

## 副溶血性弧菌外膜蛋白 K 的多表位串联表达研究

张玉晴, 汪天杰, 许晓升, 张峥嵘, 许如苏\* (汕头出入境检验检疫局, 广东汕头 515041)

**摘要** [目的]设计和表达 OmpK 蛋白的多表位串联肽,综合评价其免疫效应。[方法]构建重组表达质粒 pET-32a-*repis* 并进行原核表达,使用 Ni-NTA 纯化介质对表达产物进行纯化得到重组多表位串联肽(rEPIS),以 rEPIS 为免疫原免疫昆明小鼠,对 rEPIS 进行免疫原性和免疫保护性研究,Western-blot 分析 rEPIS 的免疫反应性。[结果]rEPIS 具有良好的免疫原性,能够刺激机体产生较高水平抗体,并且能够保护 90% 的昆明小鼠抵抗 10LD<sub>50</sub> 副溶血性弧菌的感染,具有良好的免疫保护效应,Western-blot 结果显示重组 rEPIS 能够与免疫后鼠血清进行特异性结合,具有良好的免疫反应性。[结论]该研究制备的重组 rEPIS 具有良好的免疫特性,为副溶血弧菌多表位疫苗的研究奠定了物质基础。

**关键词** 副溶血性弧菌;多表位串联肽;免疫特性

**中图分类号** R 378.3 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2018)23-0061-04

Multi-epitope Concatenated Expression of Outer Membrane Protein K of *Vibrio parahaemolyticus*

ZHANG Yu-qing, WANG Tian-jie, XU Xiao-sheng et al (Shantou Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Shantou, Guangdong 515041)

**Abstract** [Objective] The multi-epitope tandem peptide of OmpK protein was designed and expressed, and its immunological effect was evaluated synthetically. [Method] The recombinant expression plasmid pET-32a-*repis* was constructed and expressed in prokaryotic cells. The recombinant polyepitope tandem peptide rEPIS was purified by using Ni-NTA purification medium. Kunming mice were immunized with rEPIS. The immunogenicity and immunogenicity of rEPIS were studied. Western-blot was used to analyze the immunoreactivity of rEPIS. [Result] rEPIS has good immunogenicity, which can stimulate the body to produce a higher level of antibodies, and protect 90% of Kunming mice against *Vibrio parahaemolyticus* 10LD<sub>50</sub> infection. The results of Western-blot showed that the recombinant rEPIS could specifically bind to the serum of immunized mice and had good immunoreactivity. [Conclusion] The recombinant rEPIS prepared in this study has good immune characteristics, which lays a material foundation for the study of polyepitope vaccine of *V. parahaemolyticus*.

**Key words** *Vibrio parahaemolyticus*; Multi-epitope tandem peptide; Immune characteristics

近年来,人工海水养殖规模迅速扩大,生产集约化程度不断提高,病害已经成为制约水产养殖业健康发展的关键因素。在众多的细菌性病害中,弧菌病被公认为是鱼类养殖中最为严重的病害之一,其中副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*, VP)是威胁海水养殖产业的重要病原菌之一,给水产养殖业带来了巨大的经济损失<sup>[1]</sup>。该菌侵染 48 种海水鱼类之多,发病率高,流行范围广,危害严重,是限制我国海洋鱼类、贝类等海洋经济动物养殖业发展的最主要因素之一。

随着人们生活水平的提高,其对水产品质量安全和环境污染问题日益关注,传统的水产养殖方式如采用各种化学药物防治病害的方式越来越受到质疑。接种疫苗能有效预防水产动物疫病发生<sup>[2]</sup>,且无污染环境、无药物残留,针对水生动物的疫苗领域研究逐渐成为热门,而接种疫苗也已成为国际现代水产养殖业的规范性生产标准。其中抗原表位是诱导特异性免疫应答的最基本结构和功能单位。表位疫苗将抗原表位作为疫苗的免疫原,去除免疫无关、免疫抑制及免疫病理等序列,可有效调控免疫应答类型,大大降低副作用,增强对机体的免疫保护效力<sup>[3]</sup>。该研究前期筛选了副溶血弧菌的保护性抗原外膜蛋白(outer membrane protein, omp)K 的 6 个 B 细胞线性表位,在此工作基础上,设计 OmpK 的多表位串联肽,并进行原核表达,对其进行免疫特性研究,为渔用新型多表位疫苗的开发研究奠定一定

