

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
55 (1) :107 - 113; 4 January 2015
ISSN 0001 - 6209; CN 11 - 1995/Q
http://journals.im.ac.cn/actamicrocn
doi: 10.13343/j.cnki.wsxb.20140144

吸水链霉菌 HS023 *milF* 基因敲除构建产 5-酮米尔贝霉素基因工程菌

黄隽, 林甲檀, 周敏, 白骅

浙江海正药业股份有限公司, 浙江 台州 318000

摘要:【目的】通过敲除吸水链霉菌 HS023 的 *milF* 基因, 构建产 5-酮米尔贝霉素的基因工程菌。【方法】构建 *milF* 基因敲除质粒 pMSST- Δ milF, 转入米尔贝霉素产生菌——吸水链霉菌 HS023, 获得 *milF* 基因敲除的双交换突变株 F2-18。【结果】发酵结果表明: *milF* 基因敲除突变株 F2-18 不再产生米尔贝霉素, 仅产生中间产物 5-酮米尔贝霉素, 且发酵单位较出发菌株略有提升。【结论】通过敲除 *milF* 基因, 发酵可生产 5-酮米尔贝霉素, 并直接用于驱虫药米尔贝肟和乐平霉素的化学合成, 可大大简化从米尔贝霉素到米尔贝肟和乐平霉素的合成步骤。

关键词: 吸水链霉菌, 基因 *milF*, 基因敲除, 5-酮米尔贝霉素

中图分类号: Q933 **文章编号:** 0001-6209 (2015) 01-0107-07

米尔贝霉素 (milbemycins, 图 1-A) 是一种大环内酯类驱虫药物, 日本三共株式会社于 1975 年发现, 经过多年的改良于 1986 年正式以商品名米尔贝肟 (milbemycin oxime, 图 1-B) 上市。米尔贝肟是米尔贝霉素 A3 和 A4 的肟衍生物, 对控制和预防大部分常见寄生虫疾病都有很好的效果。由于米尔贝肟杀虫活性高、毒性小, 同时对阿维菌素类药物敏感的犬毒性较小^[1], 所以具有很好的市场前景。

米尔贝肟较为普遍的是通过半合成的方法生产^[2]。首先由发酵得到米尔贝霉素 A3/A4, 然后将其 C5-羟基氧化成酮。这种 5-酮米尔贝霉素与盐酸羟胺在二噁烷-甲醇-水中发生反应, 得到米尔贝肟。显然, 如果能获得直接产 5-酮米尔贝霉素的菌株,

将缩短米尔贝肟的生产工艺。

乐平霉素 (lepimectin, 图 1-C) 是日本三井化学公司开发的 16 元环生物源杀虫剂, 它对鳞翅目害虫具速效, 并且效果十分明显。目前它被广泛用于蔬菜、果树、茶树及花卉等作物^[3]。目前乐平霉素比较成熟的生产工艺也是从米尔贝霉素出发, 氧化保护 C5 位成 5-酮米尔贝霉素后, 再经过一系列化学反应得到 5-酮乐平霉素, 最后将 C5 位的酮基还原得到乐平霉素^[4]。

因此, 5-酮米尔贝霉素是重要的化学中间体。

目前用于生产米尔贝霉素 A3/A4 的链霉菌主要有吸水链霉菌 (*Streptomyces hygroscopicus*)^[5] 和冰城链霉菌 (*Streptomyces bingchengsis*)^[6]。其中冰城

基金项目: 国家“863 计划”(2012AA022107)

作者简介: 黄隽 (1978 -), 男, 浙江黄岩人, 高级工程师, 硕士, 主要从事工业生产菌的基因改造。Tel: +86-576-88820587; Fax: +86-576-88828299; E-mail: huangj@hisuhpharm.com

收稿日期: 2014-03-21; 修回日期: 2014-06-06

链霉菌 *Streptomyces bingchengsis* sp. nov. (CGMCC 序完成。
NO:1734) 的基因组 (GenBank: FJ560599.2) 已经测

