

长双歧杆菌 BBMN68 可溶性蛋白质图谱的建立

肖满¹ 徐攀¹ 赵建云¹ 马会勤² 张江巍¹ 陈尚武^{1*}

(1. 中国农业大学食品科学与营养工程学院 教育部北京市功能乳品实验室 北京 100083)

(2. 中国农业大学农学与生物技术学院 北京 100193)

摘要: 为了建立长双歧杆菌 BBMN68 蛋白质图谱, 采用双向电泳的方法建立了 2-D 参考图谱, 通过 MALDI-TOF/MS 质谱鉴定和数据库搜索, 鉴定到 206 个蛋白质(占长双歧杆菌 BBMN68 基因预测总蛋白的 11.4%)。通过 2-D 胶分析, 共有 800±15 (对数期)和 800±20(稳定期)个蛋白质, 其中 282 个蛋白点成功鉴定, 代表 206 个不同的蛋白质。另外, 分析了实验鉴定蛋白质的等电点和分子量, 蛋白功能, 密码子偏好性, 蛋白质疏水性以及蛋白质细胞定位的分析。研究结果为长双歧杆菌的比较蛋白质组学研究提供了参考图谱和蛋白质基础信息数据。

关键词: 长双歧杆菌 BBMN68, 蛋白质组, 双向电泳, 蛋白质图谱

A proteome reference map of *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* BBMN68

XIAO Man¹ XU Pan¹ ZHAO Jian-Yun¹ MA Hui-Qin² ZHANG Jiang-Wei¹
CHEN Shang-Wu^{1*}

(1. Key Laboratory of Functional Dairy Science of Chinese Ministry of Education and Municipal Government of Beijing, College of Food Science and Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China)

(2. College of Agriculture and Biotechnology, China Agricultural University, Beijing 100193, China)

Abstract: To establish proteomic maps of *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* BBMN68, applying two-dimensional gel electrophoresis, we built a 2-D reference map, by MALDI-TOF mass spectrometry. We identified a total number of 206 different proteins (11.4% of predicted total proteins in *B. longum* subsp. *longum* BBMN68). A total of 800±15 (exponential) and 800±20 (stationary) protein spots on each 2D-PAGE map were got, in which a total of 282 spots were successfully identified, represented 206 different proteins. Additionally, combined with analysis of pI and molecular masses, COG, CAI, GRVAVY and the cellular localizations of identified proteins in *B. longum* subsp. *longum* BBMN68. This study presented a proteome map of *B. longum* BBMN68 and provided a reference proteome data-base for comparative proteomic studied.

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 31071507)

*通讯作者: Tel: 86-10-62733986; Fax: 86-10-62738663; ✉: swchen@cau.edu.cn

收稿日期: 2010-09-19; 接受日期: 2010-12-03

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

Keywords: *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* BBMN68, Proteomics, Two-dimensional gel electrophoresis, Reference map

双歧杆菌属于革兰氏阳性厌氧菌,许多菌株分离自哺乳动物的肠道^[1]。双歧杆菌是能促进人体健康的益生菌^[2-4],其活菌广泛应用于食品工业^[5-6]。

双歧杆菌在食品工业生产过程中以及人体胃肠道中,会受到一些环境压力,如热,氧,酸和胆盐等。用基因组学,转录组学和蛋白质组学研究这些压力反应的机理已有报道,如基因组^[1,7-9]、转录组^[10-12]和蛋白质组^[13-15]。

蛋白质组学是研究双歧杆菌环境压力反应的有力工具,是基因组学和转录组学的有力补充,用蛋白质组学的方法研究双歧杆菌的胁迫反应,首先要建立其蛋白质二维图谱。目前,仅只有长双歧杆菌 NCC2705 (工业应用菌株)蛋白质双向图谱已经建立^[16]。另外,不同的双歧杆菌菌株表达的蛋白不一定相同,益生菌的益生作用是由菌株决定的,具有菌株特异性^[17],这就需要对不同的双歧杆菌更多表达蛋白的细节信息进行分析,特别是工业菌株和原生态菌株。

