

通过大肠杆菌 *thyA* 染色体-质粒平衡致死系统 构建无抗性基因表达载体

黄 维* 曹 诚 李 平 钟 辉 马清钧

(军事医学科学院生物工程研究所,北京 100850)

摘 要 克隆了大肠杆菌和霍乱弧菌胸腺嘧啶合成酶基因 *thyA*, 并以 pcDNA3 质粒为基础, 分别用两种来源的 *thyA* 基因替代其氨苄抗性基因 *Amp* 构建了不含抗性基因, 且可在 *thyA* 营养缺陷型大肠杆菌中基于染色体-质粒平衡致死系统稳定传代的真核表达载体。该载体可有效表达红色荧光蛋白报告基因。为核酸疫苗的制备提供一个无抗性的表达载体系统。

关键词 基因疫苗, 染色体-质粒平衡致死系统, *thyA*

中图分类号 R392.7 R378.22 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(2003)05-0521-06

以抗性基因为标志的质粒载体系统赋予细胞在含相关抗生素培养基上继续生长的能力, 这种优点既防止了质粒的脱落, 也给筛选带来方便, 因而在基因工程研究中得到了广泛应用。但是抗药质粒是临床耐药菌株播散的主要原因, 且产品生产过程中需使用抗生素作为选择压力, 可能造成过敏等毒副作用的发生, FDA 已禁止在重组菌生产中使用抗生素^[1]。

染色体-质粒平衡致死系统是以营养选择标志基因代替抗性基因的新型质粒载体系统^[1]。其宿主菌通常在染色体上带有重要代谢途径的基因突变, 因此突变株在基本培养基上不能生长。只有补充相应的外源营养物质或导入携带有野生型基因序列的互补质粒后, 才能使其生存。因此在无相应营养物质添加的基本培养基中, 互补质粒的导入是缺陷型宿主菌生长的必需条件。目前该系统已广泛应用于不同种属的减毒疫苗的开发研制过程中^[1-7]。

大肠杆菌是重组药物和核酸疫苗研究中使用最为广泛的宿主菌, 但目前在大肠杆菌中表达及扩增的质粒载体仍需使用不同的抗性基因。本研究通过构建以营养选择标志基因 *thyA* 代替抗性基因的大肠杆菌染色体-质粒平衡致死系统, 在质粒扩增中不

需使用抗生素, 从而为重组药物和核酸疫苗研究提供了安全的系统^[8]。

1 材料和方法

1.1 菌株和质粒

大肠杆菌菌株 DY330(W3110ΔlacU169 gal490 λcI857 Δ*cro-bioA*)由美国国立肿瘤研究院 Donald L. Court 教授惠赠; 大肠杆菌 *thyA*-株 DY330-T1(W3110ΔlacU169 gal490 λcI857 Δ*cro-bioA*)Δ*gam-c* III Δ*thyA* :::Kan)为本室构建, 它是以 DY330 为出发菌, 通过其染色体整合的缺陷型 λ 原噬菌体同源重组系统将其基因组 *thyA* 除保留 N 端 1-49 氨基酸残基相应的必需核苷酸序列外^[9-11], 其余部分被全部缺失, 代之以卡那抗性基因(Kan), 而后再将该重组系统敲除而得。该菌株生长需补充胸腺嘧啶核苷(50 μg/mL)。质粒 pFGY101 为中国预防医学科学院高守一教授惠赠, 该质粒携带霍乱弧菌 *thyA* 基因; pcDNA3.1mychi(-)A 购于 Invitrogen 公司; pDsRed2-C1 为 Clontech 公司产品。

1.2 细胞培养

人胚肾 HEK293 细胞购自美国典型培养物保存中心(ATCC), 用含青链霉素的高糖(4500mg/L)

DMEM 培养基于 37℃ , 5% 二氧化碳环境下培养。

1.3 试剂

pfu DNA 聚合酶购于上海生物工程公司 ;PCR 产物纯化试剂盒购于 Promega 公司 ,限制酶 *Bsp*H I 、*Xmn* I 购于 Biolabs 公司 ,其余内切酶购于 Promega 公司 ,质粒抽提试剂盒购于 QIAgen 公司 ,DNA Marker DL2000 购于 TaKaRa 公司 ;DMEM 培养基购于 GIBICO 公司 ,胸腺嘧啶或胸苷 (thymine 或 thymidine) 为美国 Sigma 公司产品。

