

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
49(2):161-167; 4 February 2009
ISSN 0001-6209; CN 11-1995/Q
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>

马立克氏病病毒 I 型 CVI988/Rispens 疫苗株 UL13 激酶结构域分析及其偏嗜密码子片段在大肠杆菌中的表达

张晨飞, 秦爱建*, 邓绪方, 苏钰文, 薛敏, 尹天燕, 王平平

(扬州大学江苏省动物预防医学重点实验室, 扬州 225009)

摘要【目的】寻找 MDV-1 UL13 激酶催化中心, 并体外表达 UL13, 以便研究 UL13 蛋白激酶的功能。【方法】用 PCR 方法从 CVI988 疫苗株基因组中扩增 UL13 基因, 利用 GENEART(www.geneart.de)分析 UL13 在大肠杆菌中表达时密码子的偏嗜性, 通过 DNASTAR 抗原性分析确定 UL13 的高抗原性片段, 进行原核表达, 并以切胶免疫方法免疫小鼠制备多抗血清, 通过 NCBI 的 protein blast 功能及 Cn3D 4.1 在线软件分析 UL13 保守结构域。【结果】PCR 扩增出 UL13 基因, 序列分析结果表明, UL13 的 259~400 aa、431~513 aa 两个片段抗原性强, 且稀有密码子较少; 保守结构域分析发现 UL13 催化中心主要位于 152~297 氨基酸残基间, 且在激酶 Subdomain VII 的保守甘氨酸残基被丝氨酸替代, Subdomain VIII 的保守非极性脯氨酸残基被极性半胱氨酸残基替换。利用大肠杆菌表达的 UL13 第 259~400 aa 片段免疫小鼠制备出多抗血清能与真核表达产物反应。【结论】MDV-1 UL13 催化中心主要位于 152~297 氨基酸残基间, 体外表达的基因产物诱导机体产生了抗 UL13 激酶的特异性抗体。

关键词: MDV-1; CVI988; UL13; 序列分析; 密码子偏嗜性; 表达

中图分类号: Q933 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209(2009)02-0161-07

马立克氏病病毒 UL13 基因大小为 1542 bp, 编码 514 氨基酸的被膜蛋白。该蛋白属于疱疹病毒 UL97 蛋白激酶亚家族, 为病毒自身编码的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶^[1]。疱疹病毒共编码两类病毒蛋白激酶 US3 亚家族及 UL97 亚家族, 其中 US3 仅在 α -疱疹病毒中保守, 而后者则属于整个疱疹病毒科的保守蛋白激酶。近几年的研究表明, 包括 UL13 在内的 UL97 蛋白激酶亚家族成员对病毒基因组的复制^[2-3]、转录及翻译细胞因子的修饰^[4-5]、病毒核衣壳的生成^[6-7]以及病毒水平传播^[8]均有调节作用。Ng 等利用人巨细胞病毒 UL97 基因替换了单纯疱疹病毒 I 型 UL13 基因, 发现 UL97 能够部分替代 UL13 的功能, 进一步说明了该家族成员的功能保守性^[9]。

尽管如此, Romaker 等^[10]认为, UL97 蛋白激酶家族成员仅仅在部分而非全部功能上保守。他们通过序列分析、体外活性实验、对宿主细胞蛋白磷酸化等实验发现人巨细胞病毒 UL97 与鼠巨细胞病毒 pR97 间的功能相似性较大, 而与艾伯斯坦-巴尔病毒的 BGLF4 及单纯疱疹病毒 UL13 则存在较大差异, 提示病毒编码的该家族蛋白激酶可能存在各自的生物学调节功能。

目前, 有关 MDV UL13 的功能研究还很少, UL13 编码的蛋白激酶是否也具有某种生物学活性, 特别是对病毒的复制和游离病毒产生的影响如何仍不清楚。本研究在分析 MDV-1 UL13 编码氨基酸的抗原性、表达的偏嗜性及蛋白激酶的保守结构域的基础

基金项目: 国家自然科学基金(30671569); 全国博士学位论文作者专项资助(200256); 博士点基金(20061117003)