长双歧杆菌 BBMN68 是一株具有益生作用的菌株,分离自广西巴马地区的长寿老人^[18-19]。构建其蛋白质图谱可以为长双歧杆菌 BBMN68 比较蛋白质组学研究提供基础信息,也可为其其它双歧杆菌蛋白质图谱的建立提供参考。

1 材料与方法

1.1 菌株、培养基和培养条件

长双歧杆菌 BBMN68 由中国农业大学功能乳品重点实验室筛选保存。菌种活化和培养采用 MRS 液体培养基,活化后的长双歧杆菌以 1% 的接种量,用注射器转接到装有 100 mL MRS 液体培养基的培养瓶中(培养瓶已充氮气密封,灭菌),37 °C 厌氧培养。

1.2 长双歧杆菌 BBMN68 生长曲线的测定

长双歧杆菌 BBMN68 在以上培养条件下生长,每隔 2 h,用 1 mL 一次性注射器吸取 1 mL 液体,8 000 ×g、4 °C 离心 5 min,细胞重悬于 1 mL

50 mmol/L Tris-HCl (pH 6.8)中,用分光光度计在 600 nm 下测 OD 值。

1.3 样品收集

长双歧杆菌生长至对数中期($OD_{600}=0.6$)和稳定期($OD_{600}=2.7$),6 000 ×g,4 °C 离心 5 min,收集菌体,迅速用已预冷至 4 °C 的 10 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0)洗 2 次,离心后,液氮速冻,放入-80 °C 备用。

1.4 全蛋白提取

湿菌体 0.2-0.5 g 溶于 3 mL 裂解液[尿素 7 mol/L,硫脲 2 mol/L,CHAPS 4% (W/V),DTT 50 mmol/L,蛋白酶抑制剂(Roche)]。在冰浴上超声破碎细胞,超声条件是:240 W,超声 2 s,停 6 s,共超声 32 min。超声完毕,加入 10 μL/mL 核酸酶混合物(GE Healthcare),室温放置 1 h 后,12 000 ×g,4 °C 离心 30 min,收集上清,放入-20 °C 保存。上清用 2-D 定量试剂盒(GE Healthcare)测定蛋白浓度。

1.5 双向电泳及图像分析

第一向,400 μg 蛋白常温泡涨于 18 cm IPG 胶条 (pH 4-7)中,16 h 后将胶条放置于 IPGPhor II system (GE Healthcare),20 °C 进行 IEF,电泳程序为:100 V,3 h;从 100 V 到 500 V,2 h;500 V,2 h;从 500 V 到 1 000 V,1 h;1 000 V,1 h;从 1 000 V 到 8 000 V,4 h;8 000 V,9 h,共 91 kVh。等电聚集完成后,胶条分别用含 2% (W/V) DTT (第 1 次平衡使用)和 2.5% (W/V) IAA (第 2 次平衡使用)的平衡液[50 mmol/L Tris-HCl pH 8.8,6 mol/L 尿素,30% (V/V)甘油,2% (W/V) SDS,0.002% (W/V)溴酚蓝]进行 2 次平衡,每次 15 min。第二向使用 Ettan Dalt twelve (GE Healthcare)仪器,用 12.5%聚丙烯酰胺凝胶电泳。2-DE 胶用考染^[20]。胶图用扫描仪(Perfection 4990 scanner, Epson)扫描,图像用 ImageMaster 2-D Platinum version 5.0 software (GE Healthcare)分析。双向电泳胶图上的蛋白点,经过 3 次生物学重复,3 个重复胶图分析。

1.6 胶内酶解、质谱鉴定和数据库搜索

胶内酶解、质谱鉴定和数据库搜索参考文献[21],主要是用 Mascot 软件,利用 AUTOFLEX II

TOF/TOF 质谱仪得到的蛋白肽指纹(Peptide mass fingerprinting), 在 NCBI 蛋白数据库中进行检索, 搜索参数如下: 分类单元为细菌, cysteine carbamidomethylation 为固定修饰, methionine oxidation 为可变修饰, 胰酶一个错误剪切, 肽分子质量容许误差 0.1 或 0.2 D。搜索结果中, 分数大于 80 分 ($P < 0.05$) 为成功鉴定到蛋白质。部分未成功鉴定的, 特别是分子量低的蛋白质, 用二级质谱(MALDI-TOF-TOF)鉴定。

