

# 乳及乳制品中肺炎克雷伯氏菌 PCR-DHPLC 检测新技术的建立

杨春华<sup>1</sup> 曹际娟<sup>2\*</sup> 钟毅<sup>1</sup> 石磊<sup>1</sup> 陈庆富<sup>1</sup> 马欣欣<sup>1</sup> 龚斐<sup>1</sup>

(1. 江西出入境检验检疫局 江西 南昌 330002)  
(2. 辽宁出入境检验检疫局 辽宁 大连 116001)

**摘要:** 为了应用 PCR 结合变性高效液相色谱(DHPLC)技术建立乳品中肺炎克雷伯氏菌的快速检测方法, 根据肺炎克雷伯氏菌 16S-23S rRNA 特异基因序列的特点设计特异性引物, PCR 扩增的产物经 DHPLC 技术进行快速检测。以肺炎克雷伯氏菌等 57 株参考菌株做特异性试验; 将肺炎克雷伯氏菌菌株稀释成不同梯度, 做灵敏度试验。试验结果表明该方法具有很好的特异性, 灵敏度较高, 检测下限可达到 100 CFU/mL, 可以快速、准确检测肺炎克雷伯氏菌, 是乳及乳制品中致病菌快速检测的新技术。

**关键词:** DHPLC, 肺炎克雷伯氏菌, 16S-23S rRNA

## Construction of Identification of *Klebsiella pneumoniae* in Milk and Dairy Product with PCR-DHPLC

YANG Chun-Hua<sup>1</sup> CAO Ji-Juan<sup>2\*</sup> ZHONG Yi<sup>1</sup> SHI Lei<sup>1</sup> CHEN Qing-Fu<sup>1</sup>  
MA Xin-Xin<sup>1</sup> GONG Fei<sup>1</sup>

(1. Jiangxi Entry-Exit Inspection & Quarantine Bureau of P.R.China, Nanchang, Jiangxi 330002, China)  
(2. Liaoning Entry-Exit Inspection & Quarantine Bureau of P.R.China, Dalian, Liaoning 116001, China)

**Abstract:** To identify the 16S-23S rRNA gene in *Klebsiella pneumoniae*, a PCR-DHPLC assay was performed in this study. Primers specific for the 16S-23S rRNA gene of *Klebsiella pneumoniae* in dairy were selected to conduct the DHPLC assays. The specific testing was performed with *Klebsiella pneumoniae* and 57 strains, and various grads of *Klebsiella pneumoniae* was used for the sensitivity testing. The good specificity was found in this study. Also, the method showed nice sensitivity with the lowest amount of detecting at 100 CFU/mL, so it can detect and identify *Klebsiella pneumoniae* quickly and correctly. The DHPLC could be a new method for detecting dairy pathogens.

**Keywords:** DHPLC, *Klebsiella pneumoniae*, 16S-23S rRNA

肺炎克雷伯氏菌(*Klebsiella pneumoniae*)是革兰氏阴性杆菌, 属肠杆菌科克雷伯菌属。该菌广泛分

布于自然界, 是人和动物肠道、呼吸道的致病菌, 该菌近年来成为仅次于大肠杆菌的最重要的致病

菌<sup>[1-2]</sup>。肺炎克雷伯氏菌可在全身各部位发生感染,但最高的发病率在尿道和呼吸道。当机体免疫力降低或长期大量使用抗生素导致菌群失调时引起全身感染,可引发肺炎、脑膜炎、肝脓肿、眼内炎、泌尿系统发炎、伤口感染、全身败血症等,发病死亡率极高<sup>[2-3]</sup>。据不完全统计,南美发展中国家重症监护病房内肺炎克雷伯菌检出率高达 27%,俄罗斯早产儿肺炎克雷伯菌检出高达 31%,新生儿病区也易于发生和流行克雷伯氏菌肺炎,突尼斯曾报道一组新生儿院内爆发克雷伯氏菌肺炎,25 d 导致 14 名新生儿死亡<sup>[4]</sup>。