的基础。

## 1 材料与方法

**1.1 材料** 副溶血性弧菌标准菌株 ATCC17802、*E. coli* Rosetta (DE3) 由汕头出入境检验检疫局技术中心实验室保存;原核表达载体 pET-32a (+) 购自 Novagen;副溶血性弧菌阳性血清、阴性血清、重组 OmpK 蛋白和 His-Taq 标签蛋白均由笔者所在实验室制备。

**1.2 主要试剂** 核酸限制性内切酶(*Bam*H I、*Hind* III)、*Ex*Taq 聚合酶和 T<sub>4</sub> 连接酶购自宝日医生物技术(北京)有限公司;细菌基因组 DNA 提取试剂盒、DNA 凝胶回收试剂盒和质粒纯化试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司;未预染标准蛋白和预染标准蛋白为北京康为世纪生物科技有限公司产品;Ni-NTA 纯化介质购自南京金斯瑞生物科技有限公司;过硫酸铵、TEMED、β-巯基乙醇等购自美国 BBI 公司;基因序列合成由通用生物系统(安徽)有限公司完成;引物合成和测序由生工生物工程(上海)股份有限公司完成。

## 1.3 方法

**1.3.1 OmpK 蛋白多表位串联肽的设计。** 实验室前期通过应用 DNASTar Protean 软件预测副溶血性弧菌标准菌株 ATCC17802 的 OmpK 蛋白的 6 个 B 细胞线性表位,将该 6 个表位序列用 GGGS(甘氨酸-甘氨酸-甘氨酸-丝氨酸)接头连接后,转化为核苷酸序列(命名为 *repis*),并在序列 5' 加上 *Bam*H I 酶切位点、保护性碱基(CGC)和起始密码子(ATG),在 3' 端加上 *Hind* III 酶切位点,保护性碱基(GGG),且经密码子优化后,将最终设计的核苷酸序列送至通用生物系统(安徽)有限公司合成并克隆至质粒 pET-32a (+),形成重组质粒

**基金项目** 广东检验检疫局科技计划项目(2016GDK44)。

**作者简介** 张玉晴(1988—),女,安徽宣城人,硕士,从事出境动物源性食品检验检疫研究。\* 通讯作者,研究员,硕士,从事动物检疫、食品微生物检验研究。

**收稿日期** 2018-04-26

pET-32a-*repis*。

**1.3.2 pET-32a-*repis* 的原核表达及纯化。**将重组质粒 pET-32a-*repis* 转化至 *E. coli* Rosetta( DE3) 中,按照质粒纯化试剂盒说明书提取重组表达质粒 pET-32a-*repis* 进行 PCR 鉴定。上游引物 P1 为 5'-ATGGATATCCACAAAAACGAT-3'; 下游引物 P2 为 5'-AGATTCTGGTTTGTGACCAGAACC-3'。PCR 反应体系(50.0  $\mu$ L)包括 10 $\times$ PCR buffer 5.0  $\mu$ L, dNTP 4.0  $\mu$ L, P1/P2 各 1  $\mu$ L, ExTaq 酶 0.2  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 37.8  $\mu$ L, 质粒模板 1.0  $\mu$ L。PCR 反应条件为 95  $^{\circ}$ C 预变性 4 min; 94  $^{\circ}$ C 变性 1 min, 50  $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72  $^{\circ}$ C 复性 30 s, 共 25 个循环; 72  $^{\circ}$ C 后延伸 10 min。将 PCR 阳性质粒送至上海生物工程技术服务有限公司进行测序鉴定。