* 通信作者。Tel: +86-514-87979217; E-mail: aijian@yzu.edu.cn

作者简介: 张晨飞(1981-)男, 江苏通州人, 博士, 主要从事分子病毒学研究。

收稿日期: 2008-07-30; 修回日期: 2008-11-5

上,在大肠杆菌中对 UL13 成功进行了分段表达,并利用表达产物制备了多抗血清,为后期该蛋白功能的研究奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 毒株和菌株: CVI988/Rispens 疫苗株属于血清 I 型 MDV 弱毒株,由本实验室保存; rBAC-UL13 重组杆状病毒系 UL13 基因片段通过 Bac-To-Bac 系统重组插入杆状病毒基因组获得(资料待发表); *E. coli* BL21(DE3)工程菌购于美国 Promega 公司; *E. coli* JM109 工程菌由 TaKaRa 公司购得。

1.1.2 主要试剂: pGEM-T 载体购自 Promega 公司; pGEX-6p-1 原核表达载体购自 Clontech 公司; 凝胶回收试剂盒购于 QIAGEN 公司; T4 连接酶购于美国 Promega 公司; BamHI、EcoRI 及 SalI 限制性内切酶购于上海生物工程技术服务有限公司; dNTP、Taq 酶等购自 TaKaRa 公司; IPTG 购自 Sigma 公司; 转印用 NC 膜购自 Amersham 公司; Western blot 检测用 GST 多抗血清为本实验室自行制备保存; HRP 标记兔抗鼠 IgG 及 FITC 标记的羊抗鼠 IgG 为 Sigma 公司产品。

1.2 UL13 基因的扩增及克隆

根据 NCBI GenBank 提供的 MDV CVI988/Rispens 疫苗株全基因组序列(登录号 DQ530348)设计引物,为方便以后克隆和表达,在引物中引入 BamHI、EcoRI 酶切位点及 Kozak 序列,引物如下:上游:5'-CGTGGATCCAAAATGGATACTGAATC-3',下游:5'-GGCGAATTCCTAGTTCATAACAA-3'。引物由申能博彩公司合成。MDV CVI988/Rispens 基因组采用常规方法从感染 CVI988 的 CEF 细胞中制得(组织细胞消化液 100 mmol/L NaCl, 10 mmol/L Tris·Cl, 25 mmol/L EDTA, 0.5% SDS, 消化感染 CVI988 的 CEF 细胞,同时加入 1% 蛋白酶 K 及 1% RNase 37℃ 温育 3 h,等体积苯酚氯仿抽提两次后离心取上清,预冷无水乙醇沉淀后用灭菌双蒸水溶解备用)。UL13 基因的 PCR 扩增条件是:95℃ 5 min; 94℃ 1 min, 50℃ 1 min, 72℃ 2 min 30 循环, 72℃ 10 min, PCR 产物经凝胶回收后连入 pGEM-T 载体,并送上海生物技术服务有限公司测序鉴定。

1.3 序列分析

通过 GENEART(www.gcu.de)提供的在线稀有密码子分析软件对 UL13 基因在大肠杆菌中表达的稀有密码子进行分析,并利用 DNASTAR 对其抗原性

进行分析,选择抗原性较高、稀有密码子丰度较低的片段进行原核表达。同时利用 NCBI 提供的在线 protein blast 功能及 Cn3D 4.1 在线软件分析 UL13 氨基酸序列,确定其激酶结构域及亚结构域,并分析其激酶结构域内保守氨基酸残基的变化。

1.4 UL13 在大肠杆菌中的分段表达

针对大肠杆菌中 UL13 密码子表达的偏嗜性分析结果,分别扩增 UL13 1~114aa, 259~400 aa 及 431~513aa 片段,命名为 UL13N、UL13S 和 UL13H。引物如下:UL13N 上游:5'-CGTGGATCCAAAATGGATACTGAATC-3', UL13N 下游:5'-ATCGTCCGACCTACGCTAAGGACCG-3', UL13S 上游:5'-CGTGGATCCAAACGTGTCTTGT-3', UL13S 下游:5'-GGCGTCGACTTACTAGTTCATAACAA-3'。将上述片段通过 EcoRI 和 SalI 酶切位点引入 pGEX-6P-1,分别命名为 pGEX-UL13N, pGEX-UL13S, pGEX-UL13H。将上述阳性菌以 1:100 接种 2 mL 2 × YT 液体培养基, 28℃ 分别培养 2、3、4 h 后加入 100 mmol/mL IPTG 15 μL,继续培养 4 h 后 SDS-PAGE 电泳分析诱导表达情况,同时设置 pGEX-6P-1 空载体对照。

