

设计乳杆菌特异性引物并运用菌落 PCR 技术快速检出和鉴定四川泡菜中的乳杆菌

潘渠^{1*} 杨维华² 王颖² 余小平¹ 陈恬¹ 陈玮¹

(1. 成都医学院病原生物学教研室 四川 成都 610083)

(2. 成都医学院 2008 级检验本科班 四川 成都 610083)

摘要: 乳杆菌(*Lactobacillus*)是益生菌,也是当前的研究热点之一。研究泡菜等样品中的乳杆菌需要快速的检出方法。根据已完成全基因组测序的 14 种乳杆菌的 16S rDNA 序列,设计一对乳杆菌特异性引物。PCR 检测结果表明该引物对乳杆菌和明串珠菌能扩增出 800 bp 的片段,对表皮葡萄球菌、乳酸乳球菌和枯草芽胞杆菌却没有扩增条带,具有一定的乳杆菌特异性。结合 MRS 乳杆菌半选择培养基和革兰氏染色,运用菌落 PCR 技术,可以快速高效地检出四川泡菜中的乳杆菌。再通过对 PCR 扩增片段测序,可以将乳杆菌鉴定到种。从 16 份四川泡菜样品中检出了 15 株乳杆菌,其中 14 株被鉴定为植物乳杆菌,1 株需进一步鉴定才能确定种。该方法可以检出乳杆菌新种。
关键词: 乳杆菌,四川泡菜,菌落 PCR,鉴定,16S rDNA

Rapid detection and identification *Lactobacillus* from Sichuan pickle by colony PCR using *Lactobacillus*-specific primers

PAN Qu^{1*} YANG Wei-Hua² WANG Ying² YU Xiao-Ping¹ CHEN Tian¹
CHEN Wei¹

(1. Department of Pathogenic Biology, Chengdu Medical College, Chengdu, Sichuan 610083, China)

(2. Laboratory Medicine Class of Grade 2008, Chengdu Medical College, Chengdu, Sichuan 610083, China)

Abstract: *Lactobacillus* is used as probiotics and there has been much interest. The detection and identification of *Lactobacillus* from pickle need a rapid method. We designed a pair *Lactobacillus*-specific primer by analyzing 16S rDNA of 14 *Lactobacillus* species whose complete genomes had been sequenced. The results of colony PCR showed that an 800 bp band was generated when *Lactobacillus* and *Leuconostoc* strains used as template but no band appeared when *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus subtilis*, or *Lactococcus lactis* used as template. *Lactobacillus* of Sichuan pickle was rapidly detected by a procedure including selection of MRS culture, Gram stain and colony PCR. By sequencing the 800 bp

fragment, the detected strain was identified at the species level. 15 *Lactobacillus* strains were detected from 16 samples of Sichuan pickle. 14 *Lactobacillus* strains were identified as *L. plantarum* and a *Lactobacillus* strain need more identification. The method would detect new *Lactobacillus* species.

Keywords: *Lactobacillus*, Sichuan pickle, Colony PCR, Identification, 16S rDNA

乳杆菌属 (*Lactobacillus*) 是一类公认安全 (Generally regarded-as-safe, GRAS) 的微生物, 具有改善肠道环境、增强宿主免疫力等功能, 是对人体有益的益生菌 (Probiotics)。目前, 乳杆菌不仅在食品和饲料工业上被广泛应用, 而且通过基因工程, 正在被开发为疫苗投送载体、微生态纠正剂、全酶制剂等^[1-2], 是当前的研究热点之一。在四川泡菜、奶酪、腊肠、青贮饲料、韩国泡菜等传统发酵食品中都存在大量的乳杆菌。四川泡菜与韩国泡菜、日本泡菜齐名, 是世界公认的健康发酵蔬菜制品。为了改善泡菜风味, 收集微生物资源, 从四川泡菜中已经分离到了植物乳杆菌 (*L. plantarum*)、短乳杆菌 (*L. brevis*)、干酪乳杆菌 (*L. casei*)、嗜酸乳杆菌 (*L. acidophilus*) 等乳杆菌^[3-7]。四川泡菜种类繁多, 品牌林立, 其中应该还有乳杆菌有待分离和鉴定。

