

人骨保护素(OPG)重组腺病毒的制备及其生物活性研究

刘继中¹ 纪宗玲^{2*} 胡蕴玉¹ 陈苏民² 朱帮福¹ 杨彤涛³

(第四军医大学¹ 西京医院全军骨科研究所² 生物化学与分子生物学教研室³ 唐都医院骨科 西安 710032)

摘要 采用 RT-PCR 法得到人 OPG 的编码区 cDNA,克隆至穿梭质粒 pShuttle,构建重组有 OPG 编码区 cDNA 的腺病毒 DNA,经 Pac I 酶切线性化,在脂质体介导下转染 HEK293 细胞,制备重组腺病毒并测定病毒滴度约为 $5 \times 10^6 \sim 1.5 \times 10^7$ pfu/mL。体外感染小鼠成肌细胞 C2C12,Western blot 及 ELISA 检测证实有 OPG 蛋白的表达,并可在细胞培养上清中持续表达 6 周。感染 OPG 重组腺病毒的 C2C12 细胞生长状态良好,细胞周期无明显变化。将重组腺病毒加入体外培养的小鼠骨髓细胞的培养基中,诱导形成的破骨细胞数量及在象牙片上形成的吸收陷窝的数量显著减少($P < 0.01$)。

关键词 骨保护素,重组腺病毒,破骨细胞

中图分类号 Q78 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2003)01-0035-06

骨保护素(Osteoprotegerin, OPG),或称破骨细胞生成抑制因子(Osteoclastogenesis inhibitory factor, OCIF),是含有 401 个氨基酸残基的肝素结合分泌型糖蛋白,其结构与 TNF 受体(TNFR)超家族的成员具有高度的保守性。实验表明 OPG 能够在全身或局部通过抑制破骨细胞分化、抑制成熟破骨细胞的活性并诱导其凋亡等来增加骨量,OPG 基因敲除小鼠成年后表现为严重的骨质疏松,而切除卵巢后的骨质疏松小鼠注射重组人 OPG 两周后,出现了明显的骨矿物质密度上升和骨量增加^[1,2]。OPG 与其配体 OPGI(Osteoprotegerin ligand)之间的竞争性结合被认为是破骨细胞分化、增殖、凋亡及发挥生理作用过程中最重要的调控机制,提示其在治疗骨质疏松、癌症骨转移、高钙血症及 Paget's 病等方面具有广阔的应用前景。本实验构建了表达人 OPG 的复制缺陷性腺病毒,证实其在体外具有抑制破骨细胞分化和骨吸收的活性,并研究了病毒感染小鼠成肌细胞后 OPG 蛋白分泌表达的时限及对细胞生长的影响。

1 材料和方法

1.1 材料

腺病毒表达系统 Adeno-XTM及传代次数在 20 代以内的 HEK293 细胞(CLONTECH),羊抗人 OPG 多克隆抗体及碱性磷酸酶标记的驴抗羊 IgG(SANTA

CRUZ),抗酒石酸酸性磷酸酶(TRAP)染色试剂盒、 $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 及地塞米松(Sigma), α -MEM、转染试剂阳离子脂质体 Lipofectamine Reagent 2000(Gibco BRL),限制性核酸内切酶、T4 DNA 连接酶、T4 DNA 聚合酶等(NEB),小量质粒提取试剂盒(QIAGEN),原核表达的 OPG-MBP 融合蛋白为本实验室制备并保存 6~8 周龄 BABL/c 雄性小鼠由本校动物中心提供。

1.2 方法

1.2.1 携带人 BMP-2 基因的穿梭质粒的构建 设计一对针对人 OPG 编码区全长 cDNA 的引物 P₁、P₂,两引物的 5'端分别设计限制酶酶切位点 Xba I 和 Nhe I。提取人骨肉瘤细胞系 MG63 细胞的总 RNA,以 oligo(dT)为引物合成 cDNA 第一链。取 2mL 逆转录产物为模板,用引物 P₁、P₂ 进行 PCR,将 PCR 产物克隆入用 Sma I 切开的 pUC19 质粒中,构建重组质粒 pUC19-OPG,酶切鉴定后进行序列测定。

穿梭质粒 pShuttle 和重组质粒 pUC19-OPG 分别经 Xba I 和 Nhe I 酶切后,按常规方法构建重组穿梭质粒 pShuttle-OPG,分别经 EcoR I 和 Hind III 单酶切鉴定。

