

RNA 干扰(RNAi)文库研究进展

罗彦忠 王磊*

(中国农业科学院生物技术研究所 北京 100081)

摘要: RNAi 是由双链 RNA (dsRNA)引发的转录后基因沉默现象,由 dsRNA 产生的小分子 siRNA 会导致生物体内同源转录产物特异性降解,是基因表达调控的重要方式之一。目前 RNAi 技术已发展成为遗传分析强有力的工具,在基因功能分析鉴定方面发挥越来越大的作用。构建大规模的 RNAi 文库进而转变成 RNAi 突变体库是功能基因组学研究的重要手段,因此如何利用简单经济的方法构建特定物种的高效 RNAi 文库就成为关键问题。综述了目前构建 RNAi 文库的不同方法以及每种构建方法的优点和存在的不足,为不同研究目的的 RNAi 文库的构建提供参考。

关键词: RNAi 文库, siRNA, 构建方法, 基因沉默

Progress in Construction of RNAi Library for Generation of siRNAs

LUO Yan-Zhong WANG Lei*

(Biotechnology Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China)

Abstract: RNA interference (RNAi) is a post-transcriptional gene silencing mechanism that is triggered by double-stranded RNA (dsRNA) and results in the degradation of homologous transcripts. RNAi technology has been developed as a powerful tool for genetic screens to analyze gene function in various organisms. Construction of large-scale species-specific RNAi library and further RNAi mutant library is important strategies for functional genomics research. So how to construct RNAi libraries simply and efficiently is becoming a key question in gene function research. In the review, representative strategies for RNAi library construction and their advantages and potential disadvantages were summarized.

Keywords: RNAi library, siRNA, Construction, Gene silencing

RNA干扰(RNA interference, RNAi)在绝大多数真核生物中是一种保守的调控基因表达的机制^[1-5],生物体内长链dsRNA (Double strand RNA, dsRNA)经过类RNaseIII的核酸内切酶Dicer/DCLs加工处理成 21-24 nt siRNA (Small interference RNA, siRNA),随后siRNA进入RNA诱导的沉默复合体(RISC),实

现对靶基因的特异性降解,即PTGS (Post-transcriptional gene silencing)^[6]。

目前发卡RNA介导的基因沉默技术已发展成为研究基因表达调控强有力的遗传工具^[7],且因为沉默的高度特异性和高效性,在基因表达调控和功能分析鉴定中已得到广泛应用^[8-13]。然而RNAi

表达载体的构建是一个相对比较繁琐的过程,传统的构建方法是采用两步法,首先连接一段顺义的DNA片段,然后再连接一段反义的DNA片段,形成一个反向重复结构(IR),转录后就形成发卡RNA,这种方法对于构建少量的RNAi载体是可行的,对于构建一个大规模的RNAi文库而言,要耗费大量的人力物力,因此如何高效而简便的构建RNAi文库是人们一直在探索和研究的一个重要问题,也是RNAi技术在大规模的功能基因组研究和应用中的一个关键问题。本文综述迄今为止人们相继发展起来的主要的几种构建RNAi文库的方法,并对其优缺点做了简要评述。

1 针对每个基因进行单独构建,最后形成RNAi文库

利用PCR的方法扩增目的基因,两端引物引入不同的限制性内切酶位点,以基因组DNA为模板,分别扩增每个编码基因片段,利用引物两端的酶切位点酶切后进行连接,这样每个PCR产物片段就以“头对头”形式形成了反向重复(Inverted repeat, IR)序列结构,再把这一IR结构分别克隆到含有特定启动子的表达载体中(图1)。Dietzl等^[14]利用该方法,以二元GAL4/UAS表达系统成功构建了果蝇含有IR结构的15072个克隆,IR片段平均长度为323 bp,覆盖13327个编码基因(占总编码基因的97%),最终获得了22270个果蝇转基因系,覆盖整个基因组蛋白编码基因的88%。Kamath RS等也用类似方法(每个基因单独操作)构建了线虫RNAi文库,所不同的是后者将线虫基因组DNA片段克隆入两端均含有启动子的原核载体上,这样在大肠杆菌中转录形成dsRNA,通过大肠杆菌饲喂线虫来实现RNAi,覆盖了线虫86%的基因^[15]。利用Gateway系统构建也是基于单个基因操作,最后形成文库^[13]。

