

猪链球菌 2 型 *srtF* 基因敲除突变株的构建及其毒力

陈红娜^{1,2} 王长军^{1,2} 潘秀珍¹ 唐家琪^{1,2*}

(1. 南京军区军事医学研究所 江苏 南京 210002)
(2. 南京医科大学基础医学院 江苏 南京 210029)

摘要: 利用同源重组基因敲除方法构建猪链球菌 2 型强毒株 05ZYH33 *srtF* 同源突变体。组合 PCR、交叉酶切、RT-PCR 结果均显示 *srtF* 突变体构建成功。突变株与强毒株的菌落形态、生长速率以及对小鼠的致病力均无显著性差异。小鼠竞争实验结果提示, 突变株在心脏的定殖及感染能力显著减弱。成功构建的 *srtF* 突变株为进一步研究 *srtF* 的生物学功能奠定了基础。

关键词: 猪链球菌 2 型, *sortase F*, 基因敲除, 毒力

Construction and Virulence Assays of the *sortase F* Gene Knock-out Mutant of *Streptococcus suis* 2

CHEN Hong-Na^{1,2} WANG Chang-Jun^{1,2} PAN Xiu-Zhen¹ TANG Jia-Qi^{1,2*}

(1. Institute of Military Medical Sciences, Nanjing Command, Nanjing, Jiangsu 210002, China)
(2. School of Basic Medical Sciences, Nanjing Medical University, Nanjing, Jiangsu 210029, China)

Abstract: To approach the relationship between the *srtF* gene and the high pathogenicity of *S. suis* 2 05ZYH33, an isogenic knockout mutant of *srtF* was generated based on the principle of homologous recombination and confirmed by PCR, restriction analysis and reverse transcription polymerase chain reaction. The resulting mutant strain exhibited growth kinetics equivalent to those of the WT parent strain upon cultivation in standard laboratory used in our *in vitro* assays. A similar absence of difference between parent strain and mutant was observed when competition infection mice by the WT and mutant strains was evaluated. Taken together, these results suggest that *srtF* might in fact not critical for the full virulence of *S. suis* 2. It is to expect that future study carried out with *S. suis* 2 to verification the conclusions.

Keywords: *Streptococcus suis* 2, *sortase F*, Gene knock-out, Virulence assay

猪链球菌 2 型(*Streptococcus suis* serotype 2, *S. suis* 2)是一种重要的人兽共患病病原菌, 不仅可感染猪引起脑膜炎、败血症、关节炎、肺炎等多种临床疾

病, 并且可通过伤口和呼吸道等传播途径, 导致人感染发病和死亡^[1-2]。1998 年和 2005 年, 分别在我国江苏海安和四川资阳爆发了大规模的 *S. suis* 2 感

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(No. 30730081, 30972638, 81071317); 江苏省自然科学基金资助项目(No. BK2009042, BK2010025, BK2010114, BK2010113); 南京军区医学科技创新课题(No. 09Z040, 07Z045)

* 通讯作者: Tel: 86-25-84526002; 信箱: tjq85@hotmail.com

收稿日期: 2010-08-18; 接受日期: 2010-10-18

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

染人疫情^[3-4], 患者出现高比例的、国内外罕见的链球菌中毒性休克综合症(*Streptococcus toxic shock syndrome*, STSS), 病情凶险, 病死率极高, 引发业界人士的高度关注。

