

黑胸大蠊浓核病毒 NS2 蛋白的表达、 抗体制备及亚细胞定位

杨波^{1,2*} 余沛然^{2*} 蔡大威² 董晓敏² 刘志刚¹ 胡征¹ 张珈敏² 胡远扬^{2**}

(1. 湖北工业大学生物技术系 湖北 武汉 430068)

(2. 武汉大学病毒学国家重点实验室 湖北 武汉 430072)

摘要: *ns2* 是黑胸大蠊浓核病毒的一个非结构基因, 所编码的蛋白质大小为 30 kD, 是一个功能未知的基因。为了对该基因进行深入的功能研究, 从感染了黑胸大蠊浓核病毒的蟑螂的后肠组织中通过 RT-PCR 得到 *ns2* 基因编码序列, 将其构建于原核表达载体 pET-28a, 转化大肠杆菌 BL21(DE3) 获得融合表达产物。此融合蛋白经分离纯化后, 免疫新西兰大白兔, 制备其多克隆抗体。采用 Western 印迹技术, 用该抗体检测 *ns2* 基因的真核表达产物, 证明该抗体有较好的针对 NS2 蛋白的专一性, 可用于对 NS2 结构和功能的研究。同时, 将此编码序列克隆至果蝇细胞表达载体 pAC, 得到重组质粒后转染果蝇 S2 细胞表达重组蛋白, 通过共聚焦显微镜用该抗体检测该蛋白在 S2 细胞中的亚细胞定位, 发现 NS2 蛋白主要定位于细胞质, 核内仅有少量分布。

关键词: 黑胸大蠊浓核病毒, NS2 蛋白, 表达, 亚细胞定位

Expression, Purification, Preparation of Polyclonal Antibody and Subcellular Localization of the NS2 Protein of *Periplaneta fuliginosa* Dengovirus

YANG Bo^{1,2*} YU Pei-Ran^{2*} CAI Da-Wei² DONG Xiao-Min² LIU Zhi-Gang¹
HU Zheng¹ ZHANG Jia-Min² HU Yuan-Yang^{2**}

(1. Department of Biotechnology, Hubei University of Technology, Wuhan, Hubei 430068, China)

(2. State Key Laboratory of Virology, Wuhan University, Wuhan, Hubei 430072, China)

Abstract: NS2 is a nonstructural protein of *Periplaneta fuliginosa* dengovirus (PfdNV) with a molecular mass of 30 kD, whose function is not yet clearly understood. In order to study the expression, subcellular distribution and the function of NS2 protein, the coding region of NS2 was amplified from the hindgut tissue of cockroaches infected with PfdNV by RT-PCR and then the recombinant prokaryotic expression vector pET28a-NS2 was constructed. The recombinant plasmid was transformed into *E. coli* BL21 (DE3) to express the 6×His fusion protein in the bacteria. After purification, the fusion protein was injected into New Zealand rabbits to prepare polyclonal antibody. The specificity of the anti-NS2 antibody was successfully

基金项目: 病毒学国家重点实验室开放研究基金资助项目(No. 2007001)

* 共同第一作者

** 通讯作者: ✉ YYPHu@whu.edu.cn

收稿日期: 2009-01-15; 接受日期: 2009-03-18

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

proved by western blotting on the eukaryotic expressed products of NS2 protein. Meanwhile, the full sequence of *ns2* gene was also cloned into the eukaryotic expression vector pAC. The recombinant plasmid pAC-NS2 was then transfected into Schneider line 2 (S2) cells to express NS2 protein in the insect cells. The subcellular localization of NS2 in the insect cells was then investigated by indirect immunofluorescence technique using the anti-NS2 polyclonal antiserum. The confocal laser scanning microscope observation showed that NS2 protein was located primarily in the cytoplasm with some punctate nuclear staining.

