

C3d-M28 增强伪狂犬病毒 gC 基因体液免疫

樊惠英^{1*}, 刘中勇^{2*}, 佟铁铸^{3,4}, 刘星³, 郭爱珍⁴

1 华南农业大学兽医学院, 广州 528427

2 广东省出入境检验检疫局技术中心, 广州 541004

3 惠州市出入境检验检疫局技术中心, 惠州 516006

4 华中农业大学畜牧兽医学院, 武汉 430070

摘要: 研究补体 C3d 的受体结合功能区(M28)对伪狂犬病毒 gC 基因 DNA 疫苗免疫增强作用。将 4 拷贝的 M28 基因与伪狂犬病毒 gC 基因串联后, 克隆到载体 pcDNA3.1 中, 构建融合表达的重组质粒(sgC-M28₄)。BALB/c 小鼠免疫试验表明, sgC-M28₄ 免疫组比单独表达伪狂犬病毒 gC 蛋白的重组质粒(sgC)免疫组产生的 ELISA 抗体高 17 倍, 对致死剂量 (316 LD₅₀) 伪狂犬病毒攻毒的保护率提高了 63%。gC 基因与 M28 基因融合表达诱导产生的 IL-4 水平接近了伪狂犬灭活疫苗免疫组产生的 IL-4 水平, 显著增强了基于 Th2 途径的体液免疫反应。

关键词: 补体 C3d, gC 糖蛋白, 伪狂犬病毒, C3d 受体结合功能区(M28), 分子免疫佐剂

C3d-M28 enhanced DNA vaccination induced humoral immune response to glycoprotein C of pseudorabies virus

Huiying Fan^{1*}, Zhongyong Liu^{2*}, Tiezhu Tong^{3,4}, Xing Liu³, and Aizhen Guo⁴

1 College of Veterinary Medicine, South China Agricultural University, Guangzhou 528427, China

2 Guangdong Entre-exit Inspection and Quarantine Bureau, Guangzhou 541004, China

3 Huizhou Entre-exit Inspection and Quarantine Bureau, Huizhou 516006, China

4 College of Veterinary Medicine, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China

Abstract: We studied the immunogenicity of pseudorabies virus gC DNA vaccination by fusing the murine complement C3d receptor binding domain. First, pseudorabies virus gC gene was linked to four copies of C3d receptor binding domain (M28₄), and then cloned into the vector pcDNA3.1 to construct the recombinant plasmid sgC-M28₄. Through the experiment of immunized BALB/c mice, we found that the enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) antibody titer for sgC-M28₄ was 17-fold higher than that for sgC alone, and protective rate of mice was augmented from 25% to 88% after lethal dose PrV (316 LD₅₀) challenge. In addition, the IL-4 levels for sgC-M28₄ immunization approached that for the pseudorabies virus inactivated vaccine. In conclusion, we demonstrated murine C3d receptor binding domain fusion significantly increased Th2-biased immune response by inducing IL-4 production.

Keywords: C3d, gC protein, pseudorabies virus, complement C3d receptor binding domain M28, molecular adjuvants

Received: January 19, 2009; **Accepted:** May 22, 2009

Supported by: National Natural Sciences Foundation of China (No. 30800826).

Corresponding author: Aizhen Guo. Tel: +86-27-87286881; Fax: +86-27-87282608; E-mail: aizhen@mail.hzau.edu.cn

*These authors contributed equally to this study.

国家自然科学基金项目(No. 30800826)资助。

伪狂犬病(Pseudorabies)是当今危害养猪业的最重要传染病之一, 研制更安全、高效、廉价的新型疫苗一直是伪狂犬病研究的重要方向^[1,2]。伪狂犬病毒的囊膜蛋白 gB、gC 和 gD 是病毒感染细胞的几个关键步骤中所必需的基因。因此, 以伪狂犬病毒的囊膜蛋白 gB、gC 和 gD 为靶抗原的核酸疫苗首先能够比传统疫苗更有效地减少宿主感染病毒后的排放, 尤其宿主在有母源抗体存在的情况下应用核酸疫苗能够更好地起到免疫保护作用^[3]。然而核酸疫苗的最大缺陷是产生的抗体水平低和较慢, 目前报道的可以增强伪狂犬病毒核酸疫苗免疫效果的方法有应用辛巴病毒作为载体构建自杀性 DNA 疫苗^[4], 应用集落刺激因子 GM-CSF^[5]、CpG^[6]、IL-2^[7]、IFN- γ ^[8]等作为分子佐剂。