肺炎克雷伯氏菌的传统检测方法用前增菌和选择性增菌等多种培养基进行培养、鉴定,此类方法操作步骤繁杂,工作量大,从培养到生化鉴定耗时 5-8 d。在食品安全面临严峻挑战的形势下,有必要建立快速诊断和鉴定技术,从菌株水平确定病原菌。变性高效液相色谱(DHPLC)采用高压闭合液相流路,将 DNA 样品自动注入并在缓冲液携带下流过 DNA 分离柱,通过缓冲液的不同梯度变化,在不同分离柱温度条件下实现对 DNA 不同的分析。DHPLC 通过对细微差异的 DNA 序列分析可以从菌株水平快速识别病原菌。

本文建立的 PCR-DHPLC 检测技术将 PCR 技术与 DHPLC 技术结合在一起,具有快捷、灵敏、特异的优势,同时检测成本较低,检测速度快,操作安全、省时高效,且可达到同时检测数百个样品的自动化、高通量检测的目的。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验菌株

本研究所用标准菌株均购自美国典型菌种保藏中心(ATCC)和中国医学微生物菌种保藏管理中心(CMCC),其他菌株为本实验室和其他检验检疫局实验室分离鉴定获得的分离株,详见表 1。

### 1.2 仪器和试剂

**1.2.1 主要仪器:** 基因扩增仪(美国 ABI 公司); 变性高效液相色谱(简称 DHPLC, 美国 Transgenomic 公司)。

**1.2.2 主要试剂:** 细菌基因组 DNA 提取试剂(TaKaRa MiniBEST Bacterial Genomic DNA Extraction Kit)及 Ex Taq 等试剂购自宝生物工程(大

连)有限公司。三乙胺乙酰盐(TEAA, 色谱纯)购自 Transgenomic 公司。乙腈(色谱纯)购自 Fisher 公司。

肺炎克雷伯氏菌 PCR-DHPLC 检测的引物序列如下: 上游引物: 5'-TGGCCCCGCGCCAGGGTTCG AAA-3', 下游引物: 5'-GATGTGTCATCGTTGATG CCGAG-3'。预期扩增片段为 368 bp。引物由宝生物工程(大连)有限公司合成。

DHPLC 缓冲液: 缓冲溶液 A 为 0.1 mmol/L TEAA; 缓冲溶液 B 为 0.1 mol/L TEAA + 25%乙腈。

### 1.3 试验方法

**1.3.1 致病菌 DNA 的提取:** 取肺炎克雷伯氏菌培养液 1 mL, 采用细菌 DNA 提取试剂盒(TaKaRa MiniBEST Bacterial Genomic DNA Extraction Kit)提取细菌 DNA, 保存于 -20°C 备用以待检测。

**1.3.2 引物筛选与反应体系优化:** 检索文献, 确定靶基因, 从 GenBank 下载所有靶基因的序列, 用 Lasergene 软件进行序列比对, 并截取最一致的序列设计引物, 将设计好的引物在 GenBank 上进行 BLAST 比对, 验证引物的保守性。以完全相同的模板对各个引物对进行相同条件反应, 同时微调引物量, 选出反应效果最佳的引物。然后进行 Taq 酶、Mg<sup>2+</sup>、引物用量和循环条件优化, 直至得出最佳反应体系。

**1.3.3 PCR 扩增条件:** PCR 反应体系(25 μL): 10 × PCR 缓冲液 2 μL、引物对(10 μmol/L)各 1 μL、dNTPs (10 mmol/L) 2 μL、Taq DNA 聚合酶(5 U/μL) 0.2 μL、模板 DNA 2 μL、ddH<sub>2</sub>O 16.8 μL。PCR 反应条件: 94°C 3 min; 94°C 60 s, 60°C 60 s, 72°C 60 s, 35 个循环; 72°C 7 min, 4°C 保存反应产物。