乳杆菌的分离鉴定需要快速的检出方法。2000年, PCR-TGGE 技术被研发^[8]。该技术通过扩增 16S rDNA 序列 V3 可变区的 233 bp 片段, 再将扩增片段用温度梯度电泳技术分析, 可鉴定 6 种乳杆菌。2001 年, 根据当时已测序的 6 种乳杆菌的 16S rDNA 序列, 7 条引物被设计, 通过 6 次 PCR 扩增, 以是否出现 1 kb 产物片段为指标, 可以鉴定 6 种乳杆菌^[9]。2002 年, Dubernet S. 等人设计一对引物, 扩增 16S rDNA 序列 3' 端到 23S rDNA 序列之间的区域, 根据电泳是否出现 250 bp 条带, 可确定 23 种菌是否是乳杆菌, 但不能鉴定到种^[10]。2004 年, 通过设计 6 种目标乳杆菌的 16S 和 23S rDNA 序列引物, 将 PCR 结果结合核糖体基因型数据库 (Ribotype profiles) 进行分析, 可以追踪在使用 2 种益生菌制品后阴道和胃肠道中 6 种乳杆菌菌株的定殖情况^[11]。现在, 已实现全基因组测序的乳杆菌有 14 种。本研究根据这 14 种乳杆菌的 16S rDNA 序列, 设计了一对乳杆菌特异性引物。结合 MRS 乳杆菌半选择培养基和革兰氏染色, 运用菌落 PCR 技术, 可以快速检出

四川泡菜中的乳杆菌, 包括未知的乳杆菌新种。再通过对 PCR 扩增片段测序, 可以将乳杆菌鉴定到种。我们从 16 份四川泡菜样品中检出了 15 株乳杆菌, 其中 14 株鉴定为植物乳杆菌。另一株需进一步鉴定才能确定种。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

从四川省的成都市、自贡市、德阳市、乐山市、眉山地区和资阳地区的居民家中收集自制的泡菜样品共 16 份。短乳杆菌 (*L. brevis* ATCC 367) 和嗜酸乳杆菌 (*L. acidophilus* ATCC 4356) 购自中科院微生物研究所菌种保藏库。植物乳杆菌 (*L. plantarum* CICC 6002)、瑞士乳杆菌 (*L. helveticus* CICC 22826) 和德氏乳杆菌保加利亚亚种 (*L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CICC 6064) 购自中国工业微生物菌种保藏中心。干酪乳杆菌 (*L. casei* ATCC 393) 购自美国菌种保藏中心 (ATCC)。乳酸乳球菌 (*Lactococcus lactics* MG 1363) 由重庆医科大学张德纯教授赠送。表皮葡萄球菌 (*Staphylococcus epidermidis* PC 313)、类肠膜明串珠菌 (*Leuconostoc paramesenteroides* PC 409) 和枯草芽胞杆菌 (*Bacillus subtilis* LM 67) 是本实验室分离鉴定菌株。乳杆菌菌株均用 MRS 培养基^[12] 在 37 °C 培养 24 h, 其它菌株使用肉汤培养基在 37 °C 培养 18 h。PCR 试剂盒 (Ex Taq) 购自大连宝生物公司 (TaKaRa), 胶回收试剂盒购自 Omega 公司 (Bio-Tek USA)。

1.2 泡菜样品中乳杆菌的初步鉴定

将收集的 16 份泡菜样品分别在 MRS 培养基上划线分离, 各挑选 3 个菌落继续划线分离 2 次。MRS 培养基是乳杆菌的半选择培养基, 对乳杆菌有一定的选择作用。将分离到的 48 个菌株进行革兰氏染色并在显微镜下观察 (×1 000)。革兰氏染色阳性、菌体为杆状的菌株初步鉴定为乳杆菌。