Keywords: *Periplaneta fuliginosa* densovirus (PfdNV), NS2 protein, Expression, Subcellular localization

蟑螂, 学名蜚蠊, 是我国主要的城市卫生害虫, 而黑胸大蠊是我国蟑螂的优势品种。黑胸大蠊浓核病毒(*Periplaneta fuliginosa* densovirus, PfdNV) 是由胡远扬等^[1]于 1994 年首次从黑胸大蠊体内分离的一株对黑胸大蠊具有致死性的浓核病毒。自此, 本实验室对该病毒依次进行了理化性质、病理学、全基因组序列测定、感染性克隆构建、病毒粒子三维重构等方面的研究, 使之成为世界首株经过全面系统研究的蟑螂病毒^[2-4]。

黑胸大蠊浓核病毒属于细小病毒科浓核病毒亚科, 是一种单链 DNA 病毒, 基因组全长 5454 bp, 其两端有与病毒复制密切相关的末端反向重复序列 (Inverse terminal repeat, ITR)。病毒全基因组由正链 DNA 或负链 DNA 组成, 正链 DNA 编码结构蛋白 (Viral protein, VP), 而负链 DNA 编码非结构蛋白 (Nonstructure protein, NS), 成熟的病毒粒子随机包装一条正链 DNA 或负链 DNA。

根据 Guo 等^[4]的研究, 黑胸大蠊浓核病毒负链 DNA 有 3 个开放阅读框 (Open reading frame, ORF), 长度分别为 1614 bp、795 bp 和 825 bp, 预测它们分别编码 3 种非结构蛋白 (NS1、NS2 和 NS3), 大小分别为 62 kD、30 kD 和 33 kD, 其中 NS2 ORF 位于 NS1 基因内部。研究表明, 与其它浓核病毒 NS1 蛋白一样, PfdNV NS1 蛋白也具有 ATP 酶和解旋酶活性, 可结合在病毒基因组末端以发夹转移的形式起始病毒基因组的复制^[5]。然而, 针对其他两种非结构蛋白的研究至今尚未见报道。

细小病毒科所有病毒成员均编码 NS2 蛋白, 但是对其进行的研究在广度和深度上远不及 NS1, 到目前为止, 人们只对某些感染脊椎动物的细小病毒编码的该蛋白的功能有所了解。研究表明, 鼠细小病毒非结构蛋白 NS1 在 NS2 的协同作用下对转化细胞有直接毒性作用, 从而预测 NS2 可能是 NS1 的辅助蛋白^[6-8]。

本实验通过提取感染 PfdNV 的黑胸大蠊后肠组织总 RNA, 根据已公布的 PfdNV 基因组序列设计特异性的 *ns2* 引物进行 RT-PCR 扩增, 获得目的基因后将其克隆至 pET-28a 表达载体, 最后经诱导、表达, 纯化从而获得 NS2 蛋白, 并成功制得针对该蛋白的多克隆抗体。同时我们还利用果蝇 S2 细胞对其进行了亚细胞定位的研究, 为进一步研究其功能打下基础。

1 材料和方法

1.1 材料

果蝇 S2 细胞, 大肠杆菌 DH5 α 、BL21(DE3), 黑胸大蠊浓核病毒 (PfdNV) 均由本实验室保存; 罹病的黑胸大蠊由病毒感染而得, 收集的虫体立即用来提取总 RNA 或者存在液氮中备用; 免疫用 1.5 kg 新西兰大白兔由湖北省疾病预防控制中心提供。

1.2 试剂

酶等主要试剂购自 TaKaRa 公司; pAc5.1/V5-His B 果蝇细胞表达载体、Trizol 总 RNA 提取试剂盒、cDNA 第一链合成试剂盒 (含 ThermoscriptTM RT)、Grace 昆虫细胞培养基、胎牛血清 (FBS)、转染试剂 Lipofectin 均为 Invitrogen 公司产品; 溶菌酶、金属螯合亲和层析介质 (Ni-NTA) 购自德国 Qiagen 公司; FITC 标记的羊抗兔 IgG, AP 标记的羊抗兔 IgG 抗体购自 Santa Cruz 公司; 原核表达载体 pET28a 为 Novagen 公司产品; 各种核苷酸引物合成、测序由上海英骏生物工程公司完成。

1.3 方法

1.3.1 引物设计: 参照 GenBank 中黑胸大蠊浓核病毒 *ns2* 基因核苷酸序列, 分别设计用于原核表达和亚细胞定位的特异性引物: 引物 P1, 5'-TACCGGATCCATGGAAAGCAGCCAGACAACA GTAA-3' 与引物 P2, 5'-GACGCTCGAGCTATTTTC TCCATTTCTTCGCGGAT-3' (划线处为限制性内切