逐个基因操作方法构建RNAi文库的最大优点是整个库内每个基因的丰度比较均一,由于是单独操作每个基因,所以库容量理论上可达到最大值。同时也因为是逐一构建,所以耗时,耗力,耗财。由于构建的IR结构两端含有相同的酶切位点,这样对克隆入表达载体的技术有较高的要求。通常认为利用该方法够建的载体转录形成的dsRNA因不含有内含子从而使沉默效率较低^[16],且只适用于已经测序的生物。

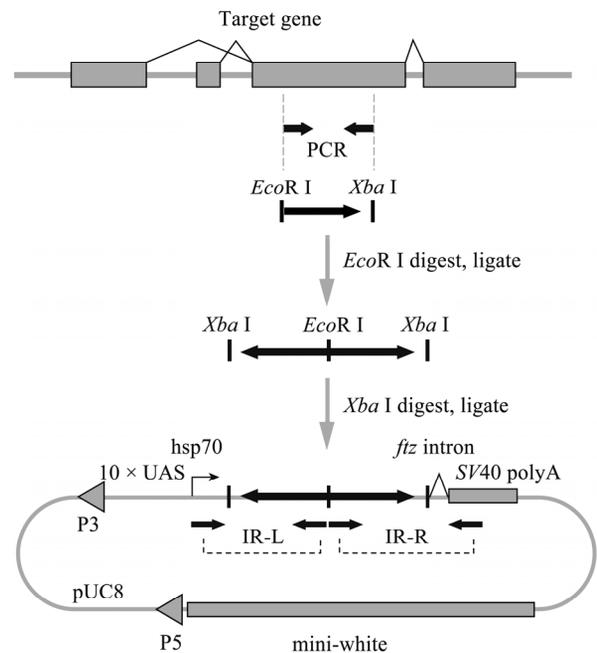


图1 构建UAS-IR的策略^[14]

Fig. 1 Strategy used to generate UAS-IR constructs^[14]

2 通过酶学工程方法构建RNAi文库

Luo等利用DNA酶学工程方法(Small interfering RNA production by enzymatic engineering of DNA, SPEED)构建了小鼠胚胎siRNA文库^[17]。该方法是基于内切酶Mme I [TCCRAC(N)20]能够在距离识别位点20 bp处切割双链DNA,从而形成含有20 bp的短发卡结构DNA,该结构可以在体内转录为短的发卡RNA(Short hairpin RNA, shRNA)。该方法首先将目的DNA片段用识别4碱基的内切酶(Aci I, Hpa I, Hpy CH4IV, Hin P I, Taq I)进行消化,产生出粘性末端相同但长度不等的DNA片段,然后与人工合成的43 nt具有小发卡结构的寡核苷酸片段相连,连接产物经Mme I酶切并回收形成单链形态的发卡DNA(Hairpin DNA, hpDNA),然后与人工合成的寡核苷酸片段连接,随后在Bst DNA聚合酶作用下,通过引物延伸和链置换使单链hpDNA转变为具有反向重复结构的dsDNA,通过合适的酶切位点消化后将它们克隆到表达载体上(图2)。利用该方法建立的shRNA文库含有 3.0×10^6 个克隆,从中随机抽取克隆转化细胞, Northern杂交表明产生-21 nt的siRNA。类似的方法还有Sen G^[18]等利用REGS(Restriction enzyme-generated siRNA)法,该方法用

Phi29 DNA 聚合酶替代 Bst DNA 聚合酶对小发卡 DNA 进行扩增。Du Cheng 等^[19]、Xu Lei 等^[20]以 PCR 为基础构建 siRNA 表达文库, 该方法用 *Taq* 酶代替上述的 Bst DNA 聚合酶, 以 PCR 的方式形成具有反向重复结构的 dsDNA, 而不是利用引物延伸来形成双链 DNA。

