

长角血蜱卵泡抑素相关蛋白的定性

田占成, 刘光远, 殷宏, 罗建勋, 谢俊仁

中国农业科学院兰州兽医研究所 家畜疫病病原生物学国家重点实验室 甘肃省动物寄生虫病重点实验室, 兰州 730046

摘要: 参照 GenBank 中长角血蜱致病性 Okayama 株卵泡抑素基因的核苷酸序列 (GenBank Accession No. DQ248886) 设计合成一对引物, 从本实验室保藏的单克隆洁净长角血蜱饥饿成蜱中快速提取总 RNA, 通过 RT-PCR 扩增出 814 bp 的卵泡抑素基因, 序列比对结果显示: 与长角血蜱致病性 Okayama 株的核苷酸序列及氨基酸序列一致性分别为 97.8% 和 99%, 将其亚克隆到表达载体 pGEX-4T-1 中进行表达, GST 融合重组蛋白预期分子量为 57 kD。表达重组蛋白经 MagneGST™ 蛋白纯化系统纯化后作为抗原分别与抗不同发育阶段长角血蜱(卵、幼蜱、若蜱、成蜱)多克隆抗体作为一抗进行免疫印迹, 结果表明: 与长角血蜱卵制备的多克隆抗体有很强的免疫反应, 而与其他发育阶段(幼蜱、若蜱、成蜱)饥饿长角血蜱制备的多克隆抗体反应性很弱。以上结果表明: 长角血蜱卵泡抑素蛋白在长角血蜱产卵及卵成熟发育时期的表达水平较其他发育阶段(幼蜱、若蜱、成蜱)的蛋白表达水平高。

关键词: 长角血蜱, 卵泡抑素, 定性

Characterization of follistatin-related protein from the hard tick *Haemaphysalis longicornis*

Zhancheng Tian, Guangyuan Liu, Hong Yin, Jianxun Luo, and Junren Xie

Key Laboratory of Veterinary Parasitology of Gansu Province, State Key Laboratory of Veterinary Etiological Biology, Lanzhou Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou 730046, China

Abstract: We designed the primers based on the sequence of the follistatin-related protein from *Haemaphysalis longicornis* Okayama strain accessed in GenBank. We cloned a gene encoding follistatin-related protein by RT-PCR, and the length cDNA is 814 bp, encoding a deduced protein of 289 amino acids. The alignment with the sequence of follistatin-related protein from the *H. longicornis* Okayama strain showed that the percent of nucleotide sequence and amino acid sequence is 97.8% and 99%, respectively. The expected size of GST-fused recombinant protein was 57 kD. We purified the recombinant protein through MagneGST™ protein purification system. Western blotting revealed that stronger reaction happened with the antiserum against eggs, but not clear with antisera against other developmental stages.

Keywords: *Haemaphysalis longicornis*, follistatin-related protein, characterization

卵泡抑素 (Follistatin-related protein, FRP) 是细胞生理过程, 包括增殖、细胞死亡、新陈代谢、TGF-β(β 转化生长因子)超家族结构相关蛋白, 调控动态平衡、分化、免疫反应及内分泌功能。TGF-β

Received: June 23, 2009; **Accepted:** September 30, 2009

Supported by: National Technological Basic Platform Project (No. 2005DKA21205-3), Gansu Province Natural Science Foundation Project (No. 096RJZA128).

Corresponding author: Guangyuan Liu. Tel: +86-931-8311181; Fax: +86-931-8340977; E-mail: liuguangyuan2002@sina.com

国家科技基础条件平台项目 (No. 2005DKA21205-3), 甘肃省自然科学基金项目 (No. 096RJZA128) 资助。

超家族成员的失活或失调通常发生在病理阶段,诸如异常细胞分化、增殖及新陈代谢等^[1-2]。目前已克隆鉴定了脊椎动物和无脊椎动物的 40 个成员,分成 3 个亚家族:转化生长因子- β s(TGF- β s)、骨形态发生蛋白(BMPs)及活化素(Activin)。在许多脊椎动物中鉴定的活化素信号拮抗剂被称为卵泡抑素,是活化素结合蛋白,能够抑制卵泡促进素的分泌^[3]。虽然 FRP 的功能尚未完全清楚,但 FRP 在细胞生长的负调控中起一定作用^[4],如 FRP 被发现能下调癌细胞增殖及转移^[5]。

