

CP7 抗菌蛋白对嗜水气单胞菌的抑杀作用机理

苑园园 刘清明 钟杨生 廖富蘋 林健荣*

(华南农业大学 动物科学学院 广东 广州 510642)

摘要: 【目的】研究多粘类芽孢杆菌(*Paenibacillus polymyxa*) CP7 菌株的抗菌蛋白(CP7ACP)对嗜水气单胞菌的抑杀作用机理,为防治嗜水气单胞菌引起的鱼病提供新的潜在天然药物。【方法】采用抑菌试验、钼锑抗比色法和紫外光谱法研究其对嗜水气单胞菌 S12 菌株生长、磷泄漏和生物大分子的影响,并利用扫描电镜和透射电镜观察了嗜水气单胞菌细胞结构遭受的破坏作用。【结果】CP7ACP 对嗜水气单胞菌的抑菌圈直径约 8.1 mm,最小抑菌浓度(MIC)与最小杀菌浓度(MBC)分别为原液浓度的 1/8 和 1/4;嗜水气单胞菌受 CP7ACP 处理后,电镜观察发现其细胞壁、细胞膜、细胞器以及菌体均受到不同程度的破坏,胞内的生物大分子和磷泄漏明显,基因组 DNA 发生增色效应。【结论】CP7ACP 抑制嗜水气单胞菌生长,可用于防治嗜水气单胞菌引起的鱼病。

关键词: CP7 菌, 抗菌蛋白, 嗜水气单胞菌, 作用机理, 电镜

Mechanism of CP7 antibacterial protein against *Aeromonas hydrophila*

YUAN Yuan-Yuan LIU Qing-Ming ZHONG Yang-Sheng
LIAO Fu-Ping LIN Jian-Rong*

(College of Animal Science, South China Agricultural University, Guangzhou, Guangdong 510642, China)

Abstract: [Objective] The efficacy of the CP7 antimicrobial proteins (CP7ACP) to *Aeromonas hydrophila* was evaluated to provide potential novel natural drug for treating fish disease caused by *Aeromonas hydrophila*. [Methods] The effect on Growth, phosphorus divulges and biomacromolecule of *Aeromonas hydrophila* S12 were tested using Antibacterial test, Mo-Sb colorimetry and UV spectroscopy, while destructive effects of *Aeromonas hydrophila* cell

*通讯作者: Tel: 86-20-85280591; 信箱: jrln@scau.edu.cn

收稿日期: 2011-11-08; 接受日期: 2012-02-06

structure by CP7ACP were observed under both scanning electron microscope and transmission electron microscope. **[Results]** The inhibition zone diameter was about 8.1 mm, the minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) was 1/8 and 1/4 of stock solution respectively. After treated by CP7ACP, electron microscope reveals that cell wall, membrane, organelles and the thallus of *Aeromonas hydrophila* are subject to different degrees of damage, while intracellular biomacromolecule and phosphorus significantly divulge, genomic DNA become hyperchromic effect. **[Conclusion]** CP7ACP inhibit the growth of *Aeromonas hydrophila*, can be used for preventing fish disease caused by *Aeromonas hydrophila*.

Keywords: CP7 strain, Antibacterial protein, *Aeromonas hydrophila*, Mechanism, Electron microscope

嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)是水产养殖重要的条件致病菌,能够引起多种水产动物败血症,危害极大。目前由该菌感染引起的疾病绝大多数依赖抗生素药物治疗,对水环境、水产品质量和人类健康等的安全造成重要影响^[1]。因而,采用生物防治技术或利用生物产物进行水产养殖动物嗜水气单胞菌感染症的预防和治疗有重要意义。

近年来,我国在嗜水气单胞菌的生物防治领域已取得一些进展,单晓枫等^[2]研究了粪肠球菌MLS-7对嗜水气单胞菌有较强的抑菌作用,宋铁英等^[3]从土壤和植物中分离纯化出拮抗菌LB3、K1、K29、E43,对防治鳖的嗜水气单胞菌感染症有效,秦生巨等^[4]发现8株蛙弧菌对河蚌嗜水气单胞菌具有裂解效果。周飞等^[5]发现金银花对嗜水气单胞菌有较强的抑菌作用,彭金菊等^[6]在32味中药中筛选出五倍子、栀子、诃子、五味子、乌梅、黄芩、川黄连、石榴皮等8味药物对嗜水气单胞菌具有较强的抑菌活性,张梁^[7]的研究表明大蒜素对引起草鱼肠炎的豚鼠气单胞菌具有显著的体外抑菌及防治效果。芽孢杆菌是一类重要的具有生防潜力的细菌,这类菌株能产生多种抗菌物质^[8],多粘类芽孢杆菌(*Paenibacillus polymyxa*) CP7菌株是本课题组分离获得的一株具有广谱抗病原菌活性的拮抗性细菌,能够分泌多