Sortase (*srt*)是普遍存在于革兰氏阳性菌中, 催化表面蛋白共价锚定到细胞壁上的一类转肽酶^[5]。根据 Dramsi 等人提出的准则, sortase 分为 A、B、C、D 4 类, 其中 C 类 sortase 家族最大, 存在于多种菌中^[6], 主要功能为催化细菌表面菌毛结构的合成及其与细胞壁的锚定。研究表明, 肺炎链球菌中 C 类 sortase (*srtB*、*srtC*、*srtD*)以及 B 组链球菌中 *srtC1*、*srtC2*、*srtC3*、*srtC4* 的缺失, 将明显影响菌毛结构的合成, 致使细菌在粘附、侵袭、毒力方面的能力明显减弱^[7-8]。然而, 关于 C 类 sortase 在 *S. suis* 2 中的致病作用尚未见报道。本课题组已完成 1998 年强致病株 98HAH12 和 2005 年强致病株 05ZYH33 的全基因组测序和功能注释, 发现 *S. suis* 2 中共含有 *srtB*、*srtC*、*srtD*、*srtF* 共 4 种 C 类 sortase, 其中

srtF 与菌毛的合成过程关系密切^[6]。本研究以中国强致病菌株 05ZYH33 为研究对象, 主要从以下几个方面对 *srtF* 进行探讨: (1) *srtF* 突变株的构建; (2) *srtF* 突变株的多重验证; (3) *srtF* 突变株的毒力研究。

1 材料与方法

1.1 菌株、质粒和引物

本实验所用的菌株、质粒及引物见表 1, 引物由上海赛百盛基因技术有限公司合成。

1.2 主要试剂及仪器

Ex Taq DNA 聚合酶、DNA 限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、质粒 DNA 抽提试剂盒及 RNA 反转录试剂盒均为 TaKaRa 公司产品; 胶回收试剂盒、基因组及 RNA 提取试剂盒为 Promega 公司产品; Todd-Hewitt Broth (THB)培养基购于 Difco 公司; Gene Pulser Xcell™ 型电穿孔仪及电转杯为 Bio-Rad 公司产品; Ultrospec2000 型紫外分光光度计为 Pharmacia 公司产品。

表 1 实验所用的菌株、质粒和引物
Table 1 Bacterial strains, plasmids and primers used in this study

菌株、质粒及引物 Strains, plasmids and primers	表型及相关特征 Phenotypes and correlative characters	来源 Sources
菌株 Strains		
05ZYH33	血清型 2 型, 强致病株	本室保存
$\Delta srtF$	血清型 2 型, <i>Spc</i> ^r	本研究构建
<i>E. coli</i> DH5 α	<i>deoR</i> , <i>recA</i> , <i>endA</i> , <i>hsdR</i> , <i>supE</i> , <i>thi</i> , <i>gyrA</i> , <i>relA</i>	本室保存
质粒 Plasmids		
pMD18-T	T 载体, <i>lacZ</i> , <i>Amp</i> ^r	TaKaRa
pUC18	<i>E. coli</i> 克隆载体, <i>lacZ</i> , <i>Amp</i> ^r	本室保存
pSET2	<i>E. coli</i> - <i>S. suis</i> 穿梭质粒, <i>Spc</i> ^r	Takamatsu et al. (2001)
LSR-pUC18	<i>srtF</i> 基因敲除质粒, <i>Amp</i> ^r , <i>Spc</i> ^r	本研究构建
引物 Primers		
L1	<u>GAAITC</u> AAAACACTACTAATCCAA (下划线为引入的 <i>EcoR</i> I 酶切位点)	
L2	<u>GGATCC</u> TCCGAAGATAGATTCTA (下划线为引入的 <i>Bam</i> H I 酶切位点)	
R1	<u>CTG</u> CAGTTTATATTTTATAACAA (下划线为引入的 <i>Pst</i> I 酶切位点)	
R2	<u>AAGCTT</u> AACACTGTCTTATTTT (下划线为引入的 <i>Hind</i> III 酶切位点)	
<i>Spc</i> 1	<u>GGATCC</u> GTTTCGTGAATACATGTTATA (下划线为引入的 <i>Bam</i> H I 酶切位点)	
<i>Spc</i> 2	<u>CTG</u> CAGGTTTCTAAAATCTGAT (下划线为引入的 <i>Pst</i> I 酶切位点)	
IN1	TTGGGGATTGGACTATTGGCTTAT	
IN2	TCAGAAAACAGACGGGCAGATG	
OUT1	CACCAA ATGCAACTGTTA TCGATA	
OUT2	TATCTAGTAGACGGGCTGCAGATT	

