

T_RFLP 技术及其在硝化细菌群落分析中的应用

罗剑飞 林炜铁* 任杰 崔华平

(华南理工大学 生物科学与工程学院 广州 510006)

摘要: T_RFLP 是建立在 PCR 基础上的, 一种不依赖于传统培养方法的微生物生态学的研究方法。具有快速、灵敏的特点。自 1997 年首次被报道以来, T_RFLP 技术已广泛应用于菌种鉴定、群落对比分析、群落中系统发育种群多样性的评估等领域, 并成为环境微生物群落结构分析的强有力工具之一。目前 T_RFLP 在国内的应用较少, 硝化细菌的群落分析上还未见报道。但作为一种研究微生物群落结构特征的理想方法, 将会得到广泛地应用。本文主要介绍了 T_RFLP 的基本原理, 概括了在微生物群落分析上的应用, 阐述了硝化细菌传统研究的局限性及 T_RFLP 在硝化细菌群落结构分析上的应用前景。

关键词: T_RFLP, 群落分析, 硝化细菌

T_RFLP Technique and Its Application on Community Analysis of Nitrifying Bacteria

LUO Jian-Fei LIN Wei-Tie* REN Jie CUI Hua-Ping

(Department of Biological Science and Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510006)

Abstract: Terminal restriction fragment length polymorphism (T_RFLP) analysis is a culture-independent approach for analyzing microbial community in environment. It bases on PCR technology, and its process includes DNA extraction of environmental samples, amplification of genes encoding the 16S rRNA, 18S rRNA or enzymes with fluorescently labeled primers, the restriction enzyme digestion of PCR products, capillary electrophoresis and the analysis of T_RFLP profile. It has been proved to be powerful applied on microbial community in environment since developed in 1997. Currently, T_RFLP rarely applied in China, and it has no applications on microbial community analysis of nitrifying bacteria. In this article, the fundamental principle of this technique and the recent applications of T_RFLP on microbial community are summarized; in addition, it illustrates the confinements of conventional culture-dependent of nitrifying bacteria and the foreground of T_RFLP applying on microbial community structure analysis of nitrifying bacteria.

Keywords: T_RFLP, Community analysis, Nitrifying bacteria

环境微生物是由多个种群(population)组成的微生物群落(community), 不同种群之间存在着共生、互利、共存和竞争等各种复杂的关系, 在物质循环

和能量转化过程中发挥着重要作用^[1]。因此, 环境中的微生物都不是单独存在的, 总是通过各种信号传递、对空间和营养的相互竞争和依赖等作用而形成

* 通讯作者: ✉: wettie@21cn.com

收稿日期: 2007-07-05; 接受日期: 2007-08-31

的微生物群落^[2]。近几年来,微生物群落结构成为研究的热点。首先,群落结构决定了生态功能的特性和强弱。其次,群落结构的高稳定性是实现生态功能的重要因素。再次,群落结构变化是标记环境变化的重要方面。因此,通过对目标环境微生物群落的种群结构和多样性进行解析并研究其动态变化,可以为优化群落结构、调节群落功能和发现新的重要微生物功能类群提供可靠的依据^[3]。

传统的微生物群落分析方法建立在微生物分离、纯种培养的基础上,通过对纯种微生物进行显微观察和生理生化特性研究来认识群落结构^[1, 2]。由于环境中微生物群落结构非常复杂,物种多样性极高,纯种分离富集培养的方法不但费时费力,而且存在很多的局限性:自然界中绝大部分的微生物,以目前的条件还难以培养,而且一旦将这些有机体从环境中分离出来,微生物原有生存环境将被改变,因而所获得的物种丰度和物种均匀度数据无法准确地反映原始群落结构和微生物多样性,且分离培养后微生物的生理特性易发生改变^[1, 4, 5]。培养分离方法采用配比简单的营养基质和固定的培养温度,还忽略了气候变化和生物相互作用的影响^[3]。反应结果的阳性阴性有时不好判断,容易产生偏差^[6]。所以,很有必要研究不依赖微生物培养来进行环境微生物群落分析的方法。近年来,随着分子生物学理论与技术的发展,基于 16S rRNA 基因的非培养技术为揭示自然环境中微生物种类和遗传多样性开辟了

