

鹅源新城疫病毒 ZJ1 株微型基因组的构建及其初步应用

张艳梅 刘玉良 黄 勇 贾立军 刘秀梵*

(扬州大学 农业部畜禽传染病学重点开放实验室 扬州 225009)

摘 要 在获得鹅源新城疫病毒 ZJ1 株全基因组序列的基础上,用增强型绿色荧光蛋白(eGFP)报告基因取代鹅源新城疫病毒 ZJ1 株整个编码区,只保留与病毒复制、转录和病毒粒子包装相关的调控序列,将其反向克隆入转录载体 TVT7R(0.0)中,构建了该毒株的微型基因组。当转染用辅助病毒 ZJ1 株感染的 HEp-2 细胞时报告基因得到表达,表明此微型基因组 RNA 可被辅助病毒提供的 NP、P 和 L 蛋白翻译。同时将该病毒 NP、P 和 L 蛋白基因分别克隆入真核表达载体 pCI-neo 中,构建了表达该病毒 NP、P 与 L 蛋白的辅助质粒,用此微型基因组对辅助质粒的表达产物进行了功能鉴定并对该病毒拯救过程中痘苗病毒的最适感染剂量进行了摸索。以上研究为该病毒的成功拯救及开展其它相关研究奠定了基础。

关键词 新城疫病毒,微型基因组,病毒拯救

中图分类号:Q789 文献标识码:A 文章编号:1001-6209(2005)01-0072-05

新城疫(Newcastle disease, ND)是由新城疫病毒(Newcastle disease virus, NDV)引起的禽类的一种烈性传染病。NDV 为单股负链不分节段的 RNA 病毒,其基因组全长为 15186nt 或 15192nt,基因组结构模式为 3'-Leader-NP-P-M-F-HN-L-Trailer-5',分别编码以下 6 种结构蛋白:核衣壳蛋白(NP)、磷蛋白(P)、基质蛋白(M)、融合蛋白(F)、血凝素-神经氨酸酶蛋白(HN)和大蛋白(L)。基因组 3'端的引导(Leader)序列和 5'端的尾随(Trailer)序列是 NDV 复制、转录及包裹的重要顺式调控序列。与其它负链 RNA 病毒相似,NDV 基因组 RNA 必须先被 NP 蛋白包裹,然后与 P 和 L 蛋白形成的病毒自身 RNA 聚合酶结合形成核糖核蛋白复合物(RNPs)才具有感染性^[1]。

近年来在分子病毒学研究领域新兴起的“反向遗传操作技术”(又称“病毒拯救”)为在分子水平对负链 RNA 病毒进行功能基因组研究提供了一种有效方法。它是在 RT-PCR 和体外转录技术基础上建立起来的病毒全长感染性 cDNA 克隆技术^[2]。由于许多负链 RNA 病毒基因组较大难以操作,所以在进行病毒拯救之前,许多研究者尝试用报告基因替代病毒整个编码区,只保留与病毒基因复制、转录和病毒粒子包装相关的调控序列构建该病毒的“微型基因组”,可作为基因组转录/复制的特异指示系统用来鉴定相关病毒蛋白的功能并初步反映所建立的病

毒拯救体系^[3,4]。

本研究所选用的新城疫病毒 ZJ1 毒株是 2000 年从浙江发病鹅群中分离到的强毒株,目前我室已经完成了该毒株生物学特性鉴定^[5],首次获得该毒株基因组全序列^[6]。本研究构建了该毒株的微型基因组和分别表达该病毒 NP、P 与 L 蛋白的辅助质粒并进行功能鉴定。同时确定了该病毒拯救过程中痘苗病毒的最适感染剂量,旨在为鹅源 NDV ZJ1 株的反向遗传操作以及有关功能基因组研究奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 毒株、细胞和鸡胚:鹅源 NDV ZJ1 株由刘秀梵等^[5]分离和鉴定;表达 T7 RNA 聚合酶的痘苗病毒 W2 株以及用于转染的 HEp-2 细胞由哈尔滨兽医研究所步志高研究员惠赠;SPF 鸡胚购自山东省家禽科学研究所。

