

# 水体中病毒浓缩方法及其条件优化

寇晓霞<sup>1</sup> 吴清平<sup>1\*</sup> 姚琳<sup>1,2,3</sup> 张菊梅<sup>1</sup>

(1. 广东省微生物研究所广东省菌种保藏与应用重点实验室 广东 广州 510070)

(2. 中国科学院武汉病毒研究所 湖北 武汉 430071)

(3. 中国科学院研究生院 北京 100049)

**摘要:** 本研究探讨了在自来水和污水两种不同的水体环境中, 三氯化铝沉淀法和正电荷滤膜法浓缩回收病毒的效率, 并比较应用不同的浓缩条件、洗脱物质时的病毒回收率, 从而建立有效的环境样本中病毒的浓缩方法。结果表明, 三氯化铝沉淀法在两种水体中的回收率均较高, 最高回收率分别达到 96.0% 和 92.0%, 但正电荷滤膜法在两种水体中的回收率差别较大。在自来水中, 正电荷滤膜法的最高回收率为 93.9%, 在污水中的最高回收率仅为 69.9%, 这说明正电荷滤膜法适用于病毒含量较高且悬浮物等杂质较少的样本。在应用于自来水样时, 两种方法均可起到有效的病毒浓缩作用, 但在悬浮物等杂质较多的污水中, 三氯化铝法具有较好的回收效率。

**关键词:** 水, 病毒, 浓缩, 检测

## Methods of Viruses Concentration and Conditions Optimization in Water

KOU Xiao-Xia<sup>1</sup> WU Qing-Ping<sup>1\*</sup> YAO Lin<sup>1,2,3</sup> ZHANG Ju-Mei<sup>1</sup>

(1. *Guangdong Institute of Microbiology, Guangdong Provincial Key Laboratory of Microbial Culture Collection and Application, Guangzhou, Guangdong 510070, China*)

(2. *Wuhan Institute of Virology, Chinese Academy of Science, Wuhan, Hubei 430071, China*)

(3. *Graduate University of Chinese Academy of Science, Beijing 100049, China*)

**Abstract:** The efficacy of the method of  $\text{AlCl}_3$  sedimentation and positive-charged membrane filtration for concentrating viruses was compared in this study. In addition, the efficacy of the two methods was also compared in different waters, conditions and elution. The recovery rate of the sedimentation method of  $\text{AlCl}_3$  and the positive-charged membrane was 96.0% and 92.0% respectively when tap water served as samples. The recovery rate of the sedimentation method of  $\text{AlCl}_3$  and the positive-charged membrane was 93.9% and 69.9% respectively when sewage served as samples. Compared with the two concentration methods, there was no obvious difference in tap water but significant difference in sewage. The results showed that the positive-charged membrane was adapted to the water samples with little impurity. According to the experiment results, the two methods could be used to effectively concentrate viruses in tap water. However, the sedimentation method of  $\text{AlCl}_3$  was recommended to the primary method in other water sam-

ples.

**Keywords:** Water, Virus, Concentration, Detection

甲肝病毒、诺如病毒、轮状病毒和星状病毒多起重大的水源性非细菌性疾病的流行病学事件暴发有关<sup>[1]</sup>。在我国及世界上大多数国家,对于水质中病毒的质量控制中都没有建立常规的病毒检测方法,原因主要在于缺乏有效、简单、快速、可靠的技术用于浓缩和检测这些病原<sup>[2]</sup>。RT-PCR等分子检测方法由于其高度灵敏、特异的特点,是目前用于检测环境样本中病毒的最有效方法<sup>[3,4]</sup>,但由于水环境中存在的致病病毒量极低,能否将大量水体中极其微量但却足以使人致病的病毒粒子有效的浓缩,成为将这些分子方法成功应用的关键点。水中病毒的浓缩目前有吸附法、有机混凝法和过滤膜法等为主的各种方法,但这些方法的浓缩效率和应用前景均存在一定的争议<sup>[5]</sup>。