1.3 乳杆菌特异性引物的设计

检索 NCBI 的 Genome 数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/genlist.cgi?taxid=2&type=1&name=Bacteria%20Complete%20Chromosomes>), 发现有 14 种乳杆菌已全基因组测序; 并检索到与乳杆菌同属乳杆菌科的片球菌(*Pediococcus*), 与乳杆菌同属乳杆菌目的肠球菌(*Enterococcus*)、乳球菌(*Lactococcus*)和明串珠菌(*Leuconostoc*), 以及与乳杆菌同属芽胞杆菌纲的芽胞杆菌(*Bacillus*)和葡萄球菌(*Staphylococcus*)(表 1)。利用软件 DNASTAR 和多序列比对软件 DNAMAN V6.0 比对分析这些菌株的 16S rRNA 序列, 寻找乳杆菌保守序列。最后利用引物设计软件 Primer Premier 5 设计乳杆菌特异性引物。

表 1 已测序的 14 种乳杆菌和 5 种近缘菌种列表
Table 1 14 Lactobacillus species and 5 relative species whose complete genomes had been sequenced

GenBank 编号 GenBank numbers	菌种名称 Names of species
NC_004567	植物乳杆菌(<i>L. plantarum</i> WCFS1)
NC_005362	约氏乳杆菌(<i>L. johnsonii</i> NCC 533)
NC_006814	嗜酸乳杆菌(<i>L. acidophilus</i> NCFM)
NC_007576	清酒乳杆菌(<i>L. sakei</i> subsp. <i>sakei</i> 23K)
NC_007929	唾液乳杆菌(<i>L. salivarius</i> UCC118)
NC_008054	德氏乳杆菌 (<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> ATCC 11842)
NC_008497	短乳杆菌(<i>L. brevis</i> ATCC 367)
NC_008526	干酪乳杆菌(<i>L. casei</i> ATCC 334)
NC_008530	加氏乳杆菌(<i>L. gasseri</i> ATCC 33323)
NC_009513	罗伊乳杆菌(<i>L. reuteri</i> DSM 20016)
NC_010080	瑞士乳杆菌(<i>L. helveticus</i> DPC 4571)
NC_010610	发酵乳杆菌(<i>L. fermentum</i> IFO 3956)
NC_013199	鼠李糖乳杆菌(<i>L. rhamnosus</i> Lc 705)
NC_014106	卷曲乳杆菌(<i>L. crispatus</i> ST1)
NC_008525	戊糖片球菌 (<i>Pediococcus pentosaceus</i> ATCC 25745)
CP001758	明串珠菌(<i>Leuconostoc kimchii</i> IMSNU 11154)
AE016830	粪肠球菌(<i>Enterococcus faecalis</i> V583)
NC_013656	乳酸乳球菌 (<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> KF147)
HQ423385	枯草芽胞杆菌(<i>Bacillus subtilis</i> strain P79)
AE015929	表皮葡萄球菌 (<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228)

1.4 特异性引物的验证

运用菌落 PCR 技术^[13]进行特异性引物的验证。将在材料中提到的短乳杆菌、嗜酸乳杆菌、植物乳杆菌、干酪乳杆菌、瑞士乳杆菌、德氏乳杆菌、明串珠菌、乳酸乳球菌、枯草芽胞杆菌和表皮葡萄球菌在 MRS 或肉汤固体培养基上划线培养, 然后直接用小枪头从菌落上挑取微量菌体, 加入到 PCR 扩增体系(25 μ L)中, 引物为乳杆菌特异性引物。设置 PCR 循环参数为: 94 $^{\circ}$ C 5 min; 95 $^{\circ}$ C 40 s, 57 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 100 s, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。取 5 μ L 反应液进行琼脂糖凝胶(0.7%, *W/V*)电泳。

1.5 PCR 检出

将初步鉴定为乳杆菌的菌株在 MSR 平板上划线培养过夜。从平板上长出的菌落上挑取微量菌体, 加入到 PCR 扩增体系(25 μ L)中, PCR 引物为乳杆菌特异性引物, 进行菌落 PCR。然后进行琼脂糖凝胶电泳, 扩增出 800 bp 片段者为乳杆菌。

1.6 测序鉴定

将 PCR 体系扩大为 150 μ L, 循环次数缩短为 25 次, 运用菌落 PCR 技术扩增候选菌株的 16S rDNA 序列片段。再使用胶回收技术纯化扩增片段, 然后送大连宝生物公司测序。利用 NCBI 网站的 BLASTn 工具比对测序结果。根据测序结果确定 PCR 阳性菌株是否是乳杆菌并将其鉴定到种。

