

肽核酸探针在微生物诊断领域的应用进展

李可¹ 张晓峰^{1*} 王忠才² 吴珊¹ 帅江冰¹

(1. 浙江出入境检验检疫局 浙江 杭州 310016)

(2. 温州出入境检验检疫局 浙江 温州 325027)

摘要: 肽核酸(Polyamide nucleic acid, PNA)是以中性酰胺键为骨架的脱氧核糖核酸(DNA)结构类似物,它可以特异性地与DNA杂交,且具有极高的生物稳定性。相比较传统的DNA探针技术,肽核酸探针以其特殊的结构和性质在食品、环境及临床等微生物快速诊断领域显示出独特的优势。就肽核酸探针在微生物诊断方面的应用进展做简要综述。

关键词: 肽核酸, 微生物诊断, 探针

Application of peptide nucleic acid probes in microbiological diagnostics

LI Ke¹ ZHANG Xiao-Feng^{1*} WANG Zhong-Cai² WU Shan¹
SHUAI Jiang-Bing¹

(1. Zhejiang Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Hangzhou, Zhejiang 310016, China)

(2. Wenzhou Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Wenzhou, Zhejiang 325027, China)

Abstract: Polyamide nucleic acid (PNA) molecules are DNA mimics with neutral acrylamide bonds as tskeleton. PNA could combine specifically with targeting DNA and the PNA-DNA duplex exhibits higher thermal stability than the corresponding DNA-DNA duplex. Due to their specific structure and characteristics, PNA probes have recently been developed and applied to a variety of microbiological diagnostics fields, such as food, environmental and clinical assay, which go above and beyond the possibility of DNA probes. Here we summarize

基金项目: 国家质检总局科技计划项目(No. 2005IK564)

*通讯作者: Tel: 86-571-81100338; 信箱: zxf@ziq.gov.cn

收稿日期: 2011-10-16; 接受日期: 2012-01-12

the recent application of PNA probes in the realm of microbiological diagnostics.

Keywords: PNA, Microbiological diagnostics, Probe

肽核酸是 1991 年由丹麦有机化学家 Ole Buchardt 和生物化学家 Peter Nielsen 经数年潜心研究, 经计算机构建并最终人工合成的一种以中性酰胺键为骨架的全新 DNA 类似物, 它可以序列特异地与 rRNA 结合, 其骨架结构单元为 N(2-氨基乙基)-甘氨酸, 碱基部分通过亚甲基羰基连接于主骨架的氨基 N 上。其骨架为电中性, 与 DNA-DNA 或 RNA-DNA 互补链相比不存在静电排斥作用, 因此具有很高的 DNA 或 RNA 亲及热稳定性^[1]。由于其特殊的结构特点, 肽核酸已被应用于各种各样的研究和诊断领域, 例如基因点突变的分析、染色体分析、人体病理学、病毒学、真菌、细菌等领域^[2-4]。

根据不同微生物的特点和诊断方法的要求, 目前微生物的快速诊断主要有 3 种策略: (1) 样品的直接检测, 例如 PCR 检测, 其中荧光定量 PCR 是较快的一种方法; (2) 检测前经过较短时间的菌体富集, 与传统的培养鉴定相比获得结果的速度更快; (3) 分离培养后的快速鉴定。针对 rRNA 的肽核酸探针已经成功应用于以上 3 种方式的诊断, 由于肽核酸与核酸结合的高特异性和敏感性等特点, 在此基础上已经发展了多种形式的检测模式, 如基于显微镜载玻片的荧光原位杂交、基于滤膜的荧光原位杂交、化学发光原位杂交、液相杂交、淬灭剂标记的肽核酸(Q-PNA) PCR 等技术。随着多态性微生物分类学及生物信息学的发展, 两者共同推进了微生物快速诊断技术的飞速发展。

1 肽核酸探针

肽核酸因其卓越的化学和生物稳定性及化学合成的灵活性使其作为探针在微生物诊断领域

显示出独特的优势。肽核酸探针一般是指特定序列的 13-18 个碱基的短肽核酸, 其长度比 DNA 探针更短。电中性的骨架使它具有了比 DNA 更高的杂交亲和性, 同时碱基配对的特异性也明显提高, 能够通过单碱基错配来分辨不同的核酸序列。杂交条件也比 DNA 探针温和, 低盐浓度下不影响杂交。而且非天然的肽骨架能够抵抗核酸酶及蛋白酶的降解, 生物稳定性高。

