

微生物代谢组学的前处理及分析技术

董玲玲 柴逸峰 曹颖瑛 朱臻宇*

(第二军医大学药学院 上海 200433)

摘要: 微生物代谢组学主要研究细胞生长或生长周期某一时刻细胞内外所有低分子量代谢物。分析技术的不断发展促进了微生物代谢组学研究的进展。本文结合微生物样品前处理方法, 综述了目前研究中所采用的各种分析技术的特点与应用, 并展望微生物代谢组学研究中分析技术的发展趋势。

关键词: 分析技术, 样品前处理, 微生物代谢组学

Preparation and Analytical Method in the Study of Microbial Metabolomics

DONG Ling-Ling CHAI Yi-Feng CAO Ying-Ying ZHU Zhen-Yu*

(School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

Abstract: Microbial metabolomics is a subject that chiefly studying all the low molecular weight metabolites in an organism or cells during their growing process. The progress of analytical technology promotes microbial metabolomics to make advancement. In this paper, the commonly used analytical technology, sample preparation and its application were discussed and the prospects of the analytical methods were also discussed.

Keywords: Analytical technology, Sample preparation, Microbial metabolomics

代谢物是整个细胞调控体系的最终产物, 代谢物的定量水平可以反映生物体系对于基因和环境改变的最终响应, 因此代谢组学和蛋白组学, 转录组学相互补充, 与基因组学一起成为研究生命现象的重要手段。微生物代谢组学以微生物为研究对象, 主要研究细胞生长或生长周期某一时刻细胞内外所有低分子量的代谢物。自从 Elmroth 利用 GC-MS 技术分析脂肪酸、氨基酸和糖类并结合化学计量学方法监测肠系膜明串珠菌发酵生产葡聚糖过程中的微生物污染^[1]。至今, 代谢组学研究已应用于微生物鉴

定^[2]、突变体筛选和功能基因研究^[3]、代谢途径及代谢工程^[4,5]、发酵工艺的监控和优化^[4,6,7]及环境微生物研究^[8,9]等诸多方面。

分析技术的不断进步, 极大地推动了代谢组学研究的进展。其中包括前处理技术和仪器分析技术, 而前处理技术与仪器分析技术紧密相关: 不同的仪器分析技术对于样品的前处理有不同的要求, 只有经过适当的前处理, 才能保证对样品所做的分析结果具有可信度。代谢组学研究的仪器分析技术主要基于核磁共振波谱(NMR)和质谱(MS)技术, 此外还

基金项目: 上海市自然科学基金(No. 06ZR14112)

*通讯作者: Tel: 86-21-81871261-87; ✉: zzycyy@yahoo.com.cn

收稿日期: 2009-04-30; 接受日期: 2009-06-30

有傅立叶变换红外光谱 FTIR^[10]。质谱技术又主要是与各大色谱技术联合使用, 如气相色谱质谱联用技术(GC-MS)、毛细管电泳质谱联用技术(CE-MS), 当然也有直接注射质谱 DIMS 技术用于酵母类的足迹分析报道^[11]。

本文就微生物代谢组学研究中, 前处理技术和各种分析方法的优缺点进行综述。并对微生物代谢组学研究中分析技术的发展趋势作一展望。

1 前处理技术

做好样品的前处理是取得可靠分析结果的先决条件。在微生物代谢组学研究过程中, 前处理的关键在于如何迅速降低胞内代谢酶活性及提取代谢物组分。根据分析对象是原核生物还是真核生物, 淬灭的方法有所不同。淬灭方法的好坏取决于操作过程中胞内物质泄漏率的高低。Mashego MR 等人总结了文献报道的各大经典方法, 但目前还没有一种方法具有普遍使用性, 需要针对不同的待测对象选择合适的淬灭和提取方法^[12,13]。

