

外周血单个核细胞中肺炎衣原体的分离、 培养及连续传代

金前¹ 孙书明^{2*} 王卫群³ 周颖¹ 余竹元⁴

- (1. 浙江省立同德医院呼吸科 浙江 杭州 310012)
- (2. 复旦大学附属金山医院呼吸科 上海 200540)
- (3. 复旦大学附属金山医院心内科 上海 200540)
- (4. 复旦大学附属中山医院免疫室 上海 200032)

摘要: 开发一种分离并增殖肺炎衣原体(Cpn)的简易方法极具意义。该方法先分离血液标本中的外周血单个核细胞(PBMC),用 PEG 使 Cpn-Ag 阳性的 PBMC 裂解释放出 Cpn,然后与人喉表皮癌细胞(Hep-2)一起离心,继续培养 Hep-2 细胞,再将 Hep-2 细胞冻融破碎后,放入到新的 Hep-2 细胞中进行离心,以完成 Cpn 的 1 次传代,然后以同样的方法进行 2-4 次传代。分别用微量免疫荧光法(MIF)及 PCR 法检测 Hep-2 细胞中的 Cpn-Ag 和 Cpn DNA,并用 FITC 标记的属特异性衣原体脂多糖单克隆抗体检测实验分离以及进口菌株传代后的包涵体形成单位数量。结果显示 MIF 法检测 Cpn 感染后的 Hep-2 细胞,其胞内 Cpn-Ag 强阳性;MIF 法检测 1 次传代及 2 次传代的 Hep-2 细胞,其胞内 Cpn-Ag 亦均强阳性,3 次传代阳性,而 4 次传代阴性;PCR 法检测 2 次传代后 Cpn DNA 阳性。该简化方法可以实现 PBMC 中 Cpn 的分离,分离菌株传代 4 次后出现退化(优于进口菌株),但该方法仍可实现进一步的培养及传代。

关键词: 肺炎衣原体, 单个核细胞, 连续传代

The Isolation, Culture, and Serial Passage of *Chlamydia pneumoniae* from PBMC

JIN Qian¹ SUN Shu-Ming^{2*} WANG Wei-Qun³ ZHOU Ying¹ YU Zhu-Yuan⁴

- (1. Department of Respiratory Medicine, Tongde Hospital of Zhejiang Province, Hangzhou, Zhejiang 310012, China)
- (2. Department of Respiratory Medicine, Jinshan Hospital, Fudan University, Shanghai 200540, China)
- (3. Department of Cardiology, Jinshan Hospital, Fudan University, Shanghai 200540, China)
- (4. Department of Internal Medicine Immunology, Zhongshan Hospital, Fudan University, Shanghai 200032, China)

Abstract: Developing a new method to isolate and proliferate *Chlamydia pneumoniae* is meaningful. This new method begins with isolating peripheral blood mononuclear cell from blood samples, and use polyethylene glycol to break peripheral blood mononuclear cells which are positive with *Chlamydia pneumoniae* antigen, then centrifugate these broken peripheral blood mononuclear cells together with

Hep-2 cells. After 7-day's culture, these cells were broken by freeze-thaw cycle, and put into new Hep-2 cells, then centrifugated together to finish the first passage of *Chlamydia pneumoniae*. The second to the fourth passages were conducted in the same way. At the same time, we used Micro-immunofluorescence and PCR methods to detect *Chlamydia pneumoniae* in Hep-2 cells, also used a genus-specific, fluorescein isothiocyanate-conjugated monoclonal antibody to *Chlamydia lipopolysaccharide*, to stain inclusions, and got the IFUs counts of both imported and isolated strains after each passage. With the method of Micro-immunofluorescence, we found that Hep-2 cells centrifugated with peripheral blood mononuclear cells, Hep-2 cells of the first passage, Hep-2 cells of the second passage were all strong positive with *Chlamydia pneumoniae* antigen, Hep-2 cells of the third passage was positive, and the fourth passage negative. We also detected *Chlamydia pneumoniae* DNA existing in Hep-2 cells of the second passage with the method of PCR. So this simplified way can successfully achieve the isolation of *Chlamydia pneumoniae* from peripheral blood mononuclear cells. The phenomenon of degeneration appeared in the fourth passage of isolated strain, which was still superior to imported strain, but it will not largely affect the culture and passage of *Chlamydia pneumoniae* from peripheral blood mononuclear cells.