2 结果与分析

2.1 长双歧杆菌 BBMN68 的生长曲线

长双歧杆菌 BBMN68 在厌氧条件下培养的生长曲线见图 1, 经过 2 h 培养, 细胞开始从延滞期进入对数生长期, 12 h 后, 进入稳定期。图中箭头表示取样点, 即在对数中期和稳定期取样, 进行蛋白质提取。

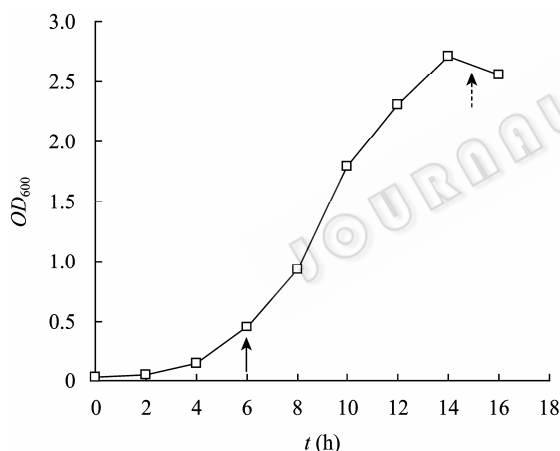


图 1 长双歧杆菌 BBMN68 生长曲线

Fig. 1 Growth curves of *B. longum* subsp. *longum* BBMN68 under anaerobic condition

注: 箭头表示在对数中期和稳定期取样。

Note: Mid-exponential cells (shown by continuous arrow) and stationary cells (shown by dotted arrow) for proteomic investigations were sampled, respectively.

2.2 对数中期和稳定期全蛋白图谱

通过蛋白提取和双向电泳, 分别得到 BBMN68 对数中期和稳定期全蛋白图谱, 其中稳定期图谱中用数字和箭头标记的蛋白点是对数中期图谱中没有的, 能对应对数中期图谱上的点未标记出来, 见图

1。经过软件分析, 图谱中有 800 ± 15 (对数中期) 和 800 ± 20 (稳定期) 个蛋白点被检测到, 共有 282 个蛋白点成功鉴定, 代表 206 个不同的蛋白(数据未附)。和已经发表的学术文章中长双歧杆菌蛋白图谱比较^[16], 本实验得到的图谱中, 成功鉴定到蛋白质的个数减少, 本实验鉴定到蛋白质 206 个, 文献作者鉴定到 369 个, 蛋白点分布不相同, 这些差异主要是文献中作者使用了 pH 4-7、pH 4-5 和 pH 4.4-5.5 3 种不同 pH 范围的胶条, 可以分离酸性端的蛋白质更多, 其图谱是 3 个胶图组合的蛋白图谱, 与本实验 pH 4-7 的图谱无法比较。所以, 为了让长双歧杆菌蛋白参考图谱更有可比性, 本实验选取常用 pH 4-7 的胶条, 进行实验。此外, 蛋白质差异也有可能是双歧杆菌菌株的不同而引起的。实验成功鉴定的蛋白点标记在图 2 上。

2.3 实验鉴定蛋白质等电点和分子量分析

实验鉴定到蛋白质的等电点主要在 4.0-6.5 之间(图 3), 分子量分布在 1 000-121 000 D 之间。

2.4 实验鉴定蛋白质分类与功能分析

根据蛋白质直系同源簇(COG, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/COG>), 对实验鉴定蛋白质进行功能分类(图 4), 翻译相关蛋白占 19.4%, 氨基酸转运和代谢相关蛋白占 18.8%, 碳源转运和代谢相关蛋白占 13.8%, 说明这些蛋白在菌体生长中起重要作用。