1.3 实验动物

BALB/c 小鼠(SPF级), 雌性, 4周龄, 购自中国人民解放军军事医学科学院实验动物中心。

1.4 05ZYH33 *srtF* 基因敲除突变株的构建和鉴定

1.4.1 基因敲除质粒的构建: 以 *S. suis* 2 05ZYH33 基因组 DNA 为模板, 分别扩增 *srtF* 基因的上游 LA (1000 bp) 及下游 RA (700 bp) DNA 片段, 同时以 pSET2 质粒为模版, 用引物 Spc1/2 扩增壮观霉素抗性基因(*Spc^r* cassette, 1130 bp)。将这 3 个片段(LA、RA、*Spc*)克隆到 pMD18-T 载体上, 然后在限制性内切酶和 T4 DNA 连接酶的作用下, 依次克隆到 pUC18 载体的 *EcoR* I、*Bam*H I、*Pst* I 和 *Hind* III 4 个多克隆位点上, 形成一个 *Spc^r* 基因两侧具有与 *srtF* 上下游同源序列的重组敲除质粒 pUC::*srtF*, 如下图所示。

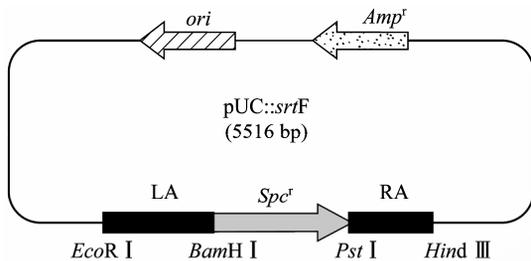


图 1 pUC::*srtF* 重组质粒的构建示意图

Fig. 1 Construction of plasmid pUC::*srtF*

1.4.2 基因敲除突变体的筛选和初步鉴定: 对 Smith 等^[9]的方法略作改动, 制备 05ZYH33 感受态细菌。在 2150 V/cm、200 Ω 和 25 μ F 电转参数下, 将重组敲除质粒 pUC::*srtF* 电转化到 05ZYH33 感受态细胞中。用位于 *srtF* 内部的引物 IN-1/IN-2 进行 PCR 初次筛选, 若目的基因缺失, 对疑似阳性菌用引物 SPC-1/SPC-2、OUT-1/SPC-2、SPC-1/OUT-2 和 OUT-1/OUT-2 进行组合 PCR 验证, 琼脂糖凝胶电泳分析各 PCR 产物与理论大小是否一致。

1.4.3 RT-PCR 验证: 取适量的野生型 05ZYH33 和突变株 Δ *srtF* ($OD_{600} \approx 0.6$) 菌液提取 RNA, 将提取的 RNA 反转录成 cDNA, 并通过混合引物和 Checkin1/2 引物对提取的 RNA、cDNA 进行鉴定。

1.5 生物学特性分析

1.5.1 形态结构和溶血活性: 为了比较野生型和突变株之间生长状态有无差异, 采用分区划线法, 将过夜培养的细菌接种于 THB 血平板(含 5%绵羊血)上, 37°C 培养箱孵育 24 h, 观察二者菌落形态和溶血活性有无明显差别。

1.5.2 革兰氏染色: 将突变株和野生型接种 THB 培养基(含 10%胎牛血清)中于 37°C 培养至对数中期, 用接种环取样均匀涂布于载玻片上, 自然晾干后进行常规革兰氏染色, 于显微镜下观察菌落形态。

1.5.3 生长速率的比较: 为了对比突变株与野生型的生长状态有无差异, 取相同数量($OD_{600} \approx 0.008$)的细菌置于 THB 液体培养基中, 37°C 振荡培养, 每间隔 1 h 测取 OD_{600} 值, 重复实验 3 次并绘制生长曲线。