Keywords: *Chlamydia pneumoniae*, Mononuclear cell, Serial passage

肺炎衣原体(*Chlamydia pneumoniae*, Cpn)是衣原体属中的一个新种,是一类能通过细菌滤器、严格细胞内寄生、并有独特发育周期的原核细胞型微生物。既往对于 Cpn 致病的认识往往局限在其导致社区获得性肺炎上,目前又有很多研究表明 Cpn 与动脉粥样硬化密切相关,Cpn 与肺癌^[1]、中耳炎、结节病、咽炎、鼻窦炎、哮喘、Reiter 综合征等疾病的关系亦在探索当中。因此 Cpn 菌株成为这些科研能够开展的必要条件,但申请进口 Cpn 菌株手续繁琐,价格昂贵,进口菌株传代 2-3 次即出现增殖能力退化,须不断引进。所以,在国内开发一种培养、增殖 Cpn 的简便方法迫在眉睫。本实验针对这一现状,试图开发一种低成本、易操作的 Cpn 培养、增殖方法。

1 材料与方 法

1.1 材 料

外周血单个核细胞(Peripheral blood mononuclear cell, PBMC)来自检测 Cpn 抗原抗体的临床血液标本;人喉表皮癌细胞株(Hep-2)购自上海中国科学院细胞所;Hep-2 细胞消化液为 0.25%的胰蛋白酶;聚合酶链反应(Polymerase chain reaction, PCR)试剂盒购自上海华美生物工程公司;AR-39 株肺炎衣原体抗原、AR-39 株肺炎衣原体、微量免疫荧光法(Micro-immunofluorescence, MIF)所需的肺炎衣原体荧光素标记单克隆抗体(TT-401)及异硫氰酸荧光素

(Fluorescein Isothiocyanate, FITC)标记的属特异性衣原体脂多糖单克隆抗体均购自美国华盛顿大学衣原体研究基金会;聚乙二醇(Polyethylene Glycol, PEG),分子量 3000,为日本三洋公司产品;淋巴细胞分离液、细胞培养液及细胞培养瓶购自上海华美生物工程公司;实验中所用的磷酸盐缓冲液(Phosphate buffered saline, PBS)其 pH 值均为 7.2,浓度均为 0.01 mol/L。

1.2 方 法

1.2.1 分离血液标本中的 PBMC: 收集若干份采集时间各异的临床血液标本(每份 3 mL),于 4°C 冰箱保存。静置后吸出血浆,剩余血细胞用等量的 PBS 稀释混匀,再沿离心管壁缓慢加入到含有 3 mL 淋巴细胞分离液的离心管中。然后于室温 950 r/min 离心 60 min,用吸管小心吸出含 PBMC 的云雾状层,用低渗溶液(由 PBS 和蒸馏水以 1:40 的比例配制而成)洗涤 PBMC 3 次。

1.2.2 PBMC 存活率计算: 在每份分离好的 PBMC 中取一部分,分别制成 200-2000 个/mL 浓度的悬液,用台盼兰拒染法测定每份 PBMC 的存活率。

1.2.3 PBMC 裂解率计算: 在每份分离好的 PBMC 中取一部分,制成约 10^6 个/mL 的细胞悬液,取 20 μ L 滴加在载玻片上,在显微镜下计算 4 个视野完整细胞记数的平均值(A),加入 20 μ L 37% PEG 并混匀,在镜下可见 PBMC 迅速裂解。同样在显微镜下计算 4 个视野完整细胞记数的平均值(B),按

