

旱地小麦根际细菌中产生1-氨基环丙烷-1-羧酸 (ACC)脱氨酶菌株的分离和鉴定

魏素娜 蒋帅 黄锡云 韦革宏 刘西平*

(西北农林科技大学生命科学院 陕西 杨凌 712100)

摘要: 采用富集定向筛选法, 从旱地小麦的根际土壤中分离到 2 株产生 1-氨基环丙烷-1-羧酸 (ACC)脱氨酶的菌株 AS 和 CS。经测定菌株 AS 和 CS 的 ACC 脱氨酶的比活力分别为 0.018 6 U/mg 和 0.016 7 U/mg 蛋白。根据培养特征观察和生理生化指标测定结果, 结合 16S rDNA 碱基序列测定和系统发育同源性分析, 确定菌株 AS 和菌株 CS 分别属于霍氏肠杆菌(*Enterobacter hormaechei*) 和变形斑沙雷氏菌(*Serratia proteamaculans*)。

关键词: ACC 脱氨酶, 筛选, 鉴定, 根际细菌, 肠杆菌, 沙雷氏菌

Isolation and identification of wheat rhizosphere bacteria producing 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase from drought soil

WEI Su-Na JIANG Shuai HUANG Xi-Yun WEI Ge-Hong LIU Xi-Ping*

(Northwest A&F University, College of Life Science, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: Two bacteria strains marked AS and CS, producing 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase, were isolated from wheat rhizosphere of drought soil. The activity of ACC deaminase from AS and CS strains was 0.018 6 U/mg and 0.016 7 U/mg protein, respectively. Based on the cultural morphological features as well as physiological and biochemical parameters in combination with 16S rDNA sequence analysis and sequence homology analysis, the strain AS and CS were identified as *Enterobacter hormaechei* and *Serratia proteamaculans*, respectively.

Keywords: ACC deaminase, Screening, Identification, Rhizosphere bacteria, *Enterobacter*, *Serratia*

随着世界人口的快速增长, 人类对粮食的需求量日益增加, 而全球的耕地面积总量却在不断下

降。与此同时, 干旱、盐碱、水涝等环境胁迫导致的作物减产造成了巨大的经济损失, 因而粮食安全

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 30671658); 国家大学生创新性试验计划项目(No. 091071253)

* 通讯作者: ✉ xpliuderen@163.com

收稿日期: 2010-09-27; 接受日期: 2011-01-04

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

问题显得越来越重要。过去的几十年, 人类依靠农药化肥来维持粮食高产, 但也因此带来了水体和土壤污染、土壤板结等诸多棘手的环境问题, 迫使人们不得不另辟新径。因此, 挖掘植物自身的潜力、利用生物措施提高作物在逆境环境下的产量具有重要的理论和现实意义。

当植物遭受干旱胁迫时, 会导致根系乙烯水平明显增加。乙烯及其生物合成的前体 1-氨基环丙烷-1-羧酸(ACC)随蒸腾液流上升到植物地上部分后会加速叶片成熟和衰老, 导致光合能力下降, 从而使作物产量降低^[1]。1978年 Honma 等人从土壤的假单胞菌 *Pseudomonas* sp. 中分离出含有 ACC 脱氨酶的菌株, 随后国外学者对这一类细菌进行了大量的研究。已有的研究表明, 存在于植物根际土壤的产生 ACC 脱氨酶的天然细菌^[2]可以把乙烯合成的前体-ACC 水解成氨和 α -丁酮酸^[3], 并将这 2 种分解产物分别作为 N 源和 C 源^[4]利用掉, 从而降低应激乙烯的含量, 减轻逆境胁迫对植物造成的伤害, 促进植物生长^[2,5-6]。但截至目前, 我国在这一领域的研究工作开展地不多, 特别是在旱地小麦上。本文通过富集定向筛选法从旱地小麦根际土壤中分离筛选出两株产生 ACC 脱氨酶的菌株, 并对其进行了分子生物学鉴定和生理生化特性研究。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 样品来源: 样品采自西北农林科技大学小麦试验中心旱地小麦根际土壤。

