

研究报告

## 抗酸土脂环酸芽孢杆菌(*Alicyclobacillus acidoterrestris*)单克隆 抗体制备

张宇霞<sup>1</sup> 连晓雯<sup>2</sup> 李儒<sup>1\*</sup> 杜惠芬<sup>2</sup> 李克生<sup>2</sup>

(1. 甘肃出入境检验检疫局综合技术中心 甘肃 兰州 730020)

(2. 甘肃省医学科学研究院 甘肃 兰州 730020)

**摘要:**【背景】基于本实验室已经建立的脂环酸芽孢杆菌检测和鉴定方法工作基础之上,以期建立具有很好的经济价值和实用价值,且更为方便、快捷、准确、特异、灵敏的检测方法。【目的】实现对果汁生产中脂环酸芽孢杆菌从原料到成品的快速检测和鉴定。【方法】采用杂交瘤细胞技术,以 *Alicyclobacillus acidoterrestris* (ATCC49025)免疫 BALB/c 小鼠,用建立的间接 ELISA 方法筛选杂交瘤细胞,得到了3株能稳定分泌 *A. acidocaldarius* 抗体的杂交瘤细胞株,其中两株为 IgG1 亚类,并对其进行生物学特性的鉴定。【结果】得到的两株单抗 3F7 和 9C4 是针对不同的抗原位点,且多次传代后稳定性基本保持不变;特异性实验表明两株单抗均不与 *A. acidocaldarius* (NCIMB11725)、*Bacillus cereus* (ATCC11778)、*Bacillus subtilis* (ATCC11774)、*A. cycloheptanicus* (ATCC49029)等发生交叉反应。【结论】3F7 和 9C4 这两株单抗可以进一步用于检测胶体金试纸条的研制。

**关键词:** 脂环酸芽孢杆菌, 单克隆抗体, 鉴定

## Preparation of monoclonal antibodies against *Alicyclobacillus acidoterrestris*

ZHANG Yu-Xia<sup>1</sup> LIAN Xiao-Wen<sup>2</sup> LI Ru<sup>1\*</sup> DU Hui-Fen<sup>2</sup> LI Ke-Sheng<sup>2</sup>

(1. The Center Lab of Gansu Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Lanzhou, Gansu 730020, China)

(2. Gansu Provincial Academic Institute for Medical Research, Lanzhou, Gansu 730020, China)

**Abstract:** [Background] This project is based on the methods of detection and identification of *Alicyclobacillus* in our laboratory. We hope to establish a good economic value and practical value, more convenient, fast, accurate, specific and sensitive detection methods. [Objective] In order to detect and identify *Alicyclobacillus* rapidly in raw materials or finished products in fruit juice production enterprises. [Methods] We immunized BALB/c mice with *A. acidoterrestris* (ATCC49025) and established indirect ELISA to screen hybridoma cells. Using hybridoma

**Foundation item:** Chinese Academy of Inspection of the Fundamental Research Funds for the Project Supported by the Special Funds (2013JK031)

\*Corresponding author: E-mail: liru8573@sina.com

Received: April 12, 2017; Accepted: August 11, 2017; Published online (www.cnki.net): August 30, 2017

基金项目: 中国检验检疫科学研究院基本科研业务费专项资金(2013JK031)

\*通信作者: E-mail: liru8573@sina.com

收稿日期: 2017-04-12; 接受日期: 2017-08-11; 网络首发日期(www.cnki.net): 2017-08-30

technology, we obtained 3 hybridoma cell lines that could stably secrete *A. acidoterrestris* antibody. Two of the three were IgG1 and their biological characteristics were identified. **[Results]** Two monoclonal antibodies 3F7 and 9C4 had different antigenic sites and the stability remained unchanged after multiple passages. Specificity experiments showed that the two monoclonal antibodies did not cross react with *A. acidocaldarius* (NCIMB11725), *Bacillus cereus* (ATCC11778), *Bacillus subtilis* (ATCC11774) and *A. cycloheptanicus* (ATCC49029). **[Conclusion]** These two monoclonal antibodies can be further used in the development of colloidal gold test strips.

**Keywords:** *Alicyclobacillus*, Monoclonal antibodies, Identification

脂环酸芽孢杆菌(*Alicyclobacillus*)俗称耐热菌、嗜酸耐热菌、耐热耐酸菌等<sup>[1-2]</sup>,能引起巴氏灭菌果汁风味改变甚至腐败<sup>[3]</sup>,而目前的杀菌条件难以消除该菌。美国、欧洲大部分果汁消费国脂环酸芽孢杆菌达到了小于1个/10 mL的要求,而我国部分浓缩果汁中脂环酸芽孢杆菌的含量超过了1个/10 mL,并且我国果汁产品中脂环酸芽孢杆菌的污染没有制定相应的限量值以及检测方法的滞后,已成为制约我国浓缩苹果汁出口的主要障碍。因此,如何在浓缩果汁中快速准确地检测和鉴定脂环酸芽孢杆菌已成为苹果浓缩汁生产企业亟待解决的问题。目前脂环酸芽孢杆菌的检测方法主要有传统检测方法、数值分类技术、细胞膜脂肪酸组成检测<sup>[4]</sup>、代谢产物的检测<sup>[5]</sup>、基于聚合酶链式反应(Polymerase chain reaction, PCR)的分子生物学检测<sup>[6-18]</sup>、傅里叶红外光谱检测<sup>[19]</sup>等,但这些方法对所需仪器设备以及设备操作人员技术要求较高,检测方法复杂,不利于浓缩苹果汁生产企业在加工生产环节对该菌进行有效、简便的检测和控制,且不同检测方法判定标准的差异会导致结果存在一定的差异,而基于PCR的分子生物学方法快速、简便,因此成为目前检测该菌的首选实验室方法。为了建立脂环酸芽孢杆菌快速检测方法,利用免疫胶体金的快速高效、灵敏准确、结果受外因素影响较少、安全简便、不需任何仪器和设备、成本低廉、所需试剂和样本量少、实验结果可长期保存等特点;从而有效地在生产环节中大大降低原料、主要生产工段、生产用水、超滤出的苹果清汁等环节的脂环酸芽孢杆菌的污染,以及时指导生产。本试验利用细胞融合技术,制备了单克隆抗体并对其特异性进行鉴

定,旨在建立抗脂环酸芽孢杆菌的杂交瘤细胞株;并对单克隆抗体的特性进行研究,为检测用胶体金试纸条的制备打下良好的基础,从而期望实现对脂环酸芽孢杆菌的快速检测,而利用其制备单克隆抗体以及制备胶体金免疫层析试纸检测浓缩果汁中 *A. acidoterrestris* 在国内外尚属首次。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌种