1.1 自身报告的 PNA 探针

LightUP 探针(LightUP 公司, 哥德堡, 瑞典)和 LightSpeed 探针(Boston 探针公司, 贝德福德, 麻萨诸塞州, 美国)均是荧光标记的肽核酸探针, 它们在与靶序列结合之前是不发出荧光或自身淬灭的。当它们与目标序列互补结合时, 探针就会发出荧光。这种探针的优点是在杂交后可以省去分离和洗涤步骤。LightUp 探针是偶联有噻唑橙染料的肽核酸探针, LightSpeed 探针是双标记的探针, 即在肽核酸分子的两端分别连上荧光染料和淬灭剂, 在水溶液环境中, LightSpeed 探针的构象使荧光染料和淬灭染料彼此靠得很近, 荧光被淬灭。当探针与靶序列结合时, 荧光剂和淬灭剂在空间上得到分开, 使肽核酸的荧光染料发出荧光^[5]。噻唑橙标记的 LightUp 探针在非杂交状态下是内在非荧光的, 当探针与核酸靶标或杂交体相互作用以后发出荧光^[6]。但这种发光效应与肽核酸的序列有很大程度的相关性, 目前这种关系机制还没有完全清楚。这两种探针都可以用于实时 PCR 分析, 并且具有很高的敏感性和特异性。

1.2 Q-PNA PCR

近年研制出的另一种实时检测扩增子的方法即淬灭剂标记的肽核酸 PCR, 其原理是采用一种

淬灭剂标记肽核酸来淬灭荧光染料标记的 DNA 引物产生的荧光信号^[5]。在一条引物上加上一短标签序列及末端荧光标记, 淬灭剂标记的肽核酸与标签序列互补, 使得淬灭剂与荧光染料靠近。Q-PNA/引物双链体的 T_m 值应在 PCR 的退火与延伸温度之间。在 PCR 过程中随着引物嵌入扩增子, Q-PNA 被置换出来, 因此标记引物的荧光素解除淬灭, 发出荧光。与传统 PCR 相比, Q-PNA PCR 的特异性也是通过引物的保真性来测定的。在此基础上, 采用具有不同标记的引物混合物, 可以进行多重 PCR 分析^[7]。此外, 还可以将其与自身报告的肽核酸探针结合运用, Q-PNA 部分产生的信号可作为扩增反应的内对照, 自身报告 PNA 探针用来对扩增子进行特异性鉴定。

1.3 肽核酸阻断探针

肽核酸探针与 DNA 探针相比特异性虽然明显增强, 但其特异性还不能足够精确区分与靶标分子亲缘关系非常接近的序列分子。在这种情况下, 我们可以通过非标记的阻断探针来屏蔽非靶标序列, 减少标记探针的错误结合, 提高其特异性^[8]。肽核酸阻断探针有时和其他封闭物在分子生物学实验中同时使用。例如, 基于滤膜在原位杂交实验中, 可以通过和酪蛋白、白蛋白、小牛血清、明胶的混合使用, 以消除标记探针与膜的非特异结合, 提高特异性。尽管肽核酸阻断探针仅与标记探针有微弱的靶标结合竞争效应, 但却使荧光信号有了明显增加。我们可以调整阻断探针的浓度, 不断优化杂交方案, 从而使特异性达到最佳。

2 肽核酸在微生物诊断领域的应用

2.1 直接检测和鉴定

不经培养而直接对样品中的致病菌或污染物进行检测是快速诊断所追求的最终目标。近几十年来, 各种各样的诊断方法如染色技术已经直接

用于微生物的检测, 但只能对可疑微生物进行推测性鉴定, 而不能提供精确的结果。分子生物学方法, 如荧光原位杂交(FISH)、PCR 等可直接用于检测鉴定特定的微生物, 成为现代微生物诊断的重要方法, 直接指导临床用药和食品的储存管理。