蜱是真菌、原虫、斑疹、细菌及病毒等病原的传播媒介,危害仅次于蚊虫^[6]。长角血蜱(*Haemaphysalis longicornis*)在我国广泛分布,是泰勒虫和巴贝斯虫的主要传播媒介,引起难以估量的经济损失^[7]。大量的方法用于控制蜱的种群数量,如化学杀虫剂。然而,由于化学杀虫剂的残留效应给环境造成不利影响^[8],需要寻找一种替代产品。目前,已商业化的蜱疫苗只有微小牛蜱 BM86 疫苗,而微小牛蜱 BM86 疫苗只局限于微小牛蜱的防治^[9-10],且对于阿根廷 A 株微小牛蜱的防治能力很弱^[11]。因此,以几种抗原为基础的抗蜱鸡尾酒疫苗,其疫苗免疫防治效果应该更好^[12]。故而,需要筛选克隆更多的未知疫苗候选抗原。蜱卵巢对于传播病原及产卵都很重要,卵巢相关分子的鉴定有助于更好地理解蜱繁殖和媒介-病原相互作用的生理行为。本实验克隆了编码长角血蜱卵泡抑素相关蛋白的基因,观察了重组长角血蜱卵泡抑素蛋白的免疫反应性及不同发育阶段长角血蜱的卵泡抑素蛋白表达丰度差异,为蜱生物工程疫苗的研制奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 试剂

大肠杆菌 JM109 感受态细胞和表达宿主菌 BL21 购自大连宝生物公司; pGEX-4T-1 载体和 pGEM-T-Easy 载体购自 Promega 公司; MagneGSTTM 蛋白纯化系统(MagneGSTTM Protein Purification System)购自 Promega 公司。

1.1.2 实验动物

试验兔为 2 月龄雄性青紫蓝家兔 8 只,体重

2.4 kg, 购自中国农业科学院兰州兽医研究所试验动物场,清洁级。单克隆洁净长角血蜱成蜱由中国农业科学院兰州兽医研究所虫种资源课题组饲养,在 25°C \pm 1°C、相对湿度 75%~90%的恒温培养箱中饲养、保藏、传代培养备用。

1.2 方法

1.2.1 长角血蜱卵泡抑素基因的克隆

取长角血蜱饥饿成蜱用 DEPC 水冲洗 3~4 次,再用 Trizol 试剂盒提取总 RNA,操作方法严格按试剂盒的使用说明书进行。根据已发表的致病性 Okayama 株长角血蜱的卵泡抑素基因序列,利用 Oligo6.0 软件设计如下—对引物,上游引物为 S 上: 5'-CC GGA TCC GTG CCG TTT AAA GAC G-3'; 下游引物为 S 下: 5'-CG GAA TTC TTT AAT CCG AAA TAT-3'; 扩增片段长度为 815 bp, 上、下游引物中分别引入 *Bam*H I 和 *Eco*R I 酶切位点(下划线部分),引物由大连宝生物公司合成。RT-PCR 反应根据 universal riboclone cDNA synthesis system 说明书方法进行。PCR 循环参数为: 95°C 预变性 5 min; 94°C 变性 30 s, 55°C 退火 1 min, 72°C 延伸 1 min, 35 个循环; 72°C 延伸 7 min。用大连宝生物公司胶回收试剂盒回收约为 815 bp 的目的片段后,与 pGEM-T-Easy 载体 4°C 过夜连接。转化大肠杆菌 JM109,在涂有 X-gal 和 IPTG 的氨苄青霉素抗性平板上随机挑取 2 个白色菌落,接种至含 5 mL 氨苄青霉素的液体培养基中, 37°C 培养 6 h, 取 10 μ L 菌液用设计的引物进行扩增鉴定后,送上海生工测序。

1.2.2 卵泡抑素基因序列分析

将所扩增到的长角血蜱(甘肃株)卵泡抑素基因序列与 NCBI/GenBank 上登载的长角血蜱(Okayama 株)卵泡抑素序列采用 Clustal W 软件进行同源性比对,分析它们之间的序列差异。

1.2.3 表达载体的构建

以重组 pGEM-T easy 载体为模板,用设计的引物进行 PCR 扩增后,将扩增片段和 pGEX-4T-1 质粒分别用 *Eco*R I 和 *Bam*H I 进行双酶切、连接,测序正确后转化大肠杆菌 BL21(DE3)感受态细胞。