1.1.2 主要仪器和试剂: ACC (A-3903)购自美国 Sigma 公司; 菌体 DNA 提取试剂购自北京百泰克生物技术有限公司; 凝胶回收试剂盒及 PCR 试剂均购自 TaKaRa 公司, 其它试剂均为国产分析纯。

PCR 仪(德国 Eppendorf 公司); 凝胶成像仪(美国 Bio-Rad 公司); 超微量紫外分光光度仪(美国 NanoDrop 公司生产的 ND-1000 型)。

1.1.3 培养基: 富集培养基: PAF (*Pseudomonas* agar F)培养基(g/L): 蛋白胨 10, 酪蛋白水解物 10, 无水 $MgSO_4$ 1.5, K_2HPO_4 1.5, 甘油 10 mL, pH 7.2。

筛选培养基: DF 盐培养基^[7](g/L): KH_2PO_4 4.0, Na_2HPO_4 6.0, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2, 葡萄糖 2.0, 葡萄糖酸 2.0, 柠檬酸 2.0, $(NH_4)_2SO_4$ 2.0。微量元素: $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 1 mg, H_3BO_3 10 μg , $MnSO_4 \cdot H_2O$ 11.19 μg , $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 124.6 μg , $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 78.22 μg , MnO_3 10 μg , pH 7.2。

加富培养基(DFa): 把 ACC 溶于超纯水通过 0.2 μm 的膜进行抽滤灭菌, 以终浓度为 3.0 mmol/L 加入到预先灭菌的 DF 盐培养基。

分离纯化培养基: 于 DFa 加富培养基中加入琼脂 15-20 g/L。

TSB 培养基(g/L): 胰蛋白胨 17, 大豆胨 3, NaCl 5, 葡萄糖 2.5, K_2HPO_4 2.5, pH 7.1-7.5。

1.2 方 法

1.2.1 材料处理及 ACC 脱氨酶活性细菌的富集、筛选和分离纯化: 将从旱地采回的新鲜小麦植株根系, 去除大块土, 然后轻轻抖动根系, 以获得小麦根际土壤。取 1 g 小麦根际土加入到含 50 mL 无菌 PAF 培养液中, 然后于 28 $^{\circ}C$ 、200 r/min 水浴振荡培养。24 h 后, 从其中吸取 1 mL 菌悬液重复转接 1 次。从第 2 次菌悬液中吸取 1 mL 加入到含 50 mL 无菌 DF 盐培养液中, 恒温水浴振荡培养 24 h, 然后同样条件下再转接 1 次。吸取 1 mL 上述培养液加至含 50 mL 无菌 DFa 培养液中, 相同条件下培养 24 h。如此转接 3 次后, 梯度稀释 DFa 培养液中菌悬液涂布于分离纯化平板培养基, 28 $^{\circ}C$ 恒温箱中培养, 待长出单菌落后挑取单菌落纯化后保存于 TSB 培养基斜面。

1.2.2 ACC 脱氨酶活性的测定: 供试菌株在 TSB 培养液中过夜培养, 4 $^{\circ}C$ 离心收集, 菌体细胞用 DF 盐培养液(不加硫酸铵)洗涤离心(8 000 $\times g$, 10 min) 3 次, 重新悬浮于 DFa 培养液, 28 $^{\circ}C$ 、200 r/min 振荡培养 24 h, 以诱导产生 ACC 脱氨酶。4 $^{\circ}C$ 离心收集菌体, 用 0.1 mol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 7.6)洗涤离心(8 000 $\times g$, 10 min) 3 次, 重悬浮于 600 μL 0.1 mol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 8.0)中, 加入 30 μL 甲苯并迅速振荡 30 s 以破碎细胞。取 200 μL 含甲苯的细胞提取物, 加入 20 μL 0.5 mol/L ACC 混匀, 同时做不添加 ACC 的空白对照试验, 30 $^{\circ}C$ 培养 15 min。

添加 1 mL 0.56 mol/L HCl, 16 000×g 离心 5 min。取 1 mL 上清液, 加入 800 μL 0.56 mol/L HCl 和 300 μL 2,4-二硝基苯肼, 30 °C 保温 30 min, 加入 2 mL 2 mol/L NaOH, 用紫外分光光度仪在 540 nm 波长下测定吸光度, 以 α-丁酮酸制作标准曲线, 根据提取液中 α-丁酮酸的含量, 计算出单位时间 ACC 脱氨酶催化 ACC 生成 α-丁酮酸的量, 即单位酶活力, 用 μmol/min 表示^[8]。