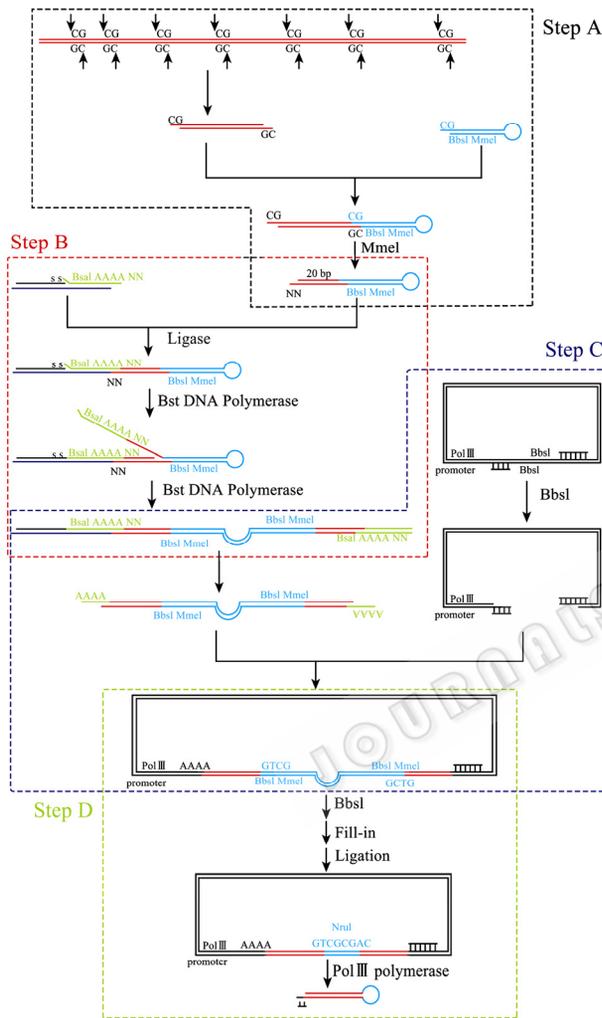


图2 SPEED 法构建 siRNA 文库的策略^[17]

Fig. 2 Schematic outline of SPEED for construction of a siRNA library^[17]

Note: Step A: Hairpin linker attachment; Step B: Conversion of extended hairpins into palindromic dsDNAs; Step C: Cloning into the retrovirus expression vector; Step D: Creation of a hairpin loop.

SPEED和REGS方法的主要优点是简单高效, 由于避免了逐一合成引物, 所以节省大量财力, 而且是所有基因混合在一起进行操作, 也节省了人力。由于该方法是基于 *Mme I* 的酶切反应来构建, 所以就限制了 dsRNA 的形成长度, 从而使沉默效率降

低, 尽管最初认为 > 30 bp 的 dsRNA 进入哺乳动物细胞会因干扰反应而引起非特异性基因沉默^[21], 但对于其他的整个生物体来说未必如此, 这样就限制了该方法在其他生物中实用范围。又由于利用这个方法构建 siRNA 文库需要先人工合成 Hairpin linker, 该 Linker 末端是 GC, 并且目的 DNA 片段所产生的粘性末端也为 GC, 结果势必造成 2 个 Linker 和 cDNA 片段相互连接在一起, 在后续的文库构建中会有部分人工合成的 Linker 片段的克隆。在以 PCR 方式扩增形成反向重复的 dsDNA 时, 由于不同的 DNA 片段连接的是相同的接头, 即不同的 DNA 片段间可部分互补, 在 PCR 时其中一种 DNA 的 PCR 的产物在下一个循环有可能成为另一种 DNA 的引物, 从而导致非 IR 结构的 DNA 片段的产生。另外, 由于受到起始 DNA 文库内不同基因丰度及酶切位点不同的影响, 也会导致文库中基因丰度差异较大。

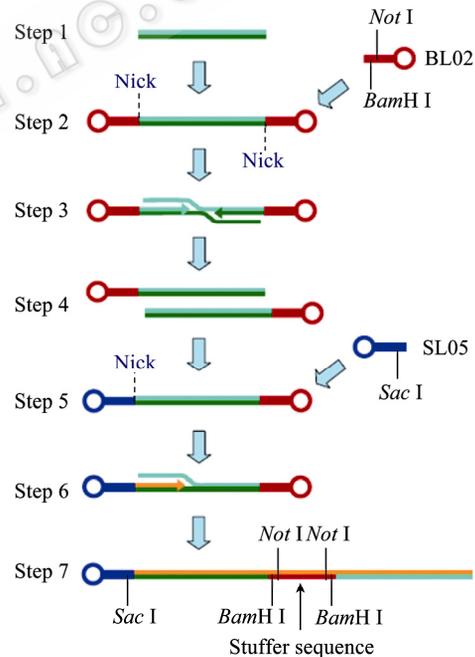


图3 切口平移形成 IR 结构^[22]

Fig. 3 Nick translation used to construct inverted repeat sequence^[22]

Note: Step 1: The 5'-phosphate was removed from arbitrary blunt DNA; Step 2: DNA fragments were ligated with hairpin-type linker whose 5'-end had previously been phosphorylated; Step 3: DNA was extended by the reaction of the Klenow fragment; Step 4: 1 molecule of dumbbell-type DNA was converted to 2 molecules of hairpin-type DNA; Step 5: This hairpin-type DNA was ligated with another hairpin-type linker; Step 6: DNA strand extension from nick; Step 7: hairpin-type DNA fragments containing inverted repeat sequences was obtained.