1.1 淬灭

淬灭即迅速降低细胞内的代谢酶活性, 使代谢反应停止。常用的淬灭方式有骤变温度法和加有机溶剂法。骤变温度指瞬间改变样品温度至 -40°C 或 $>80^{\circ}\text{C}$, 也有使用液氮灭活, 其原理也是迅速降低样品温度至 -150°C , 抑制代谢酶活性, 再于 0°C 解冻后收集菌体。在样品中加入酸(高氯酸、盐酸、三氯乙酸)或碱(氢氧化钠、氢氧化钾)也能达到淬灭的目的。研究发现, 淬灭过程会导致泄露即细胞内代谢物的丢失, 且泄露的程度与淬灭时间、温度及加入的有机溶剂量等有关, 随着缓冲液的加入, 淬灭时间减少, 离心速度加快, 泄露程度会减轻, 研究还表明真核生物灭活过程中, 由有机溶剂引起的代谢产物泄露不及原核生物严重^[14]。既然淬灭过程中泄露在所难免, 在进行样品前处理时应尽量将泄露的影响降到最低, 并注意平行操作, 快速淬灭后, 迅速低温离心收集菌体。

1.2 细胞内代谢产物的提取

代谢产物的提取以尽可能多的提取代谢物, 避免物理或化学改性, 尽可能减少稀释效应为原则^[13]。Maharjan RP 使用酸碱破坏、冷甲醇破壁、甲醇或乙醇中高温提取、氯仿-甲醇溶菌提取等 6 种不同的提取方式提取大肠杆菌中的代谢物, 以同位素标记的

葡萄糖作为检验指标比较各种提取方式, 研究表明, 低温下(-40°C)以甲醇作为提取溶剂时效果最佳, 同时文章也指出代谢物提取方法的选择与化合物自身性质及分析的目的相关^[15]。衡量一个提取方法的好坏不能只关注最终代谢产物的量, 首先要确保提取过程中代谢物的稳定, 因此在提取时往往要加入缓冲溶液来增强代谢物的稳定性, 如乙醇胺、磷酸盐、42 羟乙基哌嗪乙磺酸(HEPES)^[16]、哌嗪乙磺酸(PIPES)^[14]等, 后两者使用更为普遍。除了上面提到的液液萃取之外, 微波辅助萃取、超临界流体萃取、固相萃取、固相微萃取等方法以缩短提取时间、提高提取效率、溶剂消耗低, 易于实现自动化的优势在微生物代谢领域也有广泛的应用前景。

2 分析技术平台

代谢物的多样性决定了代谢组学研究需要根据样品的属性和研究目的来选择并综合运用多种分析技术平台。图 1 所示为各种代谢组学研究中常用的技术平台^[17]。尤其核磁共振波谱技术及色谱-质谱联用技术的应用最为广泛。

2.1 NMR

核磁共振光谱(Nuclear magnetic resonance, NMR)技术能快速准确的对样品进行高通量分析, 且样品预处理比较简单, 适合复杂基质的微生物样品的代谢组学研究。NMR 主要通过磁场和射频脉冲作用于原子核, ^1H (质子)-核磁共振临床研究报告表明, 大多数已知的代谢物含有 H 原子, 所以系统对于特殊的代谢物不存在任何歧视。 ^1H -核磁共振光谱能提供分子中氢原子所处的化学环境、各官能团或分子骨架上氢原子的相对数目, 以及分子构型等相关信息; ^{13}C -核磁共振光谱能提供有关分子骨架结构信息, 二者相互补充, 用于化合物分子结构测定。一些质谱响应低、不易离子化的化合物尤其适合使用 NMR 来进行研究。

在代谢组学提出的早期, 核磁共振波谱就已经是研究的主要工具之一, 关于植物代谢组学的很多研究就是基于 NMR 的^[18,19]。在微生物代谢组学的研究过程中, NMR 也发挥着巨大的作用。但是一般来说, NMR 存在着灵敏度低, 对样品用量需求大的问题, 好在现在也有高照射频率的商用核磁共振仪, 如 950 MHz, 可以提高灵敏度和分辨率^[10]。外磁场强度大的仪器更主要的特点是可以使图谱简化(在