种抗菌活性物质^[9],在其发酵培养的上清液中,已知有3种抗菌物质存在:第1种是由23个氨基酸组成的具有抗革兰氏阳性菌的Cpacin抗菌肽(廖富蘋等,发明专利号:200710118975)^[10];第2种是抗革兰氏阴性菌的多粘菌素类物质^[11];第3种是抗真菌的 β -1,3-1,4-葡聚糖酶^[12]。本文研究了CP7菌株的抗菌蛋白(CP7ACP)对嗜水气单胞菌S12菌株的抑杀作用机理,为CP7ACP在水产致病细菌嗜水气单胞菌的生物防治提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 菌株

多粘类芽孢杆菌CP7菌株为本实验室保存,嗜水气单胞菌S12菌株来自中国水产科学研究院珠江水产研究所。

1.2 CP7ACP的制备

挑取平板培养的CP7菌株单菌落接种于5 mL YEPD液体培养基中,于30 °C、180 r/min恒温摇床中培养24 h作为种子菌液,按1%接种量(体积比)转接到发酵培养基中,于30 °C、180 r/min恒温摇床中培养48 h。将培养液置于沸水浴中处理20 min后,迅速取出冰浴冷却,于4 °C、10 000 r/min离心20 min,收集的上清液经0.22 μ m滤膜过滤后用33%硫酸铵饱和度沉淀其蛋白,经透析,即为菌株抗菌蛋白提取液,于

-20 °C 冰箱保存备用。可溶性蛋白的含量测定采用考马斯亮蓝显色法测定抑菌蛋白的浓度。

1.3 抑菌试验和杀菌试验

S12 菌液浓度经血球计数板计数为 10^5 – 10^6 CFU/mL。用 CP7ACP 原液(浓度为 27.84 g/L)对 S12 的抗菌活性参照琼脂板孔穴扩散法^[13], 孔穴直径 2.7 mm, 每孔穴加粗提液 5 μ L, 以消毒营养肉汤培养基为对照, 30 °C 倒置培养过夜, 测量 CP7ACP 对 S12 抑菌圈的直径。采用二倍稀释法测定 CP7ACP 对 S12 的最小抑菌浓度(MIC)与最小杀菌浓度(MBC)^[14]。

1.4 S12 磷泄漏的检测

参照 Newton 等^[15]的方法并做改进, 将处于对数生长期的 S12 菌液于 4 500 r/min 离心 10 min, 收集菌体。用 pH 7.0、5 mmol/L 的 HEPES-Na 缓冲液(含 1% NaCl)重新悬浮洗涤除去杂质, 重复 2–3 次, 调节浓度约 1.0×10^8 CFU/mL; 然后依次向 10 mL 离心管中加入 HEPES-Na 缓冲液、S12 菌液和 CP7ACP 的 2、4 倍稀释液。使菌液最终浓度为 2.0×10^7 CFU/mL。以灭菌水处理作为对照组, 30 °C 分别孵育 0、10、20、30、60、90、120、150、180 min 后, 迅即放置在冰浴上, 4 °C、4 500 r/min 离心 5 min, 收集上清, 用紫外分光光度计在 OD_{700} 测定上清液中磷的吸光度, 通过标准曲线的回归方程计算出含量, 从而测算 CP7ACP 作用菌体后引起菌体磷泄漏的变化情况。处理样品中磷含量的测定采用钼锑抗(即钼酸铵-酒石酸锑钾-抗坏血酸)比色法^[16]。

1.5 CP7ACP 对 S12 胞内的生物大分子物质影响的检测

生物体内的紫外吸收物质主要有蛋白质、DNA 和 RNA 等, 可通过检测紫外吸收量来衡量分析, 参照邹文政等的方法^[17]。取对数生长期的 S12, 用 0.1 mol/L pH 7.4 磷酸盐缓冲液稀释为 1×10^6 CFU/mL。CP7ACP 的 2 倍、4 倍稀释液的

分别与稀释菌液于 30 °C 共同孵育 10、20、30、60、90、120、150、180 min, 以未加 CP7ACP 的稀释菌液为对照; 用 0.22 μ m 滤膜过滤检测液, 滤液于紫外分光光度计 260 nm 波长测定其吸光值, 以其衡量 CP7ACP 引起 S12 内泄出生物大分子物质的效应。

1.6 紫外光谱法分析 S12 基因组 DNA 增色效应

利用 TIANamp Bacteria DNA Kit 细菌基因组 DNA 提取试剂盒, 提取 S12 基因组 DNA, 在 0.01 mol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 7.2)介质中, S12 基因组 DNA 与 CP7ACP 2 倍稀释液混合于 30 °C 避光孵育, 孵育时间经过 3、6、12、18 h 后; 以水调零做基线, 置于紫外-可见分光光度计中进行扫描, 分别测其波长在 220–300 nm 范围内的紫外吸光光谱^[18]。在整个操作过程中, 样品实行避光保存。