酶 *Bam*H I 和 *Xho* I 酶切位点)用于基因的原核表达; 引物 P3, 5'-TACCGGTACCATGGAAAGCAGCCAGACAACAGTAA-3' 与引物 P4, 5'-GACGGAATTCCTATTTTCTCCATTTCTTCGCGGAT-3' (划线处为限制性内切酶 *Kpn* I 和 *Eco*R I 酶切位点)用于 NS2 的亚细胞定位。

1.3.2 ns2 基因的扩增: 选取健康的 4 龄黑胸大蠊若虫若干条, 采用腹腔注射的方法(每只注射 1 μ g 经 CsCl 密度梯度离心纯化的 PfDNV 病毒粒子)使之感染。喂养 7 d 后, 黑胸大蠊陆续发病, 选取发病典型的 3~4 只, 取其后肠, 液氮碾磨后, 用 Trizol 提取总 RNA, 提取步骤参照 Trizol^M 的说明书。以 Oligo(dT) 为引物, 由 ThermoscriptTM RT 逆转录酶催化合成总 cDNA。以此 cDNA 为模板, 以 P1/P2 为引物按如下程序扩增: 94 $^{\circ}$ C 3 min; 94 $^{\circ}$ C 45 s, 55 $^{\circ}$ C 45 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。0.8% 琼脂糖凝胶电泳分析 PCR 产物, 回收特异性目的片段, 取名为片段 BX。

1.3.3 原核与真核表达载体的构建: 以 BX 为模板, 用引物 P3/P4 进行 PCR 扩增, 得到目的片段 KE, 回收后, 将此二片段分别用限制性内切酶进行双酶切, 其中 BX 使用 *Bam*H I 和 *Xho* I, KE 使用 *Kpn* I 和 *Eco*R I。同时原核表达载体 pET28a 和真核表达载体 pAc5.1/V5-His B 也相应进行双酶切。酶切后的 BX 与 pET28a、KE 与 pAc5.1/V5-His B 分别进行连接。连接产物前者转化大肠杆菌 BL21(DE3)感受态细胞, 后者转化大肠杆菌 DH5 α , 分别构建原核表达质粒 pET28a-NS2 与真核表达质粒 pAC-NS2。

1.3.4 NS2 蛋白的表达、纯化及抗体制备: 将含重组质粒 pET28a-ns2 的大肠杆菌 BL21 (DE3) 接种到新鲜 LB 液体培养基中培养, 经优化表达条件, 培养至 OD 值为 0.6 后加入 IPTG 至终浓度 1.0 mmol/L, 37 $^{\circ}$ C 诱导表达 2 h。收集菌体后 PBS 重悬, 超声波破碎后 12000 \times g 离心 10 min, 去上清得到包涵体。将包涵体用 8 mol/L 尿素溶解, 经 Ni-NTA 亲和层析柱纯化后进行 SDS-PAGE 检测其大小与纯度。取 400 μ g 纯化的蛋白与等体积的完全弗氏佐剂充分混匀后皮下多点注射新西兰大白兔。1 个月后, 每隔 1 星期免疫 1 次(以不完全弗氏佐剂取代完全弗氏佐剂)。免疫接种 4 次后, 制备相应的兔抗血清。

1.3.5 NS2 多抗的鉴定: 用 Western 印迹的方法鉴定多抗血清。用质粒 pAC-NS2 转染果蝇 S2 细胞, 24 h

后收集细胞并抽提总蛋白^[9]。将 30 μ g 细胞总蛋白经 10% SDS-PAGE 后电转移到硝酸纤维素膜上, 5% 脱脂奶粉封闭后, 以免抗 NS2 抗血清(1: 300 稀释)为一抗, 碱性磷酸酶标记的羊抗兔 IgG(1: 2000 稀释)为二抗进行反应, 用 NBT-BCIP 进行显色。

1.3.6 NS2 亚细胞定位的免疫荧光染色检测: 准备 S2 的贴壁细胞玻片, 将质粒 pAC-NS2 转染果蝇 S2 细胞, 48 h 后收获细胞, PBS 洗涤, 多聚甲醛固定, RNAase 消化处理, 正常山羊血清封闭, 分别以兔抗 NS2 抗血清(1: 200 稀释)作为一抗, FITC 荧光标记的羊抗兔 IgG(1: 250 稀释)为二抗, PI(终浓度为 10 μ g/mL)为核染料, 进行荧光免疫细胞化学反应, Zeiss 激光共聚焦显微镜观察 NS2 在细胞内的表达及定位。