1.2.2 重组人 OPG 基因的腺病毒 DNA 的构建及鉴定 按腺病毒表达系统 Adeno-XTM试剂盒操作手册构建重组人 OPG 基因的腺病毒 DNA(命名为 Adeno-

OPG), 并去除自连的载体 DNA。

重组有 OPG 编码区基因的腺病毒 DNA 约有 34kb, 阳性克隆的鉴定采用 PCR 法。以重组腺病毒 DNA 为模板, 以试剂盒提供的鉴定引物 P_F 、 P_R 作 PCR, 根据说明书提供的反应条件, 阳性克隆应能得到大小为 370bp 的条带。而以针对 OPG 编码区基因的引物 P_1 、 P_2 作 PCR, 阳性克隆应能得到大小约为 1200bp 的条带。

1.2.3 人 OPG 重组腺病毒的制备及滴度测定 5 μ g Adeno-OPG 质粒, 37 $^{\circ}$ C 下经 *Pac1* 酶切 8h 进行线性化, 抽提后溶于 10 μ L TE 中, 转染 HEK293 细胞。一般在常规培养 1 周以后, 细胞出现病变 (Cytopathic effect, CPE), 表现为细胞变圆, 部分细胞脱壁。当 50% 的细胞脱壁后, 收集细胞 (勿使用胰蛋白酶), 细胞沉淀重悬于 500 μ L 的 PBS 缓冲液中。经 -70 $^{\circ}$ C 到 37 $^{\circ}$ C 反复冻融 3 次以上, 离心, 上清中即含有重组病毒颗粒, 将第一次获得的腺病毒液命名为“初次扩增产物”。取 250 μ L“初次扩增产物”直接加入生长在直径 60mm 培养板中的 HEK293 细胞的培养液中, 细胞一般在感染 1 d 后培养基变黄, 2~3 d 50% 以上的细胞脱壁。同法收集细胞, 反复冻融制备含有病毒的 PBS 液。重复进行上述实验以制备足够量的重组病毒。

以制备的病毒液为模板, 以试剂盒提供的鉴定引物 P_F 、 P_R 作 PCR, 根据说明书提供的反应条件, 若制备的重组腺病毒含有人 OPG 基因, 则应能得到大小为 370bp 的条带。

应用空斑形成试验测定病毒滴度。病毒的滴度以每毫升病毒液内的空斑形成单位 (Plaque forming units, pfu) 表示, 根据公式计算:

$$\frac{\text{空斑数量}}{\text{病毒稀释倍数} \times \text{病毒液体积}}$$

1.2.4 人 OPG 重组腺病毒体外感染小鼠成肌细胞 C2C12 6 孔细胞培养板中, 小鼠成肌细胞 C2C12 在含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基中培养至 80% 汇片, 细胞计数后, 移除培养液, 加入 1mL 经培养液稀释的病毒液, 以每个细胞加入约 10 个 pfu 的病毒计算。轻轻敲击培养板的底部使液体均匀覆盖所有细胞。继续培养 48h, 离心收集 2×10^5 个细胞, 裂解后制备样品进行 10% SDS-PAGE 电泳, 按常规进行 Western blot, 一抗为羊抗人 OPG 的多克隆抗体 (1:500), 二抗为碱性磷酸酶标记的驴抗羊 IgG (1:400), 显色液为 NBT/BCIP。

应用 ELISA 测试 OPG 在 C2C12 细胞中的分泌

表达时限。在 6 孔培养板中培养 C2C12 细胞, 重组腺病毒感染 24 h 后, 加入完全培养基, 此后转入 25cm 的培养瓶中培养, 分别在感染后 2、4、6、8 周收集培养上清和细胞。在收集细胞 2 d 前更换培养基, 改用含 0.5% 胎牛血清的培养液培养 48h 后, 收集上清, 常规方法进行 ELISA 检测, 以未被重组病毒感染的 C2C12 培养上清作为阴性对照, 以原核表达的 OPG-MBP 融合蛋白作为阳性对照。同法收集细胞进行流式细胞仪检测。