挑取鉴定阳性的重组菌 pET-32a-*repis*/Rosetta( DE3) 单菌落于 5 mL 含 100  $\mu$ g/mL Amp 的 LB 液体培养基中, 37  $^{\circ}$ C、200 r/min 培养 12~14 h 后, 取 2 mL 菌液加入到 200 mL LB 培养基(Amp+Cl 抗性)中扩大振荡培养至 OD<sub>600</sub> 为 0.4~0.5 时, 加入诱导剂 IPTG 至终浓度为 1 mmol/L, 转 16  $^{\circ}$ C 继续振荡培养 16 h。离心收集菌体沉淀, 用 PBS 重悬沉淀, 加入 PMSF(工作浓度为 1 mmol/L)和溶菌酶, 反复冻融 3 次后进行超声裂解(采用 300 W, 超声 4 s, 停 8 s, 总计 20 min), 使菌体充分破碎。将超声后的样本离心分离沉淀与上清, 上清即为可溶性部分, 沉淀为包涵体部分, 用同样体积 20 mL 的 PBS 重悬。沉淀和上清各取 8  $\mu$ L 进行 SDS-PAGE 检测, 进行表达产物的鉴定及表达形式分析。使用 Ni-His resin 亲和层析柱对表达产物进行亲和纯化。

**1.3.3 OmpK 多表位串联肽 rEPIS 的免疫保护性。**将昆明小鼠随机分为 5 组, 第 1~4 组分别为 rEPIS 组、重组 OmpK 蛋白组、灭活副溶血性弧菌菌苗组和标签蛋白组, 第 5 组为 PBS 对照组, 每组 20 只。3 种蛋白的免疫剂量为 2  $\mu$ g/g 体重, 首次免疫时, 灭活菌苗的免疫剂量为  $1 \times 10^8$  CFU/只, 免疫途径为腹腔注射, 蛋白与弗氏不完全佐剂按照 1:1 混合乳化。14 d 后加强免疫 1 次, 加强免疫时, 蛋白与弗氏完全佐剂按照 1:1 混合乳化, 剂量同一免, 对照组注射等量 PBS。分别于免疫前和免疫后 14 d 和 28 d, 对各实验组小鼠进行眼眶采血, 采用间接 Elisa 检测血清中抗体水平。免疫 30 d 后人工感染副溶血弧菌, 感染剂量为 10LD<sub>50</sub>。记录实验小鼠 14 d 的存活情况, 计算免疫保护率 = (1 - 免疫组死亡率/对照组死亡率)  $\times$  100%。

**1.3.4 重组多表位肽 rEPIS 的免疫反应性。**纯化重组 rEPIS 蛋白先进行 SDS-PAGE, 电泳结束后进行 Western-blot 分析。以重组 rEPIS 蛋白免疫组首次免疫后 28 d 小鼠眼眶采血分离的抗血清为一抗, 对纯化重组 rEPIS 蛋白进行 Western-blot 分析。

## 2 结果与分析

**2.1 OmpK 蛋白多表位串联肽的设计** 将 6 个表位(氨基酸序列为 DIHKNDY、NEKGYAESSHDY、PGSDKAG、YDGNKKDW、DDDKGNK、GHKPES)用 GGS 连接后, 转化为核苷酸序列(图 1)。

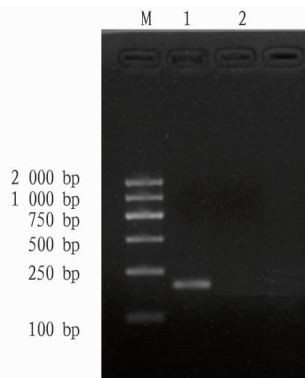
```

CGCGGATCCATGGATATCCACAAAAACGATTACGGTGG
      BamHI  起始密码子                                GG--
TGGTTCTAACGAGAAAGGTTATGCTGAATCTTCTCATG
---GS
ATTACGGTGGTGGTTCTCCAGGCAGCGACAAAGCTGG
      GGS
CGGTGGTGGTTCTTACGATGGCAACAAGAAAGATTGG
      GGS
GGTGGTGGTTCTGATGACGACAAAGGTAACAAGGGT
      GGS                                G--
GGTGGTTCTGGTCACAAACCAGAATCTAAGCTTGGG
---GGS                                HindIII
  