1.2.4 GST-卵泡抑素融合蛋白的诱导表达和纯化

将上述重组质粒转化菌接种到 2 \times YT 中,当菌

液浓度达到 $OD_{260}=1.0$ 时, 加入终浓度为 1 mmol/L IPTG 诱导表达 4 h, $16\,000 \times g$ 离心 2 min, 收集菌体, 用 $200 \mu\text{L}$ MagneGSTTM 细胞裂解液悬浮菌体沉淀, -20°C 放置 20 min。此后, 按照 MagneGSTTM 小量蛋白纯化试剂盒说明书进行纯化重组卵泡抑素蛋白。紫外吸收法测定蛋白质含量, 置 -20°C 冷冻保存。

1.2.5 融合蛋白的 SDS-PAGE、Western blotting 检测

1) 各发育阶段长角血蜱粗抗原的制备: 将长角血蜱幼蜱、若蜱、成蜱分别饲喂于兔体, 当叮咬 48 h 后, 将幼蜱、若蜱、成蜱摘下, 与卵一起分别在冰浴条件下进行研磨, 超声处理后, 4°C 、 $16\,000 \times g$ 离心 30 min 取上清, 测定长角血蜱 4 个发育阶段分别制备的粗抗原浓度。

2) 各发育阶段长角血蜱多克隆抗体的制备: 首先用弗氏不完全佐剂免疫兔体, 以提高兔体的基础免疫水平, 进一步将 4 个发育阶段等量抗原 1 mg/只 分别与等体积的弗氏佐剂混匀, 免疫兔体。采取同种方法, 每隔 4 周免疫一次, 共免疫 3 次。第一次免疫后第 3 周开始耳静脉采血, 每周 1 次, 直到全蜱攻毒后 3 周停止采血。制备的血清置于 -20°C 备用。

3) SDS-PAGE 及 Western blotting 检测: 将诱导表达的菌体超声波破碎, 加入 8 mol/L 尿素裂解包涵体, 按 SDS-PAGE 方法电泳, 电泳后用于胶染色观察重组卵泡抑素蛋白的表达情况; 将小量蛋白纯化试剂盒纯化的重组卵泡抑素蛋白作为抗原, SDS-PAGE 方法电泳后, 转移硝酸纤维素膜, 用上述方法所制备的各发育阶段(卵、幼蜱、若蜱、成蜱)长角血蜱多克隆抗体与等体积大肠杆菌 BL21 蛋白 37°C 下预吸附 2 h 后作为一抗(稀释度 1: 100), 与碱性磷酸酶标记的二抗(羊抗兔 IgG)一并用于 Western blotting, 以检测重组长角血蜱卵泡抑素蛋白的免疫原性。

2 结果

2.1 序列测定及不同长角血蜱地方株卵泡抑素基因核苷酸和氨基酸序列比对分析

序列测定表明, 所克隆的长角血蜱(甘肃株)卵泡抑素基因部分阅读框序列长度为 815 bp。将该序列提交 NCBI/GenBank 核苷酸序列数据库, 获得登录号为 EF139655, 与 NCBI/GenBank 中登载的长

角血蜱(Okayama 株)卵泡抑素开放阅读框核苷酸序列和氨基酸序列用 Clustal W 软件进行同源性比对可知: 与 GenBank 中的长角血蜱(Okayama 株)卵泡抑素(GenBank Accession No. DQ248886)的核苷酸序列和氨基酸序列一致性分别为 97.8%和 99%。其中 6 处 T 变为 C, 5 处 G 变为 A, 3 处 A 变为 G, 3 处 C 变为 T, 1 处 G 变为 T。翻译的氨基酸序列比对结果表明: 长角血蜱(Okayama 株)卵泡抑素蛋白第 237 位的精氨酸(R)变为谷氨酰胺(Q)(图 1)。

211	L	L	T	R	R	E	F	Q	S	F	M	R	P	S	F	dq248886
193	L	L	T	R	R	E	F	Q	S	F	M	R	P	S	F	EF139655
	H	P	P	I	K	S	C	P	L	E	D	Q	Y	Y	K	Majority
226	H	P	P	I	K	S	C	P	L	E	D	Q	Y	Y	K	dq248886
208	H	P	P	I	K	S	C	P	L	E	D	Q	Y	Y	K	EF139655
	D	G	D	E	V	M	I	D	C	S	N	C	V	C	A	Majority
241	D	G	D	E	V	H	I	D	C	S	N	C	V	C	A	dq248886
223	D	G	D	E	V	H	I	D	C	S	N	C	V	C	A	EF139655

图 1 长角血蜱卵泡抑素相关蛋白甘肃株与 Okayama 株氨基酸序列比对结果

Fig. 1 Alignment of amino acid sequence of follistatin-related protein from *Haemaphysalis longicornis* Gansu strain and Okayama strain.