2 结果

2.1 ns2 基因的扩增

RT-PCR 扩增 *ns2* 基因片段结果见图 1, 在约 800 bp 处获得单一目的条带, 同预期的大小相一致。

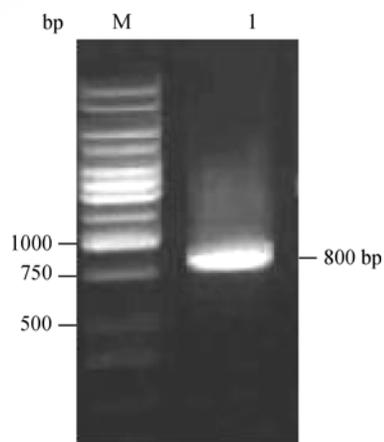


图 1 *ns2* 的 RT-PCR 扩增结果

Fig. 1 RT-PCR of *ns2*

Note: M: 1 kb ladder DNA marker; 1: RT-PCR product of *ns2*.

2.2 重组表达质粒的构建及鉴定

将该基因片段分别插入原核表达载体 pET28a 及真核表达载体 pAc5.1/V5-His B, 得到重组质粒 pET28a-NS2 与 pAC-NS2。二者分别经 *Bam*H I/*Xho* I 和 *Kpn* I/*Eco*R I 双酶切初步鉴定显示, 切出的基因片段的大小同预期结果相一致(图 2), 将获得的阳性重组体进行 DNA 测序表明, 重组表达质粒中插入的 *ns2* 基因片段的序列及读码框架均完全正确。

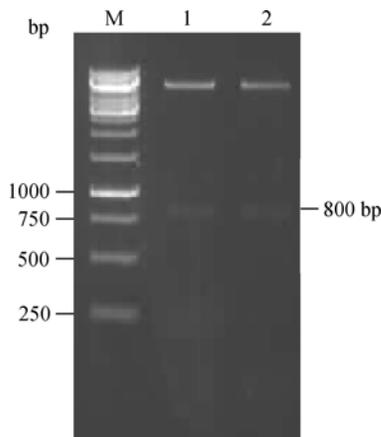


图2 重组表达载体的构建与鉴定

Fig. 2 Construction of the expression vectors and their restriction enzyme digestion analysis

Note: M: 1 kb ladder DNA marker; 1: pET28a-NS2/*Bam*H I+*Xho* I; 2: pAC-NS2/*Kpn* I+*Eco*R I.

2.3 NS2 蛋白的诱导表达及纯化

ns2 编码天然蛋白的分子量为 30 kD, 加上 His-tag 后表达的蛋白预期大小为 32 kD。用 IPTG 对受体菌 BL21(DE3)进行诱导表达, 将诱导后的全菌进行 SDS-PAGE。分析结果发现, pET28a-NS2 表达的融合蛋白大小约为 32 kD, 与预期一致, 但主要以包涵体的形式存在(图 3)。将包涵体用 8 mol/L 尿素溶解后, 用 Ni-NTA 柱亲和层析纯化, 经 SDS-PAGE 检测。结果显示: 在 150 mmol/L 咪唑的洗脱液中出现一条分子量约为 32 kD 的蛋白条带, 与预期相符(图 3)。

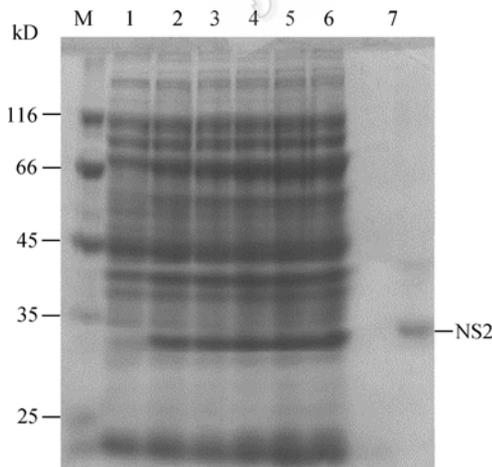


图3 His-NS2 融合蛋白诱导表达与纯化的 SDS-PAGE 分析

Fig. 3 SDS-PAGE analysis of His-NS1 expression in *E. coli* and its purification

Note: M: Marker; 1: Bacterial lysate before IPTG induction; 2-6: Bacterial lysate after IPTG induction for 2,3,4,5 and 6 hours, respectively; 7: Purified His-NS1 fusion protein.