```

图 1 多表位串联肽 rEPIS 的核苷酸序列

Fig. 1 Nucleotide sequence of multi-epitope tandem peptide rEPIS

**2.2 pET-32a-*repis* 的原核表达及纯化** 将重组质粒 pET-32a-*repis* 转化至 *E. coli* Rosetta( DE3) 后进行 PCR 鉴定, 琼脂糖凝胶电泳显示在 216 bp 附近有 1 条特异性的 DNA 条带(图 2), 表明重组质粒转化成功。重组菌经 IPTG 诱导培养后, 对表达蛋白进行了 SDS-PAGE 电泳鉴定和表达形式的检测, 结果如图 3 所示, 诱导后的 pET-32a-*repis*/Rosetta( DE3) 上清液中, 在 30 kD 左右位置出现浓染蛋白条带(泳道 5), 符合预期的 rEPIS 蛋白分子量, 沉淀中没有该浓染蛋白条带(泳道 6), 说明该诱导条件下重组 rEPIS 的表达形式为可溶性蛋白。



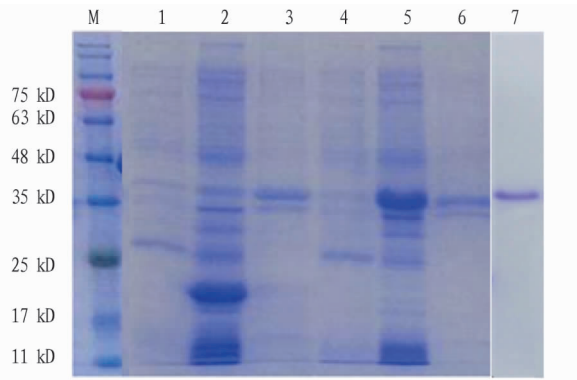
注: M. DNA marker; 1. 重组表达质粒 pET-32a-*repis* 的 PCR 扩增产物; 2. 空质粒 pET-32a 的 PCR 扩增产物

Note: M. DNA marker; 1. PCR product of recombinant plasmid pET-32a-*repis*; 2. PCR product of empty plasmid pET-32a

图 2 重组表达质粒 pET-32a-*repis* 的 PCR 鉴定

Fig. 2 PCR identification of recombinant plasmid pET-32a-*repis*

**2.3 OmpK 多表位串联肽 rEPIS 的免疫特性研究** 首次免疫后第 14 天和第 28 天, 从各组免疫鼠眼眶采血分离血清, 分别以纯化的重组 rEPIS 蛋白、重组 OmpK 蛋白及标签蛋白 His-Taq 为包被抗原, 采用间接 Elisa 方法测定特异性抗体水平。结果如表 1 所示, 重组 rEPIS 蛋白和重组 OmpK 蛋白均能很好地刺激机体产生较高水平的抗体, 标签蛋白也能刺激机体产生相应抗体, 但是其抗体水平远远低于抗重组 rEPIS 蛋白和重组 OmpK 蛋白抗体水平, 即 2 组免疫血清中的抗体以抗重组 rEPIS 蛋白、重组 OmpK 蛋白为主。



注: M. 蛋白质 marker; 1. pET-32a 未诱导; 2. pET-32a 诱导上清; 3. pET-32a 诱导沉淀; 4. pET-32a-repis 未诱导; 5. pET-32a-repis 诱导上清; 6. pET-32a-repis 诱导沉淀; 7. 纯化的重组 rEPIS 蛋白

Note: M. Protein marker; 1. Non-induced by pET-32a; 2. Supernatants induced by pET-32a; 3. Sediment induced by pET-32a; 4. Non-induced by pET-32a-repis; 5. Supernatants induced by pET-32a-repis; 6. Sediment induced by pET-32a-repis; 7. Purified recombinant rEPIS protein

图 3 重组 rEPIS 蛋白及标签蛋白的诱导表达及纯化

Fig. 3 Induced expression and purification of recombinant rEPIS protein and label protein