**1.3.4 DHPLC 分析条件:** 色谱柱: PS-DVB & C18 DNASep 色谱柱(4.6 mm × 50 mm, 粒度 3 μm); 柱温: 50°C; 流动相: 缓冲溶液 A 浓度为 50.2%, 缓冲溶液 B 浓度为 49.8%; 流速: 0.9 mL/min; 检测器: 荧光检测器(光源: 150 W Xenon 灯; 激发谱带宽: 15 nm; 发射谱带宽: 15.3 nm; 检测灵敏度: 在波长 350 nm 积分 2 s); 上样量: PCR 产物 5 μL。

**1.3.5 特异性试验:** 取表 1 中所列的 57 株试验菌株, 经培养后建立一个模板库, 按照 1.3.3 PCR 扩增条件和 1.3.4 DHPLC 分析条件进行致病菌的 PCR-DHPLC 特异性试验。

表 1 试验菌种及其编号  
Table 1 Test strain and No.

序号 No.	菌株名称 Strain name	拉丁名 Latin name	菌株号 Strain	菌株数量 The number of strains
1	肺炎克雷伯氏菌	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	CMCC 46112	1
2	肺炎克雷伯氏菌	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	CMCC 46119	1
3	肺炎克雷伯氏菌	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	CMCC 46102	1
4	肺炎克雷伯氏菌	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	CMCC 46103	1
5	肺炎克雷伯氏菌	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	CMCC 46104	1
6	肺炎克雷伯氏菌	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	CMCC 46108	1
7	肺炎克雷伯氏菌	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	CMCC 46109	1
8	肺炎克雷伯氏菌	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	分离株	2
9	阪崎肠杆菌	<i>Enterobacter sakazakii</i>	ATCC 51329	1
10	普通变形杆菌	<i>Proteus vulgaris</i>	ATCC 49027	1
11	奇异变形杆菌	<i>Proteus mirabilis</i>	ATCC 29245	1
12	金黄色葡萄球菌	<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 29213	1
13	福氏志贺氏菌	<i>Shigella flexneri</i>	ATCC 12022	1
14	小肠结肠炎耶尔森氏菌	<i>Yersinia enterocolitica</i>	ATCC 9610	1
15	空肠弯曲菌	<i>Campylobacter jejuni</i>	ATCC 33560	1
16	溶血性链球菌	<i>Streptococcus hemolyticus</i>	CMCC 32121	1
17	霍乱弧菌 O1 群	<i>Vibrio cholerae</i> serotype O1	ATCC 14035	1
18	霍乱弧菌 O139 群	<i>Vibrio cholerae</i> serotype O139	ATCC 51394	1
19	副溶血性弧菌	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	ATCC 17803	1
20	溶藻性弧菌	<i>Vibrio alginolyticus</i>	分离株	1
21	创伤弧菌	<i>Vibrio vulnificus</i>	ATCC 27562	1
22	拟态弧菌	<i>Vibrio mimicus</i>	ATCC 33653	1
23	梅氏弧菌	<i>Vibrio metschnikouii</i>	分离株	1
24	河弧菌	<i>Vibrio fluvialis</i>	分离株	1
25	嗜水气单胞菌	<i>Aeromonas hydrophila</i>	ATCC 7966	1
26	类志贺邻单胞菌	<i>Plesiomonas shigelloides</i>	ATCC 14030	1
27	单核细胞增生李斯特氏菌	<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 19111	1
28	绵羊李斯特氏菌	<i>Listeria ivanovii</i>	ATCC 19119	1
29	英诺克李斯特氏菌	<i>Listeria innocua</i>	ATCC 33090	1
30	威尔斯李斯特氏菌	<i>Listeria welshimeri</i>	ATCC 35897	1
31	西尔李斯特氏菌	<i>Listeria seeligeri</i>	ATCC 35967	1
32	格氏李斯特氏菌	<i>Listeria grayi</i>	ATCC 25401	1
33	脱氮李斯特氏菌	<i>Listeria denitrificans</i>	ATCC 14870	1
34	肠炎沙门氏菌	<i>Salmonella enteritidis</i>	ATCC 13076	1
35	鼠伤寒沙门氏菌	<i>Salmonella typhimurium</i>	CMCC 50115	1
36	猪霍乱沙门氏菌	<i>Salmonella cholerae</i>	分离株	2
37	丙型副伤寒沙门氏菌	<i>Salmonella paratyphi C</i>	分离株	3
38	伊思特本沙门氏菌	<i>Salmonella eastbourne</i>	分离株	1
39	大肠埃希氏菌	<i>Escherichia coli</i>	分离株	5
40	肠出血性大肠埃希氏菌 O157: H7	<i>Enterohemorrhagic E. coli</i> O157: H7	ATCC 35150	1
41	产肠毒素大肠埃希氏菌	<i>Enterotoxigenic E. coli</i>	ATCC 35401	1
42	肠致病性大肠埃希氏菌	<i>Enteropathogenic E. coli</i>	ATCC 43887	1
43	肠侵袭性大肠埃希氏菌	<i>Enteroinvasive E. coli</i>	ATCC 43893	1
44	弗劳地柠檬酸杆菌	<i>Citrobacter freundii</i>	分离株	1
45	阴沟肠杆菌	<i>Enterobacter cloacae</i>	分离株	1
46	产气肠杆菌	<i>Enterobacter aerogenes</i>	分离株	1
47	腊样芽孢杆菌	<i>Bacillus cereus</i>	分离株	1
48	产气荚膜梭菌	<i>Clostridium perfringens</i>	分离株	1
49	绿脓杆菌	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	分离株	1