酸土脂环酸芽孢杆菌(*A. acidoterrestris*) ATCC49025、*A. acidocaldarius* (NCIMB11725)、*Bacillus cereus* (ATCC11778)、*Bacillus subtilis* (ATCC11774)、*A. cycloheptanicus* (ATCC49029)均购自美国标准生物品收藏中心(ATCC);分离菌株 *A. species* 及以上菌株均由甘肃出入境检验检疫局综合技术中心微生物实验室保存。BALB/c 小鼠,雌性,8-10周龄,体重18-20 g,购自兰州大学实验动物中心。SP2/0 骨髓瘤细胞购自中国科学院细胞库,由甘肃省医学科学研究院医学生物技术中心保存。

### 1.2 主要试剂和仪器

弗氏完全佐剂(FCA)、弗氏不完全佐剂(FIA)和HAT、HT选择培养基、TMB(四甲基联苯胺)、鼠源单克隆抗体亚类鉴定试剂盒, Sigma公司;DMEM细胞培养基, GIBCO公司;二甲基亚砜(DMSO)、PEG1000、Tween-20, 生工生物工程(上海)股份有限公司;羊抗鼠辣根过氧化物酶(HRP)标记的IgG酶标二抗,北京博奥森生物技术有限公司;胎牛血清,兰州民海生物工程有限公司;其它试剂均为进口分装或国产分析纯化学试剂。

恒温培养箱、低温冰箱、高压蒸汽灭菌器,日

本 Sanyo 电器公司; 酶标检测仪、酶联洗板机, 美国 BioTek 仪器有限公司; 精密移液器、高速离心机、蛋白浓度测定仪, 德国 Eppendorf 股份公司; 低温冷冻离心机, 德国 Sigma 公司; 倒置生物显微镜, 日本奥林帕斯光学工业株式会社; 光学显微镜, 日本 Nikon 公司; 电热恒温培养箱, 德国 Memmert 有限公司; 超净工作台, 苏州安泰空气技术有限公司; 电热恒温水浴锅, 美国 Polyscience 公司; 塑料薄膜封口机, 温州鹿城海达包装机械厂; pH 仪, 赛多利斯(上海)贸易有限公司; 空气压缩机, 天津第二仪表厂。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 抗原制备

免疫用抗原制备: 参考文献[20]的方法培养 *A. acidoterrestris* (ATCC49025), 重复洗涤 2 次后, 用生理盐水将该菌的浓度调整到  $10^9$  CFU/mL。

包被用抗原制备: 取部分洗脱好的菌液用超声波粉碎仪进行裂解。以 20 kHz 频率、150 W 的功率在冰浴中将细菌细胞破碎, 每 6 s 间隔 4 s, 总时间为 30 min。裂解后将液体 3 000 r/min 离心 10 min, 将上清与沉淀分别用 Eppendorf 管进行分装, 存于  $-20^{\circ}\text{C}$ 。

#### 1.3.2 筛选方法的建立

筛选方法采用间接 ELISA, 用方阵滴度法确定抗原包被浓度和酶稀释度。抗原分别做 1:1 000、1:2 000、1:4 000 的稀释; 酶标分别做 1:20 000、1:40 000 的稀释; 免疫小鼠多抗血清用样品稀释液从 40×起倍比稀释; HRP 标记的羊抗小鼠 IgG, 用酶稀释液分别做 1:20 000、1:40 000 稀释; 设阴性和空白对照; 以 450 nm 波长, 以空白对照调零, 读记各孔光密度值(OD), 凡  $P/N > 2$  为阳性结果( $P/N =$  待测孔 OD 值/阴性对照孔 OD 值)。

#### 1.3.3 动物免疫及效价测定

取 5 只 6-8 周龄体重 18 g 左右雌性的健康 BALB/c 小鼠, 免疫前 7 天卡介苗致敏小鼠 (0.1 mL/每只)。每次免疫间隔 3 周, 都较前一次免疫剂量加倍, 共 3 次。于第 3 次免疫 7 d 后以间接

ELISA 法检测小鼠抗体效价, 取效价最高的小鼠脾脏进行细胞融合。按照 1.3.2 确定的抗原包被浓度包被酶标板, 将免疫小鼠全血按照 100×、200×、400×-51 200×稀释, 即倍比稀释的方法进行间接 ELISA 法检测。

#### 1.3.4 杂交瘤细胞株的建立

对冻存的骨髓瘤细胞(SP2/0)进行复苏, 用含 20%胎牛血清的 DMEM 完全培养液进行传代培养, 且加入 1% 8-氮鸟嘌呤进行处理, 细胞处于对数生长期时即可用于细胞融合。制备饲养层细胞、免疫鼠脾细胞悬液, 与骨髓瘤细胞进行细胞融合<sup>[21]</sup>。当融合细胞覆盖孔底 20%-30%时, 用间接 ELISA 法对细胞培养上清进行检测, 对挑选出的阳性孔及时采用有限稀释法<sup>[22]</sup>进行克隆。每次克隆后第 9 天左右, 对克隆过的细胞上清用 ELISA 进行检测, 对所得的  $OD_{450}$  和对应的克隆数进行评价。选择克隆数少、 $OD_{450}$  高的阳性孔, 将其再次克隆。经 3-4 次克隆, 直到阳性率 100%。将细胞株转入 24 孔细胞培养板中继续生长, 待其适应后再转入细胞瓶中。细胞数量足够多时收集细胞进行小鼠腹水的制备。

#### 1.3.5 单克隆抗体腹水的制备

取 8-10 周龄 BALB/c 小鼠, 每只小鼠腹腔注射 0.5 mL 高压灭菌后的液体石蜡。7 d 后腹腔注入  $1 \times 10^6 - 5 \times 10^6$  个杂交瘤细胞。小鼠腹部明显膨大时, 无菌操作收集腹水, 1 000 r/min 离心 10 min 收集中间层液体即为单克隆抗体,  $-20^{\circ}\text{C}$  冻存备用。离心沉淀物用生理盐水悬浮后按  $1 \times 10^6 - 5 \times 10^6$  个细胞/只注射小鼠, 继续进行腹水的扩大化生产, 将传代过程中生长良好的细胞移入 2 mL 冻存管于液氮罐中冻存<sup>[23]</sup>。

#### 1.3.6 单抗生物学特性的鉴定

用间接 ELISA 方法对单克隆抗体细胞培养液上清和腹水进行效价测定, 亚类鉴定采用 Sigma 公司的免疫球蛋白标准亚类鉴定试剂盒进行鉴定, 杂交瘤细胞的染色体鉴定按照文献[22]进行。测定杂交瘤细胞在第 1 次到第 4 次克隆的  $OD_{450}$ 。同时测定小鼠第 1、2、3、4 代腹水的效价, 并将这些结果进行比较。