<http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>

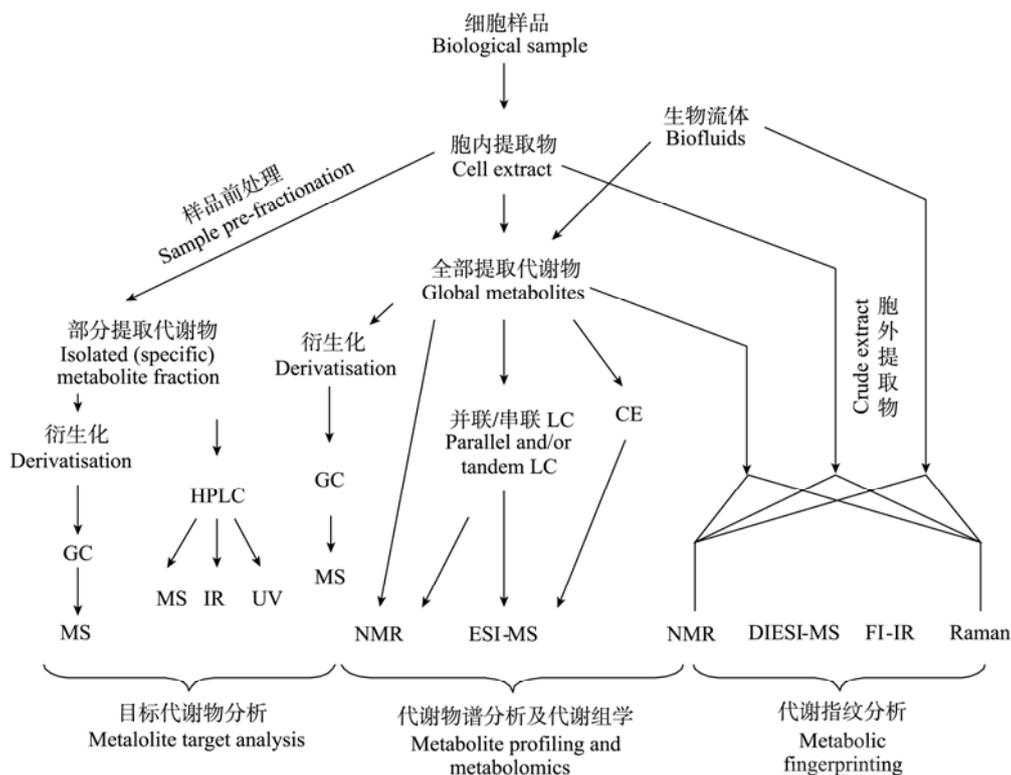


图1 代谢组学研究中常用的技术平台
Fig. 1 Analysis platform in metabolomics

低 MHz 仪器上测定呈高级偶合的信号, 在高 MHz 仪器上测定信号常呈一级偶合), 便于分析。二维-NMR(2D-NMR)技术的开发应用, 既显著提高了测定灵敏度, 又使得 ^1H -谱与 ^{13}C -谱相构联, 建立了不依赖任何经验规则预测的, 对分子骨架、构型及构象等直接确凿的测定方法。

有学者利用 2D 和 1D-谱相结合的方法从腐生真菌 *Ulocladium atrum* 中找出抗真菌的活性成分 cyclopeptolide 1, 不同于以往文献中 cyclopeptolide 1 只能抗酵母样真菌, 不具备抗丝状真菌活性的报道, 他们发现 cyclopeptolide 1 具有抗植物丝状真菌的活性, 并对其结构进行了确证^[20]。

NMR 的优势在于它不需要进行样品的提取、纯化等复杂的预处理过程, 就能够快速地检测机体代谢表达谱的改变, 甚至可以在活体上进行相关检测^[21]。

2.2 MS

质谱分析法主要是通过分析样品离子的质荷比而实现对样品的定性和定量分析。质谱图中常常包含化合物的分子离子峰以及离子碎片峰, 可以提供大量的结构信息。

2.2.1 DIMS: 直接注射质谱(DIMS)分析方法应用

较早, 比较经典的如 Allen 等人将酿酒酵母培养基上清液直接注入正离子低分辨率的电喷雾质谱进行分析, 得到 250 个单基因剔除酵母菌的平均足迹。每个质荷比(m/z)下都测得峰值, 得到一些典型峰, 利用这种技术, 他们能迅速筛选酵母菌突变株, 得到大量的可用于通用代谢模式识别的数据。此种方法可以快速、简便的区别抗菌物质的作用模式, 还能够提供大量的有用信息^[11]。