2.1.1 PNA 荧光原位杂交技术(PNA-FISH)直接检测微生物: PNA-FISH 技术已成为微生物检测的一种新兴技术。无乳链球菌(又称为 B 群链球菌, GBS), 是新生儿和女性生殖道受感染的重要病菌, 尤其新生儿的感染可能会危及生命, 其并发症包括败血症、肺炎和脑膜炎等, 因此, 对怀孕特别是围产期妇女的病原菌检测十分必要, 然而目前通用的平板培养法的假阴性率高达 50%。Peltroche-Llacsahuanga 等将 PNA-FISH 方法应用于棉拭子标本中无乳链球菌的检测, 表现出很高的敏感性和特异性, 值得一提的是, 本法适用于无乳链球菌的所有血清型(包括溶血株和非溶血株)^[9]。杂交的条件相对温和, 但 PNA 依然能够穿透细菌细胞壁, 而且保持完好的细菌形态, 并且相比 DNA-FISH 而言, PNA-FISH 大大节约了检测时间。可能是因为 PNA 的疏水性比 DNA 更强, Lehtola 等还用滤膜过滤饮用水样品后直接在滤膜上进行荧光原位杂交来检测大肠弯曲杆菌^[10]。此外荧光原位杂交技术广泛用于分析复杂环境的微生物群落构成, 可以在自然生境中监测和鉴定微生物, 并能对未被培养的微生物进行检测。以 rRNA 为靶序列的 PNA 探针荧光原位杂交技术能提供微生物的形态学、数量、空间分布等信息, 现已成为环境科学研究领域中的热点技术。

2.1.2 改良 PCR 检测微生物: 常规 PCR 技术已经被广泛用于微生物的诊断领域, 然而到目前为止 FDA 认可用于体外诊断的产品只限于部分病毒以及少数临床重要的细菌, 如结核分枝杆菌、淋球菌和沙眼衣原体。PCR 鉴定必须在扩增后对

产物进行电泳或杂交作为最后确认的依据, 随后发展的荧光 PCR 技术可省略扩增后的鉴定。最近利用 PNA 研制出的 LightUp 探针、LightSpeed 探针结合 Q-PNA PCR 方法, 可用于对扩增产物进行实时检测。其原理是用特定的引物来扩增靶标片段, 并以荧光标记的 LightSpeed PNA 探针特异性结合扩增产物, 发出信号以达到实时监测的效果。利用 Q-PNA PCR 还可同时对沙眼衣原体和淋球菌进行双色检验^[7]。

2.2 培养增菌后鉴定

2.2.1 增菌后鉴定及计数: Stender 用 Cy-3 标记的 PNA 探针与过滤后培养 5 h 的大肠杆菌 16S rRNA 进行杂交, 然后对滤膜进行 PNA 荧光原位杂交分析, 研究发现荧光点代表着滤膜表面大肠杆菌菌落数, 在高于 100 CFU 的情况下仍然有很好的相关性, 扫描仪对相邻菌落有足够的分析分辨能力^[11]。

Esiobu 将海水样品中的微生物经 PVDF 膜过滤, 将其贴在胰蛋白大豆琼脂平板上培养 5 h, 在滤膜上用以过氧化物酶标记的 PNA 探针(以 16S rRNA 片段的特异性序列设计), 与过滤膜上的菌落进行原位杂交, 过氧化物酶与化学发光底物反应产生的光信号经数字摄像系统捕获, 被扫描到电脑, 根据每一个斑点代表一个菌落的原理, 最终得出样品中所含目标菌的数量^[12]。总之, 此方法可以将检测、鉴定和计数一次性完成, 提高工作效率。

2.2.2 基于玻片的固相 PNA-FISH: 1999 年, 丹麦的 DAKO 公司首次研制成功基于玻片的 PNA-FISH 技术, 用于检测抗酸染色为阳性的结核分枝杆菌和非分枝杆菌。其基本方法是将细菌培养物按照标准方法制成涂片, 采用火焰固定或其他化学方法固定, 然后滴加杂交缓冲液, 55 °C 孵育 90 min, 用洗涤液漂洗 30 min, 最后荧光显微镜观察。菌体不需要任何消化处理, PNA 探针

能直接穿透细胞壁进入细胞与 rRNA 进行杂交。Wilson 利用 PNA-FISH 技术检测血液培养物中分离的白色念珠菌, 并对该方法进行了评价试验, 发现其敏感性、特异性、阳性预测值与阴性预测值分别为 99%、100%、100%与 99.3%, 可成功用于临床样品的检测, 并为制定合理的治疗方案提供了重要依据^[13]。1995 年以前, 柏林假丝酵母菌一直被误认为与白色念珠菌是同一种真菌, 因为传统的表型分析无法将它们区分; 此后发展了各种各样的生化及分子生物学方法用来鉴定这两种致病性真菌, 其中以 rRNA 基因序列作为种族进化标志, 设计作用于种特异的 rRNA 序列的 PNA 探针, 可成功区分这两种病原菌^[14]。