一条全新的途径。末端限制性酶切片段长度多态性分析(terminal restriction fragment length polymorphism, T_RFLP)就是在PCR技术和RFLP技术基础上发展起来的微生物群落分析的最新技术之一^[2]。

1 T_RFLP 技术的基本原理

T_RFLP技术以分子系统学原理为基础,综合运用了PCR技术、DNA限制性酶切技术、荧光标记技术和DNA序列自动分析技术,在DNA水平上通过对特定核酸片段长度多态性的测定来分析比较微生物群落结构和功能^[2]。其原理是根据微生物群落的特点以及分析目的确定目标DNA片段,以目标基因序列上的保守区域设计一对合适的引物,其中一个引物的 5' 端用荧光物质标记。采集样品,提取样品中微生物群落的总DNA,以总DNA为模板进行PCR扩增,所得到的PCR产物一端就带有这种荧光标记。将PCR产物用合适的限制性内切酶消化,由于在不同细菌的扩增片段内存在核苷酸序列的差异,酶切位点就会存在差异,酶切后就会产生许多不同长度的限制性片段。消化产物用自动测序仪进行检测,只有末端带荧光标记的片段能被检测到,而其它没有带荧光标记的片段则检测不到。通过对这些荧光信号以及由此生成的T_RFLP图谱的分析,就可以揭示样品中微生物的种类、数量和种群大小等,从而解析微生物群落的结构、功能及其动态变化^[2, 7]。图 1^[6]显示了T_RFLP分析的全过程。

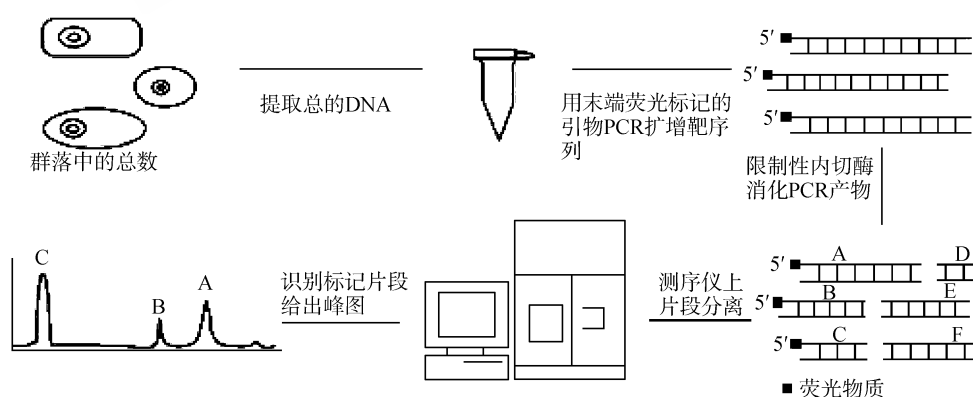


图 1 T_RFLP 流程

Fig. 1 The process of T_RFLP

环境样品总DNA的提取是T_RFLP技术的关键之一。DNA提取法应尽可能地提取样品中所有微生物的完整的DNA分子,使之能够代表样品中的遗传多样性的实际情况。由于实际操作中很难保证对所