目前研究证实, 补体 C3d 与靶抗原结合后能够有效增强抗原的体液免疫反应^[9], C3d 作为补体被抗原激活后的最后裂解产物与抗原融合表达后可以显著增强融合蛋白的免疫原性^[10]。C3d 能够与 B 细胞表面的补体受体 2 或者 CD21 分子结合。CD21 和 B 细胞的膜蛋白 CD19 组成信号传导复合物, 其中 CD21 是负责与配体结合的亚单位, 而 CD19 则负责把信号传导给细胞内成分^[11]。当抗原补体复合物与抗原特异性 B 细胞相互作用时, 抗原通过 B 细胞受体(BCR)传递刺激信号, 而 C3d 同时通过 CD19 传递信号^[12], 这就加强了对抗原特异性 B 细胞的刺激。抗原补体复合物和树突状细胞表面分子 CD21 的相互作用增强了树突状细胞对抗原的捕获, 进一步提高了抗原提呈作用。补体受体 2(CR2)与 C3d 的结合区域(M28)位于补体 C3 的 1209-1236 氨基酸间^[13]。本试验将研究补体 C3d 的 CR2 受体结合区域 M28 是否能够增强伪狂犬病毒 gC 基因 DNA 疫苗免疫反应。

1 材料与方法

1.1 细胞、毒株和质粒

猪伪狂犬病毒(PrV)鄂 A(Ea)株、DH5 α 和 PK-15 细胞均为华中农业大学畜牧兽医学院病毒室保存。含有 linker(G4S2)的 pUC-19-linker 质粒由宾夕法尼亚大学 Bello 博士惠赠。含分泌型信号肽 tPA (Tissue plasminogen activator-组织血纤维蛋白酶原激活因子的信号肽) pcDNA3.1-tPA 为郭爱珍课题组构建并保存。

1.2 方法

1.2.1 M28 的克隆

根据已报道的 M28 在补体 C3 序列(GenBank Accession No. NM_009778)上的位置设计引物, 以带有鼠 C3d 的 pUC-19 质粒(郭爱珍课题组构建并保存)为模板进行 PCR 扩增, 引物序列如表 1 所示。采用与 Toss 相同的构建策略^[11], 以 pUC-19-linker 为骨架构建含有 4 拷贝 M28 分子的重组质粒 pUC19-4(M28)。

1.2.2 伪狂犬病毒 gC 基因的克隆

以含有 gC 基因全长序列的 pSFVC1.5 质粒(华中农业大学兽医学院病毒室肖少波博士构建并惠赠)为模板, 参考 GenBank 上公布的 gC 基因核苷酸序列设计引物(GenBank Accession No. AF158090)扩增 gC 基因的胞外区部分(去除掉信号肽、跨膜区和胞内区), 上下游引物分别引入 Bgl II 和 BamH I 位点, 引物序列如表 1。PCR 产物经 Bgl II 和 BamH I 双酶切后直接连入经 BamH I 单酶切的 pcDNA3.1-tPA 上, 重组质粒经酶切、测序鉴定正确后命名为 sgC。

1.2.3 sgC-M28₄ 重组表达质粒构建

用 Bgl II 和 BamH I 双酶切重组质粒 pUC19-4(M28), 回收酶切片后连入经 BamH I 单酶切的 sgC 重组质粒以获得分泌型的 M28 与 gC 基因融合表达质粒, 重组质粒经酶切鉴定正确后命名为 sgC-M28₄ (结构示意图见图 1)。

1.2.4 转染和表达

按 LipofectAMINE 2000 (Invitrogen, USA)脂质体转染试剂盒说明书方法将重组表达质粒分别转染 PK-15 细胞, 再通过 G418 筛选阳性细胞构建表达重组蛋白的细胞系, 收集 30 μ L 细胞上清液进行 SDS-PAGE 蛋白凝胶电泳分离, 并利用针对 gC 蛋白的多克隆抗体进行 Western blotting 分析。

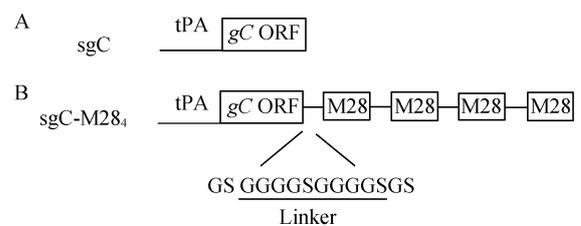


图 1 重组表达质粒的结构示意图

Fig. 1 Schematic diagram of the plasmids expressing sgC-M28₄ and sgC.