各实验组小鼠在免疫后第 30 天, 分别用 10LD<sub>50</sub> 副溶血性弧菌 ATCC17802 株进行攻毒实验, 结果发现标签蛋白组

和 PBS 对照组 20 只小鼠全部死亡, 重组 rEPIS 组小鼠存活 18 只, 相对保护率为 90%; 重组 OmpK 组小鼠存活 17 只, 相对保护率为 85%; 灭活菌组小鼠存活 18 只, 相对保护率为 90% (表 2)。死亡小鼠腹部肿胀, 剖检后可见肝脏肿大且颜色变黄, 肠道内有黄色积液, 用肝脏切面涂抹平板, 四区划线分离细菌, 经生化鉴定为副溶血性弧菌。

**2.4 重组多表位肽 rEPIS 的免疫反应性** Western-blot 结果显示, 纯化的 rEPIS 蛋白能与鼠抗重组 rEPIS 抗体发生特异性结合反应, 在 30 kD 处出现 1 条特异性免疫反应条带 (图 4), 表明该重组蛋白具有良好的免疫反应性。

### 3 讨论

传统疫苗包括减毒活疫苗和灭活疫苗。减毒活疫苗免疫效果虽好, 但减毒不充分, 存在临床感染的风险。灭活疫苗虽然比较安全, 但也有一定的毒副作用。近年来, 随着分子生物学与分子免疫学的发展, 出现了多种替代传统疫苗的新形式分子疫苗, 如基因工程亚单位疫苗、多表位疫苗、核酸疫苗以及基因缺失疫苗等。多表位疫苗由多个保护性抗原表位制成, 是一种新型亚单位疫苗, 与传统疫苗相比, 其具有安全无毒、稳定可控等优势。我国水产疫苗研究开发起步较晚, 全国现有近 30 家科研单位开展水产疫苗相关研究, 涉及病毒、细菌和寄生虫等病原 27 种(类)<sup>[4]</sup>。到目前为止, 只有 4 个渔用疫苗获得国家新兽药证书, 渔用疫苗的研究开发前景比较开阔。

表 1 昆明小鼠免疫后血清中抗体水平 ELISA 检测结果

Table 1 ELISA detection results of serum antibody levels in Kunming mice after immunization

包被抗原 Envelope antigen	重组 rEPIS 蛋白免疫组血清 rEPIS protein immunization group		重组 OmpK 蛋白免疫组血清 OmpK protein immunization group	
	14 d	28 d	14 d	28 d
重组 rEPIS 蛋白 Recombinant rEPIS protein	1:204 800	1:1 638 400	—	—
重组 OmpK 蛋白 Recombinant OmpK protein	—	—	1:409 600	1:6 553 600
His-Taq 蛋白 His-Taq protein	1:12 800	1:25 600	1:25 600	1:51 200

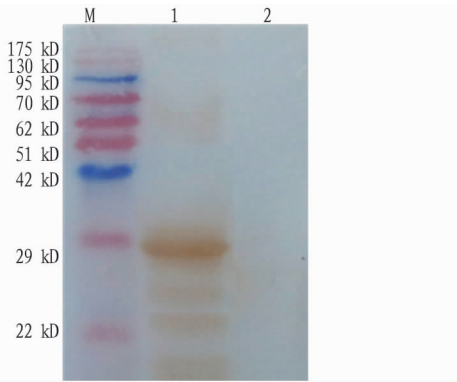
表 2 实验小鼠免疫保护性试验结果

Table 2 Experimental mouse immunoprotective test results

组别 Group	免疫总数 Total number of immune	攻毒后各组各时间点死亡数 The number of deaths in each group at each time point after the attack					死亡总数 Deaths	存活率 Survival rate %	相对保护率 Relative protection rate//%
		1 d	2 d	3 d	7 d	14 d			
rEPIS	20	1	0	1	0	0	2	90	90
OmpK	20	2	1	0	0	0	3	85	85
灭活菌 Inactivated bacteria	20	1	1	0	0	0	2	90	90
标签蛋白 Tag protein	20	15	3	2	0	0	20	0	0
PBS	20	17	3	0	0	0	20	0	0