DIMS 技术是一种高通量的筛选工具, 每天能检测分析大量的生物样品。且样品无需经过特殊处理, 直接注入质谱仪, 但 DIMS 只能作为样品筛选工具, 而不能作为代谢物定量工具, 因为样品分析过程中的离子抑制效应会影响检测的灵敏度。而且根据样品离子化程度的高低, 代谢组的有效区域有大有小。理论上每个波谱峰代表一种样品成分, 质荷比(m/z)可作为样品鉴别的标准, 但是没有预先进行色谱分离处理, 往往会发生色谱峰重叠的现象, 给鉴别带来困难。Georgina 等人利用 DIMS(Q-TOF) 和 GC-TOF-MS 做代谢足迹分析来区别不同的酿酒酵母^[22], 通过运用多种化学计量学方法比较后发现两种分析方法之间没有本质的区别。此外, Sandrine

Mas 等人比较了 DIMS 技术及气相色谱质谱联用 (GC-MS) 技术用于酵母株系的足迹分析, 发现虽然 DIMS 分析法可以提供更为全面的质谱信息, 但色谱与质谱联用技术才是代谢组学研究最常用的技术, 如气相色谱质谱联用技术, 高效以及超高效液相色谱质谱联用技术等^[22,23]。

2.2.2 GC-MS: 气相色谱质谱联用(Gas chromatography-mass spectrometer, GC-MS) 技术是目前代谢轮廓分析所使用的最频繁的分析手段之一。仪器技术已经足够成熟, 适合分析大量样品, 而且科技进步扩大了可供检测样品的范围, 算法的改进、数据库的不断完善, 也使得捕获更多的生物学相关信息成为可能^[24]。GC-MS 技术允许在一次分析过程中同时检测不同类型的代谢物。这是代谢组学研究的经典方法, 很多代谢组学方面的文章均出于此^[14,25-27]。微生物方面也不例外, Steve O'Hagan 等利用气相色谱-飞行时间质谱 (GC-TOF/MS) 研究酵母发酵过程中的代谢产物, 他们侧重优化分析仪器的参数, 发明了闭环多目标的参数优化方法^[7]。此方法无需人工干预即可找到最优化的分析参数, 而且适用于多种类型分析参数的优化。Villas-Bôas SG 工作组一直致力于酵母代谢组学研究, 从样品前处理^[14], 胞内外代谢物的定性定量分析^[28], 比较不同分析手段用于区分酵母株系^[23], 到利用胞外代谢组学对 *Clostridium proteoclasticum* B316^T 进行转录插入株系表型鉴定^[29]等等, 在其研究过程中 GC-MS 方法一直是重要的分析工具, 发挥重要的作用。

气相色谱质谱联用的优势在于有较高的分辨率和检测灵敏度, 并且有可供参考比对的标准谱图库, 能方便地得到待分析组分的定性结果, 但其要求样品具有挥发性, 或者通过对样品进行衍生化处理使其具有挥发性, 前处理步骤相对繁琐。

2.2.3 HPLC/UPLC-MS: 液相色谱-质谱联用系统(Liquid chromatography-mass spectrometer, LC-MS) 采用液相色谱 (LC) 作为主要的分离手段, 增强其分辨能力, 与质谱 (MS) 或串联质谱 (MS/MS) 的联用可以得到代谢组分的结构信息。与 NMR 相比, LC-MS 具有高灵敏度和高分辨率的优势; 与 GC-MS 相比, 样品的前处理相对简单, 因此在代谢组学领域得到了越来越广泛的应用。然而, 由于代谢物本身所具有的复杂性, 为了实现较好的分离效果, 传统的液相色谱往往需要长达数十分钟的分离时间, 分析通