1.2.5 小鼠破骨细胞样细胞的培养及骨吸收陷窝形成实验 参照 Takahashi 等的方法并稍做改动^[3,4]。6~8 周龄 BABL/C 雄性小鼠 12 只, 颈椎脱臼处死后浸泡于 75% 酒精中 3min, 分离股骨、胫骨, 剪除骨干两端骨质显露骨髓腔, 将骨髓细胞自骨干一端冲出, α -MEM 洗 2 遍。吸取少许细胞悬浮液, 5% 的草酸溶液溶解混杂的红细胞, 显微镜下细胞计数。直径 4mm、厚约 150 μ m 的象牙片浸泡于 75% 酒精中过夜除菌, 以消毒的铅笔在一侧标记以便识别象牙片方向。象牙片与直径 4mm 的玻片置于 96 孔细胞培养板中, 先加入培养液 0.1 mL, 温育 2h 后吸出培养基, 每孔加入鼠骨髓细胞悬液 0.1 mL (细胞数为 1×10^5 个)。培养 2h 后, 将象牙片或玻片取出, 浸入 α -MEM 中稍稍清洗去除红细胞, 再转入 24 孔细胞培养板内, 每孔加入 3 个象牙片或玻片。加入 0.5mL 完全培养基。特别注意在此过程及此后的换培养液的过程中使象牙片或玻片附着细胞的一面向上, 如颠倒后将导致细胞死亡。

1 α 25(OH) $_2$ D $_3$ 、地塞米松在纯酒精中溶解后以适量 α -MEM 稀释, 加入培养液中至终浓度分别为 2×10^{-8} mol/L、 1×10^{-7} mol/L。实验组加入人 OPG 重组腺病毒液 50 μ L (含病毒约 7×10^5 pfu), 对照组加入 PBS 缓冲液 50 μ L。每组 8 个复孔, 每个培养孔内各有 3 个象牙片或玻片。单个培养孔内的液体量为 1 mL。每 2d 换液 1 次。全部试验重复 3 次。

1.2.6 破骨细胞样细胞的 TRAP 染色及骨吸收功能检测 培养 14d 后, 盖玻片经 PBS 溶液洗 3 次, 冷丙酮固定 15min, 空气中干燥, 按说明书行抗酒石酸性磷酸酶 (TRAP) 染色。3 个以上细胞核、染为红色的为破骨细胞样细胞。光学显微镜下计算每个玻片上 TRAP 染色阳性的多核细胞数。部分切片行 HE 染色。象牙片在 0.25mol/L 氨水中超声 3min 去除附着的细胞, PBS 溶液洗, 0.1% 甲苯胺蓝溶液染色 5min, 1.0% 盐酸酒精分化, 丙酮脱水, 空气中干燥, 相差显微镜下观察象牙片上骨吸收窝形成情况。

并计算每个象牙片上骨吸收陷窝的数量。

1.2.7 统计学处理 :各组 TRAP 染色阳性细胞及骨吸收陷窝的数以均数 \pm 标准差表示,用配对 *t* 检验进行分析, $P < 0.05$ 为差异显著。

2 结果

2.1 人 OPG cDNA 的克隆及穿梭质粒的构建

提取的骨肉瘤 MG63 细胞总 RNA 经 RT-PCR 扩增后得到约 1.2 kb 的片段,PCR 产物克隆入质粒 pUC19 的 *Sma* I 位点,酶切鉴定正确(图略)。序列分析的结果表明,本实验所克隆的 OPG 编码区基因的核苷酸序列与文献报道^[1,3]的完全一致。将 OPG 全长 cDNA 克隆入穿梭质粒 pShuttle,构建重组有人 OPG 编码区基因的重组质粒 pShuttle-OPG(图 1)。

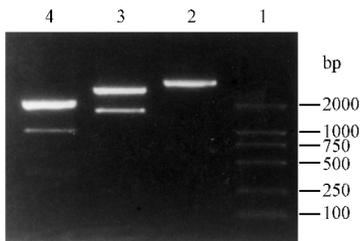


图 1 pShuttle-OPG 重组质粒的酶切鉴定

Fig.1 Identification of recombinant

plasmid pShuttle-OPG

1. DL2000 DNA markers ;
2. Uncut plasmid pShuttle-OPG ;
3. pShuttle-OPG / *Eco*R I ;
4. pShuttle-OPG / *Hind* III

2.2 人 OPG 重组腺病毒的制备与鉴定

质粒 pShuttle-OPG 经 *Pi-Sce* I 和 *I-Ceu* I 双酶切后得到的目的片段克隆入经 *Pi-Sce* I 和 *I-Ceu* I 切过的开环腺病毒 DNA 中。采用 PCR 法进行鉴定,阳性克隆扩增得到大小约为 1200bp 的条带(图 2)。