1.1.2 质粒和菌株:真核表达载体 pCI-neo 购自 Promega 公司;转录载体 TVT7R(0.0)由美国 Alabama 大学 L. Andrew Ball 教授惠赠;含有增强型绿色荧光蛋白(eGFP)基因的质粒 pEGFP 为 Clontech 公司产品;包含鹅源新城疫病毒 ZJ1 株基因组 1~2951nt 和 12981~15792nt 序列的质粒 TNDV1 由本实验室构建;大肠杆菌(*Escherichia coli*)DH5 α 为本室保存。

基金项目:国家 973 项目(GI 9990119);国家自然科学基金重大项目(39893290)

* 通讯作者。Tel 86-514-7979386;Fax 86-514-7323112;E-mail:xfliu@mail.yzu.edu.cn

作者简介:张艳梅(1976-),女,黑龙江人,博士研究生,主要从事新城疫病毒分子生物学研究。E-mail:yanmeizhang2003@yahoo.com.cn

其他作者:卢建红,韦栋平,吴艳涛

收稿日期 2004-07-20,修回日期 2004-09-13

1.1.3 主要试剂:AMV 反转录酶、High fidelity DNA polymerase、T4 DNA 连接酶、pGEM-T easy Vector 购自 Promega 公司; *BsmB* I、*Bbs* I 等限制性内切酶购自上海 Sangon 公司; Agarose Gel DNA Extraction Kit 购自 Roche 公司; Lipofectin Reagent 购自 Invitrogen 公司; Plasmid Mini Kit 为上海华舜公司产品; DMEM 细胞培养基购自 Sigma 公司。

1.2 病毒增殖、滴度测定和病毒 RNA 抽提
操作方法参考文献 [7]

1.3 鹅源 NDV ZJ1 株微型基因组 (p-LGT) 的构建

设计引物 Leader P1/Leader P2 和 Trailer P1/Trailer P2, 以质粒 TNDV1 为模板, 通过 PCR 方法分别扩增 ZJ1 株基因组的 Leader 区域(1 ~ 121nt)和 Trailer 区域(15002 ~ 15192nt)基因; 设计引物 GFP P1/GFP P2 扩增 eGFP 基因。Leader P1 5'-GCGTCTC TACCCACCAAACAGAGAATCTGTGAG-3' (含 *Bbs* I 位点); Leader P2 : 5'-TCACCATATCGGTAGAAGGTTCCC TCAG-3'; Trailer P1 : 5'-CAAGTAAAGGCAATCGTACG CCAAT-3'; Trailer P2 : 5'-GCGTCTCGTATAGGACC AACAGAGATTTGGTGACC-3' (含 *BsmB* I 位点, 在 Trailer 序列前加入两个 G, 黑体标注); GFP P1 : 5'-TCACCATATGGTGAGCAAGGGCGAGGAG-3'; GFP P2 : 5'-ATTGCCTTACTTGTACAGCTCGTCCATGCC-3'。引物外带 *Bbs* I 和 *BsmB* I 酶切位点用下划线标注, overlap 部分以斜体标注。引物由大连 TaKaRa 公司合成。

ZJ1 株基因组 Leader、Trailer 和 eGFP 基因 PCR 反应条件: 94°C 4min, 94°C 45s, 48°C 45s, 72°C 60s, 5 个循环后进入第二个循环程序: 94°C 45s, 50°C 45s, 72°C 60s, 20 个循环; 72°C 10min。ZJ1 株基因组 Leader、Trailer 和 eGFP 基因相连接时 overlap PCR 反应条件: 94°C 4min, 94°C 30s, 48°C 60s, 72°C 90s, 5 个循环后进入第二个循环程序: 94°C 30s, 50°C 60s, 72°C 90s, 20 个循环; 72°C 10min。将 Leader 区域、eGFP、Trailer 区域通过 overlap PCR 方法相连, PCR 产物经纯化回收后克隆于 pGEM-T easy Vector, 最后将目的片段反向亚克隆到经相同双酶切的转录载体 TVT7R(0.0)中。重组质粒用酶切和 PCR 方法鉴定, 阳性克隆穿刺培养后由上海 Sangon 公司测序验证。