用 ELISA 叠加试验进行抗原位点分析(腹水和

细胞上清),在确定各 McAb 饱和值的基础上,在最适菌体抗原包被的酶标板内分别加入一种饱和浓度 McAb1 (100  $\mu\text{L}/\text{孔}$ ), 37  $^{\circ}\text{C}$  作用 30 min, 洗涤 4 次后加入另一种饱和浓度的 McAb2 (100  $\mu\text{L}/\text{孔}$ ), 同样孵育洗涤; 加入 1:1 000 稀释的羊抗小鼠 IgG-HRP (50  $\mu\text{L}/\text{孔}$ ), 同样孵育洗涤; 加入 TMB 底物溶液(100  $\mu\text{L}/\text{孔}$ )显色 10 min, 2 mol/L  $\text{H}_2\text{SO}_4$  终止反应, 测定  $OD_{450}$  值, 计算叠加率(AI)。按如下公式计算:  $AI=[2\times A_{(1+2)}\div(A_1+A_2)-1]\times 100\%$ 。公式中:  $A_1$  为 McAb1 的  $OD_{450}$  值;  $A_2$  为 McAb2 的  $OD_{450}$  值;  $A_{(1+2)}$  为 McAb1 叠加 McAb2 的  $OD_{450}$  值。  $AI > 50\%$  说明被测的两株单抗的抗原结合位点不同;  $AI < 50\%$  说明被测的两株单抗抗原结合位点相同; 且 AI 值越大, 抗原位点重叠的可能性越小。

用 *A. acidocaldarius* (NCIMB11725)、*Bacillus cereus* (ATCC11778)、*Bacillus subtilis* (ATCC11774)、*A. cycloheptanicus* (ATCC49029)、分离菌株 *A. species* 菌液包被酶标板, 将 1.3.5 收集到的腹水采用间接 ELISA 法测定单克隆抗体的特异性。

应用饱和硫酸铵盐析沉淀法及 Sephacryl-S300 凝胶柱, 对 3F7 和 9C4 单克隆抗体腹水(各 4 mL)

进行粗提和纯化, 收集各吸收峰的纯化产物, 用间接 ELISA 法测定它们的效价, 用蛋白测定仪测定各管产物的蛋白浓度, 并将腹水原液和纯化蛋白作 SDS-PAGE 电泳。采用已建立的间接 ELISA 法分别测定 3F7 和 9C4 各吸收峰的纯化产物, 并与纯化前的腹水、50% 饱和  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  沉淀和 45% 饱和  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  沉淀的蛋白效价进行比较。将纯化后腹水中 McAb 进行亲和常数的测定。

## 2 结果与分析

### 2.1 最适抗原浓度和酶稀释浓度

采用间接 ELISA 法筛选, 结果如表 1 所示。用方阵滴度法确定的抗原最佳包被浓度为 1:2 000, 最佳酶标二抗的稀释浓度为 1:20 000。

### 2.2 免疫小鼠抗体效价检测结果

在融合前 3 天用最佳包被浓度和最佳酶浓度对免疫小鼠进行抗体效价检测, 结果见表 2。3 次免疫 7 d 后小鼠尾血效价测定结果可知, 免疫小鼠中 1 号小鼠的效价最高, 大于 1:51 200, 2、3 号小鼠效价大于 1:12 800, 4、5 号小鼠的效价大于 1:25 600, 1 号和 3 号大于 1:25 600。选取效价最高的小鼠进行细胞融合, 融合用小鼠尾血的免疫效价均在 1:10 000 以上。

表 1 最适抗原浓度和酶稀释浓度测定结果

Table 1 The results of detection to the fit dilution rate of antigen and enzyme

酶浓度 Enzyme concentration	包被浓度 Inclusion concentration	阳性值 Positive value	阴性值 Negative value	空白 Blank
1:20 000	1:1 000	1.202	0.095	0.003
	1:2 000	1.311	0.026	0.001
	1:4 000	1.016	0.060	0.001
1:40 000	1:1 000	1.065	0.105	0.017
	1:2 000	0.884	0.141	0.008
	1:4 000	0.608	0.218	0.018

表 2 免疫小鼠抗体效价测定结果

Table 2 The results of detecting titers of the immunity class

小鼠 Mouse	1:100	1:200	1:400	1:800	1:1 600	1:3 200	1:6 400	1:12 800	1:25 600	1:51 200	阴性对照 Negative control	空白 Blank
1	1.415	1.139	1.255	1.250	1.318	1.110	0.712	0.605	0.476	0.260	0.017	0.000
2	0.918	0.876	0.649	0.568	0.475	0.315	0.196	0.266	0.169	0.094	-0.007	0.000
3	0.997	0.928	0.884	0.795	0.628	0.480	0.464	0.286	0.182	0.047	-0.001	0.000
4	1.259	0.984	0.993	0.731	0.656	0.752	0.404	0.431	0.272	0.117	-0.008	0.000
5	1.302	1.014	0.919	0.882	0.845	0.631	0.557	0.323	0.200	0.134	0.001	0.000

### 2.3 杂交瘤细胞株的建立

自 2013 年 12 月至今共融合 21 次, 融合采用免疫小鼠处死后取脾, 脾细胞计数后与 SP2/0 骨髓瘤细胞按 6.5:1 的比例在 50% PEG1000 作用下融合, 在 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 及饱和湿度下培养, 融合细胞先在 HAT 选择培养基中培养两周, 随后换为 HT 培养基。待孔内细胞长至约 1/2 满时, 取细胞上清液进行抗体检测, ELISA 方法筛选阳性。采用有限稀释法对阳性孔进行亚克隆, 经 3 次亚克隆使抗体阳性率达 100% 后建株。筛选出 3 株针对 49025 菌株能稳定分泌特异性抗体的杂交瘤细胞株, 分别命名为 3E12、3F7、9C4。3 株杂交瘤细胞每次克隆孔的检测值见表 3。

### 2.4 细胞培养液上清和腹水效价测定

采用间接 ELISA 法检测所获得的单克隆抗体细胞株的细胞上清和腹水效价。以 40 倍稀释的免疫小鼠血清作为阳性对照, 以 DMEM 细胞培养液、样品稀释液及健康小鼠血清作为阴性对照。以 *A. acidoterrestris* (ATCC49025) 菌原液作为抗原包被酶标板, 包被浓度为  $1.475 \times 10^6$  个/mL, 每孔 0.1 mL, 37 °C 2 h, 4 °C 过夜; 拍干后加入封闭液 37 °C 封闭 2 h, 拍干后进行检测。加入倍比稀释的细胞上清或腹水, 37 °C 孵育 0.5 h, 洗涤 3 次, 再加入 1:20 000 稀释的 HRP 标记的羊抗鼠抗体, 37 °C 孵育 0.5 h, 洗涤后加底物显色 10 min, 加终止液终止反应, 用酶标仪测定 OD<sub>450</sub> 值,  $P/N \geq 2.1$  为阳性, 否则为阴性, 结果如表 4 和 5 所示。

表 3 细胞株每次克隆的 OD<sub>450</sub> 值

Table 3 The results of each clone OD<sub>450</sub> values of the three hybridoma cell

克隆次数 Clone number	3E12 测定值 Value of 3E12	3F7 测定值 Value of 3F7	9C4 测定值 Value of 9C4	阳性对照 Positive control	阴性对照 Negative control
1	0.214	0.268	0.338	1.081	0.002
2	0.375	0.412	0.622	1.086	0.006
3	0.664	0.489	0.583	1.148	0.038