1.5.4 小鼠致病实验: SPF 级 4 周龄 BALB/c 小鼠 30 只, 随机分为 3 组, 分别腹腔注射野生型和突变株菌液 1 mL (约 1×10^8 CFU/只), 并设 THB 阴性对照组(1 mL/只), 及时观察记录小鼠发病及死亡情况。

1.5.5 竞争感染实验: 用等比例的野毒株和突变株(各 5×10^7 CFU)混合菌液腹腔注射 10 只小鼠, 及时观察小鼠发病情况, 当动物出现发病症状, 如嗜睡、脓眼、跛行等症状, 随机抽取 3 只, 并进行心脏、血液、肝脏、肾脏、脾脏样本的采集, 称重后研磨, 取均浆分别作 10 倍连续稀释, 取一定稀释倍数的菌液 100 μ L 涂布于 THB 平板(分别为含 100 g/L 壮观霉素和不含壮观霉素), 37°C 孵育 48 h 后通过平板计数和抗性筛选测定各被检组织中野生型和突变株的细菌数量(突变株的细菌数量等于壮观霉素抗性平板上长出的菌落数, 而野毒株的细菌数量等于普通 THB 平板上的菌落数减去壮观霉素抗性平板上的菌落数)。

2 结果

2.1 重组敲除质粒 pUC::*srtF* 的鉴定

提取构建好的重组质粒, 对重组敲除质粒进行组合 PCR 及交叉双酶切验证, 结果见图 2 和图 3, 各条带大小均与理论值相符, 测序结果亦显示 3 个片段序列及连接顺序正确。

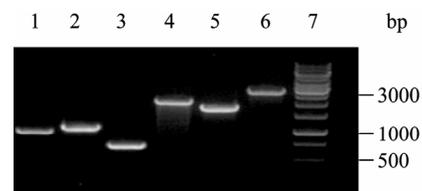


图 2 重组敲除质粒 pUC::*srtF* 的组合 PCR

Fig. 2 Multiple-PCR analysis of the recombinant plasmid pUC18::*srtF*

Note: 1: PCR products with L1/L2 (1000 bp); 2: PCR products with SPC1/SPC2 (1130 bp); 3: PCR products with R1/R2 (700 bp); 4: PCR products with L1/SPC2 (2130 bp); 5: PCR products with SPC1/R2 (1830 bp); 6: PCR products with L1/R2 (2830 bp); 7: 1 kb DNA ladder marker.

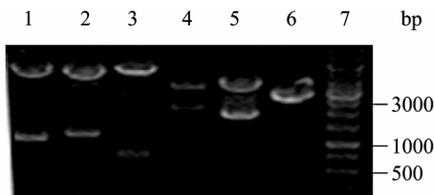


图 3 重组敲除质粒 pUC18::*srtF* 的交叉酶切鉴定
Fig. 3 Restriction enzyme digesting of the recombinant plasmid pUC18::*srtF*

Note: 1: Digested by *EcoR* I and *Bam*H I; 2: Digested by *Bam*H I and *Pst* I; 3: Digested by *Pst* I and *Hind* III; 4: Digested by *EcoR* I and *Pst* I; 5: Digested by *Bam*H I and *Hind* III; 6: Digested by *EcoR* I and *Hind* III; 7: 1 kb DNA ladder marker.