依靠酶学工程构建 RNAi 文库的另一类方法是摆脱 *Mme I* 等内切酶的限制, 插入的目的 DNA 可以是任意长度的片段。该法是利用任意长度的 5' 末端脱磷酸化的 DNA 与人工合成的发卡 DNA linker 相连, 依靠切口平移的方法使单链 hpDNA 转变为具有 IR 结构的 dsDNA^[22](图 3)。利用这种方法够建的 RNAi 文库摆脱了 DNA 长度的限制, 但由于在操作的过程中要经过 2 次 Linker 的连接和 DNA 的合成, 操作过程比较繁琐, 同时 Linker 本身退火行为也比较复杂, 除自身退火外, Linker 分子间也可以退火, 这样连接在 Linker 两端的 DNA 就有可能不同。因为不同的 DNA 分子连接相同的 Linker 这样的共有序列, 在进行两次切口平移的过程中, 不同的 DNA 分子间可能会有交错延伸, 会造成 linker 两端的 DNA 分子不同, 如果在构建的 RNAi 文库中未插入的空载体或插入的片段不具有 IR 结构过多将严重影响该库的应用。

3 以重组酶为基础构建 RNAi 文库

Nichols 等以重组酶为基础构建了能产生随机 siRNA 的 RNAi 文库^[23](图 4)。该法利用载体上含有 FLP 重组酶基因和它特异识别的两个方向相反的重组位点 FRT (GAAGTTCCTATTCTctagaaaGTATAGGAACTTC), 这样的质粒在细胞内扩增时在体内重组酶的作用下, 各拷贝间会发生重组从而形成 hpDNA。这种方法的优点是利用重组酶, 避免了接头连接和后续的引物延伸及扩增程序, 构建程序简单, 财力支出较少, 特别适合那些对非编码 RNA 功能筛选的随机 RNAi 文库的构建。因为起始 DNA 是随机合成的寡核苷酸片段经退火而成, 所以限制了 siRNA 沉默对象的范围。由于在最后形成 IR 时是通过限制性酶切后自连形成, 这样构建的载体转录形成的 dsRNA 没有内含子环, 对沉默效率可能会有一定影响。在经 *Pst I* 消化后进行自连形成环状 DNA 的时候, 由于不同的 DNA 分子含有相同的粘性末端, 这样不仅有相同插入片段 DNA 分子自连(图 4F), 而且也会在具有不同插入片段的 DNA 分子之间相互连接, 连接产物再利用 *Bgl II* 处理时, 势必因连接在一起的两个插入片段不同而产生不能形成 dsRNA 的克隆(图 4G), 从而限制该构建方法的利用。