1.4 引物

引物 P1、P2 用于扩增大肠杆菌 *thyA* 基因 ,上游引物 P1 5'端含 *Sma* I 位点 ,下游引物 P2 5' 端含 *Sal* I 位点 (下划线斜体) 以方便克隆。其序列如下 :P1 : 5'-TCCCCCGGGAA GCTTGGCTGTCTCAGGTT- 3' ;P2 : 5'-ACGC GTTCGAC AAGCTTGGCC AGTTTCTATT- 3'。引物 P3、P4 用于扩增霍乱弧菌 *thyA* 基因 ,上游引物 P3 5'含 *Kpn* I 位点 ,下游引物 P4 5'含 *Sal* I 位点 (下划线 斜 体)。P3 : 5'-GG GGTACC GCCTTAGAAG- GCGTGGTT-CT-3' ; P4 : 5'-ACGC GTTCGACTT ATTA- GACTGAAAAC-GGGT-3'。

1.5 质粒构建

互补质粒 pcDNATE、pcDNATC 是将大肠杆菌 *thyA* 基因、霍乱弧菌 *thyA* 基因分别与 pcDNA3 的相关基因片段连接并转化至 DY330-TI 获得 (构建示意图见图 1) ;pcDNATE-DsRed2、pcDNATC-DsRed2 是将 pDsRed2-C1 的红色荧光蛋白基因 DsRed2 经 *Nhe* I 、*Xho* I 双酶切后克隆于含 myc 标签的 pcDNATE、pcD- NATC 获得。

1.6 细胞转染及荧光显微镜观察

使用脂质体 Lipofectamine (Invitrogen 公司产品) 转染 293 细胞。方法如下 :pcDNATE-DsRed2、pcD- NATC-DsRed2 和 pDsRed2-C1 各 4μg 和转染试剂 (Li- pofectamine) 25μL 分别稀释于 200μL 不含血清及抗 生素的 DMEM 培养基中 ,混合后置于室温 30min ; 293 细胞分瓶后长至 50% ~ 80% 时 ,用不含血清的 DMEM 洗 1 遍 ,然后将上述脂质体-DNA 复合物用 4mL 不含血清的 DMEM 培养液稀释后加至细胞培 养瓶中 ,于 37℃、5% CO₂ 培养 5 ~ 12h 后 ,换正常培 养基继续培养 24h 后收细胞 ,回收细胞前用荧光显 微镜观察。

1.7 Western-blot 印迹分析

上述转染 293 细胞回收后 ,用细胞裂解缓冲液 (25mmol/L Tris-HCl pH 7.4 , 1mmol/L EDTA , Roche 蛋白酶抑制剂 1 片/25mL , 1% NP40) 裂解 ,经 SDS-