1.7 生化鉴定

根据乳杆菌属的生化特征^[14], 对 PCR 检出的乳杆菌菌株分别进行下列生化试验: 葡萄糖发酵试验、氧化氢酶试验、明胶液化试验、硫化氢产生试验和吲哚产生试验。

2 结果

2.1 引物的设计与分析

多序列比对结果显示: 14 种乳杆菌 16S rDNA 序列的同源性为 87.99%, 有 10 个大于 25 bp 的保守区。以植物乳杆菌 16S rDNA 序列为参照, 10 个保守区分别位于 369、528、709、807、932、996、1 088、1 225、1 393 和 1 514 处。在这些保守区中设计一对引物, 就可以扩增 14 种乳杆菌的 16S rDNA 片段。如果保守区不同于其它细菌, 则设计的引物就是乳

杆菌特异性引物, 只能扩增乳杆菌的 16S rDNA 片段。将乳杆菌的 16S rDNA 序列和亲缘关系较近的菌属相比对, 发现同属乳杆菌科的片球菌的 16S rDNA 序列和乳杆菌高度相似, 只有 5 个碱基不同, 不可能设计一对引物, 通过 PCR 区别片球菌和乳杆菌。多序列比对发现: 乳杆菌保守区 709 和 1 514 与肠球菌、乳球菌、芽胞杆菌以及葡萄球菌的对应序列有较大区别(图 1)。在 711 处设计上游引物: 5'-GTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAA-3' (29 bp), 在 1 541 处设计下游引物: 5'-GTGATCCAG CCGCAGGTTCTCC-3' (22 bp), 扩增片段长 852 bp。在上游引物的 3'端, 芽胞杆菌和葡萄球菌有 3 个碱基不同于乳杆菌, 肠球菌和乳球菌只有一个碱基不同于乳杆菌。在下游引物的 3'端, 芽胞杆菌、葡萄球菌、肠球菌和乳球菌均有 5 个碱基不同于乳杆菌。理论上, 该引物能区别与乳杆菌同纲的芽胞杆菌和

葡萄球菌, 也能区别与乳杆菌同目的肠球菌和乳球菌, 却不能区别乳杆菌同科的片球菌和同目的明串珠菌。在 852 bp 扩增片段上, 分布多个变异区。通过对扩增片段的测序, 可以区别这 14 种乳杆菌。

2.2 特异性引物的验证

运用设计的乳杆菌特异性引物, 分别以嗜酸乳杆菌、植物乳杆菌、短乳杆菌、干酪乳杆菌、瑞士乳杆菌、德氏乳杆菌、明串珠菌、乳酸乳球菌、枯草芽胞杆菌和表皮葡萄球菌的菌体为模板, 进行菌落 PCR。6 种乳杆菌都扩增出了 800 bp 片段, 而表皮葡萄球菌、乳酸乳球菌和枯草芽胞杆菌均没有扩增产物。明串珠菌和乳杆菌亲缘关系很近, 16S rDNA 序列高度相似, 所以明串珠菌也扩增出了 800 bp 片段(图 2)。结果符合理论预期。该引物对乳杆菌有较强的特异性, 能够用于快速检测泡菜中的乳杆菌。

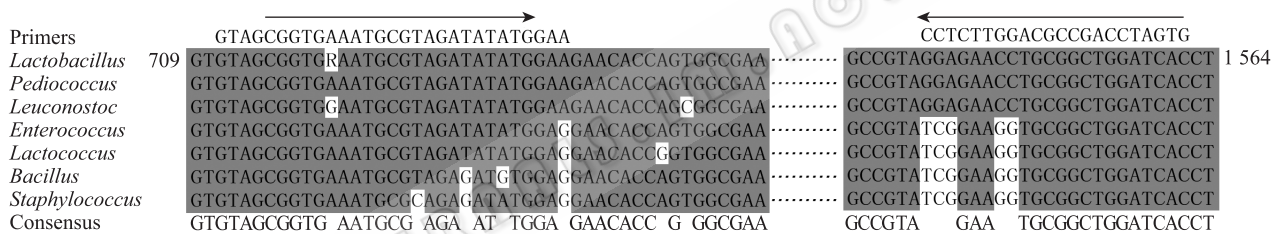


图 1 乳杆菌 16S rDNA 保守区与近缘细菌相应序列的比对图

Fig. 1 The alignment of 16S rDNA conserved regions of *Lactobacillus* and relative bacteria