2.5 实验鉴定蛋白质密码子偏好性和疏水性分析

根据软件 Codon W 计算出蛋白质开放阅读框架的密码子偏好性(CAI)和疏水性(GRAVY), 见图 5 和图 6。CAI 的值主要分布在 0.2-0.5, 蛋白质的 CAI 大于 0.3 占 97.4%, 这些结果表明, 基因编码的蛋白质 CAI 值越高, 就越容易被双向电泳分离和鉴定。本文仅鉴定到 23 个蛋白, 其 GRAVY 大于 0, 表明在双向胶上几乎很少分离到疏水性蛋白。

2.6 实验鉴定蛋白质细胞定位分析

鉴定到的蛋白质用 PSORTb Version 3.0.1(<http://www.psорт.org/psортb/index.html>) 进行细胞定位分析。有 178 个蛋白定位在细胞质中, 占分离到总蛋白质的 86.4%, 15 个蛋白是未知细胞定位, 11 个定位在膜上, 1 个胞外蛋白, 1 个细胞壁蛋白。说明本实验分离的蛋白质主要是细胞质中蛋白。

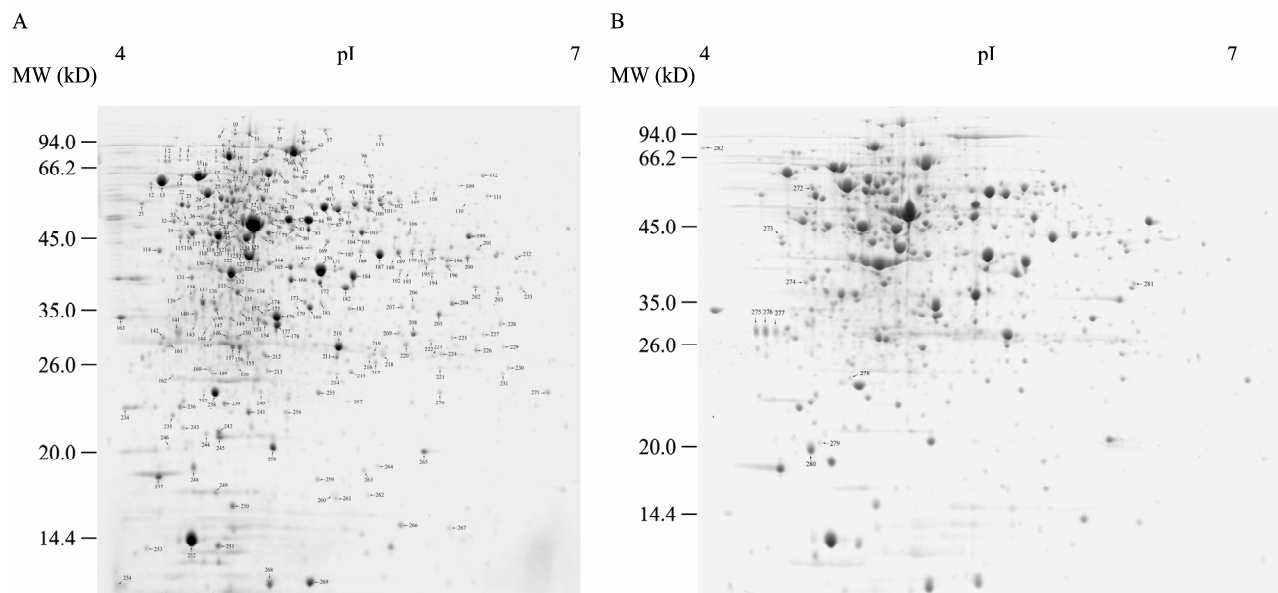


图2 长双歧杆菌 BBMN68 胞质蛋白双向电泳图谱

Fig. 2 2-DE maps of the whole proteins of *B. longum* subsp. *longum* BBMN68 under mid-log and stationary phase conditions
注: A: 对数中期; B: 稳定期。箭头和数字表示鉴定的蛋白。

Note: A: Mid-log phase; B: Stationary phase. The identified proteins were arrowed and numbered.