量较低。最近出现的超高效液相色谱 (Ultra performance liquid chromatography, UPLC) 具有分析速度快、高峰容量和高灵敏度等特点, 符合代谢组学高通量的分析要求^[30]。Yu BJ 等人使用 nano-HPLC-MS/MS 检测大肠杆菌赖氨酸乙酰化蛋白的多样性。研究发现, 稳定期的赖氨酸乙酰化蛋白的相关性要比对数生长期大, 而且大多数糖酵解和三羧酸 (Tricarboxylic acid, TCA) 循环都有赖氨酸乙酰化作用^[31]。Joseph J Dalluge 等利用 LC-MS-MS 方法同时检测 20 种基本氨基酸, 并研究它们与微生物发酵的相关性, 研究表明此种方法可以用于微生物发酵过程中的氮源、碳源的筛选^[32]。该方法在代谢工程及生物过程优化方面具有很好的发展趋势。

2.2.4 CE-MS: 毛细管电泳与质谱联用(CE-MS) 技术是近年来发展起来的一种新型分离检测技术。它综合了毛细管电泳的高效、快速与质谱强大的检测功能等优点, 广泛应用于生命科学研究各邻域, 尤其擅长样品中极性化合物的分析^[33], 因此在代谢组学领域也占有一席之地, 如 Harada 等人利用 CE-MS 实现对未经衍生化处理的氨基酸进行测定^[34]。但与前面几种分析方法相比, CE-MS 的应用并不是很普及, 还需要深入发掘它的优势。

2.3 光谱法及其它方法

除了上面提到的 NMR 及 MS 方法外, 还有光谱法及多种方法联合应用进行代谢组学研究, 如傅立叶红外光谱方法用于百日咳杆菌的生物被膜研究^[35]; ¹³C 同位素标记结合 NMR 及 MS 法测定代谢流^[36]。

3 展望

继基因组学、蛋白组学之后, 代谢组学已经成为系统生物学研究中不可分割的一部分。一直以来, 微生物代谢组学都是研究的热点, 随着分析科学和生物信息学的不断发展, 将在探索微生物世界的过程中大放异彩。微生物代谢组学面临的最大挑战就是同时测定细胞内的大量代谢物, 因为所有代谢物不仅性质不同, 浓度也有差异。因此, 分析技术的发展主要集中在提高分辨率、增加样品通量上, 选择合适的分析平台, 针对不同的分析目的充分发挥各自的优势实现样本全面性分析。