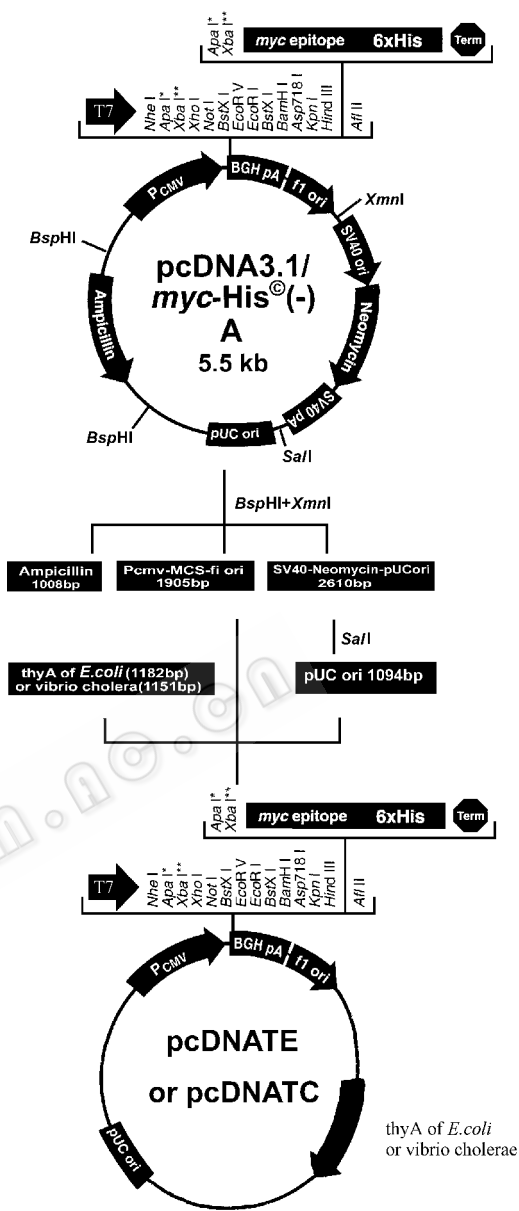


图 1 互补质粒 DNATE、pcDNATC 构建示意图

Fig.1 Construction of recombinant plasmid pcDNATE、pcDNATC

聚丙烯酰胺凝胶电泳 ,通过半干转移系统 (Bio-Rad) 转印蛋白质于硝酸纤维素膜上 ,用 anti-myc 抗体进行 Western 印迹 ,最后用 ECL 化学发光试剂 (Perkin Elmer 公司产品) 曝光显色。

1.8 重组质粒稳定性研究

分别挑取含有 pcDNATE-DsRed2、pcDNATC- DsRed2 相应质粒的单菌落 ,在不含胸腺嘧啶 (即有 选择压力) 的 LB 液体培养基中培养过夜。12h 后 , 将上述培养物再按 1:1000 用不含胸腺嘧啶的 LB 培 养基继续传代培养。同法重复 ,共传代 20 次。经上 述传代培养后 ,分别取少量稀释菌液铺于含胸腺嘧 啶 (50μg/mL) 的 LB 平板上培养过夜 (此时的培养环

境中无选择压力)。次日,从上述两种菌株的平板上各挑取 100 个菌落,分别点种于不含胸腺嘧啶的 LB 平板培养过夜,观察在不含胸腺嘧啶的平板上的菌落数量,而后,在此不含胸腺嘧啶的平板上再随机各挑取 30 个菌落提取质粒,判断带有外源基因片段 *DsRed2* 的两种互补质粒在平衡致死系统中的稳定性。另外,将上述两种菌株在含有胸腺嘧啶(无选择压力)的 LB 培养基中进行传代培养,共传 10 代,而后铺于不含胸腺嘧啶的 LB 平板培养,分别挑取 30 个菌落提取质粒,计算在无选择压力情况下互补质粒平均每代的丢失率,以及两种不同来源的 *thyA* 基因所构成的平衡致死系统的稳定性。

2 结 果

2.1 以大肠杆菌 *thyA* 为标志的互补质粒的构建、鉴定及其相应的大肠杆菌染色体-质粒平衡致死系统构建

以大肠杆菌 DY330 基因组 DNA 为模板,用引物 P1、P2 经 PCR 扩增获得 1182bp 大小的大肠杆菌 *thyA* 基因(图 2a),该片段经 *Sal* I 酶切后备用(其 5' 端为平末端)。以穿梭质粒 pcDNA3.1mychi(-)A 为基本骨架,构建以大肠杆菌 *thyA* 为标志的互补质粒。根据 pcDNA3.1mychi(-)A 的酶切位点,首先采用 *Bsp* HI、*Xmn* I 双酶切获得如下两个片段:SV40ori-Neor-SV40pA-pUCori(2610bp)和 Pcmv-MCS-BGHpA-flori 片段(1905bp);再用 *Sal* I 酶切 SV40ori-Neor-SV40pA-pUCori 获得 pUCori 片段(1094bp)。将酶切获得的 pMB1ori、Pcmv-MCS-flori 两个片段及大肠杆菌 *thyA* PCR 酶切产物进行连接,转化 DY330-TI 感受态细胞,获得正确的克隆,并通过一系列酶切鉴定证明构建正确(图 3a),获得的互补质粒命名为 pcD-NATE,它保留了穿梭质粒载体的必要元件^[8]:即真核启动子 Pcmv,多克隆位点 MCS,多聚腺苷酸尾 BGHpA 及原核复制子 pUCori;同时去除了与病毒复制有关的 SV40ori 及 SV40pA,并以营养选择标志基因 *thyA* 代替了原质粒载体上的氨苄抗性基因 *Amp^r* 及 *Neo^r*(图 1)。该互补质粒可在大肠杆菌 *ThyA*-株 DY330-TI 中稳定存在,表明以大肠杆菌 *thyA* 自身互补方式构建的染色体-质粒平衡致死系统构建成功。