1.7 CP7ACP 对 S12 作用的电镜观察

CP7ACP 对 S12 菌体作用处理过程是: S12 在营养肉汤培养基 30 °C 条件下摇床培养 12 h, 在对数生长期取菌液经 5 000 r/min 离心 10 min, 弃上清收集沉淀, 用 10 mmol/L 磷酸缓冲液(pH 7.0)调节菌的浓度为 1×10^8 CFU/mL, 吸取制备好的 S12 菌液 2 mL 至离心管中, 然后加入 CP7ACP 至终浓度为 2 倍稀释液, 混匀, 于 30 °C 保温 0.5、1、3 h 后, 5 000 r/min 离心 5 min, 收集菌体。加入适量的 PBS 缓冲液洗涤菌体 3 次, 收集菌体。以灭菌水处理的菌液为对照。分别取上述经处理的样品, 加入 1 mL 4% 戊二醛固定液, 混匀菌体, 于 4 °C 固定过夜。然后按常规方法处理样品后, 扫描电镜观察记录、拍照。分别是取上述经处理的样品, 加入适量的 PBS 缓冲液洗涤菌体 3 次, 弃缓冲液(不打散细胞), 加入 2.5% 戊二醛固定液 10 min, 然后 5 000 r/min 离心 10 min, 于 4 °C 冰箱中固定过夜。然后按常规方法处理样品, 透射电镜观察记录、拍照。

2 结果与分析

2.1 CP7ACP 对 S12 的抑杀作用

CP7ACP 对 S12 进行抑菌试验, 结果见图 1, 经检测抑菌圈直径约 8.1 mm。经测定, CP7ACP 对 S12 的最小抑制浓度(MIC)为 3.48 g/L, 即只需 CP7ACP 原液浓度的 1/8 便可完全抑制 S12 菌体的生长, 最小杀菌浓度(MBC)为 6.96 g/L, 即只需 CP7ACP 原液浓度的 1/4 便可全部杀死菌体。结果表明 CP7ACP 对 S12 有明显的抑杀作用。

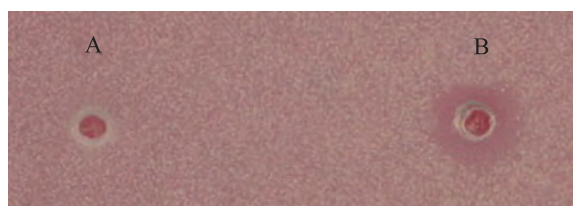


图 1 CP7ACP 对 S12 的抑杀作用

Fig. 1 Antimicrobial effect of CP7ACP to S12

注: A: 对照; B: 处理。

Note: A: Control; B: Treatment.

2.2 CP7ACP 对 S12 磷泄漏的影响

CP7ACP 对 S12 作用后, 菌体内磷的泄漏情况如图 2 所示。

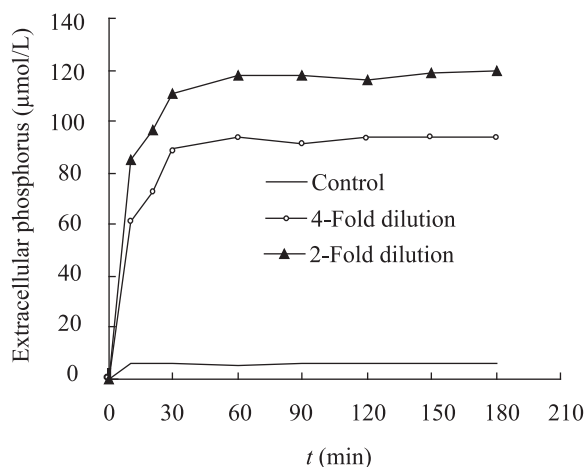


图 2 CP7ACP 对胞内磷泄漏的影响

Fig. 2 The effect of CP7ACP on phosphorus leakage

从图 2 中看出 CP7ACP 的 2、4 倍稀释液处理 30 min, S12 胞外的磷就分别达到 110.9 和 89.7 $\mu\text{mol/L}$, 60 min 后磷浓度达到最高值, 分别是 117.5 和 94.3 $\mu\text{mol/L}$, 经方差分析显示, $P>0.05$, 即 2、4 倍稀释液分别处理 30、60 min 时磷泄漏没有显著性差异, 而与对照组相比差异显著($P<0.05$)。结果表明 CP7ACP 能使 S12 胞内在短小时内发生明显的泄露, 并且 CP7ACP 浓度越高泄漏量越多。

2.3 CP7ACP 对 S12 胞内的生物大分子物质影响

生物体内的紫外吸收物质主要有蛋白质、DNA 和 RNA 等大分子物质, 以 CP7ACP 的 2、4 倍稀释液处理 S12, 在 260 nm 处检测培养液吸光值, 分析 CP7ACP 影响菌体大分子物质泄漏情况, 结果见图 3。