$R = (A - B) / A \times 100\%$ 计算出 PBMC 裂解率(R)。用不同 PBMC 标本重复以上操作 3 次, 计算 3 次平均值。

1.2.4 MIF 法检测 PBMC 中肺炎衣原体抗原 (*Chlamydia pneumoniae* antigen, Cpn-Ag): 在每份 PBMC 标本中加入一定量的 PBS, 制成细胞悬液(约 10^6 个/mL)。每份标本各取两份 10 μ L 的 PBMC 悬液, 于同一玻片上滴成 2 个圆点, 其中一点作为空白对照。将滴于玻片上的细胞悬液圆点干燥后, 于微波炉低火 1 min、中火 1.5 min 修复抗原, 然后以丙酮固定 PBMC。自然晾干后, 在每张玻片的第一圆点(即测定点)滴加 10 μ L TT-401 稀释液(用含 0.01%伊文氏兰的 PBS 稀释 TT-401 原液, 工作浓度 1:40), 并置 37°C 恒温水浴箱中孵育 90 min。孵育后的玻片于 PBS 中清洗 3 次后, 再于蒸馏水中清洗 3 次, 自然晾干。荧光显微镜下(HBO200 汞灯, 第一滤片为 BG-12, 第二滤片为 CG-13 和 WILD8075)观察均匀大小的特征性苹果绿亮点。测定点内荧光亮点数减去空白点内荧光亮点数后的差数, 作为判断 Cpn-Ag 阳性的依据。抗原阳性判断标准参照 Muhlestein 等人^[2]的标准: 强阳性(≥ 100 个亮点/圆点), 阳性(10-100 个亮点/圆点, 包括 10 个), 弱阳性(可疑阳性)(5-10 个亮点/圆点, 包括 5 个), 阴性(≤ 4 个亮点/圆点)。

1.2.5 Hep-2 细胞培养: 细胞培养液为含 10%胎牛血清的 1640, Hep-2 细胞培养于 50 mL 的一次性无菌培养瓶, 置于含 5% CO₂ 且温度为 37°C 的无菌培养箱中进行培养。

1.2.6 Cpn 分离、培养及 MIF 法检测 Cpn-Ag、Cpn IFU 计数: 用无血清的 1640 培养液配制 37% PEG, 并用 NaHCO₃ 调 pH 值至 8.0, 备用。将 Cpn-Ag 阳性的 PBMC 混合, 制成 0.3 mL PBMC 悬液, 边振荡边在 90 s 内滴入 0.3 mL 的 37% PEG, 使 Cpn 从 PBMC 中释放出来, 其中 0.4 mL 倒入铺满 Hep-2 细胞并含有 2 mL 培养液的培养瓶中^[3], 其余量分成 5 等份, 倒入铺满 Hep-2 细胞并含有 0.1 mL 培养液的培养板 5 个孔中, 上述培养瓶及培养板混匀后于 1200 r/min 水平离心 1 h, 然后于培养瓶中加入 11 mL Cpn 生长介质, 培养板各孔中加入 0.55 mL Cpn 生长介质, 该介质即为 4%胎牛血清, 庆大霉素(25 mg/L), 万古霉素(25 mg/L), 两性霉素 B(2.5 mg/L), 放线菌酮(0.5 mg/L)和葡萄糖(4.5 g/L),

置于 CO₂ 培养箱中培养。此后第 3 天再于 1200 r/min 离心一次, 并更换 Cpn 生长介质。第 4、5 天再分别于 1200 r/min 离心。培养总时间为 7 d。MIF 法检测 Hep-2 细胞中 Cpn-Ag 的具体步骤, 同 PBMC 中 Cpn-Ag 的检测。将培养板中 3 孔的 Hep-2 细胞经甲醇固定 10 min 后, 室温下用特异性衣原体脂多糖单克隆抗体-FITC 染色 30 min, 并在落射荧光显微镜下计数每孔内 Cpn 包涵体形成单位(Inclusion forming units, IFU)数量, 取 3 孔平均值, 最终计算出一孔内 IFU 数量, 并根据该数值配制出特定浓度 Cpn 的破碎细胞悬液。

1.2.7 Cpn 的传代、MIF 法检测 Cpn-Ag 及 IFU 计数: 将 Cpn-Ag 阳性的 Hep-2 细胞冻融破碎 2 次后, 取 5 份 0.1 mL 的破碎细胞悬液(Cpn 浓度为 10^3 IFU/mL)加入到铺满 Hep-2 细胞的微量培养板 5 个孔内, 其余悬液(原始浓度)分成两等份倒入另两瓶铺满 Hep-2 细胞的培养瓶中, 培养板及培养瓶于 1200 r/min 水平离心 1 h, 使 Cpn 转染新的 Hep-2 细胞, 继续放入培养箱培养。然后在转染后的第 3、4、5 天分别以 1200 r/min 水平离心 1 h, 继续培养 2 d 后, 检测一次传代后的 Cpn-Ag 及 IFU 数。MIF 法检测 Hep-2 细胞中 Cpn-Ag 的具体步骤同 PBMC 中 Cpn-Ag 的检测。培养板中 Cpn IFU 计数方法同分离培养后 Cpn IFU 计数法。用上述同样的方法进行 Cpn 的第 2-4 次传代、Cpn-Ag 检测及 IFU 计数。

