

aiiA 基因表达载体的构建及其在毕赤酵母中的表达

娄瑞娟^{1,2} 张霞¹ 罗利龙^{1,2} 徐操^{1,3} 宋水山^{1*}

(1. 河北省科学院生物研究所 河北 石家庄 050051)

(2. 河北工业大学 化工学院 天津 300100)

(3. 河北师范大学 河北 石家庄 050016)

摘要: 构建携带 N-酰基高丝氨酸内酯酶基因(*aiiA*)的重组毕赤酵母表达载体 pPIC3.5K-*aiiA*, 采用电转化方法转入毕赤酵母 GS115, 经营养缺陷型培养基、表型鉴定和高 G418 浓度筛选获得高拷贝表达盒的酵母转化子, 用 0.5% 甲醇诱导表达, RT-PCR 鉴定可检测到重组酵母中编码目的基因成熟肽的 mRNA, SDS-PAGE 和 Western blot 检测结果表明, *aiiA* 基因在毕赤酵母中成功表达, 用指示菌紫色杆菌 CV026 检测发现目的蛋白具有降解 N-酰基高丝氨酸内酯的活性。

关键词: *aiiA* 基因, 毕赤酵母, 基因表达

Construction of an *aiiA*-expressing Vector and Its Expression in *Pichia pastoris*

LOU Rui-Juan^{1,2} ZHANG Xia¹ LUO Li-Long^{1,2} XU Cao^{1,3} SONG Shui-Shan^{1*}

(1. Biology Institute, Hebei Academy of Sciences, Shijiazhuang, Hebei 050051, China)

(2. College of Chemistry and Chemical Engineering, Hebei University of Technology, Tianjin 300100, China)

(3. Hebei Normal University, Shijiazhuang, Hebei 050016, China)

Abstract: An *aiiA*-expressing vector, pPIC3.5K-*aiiA*, was constructed and transformed into *Pichia pastoris* GS115 by electroporation. The recombinant yeast strains were screened with auxotroph medium and phenotypic identification. The transformants with high copy numbers of *aiiA* gene were selected in medium containing high concentration of G418. The expression of *aiiA* was induced by addition of methanol into culture at the final concentration of 0.5%. The transcription of *aiiA* was confirmed by RT-PCR in the recombinant yeast. SDS-PAGE and Western blot analysis demonstrated that recombinant AiiA protein was successfully expressed after induction. The recombinant AiiA protein showed the activity of degrading the N-acyl-homoserine lactones when using *Chromobacterium violaceum* CV026 as reporter strain.

Keywords: *aiiA* gene, *Pichia pastoris*, Gene expression

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 30970030); 国家重大基础研究前期研究专项项目(No. 2009CB126010); 河北省自然科学基金项目(No. C2006000707)

* 通讯作者: ✉ shuishans@hotmail.com

收稿日期: 2009-11-16; 接受日期: 2010-02-08

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

细菌可以根据特定信号分子的浓度监测周围环境中自身或其他细菌的数量的变化,当信号分子达到一定的浓度阈值时,能够启动菌体中相关基因的表达来适应环境中的变化,这一调控系统被称为细菌的群体感应系统^[1]。N-酰基高丝氨酸内酯(AHLs)是革兰氏阴性细菌中群体感应的信号分子,它所介导的细菌群体感应系统参与调节植物病原菌致病因子的表达。破坏病原细菌产生的 AHLs,干扰其群体感应,阻断其致病机制有望成为生物防治此类细菌病害的新策略^[2]。AiiA 蛋白是 N-酰基高丝氨酸内酯酶,它可以水解 AHLs 的内酯环,使其失去生物学活性,从而大大减弱了细菌的致病性^[3]。

近年来,关于 *aiiA* 基因的克隆已经有许多相关的报道,并且通过不同的原核表达载体实现了表达^[4-5]。同时,通过构建带有标签的目的蛋白可以得到纯化的 AiiA 蛋白,邱健等通过谷胱甘肽-琼脂糖亲和和层析柱和凝血酶处理获得了纯化的含有 GST 标签的 AiiA 蛋白^[6];杨梅等通过镍柱亲和和层析从而得到了纯化的含有组氨酸标签 AiiA 蛋白^[7]。