2.2 表达产物的检测

诱导后的表达产物经 SDS-PAGE 分析发现, 在分子量约 57 kD 处有一条特异性的蛋白条带(图 2),

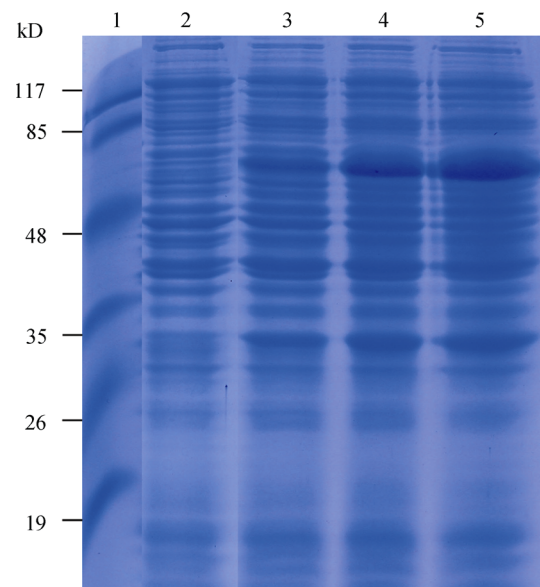


图 2 SDS-PAGE 电泳图分析长角血蜱卵泡抑素蛋白表达

Fig. 2 SDS-PAGE analysis of the expression of the follistatin-related protein. 1: protein marker; 2: blank control vector after induced by IPTG; 3-5: the expression of follistatin-related protein after induced by IPTG in 2 h, 4 h, 6 h, respectively.

这与预期的融合蛋白分子量大小一致,说明目的基因得以表达。以纯化的长角血蜱卵抑素蛋白作为抗原,长角血蜱各发育阶段(卵、幼蜱、若蜱、成蜱)粗抗原免疫兔体产生的抗血清作为一抗,抗体经 1:100 稀释后进行 Western blotting 分析,结果表明:用长角血蜱卵制备的多克隆抗体与小量纯化的重组卵抑素蛋白(图 3)产生很强的特异性免疫反应,结果出现一条大小约为 57 kD 的蛋白杂交带(图 4)。而用其他 3 个发育阶段(幼蜱、若蜱、成蜱)饥饿长角血蜱等量粗抗原免疫兔体制备的多克隆抗体作为一抗产生的反应条带却很弱(图 4)。

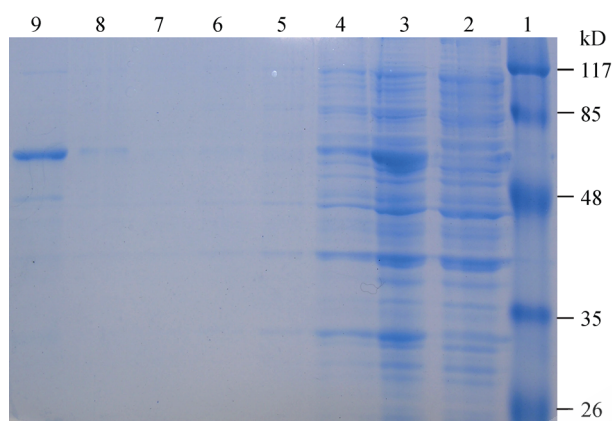


图 3 MagneGSTTM 小量蛋白纯化试剂盒纯化重组卵抑素蛋白结果

Fig. 3 Purification of the recombinant follistatin-related protein through the MagneGSTTM Protein Purification System. 1: protein marker; 2: recombinant protein before induction; 3: recombinant protein after induced four hours; 4: supernant after eluted first time; 5: supernant after eluted second time; 6: supernant after eluted third time; 7: supernant after eluted fourth time; 8: first purified recombinant protein; 9: second purified recombinant protein.