此外,由于这四种食源性病毒很难培养,或者没有体外培养的细胞系,也没有合适的动物模型,获取阳性病毒株及其效价测定存在一定困难<sup>[6,7]</sup>。因此,本实验利用大肠杆菌噬菌体的形态、大小、对环境的耐受力与病毒粒子相似,且具有培养方法简单,对人体无危害等特性,用来代替病毒的阳性毒株,探讨将正电荷滤膜法和三氯化铝沉淀法在不同条件下,应用于不同水体的病毒浓缩的可行性和效率,这对于提高样品检出率,降低检测的假阴性,对食源性病毒的监测具有重要意义。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株及噬菌体

大肠杆菌噬菌体  $\phi$ 2 及宿主菌大肠杆菌 285 购自深圳以诺金公司,  $-20^{\circ}\text{C}$  冰箱保存备用。

### 1.2 培养基

二倍肉膏蛋白胨培养液,上层肉膏蛋白胨半固体琼脂培养基(含琼脂 0.7%, 试管分装, 每管 5 mL), 下层肉膏蛋白胨固体琼脂培养基(含琼脂 2%), 1% 蛋白胨水培养基、牛肉膏蛋白胨培养基。

### 1.3 实验用膜

带正电荷的尼龙膜购自美国 AMF 公司, 64085-01-1 MDS, 孔径  $0.45\ \mu\text{m}$ 。

### 1.4 模拟样品制备

分别取自来水、生活污水作为浓缩病毒载体水

样,水样标本分成 1 L 各 3 份,取其中 2 份投入已知浓度大肠杆菌噬菌体  $\phi$ 2。另一份作为病毒污染本底对照水样,依下面的方法浓缩病毒,并计算同一病毒在不同水体环境中的浓缩回收率,以说明方法的适用性和可靠性。

### 1.5 病毒回收

**1.5.1 三氯化铝沉淀法<sup>[8]</sup>:** 每升被检水内加入 NaCl 和  $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 使其最终浓度分别达 1%(W/V) 和  $0.002\ \text{mol/L} \sim 0.01\ \text{mol/L}$  (水体杂质多时加入量增大)。置室温 1 h, 5000 r/min 低温离心 15 min 后弃上清, 沉淀物用洗脱液吹打沉淀 5 min, 使病毒洗脱,  $4^{\circ}\text{C}$ 、5000 r/min 离心 10 min, 取上清, 调 pH 至 7.2,  $-20^{\circ}\text{C}$  保存待检。

**1.5.2 正电荷滤膜法<sup>[9]</sup>:** 试验使用正电荷滤膜 (64085-01-1 MDS, 美国 AMF 公司), 孔径  $0.45\ \mu\text{m}$ 。采用负压抽滤的平板膜过滤形式, 将膜用去离子水清洗数遍后将该膜置于无菌滤器上制成吸附层, 直接将已制备好的待检样品混匀后, 倒入上部容器中过滤, 每份水样重复 2 次, 液体过滤完后将膜小心取下, 用少量洗脱液将截留在膜上的病毒洗脱下来, 对洗脱液进行病毒检测。

详细过程如下: 用  $47\ \text{mm}$ ,  $0.45\ \mu\text{m}$  的正电荷滤膜对水样进行过滤, 吸附病毒; 用洗脱液洗提滤膜, 将滤器上的病毒洗提下来; 用  $1\ \text{mol/L}$  的 HCl 将洗提液的 pH 值调到 7.0~7.4, 将洗提液涡旋 15 min; 然后将涡旋后的洗提液在  $4^{\circ}\text{C}$  下, 7000 r/min 离心 30 min 后, 将沉淀溶于洗脱液, 涡旋 5 min, 5000 r/min 离心 10 min, 取上清, 浓缩体积为 5 mL, 调 pH 至 7.2,  $-20^{\circ}\text{C}$  保存待检。