1.2.8 进口 Cpn 菌株的传代: 用 Cpn 生长介质将进口 AR-39 株 Cpn (储存浓度为 10^6 IFU/mL)稀释 1000 倍, 配制成 10^3 IFU/mL 的浓度, 取其 5 份 0.1 mL 加入到铺满 Hep-2 细胞的微量培养板 5 个孔内进行传代, 具体方法同 1.2.7 中的 Cpn 传代方法, 共进行 4 次传代。

1.2.9 PCR 法检测 Cpn DNA: Cpn DNA 的提取参照试剂盒说明书进行, 最后用异丙醇将 DNA 沉淀, 并溶于 20 μ L TE 中备用。根据 GenBank 中的 Cpn 基因序列, 应用 Primer Premier 5.0 以及 Oligo 计算机软件设计出引物, 并由上海华美生物工程公司合成。引物的寡聚核苷酸序列分别是: HL-1: 5'-GTT GTTCATGAAGGCCTACT-3'; HR-1: 5'-TGCATAA CCTACGGTGTGTT-3'。在进行 PCR 时, 上述引物将扩增 437 bp Cpn DNA 片段的合成。扩增按下列程序进行: 94°C 5 min; 94°C 1 min, 55°C 1 min,

72°C 1 min, 35 个循环。每次样品检测时用 PBS 作阴性对照, 用 AR-39 株 Cpn 抗原中提取的 Cpn DNA 为阳性对照。扩增产物的分析按照标准方法在 1.2% 琼脂糖凝胶中电泳, 然后将 PCR 扩增的产物条带位置与 TaKaRa DL2000 标准品的位置进行比较, 以判断 PCR 产物是否与理论值 437 bp DNA 片段相一致。

2 结果

2.1 台盼兰拒染法测定 PBMC 存活率

存放 3 d 以上标本中, PBMC 存活率低, 见图 1。

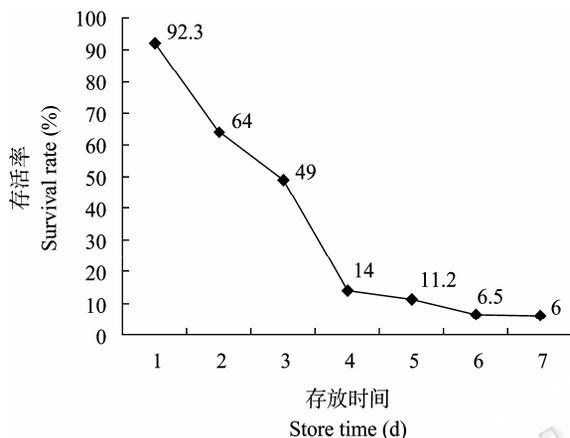


图 1 PBMC 存活率与标本存放时间的关系

Fig. 1 The relationship of survival rate of PBMC and specimen store time

2.2 37% PEG 对 PBMC 的裂解率

取 3 次均数, PBMC 悬液与 37% PEG 按 1:1 混合后达到的裂解率为 92.5%。

2.3 Cpn 分离、传代的 MIF 检测结果

Hep-2 与 Cpn-Ag 阳性的破碎 PBMC 培养 7 d 后, 在荧光显微镜下可见 Hep-2 细胞为 Cpn-Ag 强阳性, 一次及二级传代后培养 7 d 的 Hep-2 细胞为 Cpn-Ag 强阳性, 3 次传代后培养 7 d 的 Hep-2 细胞为 Cpn-Ag 阳性, 而 4 次传代后培养 7 d 的 Hep-2 细胞为 Cpn-Ag 阴性, 见图 2。