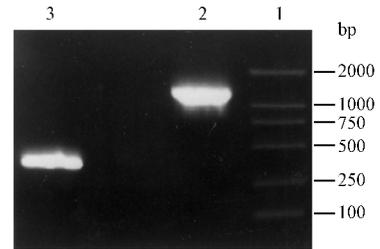


图 2 OPG 重组腺病毒 DNA 的 PCR 鉴定

Fig.2 PCR identification of recombinant adenovirus

1. DL2000 DNA markers ;
2. PCR with primer P_1/P_2 ;
3. PCR with primer P_F/P_R (370bp)

Adeno-OPG 质粒经 *Pac*1 线性化后转染 HEK293 细胞,1 周以后细胞出现 CPE(图 3)。将制备的病毒液感染 HEK293 细胞,一般 2~3 d 后细胞出现 CPE。空斑形成试验测定,病毒滴度为 $5 \times 10^6 \sim 1.5 \times 10^7$ pfu/mL。以病毒液为模板,以试剂盒提供的鉴定引物 P_F/P_R 作 PCR,根据说明书提供的反应条件,结果得到大小为 370bp 的条带(图略),证实制备的腺病毒已重组有人 OPG 编码区基因。

2.3 腺病毒介导的人 OPG 在 C2C12 细胞中的表达及对细胞生长的影响

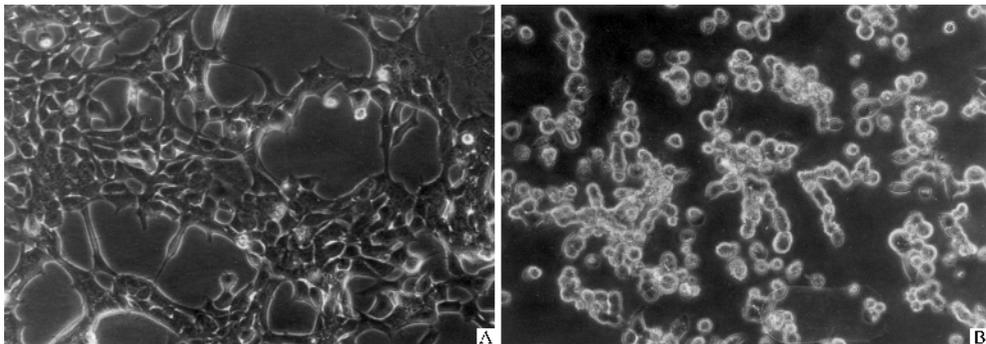


图 3 感染 Adeno-OPG 重组 DNA 前后 HEK293 细胞的形态比较

Fig.3 Morphogenesis of HEK293 cells infected by recombinant Adeno-OPG

A. Normal HEK293 cells

B. HEK293 cells infected by recombinant Adeno-OPG

小鼠成肌细胞经重组腺病毒感染后 48h,收集细胞裂解物经 SDS-PAGE 蛋白电泳后,Western blot 检测结果发现,有针对 OPG 抗体的特异性条带,分

子量约为 63kD(图 4)。证实人 OPG 重组腺病毒能在小鼠成肌细胞 C2C12 中表达人 OPG 蛋白。

在感染后 2,4,6,8 周收集细胞培养上清,进行

ELISA 检测,结果发现在 6 周内均可在细胞培养上清中检测到 OPG 蛋白的表达,8 周后检测结果为阴性。人 OPG 重组腺病毒感染小鼠成肌细胞后,细胞形态正常,流式细胞仪检测未见有细胞凋亡等异常(图略)。

