

## 抗肿瘤血管三结构域单链抗体 $V_H/L$ 的构建与表达

吴小平 杨东玲 张志强 阎锡蕴\*

(中国科学院微生物研究所微生物资源前期开发重点实验室 北京 100080)

**摘 要** 以本室研制的一株抗肿瘤血管单克隆抗体 AA98 为基础,采用 PCR 扩增抗体 AA98 基因的重链可变区 ( $V_H$ )和轻链 ( $L$ ),以重链恒定区 I ( $C_{H1}$ ) 5'端 12 个氨基酸的序列作为连接肽,并将连接肽中的 Lys 突变为 Ser,构建  $V_H$ -连接肽-L 三结构域单链抗体。重组  $V_H/L$  单链抗体在大肠杆菌中得到了高效表达,其表达量占菌体总蛋白质的 20%。表达的蛋白质在菌内形成包含体,经凝胶过滤法复性,获得了有抗原结合活性的  $V_H/L$ 。该三结构域单链抗体的成功构建和复性,为重组抗体片段的研制提供了借鉴。

**关键词**  $V_H/L$  抗体片段,构建,表达,复性

中图分类号 Q784 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2001)01-0050-05

抗体分子的抗原结合部位局限在可变区,因此可以构建具有抗原结合功能的抗体片段。常见的抗体功能片段有(1)单链抗体,最常见的是在 DNA 水平将轻重链可变区基因通过一段连接肽连在一起,使之表达成一条包含两个结构域的单链抗体即  $V_H$ -连接肽- $V_L$  单链抗体。但三结构域组成的单链抗体鲜有报道。(2)Fab,由重链 Fd 段和完整轻链通过二硫键相连组成,相同或不同的 Fab 还可通过化学交联形成  $(Fab')_2$ 。(3)单域抗体(Single-domain antibody)和分子识别单位(Molecular recognition unit):单一的重链可变区也可具有抗原结合活性,称为单域抗体;单一的 CDR 区也可能有抗原结合活性,称之为分子识别单位。在大肠杆菌中表达抗体功能片段,有大量的报道。一般来说,采用分泌型表达系统,抗体片段的产量较低,每升仅数毫克;而采用包含体表达的产量较高,但包含体的复性过程较复杂。AA98 是我室研制出的一株高效特异性肿瘤血管抗体<sup>[1]</sup>。获得 AA98 功能片段是研制重组免疫毒素,进行肿瘤血管导向治疗实验的前提。本文设计并构建了抗体功能片段  $V_H/L$ ,这种三结构域单链抗体在国内未见报道。 $(gly_4Ser)_3$  是单链抗体最常用的连接肽,而本实验采用的连接肽来自重链  $C_{H1}$ ,并将其第二个氨基酸 Lys 突变为 Ser,以避免荷正电的 Lys 与其空间相邻的带负电的氨基酸作用

而影响抗体的空间折叠<sup>[2]</sup>。该连接肽的设计可为其它单链抗体的构建提供重要的参考。同时,本文首次报道了  $V_H/L$  包含体的成功复性。

### 1 材料与方法

#### 1.1 材料

重组 pGEM-T-AA98Fd 以及 pGEM-T-AA98 $\kappa$ 、大肠杆菌 DH5 $\alpha$ 、BL21(DE3),人脐静脉内皮细胞(HUVEC)为本室保存。碱性磷酸酶标记(AP)的抗鼠  $\kappa$  链抗体购自 Sigma 公司。PCR 产物回收试剂盒购自 QIAGEN 公司。表达载体 pET21a 为 Novagen 产品。限制酶及 T4 DNA 连接酶购自 Promega 公司。蛋白质定量试剂 Bio-Rad Protein Assay 是 Bio-Rad 产品。Sephacryl 200 为 Pharmacia 产品。抗体 AA98 对应的抗原提取液为本实验室从人脐静脉内皮细胞中制备,其它试剂均为国产分析纯。