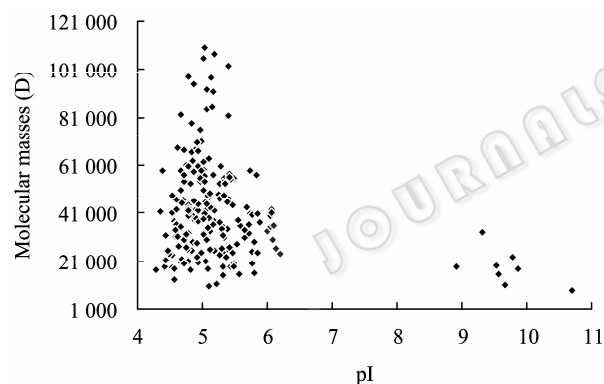


图3 鉴定蛋白质等电点和分子量分布

Fig. 3 Representation of 2-D gel separation of *B. longum* subsp. *longum* BBMN68 proteome according to pI and molecular masses

3 讨论

由于长双歧杆菌 BBMN68 基因组测序已经完成 (http://www.genome.jp/dbget-bin/www_bget?gn:T01345), 本实验鉴定蛋白质占基因预测总蛋白质的 11.4%, 这个比例符合已发表的文献报道, 在不同细菌蛋白质图谱上, 实验鉴定蛋白占基因预测蛋白的比例为 4.6%–21.3%。如谷氨酸棒杆菌 ATCC

14067 (*Corynebacterium glutamicum* ATCC 14067)^[22] 占 4.6%; 脑膜炎奈瑟氏球菌 (*Neisseria meningitidis* serogroup A)^[23] 占 12.8%; 丙酮丁醇梭菌 DSM 1731 (*Clostridium acetobutylicum* DSM 1731)^[24] 占 14.7%; 长双歧杆菌 NCC2705^[16] 占 21.3%。

目前, 仅有一篇文献(Yuan 及其同事)^[17]关于长双歧杆菌 NCC2705 蛋白质图谱的研究, 本文鉴定到的 206 个长双歧杆菌 BBMN68 蛋白与 Yuan 鉴定到长双歧杆菌 NCC2705 的 369 个蛋白质进行比较, 发现新的 16 个蛋白质(表 1)。其中, 参与氨基酸转运和代谢的蛋白多出 8 个, 核酸转运和代谢的蛋白多出 5 个, 表明在 BBMN68 中, 氨基酸和核酸代谢更加旺盛。Yuan 用双向电泳没有分离到这些蛋白不能说明在 NCC2705 没有这些蛋白的存在, 可能是没有分离到或者该菌株在培养生长过程中蛋白没有表达或者表达量很低, 未检测到。新鉴定的蛋白只能是相对比较结果, 可能在文献中的菌株有该蛋白, 文献作者没有鉴定出来。新鉴定的蛋白生物学功能只是根据 KEGG 中对长双歧杆菌的注释来解释。因为在新鉴定的蛋白中, 没有文献具体研究该蛋白在代谢中的作用。另外, Yuan 鉴定的蛋白中, 同一个蛋