1.5 Western blot 分析

利用 GST 多抗对 UL13H 及 UL13S 原核表达产物进行 Western blot 检测,同时设置 pGEX-6p-1 空载体菌诱导产物对照。经 SDS-PAGE 分离,50 V 恒压转印至 NC 膜(Amersham 公司),5% 脱脂乳封闭过夜, PBST 洗涤后加入 1:100 稀释的 GST 多抗血清,二抗为 1:10000 稀释的 HRP 标记兔抗鼠 IgG(Sigma 公司),以 DAB/H₂O₂ 显色后蒸馏水终止反应。

1.6 多抗血清制备及分析

经 SDS-PAGE 分离的 GST-UL13S 条带,切胶免疫 6 周龄 Balb/C 小鼠,间隔 7 d 免疫一次,连续免疫 6 周后,采取小鼠血液,分离制备多抗血清。感染 rBAC-UL13 的昆虫细胞经丙酮:乙醇(3:2)4℃ 固定 5 min, PBS 洗涤后以上述制备的多抗血清为一抗进行间接免疫荧光检测。

2 结果

2.1 PCR 扩增获得完整的 UL13 基因

以提取的 CVI988 基因组为模板,PCR 扩增 UL13 片段,扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳分析,证明本研究成功扩增出 UL13 基因片段,大小约为 1500 bp。凝胶回收目的片段连接入 pGEM-T 载体后

送至上海生物技术服务有限公司测序,测序结果显示扩增的 UL13 片段序列与 NCBI GenBank 上发布的序列完全相同。

2.2 UL13 基因的序列分析

利用 GENEART(www.gcu.de)提供的在线稀有密码子分析软件分析 UL13 碱基序列在大肠杆菌中表达的偏嗜性,结果显示在 UL13 全序列中存在多

个大肠杆菌中表达的稀有密码子,这些稀有密码子主要集中在序列的 N 端和编码 400 到 431 位氨基酸的碱基之间,且含有多个连续的编码精氨酸的稀有密码子(AGG、AGA)(图 1),这些稀有密码子将严重影响目的基因表达^[11-12],作者用完整的 UL13 基因未能在大肠杆菌中获得表达的结果也证明了这一点(资料未发表)。

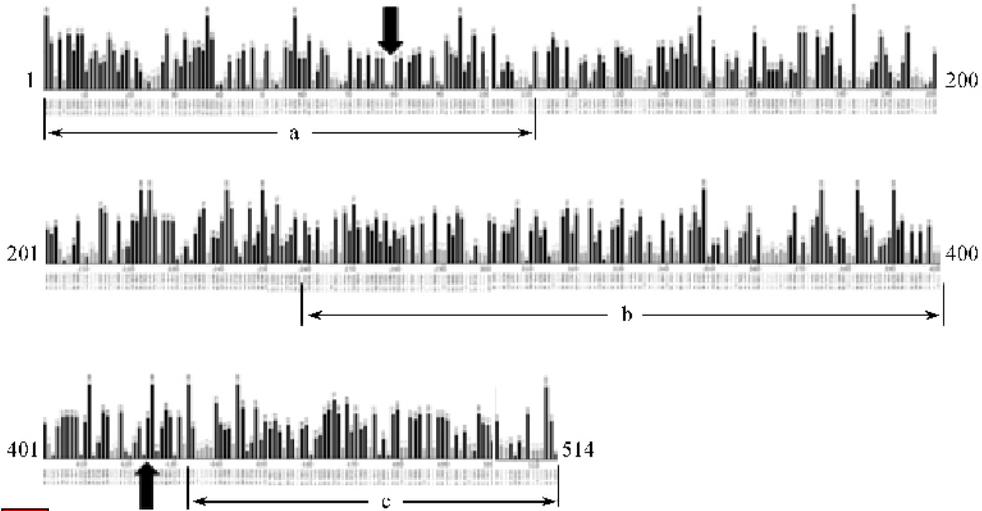


图 1 UL13 密码子偏嗜性分析

Fig.1 Codon bias analysis of UL13. a: UL13N(1-114aa); b: UL13S(259-400aa); c: UL13H(431-513aa); “→”, rare codons enriched fragments of UL13.