#### 1.2 基因操作

以重组 pGEM-T-AA98Fd 作模板,扩增  $V_H$  及其  $C_{H1}$  区的前 36 个核苷酸(连接肽基因)。引物如下(1)5'a gat ata cat atg gaa gtt cag ctg ctg gag tct ggt gct3'(含 Nde I 切点 catatg)(2)5'aaa gag ctg ggc cag tgg ata gac cga tgg ggc tgt tgt gct agc t 3'(含 Sac I 切点 gagctc 和 Nhe I 切点 gtagc)。以重组 pGEM-T-AA98 $\kappa$  为模板,扩增完整轻链  $\kappa$ ,引物如下(3)5'ccg gag ctg gtc atg aca caa tct c3'(含 Sac I

切点 gagctc )和 ( 4 ) 5' gc tct aga aag ctt att aac act cat tcc tgt tga a 3' ( 含 HindⅢ 切点 aagctt )。 Nde I 和 Sac I 酶切 V<sub>H</sub>-连接肽 , 与经同样双酶切的 pET21a 载体连接 , 转化大肠杆菌 DH5α , 鉴定重组子。然后用 Sac I 和 HindⅢ 酶切轻链 κ , 与经同样双酶切的 pET21a-V<sub>H</sub>-连接肽连接 , 构建完成 pET21a-V<sub>H</sub>/L 表达质粒。具体操作参照文献 [ 3 ]。

1.3 V<sub>H</sub>/L 在大肠杆菌中的表达及包含体的收获和溶解

重组 pET21a-V<sub>H</sub>/L 转化大肠杆菌 BL21 ( DE3 ) , 37℃ 培养至 OD<sub>600</sub> = 0.5 , 加 1mmol/L IPTG 诱导表达 4h , 离心收集菌体。超声破碎细胞 , 离心即得包含体沉淀。依次用 2.5mol/L NaCl , 0.05% Triton-X-100 , 4mol/L 尿素洗涤沉淀 , 最后将包含体溶解于变性液 ( pH8.0 , 50mmol/L Tris , 6mol/L Urea , 0.1mol/L DTT ) 中 4℃ 搅拌过夜。

1.4 V<sub>H</sub>/L 的复性

1.4.1 稀释复性法 将溶解的包含体逐滴滴入复性液 ( 50mmol/L Tris-HCl , 10mmol/L CysH , 1.5mmol/L Cys , 2mmol/L EDTA , Cys 微溶于水 , 用前滤去未溶的 Cys ) 中 , 至终浓度约 50μg/mL , 4℃ 静置 48h 以上。然后样品对 pH7.4 , 0.01mmol/L PBS 透析。

1.4.2 柱复性法 采用凝胶过滤柱复性 , Sephacryl 200 层析柱 10mm×1000mm , 包含体溶解液蛋白质浓度 2.5mg/mL , 上样量 3.0mL , 流动相 50mmol/L Tris-HCl , 10mmol/L CysH , 1.5mmol/L Cys , 2mmol/L EDTA , pH8.3 , 流速 0.2mL/min , 收集富含 V<sub>H</sub>/L 的目标蛋白质峰 , 并作活性检测。

1.5 ELISA 检测 V<sub>H</sub>/L 复性蛋白质的活性

经肝癌细胞培养上清刺激的人脐静脉内皮细胞 ( HUVEC ) 种在 96 孔培养板上 , 培养至底部长满 , 用 1:1 丙酮/甲醇固定 , 2% BSA/PBS ( 含兔血清 2% , 0.02% NaN<sub>3</sub> ) 封闭 , 加入不同稀释度的 V<sub>H</sub>/L 复性蛋白质 , 37℃ 温育 2h , PBST 和 PBS 分别洗 3 次 , 加 AP 标记的抗鼠 κ 链抗体 , 37℃ 温育 1h 后 , 以对硝基酚磷酸 ( PNPP ) 为底物显色 , Bio-Rad model 550 酶标仪上读取 A<sub>410</sub>。

1.6 V<sub>H</sub>/L 与抗体 AA98 相对亲和力比较 [ 4 ]

抗体 AA98 对应的抗原提取液包被 96 孔酶标板 , 5% 脱脂奶粉/PBS 封闭后 , 分别加入 V<sub>H</sub>/L 复性蛋白和抗体 AA98 , 37℃ 温育 2h , 0.05% Tween-20/PBS 和 PBS 各洗板 3 次。加入不同浓度 ( 0 , 0.2 , 0.4 , 0.8 , 1.2 , 1.6 , 2.0mol/L ) 的 NH<sub>4</sub>SCN 溶液各 50μL , 室温放置 15min , 用 PBS 洗板 3 次。加 AP-抗