2.2 以霍乱弧菌 *thyA* 为标志的互补质粒构建、鉴定及其相应的大肠杆菌染色体-质粒平衡致死系统构建

本研究同时构建了以霍乱弧菌 *thyA* 基因为标志的互补质粒,并以该质粒和 *thyA* 基因缺失的大肠

杆菌 DY330-TI 共同组成平衡致死系统。以 pFGY101 质粒上的霍乱弧菌 *thyA* 基因为模板,用引物 P3、P4 进行 PCR 扩增,获得 1151bp 的 *thyA* 基因片段(图 2b)纯化后用 *Sal* I 酶切(其 5' 端为平末端);然后如图 1 所示构建以霍乱弧菌 *thyA* 为标志的互补质粒,命名为 pcDNATC。该质粒含有 3 个 *Kpn* I 位点,分别位于 *thyA* 基因 5' 端、*thyA* 基因内距 5' 端 524bp 处及该互补质粒的多克隆位点(MCS)处,当 pcD-NATC 阳性克隆用 *Kpn* I 完全酶切后,则被切成三部分 524bp、823bp、2805bp。酶切鉴定结果证明 pcD-NATC 克隆正确(图 3b)。同时该互补质粒可在大肠杆菌 *ThyA*-株 DY330-TI 中稳定存在,表明霍乱弧菌 *thyA* 基因尽管与大肠杆菌 *thyA* 基因序列有较大差异(同源性仅 32.8%),但功能可以互补,故以霍乱弧菌 *thyA* 为标志,也可通过异种基因功能互补方式构建大肠杆菌染色体-质粒平衡致死系统。

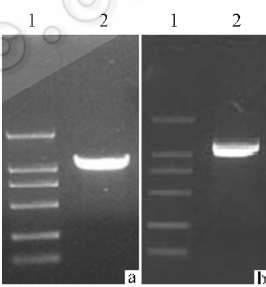


图 2 大肠杆菌、霍乱弧菌 *thyA* PCR 产物
Fig.2 PCR products of *thyA* of *E. coli* or *vibrio cholerae*
1. DNA marker DL2000 (100、250、500、750、1000、2000bp);
2a. DY 330 *thyA* PCR product (1182bp); 2b. pFGY101 *thyA* PCR product(1151bp)

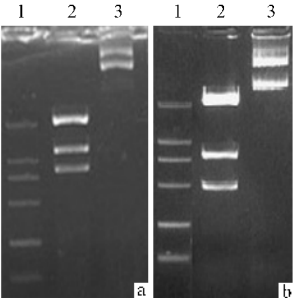


图 3 pcD-NATE、pcDNATC 酶切鉴定结果
Fig.3 Restriction endonuclease digestion of recombinant plasmid pcD-NATE、pcDNATC
1. DNA marker DL2000 (100、250、500、750、1000、2000bp); 2a. pcD-NATE/*Hind* III(831、1163、2182bp); 3a. pcD-NATE; 2b. pcDNATC/*Kpn* I (524、823、2805bp); 3b. pcDNATC

2.3 大肠杆菌 *thyA* 染色体-质粒平衡致死系统质粒稳定性的研究

为了研究携带外源基因时互补质粒在宿主菌中的稳定性,我们将 pDsRed2-C1 的红色荧光蛋白基因 DsRed2 经 *Nhe* I、*Xho* I 双酶切后克隆于含 *myc* 标

签的 pcDNATE、pcDNATC 相应的多克隆位点上,由于读框一致,DsRed2 的 C 端带有 *myc* 标签(pDsRed2-C1 的 DsRed2 无此标签),获得的质粒分别命名为 pcDNATE-DsRed2 和 pcDNATC-DsRed2。