表 1 用于 M28 和 gC 基因扩增的引物序列

Table 1 Primer pairs used to amplify the M28 and gC gene

Primer name	Primer sequence (5'-3')
M28 (sense primer)	ACGCGTCGACCATGGATCCCAACA
M28 (antisense primer)	TCGGGATCCGGCCTAGGATGTG
gC (sense primer)	TTTAGATCTCCGTCGTCCACGACGGCGCTCGGC
gC (antisense primer)	TTTGATCCGGCAGCTGCGAGGGCATGCCCTC

1.2.5 免疫和攻毒

6~8 周龄的 BALB/c 鼠分成 4 组, 每组 10 只, 分别免疫空载体 pcDNA3.1、sgC、sgC-M28₄ 和伪狂犬灭活疫苗。免疫 3 次, 间隔 3 周, 每次经后腿肌肉免疫 100 μ L 含有 100 μ g 重组质粒的 PBS 缓冲液。灭活疫苗组免疫 2 次, 间隔 4 周, 皮下免疫 2 次, 每次 100 μ L。于首免当天及首免后 2、4、6、8 周通过小鼠尾静脉采血, 用于检测针对伪狂犬病毒的 ELISA 抗体。试验动物均于首免后 8 周, 经后腿肌肉接种 100 μ L $10^{5.0}$ TCID₅₀ (相当于 316 LD₅₀) 伪狂犬病毒, 进行病毒攻击试验, 攻毒后逐日观察动物的临床症状、死亡情况。

1.2.6 ELISA 抗体检测

使用伪狂犬灭活病毒包被的 ELISA 板, 采用终点稀释法检测血清 ELISA 抗体。首先将血清进行 100 倍稀释, 第一个孔加入 100 μ L, 然后做倍比稀释。然后按照试剂盒说明书进行操作: 37°C 反应 1 h, 洗涤 3 次后加入 5000 倍稀释的特异性 HRP 标记二抗 (用封闭液稀释) 100 μ L/孔, 37°C 反应 1 h, 经洗涤后加入 TMB 底物 100 μ L, 反应 15 min, 最后加入 50 μ L 终止液终止反应, 用酶标仪在 630 nm 波长下测定 OD 值。用 PBS 作为背景对照, 检测孔与 PBS 对照孔 OD 比值大于或等于 2.1 的最高稀释度的倒数为该血清的抗体滴度。

1.2.7 IFN- γ 和 IL-4 的定量检测

于首免后 8 周, 每组取 2 只 1.2.5 中的免疫小鼠进行淋巴细胞分离试验分析免疫小鼠的细胞免疫水平。将分离好的脾细胞加入 24 孔细胞培养板中 (4×10^5 个/孔), 然后加入 20 μ L 灭活的 PrV ($1 \times 10^{7.5}$ TCID₅₀, 0.1 mL) 作为刺激原。孵育 72 h 后收获培养细胞上清, 利用商业用的 IFN- γ 、IL-4 检测试剂盒 (Biosource, USA) 进行 IFN- γ 和 IL-4 定量检测。

1.2.8 统计学方法

比较各免疫组小鼠产生的抗体水平和细胞免疫

反应的差异均采用双样本等方差 *t* 检验。 $P < 0.05$ 为差异显著, $P < 0.01$ 为差异极显著。

2 结果

2.1 重组质粒的表达

表达分泌形式 gC (sgC) 糖蛋白、M28 与 gC 融合表达蛋白 (sgC-M28₄) 的重组质粒经酶切鉴定和测序证明正确后, 转染 PK-15 细胞, 构建细胞系, 取 30 μ L 上清进行 SDS-PAGE 和 Western blotting 分析。结果显示重组质粒 sgC 和 sgC-M28₄ 相对应的孔道分别出现了约 44 kD、60 kD 大小的特异性条带而空载体组没有出现特异性条带 (图 2)。这一结果说明 sgC、sgC-M28₄ 重组蛋白能够在哺乳动物细胞内表达并且分泌到细胞外, 而且融合了 4 拷贝的 M28 不会影响其分泌表达。

