

基于 DNA 扣除法的 Real-time RT-PCR 对工程乳酸菌外源基因表达的绝对定量分析

史瑞, 刘飞, 霍贵成, 杨丽杰

东北农业大学 乳品科学教育部重点实验室, 哈尔滨 150030

摘要: 本研究旨在利用 Real-time RT-PCR 对外源基因在工程乳酸菌中的表达进行定量分析, 建立一种新的 Real-time RT-PCR 分析方法。采用玻璃珠热酚法提取工程乳酸菌总 RNA, 对外源目的基因的反转录(含有 cDNA 和 DNA)样品和非反转录(仅含 DNA)样品进行 Real-time PCR 检测, 根据经典绝对定量方法并结合 DNA 扣除法进行分析, 将得到的 Ct 值通过标准曲线换算为样品拷贝数, 通过从反转录样品中扣除 DNA 样品的拷贝数的量, 去除了 DNA 对实验结果的影响, 得出最终的定量结果。采用以上方法分析工程乳酸乳球菌 NZ9000 中外源纤维素酶基因 CBHII 的表达情况, 对表达量较低的目的基因进行转录水平的分析, 避免了 RNA 的损失, 得到了外源基因表达的量 $(1.28 \pm 0.02) \times 10^{-1}$ copies/cfu。这种基于 DNA 扣除法的 Real-time RT-PCR 绝对定量方法可以有效地对外源基因在工程乳酸菌中的表达进行分析。

关键词: 乳酸菌, Real-time RT-PCR, 绝对定量, DNA 扣除法

Real-time RT-PCR based on DNA subtraction for absolute quantification of gene expression in engineered lactic acid bacteria

Rui Shi, Fei Liu, Guicheng Huo, and Lijie Yang

Key Laboratory of Dairy Science, Ministry of Education, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China

Abstract: To evaluate the absolute quantification of a target gene transcription in engineered lactic acid bacteria, we developed the Real-time RT-PCR based on DNA subtraction. We isolated the total RNA from the bacteria samples by glass bead, and then analyzed the Ct data of real-time RT-PCR by DNA subtraction assay. Using this method, we successfully estimated the expression level of CBHII gene in the strain of genetic engineered *Lactococcus lactis*. Since this method could avoid the mRNA copy number loss, it could be used to estimate the expression of other genes in lactic acid bacteria.

Keywords: lactic acid bacteria, Real-time RT-PCR, absolute quantification, DNA subtraction

随着生物基因组学和生物信息学的不断发展以及功能基因组学研究的深入, 基因表达的定量研究

已被广泛应用于生物、医学、食品等方面的研究。实时荧光定量反转录 PCR 技术(Real-time RT-PCR)

Received: December 18, 2008; **Accepted:** July 2, 2009

Supported by: National Natural Science Foundation of China (No. 30771578).

Corresponding author: Lijie Yang. Tel: +86-451-55191807; E-mail: Ljyang01@eyou.com

国家自然科学基金(No. 30771578)资助。

具有简便、快速、不易污染、高灵敏度等优点^[1], 能够实时检测并记录 PCR 扩增产物增加的过程, 弥补了终点法定量 PCR 产物的不足, 使准确定量目的基因 RNA 成为现实^[2-3]。

