

# 以 *gfp* 为报告基因的肺炎链球菌启动子 诱捕文库的构建与分析

胥文春<sup>1</sup> 赵 清<sup>1</sup> 孟江萍<sup>2</sup> 单幼兰<sup>1</sup> 李 南<sup>1</sup> 舒朝忠<sup>1</sup> 朱新华<sup>1</sup> 尹一兵<sup>1\*</sup>

(1. 重庆医科大学检验系 临床检验诊断学省部共建教育部重点实验室 重庆市重点实验室 重庆 400016)

(2. 重庆医科大学附属第一医院 重庆 400016)

**摘 要:** 首先构建一个以 *gfp*(green fluorescence protein)为报告基因的自杀质粒 pEVP3-SDGFP, 将肺炎链球菌基因组 DNA 的随机酶切片段(200 bp~800 bp)克隆到该质粒 *gfp* 基因上游的多克隆位点, 得到约 58000 个含有肺炎链球菌基因组 DNA 随机酶切片段的重组子, 提取质粒即为质粒库, 该库大约覆盖肺炎链球菌基因组全长的 5 倍, 插入率达到 90%以上, 且有较强的随机性, 质量较高。将该质粒库转化入肺炎链球菌 TIGR4 菌株, 带有随机片段的报告质粒通过同源重组的方式将 *gfp* 基因融合于细菌染色体上该随机片段之后, 利用质粒的抗生素抗性基因筛选出重组菌株, 从而构建出相应的菌株库, 共获得包含约 500000 个肺炎链球菌转化子的菌株库, 经体内、外实验表明, 其包含插入了 *S. pn* 体内、外表达基因片段的细菌, 可以报告特定条件下的基因表达, 并可通过流式细胞仪识别、分选。该文库的构建为进一步利用差异荧光诱导技术筛选肺炎链球菌体内诱导基因奠定了基础。

**关键词:** 肺炎链球菌, 绿色荧光蛋白, 启动子诱捕文库

## Construction and Analysis of a Promoter-trap Library of *Streptococcus pneumoniae* Which Employed *gfp* as a Reporter Gene

XU Wen-Chun<sup>1</sup> ZHAO Qing<sup>1</sup> MENG Jiang-Ping<sup>2</sup> SHAN You-Lan<sup>1</sup> LI Nan<sup>1</sup>  
SHU Chao-Zhong<sup>1</sup> ZHU Xin-Hua<sup>1</sup> YIN Yi-Bing<sup>1\*</sup>

(1. Key Laboratory of Laboratory Medical Diagnostics, Ministry of Education,  
Faculty of Laboratory Medicine, Chongqing Medical University, Chongqing 400016)

(2. The first affiliated hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400016)

**Abstract:** Firstly a suicide plasmid pEVP3-SDGFP which employed *gfp* as a reporter gene was constructed. DNA fragments of *S. pneumoniae* TIGR4 were cloned upstream of the promoterless green fluorescence protein (*gfp*) gene in pEVP3-SDGFP and a plasmid library which includes 58000 recombinants was constructed. Considering insert DNA orientation and insert size, this library represents 5 coverages of the 2.2 Mb *S.*

*pneumoniae* genome. 90% of these clones had DNA fragments of *S. pneumoniae* and the library is random. Then this plasmid library was transformed into TIGR4. Through recombination, the plasmid DNA which includes the random DNA fragments was placed behind the homologous sequence of the genomic DNA of *S. pneumoniae*. The recombinants were screened according to the antibiotic gene in plasmid, and the *S. pneumoniae* library was obtained. This library includes 500000 *S. pneumoniae* transformants. Analysed by fluorescence microscope and flow cytometry, this *S. pneumoniae* library contains both the in vivo-induced gene fragments and in vitro-expressing fragments which can be reported by GFP. So this promoter-trap library can be used in analyzing the in vivo-induced gene of *S. pneumoniae* by differential fluorescence induction.