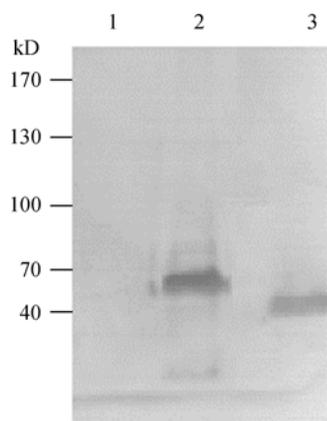


图 2 Western blotting 检测 pcDNA3.1+、sgC 和 sgC-M28₄ 在 PK-15 细胞中的表达

Fig. 2 Expression of pcDNA3.1+, sgC and sgC-M28₄ in transfected PK-15 cells was detected by Western blotting with the antibody to gC protein. 1: blank vector pcDNA3.1+; 2: sgC-M28₄ encoding about 60 kD fusion protein of sgC-M28₄; 3: sgC encoding about 44 kD ectodomain of gC protein.

2.2 PrV gC 蛋白 ELISA 抗体的检测

以商业用伪狂犬灭活病毒包被的 ELISA 抗体检测试剂盒测定 0、2、4、6、8 周血清的 ELISA 抗体

水平, 结果表明首免后第 2 周, sgC-M28₄ 免疫组产生的抗体滴度显著高于 sgC 免疫组 ($P < 0.01$), sgC 免疫组抗体滴度为 1:100, 而空载体免疫组检测不到抗体产生。sgC、sgC-M28₄ 免疫组的抗体滴度在第 8 周分别达到 1:600、1: 9549, 其中灭活疫苗免疫组诱导产生了最高的抗体滴度 1:39 810(图 3)。

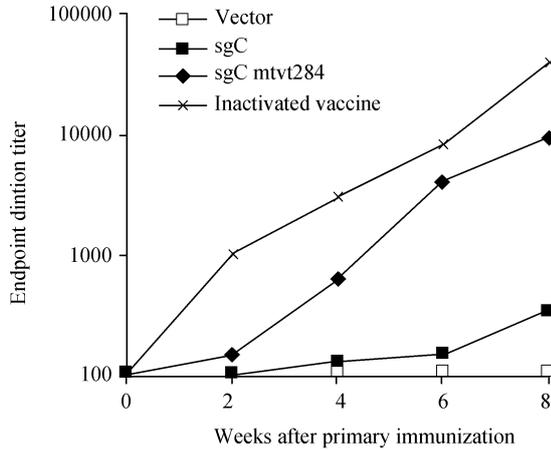


图 3 首免后不同免疫组诱导的抗 gC IgG ELISA 抗体检测
Fig. 3 Anti-gC IgG growth in mice after intramuscularly inoculation of various plasmids or inactivated vaccine.

2.3 细胞因子 IL-4 和 IFN- γ 检测

为了进一步分析细胞免疫和体液免疫激活情况, 采用细胞因子 IL-4 和 IFN- γ ELISA 试剂盒对体外刺激的脾细胞培养上清中的 IL-4 和 IFN- γ 进行了检测。用灭活的伪狂犬病毒刺激脾细胞, 收获细胞上清检测其 IL-4 和 IFN- γ 浓度。其中 IFN- γ 含量水平可以间接反映 Th1 免疫反应水平, IL-4 含量水平可以间接反映 Th2 免疫反应水平。上述 2 项检测结果显示 (图 4): 灭活疫苗诱导产生了最高的 IL-4 水平 (2000 pg/mL), 而 sgC 免疫组 IL-4 的产生最低 (574 pg/mL)。融合表达 M28 能够显著增强 IL-4 含量, 其中对 IL-4 产生的水平 (1550 pg/mL) 比 sgC 免疫组高 (574 pg/mL) ($P < 0.05$)。sgC-mM28₄ 免疫组 IL-4 的水平低于灭活疫苗产生的 IL-4 (图 4A)。sgC、sgC-mM28₄ 组 IFN- γ 产生的水平都比较相似 (697 pg/mL), 而灭活疫苗免疫组的 IFN- γ 含量很低 (239 pg/mL) ($P < 0.01$) (图 4B)。