### 1.6 洗脱液选择

实验中比较了甘氨酸缓冲液、牛肉膏溶液、磷酸缓冲液 3 种不同的洗脱液在不同 pH(7~11) 条件下的最佳洗脱效果。

### 1.7 回收率测定

用双层琼脂平板法培养噬菌体,  $37^{\circ}\text{C}$  倒置培养 12 h~24 h 后进行噬菌斑计数, 选取每皿有 30~300 个噬菌斑的平板计算噬菌体效价。回收率计算方法如下:

$$\text{回收率}(\%) = (\text{洗脱病毒总量} / \text{加注病毒总量}) \times 100$$

## 2 结果

### 2.1 添加实验前噬菌体原液效价测定

在进行模拟污染样品之前, 取 1 mL 噬菌体原液, 将其做 10 倍系列梯度稀释, 然后测定噬菌体效价, 测定结果见表 1。根据噬菌体效价计算公式可得, 实验中所用噬菌体原液的效价为  $9.6 \times 10^6$  PFU/mL。

实验 Assay	稀释度 Dilutions				
No.	$10^{-4}$	$10^{-5}$	$10^{-6}$	$10^{-7}$	$10^{-8}$
1	679	86	21	6	2
2	526	112	35	12	4
3	590	90	26	10	0
Average	598	96	27	9.3	2

### 2.2 三氯化铝浓度对回收效果影响

在用三氯化铝回收噬菌体之前, 首先探讨了不同的条件对回收效果的影响, 实验中设立了一系列的三氯化铝浓度和 3 个 pH 值, 比对最佳的回收效率, 结果见表 2。噬菌体的回收率在 60.8% 到 97.6% 之间, 三氯化铝 0.005 mol/L pH 7 时, 回收率最高。其中噬菌体的初始添加量为  $9.6 \times 10^6$  PFU/L。

$AlCl_3$ 浓度 (mol/L) $AlCl_3$ concentration	pH 值 pH Value	回收病毒总量 (PFU) Virus recovery amount	病毒回收率 (%) Virus recovery rate
0.002	3	$7.10 \times 10^6$	73.6
0.005	3	$6.35 \times 10^6$	66.1
0.008	3	$6.12 \times 10^6$	63.8
0.010	3	$5.84 \times 10^6$	60.8
0.002	5	$7.92 \times 10^6$	82.5
0.005	5	$6.94 \times 10^6$	72.3
0.008	5	$6.81 \times 10^6$	70.9
0.010	5	$6.27 \times 10^6$	65.3
0.002	7	$8.34 \times 10^6$	86.9
0.005	7	$9.37 \times 10^6$	97.6
0.008	7	$8.86 \times 10^6$	92.3
0.010	7	$8.41 \times 10^6$	87.6

### 2.3 不同洗脱液洗脱效果比较

洗脱液有甘氨酸缓冲液、牛肉膏溶液、磷酸缓冲液 3 种, 分别配以 3 个 pH 值 (7, 9.5, 11)。病毒回收率如表 3 所示。最低回收率为 66.3% (0.1 mol/L 磷酸缓冲液, pH 11), 最高回收率为 93.5% (0.1 mol/L 甘氨酸缓冲液, pH 9.5), 其中洗脱效果最好的是 pH 9.5 时的 0.1 mol/L 甘氨酸缓冲液。其中噬菌体的添加量为  $9.6 \times 10^6$  PFU/L。

洗脱液 Elution	pH 值 pH Value	回收病毒总量 (PFU) Virus recovery amount	病毒回收率 (%) Virus recovery rate
0.1 mol/L Glycine buffer	7	$7.13 \times 10^6$	74.3
3% beef extraction	7	$7.76 \times 10^6$	80.8
0.1 mol/L phosphate buffer solution	7	$7.62 \times 10^6$	79.4
0.1 mol/L Glycine buffer	9.5	$8.98 \times 10^6$	93.5
3% beef extraction	9.5	$8.68 \times 10^6$	90.4
0.1 mol/L phosphate buffer solution	9.5	$7.74 \times 10^6$	80.7
0.1 mol/L Glycine buffer	11	$8.63 \times 10^6$	89.9
3% beef extraction	11	$8.73 \times 10^6$	90.9
0.1 mol/L phosphate buffer solution	11	$6.54 \times 10^6$	66.3