菌体细胞抽提物中总蛋白含量测定采用 Bradford^[9]比色法, 以牛血清白蛋白为蛋白质(Pr)测定标准样品。然后用单位酶活除以总蛋白浓度即比活力(U/mg)表示 ACC 脱氨酶活性^[10-11]。

1.2.3 菌株的鉴定: (1) 形态结构观察及生理生化特征的测定: 在 LB 培养基平板上观察菌落形态, 采用革兰氏染色方法在光学显微镜下观察菌体形态。

参照东秀珠等人的《常见细菌系统鉴定手册》^[12]和沈萍的《微生物学实验》^[13]所描述的方法对菌株 AS、CS 进行生理生化特征的测定, 如吲哚试验、VP 反应、脲酶试验、精氨酸双水解酶试验、明胶液化、丙二酸利用、甲基红试验等。

(2) 16S rDNA 序列测序与系统发育树的构建: 参考 Terefework 等(2001)的方法提取 AS 及 CS 菌株的总 DNA^[14]。引物合成^[15]: 引物 27f: 5'-AGAG TTTGATCCTGGCTCAG-3'; 引物 1522r: 5'-AAGG AGGTGATCCAGCCGCA-3', 由上海生工生物工程有限公司完成。测序由北京奥科生物技术有限责任公司完成。

采用正向引物 27f: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' (*Escherichia coli* 对应位置为 8-27)和反向引物 1522r: 5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3' (*E. coli* 对应位置为 1541-1522)^[15], 以细菌总 DNA 为模板, PCR 反应条件为: 95 °C 5 min; 94 °C 1 min, 51 °C 1 min, 72 °C 2 min, 36 个循环; 72 °C 10 min。扩增出 16S rDNA 后, 经 1%琼脂糖凝胶电泳分离、DNA 胶回收试剂盒进行胶纯化后, 克隆至 pGEM-T Easy 载体, 转化至 *E. coli* JM109 感受态细胞。采用 Amp (100 g/L)和 IPTG/X-gal 2 种方法进行阳性克隆子筛选, 最后将阳性克隆送至北京奥科生物技术有

限责任公司进行测序。实验操作参照《分子克隆实验指南》第 3 版^[16]。

将所得序列与 GenBank 数据库中序列进行 BLAST 分析比对, 选取同源性较高的菌株与菌株 AS、CS 用 ClustalX 1.8 软件进行多重序列匹配排列分析, 用软件 TREECON (version 1.3b)中的 Tree drawing program 构建系统发育树。

2 结果与分析

2.1 ACC 脱氨酶活性菌株的富集、筛选和分离

利用 PAF 培养基以富集假单胞菌和肠细菌并减少培养基中真菌和放线菌数量, 然后经过筛选培养基、加富培养基和分离纯化培养基, 从旱地小麦根际土壤中获得产生 ACC 脱氨酶的细菌 2 株, 分别命名为 AS、CS。

2.2 菌株 AS 和 CS 的 ACC 脱氨酶活性

通过测定菌体细胞提取液中 ACC 脱氨酶作用后产生的 α-丁酮酸含量, 计算出 AS 和 CS 细胞抽提物中 ACC 脱氨酶单位酶活性分别为 3.87×10^{-3} μmol/min 和 3.14×10^{-3} μmol/min, 测定出每微升 AS 和 CS 的菌体细胞抽提物中酶蛋白含量分别为 1.043 μg 和 0.938 μg。所以, AS 和 CS 的菌体细胞抽提物中 ACC 脱氨酶比活力分别为 0.018 6 U/mg 和 0.016 7 U/mg。

2.3 菌株 AS 和 CS 的鉴定

2.3.1 形态学特征: 菌株 AS 单个菌落呈半玻璃珠状、边缘整齐、表面湿润光滑、黄色不透明、菌苔粘稠(图 1), 革兰氏染色为阴性、菌体为杆状、(0.5-0.6) μm×(1.2-2.4) μm; 菌株 CS 单个菌落白色不透明, 边缘整齐, 表面光滑有弹性, 菌落用接种针容易挑起(图 2), 革兰氏染色为阴性、菌体为杆状、(0.5-0.7) μm×(1.0-2.5) μm。