2.4 攻毒保护试验

在 3 免后 2 周, 每组 8 只老鼠用 100 μ L 10⁵ TCID₅₀ (相当于 316 LD₅₀) 的 PrV Ea 株病毒后腿

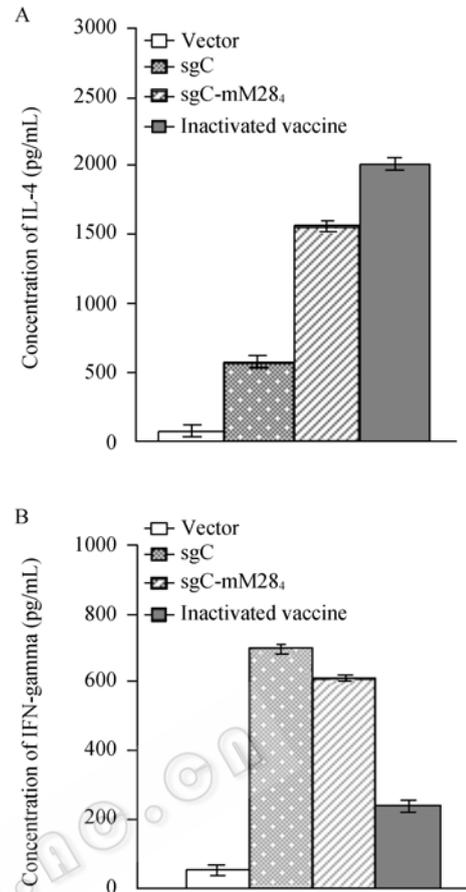


图 4 免疫组脾细胞 IL-4、IFN- γ 水平检测
Fig. 4 Levels of IL-4 (A) and IFN- γ (B) from splenocytes in mice immunized with gC encoding plasmids or inactivated vaccine.

表 2 攻毒后小鼠的存活情况

Table 2 Survival of the vaccinated mice after challenged with lethal PrV Ea strain^a

Group	Survival (No. of mice)	Protection rate (%)	Clinical sign ^b
sgC	2/8	25	+
sgC-mM28 ₄	7/8	88	+/-
Inactivated vaccine	8/8	100	-
Vector	0/8	0	+

a: the immunized mice were challenged with 316 LD₅₀ of PrV Ea strain; b: mice showing visible signs of infection were recorded as +; mice not showing visible signs of infection were recorded as -; one to three among eight mice showing visible signs of infection were recorded as +/-.

肌肉注射进行攻击。每天观察发病和死亡情况, 在空白载体和 sgC 免疫组有部分小鼠出现发病症状, 表现为兴奋性增高, 注射部位搔痒, 被毛和皮肤破损。灭活疫苗免疫组的老鼠都抵抗住了强毒的攻击, 没有出现死亡情况。然而空载体免疫组的老鼠于攻毒后的第 3 天开始出现死亡并于第 4 天全部死亡。

sgC-mM284 免疫组的老鼠在第 5 天死亡了 1 只, 其余的都抵抗住了强毒的攻击, 保护率为 88%。sgC 免疫组于第 4 天死亡了 2 只, 并且有部分老鼠出现了兴奋的神经症状又在第 6~8 天陆续死亡了 4 只, 保护率为 25%(表 2)。