### 2.4 三氯化铝沉淀法回收效率测定

取 1 mL 噬菌体原液, 即  $9.6 \times 10^6$  个噬菌体, 并对其做 10 倍系列稀释, 分别加入经灭菌处理的 1 L 自来水样和生活污水样中, 经三氯化铝沉淀法浓缩, 然后测定噬菌体效价, 计算回收效率, 并验证三氯化铝沉淀法在不同浓度范围之间的回收效率, 探讨其适用的浓度范围。测定结果分别见表 4。实验结果所采用的稀释度是从  $9.6 \times 10^5$  PFU 至  $9.6 \times 10^0$  PFU。

按照表 4 的数据可以看到, 三氯化铝沉淀法在自来水中的回收率较高, 最高达到 96%; 当添加的

表4 三氯化铝法回收自来水中噬菌体效率测定  
Table 4 The concentration measurement of phage  $\lambda$  in tap water and sewage by  $AlCl_3$  sedimentation

自来水 Tap water		生活污水 Sewage		
添加病毒总量 (PFU/L) Virus addition amount	回收病毒总量 (PFU/5 mL) Virus recovery amount	病毒回收率(%) Virus recovery rate	回收病毒总量 (PFU/5 mL) Virus recovery amount	病毒回收率(%) Virus recovery rate
$9.6 \times 10^5$	$9.22 \times 10^5$	96.0	$8.99 \times 10^5$	93.7
$9.6 \times 10^4$	$8.84 \times 10^4$	92.1	$9.01 \times 10^4$	93.9
$9.6 \times 10^3$	$9.10 \times 10^3$	94.8	$8.76 \times 10^3$	91.3
$9.6 \times 10^2$	$8.72 \times 10^2$	90.8	$8.30 \times 10^2$	86.5
$9.6 \times 10^1$	$8.00 \times 10^1$	83.3	$5.20 \times 10^1$	54.2
$9.6 \times 10^0$	$3.00 \times 10^0$	33.3	0	0

噬菌体浓度为  $9.6 \times 10^1$  PFU/L以上时,回收率均在80%以上,并且当浓度为  $9.6 \times 10^0$  PFU/L时,仍然可以回收到噬菌体,但是回收率较低,为33.3%。在生活污水中的回收率最高达到93.9%,但只有当添加的噬菌体浓度维持在  $9.6 \times 10^2$  PFU/L以上时,相应的回收率才维持在80%以上,浓度为  $9.6 \times 10^1$  PFU/L时的回收率仅为54.2%;而当浓度为  $9.6 \times 10^0$  PFU/L时,则不能有效的回收到噬菌体。比较这两组数据可以看出,自来水和生活污水两种水体中,三氯化铝的回收率均较高,相差显著性不大。

### 2.5 正电荷滤膜法回收效率测定

取1 mL噬菌体浓缩液,将其做10倍系列梯度稀释,加入经灭菌处理的1 L自来水样和生活污水样中,实验结果所采用的稀释度是从  $9.6 \times 10^5$  PFU一直系列稀释到  $9.6 \times 10^0$  PFU,经正电荷膜过滤法浓缩浓缩,测定结果分别见表5。由表中数据可以看出,回收率总体随着投毒浓度的增加而升高。但正电荷滤膜的回收效率在两种水体中具有明显差异。

在自来水中,最高回收率达到92%,当添加噬菌体的量为  $9.6 \times 10^2$  PFU/L以上时,回收率均在80%以上。当病毒量为  $9.6 \times 10^1$  PFU/L时,虽然仍然可以检出病毒,但是检出率只有29.2%;而当病毒量稀释至  $9.6 \times 10^0$  PFU/L时,没有回收到噬菌体。在污水中该法的回收率远低于在自来水中的回收率,最高回收率仅有69.9%,当添加量为  $9.6 \times 10^2$  PFU/L

表5 正电荷滤膜法回收自来水和生活污水中噬菌体的效率  
Table 5 The efficiency of sedimentation for phage in tap water and sewage by positive charged membrane