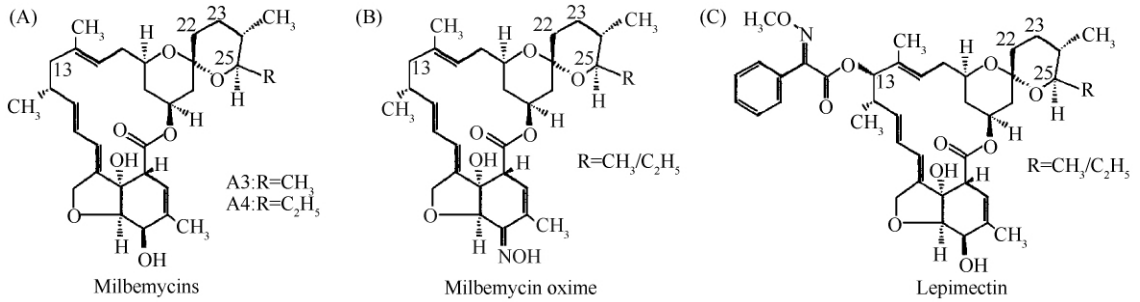


图 1. 米尔贝霉素^[2]、米尔贝胂^[1]和乐平霉素^[3]的化学结构

Figure 1. Structures of milbemycins^[2], milbemycin oxime^[1] and lepimectin^[3].

Nonaka 等^[7]报道了吸水链霉菌推测的米尔贝霉素 A3/A4 的生物合成途径:先形成 5-酮米尔贝霉素,再在 *milF* 基因编码的 C5-酮还原酶作用下将 C5 位还原成羟基,得到米尔贝霉素 A3/A4。因此,通过 *milF* 基因的敲除,理论上能够得到产 5-酮米尔贝霉素的基因工程菌。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 质粒和菌株:表 1 为本实验所用的质粒和菌株。

表 1. 本实验所用的质粒和菌株

Table 1. Strains and plasmids used in this work

Strains or plasmids	Characteristics	Source
<i>S. hygroscopicus</i> HS023	milbemycin industrial strain	Hisun
<i>E. coli</i> DH5 α	ϕ 80 <i>LacZ</i> Δ M15, <i>deoR</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i>	Stored in this lab
<i>E. coli</i> ET12567 (pUZ8002)	<i>dam</i> , <i>dcm</i> , <i>hsdS</i> , <i>cat</i> , <i>tet</i>	Stored in this lab
<i>S. hygroscopicus</i> F2-18	in-frame deleted <i>milF</i> mutant of <i>S. hygroscopicus</i> HS023	This study
pMD19-Simple	cloning vector, 2.7kb, <i>bla</i> , <i>lacZ</i> (α)	TaKaRa
pMD19-T	T-vector, 2.7kb, <i>bla</i>	TaKaRa
pSET152	integrating plasmid, 5.5kb. <i>aac</i> (3) IV, <i>lacZ</i> (α), oriT	Stored in this lab
pBlueScript SK (+)	cloning vector, 3.0kb, <i>bla</i> , <i>lacZ</i> (α)	Stored in this lab
pIJ778	<i>bla</i> , <i>aadA</i> , oriT	Gust et al. ^[8]
pMSST2	conjugative vector, 4.0kb. <i>bla</i> , <i>aadA</i> , oriT, <i>lacZ</i> (α)	This study
pMSST-milF12	pMSST2 inserted with 6.5kb milF1/milF2 PCR product containing <i>milF</i>	This study
pBluKS-milF	pBlueScript SK (+) inserted with 1.9kb KpnI-EcoRV fragment from pMSST-milF12, containing <i>milF</i>	This study
pBluKS- Δ milF	pBlueScript SK (+) containing in-frame deleted <i>milF</i>	This study
pMSST- Δ milF	pMSST2 containing in-frame deleted <i>milF</i>	This study
pSET-milF	pSET152 containing <i>milF</i>	This study

1.1.2 主要试剂:核酸内切酶, DNA 分子量标准 DL2000, 碱性磷酸酶 (Bacterial Alkaline Phosphatase, BAP), *rTaq* DNA 聚合酶, LA Taq DNA 聚合酶, DNA 连接试剂盒, DNA 平末端化试剂盒 (BKL kit), pMD19-T 载体等购自 TaKaRa; DNA 胶回收试剂盒和 DNA 片段回收试剂盒购自上海华舜生物公司;引物由南京金斯瑞生物技术有限公司合成