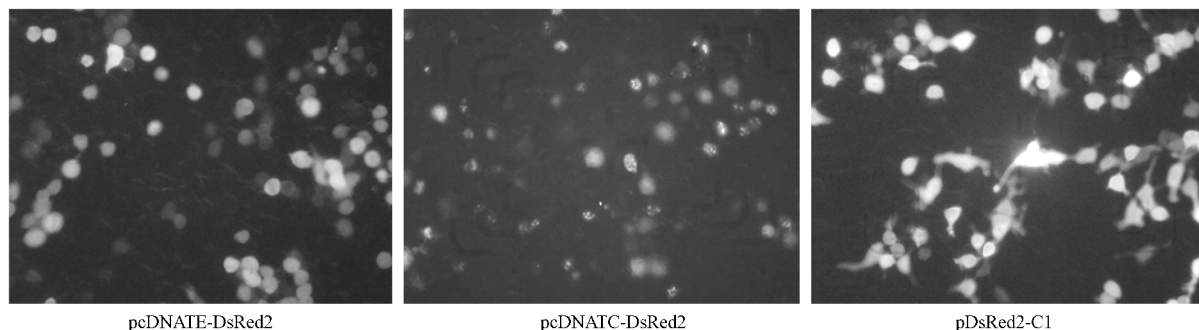


图 4 pcDNATE-DsRed2、pcDNATC-DsRed2、pDsRed2-C1 转染 HEK293 细胞的荧光显微镜观察

Fig.4 Fluorescence microscope assay of pcDNATE-DsRed2、pcDNATC-DsRed2、pDsRed2-C1 in HEK293

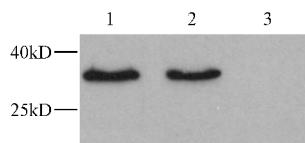


图 5 DsRed2-myc Western-blot 分析

Fig.5 Immuno-blotting analysis of myc-DsRed expressed by 293 cells transfected with pcDNATE-DsRed2 or pcDNATC-DsRed2

1. pcDNATE-DsRed2 ; 2. pcDNATC-DsRed2 ; 3. pDsRed2-C1

在无选择压力(培养基中添加胸腺嘧啶)的培养基中,经 10 次传代培养,结果表明 pcDNATE 平均每代质粒丢失率为 10.4%,pcDNATC 平均每代质粒丢失率为 9.0%,而在营养选择压力下经 20 次传代培养没有发现质粒丢失,这与抗生素作为选择压力维持质粒稳定存在的结果是一致的。上述实验结果表明,营养选择标志基因可以替代抗性基因作为维持质粒稳定存在的筛选标志,此外,利用同一基因自身互补或异种基因功能互补的方式均可构建出稳定的染色体-质粒平衡致死系统。

2.4 以大肠杆菌 DY330TI 为宿主制备 pcDNATE-DsRed2、pcDNATC-DsRed2 质粒可在真核细胞中高效表达红色荧光蛋白基因

本研究的目的是利用大肠杆菌染色体-质粒平衡致死系统,建立无须使用抗生素的原核表达系统,或是制备用作核酸疫苗的质粒 DNA。所构建的质粒 pcDNATE、pcDNATC 具有用作核酸疫苗载体的所有元件,如果能在真核细胞内高效表达外源基因,则

可用作核酸疫苗表达载体。

使用 QIAGEN 质粒抽提试剂盒从大肠杆菌 DY330TI (pcDNATE-DsRed2) 和 DY330TI (pcDNATC-DsRed2) 提取质粒,分别转染 HEK293 细胞,24h 后可在荧光显微镜下清楚看到红色荧光蛋白的表达,其表达量略低于商品质粒 pDsRed2-C1(图 4)。细胞裂解液经 SDS-PAGE 分离后转移至硝酸纤维素膜,用 anti-myc 抗体(Clontech, CA)进行 Western 印迹分析,结果进一步证明通过平衡致死系统制备的质粒可以在真核细胞中表达外源基因(图 5),因此所构建的质粒可以用作新型核酸疫苗载体。

3 讨 论

染色体-质粒平衡致死系统中的宿主菌通常是一类染色体突变体,突变的基因多为在细菌代谢过程中执行重要功能的管家(House keeping)基因,互补质粒的野生型基因与宿主菌的缺陷型基因之间同源性的直接决定了该系统的稳定性,同源率高会使缺陷型宿主菌回复为野生型,最终导致平衡致死系统的破坏^[5]。为了保证该系统的稳定性,我们采取了两种措施:其一是将染色体上的相应基因全部或大部缺失,以尽可能避免其与互补质粒上同一基因野生型序列发生同源重组^[5];其次利用种间执行同一功能的管家基因构建互补质粒,这些管家基因虽然在基因序列上不同源,但功能上可以互补,因而这种构建方式保证了平衡致死系统的稳定性。尤