鼠 κ 抗体 , 37℃ 温育 1h , 用 PNPP 底物显色 , Bio-Rad model 550 酶标仪上测定 A<sub>410</sub>。以 A<sub>410</sub> 下降 50% 时相应的 NH<sub>4</sub>SCN 浓度作为相对亲和力的指数。

2 实验结果

2.1 三结构域单链抗体 V<sub>H</sub>/L 的设计及其表达质粒的构建

mRNA5'端结构是影响外源蛋白质在大肠杆菌中表达量的重要因素。在氨基酸序列不变的前提下 , 改变外源基因的 5' 序列可以使蛋白质的表达量从无提高至 500mg/L [ 5 ]。本实验中 , 为保证 V<sub>H</sub>/L 蛋白质的表达量 , 我们在设计扩增 V<sub>H</sub> 的 5' 引物时 , 保持原氨基酸序列不变 , 根据大肠杆菌偏爱密码子 , 并通过计算机模拟 , 保证 ATG 起始密码子位于引物的“突环”结构上 , 突变了原序列中的 3 个核苷酸。原基因序列是 5' gaa gtt cag ctg ctc gac tct gga gct3' , 突变后的序列是 5' gaa gtt cag ctg ctg gag tct ggt gct3' , 黑体显示突变的部位。在设计 V<sub>H</sub>-连接肽的 3' 引物时 , 与原基因序列比较 , 设计了两个核苷酸突变 , 使得相应的一个氨基酸发生了改变 , 原氨基酸序列是 Ala Lys Thr Thr Ala Pro Ser Val Tyr Pro Leu Ala , 突变后的序列是 Ala Ser Thr Thr Ala Pro Ser Val Tyr Pro Leu Ala。PCR 扩增后 , 胶上分别可见分子量约 400bp 的 V<sub>H</sub>-连接肽和约 650bp 的轻链 , 然后将 V<sub>H</sub>-连接肽和轻链依次连入高效表达载体 pET21a , 构建过程如图 1 所示。

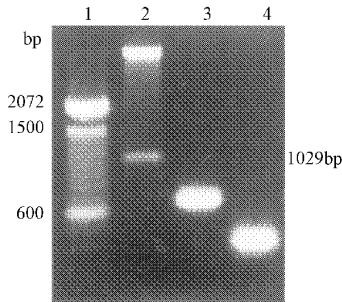


图 1 表达载体 pET21a-V<sub>H</sub>/L 的构建及酶切鉴定

Fig. 1 Construction of recombinant pET21a-V<sub>H</sub>/L and enzyme digestion identification

1. 100bp DNA ladder ; 2. Nde I / HindⅢ digestion of recombinant pET21a-V<sub>H</sub>/L ; 3. Light chain , 4. V<sub>H</sub>-linker

2.2 V<sub>H</sub>/L 在大肠杆菌中的表达

pET 大肠杆菌表达质粒带有强 T7 启动子 , IPTG 诱导时 , 宿主 BL21 ( DE3 ) 提供 T7 RNA 聚合酶 , 使得外源基因表达。诱导培养后 , 经 SDS-PAGE 和 Western blotting 检测到 V<sub>H</sub>/L 表达 ( 图 2a , 2b )。

抗鼠  $\kappa$  链抗体识别分子量约 38kD 的蛋白质带,与根据核苷酸序列预测的  $V_H/L$  分子量相同。说明在大肠杆菌中获得了  $V_H/L$  的表达。蛋白质凝胶薄层扫描结构显示,其表达量占菌体总蛋白质的 20%,超声破碎后,获得的包含体纯度在 85%左右。

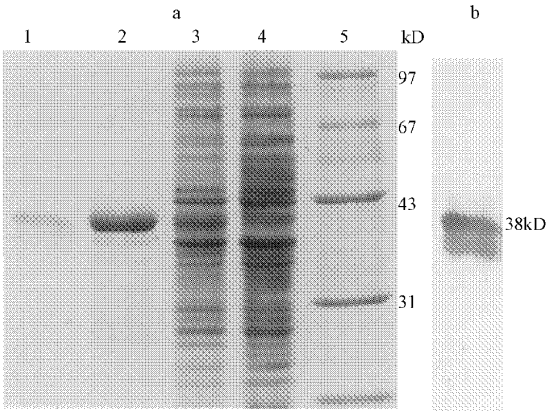


图 2a SDS-PAGE 检测  $V_H/L$  在大肠杆菌中的表达  
Fig.2a SDS-PAGE analysis of the expression of  $V_H/L$  in *E. coli*