注: 箭头所示为引物扩增方向, 阴影部分为同源序列, R 表示 A 或 G, *Lactobacillus* 包括 14 种乳杆菌, 709 和 1 564 是该序列在植物乳杆菌 16S rDNA 基因序列上的位置。

Note: The direction of amplification is indicated by horizontal arrows. Bases matching consensus in the conserved regions are shaded. R=A or G. *Lactobacillus* include 14 *Lactobacillus* species. 709 and 1 564 represent locus of 16S rDNA of *L. plantarum*.

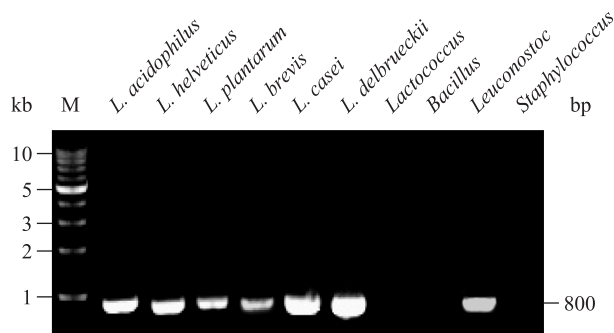


图 2 乳杆菌和近缘细菌 16S rDNA 序列的 PCR 电泳图 (PCR 引物为乳杆菌特异性引物)

Fig. 2 PCR electrophoresis of 16S rDNA of *Lactobacillus* and relative bacteria (Using *Lactobacillus*-specific primers)

Note: M: Marker. The 800 bp band is the objective band.

2.3 泡菜中乳杆菌的 PCR 检出

通过在 MRS 培养基上的划线分离和革兰氏染色鉴定, 从 16 份泡菜样品中得到了 29 株菌株(注: 来自同一样品, 并且形态和染色相同的菌株, 被认为是相同的菌株), 包括 19 株革兰阳性杆菌, 6 株革兰阳性球菌, 4 株革兰阴性杆菌。运用乳杆菌特异性引物对所得菌株进行 PCR 鉴定。菌株 1、3、4、6、7、8、9、12、13、14、21、24、25、26、27、28 和 29 扩增出了 800 bp 片段(图 3), 其中菌株 21 和 24 为革兰阳性球菌, 其余 15 株都为革兰阳性杆菌。扩增出 800 bp 片段的革兰阳性杆菌菌株应该是乳杆

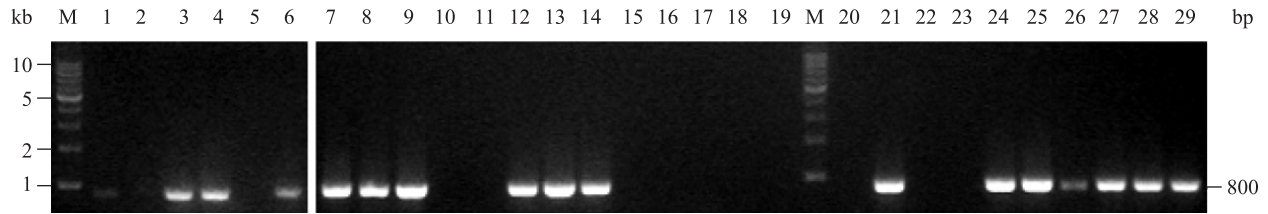


图3 四川泡菜中乳杆菌的PCR鉴定电泳图(PCR引物为乳杆菌特异性引物)

Fig. 3 PCR detection of *Lactobacillus* from Sichuan pickle (using *Lactobacillus*-specific primers)

注: M: Marker; 1-14、25-29: 革兰阳性杆菌菌株; 15-18: 革兰阴性杆菌菌株; 19-24: 革兰阳性球菌菌株. 800 bp 为理论预期条带.