Peleg 等利用标记颜色不同的两个探针, 同时对 60 份临床标本的好氧异养硝化菌和铜绿假单胞菌进行了检测, 发现对好氧异养硝化菌的检测灵敏度和特异性均达到了 100%, 发现其对铜绿假单胞菌则分别达到了 100%和 95%。在与同时进行的传统生化鉴定法进行对比时, 仅发现了两个假阳性结果, 而且在随后的重复性实验中, 上述两个假阳性结果的微弱信号消失^[15]。这种快速而且准确的诊断技术, 不仅可以加快确定合理治疗方案的进程, 而且可帮助优化控制传染的干预手段, 在临床上有着极大的应用前景。最近, Almeida 等通过实验, 确认 PNA 探针对血液和婴儿西方奶粉样品中沙门氏菌的检测限量可达到 1 CFU/10 mL (g), 而且在目标菌不占微生物总量优势的情况下, 也能保持良好的灵敏度, 整个检测时间仅需不到 20 h, 比常规的 PCR 检测周期还要短^[16]。

笔者所在课题组将固相 PNA-FISH 技术应用李斯特菌的检测, 取得了令人满意的结果。实验者分别针对李斯特菌属、李斯特菌属中对动物有致病作用的单核细胞增生李斯特菌和伊氏李斯特菌设计了相应的 PNA 探针(Lis-16S-1,

Lm-16S-2, Liv-16S-5), 通过 19 个李斯特菌属的菌株和 8 个关系较为密切的其他属的菌株验证了这 3 个探针的灵敏度和特异性: Lis-16S-1 能与实验中所有 6 个种的 19 株李斯特菌杂交 (由于没有 *L. marthii* 和 *L. rocourtiae* 的菌株, 因此未加以验证), 探针 Lm-16S-2 只能和 9 株单核细胞增生李斯特菌杂交, 探针 Liv-16S-5 则只能和伊氏李斯特菌杂交; 在特异性实验中, 3 个探针均未与非目标细菌杂交。同时, 从对食品样品的检测结果来看, PNA 鉴定方法与国际微生物鉴定金标准——API 方法也取得了高度一致, 符合率达 100%。相关论文正在修回中。

2.2.3 液相 PNA-FISH: 在载玻片及滤膜的 PNA-FISH 技术的基础上, Perry-O'Keefe 等建立了一种可用于荧光显微镜或流式细胞仪的液相 PNA-FISH 新方法。其原理是将待检的菌体经洗涤固定后与含 PNA 探针的缓冲液杂交, 最后涂片镜检或用流式细胞仪检测其荧光信号。Perry-O'Keefe 设计了分别针对葡萄球菌、巴氏杆菌、绿脓假单胞菌和沙门氏菌的 4 种 PNA 探针, 二乙基氨基香豆素(DEAC)标记的 PNA 探针靶向作用于沙门氏菌 23S rRNA, 花青(Cy-5)标记的 PNA 靶向于大肠杆菌 16S rRNA, Cy-3 标记的 PNA 探针靶向于金黄色葡萄球菌的 16S rRNA, 绿色荧光素标记的 PNA 探针靶向于绿脓假单胞菌 16S rRNA。用上述 4 种不同荧光素标记的 PNA 探针混合物对 4 种细菌混合物样品进行多重荧光分析, 分别选择不同的荧光滤片在荧光显微镜观测结果, 可同时鉴定 4 种微生物^[17]。此外, Byron 等针对李斯特菌属特异的 16S rRNA 为靶标的 PNA 探针, 用液相杂交的方法通过荧光显微镜和流式细胞仪检测荧光信号, 可以检测李斯特菌属中除 *L. grayi* 以外的 6 种李斯特菌^[18]。虽然迄今 PNA-FISH 技术在微生物检测领域仅应用于上述几种微生物, 但它可以在最短的时间内直