2.3.2 生理生化测定结果: 菌株 AS 和 CS 的生理生化鉴定结果见表 1。菌株 AS 能很好的利用葡萄糖, 蔗糖、甘露醇、柠檬酸盐和丙二酸盐等, 但不能使明胶液化, 在代谢过程中不能产碱使甲基红变黄, 不具有苯丙氨酸脱氨酶, 无吲哚产生等; 而菌株 CS 可以利用蔗糖、甘露醇、棉籽糖, 使明胶液化但菌



图1 菌株 AS 的菌落图片
Fig. 1 Colony of strain AS



图2 菌株 CS 的菌落图片
Fig. 2 Colony of strain CS

株丙二酸盐反应阴性且不能利用鼠李糖、纤维二糖等。结合 AS 和 CS 菌株的形态特征和生理生化特征综合考察, 根据《常见细菌系统鉴定手册》初步判断菌株 AS 和 CS 分别与霍氏肠杆菌和变形斑沙雷氏菌特征一致。

2.3.3 系统进化树的构建及其分析: 菌株 AS 和 CS 16S rDNA 的 PCR 扩增均得到了一条 1 500 bp 左右大小的条带(图 3), 将测序所得 DNA 碱基序列与 NCBI 数据库 BLAST 比对, 登录号分别为 AJ508302 和 AJ233435。与菌株 AS 同源性较高的菌株均属于肠杆菌属, 与菌株 CS 同源性较高的菌株均属于雷氏沙菌属, 分别选取模式菌株进行系统发育分析, 用 DNAMAN 软件进行多序列比对并构建系统发育树(图 4、图 5)。可以看出, 菌株 AS 与 *Enterobacter hormaechei* (AJ508302) 聚于同一分支中, 其同源性达到 98.25%; 菌株 CS 与 *Serratia proteamaculans* (AJ233435) 聚于同一分支, 其同源性达到 99.60%。

表 1 菌株 AS 和 CS 的主要生理生化特征

Table 1 Physiological and biochemical characteristics of strains

测试项 Test item	AS	CS	测试项 Test item	AS	CS	测试项 Test item	AS	CS
吲哚产生 Indole production	-	-	明胶液化(22 °C) Gelatin liquefaction	-	+	L-阿拉伯糖 L-Arabinose	+	+
甲基红 Methyl red	-	-	丙二酸利用 Malonate utilization	+	-	棉籽糖 Raffinose	-	+
V-P 试验 V-P test	+	+	D-葡萄糖产酸 Acid production on D-glucose	+	+	L-鼠李糖 L-Rhamnose	+	-
柠檬酸盐(西蒙氏) Citrate salt (Simmond)	+	+	D-葡萄糖产气 Gas production on D-glucose	+	+	麦芽糖 Maltose	+	+
H ₂ S (在三糖铁上) H ₂ S (TSI)	-	-	乳糖 Lactose	-	-	D-木糖 D-Xylose	+	+
脲酶 Urease	+	-	蔗糖 Sucrose	+	+	纤维二糖 Cellobiose	+	-
苯丙氨酸脱氨酶 Phenylalanine deaminase	-	-	D-甘露醇 D-Mannitol	+	+	反硝化 Denitrification	+	+
精氨酸双水解酶 Arginine hydrolase	+	-	间-肌醇 Inositol	-	+			
运动性 Mobility	+	+	D-山梨醇 D-Sorbitol	-	+			

注: +: 阳性; -: 阴性.

Note: +: Positive; -: Negative.

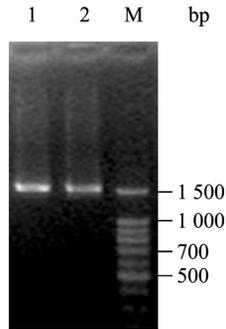


图3 目标菌株 AS 和 CS 的 16S rDNA 电泳图谱

Fig. 3 Map of PCR products of 16S rDNA electrophoresis with 1% agarose gel

注: 1: AS; 2: CS; M: Marker.

Note: 1: AS; 2: CS; M: Marker.