Note: M: Marker. The 800 bp band is the objective band. 1-14, 25-29: Gram-positive bacillus; 15-18: Gram-negative bacillus; 19-24: Gram-positive coccus.

菌。革兰阳性杆菌菌株 2、5、10 和 11 没有扩增出产物, 这个结果显示经过初步筛选的革兰阳性杆菌菌株并不都是乳杆菌。革兰阳性球菌菌株 21 和 24 应该是和乳杆菌 16S rDNA 高度相似的细菌菌株, 如片球菌或明串珠菌。

2.4 16S rDNA 测序鉴定

将扩增出的 800 bp 产物纯化后送公司测序, 比对测序结果发现: 革兰阳性球菌菌株 21 和 24 的 16S rDNA 序列的 800 bp 片段序列都和类肠膜明串珠菌(*Leuconostoc paramesenteroides* strain 1216) 的相应 16S rDNA 序列 100%相似, 可以将革兰阳性球菌菌株 21 和 24 鉴定为类肠膜明串珠菌。12 株革兰阳性杆菌菌株的 800 bp 片段序列是相同的, 并且与多株植物乳杆菌(*L. plantarum* strain WCFS1、H2、FJAT-CF7、LCR21、ST-III 等)的相应 16S rDNA 序列 100%相似, 可以鉴定为植物乳杆菌。革兰阳性杆菌菌株 27 和 29 的 800 bp 片段序列与鉴定为植物乳杆菌的 12 株菌株的 800 bp 片段序列仅有一个碱基的区别, 比对结果显示和植物乳杆菌最相似(99%), 也鉴定为植物乳杆菌。革兰阳性杆菌菌株 9 的 800 bp 片段序列与 GenBank 数据库中所有序列都不相同, 与鼠乳杆菌(*L. murinus* strain Lb、P6 和 LbP)、姬鼠乳杆菌(*L. apodemi*)、动物乳杆菌(*L. animalis*)相似性均为 99%, 仅有 8 个碱基不同, 与全基因组测序的唾液乳杆菌(*L. salivarius* UCC118)的相似性为 97%, 有 28 个碱基不同, 菌株 9 可以确定为乳杆菌, 但是需要进一步鉴定才能明确是哪种乳杆菌。

16S 测序鉴定表明: 扩增出 800 bp 片段的革兰阳性杆菌菌株均为乳杆菌。这表明设计的引物对乳

杆菌特异性较高。结合 MRS 半选择培养基和革兰氏染色初筛, 可以快速检出泡菜中的乳杆菌。

2.5 生化试验验证

测序鉴定为乳杆菌的菌株, 包括菌株 1-14、25-29, 其生化试验结果均符合乳杆菌属的特征, 即: 发酵葡萄糖产酸, 不液化明胶, 不产生氧化氢酶、硫化氢和吲哚。

3 讨论

本研究是要设计一对乳杆菌属特异性引物, 达到通过 PCR 特异性检出所有乳杆菌的目的。不过在具体的设计过程中发现, 不能区别亲缘关系很近的属, 例如副乳杆菌属、片球菌属、明串珠球菌属等; 还有一些菌属没有基因组测序的菌株, 不能对比其 16S rDNA 序列, 还不知道是否能够区别。对比前人设计的引物以及方案, 我们的引物涵盖范围更广, 不仅能检出乳杆菌, 还会检出泡菜中和乳杆菌亲缘关系近的细菌。这说明这对引物可以检出泡菜中所有的乳杆菌, 包括未知的乳杆菌新种。不足之处在于必须借助 MRS 半选择培养基和革兰氏染色进行初步筛选。通过菌体形态和染色筛掉与乳杆菌亲缘关系很近的细菌, 例如形态为球菌的片球菌和明串珠菌。对比 Dubernet S. 等人的研究^[10], 我们的扩增片段更长, 跨越了 16S rDNA 序列的多个变异区。可以通过测定扩增片段序列确定到种。如果检出了新种, 必须进一步鉴定。