DNASTar 软件对 UL13 蛋白的抗原性分析结果显示(图 2),UL13 全序列中存在 3 段抗原性较强的区域,分别位于 N 端 1~116 aa、305~372 aa 及 437~481 aa(图 2)。结合上述稀有密码子分析结果,这 3 段氨基酸片段仅 N 端 1~116 aa 中存在较多且连续的稀有密码子,而 259~400 aa(UL13S,尤其 305~372 aa 片段抗原性强)和 431~513 aa(UL13H,437~481 aa 抗原性强)所含稀有密码子较少,适合进行原核表达(图 2)。

进一步利用 NCBI 提供的在线 protein blast 功能对 CVI988 UL13 的氨基酸序列分析,并比较 UL13 氨基酸序列中的激酶结构域,结果显示 CVI988 UL13

中这些结构域高度保守,并且其催化中心主要位于 152 到 297 氨基酸残基之间(图 3)。

通过 NCBI 提供的 Cn3D 4.1 在线软件分析 UL13 的结构域时发现,UL13 存在与多数蛋白激酶如 C-Jun N 末端蛋白激酶相似的激酶亚结构域(图 4)进一步与真核生物蛋白激酶的基序^[13]比较后发现,蛋白激酶 Subdomain VII 中保守的甘氨酸残基在 UL13 中被丝氨酸残基替代,在 Subdomain VIII 中虽然保守的谷氨酸残基在 UL13 中未改变,但该残基前位较保守的非极性脯氨酸残基在 UL13 中则被极性半胱氨酸替代。

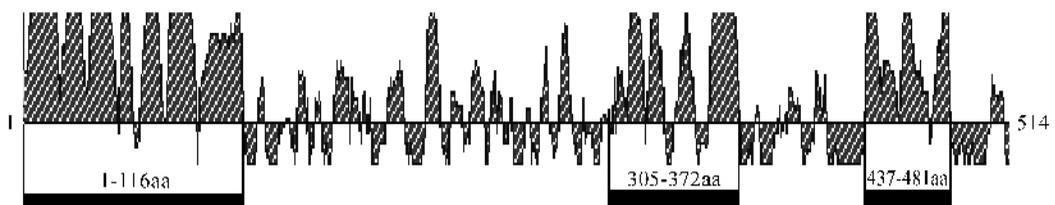


图 2 UL13 蛋白抗原性分析

Fig.2 Antigenicity analysis of UL13. UL13 gene includes three strong antigenicity fragments, 1-116aa, 305-372aa and 437-481aa; one of them, 1-116aa contains continuous rare codons for *E. coli*, which may interfere UL13 expression.

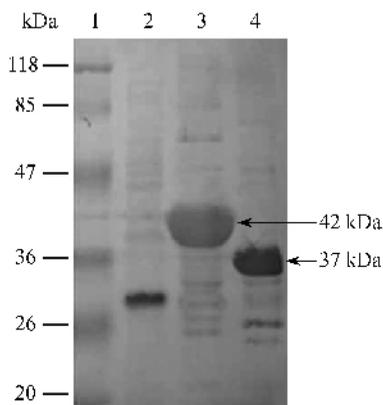


图6 Western blot 检测 UL13S 及 UL13H 的表达

Fig.6 Western blot analysis of UL13S and UL13H expression with antiserum to GST-UL13S. 1. prestained protein molecular weight Marker ; 2. pGEX-6P-1 for control ; 3. UL13S ; 4. UL13H.