有微生物的完整DNA分子进行提取,所以必须根据T_RFLP分析的目的来选取DNA提取方法^[2]。选择引物不同,最终获得的T-RFLP图谱就会产生很大的差异,因为一对引物只能扩增一部分微生物的 16S

rDNA序列, 只有选择特异性强的引物才能获得尽量多的唯一的末端片段长度^[7]。

2 T_RFLP 技术在微生物群落分析中的缺陷和优势

作为一种技术, T_RFLP有其自身的缺陷: 1) 该技术建立在PCR的基础上, 不可避免的造成群落中不同菌种DNA的差异性扩增, 以及目标DNA在菌种间拷贝数的差异等等, 导致分析结果难以准确反映自然群落的多样性以及物种间的相对丰度信息^[2]。2) 该指纹印记技术只检测带荧光标记的末端限制性片段, 从理论上讲, T_RFLP图谱中每个T_RF有可能对应着几个近缘的菌种, 这样造成对群落多样性的低估^[2, 6]。3) 酶切后T_RF的长度不一, 测序仪检测500bp以上的T_RF精度不够, 对于更长的片段, 检测分辨率明显下降, 也会造成对复杂群落多样性的低估^[8, 9]。虽然T_RFLP技术存在不少的缺陷, 但作为分析复杂环境微生物群落的最强有力的工具之

一^[10-13], T_RFLP技术具有几个明显优势: 1) 相对于其它分子生物学分析技术如RFLP、DGGE或TGGE等, 它具有分辨率高、简单快速、易于实现自动化等特点^[2, 32]。2) 重复性好, 平行样得到的峰也是几乎是一样的, 因此用它来进行定性和定量分析是可靠的^[14]。3) 序列数据库具有直接参考意义, 也就是说, 从消化产物中获得的所有的末端片段大小, 可以与越来越丰富的序列数据库中的末端片段相对比, 从而可以做系统发育的推断^[4]。4) T_RFLP的毛细管凝胶电泳分析更为快速, 而且结果是以数据的形式输出^[7]。这些优势使T_RFLP技术越来越广泛地应用于环境中微生物群落多样性的分析。

3 T_RFLP 技术在研究微生物多样性中的应用

近年来, 国内外研究者利用 T_RFLP 技术开展了大量的微生物群落结构方面的研究, 表 1 列举了国外的一些研究, 表 2 列举了国内的一些研究。

表 1 国外利用 T_RFLP 分析技术在微生物群落研究中的应用
Table 1 Applications of T_RFLP used in the study of microbial communities in abroad

序号 Number	研究内容 Aim	结论 Conclusion	文献来源 Reference
1	利用 T_RFLP 法分析了活性污泥、生物反应器内污泥、含沙水层以及白蚁内脏中微生物种群的多样性	T_RFLP 是评估复杂微生物群落多样性、比较不同生态环境下微生物群落多样性及结构的快速有效的方法	[15]
2	利用 T_RFLP 技分析了 3 种不同的细菌群落, 包括鹿肠道、沙地以及被碳水化合物污染的沙地中的微生物群落	表明了这 3 种菌落的不同, 且根据末端片段的大小检测出了 25 种不同的核酸类型	[16]
3	利用 T_RFLP 技术分析了水稻种植区土壤中沿着氧垂直梯度上的细菌群落组成变化。	结合 16S rDNA 克隆文库的构建和测序分析, 获得了与氧垂直梯度相关的不同深度细菌群落组成情况	[17]
4	研究种植不同品种马铃薯的农田土壤中细菌群落结构受到的影响及其变化	尽管建立在 PCR 基础上, T_RFLP 技术用于分析高度多样的土壤细菌群落时, 不仅可以揭示群落结构的空间异质性, 而且能够揭示群落结构随时间的变化规律	[18]

表 2 国内利用 T_RFLP 分析技术在微生物群落研究中的应用
Table 2 Applications of T_RFLP used in the study of microbial communities in china