**Keywords:** *Streptococcus pneumoniae*, Green fluorescence protein, Promoter-trap library

肺炎链球菌是一种重要的条件致病菌, 它从鼻腔进入血液并引起菌血症、肺炎和脑膜炎等严重并发症的机理并未完全清楚。细菌进入机体并生存下来, 它必须要抑制一些基因的表达, 同时也要激活一些基因的表达以适应完全不同的环境, 这些在体内激活表达的基因也叫体内诱导基因, 很可能是细菌致病的关键因素。因此找出这些基因, 不仅能阐明其在致病中的作用, 还能阐明其在引起的不同疾病(菌血症、肺炎和脑膜炎)中的作用, 为筛选抗菌药物作用靶点及蛋白疫苗候选基因提供依据。

鉴定细菌体内诱导基因的方法包括体内表达技术(*in vivo* expression technology, IVET), 标签变异技术(signature-tagged mutagenesis, STM)和基因芯片技术(microarray chip technology)等, 基因芯片技术具有不需要繁杂的后续步骤即可鉴定出差异常表达的基因, 且能同时检测出转录诱导和转录抑制的基因等优点, 然而不能从感染组织内得到足够的RNA是限制该法应用的瓶颈。差异荧光诱导技术(differential fluorescence induction, DFI)是一种体内表达技术<sup>[1]</sup>, 在分析弱启动子和瞬时表达的启动子方面优于其它IVET, 还能对单个细菌内基因的表达水平进行相对定量, 另外它不干扰细菌在宿主体内的侵袭、扩散和增殖过程<sup>[2,3]</sup>, 且该技术比STM和其他IVET更加简便可行, 结果更直观, 因此它是筛选体内表达基因的有力工具, 已用于多种病原菌的致病机理研究<sup>[4,5]</sup>。本研究旨在构建一个包含无启动子序列报告基因的启动子诱捕文库, 为采用DFI技术筛选肺炎链球菌体内诱导基因奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 菌株和质粒: 肺炎链球菌血清 4 型标准菌株

TIGR4(ATCC-BAA334), 购自美国 ATCC 微生物菌种保存中心。大肠杆菌 DH5 $\alpha$ , 由本实验室保存。

pGreenTIR: 含有 SD 序列和翻译增强子 ENH, 筛选标志为氨苄青霉素抗性基因 *Amp*, 美国加州大学伯克利分校 Steven Lindow 教授惠赠。质粒 pEVP3: 筛选标志为氯霉素抗性基因 *cat*, 本室保存。

**1.1.2 培养基:** C+Y 半合成培养基, 含 0.5% Yeast 提取物, 用于肺炎链球菌的培养; TSA 血平板, 含 5% 羊血和 2.5  $\mu\text{g/mL}$  氯霉素, 用于转化后肺炎链球菌的筛选; LB 培养基, 氨苄青霉素终浓度为 150  $\mu\text{g/mL}$ , 用于 DH5 $\alpha$ (含 pGreenTIR)的培养; LB 培养基, 氯霉素终浓度为 25  $\mu\text{g/mL}$ , 用于 DH5 $\alpha$ (含 pEVP3)的培养。

**1.1.3 动物:** BALB/c 小鼠, 雌性, 18 g~22 g, 购自重庆医科大学实验动物中心。

**1.1.4 试剂:** 质粒小、大量抽提试剂盒、胶回收试剂盒、细菌DNA提取试剂盒均购自上海华舜生物工程公司; DNA连接试剂盒、各种限制性内切酶购自大连TaKaRa公司; DNA聚合酶购自上海生工生物工程技术有限公司。用于诱导肺炎链球菌形成感受态并发生转化的感受态刺激肽(competence-stimulating peptide 2, CSP<sub>2</sub>)由挪威生命科学大学 Håvarstein LS惠赠。

**1.1.5 仪器:** 美国 BD 公司 FACS Calibur 流式细胞仪。

### 1.2 方法

本研究技术路线见图 1。

**1.2.1 重组质粒 pEVP3-SDGFP 的构建与鉴定:** 分别增菌大肠杆菌 DH5 $\alpha$ (含 pGreenTIR)和 DH5 $\alpha$ (含 pEVP3), 提取质粒 DNA。同时用 *Bam*H 酶切质粒 pEVP3(单酶切)和 pGreenTIR(ENH-SD-EGFP 上下游各 1 个酶切位点), 取 pEVP3 酶切后去磷酸化产物和