自来水 Tap water		生活污水 Sewage		
添加病毒总量 (PFU/L) Virus addition amount	回收病毒总量 (PFU/5 mL) Virus recovery amount	病毒回收率(%) Virus recovery rate	回收病毒总量 (PFU/5 mL) Virus recovery amount	病毒回收率(%) Virus recovery rate
$9.6 \times 10^5$	$8.93 \times 10^5$	92.0	$6.71 \times 10^5$	69.9
$9.6 \times 10^4$	$8.81 \times 10^4$	91.8	$5.94 \times 10^4$	61.9
$9.6 \times 10^3$	$8.02 \times 10^3$	83.6	$4.77 \times 10^3$	49.7
$9.6 \times 10^2$	$8.10 \times 10^2$	84.4	$3.80 \times 10^2$	39.6
$9.6 \times 10^1$	$2.80 \times 10^1$	29.2	$2.00 \times 10^1$	2.1
$9.6 \times 10^0$	0	0	0	0

时,回收率仅为39.6%,相比较自来水中的84.4%,几乎收率降低了一半。虽然在添加量为  $9.6 \times 10^1$  PFU/L时,也仍可以检出,但检出率非常低,仅为2.1%。

## 3 讨论

大量研究证实,外环境水体及淤泥是病毒存活循环的主要场所,并因此频频引发传染病的流行,其中以肠道病毒性疾病最为多见<sup>[10]</sup>。但在人类生活环境的各种水体中,除生活污水外,其所含有的病毒浓度往往很低,目前现有检测方法的灵敏限水平仍然达不到不经浓缩而直接从水中检测病毒的目的<sup>[11]</sup>。因此,若要对环境中的病毒进行检测和实时监控,研究从水体等环境样品中浓缩病毒,提高样品检出率,降低检测的假阴性,对水体中病毒的监测具有重要的意义。本文研究了采用三氯化铝沉淀法和正电荷滤膜过滤法用于自来水和生活污水中浓缩病毒的技术方法,探讨了每种方法应用于实际样本时的可行性和最佳条件,总结此次试验中两种浓缩方法的各自特性如下:

三氯化铝沉淀法在自来水和生活污水中的回收率均较高,无显著差异,回收率最高分别达到96.0%和93.9%。但是正电荷滤膜法在两种水体中的回收率差别较大,在自来水中,正电荷滤膜法的最高回收率为92%,在污水中的最高回收率仅为69.9%。

对于浓缩方法回收病毒是否存在有效的检测范围, 即当被检样本中的病毒浓度在一定的范围之内, 不同浓缩方法回收效果是否有变化, 本文对此问题也进行了探讨。比较于三氯化铝法, 正电荷滤膜法的有效检测范围较小。当噬菌体浓度为  $9.6 \times 10^2$  PFU/L 时, 在自来水中三氯化铝沉淀法的回收率是同等浓度下正电荷滤膜法的 3 倍, 而在污水中是正电荷滤膜法的 27 倍之多。但当噬菌体浓度为  $9.6 \times 10^0$  PFU/L 时, 无论在何种水体中, 正电荷滤膜法的回收率均为 0, 而三氯化铝沉淀法在自来水中的回收率仍可以达到 33.3%。由此可见, 两种方法回收病毒的效率在自来水中的差异不大, 但在污水中其回收效果存在显著差异。

用滤膜浓缩病毒的回收率受水样水质影响, 变动很大, 特别是以水质恶劣的水样做检测对象时, 病毒的回收率明显低下。因此, 当应用于悬浮物及杂质较多的水体时, 水体混浊度始终制约着正电荷滤膜的应用。污水中因悬浮物过多, 在浓缩病毒过滤过程中, 堵塞滤膜时有发生, 使过滤水标本耗时长, 造成大量的病毒丢失, 使正电荷膜过滤法的回收效果受到很大影响。另外, 混浊度较大的污水, 需预先澄清。吸附在悬浮物上的病毒可能会被澄清过程而除去, 从而降低检出率; 另外, 水中可溶性或胶体样的有机物可能由于和病毒竞争吸附位点而影响病毒吸附。这说明该法适用于病毒含量较高且悬浮物等杂质较少的样本。但在两种水质中, 能检出噬菌体的最低限度均是  $9.6 \times 10^1$  PFU/L。