表 4 细胞培养上清效价测定表

Table 4 The results of detection titers to supernatants of each Mcb

细胞株 Hybridoma cell	80×	160×	320×	640×	1 280×	2 560×	5 120×	阴性对照 Negative control	空白对照 Blank control
3E12	0.664	0.329	0.089	0.029	0.018	0.025	0.017	0.015	0.000
3F7	0.489	0.250	0.272	0.232	0.219	0.169	0.093	0.019	0.000
9C4	0.583	0.386	0.299	0.241	0.176	0.155	0.069	0.021	0.000

表 5 腹水效价测定表

Table 5 The results of detection titers to ascites of each McAb

细胞株 Hybridoma cell	1×10 <sup>3</sup>	2×10 <sup>3</sup>	4×10 <sup>3</sup>	8×10 <sup>3</sup>	1.6×10 <sup>4</sup>	3.2×10 <sup>4</sup>	6.4×10 <sup>4</sup>	1.28×10 <sup>5</sup>	2.56×10 <sup>5</sup>	5.12×10 <sup>5</sup>	1×10 <sup>6</sup>
3E12	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
3F7	0.835	0.764	0.702	0.619	0.603	0.593	0.316	0.322	0.202	0.116	0.079
9C4	1.153	0.950	0.885	0.787	0.571	0.404	0.252	0.109	0.079	0.050	0.025
阳性对照 Positive control	0.937										
阴性对照 Negative control	0.021										
空白对照 Blank control	0.000										

注: 阴性对照为健康小鼠血清; /: 检测后无腹水效价。

Note: Negative controls were healthy mice serum; /: No ascites titer after detection.

## 2.5 抗体亚类鉴定

单克隆抗体亚类鉴定如表6所示;细胞培养上清、腹水效价测定及亚类鉴定结果总表,如表7所示。

由表7可知,3F7和9C4的抗体细胞上清效价和腹水效价较稳定,而3E12抗体细胞上清效价检测时跳孔严重,腹水无效价,这与其抗体亚类不同密切相关。

## 2.6 杂交瘤细胞的染色体计数结果

取对数生长期细胞于10%血清培养基中培养48–54 h,将秋水仙素加入培养液,使其终浓度为0.1  $\mu\text{g/mL}$ ,继续培养4–6 h。小心吹打贴壁细胞,1 000 r/min离心10 min后进行低渗处理。随后固定细胞、制片,用新鲜Giemsa染色液染色10–20 min,镜检观察记录并进行显微拍照。染色体计数结果发现:所得杂交瘤细胞的染色体数目处于98–100条之间,符合预期数量。杂交瘤细胞9C4和3F7染色体图如图1所示。

## 2.7 杂交瘤细胞稳定性分析结果

阳性杂交瘤细胞株建株后,将能够稳定分泌抗体的细胞转入24孔板培养,每五代收集一次细胞上清检测效价,连续传代两个月。同时测定小鼠各代腹水的效价,对比传代前后效价变化情况以分析该细胞株的稳定性。细胞上清的抗体效价

采用间接ELISA法测定,3F7、9C4两株单抗细胞上清经连续传代两个月后检测仍保持稳定。3F7和9C4两株单抗各代腹水效价基本保持稳定,可达10万以上,3E12亚类为IgM,腹水效价不稳定,因此未再次传代。3F7和9C4的I、II、III代腹水效价测定结果如表8所示,经多次传代后,效价基本保持不变。

## 2.8 单克隆抗体抗原间的位点分析结果

采用1.3.6中ELISA叠加实验,计算增值指数AI。3F7和9C4两株单抗AI=64.85%,增值指数大于50%,配对良好。

## 2.9 单克隆抗体的特异性分析结果

检测结果显示3F7抗体与*A. acidocaldarius* (NCIMB11725)、*Bacillus cereus* (ATCC11778)、*Bacillus subtilis* (ATCC11774)、*A. cycloheptanicus* (ATCC49029)无交叉反应,与分离菌株*A. species*有弱阳性反应;9C4抗体与上述5株菌株均无交叉反应。

## 2.10 腹水中单克隆抗体的纯化及检测

### 2.10.1 单克隆抗体的纯化结果

3E12因抗体亚类特性,无法获得高效价的腹水,因此未纯化。饱和硫酸铵沉淀的抗体经Sephacryl-S300凝胶柱分离纯化如图2A、B图所示。I峰为杂蛋白,II峰为目的蛋白。

表6 单克隆抗体亚类鉴定表

Table 6 The results of detection to each McAb sub-type of Ig

杂交瘤细胞株 Hybridoma cell line	IgG1	IgG2a	IgG2b	IgG3	IgA	IgM
3E12	–	–	–	–	–	+
3F7	+	–	–	–	–	–
9C4	+	–	–	–	–	–

表7 细胞培养上清、腹水效价测定及亚类鉴定结果总表

Table 7 The total detection results to each McAb titers of supernatants, ascites and sub-type of Ig

杂交瘤细胞株 Hybridoma cell line	细胞上清效价 Cell supernatant titer	腹水效价 Ascites titer	腹水效价(2代) Ascites titer2 (2 Generation)	腹水效价(3代) Ascites titer3 (2 Generation)	抗体亚类 Antibody subclass
3F7	1:2 560	1:2 $\times 10^5$	1:2 $\times 10^5$	1:2 $\times 10^5$	IgG <sub>1</sub>
9C4	1:1 280	1:1 $\times 10^5$	1:1 $\times 10^5$	1:1 $\times 10^5$	IgG <sub>1</sub>
3E12	1:320	/	/	/	IgM

注: /: 检测后无腹水效价。

Note: /: No ascites titer after detection.

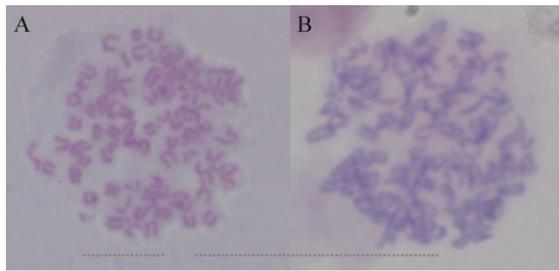


图1 杂交瘤细胞9C4 (A)和3F7 (B)染色体图片  
Figure 1 Chromosome maps of hybridoma cell line 9C4 (A) and 3F7 (B)

表8 3F7和9C4的I、II、III、IV代腹水效价结果  
Table 8 The results of detection titers to ascites of McAb 3F7 and 9C4 in several passages

腹水 Ascites	3F7	9C4
I代 Generation I	1:2×10 <sup>5</sup>	1:1×10 <sup>5</sup>
II代 Generation II	1:2×10 <sup>5</sup>	1:1×10 <sup>5</sup>
III代 Generation III	1:2×10 <sup>5</sup>	1:1×10 <sup>5</sup>