目前 Real-time RT-PCR 定量基因表达常采用 2 类方法: 即绝对定量和相对定量。无疑绝对定量法较相对定量法准确, 但是对基因表达进行绝对定量分析, 存在的主要问题是: 提取的总 RNA 中会有少量 DNA 的污染^[4]。在分析真核生物转录水平时, 通过设计跨内含子引物的方法可以回避由 DNA 污染引起的定量不准确的问题^[5]; 在原核生物水平, 传统方法是利用 DNase I (RNase Free)降解 DNA, 但是在酶解过程中, 无论是新引入的蛋白和离子成分部分抑制了反转录酶的活性, 还是抽提或灭活 DNase I 过程中对总 RNA 量及质量造成的影响, 都会使定量结果不准确。应用 DNA 扣除法, 可以很好地解决上述问题^[6]。相丽等利用了 DNA 扣除法和相对定量相结合的方法, 对金黄色葡萄球菌的内源 16S rRNA 等基因进行了检测, 也得到了较好的结果^[7]。但是这种方法不适用于对表达量较低的外源基因进行定量分析, 而且得到的相对定量结果不是基因的确切表达量。因此, 本实验以乳酸乳球菌 NZ9000 中的纤维素酶基因 CBH II 的转录水平为研究对象, 分别制备同一检测样品的反转录样品(含有 cDNA 和 DNA)和非反转录样品(含 DNA 和 RNA), 然后进行 Real-time PCR 检测分析, 通过将两者的含量相减, 实现 DNA 的扣除, 无需 DNase I (RNase Free)酶解就可以消除 DNA 对定量结果的影响。本实验实现了对原核生物基因表达的确切定量, 建立了一种基于 DNA 扣除法的 Real-time RT-PCR 绝对定量分析方法。

1 材料和方法

1.1 材料、仪器和试剂

含有纤维素酶基因 CBHII 的工程乳酸乳球菌 NZ9000 菌株(本实验室保存), M₁₇ 培养基(青岛海博公司), TaKaRa MiniBEST Plasmid Purification Kit Ver.2.0、SYBR Premix Ex Taq 试剂盒、PrimeScript RT 试剂盒(TaKaRa 公司), nisin、玻璃珠 0.1 mm(Sigma 公司), 含有 pMD19-T 载体连接的纤维素酶基因

CBH II cDNA 序列的 JM109 菌株, 由东北农业大学李杰教授惠赠。引物根据 GenBank 序列(GenBank Accession No. M16190), 利用 Oligo 6.0 自行设计: Sense: 5'-TCTTCATCACTGATCAAGGTCG-3', Anti-sense: 5'-CGAATCCAGCAACGAGTCCC-3', 委托上海英骏生物技术有限公司合成, ABI 7500 实时荧光 PCR 仪(Applied Biosystems 公司), DU 800 紫外/可见分光光度计(Beckman 公司)。

1.2 绝对定量标准曲线的制备

利用试剂盒提取含有目的基因的 JM109 菌株的质粒并进行常规 PCR 验证。利用紫外分光光度计测定质粒的 OD₂₆₀ 值, 根据拷贝数换算公式^[8]:

$$\text{拷贝数(copies/mL)} = \frac{\text{阿伏伽德罗常数} \times \text{质粒浓度(g/mL)}}{\text{质粒相对分子质量(g/mol)}}$$

计算出质粒样品的拷贝数浓度后, 用 TE 溶液按 10 倍连续梯度稀释 5 次, 得到的样品作为标准品进行绝对定量标准曲线的制作。按 SYBR Premix Ex Taq 试剂盒的组份配制 Real-time PCR 反应液(在冰上进行反应液配制): SYBR Premix Ex Taq(2×)12.5 μL, 0.25 mmol/L dNTPs 2.0 μL, Real-time up (10 μmol/L) 0.5 μL, Real-time down (10 μmol/L) 0.5 μL, 质粒 DNA 模板 2.0 μL, ddH₂O 9.5 μL, 总计 25.0 μL。

配制完成后进行 Real-time PCR 反应, 反应条件为: 95 °C 变性 10 s, 95 °C 5 s, 60 °C 34 s, 40 个循环, 在 60 °C 34 s 步骤收集信号, 调整最佳阈值, 获得 Ct 值; 同时对 Real-time PCR 产物进行 SYBR 熔解曲线分析(所有待测样品均设 3 个重复), 并用灭菌的去离子水代替模板作为阴性对照。反应结束后, 以重组质粒拷贝数的对数值为横坐标, 检测出的 Ct 值为纵坐标绘制 CBH II 基因的绝对定量标准曲线, 同时获得回归方程、斜率 slope 和相关系数 R² 等参数。