3 讨论

本实验克隆表达了甘肃株长角血蜱卵抑素相关蛋白基因,并检测了其免疫学活性及长角血蜱各个发育阶段卵抑素相关蛋白表达丰度的差异。所表达重组 GST 卵抑素相关蛋白融合蛋白的分子量约为 57 kD,与 Zhou 等^[13]所表达的 Okayama 株长角血蜱卵抑素相关蛋白的分子量一致,在核苷酸水平上,甘肃株长角血蜱卵抑素基因与 Okayama 株长角血蜱卵抑素相关蛋白核酸序列相比较,有 18 处碱基发生了变异,但氨基酸水平上仍较保守,只

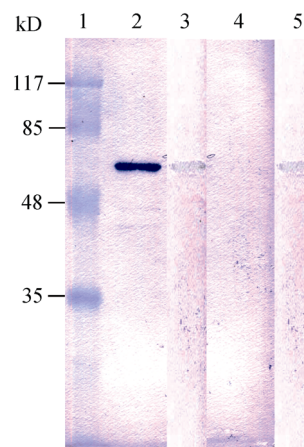


图 4 长角血蜱不同发育阶段卵抑素表达差异免疫学分析

Fig. 4 Difference profiling of the follistatin-related protein in the different developmental stages. 1: protein marker; 2: recombinant follistatin-related protein + antiserum against *Haemaphysalis longicornis* egg; 3: recombinant follistatin-related protein+antiserum against unfed larval female tick; 4: recombinant follistatin-related protein+antiserum against unfed adult female tick; 5: recombinant follistatin-related protein+antiserum against unfed nymphal female tick.

有 237 位的精氨酸变为谷氨酰胺。而长角血蜱卵抑素部分碱基的替换并未影响其免疫原性。重组卵抑素蛋白与长角血蜱卵多克隆抗体免疫印迹的结果表明:表达的重组卵抑素蛋白具有很强的免疫原性,可为将来研制长角血蜱疫苗提供参考。

目前,对于脊椎动物的卵抑素作用机理较无脊椎动物的卵抑素研究得透彻^[14-18],脊椎动物的卵抑素参与卵优势选择分子调控,而在果蝇中,骨形态发生蛋白和活化素信号的调控主要参与胚胎的生长、分化及形态发育等过程^[19]。大多数脊椎动物属于单胎或多胎生殖方式。而节肢动物长角血蜱,每次产卵可达成百上千,故而节肢动物卵抑素相关蛋白的作用机理是否与脊椎动物卵抑素存在差异,值得研究。

卵抑素(FS)是一种具有广泛组织分布的单链糖蛋白激素,该基因具有时空特异性表达调控的复杂模式^[14],本研究采用各发育阶段长角血蜱粗抗原,以相同免疫方案制备的各发育阶段长角血蜱(卵、幼蜱、若蜱、成蜱)多克隆抗体分别与纯化的重组长角血蜱卵抑素蛋白进行免疫反应,可以反映出卵抑素蛋白在长角血蜱各发育阶段的表达情况。

结果表明: 用相同方案制备的长角血蜱 4 个阶段的血清, 只有卵制备的抗体与重组卵泡抑素蛋白产生强的免疫反应, 而其他发育阶段(幼蜱、若蜱、成蜱)的长角血蜱粗抗原制备的抗体与重组卵泡抑素蛋白只有很弱的免疫反应。其原因可能是: 在同等条件下, 卵泡抑素基因在卵中表达的蛋白量相对于其他 3 个发育阶段的蛋白表达量更高, 所以用卵制备的多克隆抗体, 其卵泡抑素蛋白抗体效价更高, 可以很好地识别重组卵泡抑素蛋白。因此, 可以推断, 长角血蜱卵泡抑素蛋白在长角血蜱不同发育阶段, 其蛋白表达水平并不相同, 可能更偏向于在长角血蜱产卵及卵成熟发育时期的高水平表达。这一方面与 Zhou 等^[13]报道的长角血蜱卵泡抑素蛋白主要负责长角血蜱产卵的调控功能结果相一致。另一方面, 对于卵发育时期的长角血蜱卵泡抑素的功能, 或许更接近于人源卵泡抑素的功能: 卵泡抑素(FS)和活化素(ACT)一起, 参与胚胎发育与分化、卵巢颗粒细胞分化、神经细胞分化、成骨细胞功能等多种生理调节^[20-21]。在长角血蜱卵发育的不同时期, 其卵的发育受到了长角血蜱卵泡抑素蛋白的调控, 随着卵发育的不同时期, 其表达水平有差异。