### 2.10.2 纯化物中蛋白含量测定结果

纯化物中蛋白含量测定结果如表9所示。

由表9可以看出3F7腹水效价为 $2 \times 10^5$ ，9C4腹水效价为 $1 \times 10^5$ ，再经50%饱和硫酸铵沉淀和45%饱和硫酸铵沉淀后，效价未变。经Sephacryl-S300凝胶柱分离纯化后1-4管中虽有蛋白但无效价，进一步证实纯化I峰为杂蛋白，纯化II峰为目的蛋白。纯化后蛋白以管6为峰值，效价基本保持不变。

### 2.10.3 单克隆抗体的SDS-PAGE电泳

纯化后的蛋白中以Ig重链为主，3F7和9C4单抗的重链为55 kD左右。从图3中可以看出经饱和硫酸铵沉淀后，样品中各种蛋白的含量无明显减少。粗提后的蛋白上S-300层析柱后通过SDS-PAGE分析可见，两处明显的蛋白带是重链，其他小量杂带应该是未被完全去除的腹水中的杂蛋白，但是与纯化前相比较，腹水中含量很高的主要杂蛋白已被去除，如图3所示。

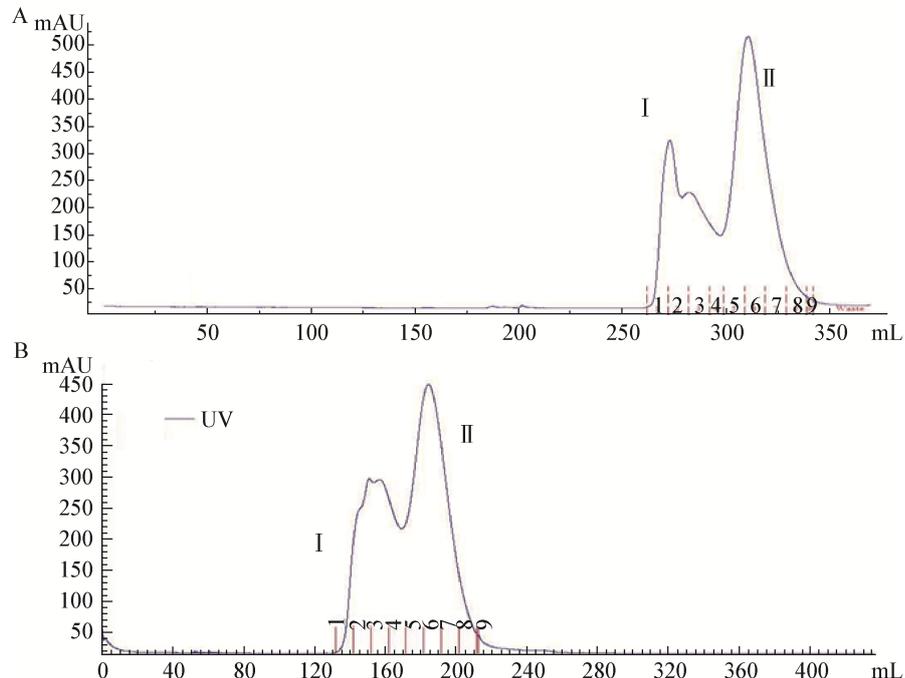


图2 单克隆抗体3F7 (A)和9C4 (B)分离纯化图  
Figure 2 The figure of McAb 3F7 (A) and 9C4 (B) purified

注：I峰为杂蛋白，II峰为目的蛋白。

Note: The peak I is the impurity protein and the peak II is the target protein.

表9 腹水和纯化蛋白的效价及蛋白浓度

Table 9 Titer and protein concentration of ascites and purified proteins

杂交瘤细胞株 Hybridoma cell line	1	2	3	4	5	6	7	50%饱和硫酸铵 50% saturated ammonium sulfate	45%饱和硫酸铵 45% saturated ammonium sulfate	腹水 Ascites
3F7 蛋白浓度(mg/mL) Protein concentration	0.29	0.45	0.31	0.27	0.84	1.36	1.19	沉淀	沉淀	杂质干扰
效价 Titer	/	/	/	/	$1 \times 10^5$	$2 \times 10^5$	$1.5 \times 10^5$	$2 \times 10^5$	$2 \times 10^5$	$2 \times 10^5$
9C4 蛋白浓度(mg/mL) Protein concentration	0.17	0.34	0.52	0.49	0.68	1.08	0.96	沉淀	沉淀	杂质干扰
效价 Titer	/	/	/	/	$0.5 \times 10^5$	$1 \times 10^5$	$1 \times 10^5$	$1 \times 10^5$	$1 \times 10^5$	$1 \times 10^5$

注: 1-7 为纯化后的蛋白收集管; /: 检测后无腹水效价。

Note: 1-7 are the purified protein collecting tubes; /: No ascites titer after detection.

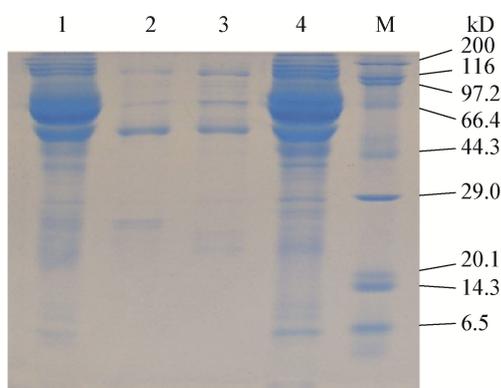


图3 SDS-PAGE 电泳图

Figure 3 The figure of SDS-PAGE

注: 1: 3F7 腹水; 2: 3F7 纯化抗体; 3: 9C4 纯化抗体; 4: 9C4 腹水。

Note: 1: 3F7 ascites; 2: 3F7 purified antibodies; 3: 9C4 purified antibodies; 4: 9C4 ascites.

#### 2.10.4 纯化物亲和常数测定结果

以纯化后的单抗作亲和力分析, 其亲和曲线如图4所示。根据测定曲线以及亲和常数的计算公式, 测得 3F7 的亲和常数为  $2.067 \times 10^6$ , 9C4 的亲和常数为  $3.76 \times 10^6$ 。

### 3 讨论

#### 3.1 抗原

抗酸土脂环酸芽孢杆菌(*A. acidoterrestris*)单克隆抗体的研制主要有两个思路, 一是用活菌或甲醛灭活的细菌直接免疫小鼠, 制备抗 *A. acidoterrestris* 特异性表面抗原的单克隆抗体; 二是提取 *A. acidocaldarius* 特有的天然蛋白或用基因工程的方法人工表达该蛋白, 以之免疫小鼠制备抗该特有