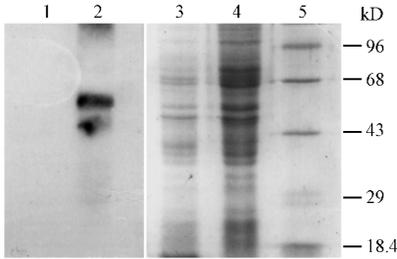


图 4 感染重组 Adeno-OPG 的 C2C12 细胞的 Western blot 分析

Fig.4 Western blot analysis of C2C12 cells infected with recombinant Adeno-OPG

1. Cell lysis of C2C12 cells analyzed by Western blot ;
2. Cell lysis of C2C12 cells infected with Adeno-OPG analyzed by Western blot ;
3. Cell lysis of C2C12 cells analyzed by SDS-PAGE ;
4. Cell lysis of C2C12 cells infected with Adeno-OPG analyzed by SDS-PAGE ;
5. Low molecular protein markers

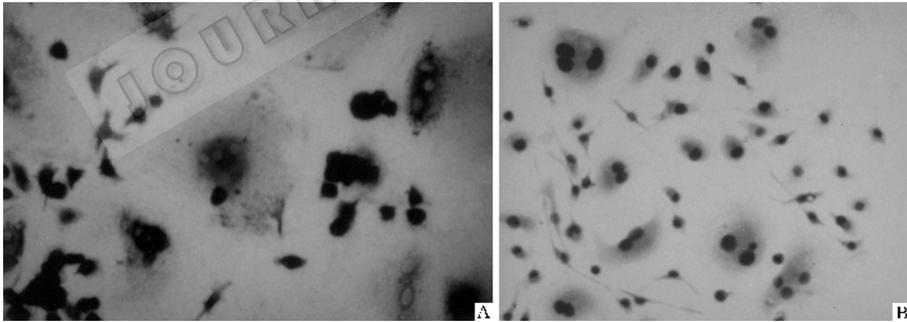


图 5 体外培养的小鼠骨髓多核细胞形态

Fig.5 Morphogenesis of multinucleated cells *in vitro*

- A. TRAP-positive multinucleated cells (TRAP stain $\times 400$);
- B. Multinucleated cells with the presence Adeno-OPG (HE stain show the nuclei $\times 200$)

3 讨 论

随着对骨形态发生蛋白(Bone morphogenetic protein, BMP)骨保护素 OPG 及其配体 OPGL、转化生长因子 α (Transform growth factor β , TGF- β) 等的研究,人们对骨形成、骨吸收过程及其调控机制有了深入的了解,然而直接将这些因子导入体内面临一定的困

2.4 人 OPG 重组腺病毒抑制破骨细胞的分化及骨吸收功能

盖玻片上破骨细胞样细胞经 TRAP 染色后,呈红色,多核,周围的胞膜可见多个伪足样突起。其周围还可见单核吞噬细胞、成纤维样细胞及红血球等散在破骨细胞之间。象牙片上出现骨吸收陷窝,呈圆形、椭圆形、腊肠状不等,骨吸收陷窝在象牙片上呈不均匀分布。

培养 14d 后各组 TRAP 染色阳性的细胞数统计表明,实验组的 TRAP 染色阳性的细胞数少于对照组, $P < 0.01$ 。实验组骨片上骨吸收陷窝的数目明显少于对照组 $P < 0.01$ 。说明腺病毒表达的 OPG 可在体外抑制破骨细胞样细胞的分化和骨吸收功能(图 5、6 表 1)。

表 1 人 OPG 重组腺病毒对破骨细胞形成及骨吸收功能的影响

Table 1 Effects of recombinant Adeno-OPG on osteoclast formation and bone resorptive function

	No. of osteoclasts/cover slip	No. of pits /dentine slice
Adeno-OPG (-)	292 \pm 9.14*	334 \pm 13.79*
Adeno-OPG (+)	77 \pm 2.35	86 \pm 7.13

* $P < 0.01$

难:目前获得足够临床应用、稳定有活性的细胞因子仍有难度,即使是体外真核细胞表达的蛋白,其糖基化、空间结构等与人体自然产生的也不尽相同,患者接受注射后有可能诱发机体的免疫排斥反应。而基因治疗作为一种选择可望为骨创伤、骨病的治疗提供新的思路^[5]。