OmpK 是一种潜在的弧菌共同抗原, 以 OmpK 为抗原基因的弧菌渔用疫苗可能具有较高的免疫保护效率<sup>[5-8]</sup>。该研究选取副溶血弧菌保护性抗原 OmpK 为靶标, 将预测得到的 OmpK 蛋白的 6 个 B 细胞线性表位用氨基酸接头连接, 设计多表位串联体。在进行表位串联设计时, 相邻表位氨基酸的首尾部分结合可能会产生新的接合表位, 会抑制原有表位诱导的免疫应答, 因此需要在相邻表位间引入合适的间隔序列。以甘氨酸接头为代表的柔性接头伸展性好, 自身结构简单, 连接 2 个大分子蛋白时往往不影响各自蛋白的天然构

象。2007 年, Wang 等<sup>[9]</sup>将鸡传染性囊病病毒的 5 个抗原表位用 GGS 连接后进行原核表达, 得到的重组蛋白 rEPIS 可诱导机体产生较高水平的特异性抗体, 并具有良好的免疫保护性。2013 年, Tian 等<sup>[10]</sup>使用接头 GGSSGG 将猪瘟疫病毒包膜糖蛋白的 B 细胞表位进行串联表达, 获得重组多表位蛋白 GST-BT22, 能够与抗猪瘟的血清抗体特异性结合, 且有很强亲和力。该研究串联表位的接头选用的是 GGS, 经原核表达得到的重组蛋白 rEPIS 免疫小鼠后 28 d, ELISA 检测抗体效价高达 1:1 638 400, 并且可保护 90% 的昆明小鼠抵抗



注: M. 蛋白质标准分子量; 1. 纯化的 rEPIS 蛋白  
Note: M. Protein marker; 1. Purified rEPIS protein

图 4 rEPIS 蛋白的 Western-blot 结果

Fig. 4 Western-blot result of rEPIS protein

10LD<sub>50</sub> 副溶血性弧菌的感染,具有良好的免疫保护效应。

#### 参考文献

[1] 王凤青,孙玉增,任利华,等. 海水养殖中水产动物主要致病弧菌研究进展[J]. 中国渔业质量与标准,2018,8(2):49-56.

- [2] PLANT K P, LAPATRA S E. Advances in fish vaccine delivery[J]. *Developmental & comparative immunology*, 2011, 35(12): 1256-1262.
- [3] 孙香丰,代旭山. 多表位疫苗构建研究进展及其兽医临床应用[J]. 山东畜牧兽医, 2017, 38(6): 76-78.
- [4] 吴淑勤,陶家发,巩华,等. 渔用疫苗发展现状及趋势[J]. 中国渔业质量与标准, 2014, 4(1): 1-13.
- [5] PENG B, LIN P X, WANG S N, et al. Polyvalent protective immunogens identified from outer membrane proteins of *Vibrio parahaemolyticus* and their induced innate immune response[J]. *Fish & shellfish immunology*, 2018, 72: 104-110.
- [6] PENG B, YE J Z, HAN Y, et al. Identification of polyvalent protective immunogens from outer membrane proteins in *Vibrio parahaemolyticus* to protect fish against bacterial infection[J]. *Fish & shellfish immunology*, 2016, 54: 204-210.
- [7] LI C C, YE Z C, WEN L Y, et al. Identification of a novel vaccine candidate by immunogenic screening of *Vibrio parahaemolyticus* outer membrane proteins[J]. *Vaccine*, 2014, 32(46): 6115-6121.
- [8] MAO Z J, YU L, YOU Z Q, et al. Cloning, expression and immunogenicity analysis of five outer membrane proteins of *Vibrio parahaemolyticus* zj2003[J]. *Fish & shellfish immunology*, 2007, 23(3): 567-575.
- [9] WANG Y S, FAN H J, LI Y, et al. Development of a multi-mimotope peptide as a vaccine immunogen for infectious bursal disease virus[J]. *Vaccine*, 2007, 25(22): 4447-4455.
- [10] TIAN H, HOU X M, LIU X T. Real-time SPR characterization of the interactions between multi-epitope proteins and antibodies against classical swine fever virus[J]. *Biochem Bioph Res Co*, 2013, 431(2): 315-320.