2.2 敲除突变株 $\Delta srtF$ 的 PCR 鉴定

如图 4 所示, 引物 IN-1/IN-2 的 PCR 产物为阴性者, 考虑为疑似阳性株, 其中 11 泳道为疑似突变株, 进一步提取基因组进行组合 PCR 验证。如果发生双向同源重组, *Spc^r* 基因将替代 *srtF* 基因, 引物

SPC-1/SPC-2 PCR 将能扩增出 *Spc^r* 基因, 引物 OUT-1/SPC-2 PCR 能扩增出约 2.2 kb 片段, 引物 SPC-1/OUT-2 PCR 能扩增出 2 kb 片段; 而在 05ZYH33 中, 用以上引物进行 PCR 都应得到阴性结果, 而用引物 IN-F/IN-R 能扩增出 416 bp 片段。结果如图 5 所示, 大小均与理论值一致。

2.3 RT-PCR 验证

为了进一步验证突变株, 用混合引物分别对 05ZYH33 和突变株 $\Delta srtF$ 的 RNA 和 cDNA 进行扩增, 结果表明获得了高纯度的 RNA(无 DNA 污染), 并且成功转录出 cDNA; Checkin1/2 引物分别对二者反转录得到的 cDNA 进行扩增, 野生型 05ZYH33 中结果为阳性, 说明 *srtF* 正常转录, 而在突变株 $\Delta srtF$ 中为阴性, 从转录水平证实 *srtF* 基因的缺失(图 6)。

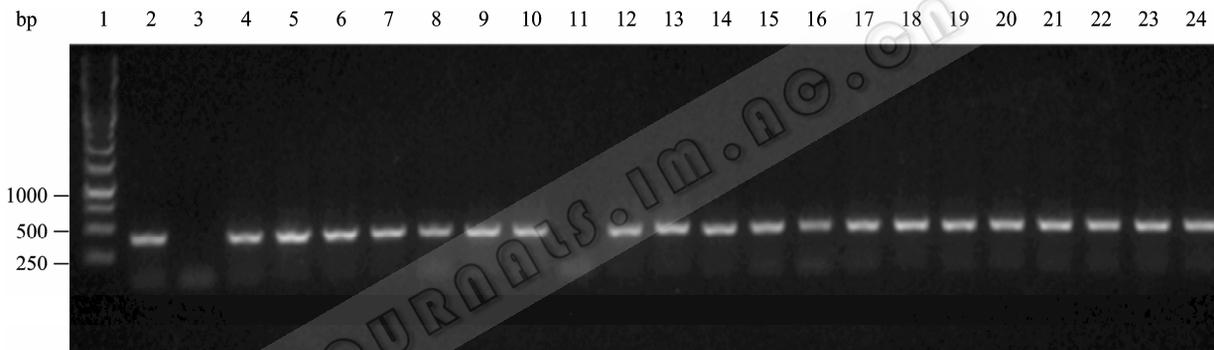


图 4 突变株 $\Delta srtF$ 的初步筛选

Fig. 4 Preliminary PCR screening of gene knock-out mutant of *srtF*

Note: 1: 1 kb DNA ladder marker; 2: Positive control; 3: Negative control; 4-24: Mutants.

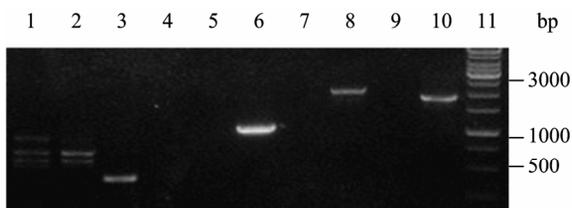


图 5 $\Delta srtF$ 的组合 PCR 验证

Fig. 5 Multiple-PCR analysis of 05ZYH33 and $\Delta srtF$

Note: 1: Mixture primers amplification of 05ZYH33; 2: Mixture primers amplification of 05ZYH33; 3: IN1/IN2 PCR amplification of 05ZYH33; 4: IN1/IN2 PCR amplification of $\Delta srtF$; 5: Spc1/Sp2 PCR amplification of 05ZYH33; 6: Spc1/Sp2 PCR amplification using $\Delta srtF$ genomic DNA as template; 7: OUT1/Sp2 PCR amplification using 05ZYH33 genomic DNA as template; 8: OUT1/Sp2 PCR amplification using $\Delta srtF$ genomic DNA as template; 9: Spc1/OUT2 PCR amplification using 05ZYH33 genomic DNA as template; 10: Spc1/OUT2 PCR amplification using $\Delta srtF$ genomic DNA as template; 11: 1 kb DNA ladder marker.