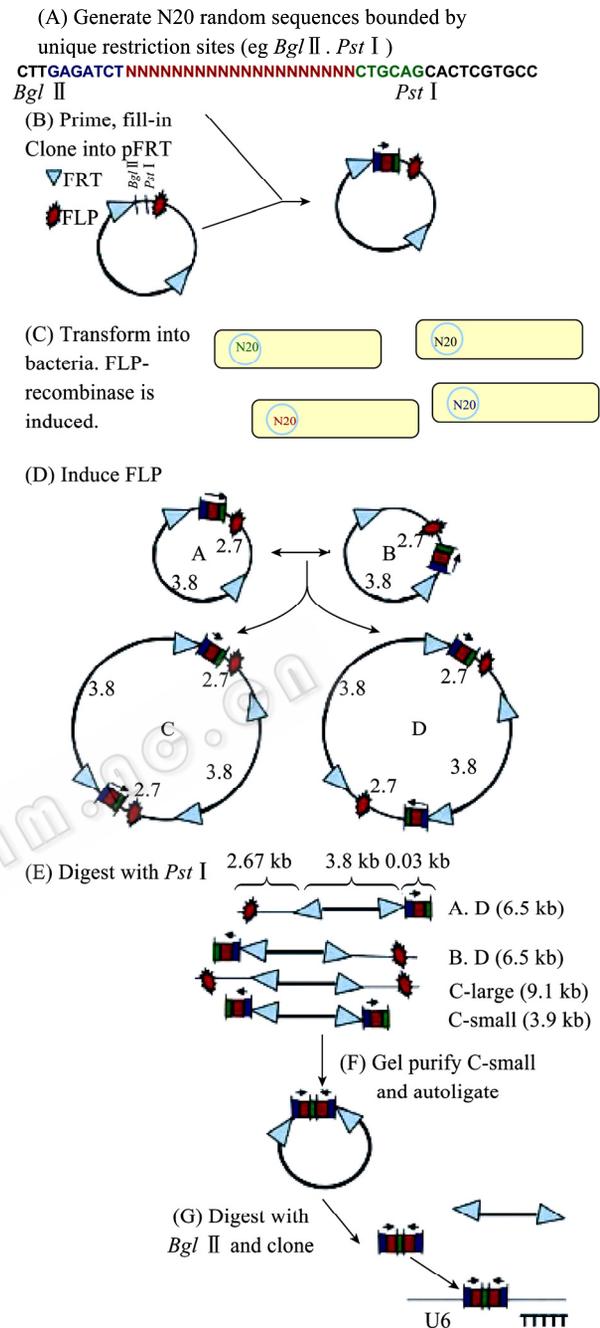


图 4 重组酶为基础的 RNAi 文库的构建^[23]

Fig. 4 Recombinase-based Strategy for generation of hairpin library^[23]

Note: A: DNA bounded by *Bgl II* and *Pst I* restriction sites (Blue and green, respectively); B: Fragment shown in (A) was filled in and cloned so that it was situated between two recognition sequences (FRTs, blue triangles) for the FLP recombinase (Orange starburst); C: Transformation distributes plasmids singly among bacteria on average and FLP recombinase is induced; D: Intra-plasmid recombination by FLP flips the FRT bounded-sequence; E, F: *Pst I* restriction digestion of pooled plasmids yields linear monomeric plasmid and isolation of the intermediate is followed by autoligation; G: Restriction digestion with *Bgl II* and cloning to yield randomized short hairpins in an expression plasmid.

4 以滚环扩增介导的(Rolling circle amplification, RCA)RNAi 文库的构建

本实验室以滚环复制为基础建立了 RMHR 系统(RCA-mediated Hairpin RNA)^[24], 该方法首先将目的 DNA 片段用 *Bsa* I 酶切[GGTCTC(N) 1/(N) 5], 产生出具有非对称粘性末端的 DNA 片段, 然后将该片段与人工合成的短发卡 DNA 连接, 形成一个单链环状 DNA, 由于该方法中目的 DNA 片段两端的粘性末端为非对称, 避免了片段间的自连。其次采用滚环复制的方法(Phi29 DNA 聚合酶)对目的基因进行扩增, 一方面可以产生具有反向重复结构的

dsDNA, 另一方面对目的基因也进行了扩增, 获得大量的 DNA, 便于 RNAi 文库的构建。最后对扩增产物进行酶切消化, 将具有 IR 结构的 DNA 直接克隆到基因表达载体上, 转录后的 RNA 可折叠形成发卡 RNA, 诱发基因沉默(图 5)。该方法特别适合于形成长链 hpRNA 文库的构建, 操作简单, 避免了大量合成寡核苷酸片段, 进而减少了人力物力的支出。结合适当的酶切位点, 以此方法形成的 hpRNA 可任意长短。由于该法也涉及接头连接和 Phi29 聚合酶扩增的步骤, 可能对库内不同基因的丰度有一定的影响。