其当宿主菌的管家基因仅被小部分缺失时 ,只能通过这种方式来构建染色体-质粒平衡致死系统 ,目前许多染色体-质粒平衡致死系统都是以此方法构建的^[1-7]。

本研究中 ,我们以 DY330-TI 为宿主菌 ,通过同一基因自身互补的方式 ,构建了以大肠杆菌 *thyA* 为标志的大肠杆菌染色体-质粒平衡致死系统。所使用的大肠杆菌 *ThyA⁺* 株 DY330-TI 为本室构建 ,其基因组 *thyA* 除保留 N 端 1-49 氨基酸残基相应的必需核苷酸序列外^[9-11] ,其余部分被全部缺失。由于 DY330-TI *thyA* 仅保留上游极短的同源序列 ,所以其与互补质粒上完整的 *thyA* 之间发生重组回复至野生型序列的可能性极低 ,从而保证了该系统的稳定性。所构建的互补质粒 pcDNAE 及含报告基因 DsRed2 的质粒 pcDNATE-DsRed2 可以在该系统中稳定扩增 ,并且在选择压力下经 20 次传代培养没有发现质粒丢失 ,表明该系统具有良好的稳定性。当外源片段较大或质粒的拷贝数较低时 ,异源同种基因的功能往往不能满足缺陷型宿主菌的需要时 ,这种途径具有较大优势^[5]。

此外 ,我们还以大肠杆菌 *thyA*-株 DY330-TI 为宿主菌 ,通过霍乱弧菌 *thyA* 与大肠杆菌 *thyA* 基因序列的低同源性及其产物功能互补的性质(夏晓滨的研究表明霍乱弧菌 *thyA* 与大肠杆菌 *thyA* 的核苷酸同源性及其氨基酸同源性均为 32.8% ,二者在功能上互补 ,但发生同源重组的几率几乎为零^[4]) ,构建了以霍乱弧菌 *thyA* 为选择标志的大肠杆菌染色体-质粒平衡致死系统 ,互补质粒也可在宿主菌中稳定扩增、传代。

以穿梭质粒 pcDNA3.1myc-his(-)A 作为骨架 ,保留其用于真核表达的必需元件^[8]后所构建的两种互补质粒不仅能在大肠杆菌 DY330TI 中稳定传代 ,而且制备的互补质粒转染真核细胞后能高效表达外源基因 ,因此可用作核酸疫苗的表达式载体。此外 ,对该质粒进行合适的改造 ,增加原核基因表达所需的相关调控元件后 ,也可作为原核表达系统的载体。使用上述系统 ,避免了抗生素的使用所带来的问题 ,符合 CBER(生物评价和研究中心)对基因疫苗生产的安全性及效率的检测要求 ,为重组药物和核酸疫苗研究提供了新的载体、宿主系统。

REFERENCES(参考文献)

[1] Koji N A , Sandra M , Roy C *et al.* . Construction of an *asd⁺* expres-

ssion-cloning vector : stable maintenance and and high-level expression of cloned genes in a *Salmonella* vaccine strain. *Biotechnol* , 1988 , **6** : 693 - 698

[2] Fu X , Xu J G. Development of a chromosome-plasmid balanced lethal system for *Lactobacillus acidophilus* with *thyA* gene as selective marker. *Microbiol Immunol* , 2000 , **44**(7) : 551 - 556

[3] Ryan E T , Crean T I , Kochi S K *et al.* . Development of a Delta *glnA* balanced lethal plasmid system for expression of heterologous antigens by attenuated vaccine vector strains of *Vibrio cholerae*. *Infect Immunol* , 2000 , **68**(1) : 221 - 226

[4] XIA X H(夏晓滨) , QI G M(祁国明) , LIU Y Q(刘延清) *et al.* . Development of a chromosome-plasmid balanced lethal gene expression system of *Vibrio cholerae* based on *thyA* locus. *Chin J Microbiol Immunol* (中华微生物学和免疫学杂志) , 2000 , **20**(3) : 223 - 227