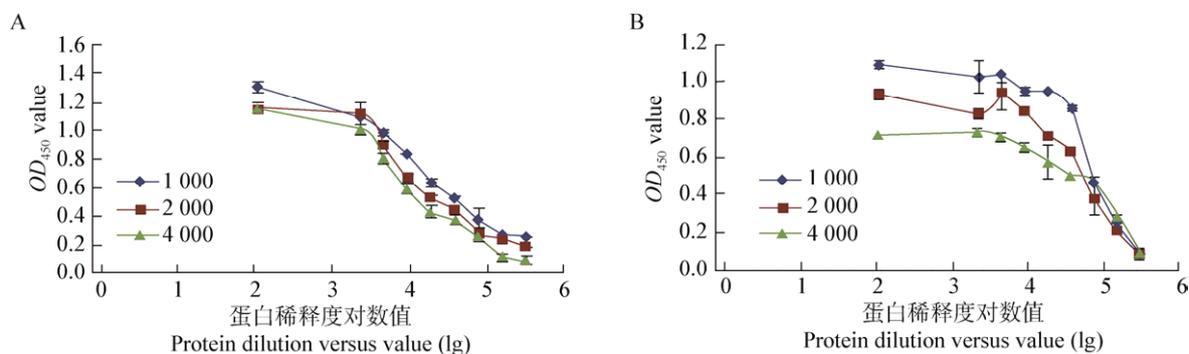


图4 3F7 (A)和 9C4 (B)纯化单抗亲和力曲线

Figure 4 The affinity curve of McAb 3F7 (A) and 9C4 (B) purified

蛋白的单克隆抗体。因为该菌对人体无害,而活菌免疫获得的抗体效价高,针对的免疫原最接近实际生产,因此本次实验选用活菌免疫小鼠制备单克隆抗体。

据报道<sup>[24]</sup>,在小鼠体内高剂量的抗原主要诱发的再次免疫应答为 IgM 类低亲和力抗体应答,而低剂量抗原主要诱发 IgG 类高亲和力抗体应答。本实验进行了 21 次融合,共得到 1 株 IgM 和 1 株 IgG 抗体,可能与所选择的抗原类型有关。本实验中采用 *A. acidoterrestris* 全菌免疫的小鼠脾细胞融合后筛选单克隆抗体,确定所制备的单抗与脂环酸芽孢杆菌属、芽孢杆菌属等亲缘关系接近的种属均不发生交叉反应。

抗原的免疫剂量依照给予动物的种类、免疫周期以及所要求的抗体特性等的不同而不同。免疫剂量过低,不能引起足够强的免疫刺激;免疫剂量过多,有可能引起免疫耐受。在一定的范围内,抗体的效价是随注射剂量的增加而增高。免疫剂量也与注射途径有关,并且两次注射的间隔时间应长短适宜,太短起不到再次反应的效果,太长则失去了前一次激发的敏感作用。

## 3.2 实验动物选择和动物免疫

### 3.2.1 实验动物的选择

免疫小鼠的选择多采用 BALB/c 小鼠。由于实验动物对免疫应答的个体差异,免疫时应同时选用数只动物进行免疫。本试验先后共进行 5 组,每组 5 只健康 BALB/c 小鼠进行免疫。单克隆抗体的制备多采用动物体内诱生法。由于绝大多数杂交瘤细胞是由 BALB/c 小鼠的骨髓瘤细胞与同一品的免疫小鼠脾细胞融合产生的,因此选取最适周龄的 BALB/c 鼠对于大量制备单抗至关重要。焦艳等<sup>[25]</sup>认为选择 11-13 周龄小鼠制备单抗比较合适,其腹水诱生量平均为 2.6 mL 左右。本实验中选取 8-10 周龄的 BALB/c 小鼠,平均腹水诱生量为 5 mL。从平均腹水诱生量来看,选择 8-10 周龄的 BALB/c 小鼠可以满足生产制备要求。

### 3.2.2 免疫方法

许多实验室采取了脾内免疫、腹腔植入、淋巴

结注射和足垫注射等方法。目的在于减少抗原用量和注射次数,缩短免疫周期,加速抗体成熟,本实验中采用了皮下注射免疫和足垫免疫同时进行。从小鼠免疫效价方面来看,该免疫方法的效果非常好,第二次免疫后免疫效价都在 1 万以上,而且还可以减少抗原的用量。

最后一次加强免疫与前一次最少应间隔 3 周,以保证绝大多数循环抗体自血流中消除(血清抗体浓度在免疫接种后 14 d 开始下降),如果循环抗体滴度高,那么这种抗体会与抗原结合,降低加强免疫效果。加强免疫的目的:一是增强免疫反应;二是使所引发的这种最佳反应状态与细胞融合同步。

## 3.3 细胞融合

细胞融合是杂交瘤技术的中心环节。

(1) 选择恰当的融合时间。有人认为处在转化时期的 B 淋巴细胞更易于融合,虽然免疫以后 7-8 d 是抗体产生的高峰时期,但形成有活力的杂交瘤细胞的可能反而减少,因此本试验在加强免疫后的第 3 天取免疫小鼠的脾脏做细胞融合。

(2) 选择合适的细胞融合剂。不同批号的 PEG 即使分子量相同,但融合率却有明显差异,选用时必须注意。本实验选择对细胞损伤较小的高纯度低分子量的 PEG1000。

(3) 融合细胞的状态对是否能获得阳性杂交瘤细胞的影响很大。本实验中 SP2/0 细胞为自己保存传代,在细胞融合前对 SP2/0 细胞进行了 8-AG 选择培养和 BALB/c 小鼠腹腔传代恢复,基本达到了去除细胞返祖和增强细胞活力的目的。

(4) 在融合过程中,操作尽量轻柔,以提高细胞的融合效果。

另外,在细胞融合过程中细致的实验准备、快速轻柔的实验操作和严格的无菌意识同样是获得融合成功的重要条件。

## 3.4 饲养细胞

在体外的细胞培养中,单个的或数量很少的细胞不易生存与繁殖,必需加入饲养细胞才能使其更好的生长繁殖。许多种类动物细胞都可以作饲养

细胞, 如正常的脾细胞、胸腺细胞、腹腔渗出细胞等。本试验选用腹腔渗出细胞, 其中主要是巨噬细胞和淋巴细胞。应用腹腔渗出细胞的好处是: 一方面可以用作饲养细胞, 另一方面巨噬细胞可以吞噬死亡的细胞和细胞碎片, 为融合细胞的生长营造良好的环境。在制备饲养细胞时, 切忌针头刺破动物的消化器官, 否则细胞可能会有严重污染。

### 3.5 血清

一般说来, 只有 1/5 的 FBS 适合杂交瘤培养, 因此应选择高质量的 FBS。将受试批次的 FBS 制成 10% 的培养基, 培养骨髓瘤细胞。好的批次应可支持至少 20 个细胞/孔的生长, 如果每孔 100 个细胞都生长不好的批次不应使用。FBS 在使用前应在 56 °C 作用 30 min, 灭活抑制杂交瘤细胞生长的物质。

另外, 所用血清和培养基应经常检查是否有支原体污染。大多数支原体在胞浆或胞浆膜内生长, 能通过 0.22 μm 标准滤膜, 且通常不引起培养液混浊和 pH 改变, 在普通显微镜下不易被观察到。支原体污染的培养液应弃用。