序号 Number	研究内容 Aim	结论 Conclusion	文献来源 Reference
1	利用 DGGE 和 T_RFLP 分析技术研究堆肥微生物种群分布及群落结构演变规律	DGGE 和 T_RFLP 分析技术为研究堆肥过程提供了有力的技术支持	[19]
2	研究了五氯酚(PCP)对好氧颗粒污泥处理生活污水的影响, 借助(T_RFLP)技术考察了 PCP 存在时好氧颗粒污泥细菌组成的变化	PCP 对氨氮去除率的影响大于对 COD 去除率的影响, 好氧颗粒污泥中微生物的种群数量随着 PCP 浓度的增加而逐渐减少, 氨氮和 COD 去除率的变化与微生物种群数量变化相吻合	[20]
3	应用 T_RFLP 技术分析和比较了胜利油田单 12 区块的 1 口注水井(S12-zhu)和 3 口采油井(S12-4、S12-5 和 S12-19)的油藏微生物多样性	查询 RDP 数据库推测这 4 个油藏样品所共有的优势微生物可能 <i>Pseudomonas</i> 属, <i>Marinobacter</i> 属和产甲烷微生物	[21]
4	利用表面荧光显微的 DAPI 染色法和 T_RFLP 技术分析了胶州湾表面海水微生物的丰度和多样性	总的微生物丰度范围在 10^6-10^7 cells/cm ³ 之间, 与世界上温带的大多数半封闭海湾相似	[22]

T_RFLP 技术自 1997 年首次报道以来, 国外已进行了 10 年的研究, 得到了广泛地应用。国内起步较晚, 应用的范围较小, 但存在很大的发展潜力。

4 T_RFLP 技术在硝化细菌群落分析中的应用

硝化细菌(Nitrifying bacteria)是一大类在自然界氮素循环中十分重要的菌群, 它们能够通过硝化作用把氨氮转化为亚硝酸盐, 再进一步把亚硝酸盐转化为硝酸盐^[23]。目前, 已知的化能无机自养型硝化细菌均不能将氨直接氧化成硝酸盐。将氨氮氧化为硝态氮的过程是两类不同的细菌连续作用的结果。一类是氨氧化菌(AOB), 它们把氨氮转化为亚硝酸盐; 另一类是亚硝酸氧化菌(NOB), 它们将亚硝酸盐氧化为硝酸盐^[23-25]。环境中起硝化作用的是由 AOB 和 NOB 组成的硝化细菌群落, 其中可能包含了不同种属的 AOB 和 NOB。Hongyan Li 等^[26]研究认为在一体式膜反应器中亚硝化单胞菌属和硝化螺菌属是硝化作用中的主要菌, 同时还存在一些其它的硝化杆菌。David Berry 等^[27]在研究饮用水配置系统中发现起硝化作用的微生物群落由亚硝化螺菌、亚硝化单胞菌、硝化杆菌和硝化螺菌组成。

目前, 我国对硝化细菌的研究主要停留在传统的菌种的分离, 纯化和生理生化特性的基础上^[28,29], 但硝化细菌的一些生长特性使其分离的难度加大。如: 1) 硝化细菌的代时长, 生长缓慢^[30], 在硅胶或琼脂平板上菌落较小, 易受杂菌污染。2) 硝化细菌易受温度、pH、溶氧和一些化学因子等环境因素的抑制^[25]。3) 硝化细菌具有生长在固体表面的习性。即使在液体培养基上, 它们也往往附着在不溶性固体颗粒或器壁表面上。粘连在一起给分离工作带来不便^[31]。4) 硝化细菌的生长伴随着其它异养细菌的生长, 要分离到纯种要经过很多次的纯化步骤。现在的研究很少涉及硝化微生物的分子生物学方面的工作。这不仅与应用的要求还有较大的距离, 而且与国外研究水平的差距也很大。传统的显微方法难于获得微生物群落结构和空间分布的有关信息, 因而不利于根据微生物群落多样性的变化以迅速判断环境的变化。所以, 很有必要研究不依赖微生物培养来进行环境微生物群落分析的方法。T_RFLP 技术作为微生物群落分析中快速而有效的方法^[9, 15, 33, 34],