(表 2)。

表 2. 本实验所用的引物

Table 2. Primers used in this work

Name	Sequence (5'→3')
milF1	CTCCACCGAGTGTCCAAGCAG
milF2	CGAGCCGGATGGCTGCTACTGAC
milVF	ATACGCCGGAGGCGCTCG
milVR	ATACGCCGGAGGCGCTCG

1.1.3 抗生素与培养基: 大肠杆菌培养基为 LB^[9], 培养基中使用的氨苄青霉素 (Ampicillin, Ap) 终浓度为 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 卡那霉素 (Kanamycin, Km) 和壮观霉素 (Spectinomycin, Sp) 的终浓度均为 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 氯霉素 (Chloramphenicol, Cm) 的终浓度为 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$. 链霉菌固体产孢培养基和接合转移培养基均为 MS^[8], 培养基中使用的壮观霉素终浓度为 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、萘啶酮酸 (Nalidixic acid, Nal) 的终浓度为 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$. 链霉菌的液体培养基为胰酶大豆肉汤 (Tryptic Soy Broth, TSB) 培养基, BD 公司产品。

1.2 转化方法

大肠杆菌转化采用 CaCl_2 法^[9], 链霉菌转化采用接合转移方法^[8]。

1.3 链霉菌基因组 DNA 的提取

链霉菌基因组 DNA 的提取参照文献 [10]。

1.4 吸水链霉菌的发酵

吸水链霉菌在 MS 固体培养基上, 28 $^{\circ}\text{C}$ 培养 5 - 6 d. 将面积为 1 cm^2 左右的菌落挖到 30 mL 种子培养基 (蔗糖 1%, 脱脂奶粉 0.1%, 蛋白胨 0.35%, 酵母膏 0.5%, K_2PO_4 0.05%, 调节 pH 值为 7.2), 28 $^{\circ}\text{C}$, 220 r/min 培养 24 - 30 h; 以 2 mL 的接种量转接到发酵培养基 (蔗糖 16%, 黄豆饼粉 2%, 酵母膏 0.5%, 麦芽膏 0.5%, K_2HPO_4 0.05%, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.005%, CaCO_3 0.3%, MgSO_4 0.05%; 调节 pH 值为 7.2), 28 $^{\circ}\text{C}$, 220 r/min 培养 10 d。

1.5 产物检测

取发酵液 1 mL, 加入 9 mL 无水甲醇, 浸泡过夜后过滤, 滤液以 HPLC 检测。HPLC 方法为: 安捷伦 C18 反相柱, 流动相为乙腈: 水 = 80:20, 检测波长为 240 nm, 流动相流速为 1 mL/min。

2 结果和分析

2.1 *milF* 基因敲除质粒的构建

以 *Bst*B I 和 *Sac* I 从质粒 pIJ778 上切下含壮观霉素抗性基因 *aadA* 和接合转移起点 *oriT* 的抗性基因盒, 以 BKL kit 平末端化后, 连接到克隆载体 pMD19-Simple 的 *Ssp* I 位点, 得到接合转移载体 pMSST2, 如图 2。

根据冰城链霉菌的基因组序列设计引物 *milF*1 和 *milF*2, 从 HS023 基因组扩增得到 6.5 kb 包含

milF 基因及两侧序列的片段 (图 3), 克隆到载体 pMSST2 的 *EcoR* V 位点, 得到重组质粒 pMSST-*milF*12. 由于 pMSST-*milF*12 上 *milF* 基因之外还有 2 个 *Nru* I 位点, 为了以 *Nru* I 和 *Xho* I 切下 *milF* 基因内部的片段, 我们首先从 pMSST-*milF*12 上切下包含 *milF* 基因的 1.9 kb *Kpn* I-*EcoR* V 片段克隆到 pBlueScript SK (+) 上, 以 *Nru* I 和 *Xho* I 切下 *milF* 基因内部的 288 bp 片段后, 余下的部分经平末端化并自连, 得到 1.6 kb 包含框内缺失的 *milF* 基因的片段。以该片段替换 pMSST-*milF*12 上的 1.9 kb 包含完整 *milF* 基因的 *Kpn* I-*EcoR* V 片段, 即得到 *milF* 基因敲除质粒 pMSST- Δ *milF*。