1.4 辅助质粒 pCI-NP、pCI-P 和 pCI-L 的构建

设计下列 3 对引物, 通过 RT-PCR 方法分别扩增 NP、P 和 L 基因。NP1 : 5'-CGGAATTCGAGCGCGA GGCCGAAGCTCGAA-3' (含 *EcoR* I 位点); NP2 : 5'-AT GTCGACCTGGGTGTTGTCGATCAGTAC-3' (含 *Sal* I 位

点); P1 : 5'-CCGCTCGAGGTGGATTAGGGTGAAGA TGCCACT-3' (含 *Xho* I 位点); P2 : 5'-GCCGTCGAC AGTGACGGGAGCCGTTTATGAGT-3' (含 *Sal* I 位点); L1 : 5'-GCCTCTAGAACACGGGTAGGACATGGCCGGCT CCGGTCCCGA-3' (含 *Xba* I 位点); L2 : 5'-TTCGTCG ACCGATTGCCTTTAAGAGTCATTATTACTGT-3' (含 *Sal* I 位点)。引物外带酶切位点分别下划线标注。以上引物由大连 TaKaRa 公司合成。

ZJ1 株基因组 NP、P 和 L 基因 PCR 反应条件: 94°C 4min, 94°C 45s, 48°C 45s, 72°C 60s, 5 个循环后进入第二个循环程序: 94°C 45s, 50°C 45s, 72°C 60s, 20 个循环; 72°C 10min。PCR 产物经纯化回收后克隆于 pGEM-T easy Vector 进行扩增, 最后将目的片段分别亚克隆到经相同双酶切的真核表达载体 pCI-neo 中。重组质粒用酶切和 PCR 方法鉴定, 阳性克隆穿刺培养后送上海 Sangon 公司测序验证。

1.5 NDV ZJ1 株微型基因组 (p-LGT) 的功能鉴定

将 HEp-2 细胞分装于 24 孔培养板上培养 20h, 使细胞密度达到 90% 左右, 用无血清无抗生素的 DMEM 培养基洗涤两遍, 用 1 个 MOI (Multiplicity of Infection) 的痘苗病毒 W2 于 37°C 感染 1h。吸弃上清, 加入 p-LGT 质粒 0.3μg 和 1μL 转染试剂的混合物, 37°C 作用 8h, 再用 1 MOI 的 NDV ZJ1 株于 37°C 感染 1h, 阴性对照组不感染任何病毒, 然后换成含有 10% 小牛血清的 DMEM 培养基。24h 后置于荧光显微镜下观察报告基因表达情况。

1.6 辅助质粒 pCI-NP、pCI-P 和 pCI-L 的功能鉴定

将 HEp-2 细胞分装于 24 孔板上培养 20h, 使细胞密度达到 90% 左右, 同上洗涤两遍。用 1MOI 痘苗病毒 W2 于 37°C 感染 1h。吸弃上清, 加入 p-LGT 质粒 0.05μg、pCI-NP 0.1μg、pCI-P 0.1μg、pCI-L 0.05μg 和 1μL 转染试剂的混合物 (阴性对照不加入质粒 pCI-L) 37°C 作用 8h 后换成含有 10% 小牛血清的 DMEM 培养基。继续培养 24h 后在倒置荧光显微镜下观察报告基因表达情况。

1.7 痘苗病毒在拯救体系中最适感染剂量的确定

将 HEp-2 细胞分装于 24 孔板上培养 20h, 使细胞密度达到 90% 左右, 分别用剂量为 0.1MOI、0.3 MOI、0.5 MOI、0.8 MOI、1 MOI、2 MOI、3 MOI、4 MOI、5 MOI 的表达 T7 RNA 聚合酶的痘苗病毒 W2 株 37°C 感染 1h, 加入质粒 p-LGT 0.05μg、pCI-NP 0.1μg、pCI-P 0.1μg、pCI-L 0.05μg 和 1μL 转染试剂的混合物, 37°C 作用 8h 后换成含有 10% 小牛血清的 DMEM 培养基, 24h 后在荧光显微镜下观察结果。