接用于病原菌、食品腐败菌及环境微生物的检测, 在微生物检测领域有着极大的发展空间。

3 结论与展望

目前微生物的检测手段仍主要依赖于传统的培养、血清抗体检测和生化特征鉴定等方法, 这些方法存在着操作过程复杂、繁琐和耗时长等缺陷, 从而制约了对食源性疾病的监测、溯源、鉴定、预警和控制能力的提高。PCR 技术具有操作简便、快速、灵敏度高等特点, 是目前研究和应用较多的快速检测方法。但 PCR 方法在近年来的实践应用中表明, 食品和培养基中存在的抑制剂可影响 PCR 反应, 使检测结果呈假阴性^[19-20]。尽管人们对 PCR 方法进行了不断的改进和完善, 却不能有效地阻止假阴性结果的发生, 因此当今微生物检测的金标准仍然是传统培养法。

其实, 上述 PNA 探针在微生物检测领域的运用并没有改变传统的检测模式, 相反, 将 PNA 探针的高敏感性和特异性应用到微生物检测方法中, 其样品的前处理, 和某些获取结果的方式与传统的检测技术非常相似, 可以直接得到确切的结果, 无需再进行其他检测。因此, 美国食品和药物管理局(FDA)推荐核酸荧光原位杂交技术用于快速检测血液中的某些致病菌。此外, 荧光染料作为 PNA 探针直接检测的标记物, 使得检测方式简单化, 用不同染料标记可以实现同时对多种微生物的多重分析。与此同时, 自动杂交设备以及基于标准显微镜载玻片的高精度荧光扫描仪不断地诞生和更新满足了高通量筛选微生物的要求, 如基于滤膜的 PNA-FISH 结合扫描技术可以精确地同时完成对细菌的检测鉴定和计数。

当然, PNA 探针在微生物诊断的实际应用中也存在一定局限性。首先, PNA 探针一般只有 13-18 个碱基, 尽管能识别到一个碱基的差异,

但以如此短的核酸序列来区分不同种属间的细菌, 难度更大, 对探针设计必然有更高的要求。第二, 有研究发现, 某些细菌有明显的自发荧光现象^[16], 这对实验者在结果的判定方面造成困扰。未来分子诊断的发展趋势主要是一方面通过精密的分析仪器来不断优化其特异性敏感性, 显著提高检测通量; 另一方面, 通过对肽核酸的不断深入研究和对其骨架的修饰及碱基类似物的寻找, 开发具有更加稳定的结构和高度特异亲和力的肽核酸, 最终研制出更简洁, 更灵敏的检测技术, 充分挖掘 PNA 作为诊断工具的潜力, 为将来开发独特的微生物诊断模式和试剂盒奠定基础。不可否认, PNA 探针在食品、环境样品、临床等方面有广阔的应用前景, 相信随着技术的不断完善, 它的表现将会日臻完美。

参 考 文 献

- [1] Cerqueira L, Azevedo NF, Almeida C, et al. DNA mimics for the rapid identification of microorganisms by fluorescence in situ hybridization (FISH)[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2008, 9(10): 1944–1960.
- [2] Pellestor F, Paulasova P. The peptide nucleic acids (PNAs), powerful tools for molecular genetics and cytogenetics[J]. *European Journal of Human Genetics*, 2004, 12(9): 694–700.
- [3] Sforza S, Corradini R, Tedeschi T, et al. Food analysis and food authentication by peptide nucleic acid (PNA)-based technologies[J]. *Chemical Society Reviews*, 2011, 40(1): 221–232.
- [4] Morgan M, Marlowe E, Della-Latta P, et al. Multicenter evaluation of a new shortened peptide nucleic acid fluorescence in situ hybridization procedure for species identification of select Gram-negative *Bacilli* from blood cultures[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2010, 48(6): 2268–2270.
- [5] Gildea BD, Coull JM, Hyldig-Nielsen JJ, et al. Methods, kits and compositions pertaining to linear beacons[P]. WO. A-9921881, 1999.
- [6] Seitz O, Bergmann F, Heindl D. A convergent strategy for the modification of peptide nucleic acids: novel mismatch-specific PNA-hybridization probes[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 1999, 38(15): 2203–2206.
- [7] Fiandaca MJ, Hyldig-Nielsen JJ, Gildae BD, et al. Self-reporting PNA/DNA primers for PCR analysis[J]. *Genome Research*, 2001, 11(4): 609–613.
- [8] Stender H, Broomer AJ, Oliveira K, et al. Rapid detection, identification, and enumeration of *Escherichia coli* cells in municipal water by chemiluminescent in situ hybridization[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, 67(1): 142–147.
- [9] Peltroche-Llacsahuanga H, Fiandaca MJ, von Oy S, et al. Rapid detection of *Streptococcus agalactiae* from swabs by peptide nucleic acid fluorescence in situ hybridization[J]. *Journal of Medical Microbiology*, 2010, 59(2): 179–184.
- [10] Lehtola MJ, Loades CJ, Keevil CW. Advantages of peptide nucleic acid oligonucleotides for sensitive site directed 16S rRNA fluorescence in situ hybridization (FISH) detection of *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli* and *Campylobacter lari*[J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2005, 62(2): 211–219.
- [11] Stender H, Oliveira K, Rigby S, et al. Rapid detection, identification, and enumeration of *Escherichia coli* by fluorescence in situ hybridization using an array scanner[J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2001, 45(1): 31–39.
- [12] Esiobu N. Use of peptide nucleic acid probes for rapid detection and enumeration of viable bacteria in recreational waters and beach sand[J]. *Methods of Molecular Biology*, 2006, 345: 131–140.
- [13] Wilson DA, Joyce MJ, Hall LS, et al. Multicenter evaluation of a *Candida albicans* peptide nucleic acid fluorescent in situ hybridization probe for characterization of yeast isolates from blood cultures[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2005, 43(6): 2909–2912.
- [14] Oliveira K, Haase G, Kurtzman C, et al. Differentiation of *Candida albicans* and *Candida*