3 讨论

近来, 补体 C3d 作为一个分子免疫佐剂已被广泛的研究^[10-12]。补体 C3d 被证实可以增强抗原的体液免疫反应, 而作为补体 C3d 的 CR2 受体结合区 M28 是否具有同样的作用研究的很少。本试验证实了补体 C3d 的 CR2 受体结合区 M28 同样在与抗原进行融合表达后可以显著地增强抗原的体液免疫反应。本研究结果显示, sgC-mM284 免疫组诱导产生的 ELISA 抗体水平(1: 9549)是 sgC 免疫组(1: 600)的 17 倍(图 3)。sgC-M284 免疫组的刺激指数(SI)最高并且略高于 sgC 免疫组, 且都显著高于灭活疫苗免疫组。同时 sgC、sgC-mM284 免疫组 IFN- γ 的产生都比较相似(697 pg/mL), 而灭活疫苗免疫组的 IFN- γ 含量很低(239 pg/mL), 说明 sgC 和 gC-mM284 免疫组比灭活疫苗免疫组诱导产生了更高的细胞免疫反应。然而灭活疫苗免疫组产生更高的体液免疫反应, 这从灭活疫苗免疫组诱导产生了最高的抗体滴度 1:39 810 以及诱导产生了最高的 IL-4 水平(2000 pg/mL)可以得到证实。其中 sgC-mM284 免疫组诱导产生较高的 ELISA 抗体水平(1: 9549)和较好的细胞免疫水平。攻毒结果 sgC 免疫组死亡了 6 只, 存活 2 只, 保护率为 25%, 而 sgC-mM284 免疫组小鼠死亡了 1 只, 其余的都获得了保护。本试验证实了 M28 与抗原 gC 融合显著增强了基于 Th2 途径的体液免疫反应, 使得 sgC-mM284 免疫组的 Th1/Th2 趋向平衡, 提高了针对病毒的保护力。

在补体 C3d 的 CR2 受体结合区 M28 与伪狂犬病毒 gC 抗原融合表达形成的蛋白复合物中, 抗原 gC 蛋白本身与 B 细胞上面的抗原受体 BCR 结合, 而 M28 则可以通过与 B 细胞和树突状细胞上面的补体受体 CR2 或 CD21 结合提高了抗原刺激域值^[13]。而且通过两个信号传导通道 BCR 和 CD21/CD19 传导信号比单纯的通过 BCR 通道传导信号放大了。

sgC-mM284 免疫组诱导产生的 IL-4 水平(1550 pg/mL)比 sgC 免疫组的 IL-4 水平(574 pg/mL)显著提高, 进一步说明了上述论点。总之, 本试验证实补体 C3d 与 CR2 受体结合区 M28 与抗原 gC 进行融合表达后可以显著地增强抗原 gC 的体液免疫反应, 增强了小鼠机体对病毒攻击的保护力。

REFERENCES

- [1] Bouma A. Determination of the effectiveness of pseudorabies marker vaccines in experiments and field trials. *Biologicals*, 2005, **33**: 241-245.
- [2] Dory D, Torche AM, Beven V, *et al.* Effective protection of pigs against lethal pseudorabies virus infection after a single injection of low-dose Sindbis-derived plasmids encoding PrV gB, gC and gD glycoproteins. *Vaccine*, 2005, **23**: 3483-3491.
- [3] Van Rooij EM, Moonen-Leusen HW, de Visser YE, *et al.* A DNA vaccine coding for gB and gD of pseudorabies virus (suid herpes type 1) primes the immune system in the presence of maternal immunity more efficiently than conventional vaccines. *Vaccine*, 2006, **24**: 1264-1273.
- [4] Dufour V, De Boissesson C. Use of a Sindbis virus DNA-based expression vector for induction of protective immunity against pseudorabies virus in pigs. *Vet Immunol Immunopathol*, 2003, **93**: 125-134.
- [5] Yoon HA, Aleyas AG, George JA, *et al.* Cytokine GM-CSF genetic adjuvant facilitates prophylactic DNA vaccine against pseudorabiesvirus through enhanced immune responses. *Microbiol Immunol*, 2006, **50**: 83-92.
- [6] Dory D, Beven V, Torche AM, *et al.* CpG motif in ATCGAT hexamer improves DNA-vaccine efficiency against lethal pseudorabies virus infection in pigs. *Vaccine*, 2005, **23**: 4532-4540.
- [7] Bu J, Song Y, Rompato G, *et al.* Co-delivery of IL-2 or liposomes argument the responses of mice to a DNA vaccine for pseudorabies virus IE180. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, 2003, **26**: 175-187.
- [8] Tudor D, Riffault S, Carrat C, *et al.* Type I IFN modulates the immune response induced by DNA vaccination to pseudorabies virus glycoprotein C. *Virology*, 2001, **286**: 197-205.
- [9] Fischer T, Buttner M, Rziha HJ. T helper 1-type cytokine transcription in peripheral blood mononuclear cells of pseudorabies virus (Suid herpesvirus 1)-primed swine indicates efficient immunization. *Immunology*, 2000, **101**: 378-387.
- [10] Wang L, Sunyer JO, Bello LJ. Immunogenicity of a bovine viral diarrhea virus E2-C3d fusion protein containing a bovine homolog of C3d. *Dev Comp Immunol*,