1.3 工程乳酸乳球菌总 RNA 的提取

将工程菌液按 1%接种量接种于 GM₁₇ 培养基中, 30 °C 静置培养至对数生长期后进行平板菌落计数; 加入终浓度为 30 ng/mL 的 nisin 诱导 5 h 后离心收集菌体, 利用玻璃珠热酚法提取乳酸乳球菌总 RNA^[9-10]。取 4 mL 菌液于 EP 管中, 10 000×g 离心 5 min, 将菌体重悬于 1000 μL 裂解液中后加入 0.2 g 玻璃珠, 2000 r/min 漩涡振荡 3 min 后 10 000×g

离心 5 min; 取悬浮物 700 μL 与同体积饱和酚混合, 68 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 5 min, 10 000 \times g 离心 5 min; 取上层水相 550 μL 与 550 μL 氯仿混合后漩涡振荡 20 s, 10 000 \times g 离心 5 min; 取上层水相 400 μL 与 800 μL 乙醇和 40 μL 3 mol/L 醋酸钠混合, -20 $^{\circ}\text{C}$ 静置 30 min 后 16 000 \times g 离心 5 min; 用 70%乙醇 1000 μL 洗涤沉淀, 16 000 \times g 离心 5 min, 沉淀物干燥 30 min; 将干燥物溶于 40 μL DEPC 水中。以上所有实验器材及溶液均经过 0.1% DEPC 处理, 防止提取过程中 RNA 的降解。取部分总 RNA 样品进行 2%琼脂糖凝胶电泳, 评估其质量。

1.4 RT 样品的制备和 Real-time PCR 检测

取一部分总 RNA 样品按 PrimeScript RT 试剂盒进行 RT-PCR。按 PrimeScript RT 试剂盒的组份配制 RT-PCR 反应液: PrimeScript RT Enzyme Mix I 0.5 μL , 5 \times PrimeScript Buffer 2.0 μL , Oligo dT Primer (50 $\mu\text{mol/L}$) 0.5 μL , Random 6 mers(100 $\mu\text{mol/L}$)0.5 μL , 总 RNA 2.5 μL , RNase Free ddH₂O 4.0 μL , 总计 10.0 μL 。配制完成后进行 RT-PCR 反应, 反转录条件为: 37 $^{\circ}\text{C}$ 15 min, 85 $^{\circ}\text{C}$ 15 s, 得到 RT 样品; 另一部分没有经过 RT-PCR 的样品作为扣除部分的样品^[11]。然后对 RT 样品和扣除部分样品进行 Real-time PCR, 反应条件与制作标准曲线的条件相同(所有待测样品均设 3 个重复), 得到相应样品的 Ct 值, 并用灭菌去离子水代替模板作为阴性对照。

根据相应样品的 Ct 值结合绝对定量标准曲线计算出样品的具体拷贝数, 将所得的 cDNA 和 DNA 总拷贝数(即 RT 样品的总拷贝数)与只含有 DNA 的拷贝数(即扣除部分样品的总拷贝数)相减, 即为 DNA 扣除法得到的绝对定量结果。

2 结果

2.1 绝对定量标准曲线的制备与检测限的确定

对 pMD19-T 载体连接的纤维素酶基因 CBH II cDNA 质粒的常规 PCR 产物进行 2%琼脂糖凝胶电泳验证, 得到的产物片段大小与预期相符, 说明可以作为绘制标准曲线的标准品。构建绝对定量标准曲线的标准品经过系列稀释后, 各个稀释度的实际拷贝数是固定的, 在进行 Real-time PCR 反应后, 得到相应 Ct 值。本实验的标准品初始浓度为 5.60×10^9

copies/mL。纤维素酶基因 CBH II 的 cDNA 绝对定量标准曲线如图 1 所示。

根据标准曲线得到的回归方程: $Y=-3.1102X+36.10$, 标准曲线斜率 slope 为 -3.1102, 通过 PCR 效率公式 $E=10^{[-1/\text{slope}]}-1$, 可以计算出 Real-time PCR 效率 E 为 1.097, 说明扩增效率较好。相关系数: $R^2=0.9969$ 。相关系数 $R^2>0.99$, 说明起始模板浓度倍数的对数值与 Ct 值有较好的线性相关性。在制作标准曲线时, 通过对标准品的检测范围的测定, 发现其浓度在 $10^5\sim 10^9$ copies/mL 时, 浓度的对数值与相应的 Ct 值具有良好的相关性, 且最低检测限度为 10^5 copies/mL。

