14 份阳性，该结果与鸡胚接种和 RT-PCR 的检出结果完全一致，符合率为 100%。

表 2 3 种诊断方法对人工感染样品的检测情况
Table 2 Detection of AIV isolate using three diagnostic methods

Sample	Egg inoculation	RT-PCR	Microarrays
cloacal swab (24h)	4/10	3/10	4/10
cloacal swab (48h)	6/6	6/6	6/6
cloacal swab (72h)	4/4	4/4	4/4
tissue samples	10/10	10/10	10/10
total detection rate	80.0%(24/30)	76.6%(23/30)	80.0%(24/30)

3 讨论

病毒鸡胚接种法是广泛应用的实验室检测禽流感方法之一^[8]，此法灵敏度高但是操作费时费力（2~10 d），并且对实验室条件有较高要求，很多省市实验室不具备操作该技术的硬件条件；免疫学方法

操作简便耗时短,但灵敏度和特异性较差,而且抗体检测的结果存在一定的缺陷,即仅能说明被检测的禽类或动物曾经感染过禽流感病毒或是进行过免疫,不能准确的反映当前是否感染或携带病毒。

近年来一系列区分禽流感亚型的分子生物学方法逐步发展起来,反转录(RT)与酶联免疫吸附相结合的检测技术^[9]敏感性高,对实验室和操作人员的要求也较低,但是不具备集成化的优势,很难对禽流感的多个亚型进行同步检测。多重 RRT-PCR 与血凝抑制相结合^[10]、针对基质蛋白和血凝素基因分别进行 RRT-PCR 的检测技术^[11]、耗费样品量少,并且具有高通量的优点,但是对于禽流感病毒来说,RRT-PCR 技术也有他的局限性,由于亚型之间核酸序列同源性高,使得此法难以实现亚型的同步区分。而且,一旦 AIV 核酸组成有变化,此检测技术就必须变换引物,通常,RRT-PCR 必须结合测序技术才能对结果做最终的判定,费时费力,增加了耗时和费用。基于核酸序列的扩增(NASBA)技术可同步诊断 H5, H7 亚型的^[12~14]。但 NASBA 的局限在于它以 RNA 为检测目标,容易受到环境中大量存在的 RNA 酶的影响,并且对待检样品的序列特异性要求很高,而流感病毒核酸具有高度的变异性,这限制了此法在流感病毒检测上的应用。基因芯片技术是目前大家比较关注的新检测手段,鉴别人流感病毒亚型的基因芯片技术^[15~18]已有报道,目前还很少见使用 DNA 芯片区分禽流感病毒亚型的报道。

本研究借鉴 LI 等^[15]的工作经验进行了同步区分禽流感亚型诊断基因芯片的制备及其检测技术的研究。该基因芯片技术的点样探针为 PCR 产物,制备简单,点样探针中添加了甜菜碱,不但降低了探针溶液的蒸发速度,而且使样点的形态更好。在 PCR 过程中进行荧光素标记,标记效率高,检测信号较强。该技术不但可准确快速诊断出禽流感病毒,并且可同步鉴定出 H5, H7, H9 抗原型和 N1, N2 抗原型。临床样品的检测表明该技术特异性好,敏感性高,是一个有效的可以同时鉴别当前主要流行流感病毒亚型的方法,可方便的应用于禽流感病毒的高通量、快速分型。

参 考 文 献

[1] Fouchier RAM, Munster V, Wallensten A, *et al.* Characterization of a novel influenza A virus hemagglutinin subtype (H16) obtained from black-headed gulls. *J Virol*, 2005, 79 (5): 2814–2822.