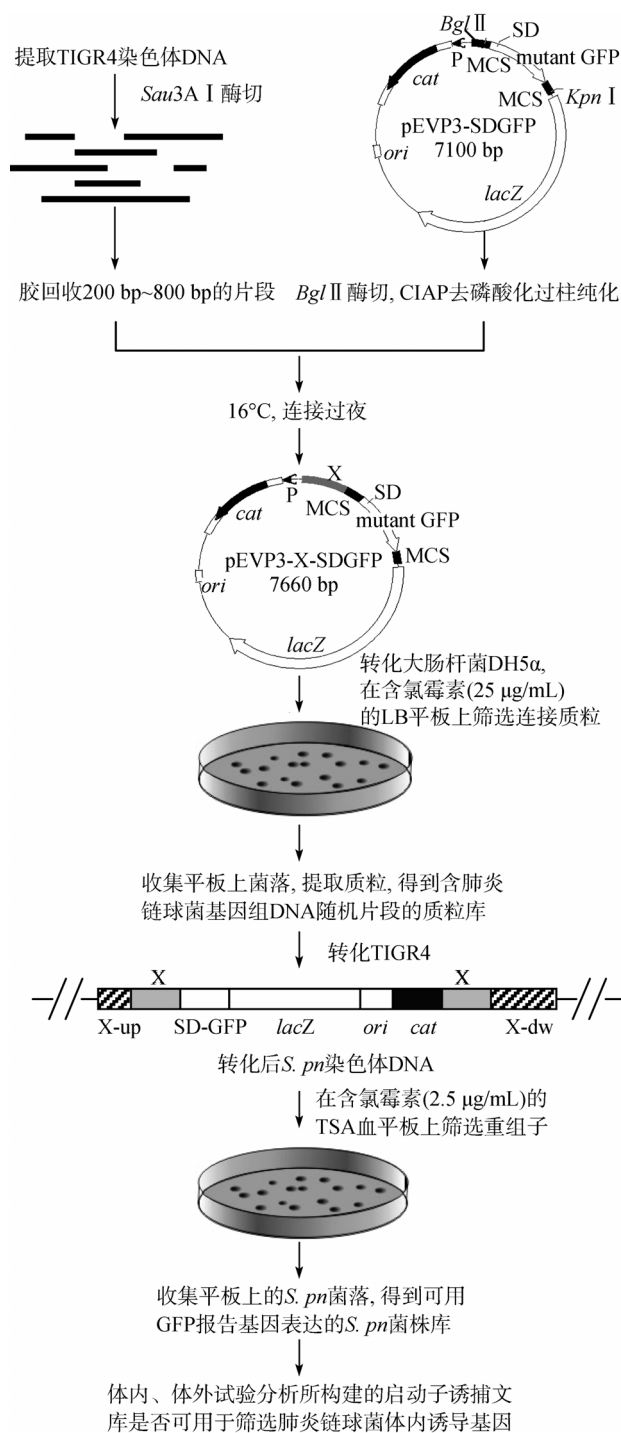


图1 肺炎链球菌启动子诱捕文库构建示意图

Fig. 1 Strategy for construction of promoter-trap library in *S. pn*

pGreenTIR 约 800 bp 片段回收产物按一定比例于 16°C、过夜连接, 转化入大肠杆菌感受态细胞, 25 μg/mL 氯霉素 LB 平板筛选, 过夜培养。阳性菌落增菌后提取质粒, 通过 PCR、酶切及测序鉴定 (PCR 及测序引物均为 pEVP3 多克隆位点两侧测序

引物 P1: 5'-GTTGAACTGCTGGTGCTCTTAA-3', P2: 5'-TGCTTTCACTTTATTATCTTGG-3')。

**1.2.2 肺炎链球菌 TIGR4 基因组 DNA 提取、酶切及胶回收:** 从 -70°C 冰箱中取出保存的肺炎链球菌 TIGR4, 室温融化后取 50 μL 菌液加入到盛有 100 mL C+Y 培养基的灭菌三角烧瓶中, 37°C 过夜培养, 勿振摇, 至对数生长期的中晚期时收获细菌, 按照试剂盒说明书操作提取细菌 DNA。0.8% 琼脂糖凝胶电泳观察 DNA 的完整性, 用蛋白核酸分析仪分析 DNA 的质量和含量。用 *Sau3A* 酶切肺炎链球菌 TIGR4 基因组 DNA, 1.5% 琼脂糖电泳, 胶回收 200 bp~800 bp 的片段。

**1.2.3 含肺炎链球菌基因组 DNA 随机片段的质粒库的构建:** 将含质粒 pEVP3-SDGFP 的大肠杆菌 DH5α 接种于含 25 μg/mL 氯霉素的 LB 培养基中, 37°C 过夜振荡培养, 按质粒大量抽提试剂盒说明书操作提取质粒 DNA。用 *Bgl* 酶切该质粒, 直接过柱纯化酶切产物。CIAP 去磷酸化 (100 μL 反应体系), 直接过柱纯化去磷酸化产物。

采用 TaKaRa 公司的 DNA 连接试剂盒, 将细菌基因组 DNA 随机片段与去磷酸化的 pEVP3-SDGFP 片段按一定比例经 16°C、过夜连接, 同时做阴性和自身环化对照。以此产物转化大肠杆菌 DH5α 感受态细胞, 热休克后直接铺于含 25 μg/mL 氯霉素的 LB 平板上, 37°C 孵育 24 h, 计数平板上的菌落。