2.4 分离及进口 Cpn 4 次传代的 IFU 数量

分离所得的 Cpn 菌株于 4 次传代时 IFU 数较初始数量减少, 出现明显的增殖能力退化, 而进口菌株在 3 次传代时即出现该现象, 详见表 1。

2.5 Cpn 2 次传代的 PCR 法检测结果

2 次传代后培养 7 d 的 Hep-2 细胞中检测到 Cpn DNA, 见图 3。

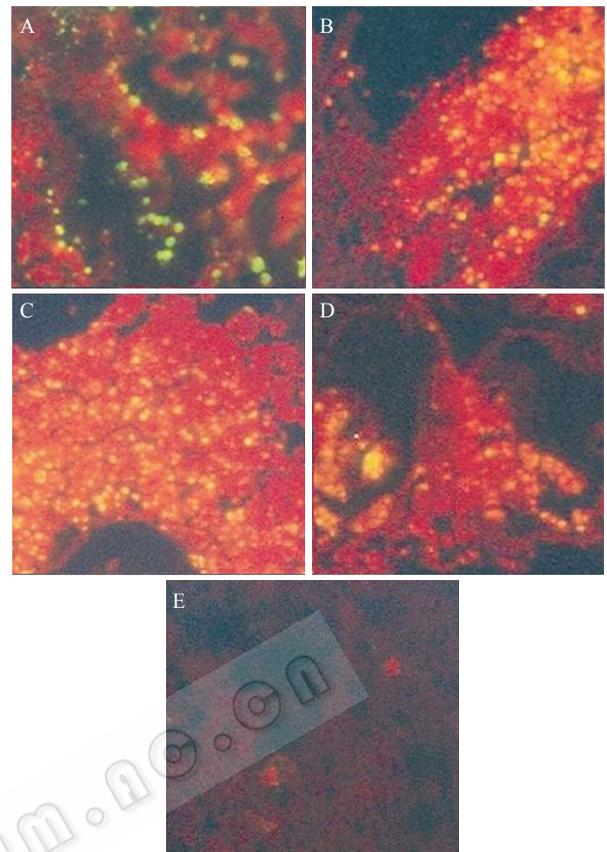


图 2 Cpn 分离、传代的 MIF 检测结果($\times 400$)

Fig. 2 The test results of Cpn isolating and serial passage with MIF ($\times 400$)

注: A: 与 Cpn-Ag 强阳性的破碎 PBMC 离心并培养 7 d 后, Hep-2 细胞中可见大量均匀苹果绿荧光亮点, 亮点数大于 100 个/圆点; B: 1 次传代后培养 7 d 的 Hep-2 细胞中可见大量均匀苹果绿荧光亮点, 亮点数大于 100 个/圆点; C: 2 次传代后培养 7 d 的 Hep-2 细胞中可见大量均匀苹果绿荧光亮点, 亮点数大于 100 个/圆点; D: 3 次传代后培养 7 d 的 Hep-2 细胞中可见较多均匀苹果绿荧光亮点, 亮点数介于 10-100 个/圆点之间; E: 4 次传代后培养 7 d 的 Hep-2 细胞中基本未见均匀苹果绿荧光亮点, 亮点数小于 10 个/圆点。

Note: A: After 7-day's coculture of Hep-2 cells and broken PBMC which was strongly positive with Cpn-Ag, we can see a great quantity of well-distributed fluorescent apple green dots, and the quantity of these dots was more than 100 per spot; B: After the first passage, we observed many well-distributed fluorescent apple green dots in Hep-2 cells which were cultured for 7 days, and the quantity of these dots was more than 100 per spot; C: After the second passage, we observed many well-distributed fluorescent apple green dots in Hep-2 cells which were cultured for 7 days, and the quantity of these dots was more than 100 per spot; D: After the third passage, we observed many well-distributed fluorescent apple green dots in Hep-2 cells which were cultured for 7 days, and the quantity of these dots was between 10 to 100; E: After the fourth passage, we observed few apple green dots in Hep-2 cells which were cultured for 7 days, and the quantity of these dots was less than 10.

表 1 分离及进口 Cpn 4 次传代的 IFU 数量
Table 1 The counts of IFUs from four times passages of isolated and imported Cpn strains

Cpn 来源 Cpn source	IFU 数量 Counts of IFUs				
	初始数量 Initial count	1 次传代 The first passage	2 次传代 The second passage	3 次传代 The third passage	4 次传代 The fourth passage
分离 Isolated	100	6951	1230	218	76
进口 Imported	100	2123	392	90	81

注: 所得数值均为 2 次实验的平均值. 每次传代实验所得的 IFU 均由初始的 100 个 IFU 增殖所得, 2-4 传代初始 IFU 来源于上一次传代.