3 讨论

本文采用富集定向筛选法,从旱地小麦的根际土壤中分离到两株产生 ACC 脱氨酶的菌株。其 ACC 脱氨酶活性大小和培养结果表明,这两株菌可以在含 ACC 的培养基上生长,是两株典型的产生 ACC 脱氨酶的、对植物生长可能有促进作用的根际细菌,

可将其归为植物生长促生根际细菌(PGPR)^[17]。

16S rDNA 序列分析的系统发育学和表型特征存在较好的相关性^[18],通过 16S rDNA 序列同源性分析与生理生化试验相结合是一种比较快速准确的方法^[19],越来越广泛的应用于细菌分类。本文采用 16S rDNA 全序列分析并结合其形态特征和生理生化试验综合分析,最后确定 AS 和 CS 这两株菌分别属于霍氏肠杆菌和变形斑沙雷氏菌。

李振高等人发现在小麦各生育阶段,根际细菌主要是革兰氏阴性菌占优势,其中广泛出现的为假单胞杆菌属、肠杆菌科和芽孢杆菌属^[20],这与我们所分离的根际细菌的肠杆菌属一致。而王平等通过测定小麦内根圈中几类微生物群体的数量发现,假单胞菌属并不是优势菌^[21],这与前人的一些报道相距甚远,而与我们所分离的肠杆菌属一致。1988 年尹瑞玲报道我国旱地土壤无机磷细菌有沙雷氏菌属等^[22],但关于沙雷氏菌属的研究很少,因此有待进一步进行促生机制的研究。