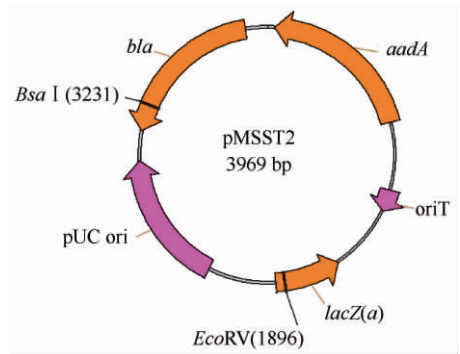


图 2. 质粒 pMSST2 的物理图谱

Figure 2. Map of plasmid pMSST2.

2.2 吸水链霉菌 HS023 *milF* 基因的敲除及 PCR 验证

重组质粒 pMSST- Δ *milF* 转化到大肠杆菌 ET12567 (pUZ8002) 后, 再通过接合转移转化到吸水链霉菌 HS023, 并以含 5 mg 壮观霉素和 0.5 mg 萘啶酮酸的 1 mL 无菌水铺上层筛选转化子。转化子经传代培养后, 筛选到壮观霉素敏感的菌株 F1-14, F1-17, F1-52, F2-18, F2-19, F3-52, F4-4 和 F4-9. 这些菌株可能是 *milF* 敲除突变株 (图 3), 也可能是回复突变株。

以筛选到的壮观霉素敏感菌株的基因组 DNA 为模板, 以引物 *milF*V 和 *milF*R 进行 PCR 检验。结果 (图 4) 表明: F2-18 和 F4-4 的 PCR 产物为 582 bp. 将 F2-18 的 PCR 产物克隆到 pMD19-T 载体, 挑两个克隆进行测序检验, 测序结果与预期的序列吻合, 表明 F2-18 为成功敲除 *milF* 的突变株。

2.3 *milF* 基因敲除突变株的发酵检验

将出发菌株 HS023 和 *milF* 敲除的突变株 F2-18 和 F4-4 进行发酵, 发酵产物经 HPLC-MS 检验,

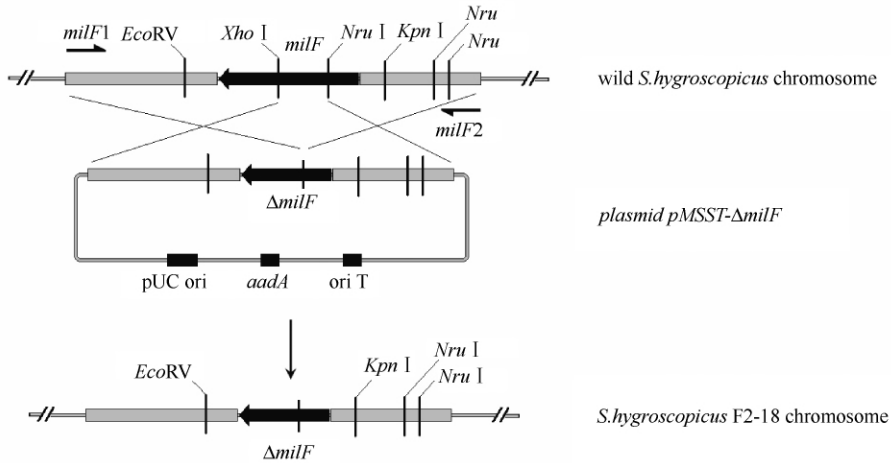


图 3. 质粒 pMSST- Δ milF 与吸水链霉菌 HS023 染色体间的同源双交换

Figure 3. Homogenous double-crossover between plasmid pMSST- Δ milF and *streptomyces hygroscopicus* HS023. In F2-18, the 288bp fragment between *Xho* I and *Nru* I was deleted from *milF*.

