

· 实验室研究 ·

中国脑膜炎奈瑟菌中插入序列 IS1301 的分布与分子流行病学研究

庞杏林 侯配斌 高源 徐丽 任红宇 朱兵清 周海健 邵祝军

【摘要】 目的 研究中国脑膜炎奈瑟菌(*Nm*)中插入序列 IS1301 的分布与分子流行病学特征。方法 设计 IS1301 引物,应用 PCR 方法检测 2007 年 1 月至 2008 年 10 月收集全国 16 个省、市、自治区 219 株 *Nm* 菌株的 IS1301,对 IS1301 扩增产物进行 DNA 测序和序列比对,PCR 扩增 IS1301 阳性菌株进行脉冲场凝胶电泳(PFGE)分析及核酸印迹杂交,研究不同 *Nm* 菌株中 IS1301 的分布特征。结果 219 株 *Nm* 菌株中,34 株携带 IS1301 (15.53%), A、B、C 群和不可分群的 *Nm* 菌株 IS1301 阳性率分别为 11.11%、20.75%、6.17% 和 28.57%; IS1301 扩增产物测序结果与 GenBank 登记编号 Z49092.1 的 *Nm* 菌株序列相似度为 94%~100%,进化树分析可分为两簇; C 群 *Nm* 菌株与其他血清群菌株 IS1301 序列存在较大差别;研究的 *Nm* 菌株基因组中至少存在 6~17 个 IS1301 拷贝,相同 PFGE 带型 *Nm* 菌株所携带的 IS1301 拷贝数具有多态性特征。结论 IS1301 在中国 *Nm* 菌株中的分布具有遗传多态性。

【关键词】 脑膜炎奈瑟菌; 插入序列 IS1301; 脉冲场凝胶电泳; 核酸印迹杂交

Distribution and molecular epidemiologic characteristics of insertion sequence IS1301 in *Neisseria meningitidis* isolated from China PANG Xing-lin*, HOU Pei-bin, GAO Yuan, XU Li, REN Hong-yu, ZHU Bing-qing, ZHOU Hai-jian, SHAO Zhu-jun. *Guangzhou Center for Disease Control and Prevention, Guangzhou 510080, China

Corresponding author: SHAO Zhu-jun, Email: shozhujun@icdc.cn

【Abstract】 Objective To research the distribution and molecular epidemiology of insertion sequence IS1301 in *Neisseria (N.) meningitidis* strains in China, so as to provide scientific and available evidence for a new method of genotyping in *N.meningitidis* strains with IS1301. Methods Examined the IS1301 by PCR in 219 *N.meningitidis* strains from 16 provinces and 3 cities during 2007 and 2008 in China, productions of amplification were sent for sequencing. The positive *N.meningitidis* strains were analyzed by pulse field gel electrophoresis (PFGE) and nucleic acid blotting hybridization (Southern blot) by electrophoresis. Results The positive rates with IS1301 were 15.53%, 11.11%, 20.75%, 6.17% and 28.57% for four serotypes (A, B, C, N) respectively. The sequence comparability between the amplification productions and No.Z49092.1 *N.meningitidis* which registered in GenBank was 94%~100%. There were two types of clusters devided by cladogram analysis. There appeared large IS1301 sequence difference between the serotype C and others. The number of IS1301 replica ranged from 6~17 per strain at least. The number of IS1301 replica changed in the same type of PFGE *N.meningitidis* respectively. Conclusion Typing by IS1301 combined with PFGE could comprehend the homology and genetic polymorphism of *N.meningitidis* epidemic strains at the molecular level.

【Key words】 *Neisseria meningitidis*; Insertion sequence 1301; Pulse field gel electrophoresis; Southern blot

插入序列(insertion sequence, IS)在基因组中的插入、删除、形成整合子等转座作用可对基因组产生多种影响,包括可造成基因沉默、基因敲除、下游基

因表达发生变化使菌株形成多样性,并有助于一部分菌株适应环境的变化^[1]。插入序列 IS1301 仅在脑膜炎奈瑟菌(*Neisseria meningitidis*, *Nm*)中有报道,分类为 IS5 家族 IS427 群^[1], IS1301 大小为 842 bp,两端各有 19 bp 的反向重复序列,内有 3 个碱基错配。*Nm* 具有高频重组的遗传学特征^[2], IS1301 的插入对 *Nm* 的基因组可产生多种影响,本研究对 219 株中国不同血清群的 *Nm* 进行 IS1301 分子分型研究,以了解中国 *Nm* 菌株中 IS1301 的分布与流行病学特征。

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2009.05.015

作者单位: 510080 广州市疾病预防控制中心(庞杏林); 山东省疾病预防控制中心(侯配斌); 中国疾病预防控制中心传染病预防控制所传染病预防控制国家重点实验室(高源、徐丽、任红宇、朱兵清、周海健、邵祝军)

通信作者: 邵祝军, Email: shaozhujun@icdc.cn

材料与与方法

1. 实验菌株: 219 株 *Nm* 来自 2007 年 1 月至 2008 年 10 月我国 16 个省、市、自治区流行性脑脊髓膜炎(流脑)监测网, 包括患者分离株和健康人群携带株。219 株 *Nm* 包括 A 群 54 株, B 群 53 株, C 群 81 株, H 群 1 株, W₁₃₅ 群 2 株, X 群 4 株, Y 群 3 株和不可分群 21 株。