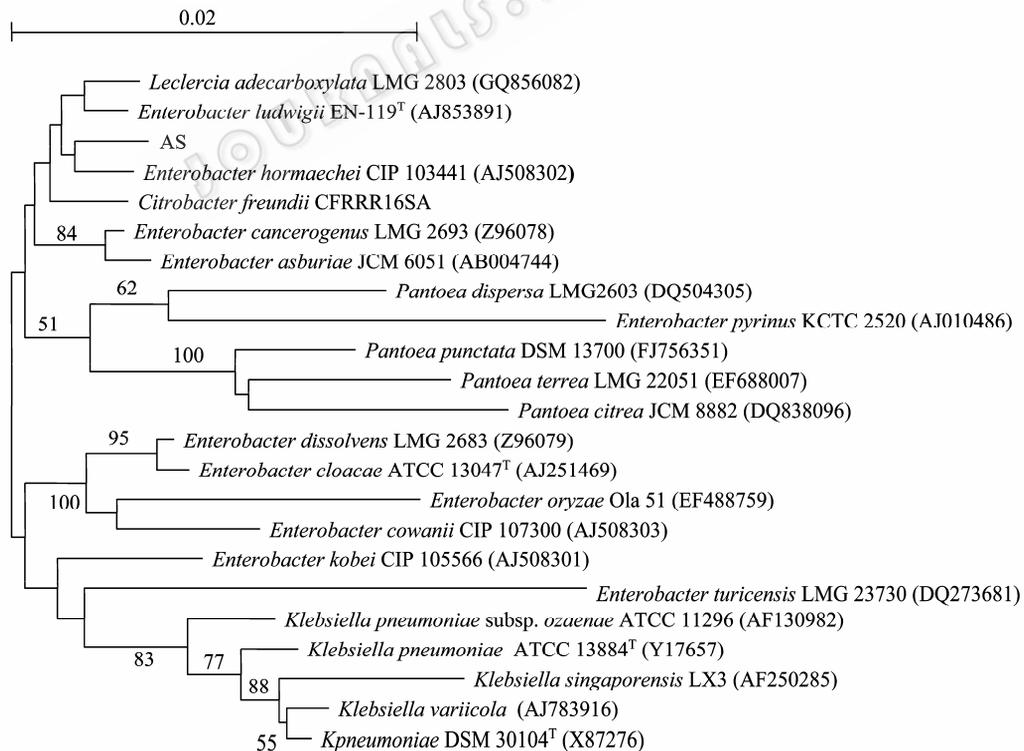


图4 菌株 AS 的 16S rDNA 的序列系统发育树

Fig. 4 The phylogenetic tree based on 16S rDNA sequence of strain AS

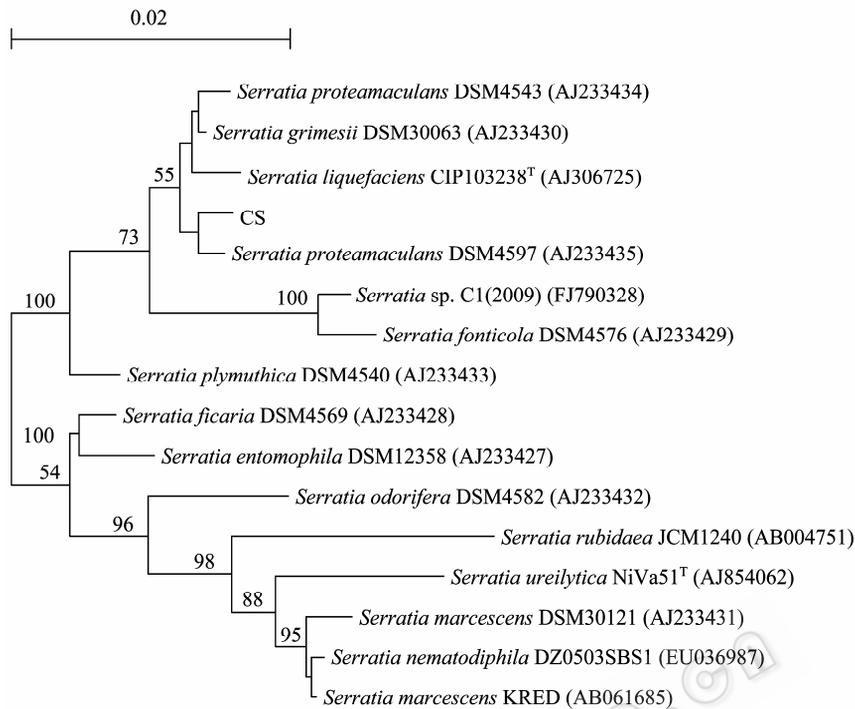


图5 菌株CS的16S rDNA的序列系统发育树
Fig. 5 The phylogenetic tree based on 16S rDNA sequence of strain CS

在干旱条件下接种产生 ACC 脱氨酶细菌的结果显示, 用 *Acbrombacter piecbaudii* ARV8 接种胡椒幼苗和番茄幼苗降低了干旱胁迫诱导的乙烯的产生, 并且当水供给恢复时提高了植物的恢复力^[23]。本研究选择从旱地小麦根际土壤筛选产生 ACC 脱氨酶活性的菌株, 这样筛选的菌株活性高, 接种后可能具有较强的定殖能力。至于把这 2 株菌回接到干旱胁迫的小麦根际后, 对小麦生长产生的作用有待进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Dodd IC. Root-to-shoot signalling: assessing the roles of 'up' in the up and down world of long-distance signalling in planta[J]. Plant and Soil, 2005, 274(1/2): 251-270.
- [2] Glick BR, Todorovic B, Czarny J, et al. Promotion of plant growth by bacterial ACC deaminase[J]. Critical Reviews in Plant Science, 2007, 26(5/6): 227-242.
- [3] Glick BR, Jacobson CB, Schwarze MMK, et al. 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid deaminase mutants of the plant-growth promoting rhizobacterium *Pseudomonas putida* GR 12-2 do not stimulate canola root elongation[J]. Canadian Journal of Microbiology, 1994, 40: 911-915.
- [4] Belimov AA, Hontzeas N, Safronova VI, et al. Cadmium-tolerant plant growth-promoting bacteria associated with the root of Indian mustard (*Brassica juncea* L. Czern.)[J]. Soil Biology and Biochemistry, 2005, 37(2): 241-250.
- [5] Li J, Ovabin DH, Charles TC, et al. An ACC deaminase minus mutant of *Enterobacter cloacae* UW4 no longer promotes root elongation[J]. Curr Microbiol, 2000, 41(2): 101-105.
- [6] Shah S, Li J, Moffatt BA, et al. Isolation and characterization of ACC deaminase genes from two different plant growth-promoting rhizobacteria[J]. Can J Microbiol, 1998, 44(9): 833-843.
- [7] Dworkin M, Foster J. Experiments with some microorganisms which utilize ethane and hydrogen[J]. J Bacteriol, 1958, 75(5): 592-601.
- [8] Glick BR. Modulation of plant ethylene levels by the bacterial enzyme ACC deaminase[J]. FEMS Microbiol Lett, 2005, 251(1): 1-7.
- [9] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. Analytical Biochemistry, 1976, 72: 248-254.
- [10] Honma M, Shimomura T. Metabolism of 1-aminocyclo-