2.4 自制的兔抗 NS2 抗体特异性的 Western blot 检测

于 S2 细胞中转染 pAC-NS2, 用自制的兔抗 NS2 抗体进行 Western blot, 以未转染表达质粒的细胞为阴性对照, 检测在 S2 细胞中表达的 NS2 蛋白。结果显示, 在 M_r 为 30000 处可见与 NS2 蛋白大小一致的条带, 而未转染的细胞里则没有检测到 NS2 的信号(图 4)。

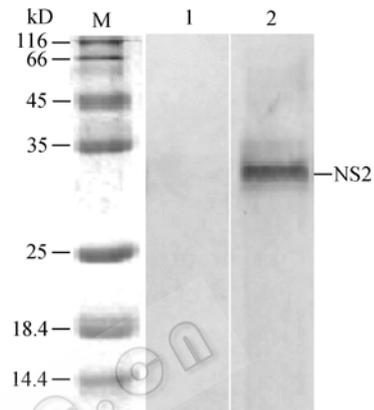


图4 S2 细胞中表达的 NS2 蛋白的 Western blot 检测

Fig. 4 Western blot analysis of NS2 expression in S2 cells

Note: M: Marker; 1: Lysate of S2 cells; 2: Lysate of S2 cells transfected with pAC-NS2.

2.5 NS2 亚细胞定位的免疫荧光分析

免疫荧光染色的结果显示, 表达的 NS2 蛋白在 S2 细胞中主要分布于细胞质中, 核内仅有少量存在(图 5)。

3 讨论

黑胸大蠊浓核病毒由于其独特的基因组结构, 在 2004 年的病毒学分类委员会第八次会议决议上被单独列为一个属: Pefudensovirus, 并以其自身作为代表种^[10]。与浓核病毒属成员一样, 其基因组负链有 3 个阅读框, 分别编码 3 种非结构蛋白: NS1、NS2 和 NS3。其中 NS2 的编码序列位于 NS1 编码框的内部, 二者起始密码子相隔 4 个碱基。序列分析表明, NS1 的起始密码子不符合典型的 Kozak 规则, 而 NS2 的却相当符合, 我们推测 NS2 蛋白的翻译起始可能是利用了核糖体的疏漏扫描机制, 即核糖体在识别 mRNA 上的第一 AUG 时, 由于第一 AUG 不符合 Kozak 规则而导致核糖体与其结合不紧密从而获得机会继续向后移位, 导致第二 AUG, 即 NS2 的起始密码子被其识别从而起始翻译。

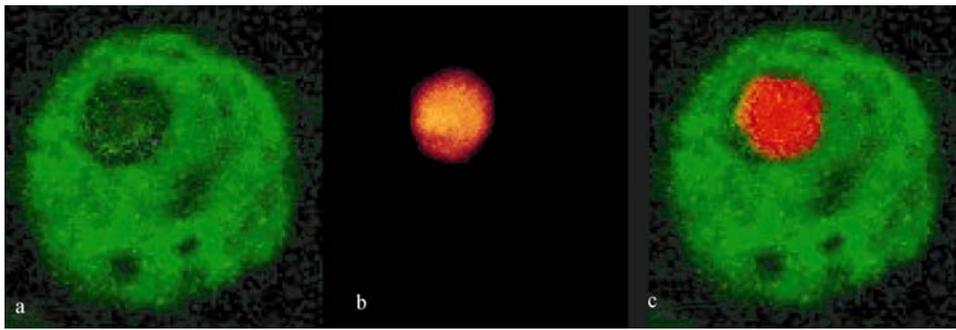


图 5 荧光免疫细胞化学方法显示 NS2 蛋白的 S2 细胞内分布($\times 400$)

Fig. 5 Expression pattern of NS2 in S2 cells by fluoroinmunocytochemistry ($\times 400$)

Note: The panel a represents subcellular localization of NS2, the panel b shows localization of nuclei, whereas the panel c reveals overlay of the two images.