**1.3.6 灵敏度试验:**取 50  $\mu\text{L}$  已复苏的肺炎克雷伯氏菌培养物,加入 10 mL 的营养肉汤培养液于 37°C 振荡培养过夜。用比浊法定量所培养的肺炎克雷伯氏菌的菌液浓度。首先用麦氏比色管试剂盒制作  $OD_{550}$  值——每 mL 菌液里的细菌个数的标准曲线,再测定所培养菌液的  $OD_{550}$  值,将  $OD_{550}$  值代入标准曲线,得到所培养菌液的浓度,单位为 CFU/mL。把菌液稀释成  $1 \times 10^1$ 、 $1 \times 10^2$ 、 $1 \times 10^3$ 、 $1 \times 10^4$ 、 $1 \times 10^5$ 、 $1 \times 10^6$  CFU/mL 等梯度。将几个梯度的肺炎克雷伯氏菌菌液采用细菌 DNA 提取试剂盒 (TaKaRa MiniBEST Bacterial Genomic DNA Extraction kit) 提取 DNA,各取 2  $\mu\text{L}$  做为模板,分别进行 PCR 结合凝胶电泳方法和 PCR-DHPLC 方法进行检测。

**1.3.7 精密度试验:**将  $1 \times 10^3$  CFU/mL 和  $1 \times 10^5$  CFU/mL 浓度的菌液进行 10 次重复 DNA 提取,将所提取的 DNA 作为模板进行 PCR-DHPLC 检测。

**1.3.8 验证试验与应用:**将本研究建立的 PCR-DHPLC 检测方法用于乳制品中的肺炎克雷伯氏菌实际检验,同时采用检验检疫行业标准的培养鉴定方法(SN/T 1962-2007)进行验证比较。

## 2 结果与分析

### 2.1 特异性试验结果

取表 1 中所列的肺炎克雷伯氏菌等 57 株参考菌株的 DNA 进行 PCR-DHPLC 检测,结果仅肺炎克雷伯氏菌检测到扩增吸收峰,出峰时间为 4.6 min 左右;而其他非肺炎克雷伯氏菌则未检测出扩增吸收峰,即为肺炎克雷伯氏菌阴性。图 1 仅示意出了 3

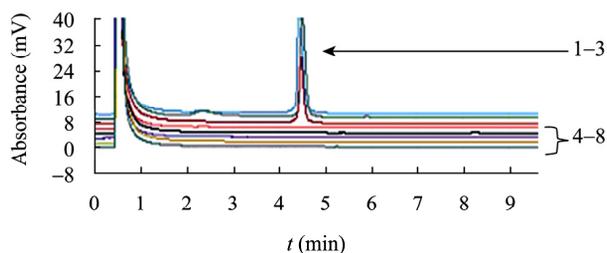


图 1 肺炎克雷伯氏菌特异性检测的 DHPLC 吸收峰图谱  
Fig. 1 DHPLC map of specificity detection of *Klebsiella pneumoniae*