参考文献

[1] Elmroth I, Sundin P, Valeur A, et al. Evaluation of chro-

<http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>

- matographic methods for the detection of bacterial-contamination in biotechnical processes. *J Microbiol Methods*, 1992, **15**(3): 215–228.
- [2] Bundy JG, Willey TL, Castel RS, *et al.* Discrimination of pathogenic clinical isolates and laboratory strains of *Bacillus cereus* by NMR-based metabolomic profiling. *FEMS Microbiol Lett*, 2005, **242**(1): 127–136.
- [3] Ruamsdonk LM, Teusink B, Broadhurst D, *et al.* A functional genomics strategy that uses metabolome data to reveal the phenotype of silent mutations. *Nat Biotechnol*, 2001, **19**(1): 45–50.
- [4] Buchholz A, Hudebaas J, Wandrey C, *et al.* Metabolomics: quantification of intracellular metabolite dynamics. *Biomol Eng*, 2002, **19**(1): 5–15.
- [5] Dauner M, Bailey JE, Sauer U. Metabolic flux analysis with a comprehensive isotopomer model in *Bacillus subtilis*. *Biotechnol Bioeng*, 2001, **76**(2): 144–156.
- [6] Dalluge JJ, Smith S, Sanchez-Riera F, *et al.* Potential of fermentation profiling via rapid measurement of amino acid metabolism by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A*, 2004, **1043**(1): 3–7.
- [7] O'Hagan S, Dunn WB, Brown M, *et al.* Closed-loop, multiobjective optimization of analytical instrumentation: gas chromatography/time-of-flight mass spectrometry of the metabolomes of human serum and of yeast fermentations. *Anal Chem*, 2005, **77**(1): 290–303.
- [8] Boersma MG, Solyanikova IP, van Berkel WJH, *et al.* 19F NMR metabolomics for the elucidation of microbial degradation pathways of fluorophenols. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2001, **26**(1/2): 22–34.
- [9] Narasimhan K, Basheer C, Bajic VB, *et al.* Enhancement of plant-microbe interactions using a rhizosphere metabolomics-driven approach and its application in the removal of polychlorinated biphenyls. *Plant Physiol*, 2003, **132**(1): 146–153.
- [10] Lindon JC, Nicholson JK. Analytical technologies for metabolomics and metabonomics, and multi-omic information recovery. *Trends in Analytical Chemistry*, 2008, **27**(3): 194–204.
- [11] Allen J, Davey HM, Broadhurst D, *et al.* Discrimination of modes of action of antifungal substances by use of metabolic footprinting. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, **70**(10): 6157–6165.
- [12] Mashego MR, Rumbold K, De Mey M, *et al.* Microbial metabolomics: past, present and future methodologies. *Biotechnol Lett*, 2007, **29**(1): 1–16.
- [13] 周大炜, 朱之燕. 微生物代谢组学的样品前处理. *化学通报*, 2008, **6**: 404–407.
- [14] Villas-Bôas SG, Højer-Pedersen J, Akesson M, *et al.* Global metabolite analysis of yeast: evaluation of sample preparation methods. *Yeast*, 2005, **22**(14): 1155–1169.
- [15] Maharjan RP, Ferenci T. Global metabolite analysis: the influence of extraction methodology on metabolome profiles of *Escherichia coli*. *Anal Biochem*, 2003, **313**(1): 145–154.
- [16] Oldiges M, Kunze M, Degenring D, *et al.* Stimulation, monitoring, and analysis of pathway dynamics by metabolic profiling in the aromatic amino acid pathway. *Biotechnol Prog*, 2004, **20**(6): 1623–1633.
- [17] Goodacre R, Vaidyanathan S, Dunn WB, *et al.* Metabolomics by numbers: acquiring and understanding global metabolite data. *Trends Biotechnol*, 2004, **22**(5): 245–252.
- [18] Choi HK, Choi YH, Verberne M, *et al.* Metabolic fingerprinting of wild type and transgenic tobacco plants by 1H NMR and multivariate analysis technique. *Phytochemistry*, 2004, **65**(7): 857–864.
- [19] Wang Y, Tang H, Nicholson JK, *et al.* Metabolomic strategy for the classification and quality control of phytochemistry: a case study of chamomile flower (*Matricaria recutita* L.). *Planta Med*, 2004, **70**(3): 250–255.
- [20] Yun BS, Kwon EM, Kim JC, *et al.* Antifungal cyclopeptide from fungal saprophytic antagonist *Ulocladium atrum*. *J Microbiol Biotechnol*, 2007, **17**(7): 1217–1220.
- [21] Lindon JC, Holmes E, Nicholson JK. Toxicological applications of magnetic resonance. *Prog Nucl Mag Res Sp*, 2004, **45**(1/2): 109–143.
- [22] Georgina A Pope, Donald A MacKenzie, Marianne Defernez, *et al.* Metabolic footprinting as a tool for discriminating between brewing yeasts. *Yeast*, 2007, **24**(8): 667–679.
- [23] Mas S, Villas-Bôas SG, Hansen ME, *et al.* A comparison of direct infusion MS and GC-MS for metabolic footprinting of yeast mutants. *Biotechnol Bioeng*, 2007, **96**(5): 1014–1022.
- [24] Oliver Fiehn. Extending the breadth of metabolite profiling by gas chromatography coupled to mass spectrometry. *Trends Analyt Chem*, 2008, **27**(3): 261–269.
- [25] Robertson DG, Reily MD, Baker JD. Metabonomics in pharmaceutical discovery and development. *J Proteome Res*, 2007, **6**(2): 526–539.
- [26] Bowser R, Cudkowiec M, Kaddurah-Daouk R. Biomarkers for amyotrophic lateral sclerosis. *Expert Rev Mol Diagn*, 2006, **6**(3): 387–398.
- [27] Dixon RA, Gang DR, Charhon AJ, *et al.* Applications of