REFERENCES

- [1] Chen YG, Lui HM, Lin SL, *et al.* Regulation of cell proliferation, apoptosis, and carcinogenesis by activin. *Exp Biol Med*, 2002, **227**: 75–87.
- [2] Massague J, Blain SW, Lo RS, *et al.* TGF- β signaling in growth control, cancer, and heritable disorders. *Cell*, 2000, **103**: 295–309.
- [3] Parker L, Stathakis DG, Arora K. Regulation of BMP and activin signaling in *Drosophila*. *Prog Mol Subcell Biol*, 2004, **34**: 73–101.
- [4] Zwijsen A, Blockx H, Van Arnhem W, *et al.* Characterization of a rat C6 glioma-secreted follistatin-related protein (FRP). Cloning and sequence of the human homologue. *Eur J Biochem*, 1994, **225**(3): 937–946.
- [5] Johnston IM, Spence HJ, Winnie JN, *et al.* Regulation of a multigenic invasion programme by the transcription factor, AP-1: re-expression of a downregulated gene, TSC-36, inhibits invasion. *Oncogene*, 2000, **19**: 5348–5358.
- [6] Bior AD, Essenberg RC, Sauer JR, *et al.* Comparison of differentially expressed genes in the salivary glands of male ticks, *Amblyomma americanum* and *Dermacentor andersoni*. *Insect Biochem Mol Biol*, 2002, **32**: 645–655.
- [7] Li Y, Luo J, Yin H, *et al.* Experimental transmission of *Theileria* sp. (China 1) infective for small ruminants by *Haemaphysalis longicornis* and *Haemaphysalis qinghaiensis*. *Parasitol Res*, 2007, **101**(3): 533–538.
- [8] Willadsen P, Kemp DH. Vaccination with “concealed” antigens for tick control. *Parasitol Today*, 1988, **4**(7): 196–198.
- [9] Montesino R, Cremata J, Rodríguez M, *et al.* Biochemical characterization of the recombinant *Boophilus microplus* Bm86 antigen expressed by transformed *Pichia pastoris* cells. *Biotechnol Appl Biochem*, 1996, **23** (Pt 1): 23–28.
- [10] García-García JC, Montero C, Redondo M, *et al.* Control of ticks resistant to immunization with Bm86 in cattle vaccinated with the recombinant antigen Bm95 isolated from the cattle tick, *Boophilus microplus*. *Vaccine*, 2000, **18**(21): 2275–2287.
- [11] García-García JC, Soto A, Nigro F, *et al.* Adjuvant and immunostimulating properties of the recombinant Bm86 protein expressed in *Pichia pastoris*. *Vaccine*, 1998, **16**(9/10): 1053–1055.
- [12] Mulenga A, Sugimoto C, Onuma M. Issues in tick vaccine development: identification and characterization of potential candidate vaccine antigens. *Microbes Infect*, 2000, **2**(11): 1353–1361.
- [13] Zhou J, Liao M, Hatta T, *et al.* Identification of a follistatin-related protein from the tick *Haemaphysalis longicornis* and its effect on tick oviposition. *Gene*, 2006, **372**: 191–198.
- [14] Lu CL, Yang W, Hu ZY, *et al.* Proliferation and differentiation of granulosa cell and its roles in regulating the development of oocytes. *Chin Sci Bull*, 2005, **50**(21): 2431–2437.
- 卢翠玲, 杨巍, 胡召元, 等. 颗粒细胞的增殖分化及其在卵泡发育中的作用. *科学通报*, 2005, **50**(21): 2431–2437.
- [15] Wang HB, Xie HR, Xia GL. Inhibin and activin in the mammalian ovary. *J Agric Biotechnol*, 2002, **10**: 197–202.
- [16] Miro F, Smyth CD, Whitelaw PF, *et al.* Regulation of 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase5/4-isomerase and cholesterol side-chain cleavage cytochrome P450 by activin in rat granulosa cells. *Endocrinology*, 1995, **136**: 3247–3252.
- [17] Rabinovici J, Spencer SJ, Doldi N, *et al.* Activin-A as an intraovarian modulator: action, localization, and regulation of the intact dimer in human ovarian cells. *J Clin Invest*, 1992, **89**: 1528–1536.
- [18] Amsterdam A, Selvaraj N. Control of differentiation, transformation, and apoptosis in granulosa cells by

oncogenes, oncoviruses, and tumor suppressor genes. *Endoc Rev*, 1997, **18**: 435-461.