NS2 蛋白是细小病毒重要的非结构蛋白之一, 所有细小病毒科成员均编码该蛋白。然而我们对其功能的了解远远不及 NS1 蛋白。目前, 针对细小病毒非结构蛋白 NS2 的功能研究主要集中于属于细小病毒亚科的鼠细小病毒 MVM 上。研究表明, MVM NS2 蛋白作为一个重要的非结构蛋白, 在 MVM 的复制过程中起着重要的作用, 它的突变可导致病毒复制能力的丧失, 并且它还和病毒 mRNA 的翻译以及病毒的核输出有关^[11-13]。现已发现它能与许多宿主因子如 SMN 蛋白, 14-3-3 家族蛋白, 核输出因子 Crm1 等发生相互作用, 这些相互作用可能与它功能的发挥密切相关^[14-16]。然而, 对于浓核病毒 NS2 蛋白的功能研究至今尚未见任何报道。

应用 Blast 程序将 PfDENV 基因组编码的 NS2 蛋白与 NBRF 蛋白数据库进行同源性搜索, 我们发现其仅与鹿眼狭蝶浓核病毒 (JcDENV) 的 ORF3 编码蛋白 (NS 蛋白) 有同源性, 与其它细小病毒如 MVM 等比较未发现氨基酸同源性存在。我们推测这种序列上的巨大差异可能是病毒在进化过程中对于宿主进行的适应性突变造成的, 这也可能是造成蟑螂浓核病毒宿主域非常狭窄的一个原因。同时我们应用氨基酸序列分析软件 Prosite 对 NS2 氨基酸序列进行分析, 发现其在 89~101 位存在一个典型的钙结合蛋白的 EF-hand Ca^{2+} motif, 这种钙离子结合结构域在其他细小病毒 NS2 蛋白中均未发现, 其功能值得深入研究。

本研究中, 在获取 PfDENV *ns2* 基因编码序列时, 我们并不是直接以 PfDENV 基因组为模板进行 PCR 扩增来获得, 而是提取感染 PfDENV 的发病黑胸大蠊的总 RNA, 用 RT-PCR 扩增得来, 这样就证实在病毒复

制过程中该基因是被转录的, 是一个功能基因。同时, 经测序后我们发现 RT-PCR 产物与病毒基因组上 NS2 的编码序列完全一致, 说明该基因并无转录后拼接加工的过程。这一点与 MVM 的 *ns2* 不同, 后者的初级转录产物通过选择性拼接加工后形成大小不一的两个转录本^[17]。在进行蛋白表达时, 我们发现在大肠杆菌中表达的 NS2 蛋白主要以包涵体的形式存在, 并不具有生物学功能, 但作为制备多克隆抗体的免疫原却是足够的。Western blot 结果 (图 4) 显示: 我们制备的抗体具有很高的特异性, 能专一识别在果蝇 S2 细胞中表达的天然 NS2 蛋白。这些结论是我们利用其对 NS2 进行亚细胞定位的基础。

我们应用制备的抗 NS2 的抗体对该蛋白进行亚细胞定位的研究, 结果表明 NS2 蛋白主要定位于细胞质中, 核内仅有少量分布。研究表明, MVM 编码的 NS2 蛋白具有典型的核定位信号, 除了在核内, 它在胞质中也有大量分布, 其可能是由宿主细胞编码的核输出因子 CRM1 运送出核的^[15]。我们对 PfDENV NS2 蛋白进行序列分析时并未发现其具有典型的核定位信号, 故其入核机制不得而知, 我们推测可能是有宿主因子的参与。我们目前已经筛选到一个可能与之有相互作用的宿主因子, 下一步准备利用该试验制得的抗体进行免疫共沉淀试验以验证此相互作用。