- 2005, **29**: 907-915.
- [11] Mitchell JA, Green TD, Bright RA, *et al.* Induction of heterosubtypic immunity to influenza A virus using a DNA vaccine expressing hemagglutinin-C3d fusion proteins. *Vaccine*, 2003, **21**: 902-914.
- [12] Green TD, Montefiori DC, Ross TM. Enhancement of antibodies to the human immunodeficiency virus type 1 envelope by using the molecular adjuvant C3d. *J Virol*, 2003, **77**: 2046-2055.
- [13] Wang L, Sunyer JO, Bello LJ. Fusion to C3d enhances the immunogenicity of the E2 glycoprotein of type 2 bovine viral diarrhea virus. *J Virol*, 2004, **78**: 1616-1622.

《生物工程学报》将结合第七届中国酶工程学术研讨会出版“酶工程”专刊

为了加速酶工程技术基础研究及成果的研发交流与互动步伐,加强酶制剂生产及应用技术的交流,促进酶工程科研、生产与应用的相互合作,沟通酶工程科研成果转化为生产力的渠道,以提高生物催化工业的先进水平,中国微生物学会酶工程专业委员会、中国食品科技学会酶制剂专业学会将共同主办第七届中国酶工程学术研讨会,会议将于2009年9月16~19日在合肥梅山饭店举办,本刊拟结合该会议于2009年12月出版一期主题为“酶工程”的专刊。

为缩短审稿时间、加快专刊稿件的出版速度,本刊将专门组织6~10人的专家评委会,严格按照《生物工程学报》评审要求对稿件进行认真评审。对所收稿件进行快速处理,最终择优筛选出一定数量的稿件以专刊出版,具体安排如下:

一、征文范围

本专刊收录酶工程领域所取得的最新研究成果和技术成果,包括研究论文和综述,但不限于此:

1. 国内外酶制剂生产及应用发展及前景
2. 酶研究的基础问题、热点及新生长点
3. 酶工程新技术、新工艺在新领域中的应用
4. 基因工程及蛋白质工程优良菌种及工程酶
5. 新酶、极端环境酶、抗体酶及核酶及其应用
6. 有机相酶催化及有机化合物、药物、手性物生物合成
7. 环境监测与控制及洗涤剂用酶
8. 化工、轻工、饲料生产用酶的开发
9. 分析、临床诊断、医疗用酶的开发及生物传感器
10. 生物反应器与后处理工艺

二、投稿要求

1. 投稿方式:全文投稿请通过《生物工程学报》投稿系统在线投稿,详见主页(<http://journals.im.ac.cn/cjbcn/ch/index.aspx>)/投稿须知/投稿方式。

注意事项:投稿时,请在稿件标题栏注明“酶工程专刊”字样,否则将以普通稿件进行处理。

2. 稿件格式:参照《生物工程学报》论文格式,详见主页/投稿须知/书写要求。

3. 投稿文章应未在正式出版物上发表过,也不在其他刊物或会议的审稿过程中,不存在一稿多投现象;应保证投稿文章的合法性(无抄袭、剽窃、侵权等不良行为)。

4. 会议将编印论文或成果摘要汇编,如果仅投稿摘要请 email 发到黎高翔老师的邮箱 ligaox2003@yahoo.com.cn。论文摘要千万不要用传真发来。

三、本专刊几个关键的时间:

1. 收稿截止日期:2009年9月25日
2. 决定是否录用日期:2009年10月25日
3. 录用后作者修回截止日期:2009年11月5日
4. 出版日期:2009年12月25日

四、特别说明:

1. 本专刊不是增刊,而是在2009年第12期《生物工程学报》正刊上刊出。

2. 专刊投稿文章免收审理费;录用后正式刊发的文章将请作者提交版权转让承诺书,并按照《生物工程学报》相关规定收取版面费和支付作者稿酬,同时赠送样刊及单行本。

五、联系方式:

电话:010-64807509 传真:010-64807327 E-mail: cjb@im.ac.cn

邮寄地址:北京市朝阳区北辰西路1号院3号中科院微生物研究所 B401《生物工程学报》编辑部(邮编:100101)

如果您还有什么问题,欢迎随时与我们联系,我们将在第一时间给您答复。

欢迎您的来稿!