2 结果和分析

2.1 鹅源新城疫病毒 ZJ1 株微型基因组(p-LGT)的构建和鉴定

鹅源新城疫病毒 ZJ1 株微型基因组分别经酶切、PCR 和测序验证,结果表明序列完全正确,命名为 p-LGT。微型基因组的转录、表达严格依赖于辅助 NDV 提供的 NP、P 和 L 蛋白,因此,利用辅助病毒 ZJ1 株可鉴定微型基因组的功能。本研究鉴定结果显示,辅助病毒 ZJ1 株感染组中 eGFP 基因得到表达,在倒置荧光显微镜下看到特异荧光(图 1-A),而阴性对照组无可见荧光(图 1-B)。说明 ZJ1 株微型基因组 p-LGT 构建成功。

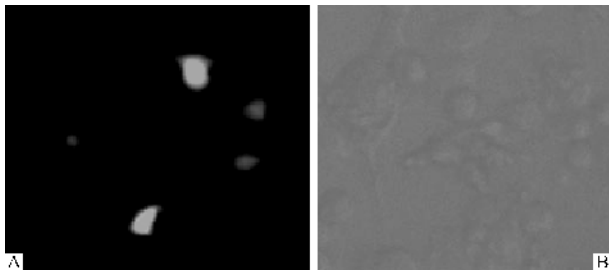


图 1 微型基因组(p-LGT)的功能鉴定

Fig.1 Functional identification of the minigenome p-LGT

A: p-LGT; B: Negative control.

2.2 辅助质粒 pCI-NP、pCI-P 和 pCI-L 构建和鉴定

3 种重组质粒分别经酶切、质粒 PCR 和测序验证,结果表明 3 种目的基因均成功亚克隆到真核表达载体 pCI-neo 上,分别命名为 pCI-NP、pCI-P 和 pCI-L。

微型基因组的转录和表达严格依赖于 3 种辅助质粒分别表达的 NP、P 和 L 蛋白,所以,用微型基因组可鉴定辅助质粒表达产物的功能活性。鉴定结果表明,辅助质粒 pCI-NP、pCI-P、pCI-L 和 ZJ1 株微型基因组 p-LGT 共转染时 eGFP 基因得到表达,在倒置显微镜下看到特异荧光(图 2-A),而阴性对照组无

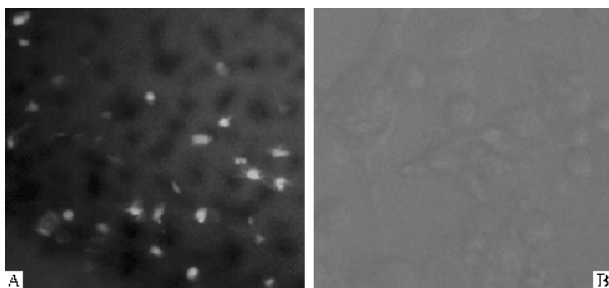


图 2 辅助质粒(pCI-NP、pCI-P 和 pCI-L)的功能鉴定

Fig.2 Functional identification of the support plasmids pCI-NP, pCI-P and pCI-L

A: Support plasmids; B: Negative control.

可见荧光(图 2-B),说明辅助质粒 pCI-NP、pCI-P、pCI-L 表达产物具备功能活性。

2.3 痘苗病毒 W2 株在拯救体系中最适感染剂量

当 W2 感染剂量为 0.5MOI 时,微型基因组 p-LGT 中报告基因的表达水平较高,在含 10% 小牛血清的 DMEM 培养基中细胞病变轻微,生长状态较好,镜下荧光持续时间可达 4~5d;W2 感染剂量高于 0.5MOI 时,报告基因的表达水平更高一些,且出现时间较早,但细胞病变相对明显,荧光持续时间较短;W2 感染剂量低于 0.5MOI 时,细胞状态更好一些,但报告基因的表达水平较低,荧光数量较少。本研究确定痘苗病毒 W2 株在拯救体系中的最适感染剂量为 0.5MOI。