以 UL13S 片段切胶免疫的小鼠血清作 1:200 稀释进行间接免疫荧光试验,检测感染 rBAC-UL13 重组杆状病毒的 Sf9 细胞,结果出现特异性荧光,而对正常细胞则未出现荧光,进一步说明血清中含有特异针对 UL13 的抗体(图 7)。

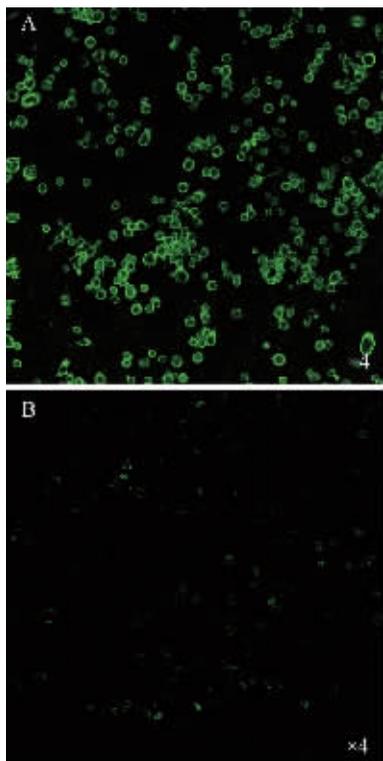


图7 免疫荧光分析 UL13S 多抗血清与昆虫细胞表达 UL13 反应性

Fig.7 UL13 expressed in sf9 cells reacted with antiserum to UL13S in IFA. A. Sf9 cells expressing UL13 showed positive ; B. normal Sf9 cells for control.

3 讨论

异源基因的表达是现代生物科技的基础,但是往往一段异源基因的表达存在诸多困难,因为它们序列中可能含有宿主的稀有密码子或者存在一些表达抑制原件^[14]。当然,决定一段基因表达水平的因素有很多,包括表达产物的毒性、目的基因 mRNA 及蛋白的稳定性以及基因本身的序列特性等。例如在表达一段基因时,表达产物 N 端第 2 位上氨基酸残基的侧链长度往往影响首位起始密码所编码的蛋氨酸的脱落,从而影响整个蛋白的表达^[15]。尽管如此,目的基因本身的密码子特性仍是影响原核表达的重要因素之一,因为宿主细胞中转运特定密码子的 tRNA 丰度直接决定了目的基因的翻译水平,从而决定目的蛋白的表达^[14]。

本研究通过稀有密码子及抗原性分析,避开 UL13 中稀有密码子富集区,选择强抗原性片段,结果成功对选择的片段进行了表达并制备了多抗血清,同时证明了稀有密码子对异源蛋白表达效率的影响。

激酶的结构域是各类蛋白激酶执行催化功能的基础,它们的序列高度保守,主要负责 ATP 结合、底物结合及磷酸根转移等功能,这些结构域被划分为 12 个亚结构域,分别含有保守不变的氨基酸残基^[13]。在对蛋白激酶功能的研究中,这些功能结构域的确定显得尤为重要。蛋白激酶 Subdomain VII 中甘氨酸残基通过氢键与天冬氨酸残基相连,在 PKA-C α 中形成 Asp-Phe-Gly 三联体,并通过天冬氨酸与辅助金属离子螯合,帮助 ATP 中 γ -磷酸根的转移^[13]。我们通过保守结构域的对比发现蛋白激酶 Subdomain VII 中的保守甘氨酸残基在 UL13 中被丝氨酸残基替代,而在 UL97 亚家族中,仅 BGLF4 中的甘氨酸未被替换。究竟这一置换对该蛋白激酶的功能有何影响,对 UL13 的调节功能又有何意义,有待进一步研究。除 Subdomain VII 外,蛋白激酶 Subdomain VIII 的保守非极性脯氨酸残基在 UL13 中也被极性半胱氨酸残基替换,有趣的是,在单纯疱疹病毒的 UL13 中,该亚结构域也出现残基的替代,由丙氨酸残基替代谷氨酸残基,这一替代恰好位于保守脯氨酸残基后一位^[10]。在 PKA-C α 中,Subdomain VIII 的谷氨酸与 Subdomain XI 的精氨酸形成离子键,稳定激酶的构象。此外,Subdomain VIII 还负责底物的识别,在某些蛋白激酶中,Subdomain VIII 甚至参与结合激酶的假底物抑制肽^[13]。近年研究表明,UL13 对细胞蛋

白和病毒蛋白都有磷酸化修饰作用,其底物包括细胞的延伸因子、RNA 聚合酶 II 以及病毒蛋白如 ICP22、VP22、VP16 及 US3 等等^[16-18], UL13 在 Subdomain VIII 上的变化,证实了 UL13 与宿主细胞蛋白激酶在底物结合上的差异。