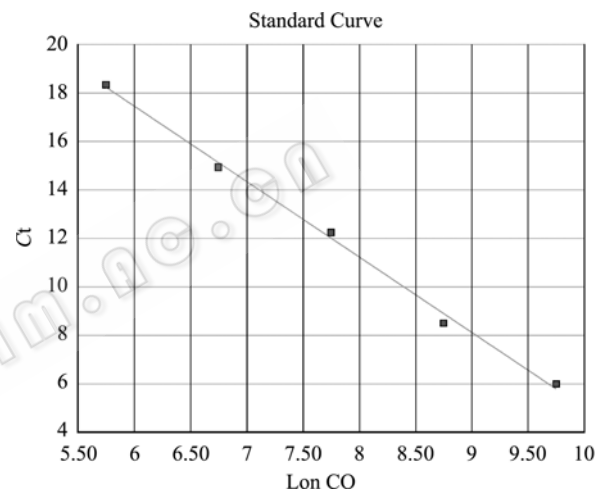


图 1 绝对定量标准曲线

Fig. 1 Standard curve of absolute quantification.

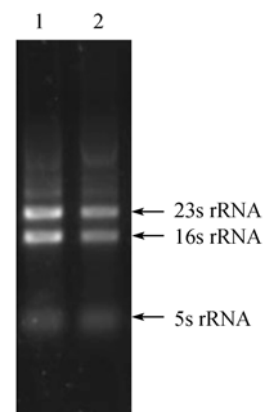


图 2 不同方法提取的总 RNA 琼脂糖凝胶电泳分析

Fig. 2 Gel analysis for total RNA in different isolations.

1: total RNA of glass bead method; 2: total RNA of Trizol method.

2.2 总 RNA 提取质量的评估及 RT 样品与扣除部分样品 Ct 值的测定

由 2 种方法提取的总 RNA 2% 琼脂糖凝胶电泳图 (图 2) 可见: 3 条 RNA 特征带明显, 由上至下分别为 23S rRNA、16S rRNA、5S rRNA, 未出现明显降解; 相比较而言, 玻璃珠热酚法提取的总 RNA 质量好于 Trizol 法, 使用玻璃珠热酚法提取的总 RNA 完全满足 RT-PCR 的要求。待测样品的 Ct 值见表 1。

2.3 利用 DNA 扣除法得到的绝对定量结果

根据实验得到的 Ct 值, 在标准曲线上查出 RT 样品和 DNA 样品相应的拷贝数浓度, 两者相减后除以平板菌落计数结果, 就到了最终的定量结果 (表 1)。

2.4 本实验方法的稳定性、重复性检验及 Real-time PCR 产物的特异性检测

扩增产物的特异性和大小取决于引物的特异

性。对各浓度标准品质粒的扩增产物进行 Real-time PCR 熔解曲线分析 (图 3), 熔解曲线只出现单峰, 且峰值单一, 说明反应特异性好。Real-time PCR 产物经 2% 的琼脂糖凝胶电泳 (图 4) 检测, 长度为预期的 130 bp 左右, 无引物二聚体以及非特异条带出现, 证明了实验结果的可靠性。由扩增曲线图 (图 5) 可知 3 个相同样品的平行性较好, 满足 Real-time PCR 绝对定量标准曲线的制作要求。综上所述, 整个检测方法比较准确, Real-time PCR 的引物设计、反应条件及标准品的制备都符合实验要求, 得到了预期的实验结果, 根据建立的标准曲线就能计算出未知样品拷贝数, 实验结果可靠。此外, 本方法的重复性和稳定性结果如表 2 所示, 实验变异系数均低于 5%。