1. Reformed  $V_H/L$ ; 2.  $V_H/L$  inclusion body; 3. Cell lysate of *E. coli* BL21 (DE3) pET21a- $V_H/L$ ; 4. Cell lysate of *E. coli* BL21 (DE3) (pET21a); 5. Protein marker

图 2b Western blotting 检测  $V_H/L$  的表达

Fig.2b Western blotting analysis of  $V_H/L$

2.3  $V_H/L$  的复性

由于部分复性的蛋白质可能相互聚集,因此复性蛋白质中间物的溶解性即可溶性蛋白的回收率是复性成功与否的限制因素。我们首先用稀释法,摸索不同 pH 下,复性液中  $V_H/L$  可溶性蛋白质的回收率。图 3a 显示 pH8.0~8.5 蛋白质的回收率最高,pH 小于 7.5 时,大部分蛋白质沉淀下来;pH 大于 9.0 时,蛋白质在复性液中能稳定存在,但透析后

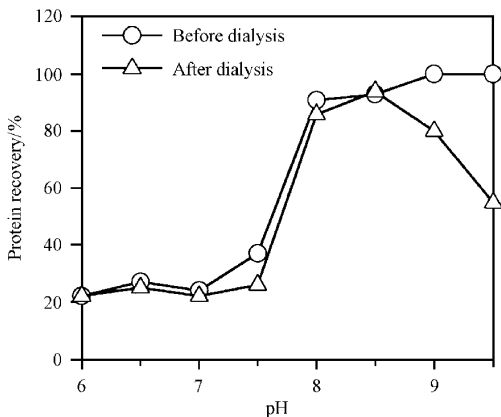


图 3a 不同 pH 值的复性液中可溶性  $V_H/L$  的回收率  
Fig.3a The recovery of soluble  $V_H/L$  under different pH

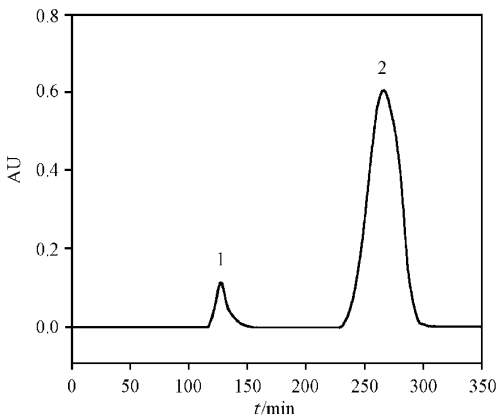


图 3b  $V_H/L$  蛋白质的 Sephacryl 200 柱上层析复性  
Fig.3b Refolding of  $V_H/L$  by gel filtration chromatography

出现部分蛋白质沉淀,各 pH 下复性的  $V_H/L$  都具有 AA98 抗原结合活性。凝胶过滤法具有蛋白质纯化和包含体复性的双重作用,实验选择 pH8.3 的复性液为流动相,包含体溶解液经凝胶过滤层析收集到两个峰(图 3b),经 Centricon (Millipore)超滤浓缩后,免疫印迹检测第一峰是杂蛋白质峰,第二峰为复性的  $V_H/L$ 。 $V_H/L$  复性蛋白质的回收率在 60%左右。

2.4 复性后  $V_H/L$  的活性

用 ELISA 比较复性后  $V_H/L$  与 AA98 靶细胞的结合活性。图 4a 显示  $V_H/L$  与 AA98 对细胞反应的特异性相同,与靶细胞 HUVEC 特异结合,而与肺癌细胞 A594,胰腺癌细胞 SW1990,结肠癌 LS-174-7,结肠癌细胞 SW116,膀胱癌 T24 细胞几乎不结合。图 4b 显示不同浓度  $V_H/L$  复性蛋白质与 HUVEC 的结合曲线。随  $V_H/L$  浓度升高,曲线接近平台,它与 HUVEC 的结合渐趋饱和。