目前对于病毒自身蛋白激酶的研究刚刚展开,作为病毒与宿主细胞联系的纽带,病毒蛋白激酶的研究意义显得更为突出。UL13 作为疱疹病毒保守的蛋白激酶,它对宿主细胞蛋白如细胞延伸因子 EF-1 δ ^[18]、RNA 聚合酶 II 的修饰^[19]以及在宿主细胞信号转导^[20]中发挥的作用将是研究病毒感染的细胞生物活性变化的重点。本研究研制的抗血清为今后疱疹病毒同宿主关系的研究提供了工具。

参考文献

- [1] Smith RF, Smith TF. Identification of new protein kinase-related genes in three herpesviruses, herpes simplex virus, varicella-zoster virus, and Epstein-Barr virus. *Journal of Virology*, 1989, 63(1):450-455.
- [2] Marschall M, M Freitag, P Suchy, et al. The protein kinase pUL97 of human cytomegalovirus interacts with and phosphorylates the DNA polymerase processivity factor pUL44. *Virology*, 2003, 311(1):60-71.
- [3] Wolf DG, CT Courcelle, MN Prichard, et al. Distinct and separate roles for herpesvirus-conserved UL97 kinase in cytomegalovirus DNA synthesis and encapsidation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2001, 98(4):1895-1900.
- [4] Baek MC, PM Krosky, A Pearson, et al. Phosphorylation of the RNA polymerase II carboxyl-terminal domain in human cytomegalovirus-infected cells and in vitro by the viral UL97 protein kinase. *Virology*, 2004, 324(1):184-193.
- [5] Kawaguchi Y, T Matsumura, B Roizman, et al. Cellular elongation factor 1delta is modified in cells infected with representative alpha-, beta-, or gammaherpesviruses. *Journal of Virology*, 1999, 73(5):4456-4460.
- [6] Krosky PM, MC Baek, DM Coen. The human cytomegalovirus UL97 protein kinase, an antiviral drug target, is required at the stage of nuclear egress. *Journal of Virology*, 2003, 77(2):905-914.
- [7] Marschall M, A Marzi, P aus dem Siepen, et al. Cellular p32 recruits cytomegalovirus kinase pUL97 to redistribute the nuclear lamina. *Journal of Biological Chemistry*, 2005, 280(39):33357-33367.
- [8] Jarosinski KW, NG Margulis, JP Kamil, et al. Horizontal transmission of Marek's disease virus requires US2, the UL13 protein kinase, and gC. *Journal of Virology*, 2007, 81(19):10575-10587.
- [9] Ng TI, C Talarico, TC Burnette, et al. Partial substitution of the functions of the herpes simplex virus 1 (UL)13 gene by the human cytomegalovirus (UL)97 gene. *Virology*, 1996, 225(2):347-358.
- [10] Romaker D, V Schregel, K Maurer, et al. Analysis of the structure-activity relationship of four herpesviral UL97 subfamily protein kinases reveals partial but not full functional conservation. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2006, 49(24):7044-7053.
- [11] Calderone TL, RD Stevens, TG Oas. High-level misincorporation of lysine for arginine at AGA codons in a fusion protein expressed in *Escherichia coli*. *Journal of Molecular Biology*, 1996, 263(4):407-412.
- [12] Zahn K. Overexpression of an mRNA dependent on rare codons inhibits protein synthesis and cell growth. *Journal of Bacteriology*, 1996, 178(10):2926-2933.
- [13] Hanks SK, T Hunter. Protein kinases 6. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. *The Federation of American Societies for Experimental Biology Journal*, 1995, 9(8):576-596.
- [14] Gustafsson C, S Govindarajan, J Minshull. Codon bias and heterologous protein expression. *Trends Biotechnology*, 2004, 22(7):346-353.
- [15] Hirel PH, MJ Schmitter, P Dessen, et al. Extent of N-terminal methionine excision from *Escherichia coli* proteins is governed by the side-chain length of the penultimate amino acid. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1989, 86(21):8247-8251.
- [16] Asai R, T Ohno, A Kato, et al. Identification of proteins directly phosphorylated by UL13 protein kinase from herpes simplex virus 1. *Microbes and Infection*, 2007, 9(12-13):1434-1438.
- [17] Kato A, M Yamamoto, T Ohno, et al. Herpes simplex virus 1-encoded protein kinase UL13 phosphorylates viral Us3 protein kinase and regulates nuclear localization of viral envelopment factors UL34 and UL31. *Journal of Virology*, 2006, 80(3):1476-1486.
- [18] Kawaguchi Y, C Van Sant, B Roizman, Eukaryotic elongation factor 1delta is hyperphosphorylated by the protein kinase encoded by the (UL)13 gene of herpes simplex virus 1. *Journal of Virology*, 1998, 72(3):1731-1736.
- [19] Long MC, V Leong, PA Schaffer, et al. ICP22 and the UL13 protein kinase are both required for herpes simplex virus-induced modification of the large subunit of RNA polymerase II. *Journal of Virology*, 1999, 73(7):5593-5604.
- [20] Hamza MS, RA Reyes, et al. ORF36 protein