目前,采用真核生物毕赤酵母表达 *aiiA* 基因还未见报道,毕赤酵母兼具有原核细胞和真核细胞表达系统的特点,又具有很高的遗传稳定性,不会在繁殖过程中发生质粒丢失的现象。本试验通过构建真核重组表达载体 pPIC3.5K-*aiiA*,并转化到毕赤酵母 GS115 中,利用甲醇诱导,在毕赤酵母中表达具有活性的 AiiA 蛋白。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 质粒和菌种: pPIC3.5K、毕赤酵母 *Pichia pastoris* GS115 由清华大学生命科学院陈国强教授惠赠;紫色杆菌 *Chromobacterium violaceum* CV026 由上海交大学生命科学技术学院许煜泉教授提供;大肠杆菌 *Escherichia coli* DH5 α 、*E. coli* BL21 为本实验室保存;含有 *aiiA* 基因的重组表达质粒 pGEX2T-*aiiA* 为作者所在实验室构建^[8]。

1.1.2 试剂: 限制性内切酶(*EcoR* I、*Bam*H I、*Sac* I)、T4 DNA 连接酶、rTaq、DL2000、 λ -*Hind* III 购自 TaKaRa 公司,胶纯化回收试剂盒购自天根公司,卡那霉素、氨苄霉素、无氨基酸的硫氨酸酵母氮源培养基(YNB)、抗生素 G418、生物素购自上海生工生物工程技术有限公司,抗 AiiA 蛋白抗体

由河北省生物研究所细胞生化室制备,辣根酶标记羊抗兔 IgG 购自北京鼎国公司, RNA 提取试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司,测序及引物合成均由上海生工生物工程技术有限公司完成。

1.1.3 培养基: YPD、MD、MM、BMGY、BMMY 配方见毕赤酵母操作手册(Invitrogen 公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 重组质粒 pPIC3.5K-*aiiA* 的构建: 将 pGEX2T-*aiiA* 用 *EcoR* I 和 *Bam*H I 双酶切,回收大小为 753 bp 的目的片段,并与同样双酶切回收的 pPIC3.5K 载体片段连接,转化 *E. coli* DH5 α 菌株,提取质粒,进行 PCR 和双酶切鉴定,PCR 所用引物 AAU、AAL 参见文献[8]。反应条件为: 94°C 2 min; 94°C 1 min, 57°C 1 min, 72°C 1.5 min, 30 个循环; 72°C 10 min。将鉴定为阳性重组质粒的克隆送到上海生工公司进行测序,将测序正确的阳性重组质粒命名为 pPIC3.5K-*aiiA*。

1.2.2 毕赤酵母的转化、筛选和表型鉴定: 制备毕赤酵母感受态细胞,并将 10 μ g 经 *Sac* I 酶切的 pPIC3.5K 和 pPIC3.5K-*aiiA* 分别采用电转仪转化到毕赤酵母 GS115 的感受态细胞中,电转化条件为 1500 V、25 μ F。转化后涂布 MD 平板,30°C 培养至转化子出现。用灭菌的牙签挑取转化子分别点种于 MD 和 MM 平板上,确定其甲醇利用表型,在 MD、MM 平板上都能正常生长的转化子为阳性转化子。将经过表型鉴定的阳性转化子分别点种到含有 0.25、0.5、1.0、1.5、2.0 g/L 抗生素 G418 的 YPD 平板上,30°C 培养 2 d,在高浓度 G418 平板上生长的为高拷贝转化子。

1.2.3 重组毕赤酵母的 PCR 鉴定: 将鉴定出的高拷贝转化子接种于 2 mL YPD 培养基中培养过夜,取 1 mL 新鲜的菌液进行 PCR 鉴定,所用引物为 AAU、AAL 及通用型引物,5'AOX: 5'-GACTGGTTC CAATTGACAAGC-3'; 3'AOX: 5'-GCAAATGGCATT CTGACATCC-3'。PCR 反应条件同 1.2.1。