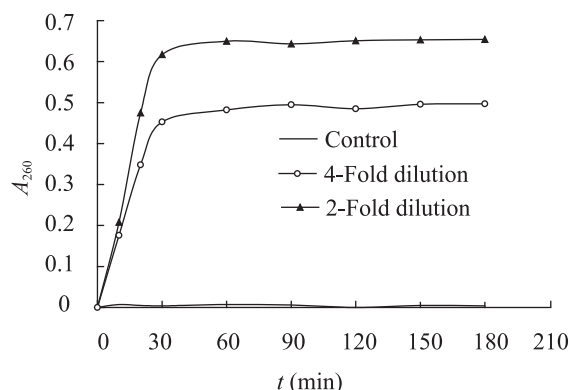


图 3 CP7ACP 对胞内生物大分子物质泄出的影响

Fig. 3 The effect of CP7ACP on the biomacromolecule

可见紫外吸收物质发生明显的变化, 在处理 0–30 min 时, 紫外吸收物质质量急剧上升, 30–60 min 时达到峰值, 此后处于平缓的状态。对照区几乎检测不出紫外吸收物质的量值。经方差分析显示, CP7ACP 的 2、4 倍稀释液作用后的吸光值差异显著($P<0.05$), 2、4 倍稀释液作用后的吸光值与对照相比差异极显著($P<0.01$)。由此推测, CP7ACP 会引起 S12 胞内紫外吸收物质即生物大分子的

外泄。

2.4 CP7ACP 对 S12 基因组 DNA 的作用

增色效应通常是由于 DNA 变性引起的光吸收增加, 可作为衡量 DNA 变性的依据。CP7ACP 处理 S12 基因组 DNA 后的增色效应检测情况如图 4 所示。

从图 4 中可以看出, CP7ACP 处理 S12 基因组 DNA 后, 在紫外光波长为 260 nm 处发生了增色效应, 处理时间越长增色效益越明显, 即 $18\text{ h} > 12\text{ h} > 6\text{ h} > 3\text{ h}$, 细菌基因组 DNA 的紫外吸光值随作用时间的延长而上升。增色效应的发生, 可能是 CP7ACP 与 DNA 表面的磷酸基团作用; 或者部分结构嵌入到 DNA 分子沟槽中, 使 DNA 原本收缩的构象趋于松散变性。

2.5 CP7ACP 对 S12 抑杀作用的电镜观察

2.5.1 CP7ACP 对 S12 作用的扫描电镜观察: S12

被 CP7ACP 的 2 倍稀释液处理 0.5、1、3 h。在扫描电镜下观察其菌体的变化, 如图 5 所示。

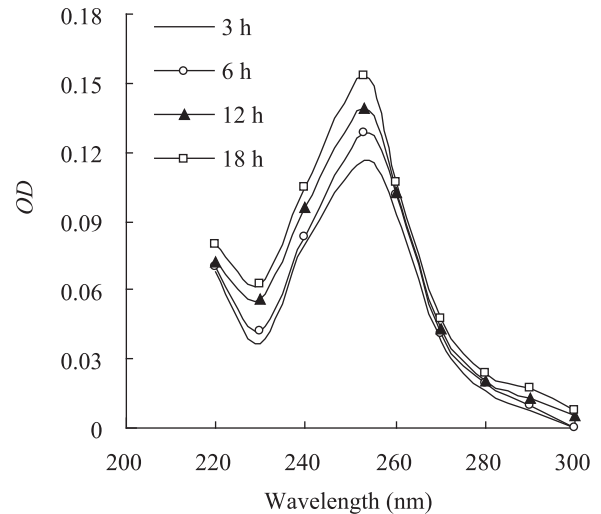


图 4 CP7ACP 处理 S12 DNA 后的紫外光谱变化
Fig. 4 The changes of UV spectrum after S12 DNA treated by CP7ACP