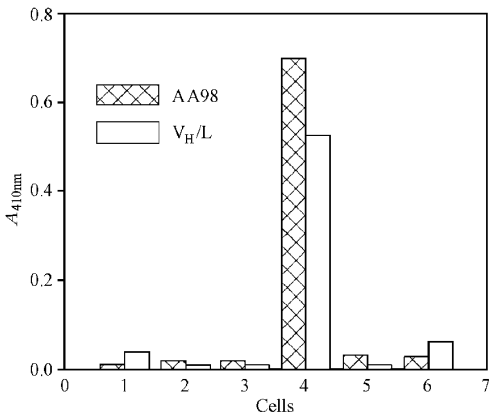


图 4a ELISA 检测重组  $V_H/L$  与几种细胞系的反应  
Fig.4a ELISA analysis of the specificity of  $V_H/L$

1. Lung cancer A594; 2. Pancreas cancer SW1990; 3. Colon cancer LS-174-7; 4. HUVEC; 5. Colon cancer SW116; 6. Bladder cancer T24

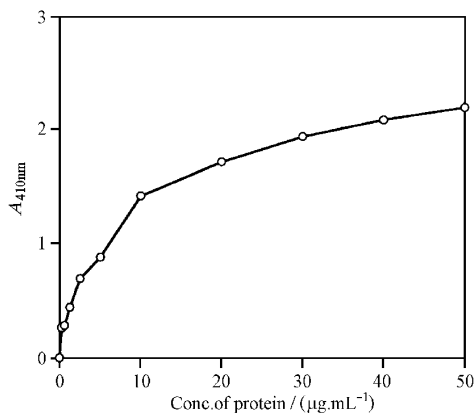


图 4b 重组  $V_H/L$  与抗体 AA98 靶细胞 HUVEC 的结合  
Fig. 4b ELISA analysis of  $V_H/L$  binding to AA98 target cell HUVEC

2.5  $V_H/L$  复性蛋白质与抗体 AA98 相对亲和力比较

图 5 所示,对于柱复性的  $V_H/L$ ,当纵轴值下降到 1.699,即 OD 下降到不加硫氰酸氨时的 50% 时,相应的硫氰酸氨浓度是 1.3mol/L,即  $V_H/L$  的相对亲和力指数是 1.3。而对于 AA98,其相对亲和力指数是 1.6。说明大肠杆菌表达的重组  $V_H/L$  对抗原的亲和力低于原抗体 AA98,而与本实验室构建的重组 AA98Fab 的(相对亲和力指数 1.2)接近。

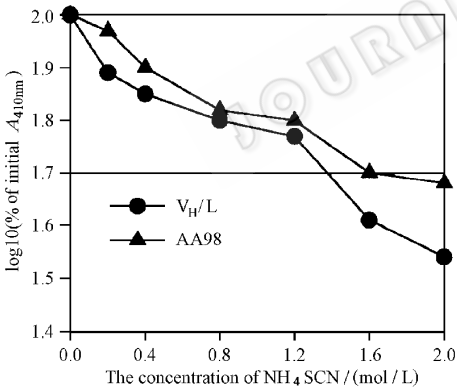


图 5 硫氰酸盐洗脱法比较  $V_H/L$  与 AA98 的相对亲和力  
Fig. 5 Measurement of relative affinity of  $V_H/L$  and AA98 by ELISA using thiocyanate elution

3 讨论

常见的由重链和轻链可变区形成的单链抗体 (ScFv) 中,在其 N 末端或 C 末端重组一段小肽作为“标签”如 c-myc E-tag, flag tag 等,以方便检测。而在  $V_H/L$  中,不需要非抗体“标签”结构,用抗  $\kappa$  链抗体即可方便地检测。单链抗体中连接肽序列的长短

及电荷严重影响抗体的特性<sup>21</sup>。最常见的连接肽是 (Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>3</sub>。本实验采用的连接肽来自 C<sub>H1</sub> 的 5' 序列,共 12 个氨基酸,与原序列相比,我们将其第 2 个氨基酸 Lys 突变为 Ser。该  $V_H/L$  具有与原 AA98 相同的抗原特异性与 AA98Fab 相似的亲和力,说明我们所采用的连接肽几乎不影响原抗体 AA98 抗原结合部位的空间结构,连接肽的设计是成功的。该连接肽的 5' 是 *Nhe* I 切点,3' 是 *Sac* I 切点,因此它可以作为独立的“组件”,用于构建其它单链抗体。