Note: Counts are averages of two separate experiments. The IFUs of these passages are all generated from 100 initial IFUs. The initial IFUs of the second to the fourth passages are derived from the prior passage.

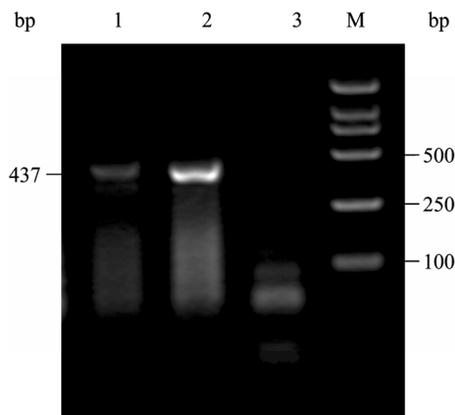


图 3 Cpn 二次传代的 PCR 检测结果

Fig. 3 The test result of the second passage with PCR

注: 1: AR-39 株 Cpn 抗原中提取的 Cpn DNA 的扩增产物条带, 为阳性对照; 2: 2 次传代 Hep-2 细胞中提取的 DNA 的扩增产物条带; 3: 阴性对照; M: TaKaRa DL2000.

Note: 1: The amplification product of Cpn DNA which was extracted from AR-39 Cpn antigen; 2: The amplification product of DNA which was extracted from Hep-2 cells of the second passage; 3: Negative control; M: TaKaRa DL2000 standard.

3 讨论

Cpn 进入人体后, 可被中性粒细胞或单核吞噬细胞以调理素依赖的方式吞噬并杀灭, 但有时不但不能被杀灭, 反而能在其内繁殖, 使其成为 Cpn 感染早期主要的宿主细胞和传播载体, 并延长宿主细胞的生存时间^[4], 因此我们收集了可能含有 Cpn 活菌的 PBMC 做为 Cpn 的来源. 若能将 PBMC 中的 Cpn 活菌转染到 Hep-2 细胞中进行培养, 就可以免去不断进口昂贵的 Cpn 菌株这一难题. 而本实验通过使用 PEG, 使 PBMC 裂解, 从而释放出 Cpn, 并成功地将 PBMC 中的 Cpn 转染到 Hep-2 细胞中(图 2). 通过台盼兰拒染法得知, 存放 3 d 的 PBMC 仍有 50% 左右的存活率(图 1), 因此, 存放时间不超过

3 d 的血液检测标本可成为 Cpn 活菌可靠、价廉的来源。

Cpn 可在 HL 细胞、Hela 229 细胞及 Hep-2 细胞等多种传代细胞株中生长, 通过比较, Hep-2 细胞株较其他细胞株更为适合^[3]. 通过冻融破碎法可将 Hep-2 细胞彻底破碎, 从而释放寄生其中的 Cpn 活菌, 通过离心的方法可以使 Cpn 活菌成功地转染新的 Hep-2 细胞(图 2). 该方法极其简便, 所需设备要求也低, 完全可以在条件设施一般的实验室完成。

目前 Cpn 的检测尚缺乏金标准, 但 MIF 和 PCR 法最具应用前景, 灵敏度和特异度也较理想^[5]. 本实验的 MIF 检测法中, 我们使用的肺炎衣原体荧光素标记单克隆抗体为种特异性, 避免了衣原体属中其他微生物对检测结果的影响. 在培养 7 d 的 Hep-2 细胞、1 次传代后培养 7 d 的 Hep-2 细胞、2 次传代后培养 7 d 的 Hep-2 细胞中均可见大量特异性的苹果绿荧光亮点, 表明其中有大量的 Cpn 菌株存在, 证明了 Cpn 培养与传代的成功. 在 2 次传代中, 我们还用 PCR 方法检测到了 Hep-2 细胞中的 Cpn DNA, 更进一步证实了 Cpn 培养与传代的成功。

在 MIF 检测法检测 Cpn-Ag 的同时, 我们还用 FITC 标记的属特异性衣原体脂多糖单克隆抗体检测实验分离以及进口菌株的传代情况, 发现实验所分离的肺炎衣原体 4 次传代后增殖退化, 而进口菌株 3 次传代后即出现增殖退化. 故若能延迟连续传代后的增殖退化, 亦有利于培养大量 Cpn 以供实验研究, 但目前国际上并无相关报道。