1.2.4 重组酵母的 RT-PCR 鉴定: 采用 TRNzol Total RNA Reagent 总 RNA 提取试剂盒提取毕赤酵母 GS115 (pPIC3.5K-*aiiA*) 和毕赤酵母 GS115 (pPIC3.5K)的总 RNA,反转录 PCR 试剂盒(TaKaRa 公司)合成 cDNA 第一链,再以 cDNA 第一链为模板进行 PCR 扩增。所用引物和 PCR 反应条件同 1.2.1。

1.2.5 酵母阳性重组菌株的诱导表达: 挑取单菌落

接种于 5 mL BMGY 培养基中, 30°C 培养至 $OD_{600} = 2.0-6.0$, 离心收集菌体, 用 10 mL BMMY 重悬, 30°C 诱导培养 120 h, 每隔 24 h 取样 1 mL 并同时补加甲醇至总体积的 0.5%, 所取样品离心收集细胞, 进行 SDS-PAGE 及 Western blot 分析。

1.2.6 表达产物的 Dot blot 分析: 取一张硝酸纤维素膜, 依次点上待检样品, 室温温育 1 h, 然后将膜置于 5% 的脱脂奶粉中 4°C 封闭过夜, 之后用抗 AiiA 蛋白抗体(一抗)孵育 2 h, 膜经 TBST 漂洗 4 次, 每次 10 min, 再与辣根酶标记羊抗兔 IgG (二抗)室温反应 2 h, TBST 漂洗 3 次, 每次 10 min, 显色。

1.2.7 表达产物的活性检测: 报告菌株采用删除 AHLs 合成酶基因 *cviI* 和紫色杆菌素合成抑制基因的紫色杆菌(*Chromobacterium violaceum*)突变菌株 CV026, 其本身不产生 AHLs, 失去了合成紫色杆菌素的能力, 当有外源 AHLs 时, 紫色杆菌素可恢复产生, 以此来鉴定培养体系中是否存在 AHLs。制备报告平板^[9], 待平板凝固后, 用已灭菌的打孔器打孔。分别在小孔中加入待测样品 10 μ L, 30°C 过夜培养。观察颜色变化, 如果 AHLs 被降解掉则会形成透明圈, 根据透明圈的大小可以判断 AHLs 被降解的程度。

2 结果

2.1 重组质粒 pPIC3.5K-aiiA 的构建与鉴定

构建的重组质粒 pPIC3.5K-aiiA 图谱见图 1。PCR 鉴定结果表明, 使用特异性引物时空质粒 pPIC3.5K 没有扩增出任何条带, 而重组质粒 pPIC3.5K-aiiA 扩增出约 753 bp 片段(图 2)。初步鉴定的阳性重组质粒用 *EcoR* I / *Bam* H I 双酶切后, 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测后得到大小为 9.3 kb 和 753 bp 的条带(图 3), 进一步测序表明序列和读码框都正确。

2.2 阳性重组子的筛选和鉴定

固体 MD、MM 平板筛选得到 56 株甲醇利用快速型菌株(*Mut*⁺), 进而通过不同浓度的抗生素 G418 筛选, 发现在含有 2.0 g/L G418 的 YPD 平板上出现了 15 个克隆。据报道, 高抗性的 *Mut*⁺ 通常含有外源基因拷贝达 2 个以上^[10], 而且, 毕赤酵母表达系统中多拷贝外源基因的存在也被证实能提高外源蛋白的表达量^[11]。以其中一株高抗性转化子的基因组 DNA 为模板分别用特异性引物和通用引物进行