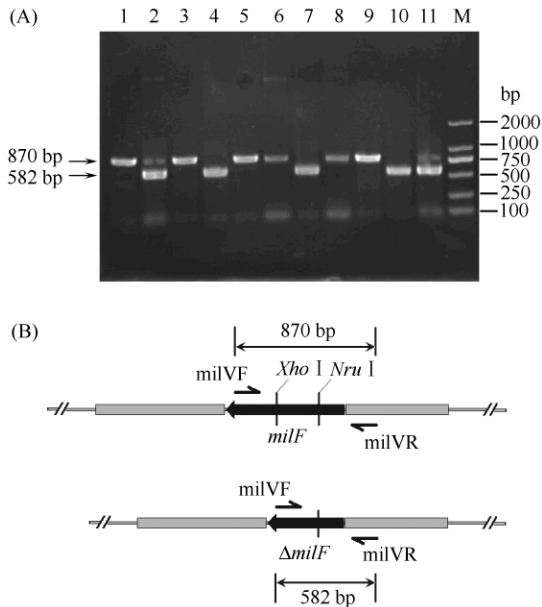


图 4. *milF* 基因敲除突变株的 PCR 验证

Figure 4. PCR analysis of *milF* mutants. A: gel chromatogram of PCR results. Lane 1: F1-14, lane 2: F1-17, lane 3: F1-52, lane 4: F2-18, lane 5: F2-19, lane 6: F3-52, lane 7: F4-4, lane 8: F4-9, lane 9: HS023 genome DNA, lane 10: plasmid pMSST- Δ milF, lane 11: HS023 genome DNA plus plasmid pMSST- Δ milF, M: DL2000. Lane 4 and 7 had the PCR products of 582 bp but no 870 bp band, indicated that the corresponding strain F2-18 and F4-4 were *milF* mutants. Lane 2 had both 582 bp and 870 bp band, indicated that the corresponding strain F1-17 was "single-crossover". B: positions of primer milVF and milVR in wild strain and *milF* mutants.

结果如图 5。结果表明:基因工程菌的发酵产物(图 5-B)与出发菌株的发酵产物(图 5-A)相比有明显不同的两个化合物,其发酵单位之和略高于出发菌株的米尔贝霉素 A3 和 A4 的总和。质谱分析其分子量分别是 526(图 5-D)和 540(图 5-E),正好比米尔贝霉素 A3 和 A4 的分子量(分别为 528,图 5-F 和 542,图 5-G)小 2,与 5-酮米尔贝霉素 A3 和 A4 的分子量吻合。

2.4 *milF* 基因的回补试验

以 *Sol* I 和 *EcoR* V 从 pMSST-*milF* 切下包含 *milF* 基因的 2239 bp 片段,平末端化后,克隆到整合载体 pSET152 的 *EcoR* V 位点,得到重组质粒 pSET-*milF*。将 pSET-*milF* 通过接合转移的方法转化到 *milF* 基因敲除的工程菌 F2-18。挑 2 个转化子发酵检验,HPLC 结果表明:发酵产物基本上为米尔贝霉素 A3/A4,但也有少量的 5-酮米尔贝霉素。说明通过回补后,*milF* 基因的功能得以恢复。

3 讨论

HS023 和 *milF* 突变体 *milF* 基因编码米尔贝霉素 C5-酮还原酶,负责将米尔贝霉素的 C5 位酮基还原成羟基。敲除 *milF* 基因可阻断米尔贝霉素生物合成途径中 C5 位的还原反应,发酵直接得到 5-酮米尔贝霉素 A3/A4,理论上其发酵单位与出发菌株的米尔贝霉素 A3/A4 相当。而本研究的结果表明:5-酮米尔贝霉素 A3/A4 的发酵单位相比出发菌株的米尔贝霉素 A3/A4

略有提升, 这可能归功于米尔贝霉素 $\alpha 2$ 组分的转化: 米尔贝霉素 $\alpha 2$ 组分是米尔贝霉素 A3 的衍生物, 与米尔贝霉素 A3 不同, $\alpha 2$ 组分的 C5 位是氧甲基而不是羟基^[11]。C5 位的氧甲基是由 *milD* 基因编码的 C-5 氧甲基转移酶将甲硫氨酸的甲基转移到米尔贝霉素 A3 的 C5 位羟基而形成的^[12], 由于 *milF* 基因的敲除阻断了 C5 位羟基的形成, 从而阻断了氧甲基的形成, 因此在 *milF* 敲除的突变株中, 米尔贝霉素 A3 组分和 $\alpha 2$ 组分都转化成 5-酮米尔贝霉素。