- [2] Abdel-Ghafar AN, Chotpitayasunondh T, Gao Z, *et al.* Update on avian influenza A (H5N1) virus infection in humans. *N Engl J Med*, 2008, 358(3): 261–273.
- [3] Belser JA, Lu X, Maines TR, *et al.* Pathogenesis of avian influenza (H7) virus infection in mice and ferrets: enhanced virulence of Eurasian H7N7 viruses isolated from humans. *J Virol*, 2007, 81(20): 11139–11147.
- [4] Wong SS, Yuen KY. Avian influenza virus infections in humans. *Chest*, 2006, 129(1): 156–168.
- [5] 殷震, 刘景华. 动物病毒学. 第二版. 北京: 科学出版社, 1997.
- [6] Lai AC, Chambers TM. Rapid protocol for sequencing RNA virus using delta *Taq* version 2.0 DNA polymerase. *BioTechniques*, 1995, 19 (5): 704–706.
- [7] Offringa DP, Tyson-Medlock V, Ye ZA. Comprehensive systematic approach to identification of influenza A virus genotype using RT-PCR and RFLP. *J Virol Methods*, 2000, 88(1): 15–24.
- [8] Cox NJ, Subbarao K. Influenza. *Lancet*, 1999, 354 (9186): 1277–1282.
- [9] Dybkaer K, Munch K, Handberg KJ, *et al.* Application and evaluation of RT-PCR-ELISA for the nucleoprotein and RT-PCR for detection of low-pathogenic H5 and H7 subtypes of avian influenza virus. *J Vet Diagn Invest*, 2004, 16 (1): 51–56.
- [10] Spackman E, Senne DA, Bulaga LL, *et al.* Development of real-time RT-PCR for the detection of avian influenza virus. *Avian Dis*, 2003, 47 (3 suppl): 1079–1082.
- [11] Spackman E, Senne DA, Bulaga LL, *et al.* Development of multiplex real-time RT-PCR as a diagnostic tool for avian influenza. *Avian Dis*, 2003, 47 (3 suppl): 1087–1090.
- [12] Collins RA, Ko LS, So KL, *et al.* Detection of highly pathogenic and low pathogenic avian influenza subtype H5 (Eurasian lineage) using NASBA. *J Virol Methods*, 2002, 103 (2): 213–225.
- [13] Collins RA, Ko LS, So KL, *et al.* A NASBA method to detect high- and low-pathogenicity H5 avian influenza viruses. *Avian Dis*, 2003, 47 (3 suppl): 1069–1074.
- [14] Lau LT, Banks J, Aherne R, *et al.* Nucleic acid sequence-based amplification methods to detect avian influenza virus. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, 313 (2): 336–342.
- [15] Li J, Chen S, Evans DH. Typing and subtyping influenza virus using DNA microarrays and multiplex reverse transcriptase PCR. *J Clin Microbiol*, 2001, 39 (2): 696–704.
- [16] Sengupta S, Onodera K, Lai A, *et al.* Molecular detection and identification of influenza viruses by oligonucleotide microarray hybridization. *J Clin Microbiol*, 2003, 41 (10): 4542–4550.
- [17] Kessler N, Ferraris O, Palmer K, *et al.* Use of the DNA Flow-Thru Chip, a three-dimensional biochip, for typing and subtyping of influenza viruses. *J Clin Microbiol*, 2004, 42 (5):

2173–2185.

[18] Townsend MB, Dawson ED, Mehlmann M, *et al.* Experimentalevaluation of the FluChip diagnostic microarray for influenza virus surveillance. *J Clin Microbiol*, 2006, 44 (8): 2863–2871.

Typing and subtyping Avian influenza virus using DNA microarrays

Zhongping Yang¹, Xiurong Wang^{1*}, Lina Tian¹, Yu Wang², Hualan Chen^{1*}

¹Animal Influenza Laboratory of Ministry of Agriculture and National Key Laboratory of Veterinary Biotechnology of Harbin Veterinary Research Institute of CAAS, Harbin 150001, China)

²Chongqing Entry Exit Inspection and Quarantine Bureau, Chongqing 400020, China)

Abstract: [Objective] Outbreaks of highly pathogenic avian influenza (HPAI) virus has caused great economic loss to the poultry industry and resulted in human deaths in Thailand and Vietnam since 2004. Rapid typing and subtyping of viruses, especially HPAI from clinical specimens, are desirable for taking prompt control measures to prevent spreading of the disease. We described a simultaneous approach using microarray to detect and subtype avian influenza virus (AIV). **[Methods]** We designed primers of probe genes and used reverse transcriptase PCR to prepare cDNAs of AIV M gene, H5, H7, H9 subtypes haemagglutinin genes and N1, N2 subtypes neuraminidase genes. They were cloned, sequenced, reamplified and spotted to form a glass-bound microarrays. We labeled samples using Cy3-dUTP by RT-PCR, hybridized and scanned the microarrays to typing and subtyping AIV. **[Results]** The hybridization pattern agreed perfectly with the known grid location of each probe, no cross hybridization could be detected. Examining of HA subtypes 1 through 15, 30 infected samples and 21 field samples revealed the DNA microarray assay was more sensitive and specific than RT-PCR test and chicken embryo inoculation. **[Conclusion]** It can simultaneously detect and differentiate the main epidemic AIV. The results show that DNA microarray technology is a useful diagnostic method.

Keywords: DNA microarray; Avian influenza virus (AIV); typing and subtyping

Supported by the Development of new techniques and products against avian influenza (2007DFR30360)

*Corresponding author. Tel: +86-451-85935080; Fax: +86-451-82733132; E-mail: wxr@hvri.ac.cn

Received: 24 January 2008/ Revised: 14 April 2008

答 作 者 问

问: 如何构建系统发育树?

答: 构建系统树是为了鉴定菌株的分类学地位, 应使用正确的方法重新构树, 制作方法如下:

- (1) 将鉴定菌的 16S rRNA 序列递交 GenBank, 用 Blast 软件搜索相似的 16S rRNA, 然后一起构树。
- (2) 构建树时采用能反应分支长度的软件(如 NJ 法), 并用 Bootstrap 值分析分支聚类的稳定性。
- (3) 系统发育分析应该用国际上较为通用的一些建树方法, 如 Neighbour-Joining 等, 这样结果就更可靠, 更直观。
- (4) 请严格按照下列具体要求写作[参见: 微生物学报, 2004, 44(2): 143.]

①系统树中: 菌名应列出全称, 且属和种名应斜体; 名称后再加括号, 其内含序列号。

②图注(本刊的图注全部采用英文写作): 应表明“树”上所有的内容, 包括: 括号中的序号、分支点上的数字涵义、0.01代表的意义。

③作图要求: 文件格式为*.Tif; 分辨率为 600 线; 字体为“Time New Roman”, 字号为 8 磅。