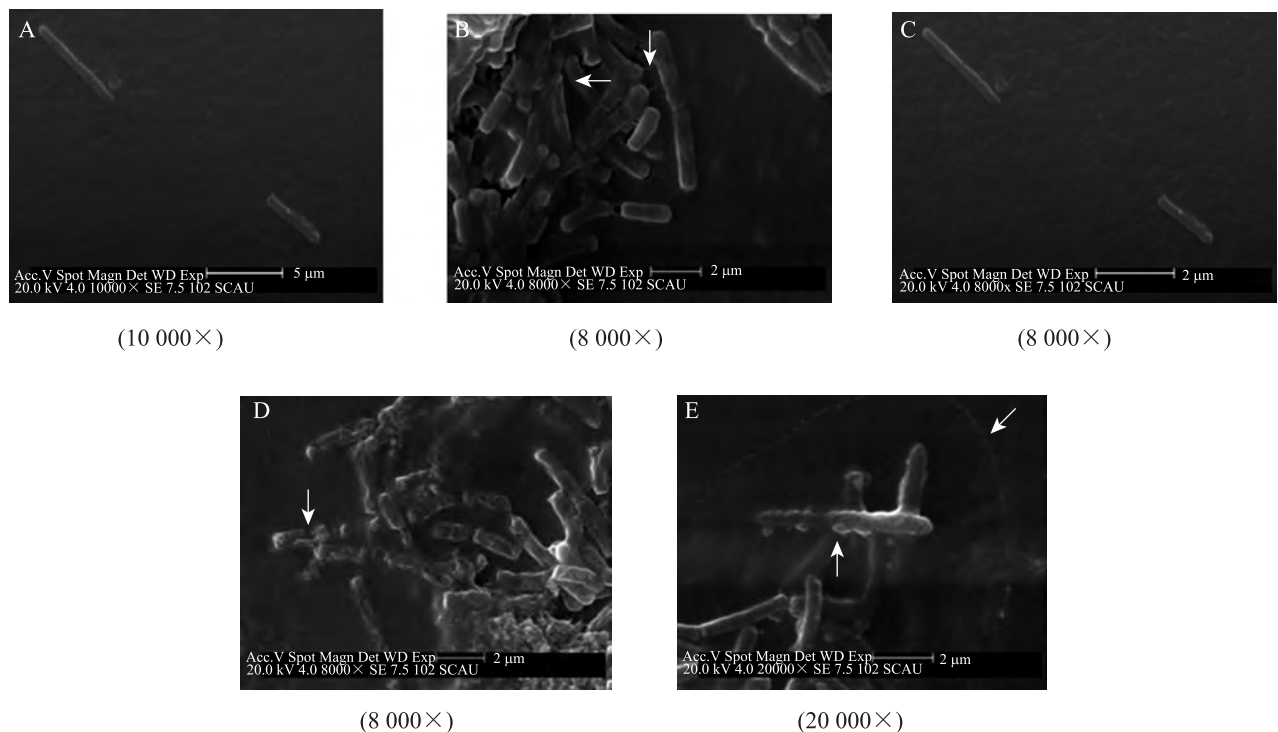


图 5 扫描电镜观察 CP7ACP 处理后的 S12

Fig. 5 Scanning electron microscopy observed S12 after treated by CP7ACP

注: A: 正常对照; B: 处理 0.5 h; C: 处理 1 h; D: 处理 3 h; E: 处理 3 h。

Note: A: Control; B: 0.5 h treated; C: 1 h treated; D: 3 h treated; E: 3 h treated.

正常 S12 的形态特征(图 5A), 菌体呈杆状, 两端钝圆, 结构完整, 外观饱满, 表面光滑、圆润无孔洞。CP7ACP 处理 S12, 0.5 h 后细胞表面变得粗糙, 有孔洞出现, 并且有些细胞间出现粘连(如图 5B 箭头所示); 1 h 后有些菌体表面有明显孔洞出现, 表面凹凸不平, 细胞与细胞之间的界限略变模糊, 细胞形态趋向变形, 边缘模糊部分粘连在一起(如图 5C 箭头所示); 3 h 后菌体细胞

壁呈溶解状, 细胞变形破裂严重, 内容物泄漏而使菌体细胞干瘪、皱缩, 表面粗糙程度加重(如图 5D 箭头所示), 另胞外可看到许多大而明显的附着在菌体上的白色分泌物, 推测是正在外泄的细胞内容物(如图 5E 箭头所示)。