3 讨论

本研究构建了含有鹅源新城疫病毒 ZJ1 毒株基因组 3'端 Leader 序列(1~121nt)增强型绿色荧光蛋白(eGFP)基因和 5'端 Trailer 序列(15002~15092nt)的微型基因组(p-LGT)。该微型基因组序列反向克隆入转录载体 TVT 7R(0.0)的 T7 启动子与转录终止信号之间,可避免报告基因在无病毒蛋白的条件下直接表达,因此报告基因的表达可作为病毒蛋白存在时基因组转录/复制的特异性指示系统。研究表明,用微型基因组转染辅助病毒 ZJ1 株感染的 HEp-2 细胞时报告基因可以表达,而转染的阴性对照组中报告基因不表达,说明本研究所构建的微型基因组具有功能活性。

本研究在构建该微型基因组时选择合适的 Leader 序列和 Trailer 序列,使微型基因组序列全长为 1032bp,恰好为 6 的倍数,遵守了 NDV 基因组转录和复制的“六碱基原则”^[3],为微型基因组能在 NP、P 和 L 辅助蛋白作用下有效的转录和复制提供了良好保证。为了提高重组质粒的稳定性和拯救效率,我们选用拷贝数低、复制严谨性高的转录载体 TVT7R(0.0),这在很大程度上降低重组质粒在复制过程中发生突变的机率。同时此转录载体 TVT7R(0.0)中含有 T7 启动子以及丁型肝炎病毒的核酶剪切位点和转录终止信号,保证了转录的高效性以及转录起始和终止的准确性。

Peeters 等^[8]研究发现,在 T7 启动子下游加入 2~3 个 G 碱基会大大提高转录效率。虽然转录所生成的微型基因组 RNA 带 2 个 G,但在辅助病毒或辅助质粒提供的 NP、P 与 L 蛋白作用下复制生成反义基因组 RNA 时,这两个“G”会自动消失。因此,本

研究还在 Trailer 序列 5' 端外带了 2 个鸟嘌呤核苷酸 (G) 以进一步提高转录效率。不过, 这额外的 2 个 G 并没有影响微型基因组全长是 6 的倍数, 即所构建的微型基因组符合“六碱基原则”。

NDV 的基因组 RNA 没有感染性, 它必须先被 NP 蛋白衣壳化, 再与 P 和 L 蛋白生成的病毒自身的 RNA 聚合酶结合形成 RNPs 才能作为转录和复制的功能性模板。本研究构建了表达病毒蛋白 NP、P 和 L 的辅助质粒 pCI-NP、pCI-P 和 pCI-L 并用 ZJ1 株微型基因组 p-LGT 证实了 3 种辅助质粒的表达产物具有功能活性。本研究还发现, pCI-NP、pCI-P、pCI-L 和 p-LGT 共转染组中报告基因 eGFP 的表达量明显高于辅助病毒 ZJ1 株感染组 (图 1-A 和图 2-A), 这可能是由于 NDV 自身编码的 RNA 聚合酶有复制和转录双重功能, 而这种功能的转换受 NP 蛋白的表达量影响: 当 NP 蛋白表达量高时, 病毒 RNA 聚合酶主要表现为复制功能; 当 NP 蛋白表达量低时, 病毒 RNA 聚合酶主要表现为转录功能^[3]。我们推测, 当辅助质粒 pCI-NP、pCI-P 和 pCI-L 共转染时, NP 蛋白的表达量可能低于 ZJ1 辅助病毒感染时 NP 蛋白的表达量, 因而前者似乎更有利于微型基因组 RNPs 的转录而后者则更利于它的复制。同时这种现象也可能与 NDV 的 V 蛋白的表达有关。有关研究发现, V 蛋白可能会在某种程度上降低病毒 RNA 的转录^[9], 所以这也可能是导致辅助病毒感染组 eGFP 表达量低于辅助质粒转染组的原因之一。