### 3.6 杂交瘤细胞的克隆

经过抗体测定的阳性孔可以扩大培养进行克隆, 以得到可分泌抗体的单个细胞的后代。克隆的时间一般来说越早越好。因为在这个时期各种杂交瘤细胞生长旺盛, 互相争夺营养和空间, 以至于使产生指定抗体的细胞有被淹没和淘汰的可能。但克隆时间也不宜太早, 太早细胞性状不稳定, 数量少也易丢失。克隆化的阳性杂交瘤细胞经过一段时期培养之后, 也还会因为细胞突变或特定染色体的丢失, 使部分细胞丧失产生抗体的能力, 所以需要再次或多次克隆化培养。克隆化次数的多少由分泌能力强弱和抗原的免疫性强弱而决定。一般来说, 免疫性强的抗原克隆次数可能少一些, 但至少需要 3-4 次克隆后才能稳定。本试验中一般都是经过 5 次克隆后再进行扩大培养。当获得产生所需的单克隆抗体的杂交瘤细胞后, 必需将一部分杂交瘤细

胞保存, 否则在连续传代的过程中, 可能产生突变或染色体的漂移以至丧失固有特性或丢失产生抗体的特性。

### 3.7 单抗的纯化

不同类型的抗体因其理化性质不同所以需要采用不同的纯化方法。陆学东等<sup>[26]</sup>报道, 硫酸铵法、辛酸二步法以及离子交换柱层析法 3 种方法中, 硫酸铵法单抗回收率最高(39.69%), 但纯度较差, 不能完全去除白蛋白, 对其它杂蛋白无去除作用; 辛酸二步法单抗回收率较低(22.74%), 但纯化的单抗纯度较高, 可有效地去除白蛋白, 对其它杂蛋白也有一定的去除作用; 离子交换柱层析法回收率为 30.22%, 对单抗的纯化程度最高, 在纯化物中几乎无白蛋白和杂蛋白存在。3 种纯化方法对单抗的活性均无明显影响。

本实验中, 先采用饱和硫酸铵盐析沉淀法对腹水进行粗提, 然后过 S-300 层析柱使回收的单抗有较高的纯度, 以便于进行下一步的分析及鉴定。通过 SDS-PAGE 分析可见明显的蛋白带是重链, 其它小量杂带应该是未被完全去除的腹水中的杂蛋白, 但是与纯化前比较, 腹水中含量很高的主要杂蛋白被去除了, 说明这种纯化方法是可行的。

## 4 结论

本实验运用杂交瘤细胞技术, 以 *A. acidoterrestris* (ATCC49025) 免疫 BALB/c 小鼠, 用建立的间接 ELISA 方法筛选杂交瘤细胞, 得到了 3 株能稳定分泌 *A. acidocaldarius* 抗体的杂交瘤细胞株, 其中两株为 IgG<sub>1</sub> 亚类。

对所得到的两株 IgG<sub>1</sub> 做生物学特性的鉴定, 结果表明两株单抗针对不同的抗原位点; 多次传代后稳定性基本保持不变; 特异性实验表明两株单抗均不与 *A. acidocaldarius* (NCIMB11725)、*Bacillus cereus* (ATCC11778)、*Bacillus subtilis* (ATCC11774)、*A. cycloheptanicus* (ATCC49029) 等发生交叉反应, 说明具有较强的特异性, 所以这两株单抗可以进一步用于检测胶体金试纸条的研制。

## REFERENCES

- [1] Cerny G, Hennlich W, Poralla K. Spoilage of fruit juice by bacilli: isolation and characterization of the spoiling microorganisms[J]. Skip to Main Content Skip to Sections, 1984, 179(3): 224-227
- [2] Wisotzkey JD, Jurtshuk PJ, Fox GE, et al. Comparative sequence analyses on the 16S rRNA (rRNA) of *Bacillus acidocaldarius*, *Bacillus acidoterrestris*, and *Bacillus cycloheptanicus* and proposal for creation of a new genus, *Alicyclobacillus* gen. nov.[J]. International Journal of Systematic Bacteriology, 1992, 42(2): 263-269
- [3] Imperio T, Viti C, Marri L. *Alicyclobacillus pohliae* sp. nov., a thermophilic, endospore-forming bacterium isolated from geothermal soil of the north-west slope of Mount Melbourne (Antarctica)[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2008, 58(1): 221-225
- [4] Goto K, Matsubara H, Mochida K, et al. *Alicyclobacillus herbarius* sp. nov., a novel bacterium containing  $\omega$ -cycloheptane fatty acids, isolated from herbal tea[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2002, 52(1): 109-113
- [5] Yang K, Yue TL, Yuan YH, et al. Study on the metabolic of a local *Alicyclobacillus acidoterrestris* isolated from apple juice using headspace SPME-GC-MS technical[J]. Academic Periodical of Farm Products Processing, 2007(3): 8-10,17 (in Chinese)  
杨康, 岳田利, 袁亚宏, 等. 利用顶空 SPME-GC-MS 联用技术检测苹果汁中嗜酸耐热菌代谢产物的研究[J]. 农产品加工, 2007(3): 8-10,17
- [6] Gouws PA, Gie L, Pretorius A. Isolation and identification of *Alicyclobacillus acidocaldarius* by 16S rDNA from mango juice and concentrate[J]. International Journal of Food Science & Technology, 2005, 40(7): 789-792
- [7] Chen SQ, Chen WF, Hu XS, et al. Rapid identification of *Alicyclobacillus* isolated from concentrated apple juice processing by 16S rDNA PCR-RFLP[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2006, 6(2): 99-102 (in Chinese)  
陈世琼, 陈文峰, 胡小松, 等. 16S rDNA PCR-RFLP 法快速鉴定分离自浓缩苹果汁生产线的脂环酸芽孢杆菌[J]. 中国食品学报, 2006, 6(2): 99-102
- [8] Goto K, Mochida K, Asahara M, et al. Application of the hypervariable region of the 16S rDNA sequence as an index for the rapid identification of species in the genus *Alicyclobacillus*[J]. The Journal of General and Applied Microbiology, 2002, 48(5): 243-250
- [9] Connor CJ, Luo HL, Brian B, et al. Development of a real-time PCR-based system targeting the 16S rRNA gene sequence for rapid detection of *Alicyclobacillus* spp. in juice products[J]. International Journal of Food Microbiology, 2005, 99(3): 229-235
- [10] Yamazaki K, Teduka H, Inoue N, et al. Specific primers for detection of *Alicyclobacillus acidoterrestris* by RT-PCR[J]. Letters in Applied Microbiology, 1996, 23(5): 350-354
- [11] Yamazaki K, Teduka H, Shinano H. Isolation and identification of *Alicyclobacillus acidoterrestris* from acidic beverages[J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 1996, 60(3): 543-545
- [12] Eguiluz KIB, Salazar-Banda GR, Funes-Huacca ME, et al. Sequence-specific electrochemical detection of *Alicyclobacillus acidoterrestris* DNA using electroconductive polymer-modified fluorine tin oxide electrodes[J]. Analyst, 2009, 134(2): 314-319
- [13] Li JK, Feng ZP, Qiu NX. Optimization and establishment of competitively quantitative PCR system for the detection *Alicyclobacillus acidoterrestris*[J]. Chinese Agricultural Science, 2006, 39(2): 375-381 (in Chinese)  
李建科, 冯再平, 仇农学. 耐热菌的竞争定量 PCR 检测方法优化与建立[J]. 中国农业科学, 2006, 39(2): 375-381
- [14] Wang F, Li JK, Liu HX, et al. Preparation and purification of polyclonal antibody against *Alicyclobacillus acidoterrestris* from apple juice concentrate[J]. Food and Fermentation Industry, 2009, 35(4):33-37 (in Chinese)  
王峰, 李建科, 刘海霞, 等. 苹果浓缩汁中嗜酸耐热菌多克隆抗体的制备及纯化[J]. 食品与发酵工业, 2009, 35(4): 33-37
- [15] Mast S, Dietrich R, Didier A, et al. Development of a polyclonal antibody-based sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of spores of *Alicyclobacillus acidoterrestris* in various fruit juices[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2016, 64(2): 497-504
- [16] Cai R, Wang Z, Yuan Y, et al. Detection of *Alicyclobacillus* spp. in fruit juice by combination of immunomagnetic separation and a SYBR green I real-time PCR assay[J]. PLoS One, 2015, 11(1): e0141049
- [17] Wang ZL, Cai R, Yuan YH, et al. An immunomagnetic separation-real-time PCR system for the detection of *Alicyclobacillus acidoterrestris* in fruit products[J]. International Journal of Food Microbiology, 2014, 175: 30-35
- [18] Wang ZL, Wang J, Yue TL, et al. Immunomagnetic separation combined with polymerase chain reaction for the detection of *Alicyclobacillus acidoterrestris* in apple juice[J]. PLoS One, 2013, 8(12): e82376
- [19] Lin M, Al-Holy M, Chang SS, et al. Rapid discrimination of *Alicyclobacillus* strains in apple juice by Fourier transform infrared spectroscopy[J]. International Journal of Food Microbiology, 2005, 105(3): 369-376
- [20] Zhang YX, Wen ZH, Li R. Detection and identification of *Alicyclobacillus* by use of PCR and automated ribotyping[J]. Food Science, 2013, 34(16): 200-205 (in Chinese)  
张宇霞, 文朝慧, 李儒. PCR 及核糖体基因分型法检测和鉴定脂环酸芽孢杆菌[J]. 食品科学, 2013, 34(16): 200-205
- [21] Xu ZK. Practical Monoclonal Antibody Technology[M]. Xi'an: Shaanxi Science and Technology Publishing House, 1996: 1-26 (in Chinese)  
徐志凯. 实用单克隆抗体技术[M]. 西安: 陕西科技技术出版社, 1996: 1-26
- [22] Fred RI. Animal Cell Culture[M]. Zhang JB, Xu CS, Trans. Beijing: Science Press, 2008: 287-291 (in Chinese)  
弗雷谢尼 RI. 动物细胞培养[M]. 章静波, 徐存拴, 译. 北京: 科学出版社, 2008: 287-291