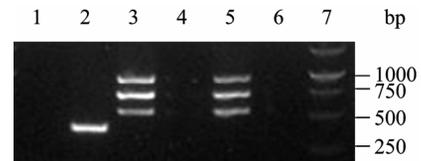


图 6 反转录 PCR 鉴定

Fig. 6 RT-PCR analysis of $\Delta srtF$

Note: 1: IN1/IN2 PCR amplification using cDNA of $\Delta srtF$; 2: IN1/IN2 PCR amplification using cDNA of 05ZYH33; 3: Mixture primers PCR amplification using cDNA of $\Delta srtF$; 4: PCR amplification using RNA of $\Delta srtF$; 5: PCR amplification using cDNA of 05ZYH33; 6: PCR amplification using RNA of 05ZYH33; 7: 250 bp DNA ladder marker.

2.4 菌落形态和溶血活性的比较

将突变株 $\Delta srtF$ 和野生型 05ZYH33 分别接种于羊血平板, 37°C 孵育 48 h, 可见灰白色、圆形半透明、湿润、表面光滑的细小菌落, 菌落周围有明显

$\Delta srtF$ 突变株细菌, 其中以血液、肝脏和肾脏数量最多和心脏中野毒株数量明显多于 $\Delta srtF$ 突变株, 具有统计学意义($P < 0.05$)。

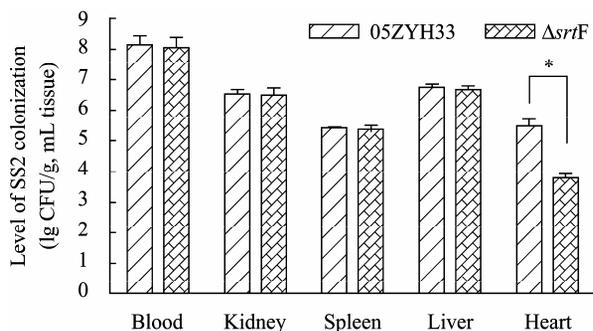


图 11 竞争实验

Fig. 11 Competition experiment

3 讨论

Sortase 介导锚定的蛋白其 N 末端含有信号肽, C 末端含有 LPXTG (Leu-Pro-X-Thr-Gly) 基序或由此基序演变的其它识别序列^[5]。在白喉棒状杆菌中, C 类 Sortase 催化菌毛合成及其装配的具体过程如下: 菌毛前体蛋白在细胞质内合成后, 在信号肽的作用下进入分泌系统, 进而与 Sortase 结合, 形成酰基酶中间体, 酰基酶中间体催化菌毛蛋白与磷脂 II 分子结合, 在菌毛特异性 Sortase 的催化下, 菌毛单体聚合形成菌毛结构, 当菌毛结构由 Sortase 转移到细胞壁肽聚糖磷脂 II 分子时, 菌毛合成过程停止, 其中菌毛的主要结构蛋白 SpaA 构成菌毛的茎干, SpaB 沿菌毛体周围呈间歇性分布, SpaC 主要定位于菌毛的顶部^[9-10]。锚定于细胞壁的菌毛结构在细菌粘附和侵袭宿主上皮细胞的过程中起着重要的作用, 并且已证实菌毛为关键毒力因子, 参与生物被膜的形成过程^[5,10]。

本研究对 *S. suis* 2 05ZYH33 基因组注释分析, 发现 *S. suis* 2 中共含有 6 种 Sortase 转肽酶, 其中属于 C 类 Sortase 家族的 *srtF* 与菌毛蛋白 SSU0473 和 SSU0474 位于同一个基因簇上, 同时, 该菌毛蛋白 SSU0473 和 SSU0474 含有 Sortase 催化的特异性 LPSTG 序列^[6]。进一步通过相关软件对 *srtF* 蛋白进行同源性比对分析, 该蛋白和多种链球菌的 Sortase 具有序列同源性。从上述分析我们可以看出, *S. suis* 2 中含有与菌毛合成相关的 C 类 Sortase *srtF*, 且该基因无论在基因组定位还是同源性上, 均与其它链