收集平板上所有菌落于含有 LB 培养基的无菌 EP 管中, 直接按质粒小量抽提试剂盒说明书提取质粒 DNA, 得到含肺炎链球菌基因组 DNA 随机片段的质粒库。用蛋白核酸分析仪分析 DNA 的质量和含量。

如上操作做多次重复, 并随机挑取平板上的单个克隆作插入率鉴定。

**1.2.4 质粒文库的质量鉴定:** 1) 插入率鉴定: 用牙签随机挑取平板上的独立克隆, 于分装有 20 μL ddH<sub>2</sub>O 的 1.5 mL EP 管中, 沸水中 5 min, 以此为模板, 用质粒 pEVP3 多克隆位点两侧测序引物 P1、P2 进行 PCR 鉴定, pEVP3-SDGFP 为对照。1.5% 琼脂糖电泳, 观察电泳条带的位置, 若 PCR 产物位置高于对照, 表明含插入片段; 若 PCR 产物与对照在同一泳动位置, 表明没有片段插入。

2) 随机性分析 随机抽取上述 30 个质粒的 PCR 产物 (引物为 P1、P2), 先用 P1 为引物正向测序, 若

片段较长再用 P2 反向测序。计算插入片段的平均长度, 并用 DNAssist 软件分析结果, 以了解插入片段的重复情况。同时为进一步了解片段的插入方向, 将测序结果到 Internet (<http://www.ncbi.nlm.gov/BLAST/>)上与肺炎链球菌 TIGR4 全基因组序列做 Blast 分析。

**1.2.5 可用GFP报告基因表达的肺炎链球菌菌株库的构建:** 1) 启动子诱捕文库的构建: 肺炎链球菌的转化及筛选参见Lee等的文章<sup>[3]</sup>, 本实验做了适当修改。取-70℃保存的TIGR4 菌株 500  $\mu$ L培养于 10 mL C+Y培养基(含 1 mmol/L的CaCl<sub>2</sub>和 0.2% BSA)中, 当细菌达到一定菌密度时( $OD_{550}=0.09\sim 0.1$ ), 加入 CSP<sub>2</sub> 10  $\mu$ L, 加入质粒库 10  $\mu$ L, 37℃孵育 90 min, 系列稀释后, 铺于含氯霉素(2.5  $\mu$ g/mL)的TSA血平板上, 37℃孵箱培养 16 h~18 h, 计数平板上的菌落, 同时收集所有菌落, 得到可用GFP报告肺炎链球菌基因表达的菌株库, 20%甘油-70℃C保存。

2) 启动子诱捕文库的初步分析: 通过体内和体外实验, 验证文库是否包含了体内外表达的肺炎链球菌基因片段。

**体外试验:** 将菌株库接种于 C+Y 培养基中培养至对数生长期中晚期, 取出 1 mL 细菌 5000 g 离心 5 min 后, 弃上清, 用 PBS 重悬。取其中一部分置于荧光显微镜下, 蓝光激发, 20 倍物镜下观察并照相。剩余部分稀释 10 倍后用流式细胞仪分析, 488 nm 激发, 检测有无发荧光的细菌。

**体内试验:** 选取体重在 18 g~22 g 的雌性 BALB/c 小鼠 6 只, 随机分为 2 组(实验组和对照组)。将菌株库接种于 C+Y 培养基中培养至对数生长期中晚期, 腹腔注射感染实验组小鼠, 每只小鼠 0.4 mL(约  $1\times 10^8$  CFU)。同时用未转化的肺炎链球菌 TIGR4, 同样感染对照组小鼠。24 h后处死小鼠, 心脏取血, 取其中大部分经 10 倍浓缩后, 荧光显微镜下观察。剩余部分经 10 倍稀释后用流式细胞仪同上分析。