本研究从 16 份四川泡菜中检出了 15 株乳杆菌, 其中 14 株为植物乳杆菌, 1 株需要进一步鉴定才能确定种。PCR 检出结果和测序鉴定以及生化鉴定结

果相一致, 证明本文设计的 PCR 快速检出法可行。由于泡菜是植物泡制的, 植物乳杆菌应该是四川泡菜中最为普遍的乳杆菌菌种。四川泡菜是中国的传统发酵食品, 从其中分离的乳杆菌很可能具有较好的益生特性, 有发展为益生菌制剂或疫苗投送载体的前景。

参 考 文 献

- [1] Kajikawa A, Igimi S. Innate and acquired immune responses induced by recombinant *Lactobacillus casei* displaying flagellin-fusion antigen on the cell-surface[J]. *Vaccine*, 2010, 28(19): 3409-3415.
- [2] Young G. Symbiosis: The bacteria diet[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2008, 6(3): 174-175.
- [3] 商军, 钟方旭, 王亚林, 等. 几种发酵蔬菜中乳酸菌的分离与筛选[J]. *食品科学*, 2007, 28(4): 195-199.
- [4] 吴元锋, 邹礼根. 泡菜中乳酸菌的分离、鉴定及其发酵性能研究[J]. *中国食品学报*, 2007, 7(5): 42-46.
- [5] 吴蕊, 田洪涛, 孙纪录, 等. 泡菜中乳酸菌优良菌株的分离鉴定及发酵性能的研究[J]. *食品研究与开发*, 2009, 30(2): 51-54.
- [6] 侯敬轩, 吕嘉彬, 张智维, 等. 泡菜中益生性乳酸菌的筛选和鉴定[J]. *中国酿造*, 2008, 188(11): 22-24.
- [7] 王柱, 张晓娟, 周光艳, 等. 四川地区发酵制泡菜乳酸菌菌种资源的收集与标准化整理[J]. *四川食品与发酵*, 2008, 44(3): 5-8.
- [8] Cocolin L, Manzano M, Cantoni C, et al. Development of a rapid method for the identification of *Lactobacillus* spp. isolated from naturally fermented italian sausages using a polymerase chain reaction-temperature gradient gel electrophoresis[J]. *Letters in Applied Microbiology*, 2000, 30(2): 126-129.
- [9] Chagnaud P, Machinis K, Coutte LA, et al. Rapid PCR-based procedure to identify lactic acid bacteria: application to six common *Lactobacillus* species[J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2001, 44(2): 139-148.
- [10] Dubernet S, Desmasures N, Guéguen M. A PCR-based method for identification of lactobacilli at the genus level[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2002, 214(2): 271-275.
- [11] Massi M, Vitali B, Federici F, et al. Identification method based on PCR combined with automated ribotyping for tracking probiotic *Lactobacillus* strains colonizing the human gut and vagina[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2004, 96(4): 777-786.
- [12] 潘渠, 丛延广, 侯瑞, 等. 嗜酸乳杆菌 3-磷酸甘油醛脱氢酶的分离纯化[J]. *免疫学杂志*, 2009, 25(4): 461-464.
- [13] Sheu DS, Wang YT, Lee CY. Rapid detection of polyhydroxyalkanoate-accumulating bacteria isolated from the environment by colony PCR[J]. *Microbiology*, 2000, 146(8): 2019-2025.
- [14] 布坎南 RE, 吉本斯 NE. 伯杰细菌鉴定手册[M]. 第8版. 中国科学院微生物研究所翻译组, 译. 北京: 科学出版社, 1984: 797-800.

稿件书写规范

论文中阿拉伯数字的使用

凡是可以使用阿拉伯数字且很得体的地方均应使用阿拉伯数字。世纪、年代、年、月、日、时刻必须使用阿拉伯数字, 年份必须用全称。对科技期刊来说, 凡处在计量单位和计数单位前面的数字, 包括 9 以下的各位数字, 除个别特例外, 均应使用阿拉伯数字。不是表示科学计量和有统计意义数字的一位数可以用汉字, 例如: 一本教材、两种商品等。