- dublinsiensis* by fluorescent in situ hybridization with peptide nucleic acid probes[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2001, 39(11): 4138–4141.
- [15] Peleg AY, Tilahun Y, Fiandaca MJ, et al. Utility of peptide nucleic acid fluorescence in situ hybridization for rapid detection of *Acinetobacter* spp. and *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2009, 47(3): 830–832.
- [16] Almeida C, Azevedo NF, Fernandes RM, et al. Fluorescence *in situ* hybridization method using a peptide nucleic acid probe for identification of *Salmonella* spp. in a broad spectrum of samples[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2010, 76(13): 4476–4485.
- [17] Perry-O’Keefe H, Rigby S, Sorensen DS, et al. Multicolor multiplex microbial Identification using PNA probes targeting rRNA (abstract). CLCHAU, 2000, 46(S11): A23.
- [18] Byron-Stecher BF, Hyldig-Nielsen JJ, Johnson EA. Design and evaluation of 16S rRNA-targeted peptide nucleic acid probes for whole-cell detection of members of the genus *Listeria*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2005, 71(9): 5451–5457.
- [19] Eriksson E, Aspan A. Comparison of culture, ELISA and PCR techniques for *Salmonella* detection in faecal samples for cattle, pig and poultry[J]. BMC Veterinary Research, 2007, 3: 21.
- [20] Fakhr MK, McEvoy JM, Sherwood JS, et al. Adding a selective enrichment step to the iQ-Check™ real-time PCR improves the detection of *Salmonella* in naturally contaminated retail turkey meat products[J]. Letters in Applied Microbiology, 2006, 43(1): 78–83.

征订启事

2012 年中科院微生物所期刊联合编辑部联合征订

	《微生物学通报》月刊(每月 20 日出版), 单价 58.00 元, 年价 696 元。刊号: ISSN 0253-2654; CODEN WSWPDI。国内邮发代号: 2-817; 国外邮发代号: BM413。
	《微生物学报》月刊(每月 4 日出版), 单价 55.00 元, 全年定价 660 元。刊号: ISSN 0001-6209; CODEN WSHPA8。国内邮发代号: 2-504; 国外邮发代号: BM67。
	《生物工程学报》月刊(每月 25 日出版), 单价 65.00 元, 全年定价 780 元。刊号: ISSN 1000-3061; CODEN SGXUED。国内邮发代号: 82-13; 国外邮发代号: BM5608。
	《菌物学报》双月刊(单月 15 日出版), 单价 80 元, 全年定价 480 元。刊号: ISSN 1672-6472; CODEN JXUUAЕ。国内邮发代号: 2-499; 国外邮发代号: Q723。
订阅	欢迎广大读者直接与本刊发行部联系订购, 我们将按期免费为您邮寄。
	汇款地址: (100101)北京市朝阳区北辰西路 1 号院 3 号中科院微生物所
	收款人: 《 》编辑部; 电话: 010-64806142; E-mail: bjb@im.ac.cn
	请在附言处注明“订刊费”及所订期刊名称、年代、卷、期和数量。