虽然在国内还没有相关的硝化细菌群落多样性分析的报道, 但在国外已有了较广泛的应用。Horz HP 等^[35]利用 T_RFLP 技术, 通过扩增群落中的编码氨单加氧酶的 *amoA* 基因序列, 研究氨氧化菌群的多样性。结果证明 T_RFLP 技术是一种可靠的手段, 可用于快速分析环境样品中氨氧化菌群的群落结构。Takshi Terahara 等^[36]利用 T_RFLP 技术研究了污水处理反应器起步阶段微生物种群的动态变化。结果显示硝化细菌的丰度和活性的增加与初始硝化作用有关。Siriponga S 和 Rittmann BE^[25]利用 T_RFLP 技术分析了 7 个市政水回收厂中硝化细菌群落的多样性。研究结果表明, 种群结构相似的水回收厂中 AOB 和 NOB 具有稳定的硝化作用, 并且在同一个系统中总是存在几种不同生长特性的 AOB 和 NOB。

5 展望

T_RFLP 作为一种研究微生物种群多样性的分子生物学技术, 克服了传统培养方法的限制, 可以快速、灵敏地分析微生物群落的变化规律, 将会广泛应用于硝化细菌群落分析上, 以解决当前研究中因纯种分离的困难而导致的硝化细菌理论研究的难题。

参考文献

- [1] 席劲瑛, 胡洪营, 钱 易. Biolog 方法在环境微生物群落研究中的应用. 微生物学报, 2003, 43(1): 138-141.
- [2] 余素林, 吴晓磊, 钱 易. 环境微生物群落分析的 T_RFLP 技术及其优化措施. 应用与环境生物学报, 2006, 12(6): 861-868.
- [3] 车玉伶, 王 慧, 胡洪营, 等. 微生物群落结构和多样性解析技术研究进展. 生态环境, 2005, 14(1): 127-133.
- [4] 王洪媛, 管华诗, 江晓路. 微生物生态学中分子生物学方法及 T_RFLP 技术研究. 中国生物工程杂志, 2004, 24(8): 42-47.
- [5] Amann RI, Ludwig W, Schleifer KH. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiological reviews*, 1995, 59: 143-169.
- [6] 贾俊涛, 宋林生, 李 筠. T_RFLP 技术及其在微生物群落结构研究中的应用. 海洋科学, 2004, 28(3): 64-68.