2.5.2 CP7ACP 对 S12 作用的透射电镜观察: S12 被 CP7ACP 的 2 倍稀释液处理 0.5、1、3 h 后, 用透射电镜观察其细胞的超微结构变化, 见图 6。

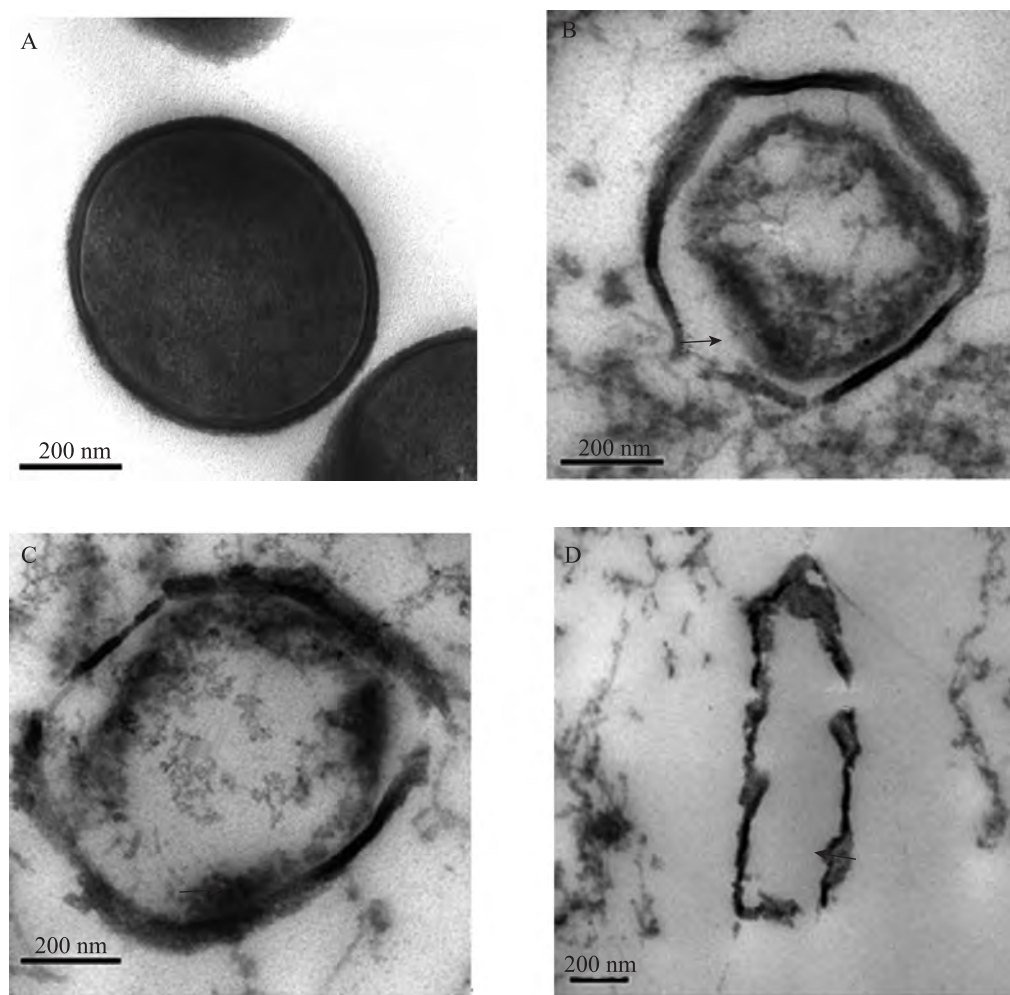


图 6 透射电镜观察 CP7ACP 处理后的 S12 (23 000×)
Fig. 6 TEM observed S12 after treated by CP7ACP (23 000×)

注: A: 正常对照; B: 处理 0.5 h; C: 处理 1 h; D: 处理 3 h.

Note: A: Control; B: 0.5 h treated; C: 1 h treated; D: 1 h treated; E: 3 h treated.

对照组菌体细胞的内膜和外膜结构完整,轮廓层次清晰、致密,胞内内容物充实且分布均匀,细胞边缘光滑,圆润(如图 6A 所示)。CP7ACP 处理 S12, 30 min 后细胞内容物出现溶解,质壁分离,细胞膜开始有破损,细胞边缘及结构层次性模糊,细胞变成不规则多边形,细胞外围可见许多短线状的絮状物(如图 6B 箭头所示); 1 h 后细胞壁破坏严重,出现许多缺损,细胞内结构模糊不清,原有的微细结构紊乱甚至消失,胞内内容物大量溢出,形成大片空白区(图 6C 箭头所示); 3 h 后细胞壁、细胞膜破损更严重,细胞变形,出现很多缺口,胞内内容物大量流失,胞内空虚,整个细胞处于崩溃状态(图 6D 箭头所示)。

3 讨论

目前认为抗菌肽杀菌的作用机制主要是其作用于病原菌的细胞壁、细胞膜,进而形成有规则结构的离子通道,胞浆完整性遭到破坏,细胞内外离子不平衡,使得离子或胞内内容物外泄,最终引起细菌死亡^[19-21]。Harder 等^[22]认为人抗菌肽 β -defensin3 能够使细胞壁形成孔洞,导致细菌死亡。徐进署等^[23]证明细胞膜结构是家蚕抗菌肽 CM4 攻击的首要靶点。而 Melittin 和 Pandinin 是通过 α -螺旋的疏水中心垂直插入到细胞膜内,破坏细胞膜的正常结构^[24-25]。本研究通过扫描电镜观察发现,受处理的菌体细胞表面变得粗糙,细胞间出现粘连,随着作用时间的延长,细胞形态变形,细胞表面出现明显缺损,内容物外泄而塌陷,菌体破裂,菌体干瘪,皱缩而坏死。透射电镜观察细胞结构也明显看到,S12 的细胞壁受损,出现孔洞;细胞膜甚至溶解,细胞器被破坏。Robert 等^[26]和 Reddy 等^[27]认为抗菌物质作用于菌体后引起细胞内无机磷、DNA 和蛋白质等生物大分子泄漏的原因是抗菌物质破坏了细胞壁,继而破坏细胞膜,细胞内大分子结构受到破坏,生化级联

反应被阻断,从而导致胞内离子的外泄,DNA 和 RNA 等核酸物质的泄漏,以及胞内 ATP 水解等,使得受处理菌液中的磷、DNA 和核酸类物质含量增多。本研究也发现受 CP7ACP 处理的 S12 菌体内无机磷和胞内生物大分子物质大量外泄,且是在短时间内发生、呈现急剧性的。此外,Boman 等^[28]和 Chatterji 等^[29]认为抗菌肽通过与细菌 DNA 结合进而阻断 DNA 的合成也是抗菌肽杀菌的原因之一。本研究发现 CP7ACP 使 S12 基因组 DNA 产生增色效应。这可能是 CP7ACP 与 DNA 表面的磷酸基团作用,或者 CP7ACP 部分结构嵌入到 DNA 分子沟槽中,使 DNA 构象趋于松散变性。综上所述,CP7ACP 的杀菌机制可能破坏 S12 的细胞壁和细胞膜,使 S12 胞内无机磷和 DNA 等生物大分子外泄或者是抗菌物质进入胞内与基因组 DNA 发生结合,引起细胞结构功能的破坏而导致细菌死亡的。