在病毒拯救体系中, 其它因素也会不同程度地影响拯救效率。其中表达 T7 RNA 聚合酶的痘苗病毒的感染剂量对拯救效率的影响很大。感染剂量过大, 细胞会产生严重的病变影响拯救的病毒粒子的增殖, 并且大大增加了从痘苗病毒中分离新拯救病毒的难度; 剂量过小又不能提供足够的 T7 RNA 聚合酶。本研究以鹅源 NDV ZJ1 株微型基因组作为指示系统对不同剂量的重组痘苗病毒 W2 株在易感细胞 HEp-2 上表达 T7 RNA 聚合酶的水平进行比较, 并结合感染后产生细胞病变的情况, 确定了痘苗病

毒在拯救体系中的最适感染剂量为 0.5MOI, 为后期工作提供有益的参考依据。

国外利用反向遗传学技术已经成功拯救了 NDV Clone-30 株、La Sota 株等鸡源弱毒株^[8, 10]。本研究所选用的 NDV ZJ1 株是近年来在我国水禽中流行并能引起水禽严重发病和死亡的强毒株。目前我们已完成了该毒株微型基因组及辅助质粒的构建和功能鉴定, 正在构建含有该毒株全长 cDNA 的转录载体进而尝试与辅助质粒共转染拯救出有感染性的病毒粒子。此毒株反向遗传学技术平台的建立将为揭示 NDV 在自然条件下种间传播现象、毒力演变规律以及开展功能基因组研究、构建候选疫苗株等奠定基础。

参 考 文 献

- [1] 殷震, 刘景华. 动物病毒学. 第二版. 北京: 科学出版社, 1997, 743-748.
- [2] Neumann G, Michael A W, Kawaoka Y. A decade after the generation of a negative-sense RNA virus from cloned cDNA-what have we learned? *J Gen Virol*, 2002, **83**: 2635-2662.
- [3] Peeters B P H, Gruijthuisen Y K, de Leeuw O S, et al. Genome replication of Newcastle disease virus: Involvement of the rule-of-six. *Arch Virol*, 2000, **145**: 1829-1845.
- [4] Leyrer S, Wolfgang J N, Reinhard S, et al. Rapid and efficient recovery of Sendai virus from cDNA: factors influencing recombinant virus rescue. *J Virol*, 1998, **75**: 47-58.
- [5] Liu X F, Wan H Q, Ni X X, et al. Pathotypical and genotypical characterization of strains of Newcastle disease virus isolated from outbreaks in chicken and goose flocks in some regions of China during 1985-2001. *Arch Virol*, 2003, **148**(7): 1387-1403.
- [6] 黄勇, 万洪全, 刘红旗, 等. 鹅源新城疫病毒 ZJ1 株全基因组的序列测定. *病毒学报*, 2003, **19**(4): 348-354.
- [7] 吴艳涛, 刘秀梵, 张如宽, 等. 新城疫病毒 F48E8 株融合蛋白基因的克隆. *畜牧兽医学报*, 1997, **28**(2): 176-180.
- [8] Peeters B P H, Olaysoleew L, Gaus K, et al. Rescue of Newcastle disease virus from cloned cDNA: Evidence that cleavability of the fusion protein is a major determinant for virulence. *J Virol*, 1999, **73**: 5001-5009.
- [9] Huang Z H, Krishnamurthy S, Panda A, et al. Newcastle disease virus V protein is associated with viral pathogenesis and functions as an alpha interferon antagonist. *J Virol*, 2003, **77**: 8676-8685.
- [10] Romer-Oberdoerfer A, Mundt E, Mebatsion T, et al. Generation of recombinant lentogenic Newcastle disease virus from cDNA. *J Gen Virol*, 1999, **80**: 2897-2995.

Construction of minigenome of Newcastle disease virus of goose origin and its preliminary application

ZHANG Yan-mei LIU Yu-liang HUANG Yong JIA Li-jun LIU Xiu-fan*
(Infectious Disease Laboratory of Chinese Ministry of Agriculture, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China)

Abstract: On the base of obtaining the full length genome sequence of a Newcastle disease virus (NDV) isolated from goose, the minigenome was constructed by replacing all the encoding region with the reporter gene of enhanced green fluorescent protein (eGFP), except the virus regulating sequences relating to replication, transcription and packing of

virus genome. The reporter gene could be expressed after it was transfected into the HEp-2 cells infected with helper virus of NDV. This result indicated that the minigenome could be translated by the NDV NP, P and L proteins provided by helper virus. Furthermore, the support plasmids expressing NDV NP, P and L protein were constructed respectively and the function of these plasmids was identified using the minigenome. Additionally, the virus rescue system was optimized by changing the infection dose of the recombinant vaccinia virus expressing T7 RNA polymerase. The work mentioned above will accelerate greatly the rescue of NDV and other relative research.