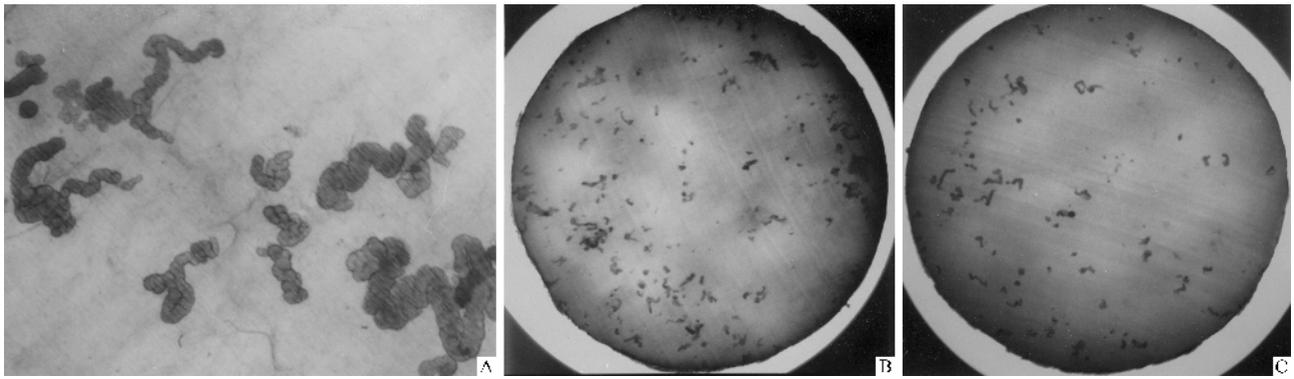


图 6 骨陷窝形成情况

Fig.6 Resorption pits formtion assay

A. Resorption pits were stained with toluidine blue(×400);

B ,C. The outlook of dentine slices(toluidine blue stain ×20)without or with Adeno-OPG

腺病毒载体具有高转染率、高表达率以及在宿主细胞内的表达有一定时限等特点,能有效转染软骨细胞、成骨细胞、破骨细胞、骨髓基质细胞、关节滑膜细胞以及椎间盘髓核细胞等^[6-8],适用于骨折愈合、脊柱融合、骨质疏松及类风湿性关节炎、骨肿瘤等疾病的基因治疗,但构建、制备过程较为复杂,病毒在扩增的过程中会有能自我复制的病毒出现,可在宿主体内表达病毒蛋白,引起机体的免疫排斥反应。本文采用的腺病毒表达系统是将目的基因连同基因组两端的反向末端重复序列经酶切、连接的方法在体外克隆入病毒质粒中,鉴定后转染 293 细胞,出现病变的细胞即为阳性克隆,较常用的“同源重组”法简易,成功率高。为减少能自我复制的病毒产生,特别强调只采用“初次扩增产物”制备病毒,避免采用反复扩增的方法制备病毒。为提高病毒的滴度,要求使用传代次数在 50 代以内的 HEK293 细胞,冻融细胞至少 3 次以上,并在每次冻融后振荡细胞有助于细胞裂解。在 -70℃ 冰箱内保存于酒精盒中,冻融时将装有 HEK293 细胞的 1.5mL 离心管置于酒精浴中可使温度迅速降低。

小鼠骨髓细胞在 $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 和地塞米松的诱导下体外培养 10~14d 可稳定分化出具有骨吸收功能的破骨细胞样细胞,是当前破骨细胞研究中常用的培养体系。除在“材料与方法”中提到的,在试验中我们还发现,较高的起始培养细胞密度(24 孔细胞培养板,每孔细胞数大于 5×10^5 个),细胞培养液的 pH 值在 7.0~7.2 之间,勤换培养液(每 2 天更换一次),可以更好的诱导破骨细胞前体向破骨细胞方向分化。由于破骨细胞在象牙片或骨片上的分布不均匀,同一玻片或骨片上不同部位的破骨细胞数

量并不相同,因此,破骨细胞的数量应计算每一个玻片上的细胞总数,而不应在高倍显微镜下计算不同视野中的破骨细胞数或骨吸收陷窝数。将直径 4mm 的象牙片和玻片先置于 96 孔细胞培养板,待骨髓细胞贴壁后再转入 24 孔培养板中培养,可以使每一个象牙片和玻片上附着的细胞数大致相等,以确保实验系统的准确性和可重复性。