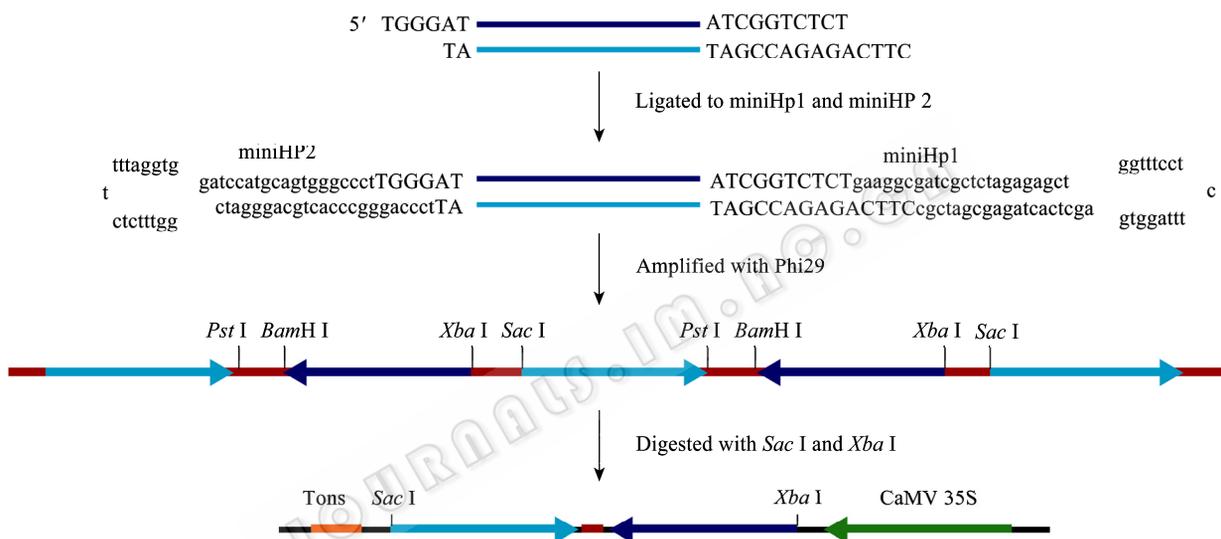


图 5 RCA 介导 RNAi 文库的构建方法^[24]

Fig. 5 Rolling circle amplification-mediated hairpin RNA library construction^[24]

5 利用转移性 RNAi (Transitive RNAi, tRNAi)原理构建 RNAi 文库

表达 siRNAs 除了通过构建形成 hpRNA 文库的方法外, 也可利用 tRNAi 形成的原理来构建。该法是利用生物体内 RNA 指导的 RNA 聚合酶(RNA directed RNA polymerase, RDRP), 尤其是 RDRP6 能识别体内的冗余或异常的 RNA, 并从转录产物的 3'-UTR 或其他位置合成互补的 RNA, 形成 dsRNA 从而发挥 RNAi 作用^[25]。Katherine A Petsch 等利用该原理构建了拟南芥叶肉细胞 RNAi 文库^[26](图 6), 约 15% 的转基因植物有可见的与光合作用缺陷相关的表型。利用这种方法构建 RNAi 文库的优点是不用通过繁杂的程序来形成 IR 结构, 操作简单, 可从

任意长度的 DNA 出发, 同一种出发 DNA 经过适当操作既可构建成 sense RNAi 文库, 也可形成 antisense RNAi 文库。tRNAi 沉默效率接近 IR-RNAi^[27], 适合特定细胞或组织尤其是对特殊生理条件或环境状态作出反应的细胞或组织 RNAi 文库的构建。由于对光合作用、顶端分生组织的变化、特殊生理或环境的反应等具有针对性, 从而起到正向突变的作用。由于这种方法依赖于体内细胞的 RDRP 活性, 如果细胞中 RDRP 活性较低或没有活性则发挥不了 RNAi 的作用, 此外对于没有 RDRP 基因的动物细胞而言也不能发挥作用。

依据不同的研究目的, 选择不同的方法构建特定物种的 RNAi 文库, 利用 RNAi 文库遗传转化特定的生物, 获得该种生物的 RNAi 突变体库。对于多基

因混合的RNAi突变体库,依据研究目的不同,通过生理生化、表型等筛选条件获得突变体,根据hpRNA表达载体插入DNA片段两端的已知序列,利用PCR或分子杂交等方法即可确定插入基因和靶标基因,进而进行基因功能分析。利用全基因组范围的RNAi文库,不仅在线虫、果蝇等模式生物中已经实现,而且也应用于人的细胞研究中,Westbrook、Kofschoten等分别利用人的RNAi文库进行全基因组范围的筛选,成功发现了两个新的癌细胞抑制基因REST和PITX1,REST是转录抑制因子,特异地抑制神经元基因的表达,PITX1是转录因子,促进Ras负调控因子基因的表达^[28-29]。本实验室利用RCA的方法构建的拟南芥RNAi文库转化拟南芥,获得了一定数量有表型的植物突变体,序列分析表明部分还是拟南芥功能未知的基因,而这些突变体单一的T-DNA插入突变是没有表型的,目前这些基因的功能分析正在进行中。