- metabolomics in agriculture. *J Agric Food Chem*, 2006, **54**(24): 8984–8994.
- [28] Villas-Bôas SG, Moxley JF, Akesson M, *et al.* High-throughput metabolic state analysis: the missing link in integrated functional genomics of yeasts. *Biochem J*, 2005, **388**(Pt 2): 669–677.
- [29] Villas-Bôas SG, Moon CD, Noel S, *et al.* Phenotypic characterization of transposon-inserted mutants of *Clostridium proteoclasticum* B316^T using extracellular metabolomics. *J Biotechnol*, 2008, **134**(1/2): 55–63.
- [30] Issaq HJ, Abbott E, Veenstra TD. Utility of separation science in metabolomic studies. *J Sep Sci*, 2008, **31**(11): 1936–1947.
- [31] Yu BJ, Kim JA, Moon JH, *et al.* The diversity of lysine-acetylated proteins in *Escherichia coli*. *J Microbiol Biotechnol*, 2008, **18**(9): 1529–1536.
- [32] Dalluge JJ, Smith S, Sanchez-Riera F, *et al.* Potential of fermentation profiling via rapid measurement of amino acid metabolism by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A*, 2004, **1043**(1): 3–7.
- [33] Ramautar R, Somsen GW, de Jong GJ. CE-MS in metabolomics. *Electrophoresis*, 2009, **30**(1): 276–291.
- [34] Harada K, Fukusaki E, Bamba T, *et al.* *In vivo* ¹⁵N-enrichment of metabolites in suspension cultured cells and its application to metabolomics. *Biotechnol Prog*, 2006, **22**(4): 1003–1122.
- [35] Serra DO, Lücking G, Weiland F, *et al.* Proteome approaches combined with Fourier transform infrared spectroscopy revealed a distinctive biofilm physiology in *Bordetella pertussis*. *Proteomics*, 2008, **8**(23/24): 4995–5010.
- [36] Rantanen A, Rousu J, Jouhten P, *et al.* An analytic and systematic framework for estimating metabolic flux ratios from ¹³C tracer experiments. *BMC Bioinformatics*, 2008, **9**: 266.

征订启事

2010年部分生物、农林类学术期刊联合征订表(2-2)

刊物名称	邮发代号	刊期	年价(元)	网址	E-mail
微生物学通报	2-817	月刊	576	http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn/	tongbao@im.ac.cn
武汉植物学研究	38-103	双月刊	180	http://whzwxxyj.cn	editor@rose.whiob.ac.cn
畜牧兽医学报	82-453	月刊	240	http://www.xmsyxb.com	xmsyxb@263.net
遗传	2-810	月刊	600	http://www.chinagene.cn	yczz@genetics.ac.cn
遗传学报	2-819	月刊	600	http://www.jgenetgenomics.org	jgg@genetics.ac.cn
营养学报	6-22	双月刊	108	http://yyxx.chinajournal.net.cn/	yyxx@chinajournal.net.cn
云南植物研究	64-11	双月刊	150	http://journal.kib.ac.cn	bianji@mail.kib.ac.cn
植物遗传资源学报	82-643	双月刊	120	http://www.zwyczy.cn	Zwyczyxb2003@sina.com Zwyczyxb2003@163.com
中国农业科学 (中文版)	2-138	半月刊	1188	http://www.ChinaAgriSci.com	zgnykx@mail.caas.net.cn
中国农业科学 (英文版)	2-851	月刊	432	http://www.ChinaAgriSci.com	zgnykx@mail.caas.net.cn
中国实验动物学报	2-748	双月刊	120	http://www.calas.org.cn	A67761337@126.com
中国生态农业学报	82-973	双月刊	210	http://www.ecoagri.ac.cn	editor@sjziam.ac.cn
中国水产科学	18-250	双月刊	180	http://www.fishscichina.com	zgscckx@cafs.ac.cn
中国水稻科学	32-94	双月刊	90	http://www.ricesci.cn	cjrs@263.net
作物学报	82-336	月刊	600	http://www.chinacrops.org/zwxp	xbzw@chinajournal.net.cn

<http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>