骨保护素 OPG 是当前破骨细胞及骨吸收领域研究的热点,在骨质疏松、类风湿性关节炎、癌症骨转移的领域有潜在的应用价值^[9-11]。将人 OPG 重组腺病毒加入鼠骨髓破骨细胞培养体系中,玻片上破骨细胞及骨片上骨吸收陷窝的数量都较对照组显著减少,说明经腺病毒感染细胞表达的 OPG 蛋白具有抑制体外培养破骨细胞的分化和骨吸收功能的作用。本实验构建的人 OPG 重组腺病毒感染 C2C12 细胞后,在体外培养的情况下可分泌表达 OPG 蛋白 6 周以上,且对靶细胞的生长无不良影响,提示应用该系统进行基因治疗的可行性,可能的应用包括骨质疏松、类风湿性关节炎、骨巨细胞瘤及骨转移癌的局部治疗研究。

REFERENCES(参考文献)

- [1] Simonet W S, Lacey D L, Dunstan C R *et al.* Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell*, 1997, **89**(2): 309-319
- [2] Yasuda H, Shima N, Nakagawa N *et al.* Identity of osteoclastogenesis inhibitory factor (OCIF) and osteoprotegerin (OPG): a mechanism by which OPG/OCIF inhibits osteoclastogenesis *in vitro*. *Endocrinology*, 1998, **139**(3): 1329-1337
- [3] Takahashi N, Yamana H, Yoshiki S *et al.* Osteoclast-like cell formation and its regulation by osteotropic hormones in mouse bone mar-

- [4] Taylor L M , Turksen K , Aubin J E *et al.* Osteoclast differentiation in cocultures of a clonal chondrogenic cells line and mouse bone marrow cells. *Endocrinology* , 1993 , **133** (5) 2292 – 2300
- [5] Rodan G A , Martin T J. Therapeutic Approaches to Bone Diseases. *Science* , 2000 **289** : 1508 – 1514
- [6] Sommer B , Kuznetsov S A , Robey P G *et al.* Efficient gene transfer into normal human skeletal cells using recombinant adenovirus and conjugated adenovirus-DNA complexes. *Calcif Tissue Int* , 1999 , **64** (1) 45 – 51
- [7] Nishida K , Kang J D , Suh J K *et al.* Adenovirus-mediated gene transfer to nucleus pulposus cells. Implications for the treatment of intervertebral disc degeneration. *Spine* , 1998 , **23** (22) 2437 – 2441
- [8] Okubo Y , Bessho K , Fujimura K *et al.* *In vitro* and *in vivo* studies of a bone morphogenetic protein-2 expressing adenoviral vector. *J Bone Joint Surg (Am)* , 2001 , **83** (Suppl) 99 – 104
- [9] Bekker P J , Hollow D , Nakanishi A. The effect of a single dose of osteoprotegerin in postmenopausal women. *J Bone Miner Res* , 2001 , **16** (2) 348 – 360
- [10] Lipton A . Bisphosphonates and breast carcinoma : present and future. *Cancer* , 2000 , **88** 3033 – 3037
- [11] Itonaga I , Fujikawa Y , Sabokbar A *et al.* Rheumatoid arthritis synovial macrophage-osteoclast differentiation is osteoprotegerin ligand-dependent. *J Pathol* , 2000 , **192** (1) 97 – 104

Construction and Biological Activity Study of Human Osteoprotegerin Expressing Adenoviral System

LIU Ji-Zhong¹ JI Zong-Ling^{2*} HU Yun-Yu¹ CHEN Su-Min² ZHU Bang-Fu² YANG Tong-Tao³

(*The Fourth Military Medical University* ¹ *Department of Orthopedics* , *Xijing Hospital* ;

² *Department of Biochemistry and Molecular Biology* , ³ *Department of Orthopedics* , *Tangdu Hospital* , *Xi 'an 710032* , *China*)

Abstract Using the isolated total RNA from osteosarcoma cell line MG63 , the cDNA encoding human OPG was amplified by RT-PCR. A recombinant adenoviral vector carrying cDNA of OPG was constructed and OPG expression in mouse myoblast C2C12 cells was confirmed by Western blot and ELISA. The secreted expression of OPG protein persisted more than 6 weeks in vitro , and the growth of C2C12 cells infected by recombinant adenoviral were in good state. Osteoclasts derived from mouse bone marrow cells infected with recombinant adenoviral made less number of TRAP positive cells and resorption pits formed on dentine slices.

Key words osteoprotegerin , recombinant adenovirus , osteoclast

Received : 07-24-2002

* Corresponding author. Tel 86-29-3374516ext 19 , Fax 86-29-3374513 ; E-mail liujzl@fmmu.edu.cn

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