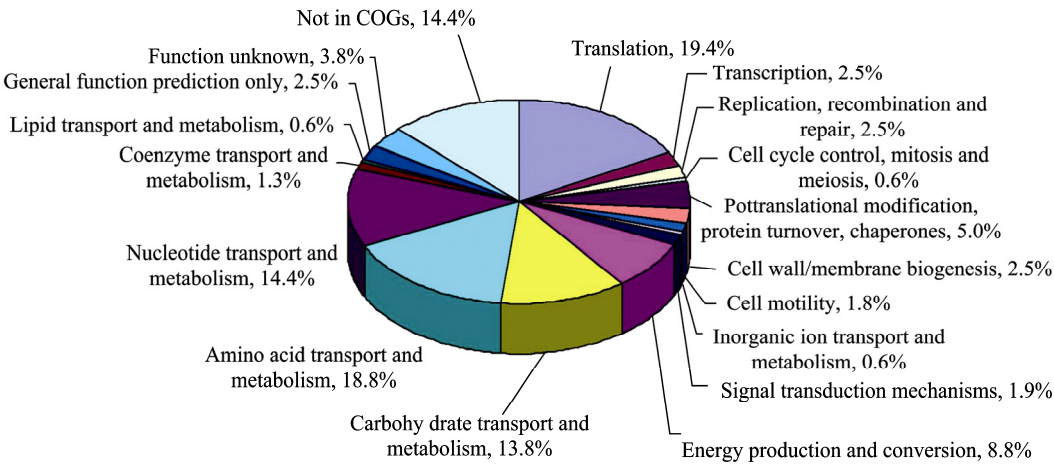


图 4 长双歧杆菌 BBMN68 实验鉴定蛋白功能分类

Fig. 4 Schematic of cellular role categories of identified proteins in *B. longum* subsp. *longum* BBMN68 according to clusters of orthologous groups

Note: COG: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/COG>.

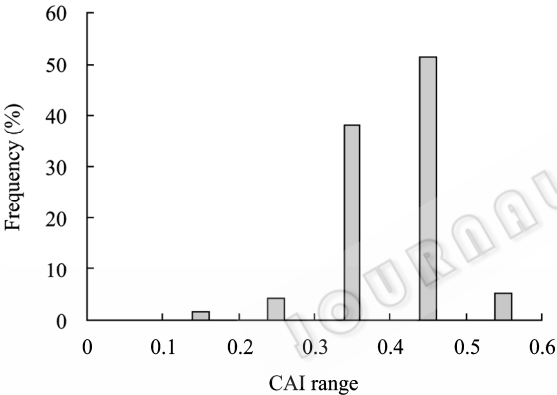


图 5 鉴定蛋白质基因的密码子分布

Fig. 5 Frequency distribution of the CAI of 206 gene encoding proteins identified on 2-D gel pH 4-7

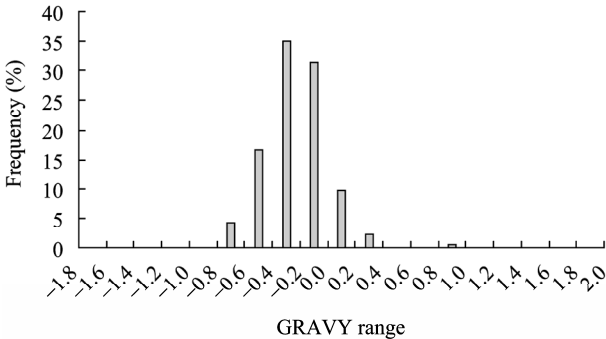


图 6 鉴定蛋白质疏水性分布

Fig. 6 Frequency distribution of the GRAVY of 206 genes encoding proteins identified on 2-D gel pH 4-7

表 1 与 Yuan ^[17] 鉴定长双歧杆菌 NCC2705 蛋白的比较 Table 1 Comparison of NCC2705 and BBMN68 of identified proteins	
新鉴定蛋白名称 New identified proteins	KEGG 中注释的蛋白功能 Protein function in the KEGG
Phosphoglyceromutase	Carbohydrate transport and metabolism
Diaminopimelate decarboxylase	
Acetylornithine deacetylase	
Carbamoyl phosphate synthase small subunit	
O-acetylhomoserine sulfhydrylase	
Acetylglutamate kinase	Amino acid transport and metabolism
2-isopropylmalate synthase	
Threonine synthase	
Phosphoglycerate dehydrogenase and related dehydrogenases	Lipid transport and metabolism
4-diphosphocytidyl-2-methyl-D-erithritol synthase	
Polyribonucleotide nucleotidyltransferase	
Inosine-5'-monophosphate dehydrogenase	
Ribose-phosphate pyrophosphokinase	Nucleotide transport and metabolism
Adenylosuccinate synthase	
Dihydroorotate dehydrogenase	
Exopolyphosphatase	

白质在胶图上分布出更多蛋白点,如烯醇酶。本文鉴定出3个蛋白点,Yuan鉴定出5个蛋白点,本作者在双向胶图上仅发现7个伴侣蛋白点,代表6个不同的蛋白质,如DnaK, GroEL, GrpE, Hsp等。而Yuan等发现35个不同伴侣蛋白点,代表5个不同的蛋白质,说明伴侣蛋白在BBMN68中比在NCC2705有更少的生物学修饰,如蛋白磷酸化、糖基化、甲基化等。蛋白修饰方面的不同,可能与菌株生物学特性有关。