- [7] 王洪媛, 管华诗, 江晓路, 等. 微生物生态学一种新研究方法 T_RFLP 技术. 中国生物工程杂志, 2004, **24**(8): 42–47.
- [8] Ranjard L, Poly F, Nazaret S. Monitoring complex bacterial communities using culture-independent molecular techniques: application to soil environment. *Res Microbiol*, 2000, **15**: 167–177.
- [9] Marsh TL, Saxman P, Cole J, *et al*. Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis Program, a Web-Based Research Tool for Microbial Community Analysis. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, **66**(8): 3616–3620.
- [10] Fedi S, Tremaroli V, Scala D, *et al*. T_RFLP analysis of bacterial communities in cyclodextrin-amended bioreactors developed for biodegradation of polychlorinated biphenyls. *Research in Microbiology*, 2005, **156**(2): 201–210.
- [11] Tom-Petersen A, Leser TD, Marsh TL. Effects of copper amendment on the bacterial community in agricultural soil analyzed by the T-RFLP technique. *Microbiology Ecology*, 2003, **46**(1): 53–62.
- [12] Akira Hiraishi, Mitsuru Iwasaki, Hisashi Shinjo. Terminal restriction pattern analysis of 16S rRNA genes for the characterization of bacterial communities of activated sludge. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2000, **90**(2): 148–156.
- [13] Park S, Ku YK, Seo MJ, *et al*. The characterization of bacterial community structure in the rhizosphere of watermelon (*Citrullus vulgaris* SCHARD.) using culture-based approaches and terminal fragment length polymorphism (T_RFLP). *Applied Soil Ecology*, 2006, **33**(1): 79–86.
- [14] Lueders T, Friedrich MW. Evaluation of PCR Amplification Bias by Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of Small-Subunit rRNA and *mcrA* Genes by Using Defined Template Mixtures of Methanogenic Pure Cultures and Soil DNA Extracts. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, **69**(1): 320–326.
- [15] Liu WT, Marsh TL, H Cheng, *et al*. Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 1997, **63**: 4516–4522.
- [16] Clement BG, Kehl LE, DeBord KL, *et al*. Terminal restriction fragment patterns (TRFPs), a rapid, PCR-based method for the comparison of complex bacterial communities. *Journal of Microbiological Methods*, 1998, **31**(3): 135–142.
- [17] Lüdemann H, Arth I, Liesack W. Spatial Changes in the Bacterial Community Structure along a Vertical Oxygen Gradient in Flooded Paddy Soil Cores. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, **66**: 754–762.
- [18] Lukow T, Dunfield PF, Liesack W. Use of the T_RFLP technique to assess spatial and temporal changes in the bacterial community structure within an agricultural soil planted with transgenic and non-transgenic potato plants. *FEMS Microbiology Ecology*, 2000, **32**(3): 241–247.
- [19] 彭科峰, 曹立群, 吴韶平, 等. DGGE和T_RFLP在堆肥微生物群落结构研究中的应用. 生物信息学, 2007, **5**(1): 31–33.
- [20] 李光伟, 刘和, 云娇, 等. 应用 T_RFLP 技术研究五氯酚对好氧颗粒污泥中细菌组成的影响. 环境科学, 2006, **27**(4): 794–799.
- [21] 袁三青, 薛燕芬, 高鹏, 等. T_RFLP 技术分析油藏微生物多样性. 微生物学报, 2007, **47**(2): 290–294.
- [22] Ren J, Dang HY, Song LS, *et al*. Bacterial and cyanobacterial diversities determined by T-RFLP analyses in the Jiaozhou Bay. *Acta Oceanologica Sinica*, 2006, **25**(4): 113–123.
- [23] Daniel SH, John GR. A close look at the bacteriology of nitrification. *Aquacultural engineering*, 1998, **18**: 223–244.
- [24] 郑平, 冯孝善. 硝化作用的生化原理. 微生物学通报, 1999, **24**(3): 215–217.
- [25] Siripong S, Rittmann BE. Diversity study of nitrifying bacteria in full-scale municipal wastewater treatment plants. *water research*, 2007, **41**: 1110–1120.
- [26] Li HY, Yang M, Zhang Y, *et al*. Nitrification performance and microbial community dynamics in a submerged membrane bioreactor with complete sludge retention. *Journal of Biotechnology*, 2006, **123**: 60–70.
- [27] Berry D, Xi CW, Raskin L. Microbial ecology of drinking water distribution systems. *Current Opinion in Biotechnology*, 2006, **17**: 297–302.
- [28] 琚姝, 周长林, 窦洁. 高硝化活性亚硝酸盐氧化细菌的培养和应用研究. 微生物学通报, 2005, **32**(5): 56–61.
- [29] 胡君利, 林先贵, 褚海燕, 等. 土壤氨氧化菌的分离方法研究. 土壤, 2005, **37**(5): 569–571.
- [30] Purkhold U, Pommerening-Roser A, Schmid JS, *et al*. Phylogeny of all recognized species of ammonia oxidizers based on comparative 16S rRNA *amoA* sequence analysis: implications for molecular diversity surveys. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, **66**: 5368–5382.
- [31] 郭爱莲, 李振海, 黄淑菊. 硝化细菌的分离研究. 西北大学学报, 1996, **1**(26): 83–86.
- [32] Seishi Ikeda, Robert DM, Watanabe KN, *et al*. Rapid Detection Method for DNA Fingerprints with a Fluorescence Scanner. *Journal of bioscience and bioengineering*, 2004, **98**(6): 500–503.