5-酮米尔贝霉素是重要的生物活性中间体, 可直接应用于驱虫药米尔贝肟和乐平霉素的化学合成。应用化学方法由米尔贝霉素氧化成 5-酮米尔贝霉素的收率比较低, 仅为 40% - 60%。而通过 *milF* 基因的敲除, 不仅发酵直接生产 5-酮米尔贝霉素, 而且发酵单位还有所提升, 相当于 100% 以上的化学合成收率。不仅如此, 发酵直接生产 5-酮米尔贝霉素还节省了一个提取的过程, 大大减少了有机溶剂的使用, 因此在降低生产成本 and 环境保护方面都具有很大的优势。

米尔贝肟是新型的体内外抗寄生虫兽药, 市场需求量非常大。本文所使用的出发菌株是海正药业当前在生产中使用的米尔贝霉素高产菌株, 最后得到的基因工程菌 F2-18, 其 5-酮米尔贝霉素 A3/A4 的发酵单位总和略高于出发菌株的米尔贝霉素 A3/A4 总和。基因工程菌经 3 次以上传代后, 菌落形态基本没有变化, 发酵结果稳定, 因此可直接应用于工业化生产。这不仅简化了米尔贝肟和乐平霉素的化学合成和提取步骤, 减轻对环境的污染, 更大幅提高了产率, 提升产品的市场竞争力, 具有很大的社会效益和经济效益。

参考文献

- [1] Xu Q, Li J, Xiang W, Zhang Y, Qu M, Yu X. Research progress on milbemycin oxime. *Chinese Journal of Veterinary Drug*, 2009, 43 (7) :33-36. (in Chinese)
徐倩倩, 李继昌, 向文胜, 张耀腾, 曲明丽, 于晓蕾. 米尔贝肟的研究进展. 中国兽药杂志, 2009, 43 (7) : 33-36.
- [2] Tsukamoto Y, Sato K, Mio S, Sugai S, Yanai T, Kitano N, Muramatsu S, Nakada Y, Ide J. Synthesis of 5-keto-5-oxime derivatives of milbemycins and their activities against icofilariae. *Agricultural and Biological Chemistry*, 1991, 55 (10) : 2615-2621.
- [3] Hu P, Wang X, Xiang W. Biological pesticide: lepipimectin. *World Pesticides*, 2010, 32 (3) : 55-58. (in Chinese)
胡萍, 王相晶, 向文胜. 生物杀虫剂——Lepimectin. 世界农药, 2010, 32 (3) : 55-58.
- [4] Saito A, Naito S, Kobayashi M, Tsuchiya M, Toyama T, Kaneko S, Nanba T, Morisawa Y. Synthesis and anthelmintic activity of 13-alkoxymilbemycin derivatives. *Journal of Antibiotics*, 1993, 46 (8) : 1252-64.
- [5] Okada S, Iwamatu S. Scale-up production of milbemycin by *Streptomyces hygroscopicus* subsp. *aureolacrimosus* with control of internal pressure, temperature, aeration and agitation. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 1997, 70 (2) : 179-187.
- [6] Wang X, Yan Y, Zhang B, An J, Wang J, Tian J, Jiang L, Chen Y, Huang S, Yin M, Zhang J, Gao A, Liu C, Zhu Z, Xiang W. Genome sequence of the milbemycin-producing bacterium *Streptomyces bingchengensis*. *Journal of Bacteriology*, 2010, 192 (17) : 4526-4527.
- [7] Nonaka K, Kumasaka C, Okamoto Y, Maruyama F, Yoshikawa H. Bioconversion of milbemycin-related compounds: biosynthetic pathway of milbemycins. *Journal of Antibiotics*, 1999, 52 : 109-116.
- [8] Gust B, Kieser T, Chater KF. REDIRECT Technology: PCR-targeting system in *Streptomyces coelicolor*. Norwich: John Innes Centre. 2002 : 13-35.
- [9] Joseph Sambrook, David William Russell. 分子克隆实验指南. 黄培堂, 等译. 第三版. 北京: 科学出版社, 2002 : 93-99.
- [10] Matsushima P, Broughton M, Turner J, Baltz R. Conjugal transfer of cosmid DNA from *Escherichia coli* to *Saccharopolyspora spinosa*: effects of chromosomal insertions on macrolide A83543 production. *Gene*, 1994, 146 (1) : 39-45.
- [11] Chen X, Zheng Y, Shen Y. Research progress of biological pesticide milbemycin. *Pesticides*, 2003, 42 (4) : 5-9. (in Chinese)
陈小龙, 郑裕国, 沈寅初. 2003. 生物农药米尔贝霉素的研究进展. 农药, 42 (4) : 5-9.
- [12] Zhang J, An J, Wang J, Yan Y, He H, Wang X, Xiang W. Genetic engineering of *Streptomyces bingchengensis* to produce milbemycins A3/A4 as main components and eliminate the biosynthesis of nanchangmycin. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2013, 97 (23) : 10091-10101.