对于碱性蛋白和膜蛋白的分离需要特殊的双向电泳方法,本实验主要集中在细胞质中酸性蛋白,选用pH 4-7的胶条进行蛋白分离。另外,本实验曾用pH 3-10的胶条参照本文的方法分离蛋白,发现蛋白主要集中在pH 4-7的范围内。所以,本文中叙述的蛋白质组方法非常适合革兰氏阳性菌细胞质中酸性蛋白的提取和鉴定。

本实验用双向电泳和质谱技术建立了长双歧杆菌BBMN68全蛋白2-DE图谱,结果将为长双歧杆菌的研究提供蛋白质组学方面的基础信息。

参 考 文 献

- [1] Schell MA, Karmirantzou M, Snel B, et al. The genome sequence of *Bifidobacterium longum* reflects its adaptation to the human gastrointestinal tract[J]. Proc Natl Acad Sci, 2002, 99(22): 14422-14427.
- [2] Blandino G, Fazio D, Di Marco R. Probiotics: overview of microbiological and immunological characteristics[J]. Expert Rev Anti Infect Ther, 2008, 6(4): 497-508.
- [3] Masco L, Van Hoorde K, De Brandt E, et al. Antimicrobial susceptibility of *Bifidobacterium* strains from humans, animals and probiotic products[J]. J Antimicrob Chemother, 2006, 58(1): 85-94.
- [4] Trebichavsky I, Rada V, Splichalova A, et al. Cross-talk of human gut with bifidobacteria[J]. Nutr Rev, 2009, 67(2): 77-82.
- [5] Masco L, Huys G, De Brandt E, et al. Culture-dependent and culture-independent qualitative analysis of probiotic products claimed to contain bifidobacteria[J]. Int J Food Microbiol, 2005, 102(2): 221-230.
- [6] Shah NP. Probiotic bacteria: selective enumeration and survival in dairy foods[J]. J Dairy Sci, 2000, 83(4): 894-907.
- [7] De Dea Lindner J, Canchaya C, Zhang ZD, et al. Exploiting *Bifidobacterium* genomes: the molecular basis of stress response[J]. Int J Food Microbiol, 2007, 120(1/2): 13-24.
- [8] Ventura M, O'Connell-Motherway M, Leahy S, et al. From bacterial genome to functionality: case bifidobacteria[J]. Int J Food Microbiol, 2007, 120(1/2): 2-12.
- [9] Klijn A, Mercenier A, Arigoni F. Lessons from the genomes of bifidobacteria[J]. FEMS Microbiol Rev, 2005, 29(3): 491-509.
- [10] González R, Klaassens ES, Malinen E, et al. Differential transcriptional response of *Bifidobacterium longum* to human milk, formula milk, and galactooligosaccharide[J]. Appl Environ Microbiol, 2008, 74(15): 4686-4694.
- [11] Rezzonico E, Lariani S, Barretto C, et al. Global transcriptome analysis of the heat shock response of *Bifidobacterium longum*[J]. FEMS Microbiol Lett, 2007, 271(1): 136-145.
- [12] Sonnenburg JL, Chen CT, Gordon JI. Genomic and metabolic studies of the impact of probiotics on a model gut symbiont and host[J]. PLoS Biol, 2006, 4(12): e413.
- [13] Sánchez B, Champomier-Vergès MC, Stuer-Lauridsen B, et al. Adaptation and response of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* to bile: a proteomic and physiological approach[J]. Appl Environ Microbiol, 2007, 73(21): 6757-6767.
- [14] Sánchez B, Champomier-Vergès MC, Anglade P, et al. Proteomic analysis of global changes in protein expression during bile salt exposure of *Bifidobacterium longum* NCIMB 8809[J]. J Bacteriol, 2005, 187(16): 5799-5808.
- [15] Sánchez B, Champomier-Vergès MC, Collado Mdel C, et al. Low-pH adaptation and the acid tolerance response of *Bifidobacterium longum* biotype *longum*[J]. Appl Environ Microbiol, 2007, 73(20): 6450-6459.
- [16] Yuan J, Zhu L, Liu XK, et al. A proteome reference map and proteomic analysis of *Bifidobacterium longum* NCC2705[J]. Mol Cell Proteomics, 2006, 5(6): 1105-1118.
- [17] Medina M, Izquierdo E, Ennahar S, et al. Differential immunomodulatory properties of *Bifidobacterium longum* strains: relevance to probiotic selection and clinical applications[J]. Clin Exp Immunol, 2007, 150(3): 531-538.
- [18] Yang HY, Liu AP, Zhang M, et al. Oral administration of live *Bifidobacterium* substrains isolated from centenarians enhances intestinal function in mice[J]. Curr Microbiol, 2009, 59(4): 439-445.
- [19] Yang HY, Liu SL, Ibrahim SA, et al. Oral administration of live *Bifidobacterium* substrains isolated from healthy centenarians enhanced immune function in BALB/c mice[J]. Nutr Res, 2009, 29(4): 281-289.
- [20] Candiano G, Bruschi M, Musante L, et al. Blue silver: a