## 2 实验结果

### 2.1 重组质粒 pEVP3-SDGFP 的构建与鉴定

PCR、酶切鉴定结果分别见图 2、图 3, 结果均与预期相符。双向测序结果表明 GFP 正确插入到

pEVP3 中, 且其上游含有翻译增强子 TTAACCTTA、核糖体结合位点 SD 序列。证明质粒构建成功。

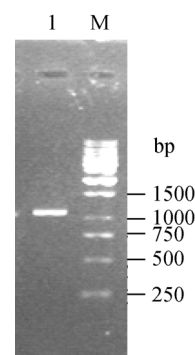


图 2 重组质粒 pEVP3-SDGFP 的 PCR 鉴定结果

Fig. 2 Recombined plasmid pEVP3-SDGFP identified by PCR

1: Products of PCR; M: Molecular size marker

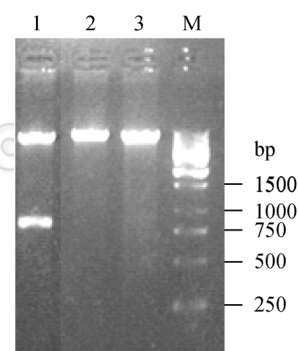


图 3 重组质粒 pEVP3-SDGFP 的酶切鉴定结果

Fig. 3 Recombined plasmid pEVP3-SDGFP identified by restriction enzyme

1: Correct ligation; 2~3: Incorrect ligation; M: Molecular size marker

### 2.2 肺炎链球菌基因组 DNA 随机片段的获得

为了获得 200 bp~800 bp 的肺炎链球菌 TIGR4 基因组 DNA 随机片段, 用 *Sau3A* 进行部分酶切时, 需要调整酶量、DNA 量、反应时间, 选择最适反应条件。结果表明要获得 200 bp~800 bp 范围的 DNA 片段, 最适酶量为 2 U/ $\mu$ g DNA~3 U/ $\mu$ g DNA, 反应时间 12 h~18 h(图 4)。在此基础上进行大量酶切, 电泳, 胶回收 200 bp~800 bp 范围的 DNA 片段。

### 2.3 含肺炎链球菌基因组 DNA 随机片段的质粒库的构建

将报告质粒 pEVP3-SDGFP 酶切后去磷酸化片段与肺炎链球菌 TIGR4 DNA 随机片段 X 按 1:3~10 的比例连接, 转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$ , 共获得约 58000

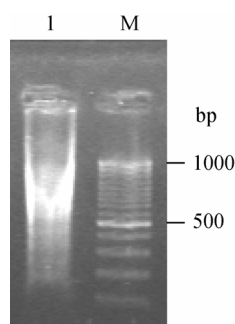


图4 *Sau3A* I 酶切肺炎链球菌 TIGR4 DNA 结果

Fig. 4 *Sau3A* I partial digestion of TIGR4 genomic DNA

1: TIGR4 genomic DNA/*Sau3A* I; M: Molecular size marker

个转化子, 收集这些克隆, 提取质粒, 即为含肺炎链球菌基因组 DNA 随机片段的质粒库(pEVP3-X-SDGFP), 每次转化的自身环化对照为 1~2 个菌落。每次提取的质粒混合后为 1 个亚库, 共 8 个亚库。

## 2.4 质粒文库质量鉴定

**2.4.1 文库的容量:** 肺炎链球菌的基因组全长约为 2.2 Mb, 获得约 58000 个克隆, 考虑到片段平均大小(400 bp)和片段插入方向, 我们的文库大约覆盖基因组全长的 5.3 倍( $58000 \times 400 \text{ bp} / 2.2 \text{ Mb} / 2$ )。

**2.4.2 文库的插入率:** 随机挑取的 80 个独立克隆中, 有 5 个克隆 PCR 产物与对照在同一泳动位置, 表明没有随机片段插入; 另有 2 个克隆经 PCR 后无条带出现, 可能为污染菌落, 其余 73 个克隆含有插入片段, 文库插入率达到 90% 以上, 质量较好。部分 PCR 结果见图 5。

**2.4.3 文库的随机性:** 随机抽取 30 个含有插入片段质粒的 PCR 产物(引物为 P1、P2), 用 P1 为引物正向测序时, 有 22 个测出了插入片段的全部序列。剩余 8 个再用 P2 反向测序, 经数据处理后得到全部序

列, 30 个质粒中插入片段平均长度为约 400 bp。用 DNAssist 软件做 Alignment 分析, 有 3 对序列完全相同。然后再到 Internet 上与肺炎链球菌 TIGR4 全基因组序列做 Blast 分析, 结果所有片段均与 TIGR4 全基因组序列吻合, 同源性 99% 以上, 其中正向插入 13 个, 反向插入 17 个。