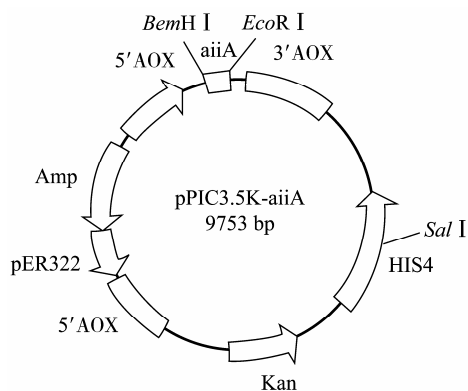


图 1 重组质粒的物理图谱

Fig. 1 Physical map of recombinant plasmid

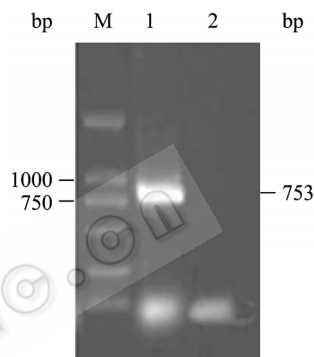


图 2 pPIC3.5K 和 pPIC3.5K-aiiA 的 PCR 鉴定

Fig. 2 PCR detection of pPIC3.5K and pPIC3.5K-aiiA

Note: M: DNA marker; 1: Recombinant plasmid pPIC3.5K-aiiA; 2: Negative control pPIC3.5K.

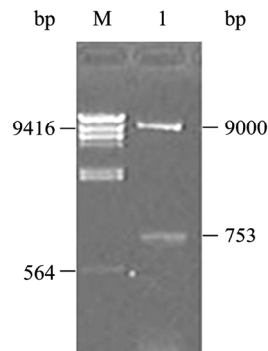


图 3 pPIC3.5K-aiiA 的酶切鉴定

Fig. 3 Digestion of plasmid pPIC3.5K-aiiA

Note: M: DNA marker; 1: pPIC3.5K-aiiA digested with *EcoR* I and *Bam* H I.

PCR 扩增分析。使用特异性引物时空重组载体 pPIC3.5K-aiiA 扩增出大小为 753 bp 的片段(图 4A); 用通用型引物时空载体 pPIC3.5K 扩增出 220 bp 的片段, 而重组载体 pPIC3.5K-aiiA 扩增出 973 bp (753 bp + 220 bp) 的片段(图 4B)。表明 *aiiA* 基因已经整合到毕赤酵母染色体上。

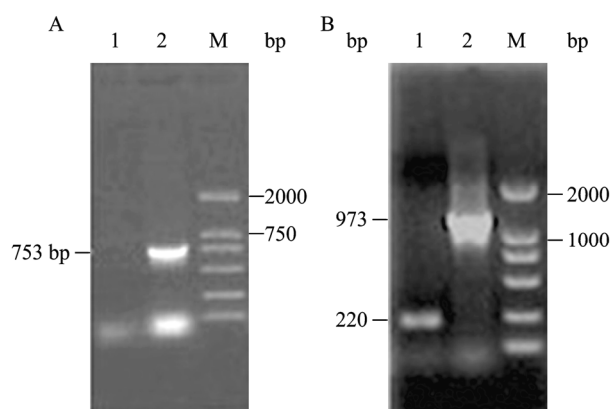


图 4 阳性重组子的 PCR 鉴定

Fig. 4 PCR analysis of positive recombinants

Note: M: DNA marker; 1: Negative control *P. pastoris* GS115 (pPIC3.5K); 2: Positive transformant.

2.3 RT-PCR 检测分析

提取毕赤酵母 GS115 (pPIC3.5K-*aiiA*)和毕赤酵母 GS115 (pPIC3.5K)的 mRNA, 以 mRNA 为模板分别进行 RT-PCR 凝胶电泳, 结果表明毕赤酵母 GS115 (pPIC3.5K-*aiiA*) RT-PCR 扩增出分子量为 753 bp 的目的条带, 而毕赤酵母 GS115 (pPIC3.5K)则没有目的条带(图 5), 证实目的基因能够正常转录。

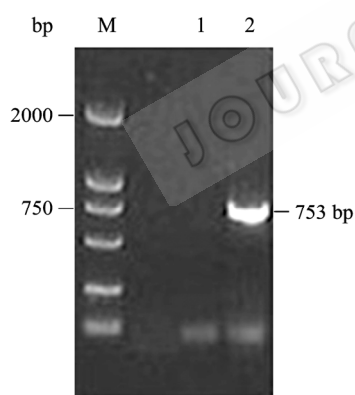


图 5 RT-PCR 产物电泳图

Fig. 5 Electrophoresis analysis of RT-PCR products

Note: M: DNA marker; 1: Negative control *P. pastoris* GS115 (pPIC3.5K); 2: *P. pastoris* GS115 (pPIC3.5K-*aiiA*).