(上接第 56 页)

了原料中可溶性糖含量不足的缺陷,在混贮感官品质鉴定过程中发现添加后的青贮料相比马铃薯茎叶单独青贮的 pH 有明显下降的趋势;混贮后的青贮在气味及质地上都有很大程度的提高,从而改善了马铃薯茎叶在青贮过程中的感官品质。

氨态氮含量是青贮料营养品质的一个重要指标,在青贮饲料中氨态氮含量越高,说明青贮饲料中蛋白质和氨基酸被微生物分解程度越高,青贮料的质量越不佳,青贮料中的感官品质及营养价值就越低。在试验组 B 中,随着在马铃薯茎叶中添加全株玉米的比例越高其氨态氮含量越低,说明随着添加量的增加,蛋白质和氨基酸被降解的程度逐渐降低,其中营养物质的损耗量也降低,青贮料的品质有很大程度的提高;在试验组 C 中,添加小麦秸秆的氨态氮含量同样随着添加比例的增加越来越小,同组之间相比较,其添加比例越高,青贮品质越好。

#### 4 结论

马铃薯茎叶在单独青贮时,青贮料的感官品质较低,腐败程度较高,即马铃薯茎叶不宜单独青贮,且单独青贮料不

宜于饲喂动物。在马铃薯茎叶中添加全株玉米和小麦秸秆进行混贮,后期青贮料的感官品质和发酵特性均有较大程度的提高。添加全株玉米的青贮料青贮效果高于添加小麦秸秆的青贮效果,在所有的试验结果中以添加 70% 全株玉米的青贮效果最好,其次为添加 70% 小麦秸秆的青贮料。通过试验结果可知,若要有效提高马铃薯茎叶的利用率,可通过添加全株玉米提高其青贮的品质和适口性。

#### 参考文献

- [1] 牧夫. 家畜喂用马铃薯茎叶中毒[J]. 新农业, 1979(17): 25.
- [2] 付月峰,乔国栋. 农户马铃薯茎叶窖藏青贮技术[J]. 畜牧与饲料科学, 2014, 35(2): 83-84.
- [3] 王成章,王恬. 饲料学[M]. 北京:中国农业出版社, 2003: 122-141.
- [4] 杨凤. 动物营养学[M]. 北京:中国农业出版社, 2000.
- [5] MCDONALD P, HENDERSON A R, HERON S J E. The biochemistry of silage[M]. 2nd ed. England: Chalcombe, Publ Marlow, 1991.
- [6] OHSHIMA M, KIMURA E, YOKOTA H. A method of making good quality silage from direct cut alfalfa by spraying previously fermented juice[J]. *Animal feed science technology*, 1997, 66(1/2/3/4): 129-137.
- [7] 杨永在,王长水,梁艺洵,等. 不同添加物对马铃薯茎叶青贮品质的影响[J]. 中国草食动物科学, 2015, 35(5): 34-38, 49.
- [8] 孙苗苗,陈辉,吴坚平,等. 产碱假单胞菌脂肪酶的克隆表达及酶学性质研究[J]. 微生物学通报, 2012, 39(11): 1580-1588.
- [9] 滕宏飞,王丹静,徐青,等. 橄榄油乳化法测定脂肪酶活性的优化研究[J]. 食品工业, 2011(6): 80-83.

## 科技论文写作规范——缩略语

采用国际上惯用的缩略语。如名词术语 DNA(脱氧核糖核酸)、RNA(核糖核酸)、ATP(三磷酸腺苷)、ABA(脱落酸)、ADP(二磷酸腺苷)、CK(对照)、CV(变异系数)、CMS(细胞质雄性不育性)、IAA(吲哚乙酸)、LD(致死剂量)、NAR(净同化率)、PMC(花粉母细胞)、LAI(叶面积指数)、LSD(最小显著差)、RGR(相对生长率),单位名缩略语 IRRI(国际水稻研究所)、FAO(联合国粮农组织)等。对于文中有些需要临时写成缩写的词(如表及图中由于篇幅关系以及文中经常出现的词而写起来又很长时),则可取各主要词首字母写成缩写,但需在第一次出现处写出全称,表及图中则用注解形式在下方注明,以便读者理解。