注: 1-3: 肺炎克雷伯氏菌; 4: 普通变形杆菌; 5: 奇异变形杆菌;  
6: 金黄色葡萄球菌; 7: 福氏志贺氏菌; 8: 弗劳地柠檬酸杆菌。

Note: 1-3: *Klebsiella pneumoniae*; 4: *Proteus vulgaris*; 5: *Proteus mirabilis*; 6: *Staphylococcus aureus*; 7: *Shigella flexneri*; 8: *Citrobacter freundii*.

株肺炎克雷伯氏菌(CMCC 46109, CMCC 46112, CMCC 46119)特异性检测结果的 DHPLC 检测图谱,其中肺炎克雷伯氏菌检测出扩增吸收峰,结果为阳性,普通变形杆菌、奇异变形杆菌、金黄色葡萄球菌、福氏志贺氏菌、弗劳地柠檬酸杆菌(仅示意了部分菌种的图谱)未检出相应的扩增吸收峰,结果均为阴性。

上述结果表明:本试验设计的适合于 PCR-DHPLC 检测的引物可以特异性扩增检测肺炎克雷伯氏菌中 *phoE* 基因,具有很好的肺炎克雷伯氏菌鉴定特异性。

### 2.2 灵敏度试验结果

当肺炎克雷伯氏菌浓度为  $1 \times 10^4$ 、 $1 \times 10^5$  和  $1 \times 10^6$  CFU/mL 时,提取 DNA,加入 2  $\mu\text{L}$  作为 PCR 反应的模板,PCR 扩增后,凝胶电泳检测,有目的条带;当肺炎克雷伯氏菌浓度为  $1 \times 10^3$  CFU/mL 以下时,凝胶电泳检测无目的条带出现。同样的 PCR 反应条件下,当肺炎克雷伯氏菌浓度为  $1 \times 10^2$  CFU/mL 和  $1 \times 10^3$  CFU/mL 时,能经 PCR-DHPLC 检测出典型的阳性吸收峰,当肺炎克雷伯氏菌浓度为  $1 \times 10^1$  CFU/mL 时则未检测出阳性吸收峰。结果表明,PCR-DHPLC 法的检测灵敏度比 PCR 结合凝胶电泳法更高,可达  $1 \times 10^2$  CFU/mL。详细情况见表 2。

表 2 肺炎克雷伯氏菌标准菌株平板计数、PCR-凝胶电泳、PCR-DHPLC 检测结果的比较

Table 2 *Klebsiella pneumoniae* results comparison among standard strain plate count and PCR-Gel electrophoresis and PCR-DHPLC

稀释梯度 Dilution gradient (CFU/mL)	PCR-DHPLC 检测结果 Test results with PCR-DHPLC	PCR-凝胶电泳检测结果 Test results with PCR-Gel electrophoresis
$1 \times 10^6$	+	+
$1 \times 10^5$	+	+
$1 \times 10^4$	+	+
$1 \times 10^3$	+	-
$1 \times 10^2$	+	-
$1 \times 10^1$	-	-

### 2.3 精密度试验结果

在不同批次培养的菌液之间和同批次培养的菌液不同批次提取的 DNA 之间,都进行了灵敏度和稳定性试验(均为 10 次重复)。结果表明,在不同批次培养的菌液之间,和同批次培养的菌液不同批次提取的 DNA 之间,其 DHPLC 检测结果无明显差异,特异性、灵敏度和稳定性都能有很好的保证。

## 2.4 验证试验与应用

将本研究建立的 PCR-DHPLC 检测方法用于乳品中的肺炎克雷伯氏菌实际检验, 同时采用检验疫苗行业标准的培养鉴定方法(SN/T 1962-2007)进行验证比较。在 312 份实际检验样品中, 经本文建立的 PCR-DHPLC 方法筛选检测为阳性的 2 株肺炎克雷伯氏菌菌株, 采用培养鉴定方法鉴定该 2 株确定为肺炎克雷伯氏菌阳性菌株。