表 1 利用 DNA 扣除法得到的数据以及绝对定量结果

Table 1 Experimental data and result of absolute quantification with DNA subtraction

	Ct	Copies (copies/mL)	RNA copies (copies/mL)	LAB (cfu/mL)	Result (copies/cfu)
RT sample	17.59±0.12	(8.60±0.72)×10 ⁵	(8.53±0.14)×10 ⁵	6.68×10 ⁶	(1.28±0.02)×10 ⁻¹
Subtraction sample	21.62±0.21	(4.28±0.26)×10 ⁴			

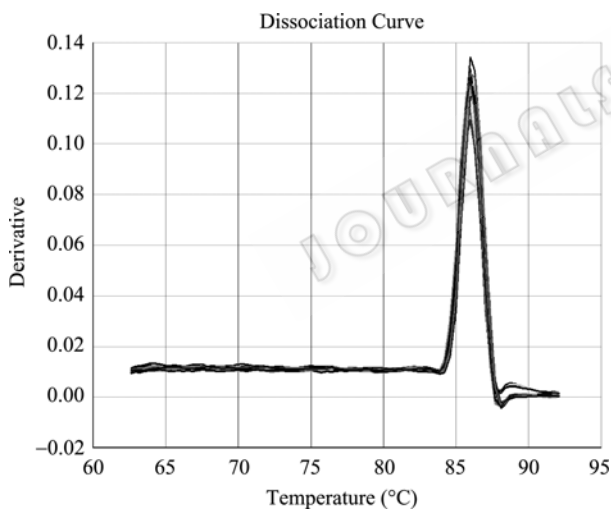


图 3 Real-time PCR 熔解曲线

Fig. 3 Melting curve of Real-time PCR.

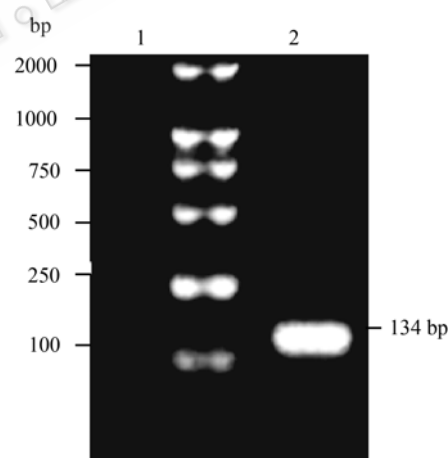


图 4 Real-time PCR 产物琼脂糖凝胶电泳分析

Fig. 4 Gel analysis for Real-time PCR productions. 1: DNA marker; 2: real-time PCR production.

表 2 不同浓度的重复性试验数据

Table 2 Experimental data of replicates of the sample with different concentration

Different concentration of the sample	Ct			Statistic results		
	1	2	3	Average	SD	CV
1	6.01	5.89	6.10	6.00	0.11	1.83%
2	8.57	8.45	8.48	8.50	0.06	0.71%
3	12.28	12.09	12.35	12.24	0.14	1.14%
4	15.15	14.78	14.89	14.94	0.20	1.33%
5	18.30	18.48	18.21	18.33	0.15	0.82%