[5] WANG H L(王恒梁) , FENG E H(冯尔玲) , LIN Y(林云) *et al.* . Construction of Δ *asd* mutant of *Shigella flexneri* 2a strain 32. *Bull Acad Mil Med Sci* (军事医学科学院院刊) , 2000 , **24**(2) : 81 - 87

[6] Tacket C O , Kelly S M , Schodel F *et al.* . Safety and immunogenicity in humans of an attenuated *Salmonella typhi* vaccine vector strain expressing plasmid-encoded hepatitis B antigens stabilized by the *Asd*-balanced lethal vector system. *Infect Immun* , 1997 , **65**(8) : 3381 - 3385

[7] Renato M , Jane Y , Andrew C *et al.* . Construction of plasmid vectors with a non-antibiotic selection system based on the *E. coli*-*thyA⁺* gene : application to cholera vaccine development. *Gene* , 1991 , **107** : 139 - 144

[8] ZHENG C F(郑春福) . The main structure of DNA vaccine vector foreign medical sciences section of biological products for prophylaxis. *Diagnosis and Therapy*(国外医学-预防、诊断、治疗用生物制品分册) 2000 , **28**(4) : 146 - 150

[9] Keda G , Krishnan S , Michael G *et al.* . The *umpA* gene of *Escherichia coli* encodes phosphatidylglycerol : Prolipoprotein diacylglyceryl transferase (*lgt*) and regulates thymidylate synthase levels through translational coupling. *J Biochem* , 1995 , **177**(7) : 1879 - 1882

[10] Marlene B , Gladys F M , Joan P L. Primary structure of the *Escherichia coli* *thyA* gene and its thymidylate synthase product. *Proc Natl Acad Sci USA* , 1983 , **80** : 914 - 4918

[11] Marlene B , Joan P L. Genetic system for analyzing *Escherichia coli* thymidylate synthase. *J Bacteriol* , 1984 , **160**(1) : 371 - 378

Expression Plasmid-Host Strain Using Chromosome-plasmid Balanced Lethal System Based on the *Escherichia coli thyA*

HUANG Wei* CAO Cheng LI Ping ZHONG Hui MA Qing-Jun

(Beijing Institute of Biotechnology, Beijing 100850, China)

Abstract To construct a vector for DNA vaccine and protein expression by using chromosome-plasmid balanced lethal system which was based on the *thyA*⁺ gene/ Δ *thyA* *Escherichia coli*. The *thyA* genes from *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae* were amplified by polymerase chain reaction and cloned into pCDNA3 by replacing ampicillin resistant gene. Multiple cloning sites, the prokaryotic replicon, CMV promoter and the bovine growth hormone polyA signal were also included in the vectors. Two new non-antibiotic recombinant plasmids renamed as pcDNATE and pcDNATC which had the nutritional marker as *thyA* were constructed and were transformed respectively into the Δ *thyA* derivative of *E. coli* K-12 strain DY330-TI, then two chromosome-plasmid balanced systems for *E. coli* based on the *thyA* were developed. To test the efficiency and stability of the newly constructed chromosome-plasmid balanced lethal system, a reporter gene—red fluorescent protein (DsRed2) gene was cloned into pcDNATE, pcDNATC and expressed as fusion to the c-myc. The two recombinant plasmids, pcDNATE-DsRed2, pcDNATC-DsRed2, were transfected into HEK293 solely and DsRed2-myc was detected by the fluorescence microscope assay and western-blot. Meanwhile, the loss of recombinant plasmids were not seen in cultures without thymidine after 20 generations. The chromosomal-plasmid balanced lethal system is proved to be an effective vector system for the expression of target genes and share the same stability with the antibiotic-resistant plasmid vector system. It holds great potential in gene vaccine vector because obviating the weakpoints of the drug resistance marker during application.

Key words gene vaccine, chromosome-plasmid balanced lethal system, *thyA*

Received: 02-26-2003

This work was supported by Grant from National 863 Project (No. 863.2001AA215021).

* Corresponding author. Tel: 86-10-66931810; Fax: 86-10-68155151; E-mail: htw5666@yahoo.com.cn 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>