嗜水气单胞菌是在水体等环境中广泛分布的有害性细菌,能够引起淡水鱼类败血症,对水产养殖危害极大。目前对该病的防治,主要使用化学药物。然而,因长期、大量使用抗生素等化学药品,现已引起了许多病原菌产生了耐药性,并产生残留,影响了水产品的质量与食用安全。为此,采用生物防治技术或利用生物产物进行水产养殖动物嗜水气单胞菌感染症的预防和治疗受到越来越多的重视。CP7 菌株的发酵上清液有 Cpacin 抗菌肽、多粘菌素类物质和 β -1,3-1,4-葡聚糖酶等 3 种成分分别抵抗革兰氏阳性、阴性菌和真菌,本研究中的 CP7ACP 实际上包括以上 3 种物质在内的蛋白质混合物。本研究利用 CP7ACP 体外作用嗜水气单胞菌,研究表明 CP7ACP 能够抑制鱼嗜水气单胞菌在琼脂平板上生长,扫描电镜和透射电镜可明显观察到 CP7ACP 能够抑杀鱼嗜水气单胞菌。嗜水气单胞菌是革兰氏阴性菌,CP7ACP 中抑制革兰氏阴性菌的成分是多粘菌素

类物质。因此认为 CP7 菌株是嗜水气单胞菌的拮抗菌,其分泌的活性成分多粘菌素类物质能够强烈抑杀嗜水气单胞菌的生长,可以考虑通过进一步的研究开发应用于防治鱼嗜水气单胞菌引起的病害。

参 考 文 献

- [1] 贾杰. 抗生素的耐药性与抗生素的应用[J]. 中国热带医学, 2007, 7(9): 1678-1680.
- [2] 单晓枫, 张洪波, 郭伟生, 等. 嗜水气单胞菌拮抗菌的筛选[J]. 淡水渔业, 2007, 37(6): 45-47.
- [3] 宋铁英, 郑伟文. 嗜水气单胞菌的拮抗菌及其拮抗物质测定[J]. 福建农业科技, 1999(5): 14-15.
- [4] 秦生巨, 舒泉. 噬菌蛭弧菌对嗜水气单胞菌裂解作用的研究[J]. 中国微生态学杂志, 1991, 3(2): 59-61.
- [5] 周飞, 刘娟, 黎德兵. 黄鳝嗜水气单胞菌的分离鉴定及中药体外抑菌效果研究[J]. 中国畜牧兽医, 2010, 37(2): 135-137.
- [6] 彭金菊, 马驿, 罗伟英, 等. 32种中药及其复方对嗜水气单胞菌体外抑菌效果[J]. 中兽医医药杂志, 2009(6): 5-7.
- [7] 张梁. 大蒜素对嗜水气单胞菌的药效学研究[J]. 水利渔业, 2003, 23(6): 49-50.
- [8] 刘训理, 王智文, 孙海新, 等. 圆孢芽孢杆菌 A95 抗菌蛋白的分离纯化及性质研究[J]. 蚕业科学, 2006, 32(3): 357-361.
- [9] 陈海英, 廖富蘋, 林健荣, 等. CP7 菌株的抗菌活性及菌种鉴定 [J]. 中国生物防治, 2007, 23(增刊): 16-21.
- [10] 廖富苹, 林健荣, 徐凤霞, 等. 一种新的杀菌肽及其产生菌株和用途: 中国, 200710118975[P]. 2008/01/16. <http://www.apchina.com/faming/1766763/>.
- [11] 陈海英, 廖富蘋, 林健荣. *Paenibacillus polymyxa* CP7 菌抗革兰氏阴性菌活性组分的分离和结构分析[J]. 中国农业科学, 2009, 42(6): 2105-2110.
- [12] 文凤云, 廖富蘋, 林健荣, 等. 多粘类芽孢杆菌 CP7 β -1, 3-1, 4-葡聚糖酶基因的克隆、表达及应用[J]. 中国农业科学, 2010, 43(22): 4614-4623.
- [13] Hultmark D, Steiner H, Rasmuson T, et al. Insect immunity. Purification and properties of three inducible bactericidal proteins from hemolymph of immunized pupae of *Hyalophora cecropia*[J]. European Journal of Biochemistry, 1980, 106(1): 7-16.
- [14] 李仪奎. 中药药理实验方法学[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1991: 289-291.
- [15] Newton BA. The release of soluble constituents from washed cells of *Pseudomonas aeruginosa* by the action of Polymyxin[J]. Microbiology, 1953, 9(1): 54-64.
- [16] 陈念. 万隆霉素对细菌抑制作用机理的研究[D]. 广州: 华南农业大学硕士学位论文, 2005.
- [17] 邹文政, 张俊杰, 鄢庆枇, 等. 嗜水气单胞菌感染后牛蛙血清中抗菌物质的初步研究[J]. 水产学报, 2007, 31(1): 62-67.
- [18] 宫霞, 施用晖, 乐国伟. 抗菌活性肽与细菌染色体 DNA 的相互作用机理[J]. 自然科学进展, 2004, 14(5): 509-513.
- [19] Minahk CJ, Farias ME, Sesma F, et al. Effect of Enterocin CRL35 on *Listeria monocytogenes* cell membrane[J]. FEMS Microbiology Letters, 2000, 192(1): 79-83.
- [20] 蒙显英, 黎起秦, 冯家勋, 等. 芽孢杆菌产生的抗菌物质的研究进展[J]. 中国植保导刊, 2004, 24(12): 13-15.
- [21] Dekker N, Cox RC, Kramer RA, et al. Substrate specificity of the integral membrane protease OmpT determined by spatially addressed peptide libraries[J]. Biochemistry, 2001, 40(6): 1694-1701.
- [22] Harder J, Bartels J, Christophers E, et al. Isolation and characterization of human β -defensin-3, a novel human inducible peptide antibiotic[J]. Journal of Biological Chemistry, 2001, 276(8): 5707-5713.
- [23] 徐进署, 张双全. 家蚕抗菌肽 CM4 组分杀菌机理