有文献报道,*E. coli* 分泌表达的抗孕酮  $V_H/\kappa$  可在包周质腔中通过二硫键形成 ( $V_H/\kappa$ )<sub>2</sub> 双体结构<sup>61</sup>。本实验中未检测到双体结构,推测大肠杆菌分泌表达的  $V_H/\kappa$  在包周质腔中相对浓度较高,有利于分子间相互作用形成双体,而体外复性时,蛋白质浓度相对较低,不利于分子间二硫键的形成。

三结构域  $V_H/L$  构建简单,检测方便,它可用于构建噬菌体抗体库,也可以作为抗体人源化或亲和力成熟研究的材料。本实验表明, $V_H/L$  的复性,类似于一般含二硫键蛋白质的复性,对于不同的抗体,最佳复性条件可能存在一些差异,需具体探索。本实验采用的柱复性法,一步完成复性和纯化,较稀释法更为简单。

REFERENCES (参考文献)

[ 1 ] Yan X Y, Yang D L, Wu X P *et al.* Inhibition of tumor growth by a monoclonal antibody targeting to microvasculature. International Conference on Immunology, Oct. 23 ~ 26, Shanghai, China, 1999, p. 25

[ 2 ] Huston J S, Tai M S, Mudgett-Hunter M *et al.* In molecular design and modeling: concepts and applications, Part B. Langone J J *ed. Methods in Enzymology*. 1991, **203**: 46 ~ 88

[ 3 ] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd *ed.* cold spring harbor laboratory press, 1989

[ 4 ] Macdonald R A, Hosking C S, Jones C L J. The measurement of relative antibody affinity by ELISA using thiocyanate elution. *J Immunol Method*, 1988, **106**: 191 ~ 194

[ 5 ] Yan X Y, Tang J, Wu X P *et al.* Human single chain antibody to vascular endothelial growth factor: gene cloning, high-level expression, affinity maturation and bioactivity. *Science in China (Series C)*, 2000, **43**(3): 232 ~ 238

[ 6 ] He M, Kang A S, Hamon M, Humphreys A S *et al.* Characterization of a progesterone-binding, three-domain antibody fragment ( $V_H/\kappa$ ) expressed in *Escherichia coli*. *J Immunology*, 1995, **84**: 662 ~ 668

## A Three-domain Antibody Fragment $V_H/L$ Specific to Tumor Blood Vessels

WU Xiao-Ping YANG Dong-Ling ZHANG Zhi-Qiang YAN Xi-Yun\*

(State Key Laboratory of Microbial Resource, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China)

**Abstract** AA98 is a specifically anti-angiogenic antibody generated in our lab. The heavy chain variable region ( $V_H$ ) attached with mutagenized 36 nucleotides sequence derived from the heavy chain constant region1 ( $C_H1$ ) was amplified.  $V_H$  and light chain ( $L$ ) were inserted into high-level expression vector pET21a successively, thus pET21a- $V_H/L$  was constructed.  $V_H/L$  was expressed in *E. coli* BL21 (DE3) after induction with IPTG. The expression of  $V_H/L$  was 20% of the total bacterial proteins. The refolding of  $V_H/L$  was conducted by dilution and gel filtration chromatography. The refolded  $V_H/L$  could bind to HUVEC specifically. Its affinity to the antigen is similar to that of recombinant AA98Fab, but lower than that of the parent antibody AA98.