球菌 C 类 sortase 相似。

在此基础上, 我们构建 *srtF* 的敲除突变株, 并对其从基因水平和转录水平进行验证。通过生物学功能实验, 我们发现 05ZYH33 野生型和 $\Delta srtF$ 突变株在菌落形态和溶血活性方面均无明显差异, 但 $\Delta srtF$ 突变株比野生型在对数初期的生长速率有增快的趋势, 这与本课题组其它突变株的生长特性有些许差异, 但是和 Fittipaldi 等人对 *S. suis* P1/7 菌株中 *srtF* 缺失株的研究结果一致^[11]。小鼠经 05ZYH33 野生型和 $\Delta srtF$ 突变株攻击后, 致死率差异不具有统计学意义, 推测 *S. suis* 2 中的菌毛结构并非蛋白对其致病作用必须的毒力因子^[11]。本研究的竞争感染实验结果和毒力实验结果一致, 除心脏外, 野毒株和突变株的感染能力无差异。 $\Delta srtF$ 突变株在心脏的定殖数量明显比野毒株低, 心内膜炎是猪感染 *S. suis* 2 的典型症状, 提示 *srtF* 参与野毒株 05ZYH33 在心脏的定殖及感染, 有望从宿主受体和细菌配体方面进行深入研究, 为 *S. suis* 2 致病机制的研究开辟新视野^[12]。

总之, 本研究结果表明 *S. suis* 2 *srtF* 基因的缺失, 对细菌的毒力影响不明显, 这与肺炎链球菌和 B 族链球菌关于 sortase 研究的结果不完全一致。因此, 关于 *S. suis* 2 菌 *srtF* 的功能, 还需通过粘附、侵袭、全血等实验进一步验证。此外, *S. suis* 2 中其它几种 C 类 sortase 是否参与菌毛的合成过程, 也有待我们进一步探讨。

参考文献

- [1] Tang JQ, Wang CJ, Feng YJ, et al. Streptococcal toxic shock syndrome caused by *Streptococcus suis* serotype 2. *PLoS Med*, 2006, **3**(5): 668-676.
- [2] Chen C, Tang J, Dong W, et al. A glimpse of *Streptococcal toxic shock syndrome* from comparative genomics of *S. suis* 2 chinese isolates. *PLoS ONE*, 2007, **2**(3): e315.
- [3] Staats JJ, Feder I, Okwumabua O, et al. *Streptococcus suis*: past and present. *Vet Res Commun*, 1997, **21**(6): 381-407.
- [4] Lun ZR, Wang QP, Chen XG, et al. *Streptococcus suis*: an emerging zoonotic pathogen. *Lancet Infect Dis*, 2007, **7**(3): 201-209.
- [5] Marraffini LA, Dedent AC, Schneewind O, et al. Sortase and the art of anchoring proteins to the envelopes of gram-positive bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2006, **70**(1): 192-221.