- 的激光共聚焦显微镜观察[J]. 自然科学进展, 2001, 11(10): 1105-1109.
- [24] Toraya S, Nishimura K, Naito A. Dynamic structure of vesicle-bound melittin in a variety of lipid chain lengths by solid-state NMR[J]. Biophysical Journal, 2004, 87(5): 3323-3335.
- [25] Nomura K, Corzo G, Nakajima T, et al. Orientation and pore-forming mechanism of a scorpion pore-forming peptide bound to magnetically oriented lipid bilayers[J]. Biophysical Journal, 2004, 87(4): 2497-2507.
- [26] Hancock REW. Cationic peptides: effectors in innate immunity and novel antimicrobials[J]. The Lancet Infectious Disease, 2001, 1(3): 156-164.
- [27] Reddy KVR, Yedery RD, Aranha C. Antimicrobial peptides: premises and promises[J]. International Journal of Antimicrobial Agents, 2004, 24(6): 536-547.
- [28] Boman HG, Agerberth B, Boman A. Mechanisms of action on *Escherichia coli* of cecropin pI and PR-39, two antibacterial peptides from pig intestine[J]. Infection and Immunity, 1993, 61(7): 2978-2984.
- [29] Chatterji M, Unniraman S, Mahadevan S, et al. Effect of different classes of inhibitors on DNA gyrase from *Mycobacterium smegmatis*[J]. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2001, 48(4): 479-485.



(上接 p. 948)

征 稿 简 则

3.3 摘要写作注意事项

3.3.1 英文摘要: 1) 建议使用第一人称, 以此可区分研究结果是引用文献还是作者得出的; 2) 建议用主动语态, 被动语态表达拖拉模糊, 尽量不用, 这样可以避免长句, 以求简单清晰; 3) 建议使用过去时态, 要求语法正确, 句子通顺; 4) 英文摘要的内容应与中文摘要一致, 但可比中文摘要更详尽, 写完后务必请英文较好且专业知识强的专家审阅定稿后再返回编辑部。

5) 摘要中不要使用缩写语, 除非是人人皆知的, 如: DNA, ATP 等; 6) 在英文摘要中, 不要使用中文字体标点符号。

3.3.2 关键词: 应明确、具体, 一些模糊、笼统的词语最好不用, 如基因、表达.....

4 特别说明

4.1 关于测序类论文

凡涉及测定 DNA, RNA 或蛋白质序列的论文, 请先通过国际基因库 EMBL (欧洲)或 GenBank (美国)或 DDBJ (日本), 申请得到国际基因库登录号 (Accession No.)后再投来。

4.2 关于版权

4.2.1 本刊只接受未公开发表的文章, 请勿一稿两投。

4.2.2 凡在本刊通过审稿、同意刊出的文章, 所有形式的 (即各种文字、各种介质的) 版权均属本刊编辑部所有。作者如有异议, 敬请事先声明。

4.2.3 对录用的稿件编辑部有权进行文字加工, 但如涉及内容的大量改动, 将请作者过目同意。

4.2.4 文责自负。作者必须保证论文的真实性, 因抄袭剽窃、弄虚作假等行为引发的一切后果, 由作者自负。

4.3 审稿程序及提前发表

4.3.1 来稿刊登与否由编委会最后审定。对不录用的稿件, 一般在收稿 2 个月之内通过 E-mail 说明原因, 作者登陆我刊系统也可查看。稿件经过初审、终审通过后, 作者根据编辑部返回的退修意见进行修改补充, 然后以投稿时的用户名和密码登陆我刊系统上传修改稿, 待编辑部复审后将给作者发稿件录用通知单, 稿件按照稿号顺序进入排队发表阶段。

4.3.2 对投稿的个人和单位一视同仁。坚持文稿质量为唯一标准, 对稿件采取择优先登的原则。如作者要求提前发表, 请在投稿的同时提出书面报告, 说明该研究成果的重要性、创新性、竞争性和提前发表的必要性, 经过我刊的严格审查并通过后, 可予提前刊出。

5 发表费及稿费

论文一经录用, 将在发表前根据版面收取一定的发表费并酌付稿酬、赠送样刊。

6 联系我们

地址: 北京市朝阳区北辰西路 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(100101)

Tel: 010-64807511

E-mail: tongbao@im.ac.cn

网址: <http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>