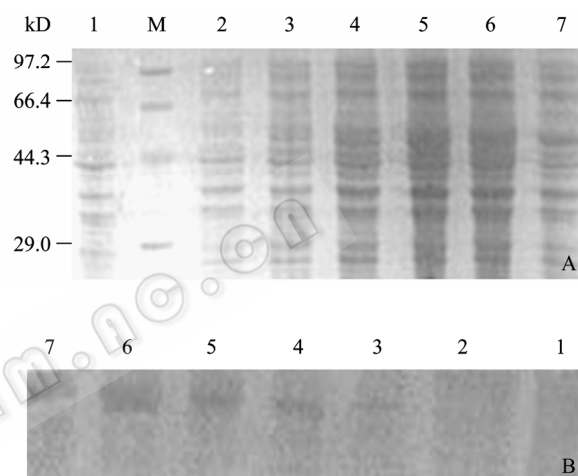
2.4 表达产物的 SDS-PAGE 及 Western blot 分析

挑取重组酵母 GS115 (pPIC3.5K-*aiiA*)及转化有空载体的酵母 GS115 (pPIC3.5K), 用 0.5%甲醇连续诱导表达 120 h 后, 进行 SDS-PAGE 分析(图 6A)。结果表明, 目的条带在 28 kD 处并没有出现大量表达, 而 Western blot (图 6B)和 Dot blot 分析(图 7)表

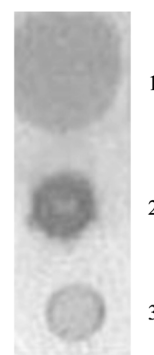
明酵母转化子有特异性条带出现, 而对照组没有任何条带, 可以证明表达的目的蛋白具有良好的特异性。并且目的蛋白随诱导表达时间的延长, 表达量逐步提高, 在 96 h 时达到最高。

2.5 表达产物的活性检测

将诱导表达不同时间的取样经破碎、浓缩得到的粗蛋白样品用紫色杆菌 CV026 检测活性, 随着诱导表达时间的延长, 透明圈越大, 信号分子被降解的程度越大, 说明蛋白的活性越高, 并且在诱导表达 96 h 活性最高(图 8)。


图 6 SDS-PAGE (A)和 Western blot (B)鉴定诱导表达的 AiiA 蛋白
Fig. 6 SDS-PAGE (A) Western blot (B) analysis of induced protein AiiA

Note: M: DNA marker; 1: *P. pastoris* GS115 (pPIC3.5K) strain as negative control; 2-7: *P. pastoris* GS115 (pPIC3.5K-*aiiA*) induced expression after 0, 24, 48, 72, 96, 120 h.


图 7 Dot blot 鉴定诱导表达的 AiiA 蛋白
Fig. 7 Dot blot analysis of induced protein AiiA

Note: 1: *E. coli* BL21 (pGEX2T-*aiiA*) strain as positive control; 2: *P. pastoris* GS115 (pPIC3.5K-*aiiA*); 3: *P. pastoris* GS115 (pPIC3.5K) strain as negative control.



图8 AiiA 蛋白活性检测

Fig. 8 Activity detection of AiiA protein

Note: 1: *P. pastoris* GS115 (pPIC3.5K) strain as negative control; 2-7: *P. pastoris* GS115 (pPIC3.5K-aiiA) induced expression after 0, 24, 48, 72, 96, 120 h.

3 讨论

甲醇毕赤酵母是一种可以利用甲醇作为唯一碳源的酵母菌,是目前应用最为广泛的一种蛋白表达系统,该表达系统除了具有一般真核表达系统的特点之外,还具有成本低、产量高、易于大规模纯化等优点,同时毕赤酵母适度的糖基化修饰也使表达的蛋白更接近天然蛋白的构象,因此越来越受到研究学者的青睐。目前已有许多细菌、真菌、无脊椎动物、病毒、人类和高等植物等近 500 多种外源基因在毕赤酵母中成功表达^[12-13],但也有许多外源基因表达量不高^[14],甚至不能表达^[15]。