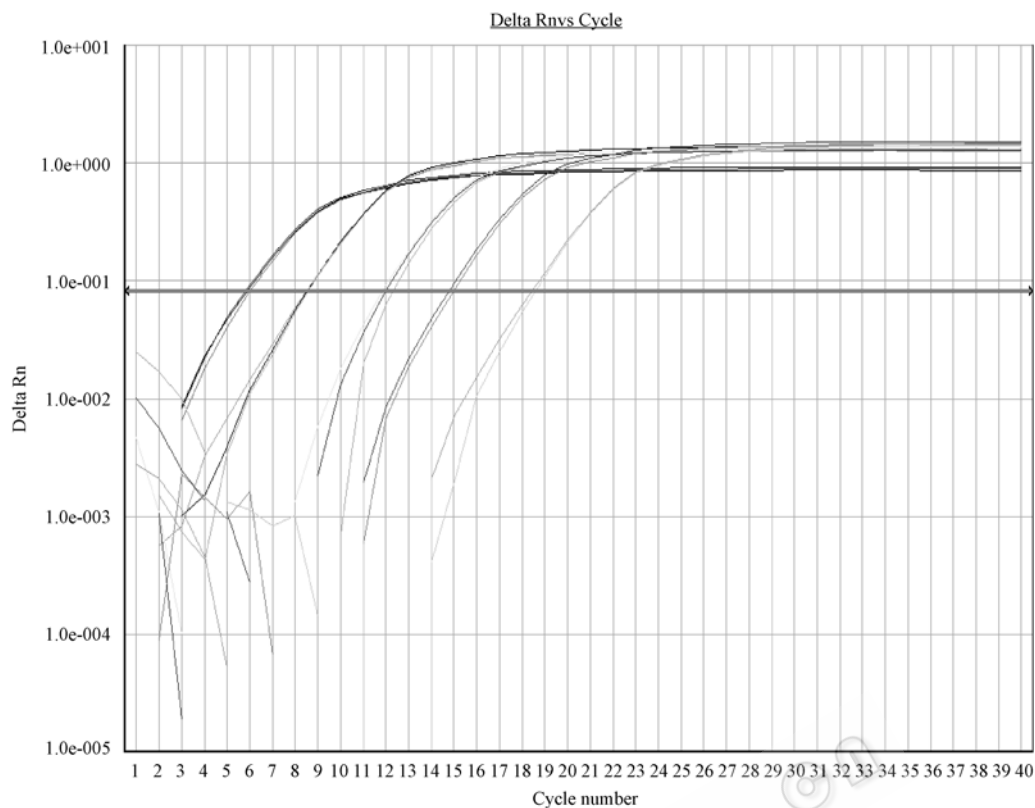


图 5 Real-time PCR 扩增曲线

Fig. 5 Amplification curve of Real-time PCR.

3 讨论

3.1 绝对定量中用于绘制标准曲线的标准品来源及浓度范围

Real-time PCR 绝对定量时, 标准曲线的制备是最为关键的一个环节, 影响定量的准确性, 而标准品的制备又是基础。标准品的构建主要有 3 种方法: 一是化学合成目的片段, 它的优点是纯度高、定量准确, 缺点是受化学合成工艺的限制, 只能合成 120 bp 左右的长度, 而且相对成本较高; 二是直接将 PCR 扩增产物作梯度稀释制作标准曲线, 优点是简便, 缺点是不准确, 也不稳定, 且易造成污染, 实验重复性不好; 三是将 PCR 产物进行纯化后克隆到载体上, 通过提取特异质粒测定其 OD_{260} 值, 然后换算为拷贝数的浓度, 梯度稀释模板进行 Real-time PCR 扩增, 建立标准曲线。该方法稳定准确, 因此本研究选用第 3 种方法构建标准品^[12]。本实验对初始标准品进行了 5 个梯度稀释, 得到了可信结果。同样方法稀释 7 倍时(即浓度为 10^2 copies/mL), 仍然可以得到满足标准的标准曲线^[7]。同时, 本实验之所以

选择了 pMD19-T 作为构建标准品的载体, 是因为 Changsoo Lee 等对该系列载体进行了绝对定量的分析, 研究证明了其在大肠杆菌宿主中拷贝数稳定, 满足作为标准品的载体, 用以制备绝对定量的标准曲线^[13]。

3.2 乳酸菌总 RNA 提取方法比较

总 RNA 提取的质量直接影响未知样品定量的准确程度, 也是决定 Real-time RT-PCR 绝对定量准确性的最关键因素之一^[14]。传统的 Trizol 法是基于氰酸胍-酚-氯仿的原理来提取总 RNA 的, 它比常规的氰酸胍-酚-氯仿方法操作简便, 也减少了对核酸的损伤, 能得到完整的目的基因, 并且还能有效地去除样本中混杂的 PCR 反应抑制物^[15]。玻璃珠热酚法是一种近年来出现的方法, 玻璃珠强大的破壁能力能有效地对乳酸菌进行破壁, 使 RNA 大量释放, 抽提过程有效地去除了残留的蛋白质。就本实验而言, 玻璃珠热酚法更适合乳酸菌这种革兰氏阳性菌。