上述结果表明, PCR-DHPLC 方法准确度为 100%, 显示该方法具有较好的适用性。两种方法的验证比较结果见表 3。

检测方法 Detection method	培养鉴定法 Identification of training	PCR-DHPLC
样品数量(份) The number of samples	312	312
阳性结果(株) Positive results	2	2
阳性率(%) The positive rate	0.64	0.64
假阳性率(%) False positive rate	0	0

## 3 讨论

目前国内外检测乳及乳制品中肺炎克雷伯氏菌的方法很多, 如: 经典的培养生化鉴定法<sup>[1,3]</sup>、PCR-凝胶电泳法<sup>[1-2]</sup>、实时荧光 PCR 法<sup>[1,4]</sup>、BAX 全自动 PCR 法<sup>[1,5]</sup>等, 以上方法均存在优势和不足。常规的细菌培养、生化鉴定是一项既耗时又复杂的工作, 由于细菌的生化特征相对的不稳定, 给细菌的鉴定带来很大的困难和不确定性, 同时由于某些生化试剂、血清等质量的不稳定、特异性不好等因素, 可能会出现检测结果不准确的现象。PCR-凝胶电泳法快捷、成本低, 但操作繁琐, 灵敏度相对较低, 且电泳检测步骤存在污染的可能性。实时荧光 PCR 技术具有特异性强, 灵敏度高优势, 但检测成本较高, 荧光探针保存时间较短。细菌的自动鉴定仪器重现性较好, 但由于只是局限在几个生化反应, 相似的菌株间鉴别特别困难。荧光免疫检测法(VIDAS)检测成本极高, 且存在假性结果的问题。由于传统方法和其他快速检测方法的局限性, 微生物学检测工作者都不断地致力于建立简便、快捷和低成本

的分析方法。

DHPLC 又称核苷酸片段分析系统, 采用高压闭合液相流路, 利用离子对反相液相色谱技术进行核酸片段的分离和分析。DHPLC 在非变性条件分析样品, 样品峰的洗脱只由碱基对的数量决定洗脱顺序。分子量较小的核酸片段含有相应较少的磷酸盐基团结合柱基质, 而分子量较大的片段则含有较多的磷酸盐基团结合柱基质。将过柱的乙腈浓度提高, 核酸片段就会根据分子量从小到大的顺序被洗脱出来。因此可以利用 DHPLC 能够区分不同长度 DNA 片段的特点, 根据各种食源性病原菌的特有基因组序列设计 PCR 引物, 进行 PCR 扩增, 然后利用 DHPLC 技术一次同时分析数百个样本, 达到快速检测食源性致病菌的目的。目前, 国内已建立了阪崎肠杆菌、单核细胞增生李斯特氏菌、沙门氏菌的 PCR-DHPLC 检测技术, 并且已经在食品快速检验中应用<sup>[6-7]</sup>。PCR-DHPLC 技术能够针对微生物遗传高变区检测, 是一种对致病微生物检测的有效方法<sup>[8-9]</sup>。

引物的设计是 PCR-DHPLC 检测技术的核心所在, 直接影响到检测方法的特异性及灵敏度。在引物的设计过程中, 本文力求用生物信息学手段从理论上避免检测的假阳性和假阴性, 同时在设计中要考虑到引物本身的生化特性来选择引物序列, 从而保证其在扩增反应过程中能有效地与模板结合, 提高扩增效率, 增加检测灵敏度。同时, 本研究发现 PCR 引物长度、PCR 引物浓度、PCR 反应体系、PCR 反应条件、检测时柱温的选择、洗脱液和 DNA 聚合酶等都可对 DHPLC 的分辨力产生重要影响, 是试验中不可忽视的重要因子。