Key words: Newcastle disease virus (NDV), Minigenome, Virus rescue

Foundation items: Key Project of Chinese National Programs for Fundamental Research and Development (GI 9990119); Major Programs of Chinese National Natural Science Foundation (39893290)

* Corresponding author. Tel 86-514-7979386; Fax 86-514-7323112; E-mail: xfliu@mail.yzu.edu.cn

Other authors: LU Jian-hong, WEI Dong-ping, WU Yan-tao

Received date: 07-20-2004

2005 年中国微生物学会及各专业委员会学术活动计划表

序号	会议名称	筹办单位	时间	人数	地点	联系人
1	2005 年中国工业微生物学术研讨会	中国微生物学会工业微生物学专业委员会	4 月	100	天津	王洪玲、杨华 022-60273281
2	中国微生物学会人兽共患病原学专业委员会会议和中国人兽共患病杂志编辑委员会会议	中国微生物学会人兽共患病原学专业委员会	4 月	100	福建	万康林 010-61739438
3	全国各省市自治区微生物学会秘书长会议	中国微生物学会	5 月	50	北京	王旭 010-62554677
4	The 3rd International Symposium on Bio-control and Biotechnology	中国微生物学会农业微生物学专业委员会 湖北武汉华中农业大学农业微生物学国家重点实验室	5 月 10 ~ 13 日	150	武汉	Dr. Liu Ziduo or Miss Meng Ying 027-87283455
5	第五届国际工业微生物与生物技术学术研讨会	中国微生物学会分子微生物学及生物工程专业委员会	6 月	200	上海	朱春宝 陈代杰 021-62479808x323
6	第八次全国环境微生物学术研讨会	中国微生物学会环境微生物学专业委员会	8 月	100	哈尔滨	李顺鹏 025-4396314
7	资源微生物技术学术研讨会	中国微生物学会基础微生物学专业委员会	4 月/5 月	80	济南	曲音波 陈冠军 0531-8364429
8	第 3 届农用微生物产品(微生物肥料)技术研讨会	中国微生物学会农业微生物学专业委员会	9 月	200	北京	李俊 010-68918702
9	第八届全国分析微生物学术研讨会	中国微生物学会分析微生物学专业委员会	9/10 月	100	湖南 吉首	宋亚军 010 - 66948562
10	2005 国际干扰素与细胞因子学术大会	中国微生物学会干扰素专业委员会	10 月 20 ~ 24 日	400	上海	焦炳华, 021-65493936 范中善, 021-25070306-8022
11	第十届全国杀虫微生物学术研讨会	中国微生物学会农业微生物学专业委员会	10 月	100	福州	关雄 0591-3789259
12	第十届全国微生物学教学研讨会	中国微生物学会基础微生物学专业委员会、普及与教育工作委员会、农业微生物学专业委员会	8 月	100	哈尔滨	王立群 徐风花 0451-55190519 55190951
13	生物制品发展现状研讨会	中国微生物学会生物制品专业委员会	10 月	150	昆明	李德富 010-67024325
14	第五届全国酶工程学术研讨会	中国微生物学会酶工程专业委员会	11 月	150	海南/ 福建	黎高翔 010-62643074
15	2005 年中国微生物学会学术年会	中国微生物学会	11 ~ 12 月	300	待定	王旭 010-62554677
16	微生物基因组学研讨会	中国微生物学会农业微生物学专业委员会 湖北武汉华中农业大学农业微生物学国家重点实验室	12 月	100	武汉	喻子牛、孙明 027-87283455
17	中国微生物学会兽医微生物学专业委员会 2005 年学术年会	中国微生物学会兽医微生物学专业委员会	待定	150	广东	王琴 010-62158844-3265