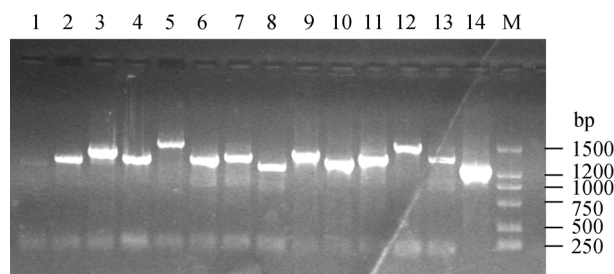


图5 质粒库插入片段 PCR 分析

Fig. 5 PCR analysis of the library inserting fragments

1~13: PCR analysis of the library(All of the plasmid in the library have inserting fragment, except for lane 1, 8); 14: PCR product of pEVP3-SDGFP; M: Molecular size marker

## 2.5 肺炎链球菌菌株库的构建

**2.5.1 可用 GFP 报告肺炎链球菌基因的菌株库的获得:** 将 8 个亚质粒库各取一部分, 分别转化肺炎链球菌 TIGR4, 每个亚库约 50000~70000 个转化子, 共得到约 500000 个转化子, 此即为肺炎链球菌启动子诱捕文库。

**2.5.2 启动子诱捕文库的初步分析:** 体内外试验均表明, 在体内外环境下, 荧光显微镜下均可见到少量发荧光的细菌, 图 6。同时流式细胞仪上分析也发现既有发荧光的细菌, 又有不发荧光的细菌, 见图 7。表明该启动子诱捕文库的细菌中部分插入了 *S. pn* 体内一定条件下表达的基因片段, 部分插入了 *S. pn*

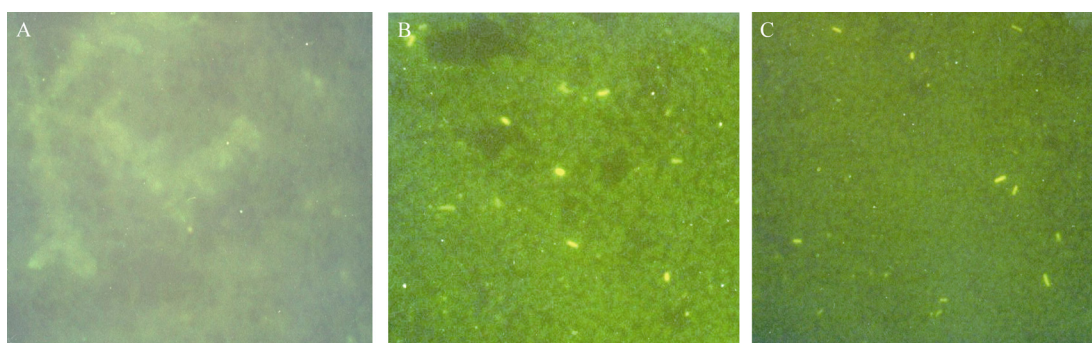


图6 肺炎链球菌启动子诱捕文库的荧光显微镜观察

Fig. 6 Fluorescence of *S. pn* promoter-trap library

A: TIGR4 *in vivo*; B: *S. pn* promoter-trap library *in vitro*; C: *S. pn* promoter-trap library *in vivo*