由于在实验过程中采用的水体、水样体积有所差异, 病毒的回收效率受操作者的熟练程度以及试剂、仪器和外界环境等干扰因素对浓缩方法的评价影响较大。多年来, 学者对于环境水体中病毒的浓缩方法的效果评价一直是众说不一。但在国外的研究中, 大多数都是使用膜吸附-洗脱法作为水样中病毒的初步浓缩方法<sup>[12,13]</sup>, 这可能是考虑到了对于大样水体的处理过程中的可操作性原因, 但不同滤膜的选择, 对于病毒的回收也有很大影响。而对于病毒洗脱液的选择和优化方面, 在病毒浓缩后所使用的检测方法也限制了洗脱液的选择, 比如张崇森<sup>[5]</sup>等人的研究表明用 3% 牛肉膏+0.05 mol/L 甘氨酸

适于作为微孔滤膜的洗脱液比单用 3% 牛肉膏作为洗脱液的病毒回收率高, 并且在随后的 PCR 检测中, 提高了特异性, 减少了干扰物, 这和本研究的结果相似。

从两种方法回收率的结果分析, 在应用于自来水样时, 两者均可用, 可以起到有效的病毒浓缩和监测作用。此外, 三氯化铝沉淀法最大的优点是适用于绝大多数具有不同水质特性的水样, 特别是可以克服膜过滤法因易堵塞而对水体悬浮物浓度有严格限制的缺陷。另外, 就条件而言, 该方法无需过滤装置等, 也省去进口的阳电滤膜, 从应用推广的角度, 更为方便, 费用成本低, 而需要的低温离心机是各病毒实验室的基本设备。另外, 本实验中采用的水样仅为 1 L, 但是在实际检测自来水中病毒时, 因为混在其中的病毒极微量, 需要大量的水样。今后, 还需要进行大量水样(数百升)的试验, 确认正电荷滤膜的实用性。

## 参考文献

- [1] Koopmans M, Von Bonsdorff CH, Vinje J, et al. Food-borne virus. *FEMS Microbiol Rev*, 2002, **26**(2): 187-205.
- [2] Belguith K, Hassen A, Aouni M. Comparative study of four extraction methods for enterovirus recovery from wastewater and sewage sludge. *Bioresour Technol*, 2006, **97**(3): 414-419.
- [3] Fout GS, Martinson BC, Moyer MW, et al. A multiplex reverse transcription-PCR method for detection of human enteric viruses in groundwater. *Appl Environ Microbiol*, 2003, **69**(6): 3158-3164.
- [4] Kittigul L, Ekchaloemkiet S, Utrarachkij F, et al. An efficient virus concentration method and RT-nested PCR for detection of rotaviruses in environmental water samples. *J Virol Methods*, 2005, **124**(1-2): 117-122.
- [5] 张崇森, 刘永军, 王晓昌, 等. 环境水体中肠道病毒浓缩方法的比较. *中国给水排水*, 2007, **23**(7): 36-39.
- [6] Zheng DP, Ando T, Fankhauser RL, et al. Norovirus classification and proposed strain nomenclature. *Virology*, 2006, **346**(2): 312-323.
- [7] Willcocks MM, Ashton N, Kurtz JB, et al. Cell culture adaptation of astrovirus involves a deletion. *J Virol*, 1994, **68**(9): 6057-6058.
- [8] Huang PW, Laborde D, Land VR, et al. Concentration and