3.3 绝对定量标准曲线的斜率 slope 的影响因素及合理变化范围

良好的扩增效率是定量准确的基础。在本实验中, PCR 效率 E 是根据标准曲线的斜率 slope 计算出

的, 根据 Real-time PCR 反应的动力学模型^[16], 扩增产物 X_{Ct} 的量为:

$$X_{Ct}=X_0(1+E)^{Ct}$$

两边同时取对数后, 若以 $\lg X_0$ 为横坐标, Ct 值为纵坐标作标准曲线, 则斜率 slope 可表示为:

$$\text{slope}=-\lg^{-1}(1+E)$$

由此可见, 影响斜率 slope 因素只有 E 值, 实际拷贝数和稀释倍数等其他因素并不影响 slope。

通常实验过程中默认 PCR 扩增效率 E 为 1, 但实际 E 值在 0 到 1 范围内波动; 普遍认为最佳的标准曲线的 PCR 扩增效率为 0.9 到 1.1, 根据公式 $\text{slope}=-\lg^{-1}(1+E)$ 推算, slope 波动范围应在 -3.1035 到 -3.5874 之间。若 slope 超出了这个范围, 则应该对 PCR 反应体系进行优化调整^[7]。

3.4 绝对定量的稳定性、重复性和灵敏度

本实验利用 DNA 扣除法和绝对定量相结合对外源基因在工程乳酸菌中的表达进行了分析, 得到了可信的结果。5 次平行实验得到的数据, 经统计学分析其变异系数小于 5%, 可见本方法具有良好的重复性和稳定性。同时, 最低检测限度为 10^5 copies/mL, Geenen 等^[17]的研究也表明, 这个范围和灵敏度完全适用于样本的检测。而且与传统的方法相比较, 本实验还排除了 DNase I 作用过程中对总 RNA 量及质量造成的影响。这表明本实验建立的方法非常适合用于对表达量较低的外源基因的表达进行定量。此外, 由于本研究所建立的分析方法是基于 DNA 扣除法和传统的绝对定量法, 因此本方法也同样适用于对内源基因进行分析。

目前对乳酸菌的相应研究已从结构基因组学逐步转入功能基因组领域的探索性研究, 基因表达分析成为功能研究的热点。本研究建立的方法可以对工程乳酸菌外源基因表达进行有效的绝对定量分析, 从方法上提高了定量的准确性。同时, 本实验对乳酸菌分子生物学方面的研究有一定的意义, 也可为其他生物外源基因表达研究提供思路上的扩展和借鉴。

REFERENCES

[1] Becker K, Pan D, Whitley CB. Real-time quantitative polymerase chain reaction to assess gene transfer. *Hum*

Gene Ther, 1999, **10(15)**: 2559–2566.

[2] Bustin SA. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol*, 2000, **25(2)**: 169–93.

[3] Workenhe ST, Kibenge MJ, Iwamoto T, et al. Absolute quantitation of infectious *Salmon anaemia* virus using different real-time reverse transcription PCR chemistries. *Virological Methods*, 2008, **154(2)**: 128–134

[4] Giulietti A, Overbergh L, Valckx D, et al. An overview of real-time quantitative PCR: applications to quantify cytokine gene expression. *Lipid Res*, 2004, **25(4)**: 386–401, 686–696.

[5] Smith JL, Rangaraj K, Simpson R, et al. Quantitative analysis of the expression of ACAT genes in human tissues by real-time PCR. *J Lipid Res*, 2004, **45(4)**: 686–696.

[6] Hartshorn C, Rice JE, Wangh LJ. Developmentally-regulated changes of Xist RNA levels in single preimplantation mouse embryos, as revealed by quantitative real-time PCR. *Mol Reprod Dev*, 2002, **61(4)**: 425–436.