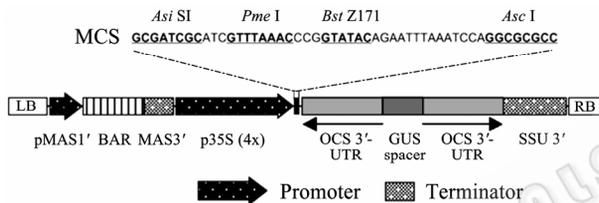


图6 构建tRNAi的载体^[26]

Fig. 6 Expression vector used to generate transitive RNAi^[26]

随着越来越多的生物基因组序列测定工作的相继完成,基因组学的研究由以大规模测序为代表的结构基因组学研究正在向以功能鉴定为主的功能基因组学研究转移,而在功能基因组的大规模挖掘和鉴定研究中,最重要和最直接的研究手段就是创造各种突变体库。目前应用EMS诱变、AC-DS转座子系统、T-DNA插入突变和基因敲除等方法创建的突变体库对基因家族或多拷贝基因同时突变,致死基因的突变体等的获得无能为力,且上述突变多发生在基因间区或内含子区,使有效突变降低,而利用RNAi突变体库就可以克服上述突变体库的缺点,是目前功能基因组研究的新手段。随着对RNAi沉默机制的深入研究必将会产生新的、更加简单高效、经济适用的RNAi文库的构建方法和策略,它将在基因功能分析、动物品种改良、作物品质的遗传改良、药物靶标的筛选和植物抗病抗逆等研究方面发

挥更大的作用。

参考文献

- [1] Cogoni C, Macino G. Gene silencing in *Neurospora crassa* requires a protein homologous to RNA-dependent RNA polymerase. *Nature*, 1999, **399**(6732): 166-169.
- [2] Waterhouse PM, Graham MW, Wang MB. Virus resistance and gene silencing in plants can be induced by simultaneous expression of sense and antisense RNA. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, **95**(23): 13959-13964.
- [3] Lohmann JU, Endl I, Bosch TC. Silencing of developmental genes in *Hydra*. *Dev Biol*, 1999, **214**(1): 211-214.
- [4] Wianny F, Zernicka-Goetz M. Specific interference with gene function by double-stranded RNA in early mouse development. *Nat Cell Biol*, 2000, **2**(2): 70-75.
- [5] Cogoni C, Irelan JT, Schumacher M, et al. Transgene silencing of the al-1 gene in vegetative cells of *Neurospora* is mediated by a cytoplasmic effector and does not depend on DNA-DNA interactions or DNA methylation. *EMBO J*, 1996, **15**(12): 3153-3163.
- [6] Elbashir SM, Lendeckel W, Tuschl T. RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev*, 2001, **15**(2): 188-200.
- [7] Hilson P, Allemeersch J, Altmann T, et al. Versatile gene-specific sequence tags for arabidopsis functional genomics: transcript profiling and reverse genetics applications. *Genome Research*, 2004, **14**(10b): 2176-2189.
- [8] Gonczy P, Echeverri C, Oegema K, et al. Functional genomic analysis of cell division in *C. elegans* using RNAi of genes on chromosome III. *Nature*, 2000, **408**(6810): 331-336.
- [9] Chuang CF, Meyerowitz EM. Specific and heritable genetic interference by double-stranded RNA in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, **97**(9): 4985-4990.
- [10] Zhang J, Gao W, Yang H, et al. Screening for genes essential for mouse embryonic stem cell self-renewal using a subtractive RNA interference library. *Stem Cells*, 2006, **24**(12): 2661-2668.
- [11] Ito M, Kawano K, Miyagishi M, et al. Genome-wide application of RNAi to the discovery of potential drug targets. *FEBS Lett*, 2005, **579**(26): 5988-5995.
- [12] Snyder LL, Esser JM, Pachuk CJ, et al. Vector design for liver-specific expression of multiple interfering RNAs that target hepatitis B virus transcripts. *Antiviral Res*, 2008, **80**(1): 36-44.
- [13] Wesley SV, Helliwell CA, Smith NA, et al. Construct design for efficient, effective and high-throughput gene silencing in plants. *The Plant Journal*, 2001, **27**(6): 581-590.
- [14] Dietzl G, Chen D, Schnorrer F, et al. A genome-wide transgenic RNAi library for conditional gene inactivation in *Drosophila*. *Nature*, 2007, **448**(7150): 151-156.