- detection of caliciviruses in water samples by reverse transcription-PCR. *Appl Environ Microbiol*, 2000, **66**(10): 4383–4388.
- [9] Kingsley DH, Richards GP. Rapid and efficient extraction method for reverse transcription-PCR detection of hepatitis A and Norwalk-like viruses in shellfish. *Appl Environ Microbiol*, 2001, **66**(9): 4152–4157.
- [10] Borchardt MA, Bertz PD, Spencer SK, *et al.* Incidence of enteric viruses in groundwater from household wells in Wisconsin. *Appl Environ Microbiol*, 2003, **69**(2): 1172–1180.
- [11] Rassard J, Seyer K, Houde A, *et al.* Concentration and detection of hepatitis A virus and rotavirus in spring water samples by reverse transcription-PCR. *J Virol Methods*, 2005, **123**(2): 163–169.
- [12] Katayama H, Shimasaki A, Ohgaki S. Development of a virus concentration method and its application to detection of enterovirus and norwalk virus from coastal seawater. *Appl Environ Microbiol*, 2002, **68**(3): 133–139.
- [13] Rutjes S, Italiaander R, Van den Berg HJL, *et al.* Isolation and detection of enterovirus RNA from large volume water samples by using the nuclisens miniMAG system and real-time nucleic acid sequence-based amplification. *Appl Environ Microbiol*, 2005, **71**(7): 3734–3740.

(上接 p.19)

## 征 稿 简 则

### 3.4 摘要写作注意事项

#### 3.4.1 英文摘要:

1) 建议使用第一人称, 以此可区分研究结果是引用文献还是作者得出的; 2) 建议用主动语态, 被动语态表达拖拉模糊, 尽量不用, 这样可以避免好多长句, 以求简单清晰; 3) 建议使用过去时态, 要求语法正确, 句子通顺; 4) 英文摘要的内容应与中文摘要一致, 但可比中文摘要更详尽, 写完后务必请英文较好且专业知识强的专家审阅定稿后再返回编辑部。5) 摘要中不要使用缩写语, 除非是人人皆知的, 如: DNA, ATP 等; 6) 在英文摘要中, 不要使用中文字体标点符号。

3.4.2 关键词: 应明确、具体, 一些模糊、笼统的词语最好不用, 如基因、表达……

### 4 特别说明

#### 4.1 关于测序类论文

凡涉及测定 DNA、RNA 或蛋白质序列的论文, 请先通过国际基因库 EMBL (欧洲)或 GenBank (美国)或 DDBJ(日本), 申请得到国际基因库登录号 (Accession No.)后再投来。

#### 4.2 关于版权

4.2.1 本刊只接受未公开发表的文章, 请勿一稿两投。

4.2.2 凡在本刊通过审稿、同意刊出的文章, 所有形式的 (即各种文字、各种介质的) 版权均属本刊编辑部所有。作者如有异议, 敬请事先声明。

4.2.3 对录用的稿件编辑部有权进行文字加工, 但如涉及内容的大量改动, 将请作者过目同意。

4.2.4 文责自负。作者必须保证论文的真实性, 因抄袭剽窃、弄虚作假等行为引发的一切后果, 由作者自负。

#### 4.3 审稿程序及提前发表

4.3.1 来稿刊登与否由编委会最后审定。凡被录用的稿件将及时发出录用通知, 对不录用的稿件, 一般在收稿 1 个月之内通过 E-mail 说明原因, 打印稿不退。稿件经过初审、终审通过后, 作者根据编辑部返回的退修意见进行修改补充, 然后以投稿时的用户名和密码登陆我刊网址上传电子版修改稿, 待编辑部复审后将给作者发送稿件录用通知单, 请作者将修改稿纸稿和签字盖章后的承诺书一并寄回编辑部, 按照稿号顺序进入排队发表阶段。

4.3.2 对投稿的个人和单位一视同仁。坚持文稿质量为唯一标准, 对稿件采取择优先登的原则。如作者要求提前发表, 请在投稿的同时提出书面报告, 说明该研究成果的重要性、创新性、竞争性和提前发表的必要性, 经过我刊的严格审查并通过后, 可予提前刊出。

### 5 发表费及稿费

论文一经录用, 将在发表前根据版面收取一定的发表费并酌付稿酬、赠送样刊及单行本。

### 6 联系我们

地址: 北京市朝阳区大屯路中国科学院微生物研究所《微生物学通报》编辑部 (100101)

Tel: 010-64807511

E-mail: tongbao@im.ac.cn

网址: <http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>