本文建立的肺炎克雷伯氏菌 PCR-DHPLC 检测方法具有稳定、特异、灵敏、快捷的特点, 完全适用于对乳及乳制品中肺炎克雷伯氏菌的快速检测。

## 参考文献

- [1] 贾艳. 猪源肺炎克雷伯菌菌毛致病的分子基础及其免疫相关抗原表位的筛选. 吉林大学硕士论文, 2007: 83-95.
- [2] 何礼洋, 韩文瑜, 雷连成, 等. 肺炎克雷伯氏菌 III 型菌毛的研究进展. 中国兽医杂志, 2007, 43(12): 50-51.
- [3] Witkowska D, Mieszala M, Gamian A, et al. Major structural proteins of type 1 and type 3 *Klebsiella fimbriae* are

- effective protein carriers and immunogens in conjugates as revealed from their immunochemical characterization. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 2005, **45**(2): 221–230.
- [4] 曹际娟. 食品微生物学与现代检测技术. 沈阳: 辽宁师范大学出版社, 2006: 237–244.
- [5] Church DL, Don-Joe C, Unger B. Effects of restructuring on the performance of microbiology laboratories in Alberta. *Arch Pathol Lab Med*, 2000(124): 357–361.
- [6] 杨春华, 曹际娟, 桂家祥, 等. 乳及乳制品中阪崎肠杆菌 PCR-DHPLC 检测新技术的建立. *微生物学通报*, 2008, **35**(11): 1845–1849.
- [7] 闫平平, 曹际娟, 郑秋月, 等. 食品中沙门菌变性高效液相色谱检测技术的研究与方法建立. *中国卫生检验杂志*, 2008, **18**(9): 1739–1741.
- [8] 曹际娟, 闫平平, 徐君怡, 等. 单核细胞增生李斯特氏菌 PCR-DHPLC 检测新技术的建立. *生物技术通报*, 2008(增刊): 415–419.
- [9] Oefner PJ, Christian GH. A decade of high-resolution liquid chromatography of nucleic acids on styrene-divinylbenzene copolymers. *Journal of Chromatography B*, 2002(782): 27–55.

## 征订启事

### 2011 年部分生物、农林类学术期刊联合征订表(2-1)

刊物名称	邮发代号	刊 期	年价(元)	网 址	E-mail
癌变·畸·突变	80-285	双月刊	60	www.egh.net.cn	cemsctm@stu.edu.cn
动物学研究	64-20	双月刊	150	www.zoores.ac.cn	zoores@mail.kiz.ac.cn
动物学杂志	2-422	双月刊	360	http://dwxzz.ioz.ac.cn	journal@ioz.ac.cn
分子植物育种	84-23	双月刊	240	www.molplantbreed.org	mpb@hibio.org
国际遗传学杂志	14-55	双月刊	90	www.cma.org.cn	genetics@ems.hrbmu.edu.cn
激光生物学报	42-194	双月刊	150	www.jgswxb.net	jgswxb@hunnu.edu.cn
菌物学报	2-499	双月刊	480	http://journals.im.ac.cn/jwxtcn	jwxt@im.ac.cn
昆虫知识	2-151	双月刊	360	www.ent-bull.com.cn	entom@ioz.ac.cn
林业科学	82-6	月 刊	300	www.linyekexue.net	linykh@forestry.ac.cn
农业生物技术学报	2-367	双月刊	240	www.jabiotech.org.cn/	nsjxb@cau.edu.cn
人类学学报	2-384	季 刊	100	www.ivpp.ac.cn	acta@ivpp.ac.cn
生命科学	4-628	月 刊	480	www.lifescience.net.cn	cblls@sibs.ac.cn
生命科学研究	42-172	双月刊	108	http://smky.chinajournal.net.cn	life@hunnu.edu.cn
生物工程学报	82-13	月 刊	780	http://journals.im.ac.cn/cjbcn	cjb@im.ac.cn
生物化学与生物物理进展	2-816	月 刊	720	www.pibb.ac.cn	prog@sun5.ibp.ac.cn
生物技术通报	18-92	月 刊	300		biotech@mail.caas.net.cn
生物技术通讯	82-196	双月刊	150	http://swtx.chinajournal.net.cn	swtx@263.net