very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis[J]. Electrophoresis, 2004, 25(9): 1327-1333.

[21] Zhang JW, Ma HQ, Chen S, et al. Stress response proteins' differential expression in embryogenic and non-embryogenic callus of *Vitis vinifera* L. cv. cabernet sauvignon-a proteomic approach[J]. Plant Science, 2009, 177(2): 103-113.

[22] Li LY, Wada M, Yokota A. Cytoplasmic proteome reference map for a glutamic acid-producing *Corynebacterium glutamicum* ATCC 14067[J]. Proteomics, 2007, 7(23): 4317-4322.

[23] Bernardini G, Renzone G, Comanducci M, et al. Proteome analysis of *Neisseria meningitidis* serogroup A[J]. Proteomics, 2004, 4(10): 2893-2926.

[24] Mao SM, Luo YM, Zhang TR, et al. Proteome reference map and comparative proteomic analysis between a wild type *Clostridium acetobutylicum* DSM 1731 and its mutant with enhanced butanol tolerance and butanol yield[J]. J Proteome Res, 2010, 9(6): 3046-3061.



2011 年中国微生物学会及各专业委员会学术活动计划表(2-1)

序号	会议名称	主办单位	时间	人数	地点	联系人
1	传染病防控研讨会暨伍连德举办“万国鼠疫研究会”100 周年纪念大会	中国微生物学会分析微生物学专业委员会	4 月 2-3 日	200	黑龙江 哈尔滨	杨瑞馥 ruiyufang@gmail.com
2	International Symposium on <i>Salmonella</i> and Other Enteric Bacteria: Genomics and Biology	中国微生物学会分析微生物学专业委员会	5 月 8-11 日	200	黑龙江 哈尔滨	刘树林 slliu@ucalgary.ca
3	Inaugural conference of Bergey's International Society for Microbial Systematics	中国微生物学会	5 月 19-23 日	300	北京	刘梅 010-62538564
4	农业污染物的微生物转化与修复学术研讨会	中国微生物学会农业微生物学专业委员会	5-6 月	80	湖北 武汉	黄巧云 qyhuang@mail.hzau.edu.cn
5	第十二届微生物学教学和科研及成果产业化研讨会	中国微生物学会基础、农业微生物学专业委员会	7 月 12-15 日	150	广西南宁	冯家勋 0771-323270736
6	全国第三届海洋微生物研讨会	中国微生物学会海洋微生物学专业委员会	8 月	100	山东 济南	张玉忠 13969185852
7	第十届中国全国生物毒素学术研讨会	中国微生物学会微生物毒素专业委员会	8 月 17-19 日	200	吉林 长春	王景林 010-66948531
8	生物制品质量控制国际研讨会	中国微生物学会生物制品专业委员会	9 月	200	四川 成都	徐苗 010-67095438
9	第二届中国临床微生物学大会暨微生物学与免疫学论坛	中国微生物学会临床微生物学专业委员会	9 月	400	四川 成都	刘辉 0852-8608272