本实验成功地构建了表达 *aiiA* 基因的毕赤酵母表达载体,并筛选获得了表达目的蛋白的阳性重组菌株。但是从 SDS-PAGE 图像上来看并未发现目的蛋白的大量表达,而通过 Western blot 和 Dot blot 分析表明,目的蛋白已经表达且具有良好的特异性。同时,目的蛋白的产量随时间的增加有一个逐渐增加的过程,并且在诱导表达 96 h 时产量达到最高,用紫色杆菌 CV026 检测目的蛋白具有良好的降解 AHLs 活性,而且在 96 h 时活性最高,这和 Western blot 检测结果一致。同时作者将筛选到的其他 14 株高拷贝转化子进行 PCR、RT-PCR 鉴定证明目的基因 *aiiA* 成功整合到毕赤酵母染色体上而且能够正常转录。0.5% 甲醇诱导表达 SDS-PAGE 检测同样没出现大量表达的情况。Western blot 和 Dot blot 检测目的蛋白有很好的特异性。通过调整培养基的组成和组成方案向培养基添加 1% 酪蛋白来抑制胞内蛋白酶的活性或者改变诱导的温度、时间和甲醇浓度基

至用筛选到甲醇利用慢型(Mut⁻)转化子来表达目的蛋白表达量都没有太大的改变。

毕赤酵母在表达外源基因的过程中,其密码子的使用存在偏爱性^[16],在表达过程中,如果稀有密码子所对应的 tRNA 的含量越低,可能会导致在蛋白合成和翻译过程中受到阻滞,同时外源基因的高 AT 含量也容易导致外源基因转录的提前终止。本实验通过对 mRNA 的检测证明了目的基因的转录,证实了该基因的小量表达。

此外,作者也尝试换用分泌性表达载体 pPIC9K,直接检测上清以及经过浓缩的上清,均未检测到分泌的目的蛋白。然而,收集细胞,经超声破碎后检测胞内物质,却存在活性。对于分泌型表达,蛋白酶的降解是影响表达的一个重要因素,选用蛋白酶缺陷型菌株 SMD1163、SMD1165 和 SMD1168 可避免表达产物的降解,或者采用控制比生长速率的手段^[17]。不同的信号肽和表达载体对异源蛋白分泌效率有很大的差异^[18-19];同时,酵母表达系统本身的缺陷以及重组 mRNA 中有非编码区和转录的阻断也能造成某些蛋白表达不理想。

参考文献

- [1] Fuqua WC, Winans SC, Greenberg EP. Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. *J Bacteriol*, 1994, **176**(2): 269-275.
- [2] Wang LH, Weng LX, Dong YH, et al. Specificity and enzyme kinetics of the quorum-quenching N-acyl homoserine Lactonase (AHL-lactonase). *J Biol Chem*, 2004, **279**(14): 13645-13651.
- [3] Bauer WD, Teplitski M. Can plant manipulated bacterial quorum-sensing. *Plant Physiol*, 2001, **28**(9): 913-921.
- [4] 杨梅, 姚帆, 黄勤清, 等. 不同来源的苏云金芽孢杆菌 *aiiA* 基因的表达及抗病性分析. 应用与环境生物学报, 2007, **13**(3): 373-381.
- [5] 周赉, 孙明, 喻子牛. 苏云金芽孢杆菌 AiiA 蛋白对魔芋软腐病菌的抗病活性. 武汉大学学报: 理学版, 2004, **50**(6): 761-764.
- [6] 邱健, 李承光, 贾振华, 等. 酰基高丝氨酸内酯酶 *SS10* 的酶学特性及其抗软腐病功能的初探. 植物病理学报, 2007, **37**(6): 629-636.
- [7] 杨梅, 张锋, 林彬辉. AiiA 蛋白的可溶性表达及其抗菌活性研究. 分子细胞生物学报, 2008, **41**(6): 465-471.
- [8] 宋水山, 马宏, 贾振华. 芽孢杆菌酰基高丝氨酸内酯酶

基因的克隆机表达. 生物技术, 2005, **15**(1): 7-9.