**Key words** antibody fragment  $V_H/L$ , construction, expression, refolding

Received: May 25, 2000

\* Corresponding author. Tel 86-10-62633718; Fax 86-10-62550912; E-mail: yanxy@sun.im.ac.cn

## 新型甜味剂产品的开发

甜味剂是食品工业不可缺少的,微生物生产甜味剂如  $\alpha$ -L-天冬酰胺-L-苯丙氨酸甲酯(简称天苯甲酯)或阿斯巴甜(Aspartame)已商品化。日本建构的“工程酵母”(*Candida utilis*)生产的甜蛋白(叫浆果甜蛋白或叫莫尼林)已工业化生产,其产品甜度是蔗糖的 3000 倍,作为蔗糖代用品,比天苯甲酯要甜 15 倍,比蔗糖甜 2000 倍。这种“工程酵母”的甜蛋白基因源于西非植物如 *Dioscoreophylla cumminisii* 浆果,经修饰后引入酵母体内,其表达产物是单链的甜蛋白(54 个氨基酸组成),其含量占“工程酵母”水溶性蛋白质的 50%,其特点是(1)在高温及不同 pH 值条件下甜蛋白结构稳定,而植物性甜蛋白则否,易遭破坏;(2)产品甜度类似天然浆果甜蛋白(3)较容易从“工程酵母”中提取(4)此甜蛋白可实行工业化生产,不受季节影响(5)使用该产品安全、无毒副作用(6)实行工业化生产可降低生产成本,有潜力。荷兰与日本联合开发阿斯巴甜,采用荷兰 Geleen 热蛋白芽孢杆菌蛋白酶,以 L-天-苯丙氨酸为原料生产的阿斯巴甜,尽管有其优越性,但成本能否与化学法竞争,还有待提高酶法的效力;木瓜蛋白酶也得到应用,酶固定化技术利用更有利于阿斯巴甜的连续生产,应该说,采用一步酶法合成阿斯巴甜是最理想的工艺路线,需要筛选耐高浓度底物、产酶力高的优良菌种,再与固定化酶技术有机结合必将提高阿斯巴甜的产率。

美国一家公司也开发一种类似的甜味剂,命名“甜剂 2000”新产品,其甜度是蔗糖的 7500 倍,似有大力开发之势。也正因为“工程微生物”生产甜味剂有如此多的优越性,一旦美国食品与药物管理局审核批准,其产品将投放市场会取得巨大经济效益。美国在开发高甜度的生物生产甜味剂的同时,还有两项研发甜味剂的成果值得注意(1)研制一种不含热量的人造甜剂叫 Sucralose,味道与糖一样,甜度为糖的 600 倍,这是唯一由糖制成的人造增甜剂,是经改变糖的分子而使甜度更浓,但又不使人体吸收制成的产品,试验证明,该产品无毒副作用,可用于各种加工食品、饮料、餐桌上用糖等等(2)美国加州大学研究人员采用基因工程技术将一种甜料基因移植到番茄、莴苣植物细胞内而获得有效表达,首次培育出含糖料蛋白的“工程番茄”和“工程莴苣”植株,经检测该蛋白的甜度,比蔗糖要高出 10 万倍。可见它的甜度已达到特高程度,此类“工程植物”称为“超甜味植物”(Super sweet plant)。

目前,我国在生物甜味剂的研发方面也取得进展,这里仅举两例(1)中国医学科学院药用植物研究所研究人员以中药罗汉果为原料,用高科技技术生产出的罗汉果甜甙——新一代天然非糖甜味剂。其甜味为蔗糖的 330 倍(一级品),具有低热、高甜、口感纯正、无毒无害、热稳定好的特点,是一类非发酵的物质,很适合于代替蔗糖在食品、饮料、医药和日化方面广泛应用,完成了中试后将投入批量生产。(2)中国农业科学院生物技术研究所研究人员通过基因工程技术建构成含莫尼林(Monellin)甜蛋白基因的大肠杆菌(*E. coli*),并获得高表达力,其表达产物的甜度为同等蔗糖甜度的 1100 倍,再经改造后,其甜度为同等重量蔗糖甜度的 4500 倍,再进一步优化“工程大肠杆菌”的发酵条件,使其表达率由 25% 提高到 40%,在完成 35L 发酵罐的发酵工艺的基础上将进一步扩大中试生产,有望实现甜蛋白的商品化生产。

总之,上述研究成果表明,不论“工程微生物”生产甜味剂,或者人造增甜剂研制以及高甜度“工程果蔬”植株的成功,均使开辟新型甜料的来源和生产显现出巨大潜力,同时对糖尿病患者、动脉硬化者、心脑血管病患者以及儿童、老人的保健也具有积极意义。这些安全性食料甜味剂的开发必将产生很好的经济效益和社会效益。

(柯 为 供稿)

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>