- [33] Blackwood CB, Marsh T, Paul EA, *et al.* Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism Data Analysis for Quantitative Comparison of Microbial Communities. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, **69**(2): 926–932.
- [34] Osborne CA, Rees GN, Janssen PH, *et al.* New Threshold and Confidence Estimates for Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of Complex Bacterial Communities. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, **72**(2): 1270–1278.
- [35] Horz HP, Rotthauwe JH, Lukow T, *et al.* Identification of major subgroups of ammonia-oxidizing bacteria in environmental samples by T_RFLP analysis of *amoA* PCR products. *Journal of Microbiological Methods*, 2000, **39**: 197–204.
- [36] Takeshi Terahara, Tatsuhiko Hoshino, Satoshi Tsuneda, *et al.* Monitoring the Microbial Population Dynamics at the Start-Up Stage of Wastewater Treatment Reactor by Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis Based on 16S rDNA and rRNA Gene Sequences. *Journal of bioscience and bioengineering*, 2004, **98**(6): 425–428.

征 稿 简 则

1 刊物简介与栏目设置

《微生物学通报》是由中国科学院微生物研究所和中国微生物学会主办的,以微生物学应用基础研究及高新技术创新为主的综合性学术期刊。刊登内容包括:微生物学、生物工程、病毒学、酶工程、发酵工程、细胞工程等领域的最新研究成果,产业化新技术和新进展。设置的栏目有:研究报告、专论与综述、生物实验室(原技术与方法)、高等院校教学、名师讲堂、教学与科研成果展示、显微世界、专题专栏、专家论坛、书讯、会讯等。

2 投稿方式

投稿时请登录我刊主页 <http://journals.im.ac.cn/wwxtb.cn>, 点击作者投稿区。第一次投稿请先注册,获得用户名和密码,然后依据提示提交稿件,详见主页“投稿、征稿须知”。

作者必须在网站投.doc 格式的电子稿,图与文字编好页码、图号后合成一个文件上传。凡不符合(投稿须知)要求的文稿,本部恕不接受。

3 写作要求

来稿要求论点明确,数据可靠,简明通顺,突出重点。

3.1 篇幅

以 A4 纸 5 号字计算,综述、教学和方法类文章最好在 3 页以内,研究报告 4~6 页(以上均包括图表)。

3.2 图表

文中的图表须清晰简明,文字叙述应避免与图表重复。所有小图的宽度应小于 8 cm(占半栏),大图的宽度应小于 17 cm(通栏)。

3.3 参考文献及脚注

参考文献按文内引用的先后顺序排序编码,未公开发表的资料请勿引用。我刊的参考文献需要注明著者(文献作者不超过 3 人时全部列出,多于 3 人时列出前 3 人,后加“等”或“*et al.*”,作者姓前、名后,名字之间用逗号隔开)、文献名、刊名、年卷期及页码。国外期刊名可以缩写,但必须标准,斜体。参考文献数量不限。

参考文献格式举例:

期刊: [1] 刘 杰, 成子强, 史宣玲. SARS 冠状病毒 *nsp14* 基因的克隆和表达. *微生物学通报*, 2007, **34**(2): 1–3.

[2] Kajiura H, Mori K, Tobimatsu T, *et al.* Characterization and mechanism of action of a reactivating factor for adenosylcobalamin-dependent glycerol dehydratase. *J Biol Chem*, 2001, **276**(39): 36514–36519.

图书: [3] 钱存柔, 黄仪秀. *微生物实验教程*. 北京: 北京大学出版社, 2000, p. 4.

[4] 董志扬, 张树政, 方宣钧, 等. 海藻的生物合成及抗逆机理. 见: 华 璐等. *核农学进展*. 北京: 中国农业出版社, 1996, pp. 115–120.

脚注(正文首页下方):

基金项目: 基金资助(No.)

*通讯作者 Tel: ; Fax: ; E-mail:

收稿日期: 2008-00-00; 接受日期: 2008-00-00

(下转 p. 469)