本实验初步证实了这种简易 Cpn 培养、增殖方法的可行性和有效性, 因此进一步的研究应将重点放在 Cpn 的提取、纯化上, 不断改进方法, 以期开

发出最有效的培养方法。本实验研究发现, 分离所得的 Cpn 菌株 4 次传代后便出现增殖退化, 但血液检测标本中的 PBMC 是 Cpn 价廉、易获取的来源, 我们可以不断地从 PBMC 中获取新的 Cpn 菌株, 从而增殖出更多的 Cpn。因此, 传统方法中 Cpn 菌株增殖退化的问题不会对本实验所开发的方法有任何影响, 这同时也是本方法的一大优点。总而言之, 开发一种低成本、易操作的 Cpn 培养、增殖方法已经获得了初步成功。

参 考 文 献

- [1] Littman AJ, White E, Jackson LA, *et al.* *Chlamydia pneumoniae* infection and risk of lung cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2004, **13**(10): 1624–1630.
- [2] Muhlestein JB, Hammond EH, Carlquist JF, *et al.* Increased incidence of *Chlamydia* species within the coronary arteries of patients with symptomatic atherosclerotic versus other forms of cardiovascular disease. *J Am Coll Cardiol*, 1996, **27**(7): 1555–1561.
- [3] Tjhie JH, Roosendaal R, MacLaren DM, *et al.* Improvement of growth of *Chlamydia pneumoniae* on HEp-2 cells by pretreatment with polyethylene glycol in combination with additional centrifugation and extension of culture time. *J Clin Microbiol*, 1997, **35**(7): 1883–1884.
- [4] van Zandbergen G, Gieffers J, Kothe H, *et al.* *Chlamydia pneumoniae* multiply in neutrophil granulocytes and delay their spontaneous apoptosis. *J Immunol*, 2004, **172**(3): 1768–1776.
- [5] Dowell SF, Peeling RW, Boman J, *et al.* Standardizing *Chlamydia pneumoniae* assays: recommendations from the Centers for Disease Control and Prevention (USA) and the Laboratory Centre for Disease Control (Canada). *Clin Infect Dis*, 2001, **33**(4): 492–503.

征订启事

欢迎订阅 《微生物学通报》

《微生物学通报》创刊于 1974 年, 是中国微生物学会和中国科学院微生物研究所主办, 国内外公开发行的, 以微生物学应用基础研究及技术创新与应用为主的综合性学术期刊。刊登内容包括: 基础微生物学研究; 农业微生物学研究; 工业微生物学研究; 医学微生物学研究; 食品微生物学研究; 环境微生物学研究; 微生物功能基因组研究; 微生物蛋白质组学研究; 微生物模式菌株研究; 微生物工程与药物研究; 微生物技术成果产业化及微生物教学研究改革等。

本刊为中国生物科学类核心期刊。曾获国家级优秀科技期刊三等奖, 中国科学院优秀科技期刊三等奖, 北京优秀科技期刊奖, 2000 年再获中国科学院优秀期刊三等奖, 2001 年被选入新闻出版署设立的“中国期刊方阵”并被列为“双效”期刊。

自 2008 年本刊已经全新改版, 由双月刊改为月刊, 更换了彩色封面, 纸张改用铜版纸, 由原来的小 16 开本改为标准大 16 开本(210×297), 发表周期缩短, 内容更加丰富详实。欢迎广大读者到邮局订阅或直接与本刊编辑部联系购买, 2011 年的每册定价为 48 元, 全年 576 元, 我们将按期免费邮寄。

另, 本刊编辑部现存有少量过期期刊, 如有需要者可直接与编辑部联系, 款到即免费寄上。(请事先与编辑部联系, 获悉每册售价。敬请在汇款单上注明所购刊物的年代、卷、期和数量)

邮购地址: (100101)北京朝阳区北辰西路 1 号院 3 号中国科学院微生物研究所《微生物学通报》编辑部

Tel: 010-64807511; E-mail: tongbao@im.ac.cn; bjb@im.ac.cn; 网址: <http://journals.im.ac.cn>

国内邮发代号: 2-817; 国外发行代号: BM413