- lopropanoic acid[J]. *Agric Biol Chem*, 1978, 42: 1825-1831.
- [11] Saleh SS, Glick BR. Involvement of *gacs* and *rpos* in enhancement of the plant growth-promoting capabilities *Enterobacter cloacae* CAL2 and UW4[J]. *Can J Microbiol*, 2001, 47(8): 698-705.
- [12] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001: 364-390.
- [13] 沈萍, 范秀容, 李广武, 等. 微生物学实验[M]. 北京: 高等教育出版社, 1999: 116-123.
- [14] Terefework Z, Kaijalainen S, Lindstrom K. AFLP fingerprinting as a tool to study the genetic diversity of *Rhizobium galegae* isolated from *Galega orientalis* and *Galega officinalis*[J]. *J Biotechnol*, 2001, 91(2/3): 169-180.
- [15] Watanabe K, Kodama Y, Harayama S. Design and evaluation of PCR primers to amplify bacterial 16S ribosomal DNA fragments used for community fingerprinting[J]. *Microbiol Methods*, 2001, 44(3): 253-262.
- [16] Sambrook J, Russell DW. 黄培堂, 译. 分子克隆实验指南[M]. 第3版. 北京: 科学出版社, 2002: 145-149.
- [17] Penrose DM, Glick BR. Methods for isolating and characterizing ACC deaminase-containing plant growth-promoting rhizobacteria[J]. *Physiologia Plantarum*, 2003, 118(1): 10-15.
- [18] Vandamme P, Pot B, Gillis M. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics[J]. *Microbiol Rev*, 1996, 60(2): 407-438.
- [19] Weissburg WG, Barns SM, Pelletier DA, et al. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study[J]. *J Bacteriol*, 1991, 173(2): 697-703.
- [20] 李振高, 潘映华, 李良谟. 不同基因型小麦根际细菌及酶活性的动态研究[J]. *土壤*, 1993, 30(1): 1-8.
- [21] 王平, 李卓棣, 胡正嘉. 小麦内根圈中几类微生物体数量比较的研究[J]. *华中农业大学学报*, 1994, 13(4): 318-324.
- [22] 尹瑞玲. 我国旱地土壤的溶磷微生物[J]. *土壤*, 1988, 20(5): 243-246.
- [23] Mayak S, Tirosh T, Glick BR. Plant growth-promoting bacteria that confer resistance to water stress in tomatoes and peppers[J]. *Plant Science*, 2004, 166(2): 525-530.

稿件书写规范

论文中计量单位的表示方法

为执行国务院发布的《关于在我国统一实行法定计量单位的命令》的规定, 计量单位和单位符号按国家技术监督局发布的《量和单位》GB3100-3102-93 执行。单位符号均用英文小写(正体), 不允许随便对单位符号进行修饰。现将本刊常用计量单位和符号介绍如下, 希望作者参照执行。

时间: 日用 d; 小时用 h; 分钟用 min; 秒用 s 等表示。

溶液浓度: 用 mol/L, 不用 M (克分子浓度)和 N (当量浓度)等非许用单位表示。

旋转速度: 用 r/min, 不用 rpm。

蒸汽压力: 用 Pa 或 kPa、MPa 表示。

光密度: 用 OD (斜体)表示。

生物大分子的分子量: 蛋白质用 D 或 kD, 核酸用 bp 或 kb 表示。

图表中数值的物理量和单位: 物理量符号采用斜体, 单位用正体并用括号括起, 例如: t (h) (表示时间, 单位是小时)。带数值的计量单位: 计量单位不能省略, 跟数字之间加一空格(%除外), 例如: 20 cm×0.3 cm, 不能写成 20×0.3 cm; 3 °C-5 °C 不可写成 3-5 °C; 3%-6%不可写成 3-6%等。