- [23] Ma XL, Song MX, Huang B, et al. Development and application of monoclonal antibodies specific to avian influenza virus[J]. Poultry Science, 2005(6): 11-13 (in Chinese)  
马秀丽, 宋敏训, 黄兵, 等. H<sub>5</sub> 亚型禽流感单克隆抗体的研制及应用[J]. 家禽科学, 2005(6): 11-13
- [24] Oche PW, Winter N, Triccas JA, et al. Expression of mycobacterium tuberculosis MPT64 in recombinant Myco. smegmatic: purification, immunogenicity and application to skin tests for tuberculosis[J]. Clinical and Experimental Immunology, 1996, 103(2): 226-232
- [25] Jiao Y, Gao KJ, Zhu QX, et al. Comparison of the production of monoclonal antibodies with different ages in BALB/c mice[J]. Chinese Journal of Biological, 2006, 19(3): 271 (in Chinese)  
焦艳, 高克谨, 朱庆宣, 等. 不同周龄 BALB/c 小鼠制备单抗的产量比较[J]. 中国生物制品学杂志, 2006, 19(3): 271
- [26] Lu XD, Sun LK, Chen Y, et al. Purification of monoclonal antibody against TB4 antigen of mycobacterium tuberculosis H<sub>37</sub>Rv strain[J]. Journal of Northwestern University, 1999, 29(5): 422-425 (in Chinese)  
陆学东, 孙连魁, 陈英, 等. 人型结核杆菌 H<sub>37</sub>Rv 菌株体特异性抗原 TB4 单克隆抗体的纯化[J]. 西北大学学报, 1999, 29(5): 422-425

(上接 p.313)

## 征 稿 简 则

3.5 参考文献: 参考文献按文内引用的先后顺序排序编码, 未公开发表的资料请勿引用。我刊参考文献需要注明著者(文献作者不超过 3 人时全部列出, 多于 3 人时列出前 3 人, 后加“等”或“et al.”, 作者姓前、名后, 名字之间用逗号隔开)、文献名、刊名、年卷期及页码。国外期刊名必须写完整, 不用缩写, 不用斜体。参考文献数量不限。

参考文献格式举例:

- [1] Marcella C, Claudia E, Pier GR, et al. Oxidation of cystine to cysteic acid in proteins by peroxyacids as monitored by immobilized pH gradients[J]. Electrophoresis, 1991, 12(5): 376-377
- [2] Wang BJ, Liu SJ. Perspectives on the cultivability of environmental microorganisms[J]. Microbiology China, 2013, 40(1): 6-17 (in Chinese)  
王保军, 刘双江. 环境微生物培养新技术的研究进展[J]. 微生物学通报, 2013, 40(1): 6-17
- [3] Shen T, Wang JY. Biochemistry[M]. Beijing: Higher Education Press, 1990: 87 (in Chinese)  
沈同, 王镜岩. 生物化学[M]. 北京: 高等教育出版社, 1990: 87
- [4] Liu X. Diversity and temporal-spatial variability of sediment bacterial communities in Jiaozhou Bay[D]. Qingdao: Doctoral Dissertation of Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, 2010 (in Chinese)  
刘欣. 胶州湾沉积物细菌多样性及菌群时空分布规律[D]. 青岛: 中国科学院海洋研究所博士学位论文, 2010

## 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: (1) 本刊只接受未公开发表的文章, 请勿一稿两投。(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。(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) 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: (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, 作者登录我刊系统也可查看。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录我刊系统上传修改稿, 编辑部复审通过后将发出稿件录用通知单, 稿件按照投稿先后排队发表。(2) 本刊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。

## 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 联系方式

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>