- [6] Wang CJ, Li M, Feng Y, *et al.* The involvement of sortase A in high virulence of STSS-causing *Streptococcus suis* serotype 2. *Arch Microbiol*, 2009, **191**(1): 23–33.
- [7] Falker S, Nelson AL, Morfeldt E, *et al.* Sortase-mediated assembly and surface topology of adhesive pneumococcal pili. *Mol Microbiol*, 2008, **70**(3): 595–607.
- [8] Dramsi S, Caliot E, Bonne I, *et al.* Assembly and role of pili in groupB Streptococci. *Mol Microbiol*, 2006, **60**(6): 1401–1413.
- [9] Smith HE, Wisselink HJ, Vecht U, *et al.* High-efficiency transformation and gene inactivation in *Streptococcus suis* type 2. *Microbiology*, 1995, **141**(Pt 1): 181–188.
- [10] Ton-That H, Marraffini LA, Schneewind O, *et al.* Protein sorting to the cell wall envelope of gram-positive bacteria. *Biochim Biophys Acta*, 2004, **1694**(1/3): 269–278.
- [11] Fittipaldi N, Takamatsu D, de la Cruz Domínguez-Punaro M, *et al.* Mutations in the gene encoding the ancillary pilin subunit of the *Streptococcus suis* *srtF* cluster result in pili formed by the major subunit only. *PLoS One*, 2010, **5**(1): e8426.
- [12] Garibaldi M, Rodríguez-Ortega MJ, Mandanici F, *et al.* Immunoprotective activities of a *Streptococcus suis* pilus subunit in murine models of infection. *Vaccine*, 2010, **28**(20): 3609–3616.

~~~~~  
(上接 p.1785)

## 征 稿 简 则

### 3.4 摘要写作注意事项

#### 3.4.1 英文摘要:

1) 建议使用第一人称, 以此可区分研究结果是引用文献还是作者得出的; 2) 建议用主动语态, 被动语态表达拖拉模糊, 尽量不用, 这样可以避免好多长句, 以求简单清晰; 3) 建议使用过去时态, 要求语法正确, 句子通顺; 4) 英文摘要的内容应与中文摘要一致, 但可比中文摘要更详尽, 写完后务必请英文较好且专业知识强的专家审阅定稿后再返回编辑部。5) 摘要中不要使用缩写语, 除非是人人皆知的, 如: DNA, ATP 等; 6) 在英文摘要中, 不要使用中文字体标点符号。

3.4.2 关键词: 应明确、具体, 一些模糊、笼统的词语最好不用, 如基因、表达……

## 4 特别说明

### 4.1 关于测序类论文

凡涉及测定 DNA、RNA 或蛋白质序列的论文, 请先通过国际基因库 EMBL (欧洲) 或 GenBank (美国) 或 DDBJ (日本), 申请得到国际基因库登录号 (Accession No.) 后再投来。

### 4.2 关于版权

4.2.1 本刊只接受未公开发表的文章, 请勿一稿两投。

4.2.2 凡在本刊通过审稿、同意刊出的文章, 所有形式的 (即各种文字、各种介质的) 版权均属本刊编辑部所有。作者如有异议, 敬请事先声明。

4.2.3 对录用的稿件编辑部有权进行文字加工, 但如涉及内容的大量改动, 将请作者过目同意。

4.2.4 文责自负。作者必须保证论文的真实性, 因抄袭剽窃、弄虚作假等行为引发的一切后果, 由作者自负。

### 4.3 审稿程序及提前发表

4.3.1 来稿刊登与否由编委会最后审定。对不录用的稿件, 一般在收稿 2 个月之内通过 E-mail 说明原因, 作者登陆我刊系统也可查看。稿件经过初审、终审通过后, 作者根据编辑部返回的退修意见进行修改补充, 然后以投稿时的用户名和密码登陆我刊网址上传电子版修改稿, 待编辑部复审后将给作者发送稿件录用通知单, 稿件按照稿号顺序进入排队发表阶段。

4.3.2 对投稿的个人和单位一视同仁。坚持文稿质量为唯一标准, 对稿件采取择优先登的原则。如作者要求提前发表, 请在投稿的同时提出书面报告, 说明该研究成果的重要性、创新性、竞争性和提前发表的必要性, 经过我刊的严格审查并通过后, 可予提前刊出。

## 5 发表费及稿费

论文一经录用, 将在发表前根据版面收取一定的发表费并酌付稿酬、赠送样刊。

## 6 联系我们

地址: 北京市朝阳区北辰西路 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(100101)

Tel: 010-64807511

E-mail: tongbao@im.ac.cn

网址: <http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>