- [9] Ravn L, Christensen AB, Molin S, *et al.* Methods for detecting acylated homoserine lactones produced by Gram-negative bacteria and their application in studies of AHL-production kinetics. *J Microbiol Meth*, 2001, **44**(3): 239-251.
- [10] Wang YC, Chen ZR, Chen ZW, *et al.* Recombinant human heparin-binding neurite-promoting factor expressed with yeast stimulates neuritis outgrowth. *Chin Med*, 2002, **115**(9): 1352-1357.
- [11] Miller KD, Weaver FJ, Gray SA, *et al.* Production, purification, and characterization of human ScFv antibodies expressed in *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*, and *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif*, 2005, **42**(2): 255-256.
- [12] Macauley-Patrick S, Fazenda ML, McNeil B, *et al.* Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system. *Yeast*, 2005, **22**(4): 249-270.
- [13] Cereghino JL, Cregg JM. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiology*, 2001, **24**(1): 45-66.
- [14] 黄琦, 谢芝勋, 庞耀珊, 等. 猪传染性胸膜肺炎放线杆菌 *apxIA* 基因在毕赤酵母中的表达与分析. 畜牧与兽医, 2008, **40**(4): 19-23.
- [15] 李欣, 郭树华. 影响外源基因在巴氏毕赤酵母中表达的因素. 生物技术通讯, 2000, **11**(2): 132-135.
- [16] 赵翔, 霍克克, 李育阳, 等. 毕赤酵母的密码子用法分析. 生物工程学报, 2000, **16**(3): 308-312.
- [17] Zhou XS, Zhang YX. Decrease of proteolytic degradation of recombinant hirudin produced by *Pichia pastoris* by controlling the specific growth rate. *Biotechnol Lett*, 2002, **24**(17): 1449-1453.
- [18] 张树军, 杨磊, 黄瑾. 信号肽序列在酵母分泌表达系统中的应用. 医学综述, 2007, **13**(9): 643-645.
- [19] 王玮, 文湘华. 木质素过氧化物酶LiPH2合成基因在毕赤酵母中的表达. 环境科学学报, 2009, **29**(9): 1793-1799.

征订启事

欢迎订阅 2010 年《植物保护》杂志

《植物保护》创刊于 1963 年, 由中国植物保护学会和中国农业科学院植物保护研究所主办, 为全国中文核心期刊、中国科技核心期刊、“中国期刊方阵”双百期刊, 曾荣获中国科协优秀科技期刊奖、全国优秀科技期刊奖, 北京市全优期刊奖、国家期刊奖提名奖等多个奖项。收录的数据库有英国《CABI 文献数据库》、《Agrindex (FAO)》、美国《化学文摘》(CA)、《中国科学引文数据库》、《中文科技期刊数据库》、《生物学文摘》、《万方数据—数字化期刊群》、《中国农业文摘数据库》、《中国科技论文与引文数据库》、《中国学术期刊(光盘版)》、《中国期刊网》。本刊主要刊登有关植物病理、农林业昆虫、杂草及鼠害等农作物有害生物、植物检疫、农药等植物保护学科各领域原始研究性论文和具有创新性、实用性技术成果文章。设有专论与综述、研究报告、调查研究、基础知识、实验技术、国外植保、争鸣、应用与交流、病虫新动态、学会动态与信息、新书新产品介绍等栏目。

竭诚欢迎全国各地科研院所研究人员、大专院校教师及研究生、各级植保科技工作者等踊跃订阅。欢迎广大作者踊跃投稿! 并欢迎咨询洽谈广告业务!

本刊为双月刊, 大 16 开, 160 页, 铜版纸印刷。每期定价 25.00 元, 全年 150.00 元。邮发代号: 2-483, 全国各地邮局均可订阅。直接在本刊编辑部订阅, 可享受 9 折优惠价, 全年 135 元, 若需挂号, 每期另加 3 元。

联系地址: 北京圆明园西路 2 号中国农科院植保所《植物保护》编辑部 邮编: 100193

电话: 010-62819059, 62815914 传真: 010-62815914

E-mail: zwbh1963@263.net 网址: www.plantprotection.ac.cn

联系人: 王音 高洪荣