[19] Haerry TE, OConnor MB. Isolation of *Drosophila* activin and follistatin cDNAs using novel MACH amplification protocols. *Gene*, 2002, **291**: 85-93.

[20] Fingdlay JK. An update on the role of inhibin, activns and

follistatin as regular of folliculogenesis. *Bio Reprod*, 1993, **48**: 15-23.

[21] Tian J, Li ZM, Fu Y, *et al.* The development of inhibin, activin and follistatin. *Prog Vet Med*, 2008, **12**: 77-81.

田锦, 李志敏, 傅衍, 等. 抑制素、活化素和卵泡抑素研究进展. *动物医学进展*, 2008, **12**: 77-81.



2010 年部分生物、农林类学术期刊联合征订表

刊物名称	邮发 代号	刊 期	年价 (元)	网 址	E-mail
大豆科学	14-95	双月刊	60	http://ddkx.periodicals.net.cn/gyjs.asp?ID=4606693	dadoukx@sina.com
动物学研究	64-20	双月刊	150	www.zoores.ac.cn	zoores@mail.kiz.ac.cn
动物学杂志	2-422	双月刊	210	http://dwzzz.ioz.ac.cn	journal@ioz.ac.cn
激光生物学报	42-194	双月刊	120	www.jgswxb.net	jgswxb@hunnu.edu.cn
菌物学报	2-499	双月刊	480	http://journals.im.ac.cn/jwxtcn	jwxt@im.ac.cn
昆虫知识	2-151	双月刊	150	www.ent-bull.com.cn	entom@ioz.ac.cn
林业科学	82-6	月刊	300	www.linyekexue.net	linykn@forestry.ac.cn
人类学学报	2-384	季刊	100	www.ivpp.ac.cn	acta@ivpp.ac.cn
山地农业生物学报	66-66	双月刊	100	http://web.gzu.edu.cn/jou/jou/	Sd.xb@163.com
生命科学	4-628	月刊	360	www.lifescience.net.cn	cbls@sibs.ac.cn
生物工程学报	82-13	月刊	780	http://journals.im.ac.cn/cjben	cjb@im.ac.cn
生物技术通报	18-92	月刊	300	http://swjstb.periodicals.net.cn/gyjs.asp?ID=4615630	biotech@mail.caas.net
生物技术通讯	82-196	双月刊	150	http://swtx.chinajournal.net.cn	swtx@263.net
生物信息学	14-14	季刊	48	xxsw.chinajournal.net.cn	cjbioinformatics@yahoo.cn
微生物学报	2-504	月刊	660	http://journals.im.ac.cn/actamicrocn	actamicro@im.ac.cn
微生物学通报	2-817	月刊	576	http://journals.im.ac.cn/wwxtben	tongbao@im.ac.cn
武汉植物学研究	38-103	双月刊	180	http://whzwxjy.cn	editor@rose.whiob.ac.cn
畜牧兽医学报	82-453	月刊	240	www.xmsyxb.com	xmsyxb@263.net
遗传	2-810	月刊	600	www.chinagene.cn	yczz@genetics.ac.cn
遗传学报	2-819	月刊	600	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)	2-138	半月刊	1188	www.ChinaAgriSci.com	zgnykx@mail.caas.net.cn
中国农业科学 (英文)	2-851	月刊	432	www.ChinaAgriSci.com	zgnykx@mail.caas.net.cn
中国实验动物学报	2-748	双月刊	120	www.calas.org.cn	A67761337@126.com
中国生态农学报	82-973	双月刊	210	www.ecoagri.ac.cn	editor@sjziam.ac.cn
中国生物工程杂志	82-673	月刊	960	www.biotech.ac.cn	biotech@mail.las.ac.cn
中国水产科学	18-250	双月刊	180	www.fishscichina.com	zgscckx@cafs.ac.cn
中国水稻科学	32-94	双月刊	90	www.ricesci.cn	cjrs@263.net
作物学报	82-336	月刊	600	www.chinacrops.org/zwxn	xbzw@chinajournal.net.cn