- [15] Kamath RS, Ahringer J. Genome-wide RNAi screening in *Caenorhabditis elegans*. *Methods*, 2003, **30**(4): 313–321.
- [16] Smith NA, Singh SP, Wang M, *et al.* Gene expression: total silencing by intron-spliced hairpin RNAs. *Nature*, 2000, **407**(6802): 319–320.
- [17] Luo B, Heard AD, Lodish HF. Small interfering RNA production by enzymatic engineering of DNA (SPEED). *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, **101**(15): 5494–5499.
- [18] Sen G, Wehrman TS, Myers JW, *et al.* Restriction enzyme-generated siRNA (REGS) vectors and libraries. *Nat Genet*, 2004, **36**(2): 183–189.
- [19] Du C, Ge B, Liu Z, *et al.* PCR-based generation of shRNA libraries from cDNAs. *BMC Biotechnology*, 2006, **6**(1): 28.
- [20] Xu L, Li J, Liu L, *et al.* Construction of equalized short hairpin RNA library from human brain cDNA. *Journal of Biotechnology*, 2007, **128**(3): 477–485.
- [21] Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, *et al.* Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature*, 2001, **411**(6836): 494–498.
- [22] Fukano H, Hayatsu N, Goto R, *et al.* A technique to enzymatically construct libraries which express short hairpin RNA of arbitrary stem length. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, **347**(3): 543–550.
- [23] Nichols M, Steinman RA. A recombinase-based palindrome generator capable of producing randomized shRNA libraries. *J Biotechnol*, 2009, **143**(2): 79–84.
- [24] Wang L, Luo YZ, Zhang L, *et al.* Rolling circle amplification-mediated hairpin RNA (RMHR) library construction in plants. *Nucleic Acids Res*, 2008, **36**(22): e149.
- [25] Lipardi C, Wei Q, Paterson BM. RNAi as random degradative PCR: siRNA primers convert mRNA into dsRNAs that are degraded to generate new siRNAs. *Cell*, 2001, **107**(3): 297–307.
- [26] Petsch KA, Ma C, Scanlon MJ, *et al.* Targeted forward mutagenesis by transitive RNAi. *The Plant Journal*, 2010, **61**(5): 873–882.
- [27] Brummell DA, Balint-Kurti PJ, Harpster MH, *et al.* Inverted repeat of a heterologous 3'-untranslated region for high-efficiency, high-throughput gene silencing. *The Plant Journal*, 2003, **33**(4): 793–800.
- [28] Westbrook TF, Martin ES, Schlabach MR, *et al.* A genetic screen for candidate tumor suppressors identifies REST. *Cell*, 2005, **121**(6): 837–848.
- [29] Kolfshoten IGM, van Leeuwen B, Berns K, *et al.* A genetic screen identifies PITX1 as a suppressor of RAS activity and tumorigenicity. *Cell*, 2005, **121**(6): 849–858.

征订启事

欢迎订阅《微生物学通报》

《微生物学通报》创刊于1974年，是中国微生物学会和中国科学院微生物研究所主办，国内外公开发行的，以微生物学应用基础研究及技术创新与应用为主的综合性学术期刊。刊登内容包括：基础微生物学研究；农业微生物学研究；工业微生物学研究；医学微生物学研究；食品微生物学研究；环境微生物学研究；微生物功能基因组研究；微生物蛋白组学研究；微生物模式菌株研究；微生物工程与药物研究；微生物技术成果产业化及微生物教学研究改革等。

本刊为中国生物科学类核心期刊。曾获国家级优秀科技期刊三等奖，中国科学院优秀科技期刊三等奖，北京优秀科技期刊奖，2000年再获中国科学院优秀期刊三等奖，2001年被选入新闻出版署设立的“中国期刊方阵”并被列为“双效”期刊。

自2008年本刊已经全新改版，由双月刊改为月刊，更换了彩色封面，纸张改用铜版纸，由原来的小16开本改为标准16开本，发表周期缩短，内容更加丰富详实。欢迎广大读者到邮局订阅或直接与本刊编辑部联系购买，2011年的每册定价为48元，全年576元，我们将按期免费邮寄。

另，本刊编辑部现存有少量过期期刊，如有需要者可直接与编辑部联系，款到即免费寄上。(请事先与编辑部联系，获悉每册售价。敬请在汇款单上注明所购刊物的年代、卷、期和数量)

邮购地址: (100101)北京朝阳区北辰西路1号院3号中国科学院微生物研究所《微生物学通报》编辑部

Tel: 010-64807511; E-mail: tongbao@im.ac.cn, bjb@im.ac.cn; 网址: <http://journals.im.ac.cn>

国内邮发代号: 2-817; 国外发行代号: BM413