[7] Xiang L, Jiang YJ, Liu W, et al. Real-time RT PCR with DNA subtraction for relative quantification of gene expression in *Staphylococcus aureus*. *Acta Microbiol Sin*, 2008, **48(4)**: 526–531.

相丽, 姜毓君, 刘伟, 等. 金黄色葡萄球菌基因表达的 DNA 扣除法 Real-time RT PCR 相对定量分析. *微生物学报*, 2008, **48(4)**: 526–531.

[8] Sambrook J, Russell DW, et al. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3rd ed. Beijing: Science Press, 2002.

J 萨姆布鲁克, DW 拉塞尔著. 分子克隆实验指南. 第 3 版. 北京: 科学出版社, 2002.

[9] Vandecasteele SJ, Peetermans WE, Merckx R, et al. Use of cDNA as internal standard for gene expression in *Staphylococci in vitro* and *in vivo*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002, **291(3)**: 528–234.

[10] Ikeda T, Tamate N, Yamaguchi K, et al. Quantitative analysis of *Staphylococcus aureus* in skimmed milk powder by real-time PCR. *Vet Med Sci*, 2005, **67(10)**: 1037–1041.

[11] Yarwood JM, McCormick JK, Paustian ML, et al. Repression of the *Staphylococcus aureus* accessory gene regulator in serum and *in vivo*. *Bacteriol*, 2002, **184(4)**: 1095–1101.

[12] Chen XL, Wang JK, Liu JX. Development of a real-time absolute quantitative PCR for quantification of cellulolytic bacteria in rumen. *Animal Prod*, 2008, **44(11)**: 36–40.

陈小连, 王佳堃, 刘建新. 实时荧光定量 PCR 对瘤胃纤维分解菌定量方法的构建. *动物生产*, 2008, **44(11)**: 36–40.

[13] Lee C, Kim J, Seung GS, et al. Absolute and relative QPCR quantification of plasmid copy number in *Escherichia coli*. *J Biotechnol*, 2006, **123(3)**: 273–280.

- [14] Fleige S, Walf V, Huch S, *et al.* Comparison of relative mRNA quantification models and the impact of RNA integrity in quantitative real-time RT-PCR. *Biotechnol Lett*, 2006, **28**(19): 1601–1613.
- [15] Stene-Johansen K, Grinde B. Sensitive detection of human caliciviridae by RT-PCR. *Med Virol*, 1996, **50**(3): 207–213.
- [16] Bar T, Stahlberg A, Muszta A, *et al.* Kinetic outlier detection (KOD) in real-time PCR. *Nucleic Acids Res*, 2003, **31**(17): 105–115.
- [17] Geenen V, Poulin JF, Dion ML, *et al.* Quantification of T cell receptor rearrangement excision circles to estimate thymic function: an important new tool for endocrine-immune physiology. *J Endocrinol*, 2003, **176** (3): 305–311.



我单位《生物工程学报》等4种期刊论文数据库制作完成并上网

为提高期刊的显示度, 加强对历史文档的整理、保护和利用, 更好地为科研人员提供信息服务, 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部历时近1年, 将包括《生物工程学报》、《微生物学报》、《菌物学报》、《微生物学通报》等4种期刊自第1卷第1期开始, 全部逐页扫描、分类检索, 进行数字化制作, 建成了回溯文档全文数据库, 共计130卷620余期, 约1万多篇论文。由于年代久远, 很多版本已成孤本, 搜集整理及制作工作耗时半年多, 目前已全部完成, 并已上传至各编辑部网页供所有读者免费浏览下载。读者只要输入题目、关键词、年卷期、作者、单位等信息, 就可以方便地检索出四刊发表过的全部相关文章。

此外, 2008年起, 我所四刊将采用 Open Access(开放存取)模式出版, 各刊当期新发表的文章将先于印刷版在网上全文发布, 以利信息的更快传播, 提高文章的阅读量和被引频次。

欢迎浏览下载, 欢迎投稿。请登录期刊联合编辑部网址: <http://journals.im.ac.cn>。