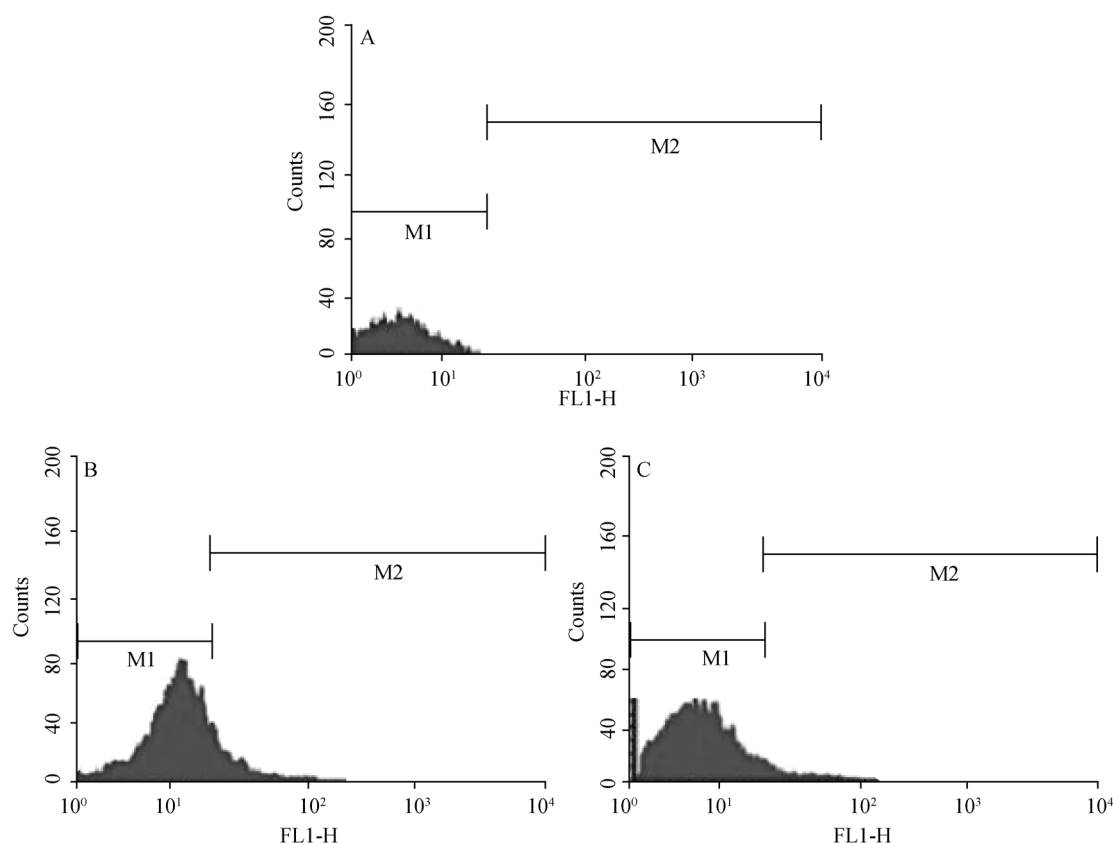


图 7 肺炎链球菌启动子诱捕文库的流式细胞仪分析

Fig. 7 Analysis of *S. pn* promoter-trap library by flow cytometry

Note: A: TIGR4 in medium C+Y; B: *S. pn* promoter-trap library in medium C+Y; C: *S. pn* promoter-trap library in mice blood

体外一定条件下表达的基因片段, 且能被流式细胞仪筛选、识别。

### 3 讨论

构建报告病原菌体内基因表达的载体是筛选体内诱导基因的关键。首先, 报告基因应不含启动子序列。本实验构建的启动子诱捕文库中的报告基因 GFP 前面没有启动子, 它只能通过上游启动子来表达, 若上游基因不表达, 它也不表达。其次, 要让报告基因能正确、高效反映上游基因的表达情况, 报告基因的上游必须含有翻译起始序列(TIR)。本实验构建的文库载体中, 报告基因前存在由翻译增强子(ENH)和核糖体结合位点(SD)组成的翻译起始序列, 无论报告基因上游插入什么序列, 都不用考虑其与 *gfp* 的连接情况, 而且即便是中等强度或弱启动子, 只要其启动子能启动报告基因的转录, 报告基因都会正确表达。

文库质量取决于文库的容量、插入率以及随机性。按照公式  $N = \ln(1-P)/\ln(1-f)^{[6]}$  计算本课题构建

的质粒文库中任何一段DNA序列出现的机率。式中  $N$  是必须的重组子数目,  $P$  是任何一段DNA序列出现的机率,  $f$  是重组克隆DNA片段的平均大小与基因组大小的比值。肺炎链球菌基因组随机酶切片段的平均大小为 400 bp, 肺炎链球菌的基因组全长约为 2.2 Mb, 若要求特定基因序列在文库中出现的机率为 99%, 所需重组子数约为 40000 个, 我们共获得约 58000 个大肠杆菌克隆, 考虑到片段插入方向和片段平均大小(400 bp), 我们的文库大约覆盖基因组全长的 5 倍, 而且 90%以上的克隆含有插入的随机片段, 表明文库有足够的容量, 质量较好。由于文库中某些克隆的复制要强于另一些克隆, 随着文库的复制和扩增, 会随之出现偏性。有的研究者为了防止文库在大肠杆菌内扩增时的偏性, 直接用连接产物转化宿主菌<sup>[7]</sup>, 但是这样可能会漏掉一些融合子。在本研究中需采用两次转化, 即转化大肠杆菌提取质粒后, 再转到宿主菌肺炎链球菌中, 在用连接产物转化大肠杆菌DH5 $\alpha$ 时, 省略了在LB液体培养基中孵育这一步(通常做转化时, 为了获得更多的转化