kinase of Kaposi's sarcoma herpesvirus activates the c-Jun
N-terminal kinase signaling pathway. *Journal of Biological*

Chemistry, 2004, 27(37): 38325 - 28330.

Kinase domain analysis of MDV-1 CVI988/Rispens UL13 and preferred codon fragments expression in *Escherichia coli*

Chenfei Zhang, Aijian Qin*, Xufang Deng, Yuwen Su, Min Xue, Tianyan Yin, Pingping Wang
(Key Lab of Jiangsu Preventive Veterinary Medicine, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China)

Abstract [Objective] To find catalytic center of MDV-1 UL13 and express it in vitro to investigate the function of UL13 kinase. **[Methods]** UL13 gene was amplified by polymerase chain reaction (PCR) from MDV-1 CVI988/Rispens strain. The codon bias and antigenicity of UL13 in *Escherichia coli* was analyzed by online service GENEART (www.gcu.de) and DNASTAR software respectively. Then the UL13 truncated fragments were expressed in *Escherichia coli*, and mice were immunized with the expressed Glutathione S Transferase fusion protein. The conserved domain was analyzed with protein blast and Cn3D 4.1 online software of National Center for Biotechnology Information. **[Results]** UL13 gene was successfully amplified. The sequence analysis suggests that 259-400 and 431-513 amino acid residues are low abundance for rare codon and strong antigenicity in UL13. Result of conserved domain analysis demonstrated that 152 - 297 residue is kinase catalytic center of UL13. However, conserved glycine in kinase subdomain VII for most protein kinase was replaced by serine in UL13 and proline in kinase subdomain VIII replaced by cysteine. The serum from mice immunized with truncated fragment, 259 - 400 amino acids, could react with recombinant UL13 protein expressed in insect cells in immunofluorescence assay. **[Conclusion]** The 152 - 297 residue is kinase catalytic center of MDV-1 UL13; UL13 protein expressed in vitro induced specific antibodies against UL13.

Keywords: MDV-1; CVI988; UL13; sequence analysis; codon bias; expression

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30671569), the Foundation for the Author of National Excellent Doctoral Dissertation of China (200256) and the Foundation for PhD authorized units (20061117003)

*Corresponding author. E-mail: aijian@yzu.edu.cn

Received: 30 July 2008/Revised: 5 November 2008

《微生物学报》投稿方式

从 2006 年起, 本刊采用“稿件远程处理系统”, 全面实行网上投稿、网上审稿、网上查询等方式进行工作。欢迎广大作者通过登陆本刊网站进行投稿和查询。

(1) 远程投稿: 请先登录本刊网站 <http://journals.im.ac.cn>, 进入《微生物学报》, 点击“作者投稿”。如果您是第一次通过“远程”给本刊投稿, 请先点击进行“注册”, 注册成功后再进行投稿。如果曾在本刊网站投过稿, 则可直接投稿。如果忘了用户名和密码, 请联系本刊编辑部找回登录口令。

(2) 邮寄纸样: 所有来稿均需要邮寄 1 份纸稿、介绍信。

(3) 稿件受理费: 投稿时请随寄 100 元受理费, 务必通过邮局汇款, 切忌随信邮寄!

注: 务请在汇款单上注明“第一作者姓名”和“稿件编号”。