Construction of genetically engineered strain producing 5-oxomilbemycin by knocking out *milF* in *Streptomyces hygroscopicus* HS023

Jun Huang^{*}, Jiatan Lin, Min Zhou, Hua Bai

Zhejiang Hisun Pharmaceutical Co. Ltd., Taizhou 318000, Zhejiang Province, China

Abstract: [Objective] To construct a 5-oxomilbemycin producing strain by knocking out *milF* gene in *Streptomyces hygroscopicus* HS023. [Methods] Plasmid pMSST- Δ milF was constructed and introduced into milbemycin industrial strain *Streptomyces hygroscopicus* HS023, and *milF* mutant F2-18 was selected by PCR amplification. [Results] Fermentation experiments showed that no milbemycins was produced in F2-18, but 5-ketomilbemycin, the intermediate of milbemycin, was obviously accumulated, and the fermentation titer was enhanced. [Conclusion] Genetically engineered strain can simplify the synthesis of milbemycin oxime and lepimectin chemical from milbemycin.

Keywords: *Streptomyces hygroscopicus*, *milF* gene, gene knockout, 5-ketomilbemycin

(本文责编:张晓丽)

Supported by the National Programs for High Technology Research and Development of China (2012AA022107)

^{*} Corresponding author. Tel: +86-576-88820587; Fax: +86-576-88828299; E-mail: huangj@hisunpharm.com

Received: 21 March 2014/Revised: 6 June 2014

《微生物学报》EndNote Style

2013年1月编制

EndNote 文献管理软件能够帮助科研人员更好地进行学术研究、学习以及论文的撰写,这已经被越来越多的人熟悉、接受。为了方便作者写作与投稿,我们编制了“《微生物学报》EndNote Style”文件。利用 EndNote 轻松调取收集的文献,自动按照《微生物学报》的格式生成论文的参考文献。

1. 建议作者在投稿本刊时使用“《微生物学报》EndNote Style”文件,这会让您在写作过程中更加轻松快乐。请到本刊网站的“下载专区”中获取这个文件。

2. 将“《微生物学报》EndNote Style”文件下载后,复制到 EndNote 安装文件夹下面的 Style 子目录中。

3. 在使用 EndNote 文献管理软件插入文献后,投稿前,请用 EndNote 软件的“Convert to Plain Text”功能,将文章中的参考文献转化成 Plain Text 格式,以便于编辑修改。【注:本刊的这个文件是在 EndNote X5 环境下编制的,因此无法在低于 X5 版本的环境打开和使用。】

4. 因本刊是中文期刊,需要作者对 3 处手工调节。具体写法参见本刊网站“投稿须知”中的“参考文献”。

(1) 西文刊名:2009 年开始西文刊名需要全拼,为的是保证刊名的书写准确。

(2) 非英文的期刊:以尊重原始语种为主,2012 年底开始采用双语表述。先英文文献后原文文献,并在英文文献的后面标出“语种”。

(3) 译著:需要给出外国作者的原姓名。

致谢:“《微生物学报》EndNote Style”是在本刊副主编、中国军事医学科学院微生物流行病学研究所杨瑞馥先生的建议下开始的,杨老师实验室的崔玉军博士按照《微生物学报》的要求编辑了该文件。在此,谨向他们表示衷心地感谢!