子,需要在LB中培养 1 h),热休克后直接铺抗生素平板,以尽量避免这种偏性,保证文库的复杂性。

在构建启动子诱捕文库过程中,以下几点值得重视:1)构建一种细菌的克隆文库,首先要提取足够量的高质量 DNA。因此我们用细菌基因组 DNA 提取试剂盒制备肺炎链球菌染色体 DNA,并分析其含量和纯度。2)载体 pEVP3-SDGFP 用限制性内切酶消化后,用碱性磷酸酶 CIAP 尽可能脱去 5'端磷酸以防止自身环化,减少背景克隆。我们用 CIAP 去磷酸化后的载体做对照,每次仅有 1~2 个克隆,有效地防止了载体的自身环化。3)调整染色体 DNA 随机酶切片段与载体的比例,以保证随机酶切片段最大限度地与载体连接。4)为了获得足够的库容量,大肠杆菌感受态细胞的转化率很关键,新鲜制备的感受态细胞 4℃ 放置过夜后转化率比冻存的要高,因此每次转化都采用新鲜制备 4℃ 放置过夜的感受态细胞。

该文库经过体内和体外实验表明,其包含插入了 *S. pn* 体内、外表达基因片段的细菌,可以报告在特定条件下的基因表达,并且可通过流式细胞仪识别、分选。我们已经用该文库筛选并鉴定了 20 多个在体外不表达、只在小鼠血液和肺内表达的基因(结果未提供),目前正在对其中部分基因进行功能研究。因此该启动子诱捕文库的成功构建,为进一步

利用差异荧光诱导技术筛选肺炎链球菌体内诱导基因奠定了良好的基础。

## 参 考 文 献

- [1] Gort AS, Miller VL. Identification and characterization of *Yersinia enterocolitica* genes induced during systemic infection. *Infect Immun*, 2000, **68**: 2359–2362.
- [2] Marra A, Asundi J, Barstilson M, *et al.* Differential fluorescence induction analysis of *Streptococcus pneumoniae* identifies genes involved in pathogenesis. *Infect Immun*, 2002, **70**(3): 1422–1433.
- [3] Bumann D, Valdivia RH. Identification of host-induced pathogen genes by differential fluorescence induction reporter systems. *Nat Protoc*, 2007, **2**(4): 770–777.
- [4] Badger JC, Wass D, Kim K. Identification of *Escherichia coli* K1 genes contributing to human brain microvascular endothelial cell invasion by differential fluorescence induction. *Mol Microbiol*, 2003, **36**: 174–182.
- [5] Schneider WP, Ho SK, Christine J, *et al.* Virulence gene identification by differential fluorescence induction analysis of *Staphylococcus aureus* gene expression during infection-simulating culture. *Infect Immun*, 2002, **70**(3): 1326–33.
- [6] J 萨姆布鲁克, DW 拉塞尔. 分子克隆实验指南. 第三版. 北京: 科学出版社, 2002, pp.302–303.
- [7] Kilic AO, Herzberg MC, Meyer MW, *et al.* Streptococcal reporter gene-fusion vector for identification of *in vivo* expressed genes. *Plasmid*, 1999, **42**: 67–72.

## 征订启事

### 《光明中医》杂志 2009 年征订征稿启事

《光明中医》杂志是国家中医药管理局主管、中华中医药学会主办的国家级中医药科技综合期刊,刊号 CN11-1592/R, ISSN-8914。国内外公开发行人,每月 20 日在北京出版。以广大基层中医药临床工作者、中医爱好者、科技、教学工作者及中医药院校师生为主要读者对象。系中国科技核心期刊(遴选)数据库、中国学术期刊(光盘版)、科技部万方数据库、中文科技期刊数据库全文收录期刊。

《光明中医》杂志是国家级综合性中医药学术期刊,本刊以“寓医理于临床”为办刊宗旨,以“面向临床”、“面向科研”、“面向社区”为办刊方针,实用性强,读者群广。主要栏目:论著、实验研究、薪火传承、硕博论坛、针灸探骊、中西医结合、临床研究、医案医话、方药纵横、民族医药、教管研究、社区医药、护理研究、科研进展等。

《光明中医》杂志为月刊,大 16 开,内文 168 页,每册定价 8.0 元,全年定价 96.0 元,邮发代号 82-525。各地邮局均可办理订购。若当地邮局订购有困难,亦可直接与本刊广告发行部订购。欢迎广大读者、作者、赐稿订阅。

本刊全国唯一专用的投稿、汇款、通联信箱:北京 105 信箱(相当于通函地址)邮编:100036。电话 010-51813510/3503(传真)

本刊唯一指定官方网站: <http://bjgmzy.com>; 本刊唯一指定的在线投稿信箱: [gmzyzy@sina.com](mailto:gmzyzy@sina.com)

本刊社址:北京市复兴门南大街甲 2 号知医堂配楼 102 室