本研究获得了对 *ns2* 开展进一步研究所需的蛋白和抗体, 并发现 NS2 在细胞中的定位, 为进一步的生物学研究工作奠定了基础。

参 考 文 献

- [1] Hu YY, Zheng JM, Lizuka T, *et al.* A densovirus newly

- isolated from the smoky-brown cockroach *Periplaneta fuliginosa*. *Arch Virol*, 1994, **138**: 365–372.
- [2] 刘文斌, 胡远扬, 张珈敏. 黑胸大蠊浓核病毒的病理学研究. 湖北大学学报, 1998, **20**: 91–93.
- [3] 张晓东, 张珈敏, 郭海涛, 等. 重组质粒转染蟑螂对黑胸大蠊浓核病毒的拯救. 中国病毒学, 1999, **14**: 152–156.
- [4] Guo HT, Zhang JM, Hu YY. Complete sequence and organization of *Periplaneta fuliginosa* densovirus genome. *Acta Virol*, 2000, **44**: 315–322.
- [5] Yang B, Zhang JM, Cai DW, *et al.* Biochemical characterization of *Periplaneta fuliginosa* densovirus nonstructural protein NS1. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, **342**: 1188–1196.
- [6] Brandenburger A, Legendre D, Avalosse B, *et al.* NS-1 and NS-2 proteins may act synergistically in the cytopathogenicity of parvovirus MVMp. *Virology*, 1990, **174**: 576–584.
- [7] Legrand C, Rommelaere J, Caillet-Fauquet P. MVM(p) NS-2 protein expression is required with NS-1 for maximal cytotoxicity in human transformed cells. *Virology*, 1993, **195**: 149–155.
- [8] Mousset S, Ouadrhiri Y, Caillet-Fauquet P, *et al.* The cytotoxicity of the autonomous parvovirus minute virus of mice nonstructural proteins in FR3T3 rat cells depends on oncogene expression. *J Virol*, 1994, **68**: 6446–6453.
- [9] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, pp.870–874.
- [10] Mayo MA. Changes to virus taxonomy. *Arch Virol*, 2004, **150**: 189–198.
- [11] Cater JE, Pintel D. The small non-structural protein NS2 of the autonomous parvovirus minute virus of mice is required for virus growth in murine cells. *J Gen Virol*, 1992, **73**: 1839–1841.
- [12] Naeger LK, Salome N, Pintel DJ. NS2 is Required for Efficient translation of viral mRNA in minute virus of mice-infected murine cells. *J Virol*, 1993, **68**: 1034–1043.
- [13] Eichwald V, Daeffler L, Klein M, *et al.* The NS2 proteins of parvovirus minute of mice are required for efficient nuclear egress of progeny virions in mouse cells. *J Virol*, 2002, **76**: 10307–10319.
- [14] Brockhaus K, Plaza E, Pintel D, *et al.* Nonstructural proteins NS2 of minute virus of mice associate *in vivo* with 14-3-3 protein family members. *J Virol*, 1996, **70**: 7527–7534.
- [15] Bodendorf U, cziepluch C, Jauniaux JC, *et al.* Nuclear export factor CRM1 interacts with nonstructural proteins NS2 from parvovirus minute virus of mice. *J Virol*, 1999, **73**: 7769–7779.
- [16] Yong PJ, Jensen KT, Burger LR, *et al.* Minute virus of mice small nonstructural protein NS2 interacts and colocalizes with the Smn protein. *J Virol*, 2002, **76**: 6364–6369.
- [17] Zhao Q, Mathur S, Burger LR, *et al.* Sequences within the parvovirus minute virus of mice NS2-specific exon are required for inclusion of this exon into spliced steady-state RNA. *J Virol*, 1995, **69**: 5864–5868.

稿件书写规范

论文中计量单位的表示方法

为执行国务院发布的《关于在我国统一实行法定计量单位的命令》的规定, 计量单位和单位符号按国家技术监督局发布的《量和单位》GB3100-3102-93 执行。单位符号均用英文小写(正体), 不允许随便对单位符号进行修饰。现将本刊常用计量单位和符号介绍如下, 希望作者参照执行。

时间: 日用 d; 小时用 h; 分钟用 min; 秒用 s 等表示。

溶液浓度: 用 mol/L, 不用 M (克分子浓度)和 N(当量浓度)等非许用单位表示。

旋转速度: 用 r/min, 不用 rpm。

蒸汽压力: 用 Pa 或 kPa、MPa 表示。

光密度: 用 OD(斜体)表示。

生物大分子的分子量: 蛋白质用 D 或 kD, 核酸用 bp 或 kb 表示。

图表中数值的物理量和单位: 物理量符号采用斜体, 单位用正体并用括号括起, 例如: $t(h)$ (表示时间, 单位是小时)。带数值的计量单位: 计量单位不能省略, 跟数字之间加一空格 (和%除外), 例如: 20 cm × 0.3 cm, 不能写成 20 × 0.3 cm; 3 ~5 不可写成 3~5 ; 3%~6%不可写成 3~6%等。