2. 主要试剂与仪器: 巧克力培养基为广州迪景公司提供, API NH 生化鉴定试剂盒为法国梅里埃公司产品, *Nm* 分群血清由美国 Remel 公司生产; DNA 提取试剂盒和 PCR 产物纯化试剂盒均由德国 Qiagen 公司生产; 紫外分光光度计为 Eppendorf Biophotometer; Taq 酶和 dNTPs 购自 TaKaRa 生物公司, 100 bp DNA 梯度 Marker 由北京全式金生物技术公司提供, 琼脂糖为 Bio-instrument YITO 公司产品; 引物由北京赛百盛公司合成。PCR 扩增仪为美国 Bio-Rad DNAEngine; 扩增产物测序由北京华大基因公司完成。Nhe I 酶和 Xba I 酶为 TaKaRa 生物公司产品, 蛋白酶 K 为 Merck 公司产品, 脉冲场电泳仪及 Gel Dos XR 成像系统均为美国 Bio-Rad 公司产品。Southern blot 用美国罗氏 DIG DNA Labeling and Detection 试剂盒, 采用英国 Amersham Biosciences 公司生产的 Hybond-N 尼龙膜, Southern blot 所用缓冲液、转移液和漂洗液用相关化学试剂分析纯根据文献[3]自行配制, 杂交用江苏太仓实验仪器生产的 DSHZ-300 型水浴恒温振荡仪。

3. 试验方法:

(1) 菌株提取 DNA: *Nm* 按常规方法分离、鉴定和血清分群, 用棉拭子收集巧克力平板上(经 5% CO₂, 37℃ 培养 18~24 h)的纯培养菌落, 洗脱于灭菌生理盐水中, 按照 Qiagen 试剂盒说明书, 提取 *Nm* 菌体的染色体 DNA, 用紫外分光光度计测定 DNA 浓度大于 100 μg/ml, -20℃ 保存。

(2) PCR 扩增引物^[4]: 上游引物序列 5' - GGG CGT GTC CCT AAT TTG A - 3', 下游引物序列 5' - GGG CGT GTC CTC AAT TTA AC - 3', 扩增体系包括 Taq 酶 0.3 μl, dNTP 4.0 μl, 10× Buffer 5.0 μl, 上下游引物浓度 10 μmol/L 各 1.0 μl, 模板 2.0 μl, 补足无菌纯水至 50 μl。反应条件为 94℃ 5 min, 94℃ 1 min, 56℃ 1 min, 72℃ 1 min, 30 个循环, 延伸 72℃ 5 min。取扩增产物 5 μl 在 1% 琼脂糖凝胶, 恒电压 5 V/cm, 电泳 45 min。电泳完毕用成像仪读胶。

(3) 脉冲场凝胶电泳(PFGE): 将 IS1301 阳性

Nm 菌株均匀洗脱于 200 μl CSB 溶液中, 菌液浓度调为 5.0 麦氏单位, 用蛋白酶 K 进行消化, 低熔点琼脂糖凝胶包埋消化过的 *Nm* 菌后, 倒入模具制成胶块, 切取 2 mm 宽度的胶块加入限制性内切酶 Nhe I, 在 37℃ 水浴中酶切 3 h。1% 低熔点琼脂糖凝胶电泳, 电压 6 V, 夹角 120°, 脉冲时间 1~25 s, 电泳 16 h, 沙门菌 H9812 作为分子质量对照。电泳完毕用成像仪读胶, 使用 BioNumerics version 4.0 软件, 选择 Dice 相关系数和 UPGMA 方法进行 PFGE 结果处理和聚类分析。

(4) Southern blot 杂交: 标记探针引物^[4], 上游引物 5' - TTG AGC TAG GGT CAT GG - 3', 下游引物 5' - AAA TCA GGG TTA GGT TTC TT - 3'。挑取一株阳性菌株的 DNA, 进行 PCR 扩增, 产物大小为 445 bp, 产物经纯化后标记地高辛制备探针, -20℃ 保存备用。经 PFGE 电泳完毕的胶块用 0.2 mol/L 的 HCl 脱嘌呤处理, 处理后用无菌纯水漂洗数遍, 再用虹吸印迹法进行碱性转移, PFGE 胶块上的 DNA 酶切片段经 16 h 转移印迹在尼龙膜上, 用预先制备的探针进行 Southern blot 杂交, 68℃ 杂交过夜后进行免疫检测和显色反应, 显色过夜后指纹图拍照保存。使用 BioNumerics version 4.0 软件, 选择 Dice 相关系数和 UPGMA 方法进行结果处理和聚类分析。

4. 序列分析: 扩增产物测序结果采用 NCBI Blast 进行同源性比较。运用 DNASTAR, MegAlign 分析软件对检出序列进行进化树分析。

5. 统计学分析: 采用统计软件 SPSS 10.0 进行统计分析, 阳性率的显著性检验用 χ^2 检验, 检验水平 $\alpha=0.05$ 。

结 果

1. IS1301 的血清群分布: 219 株 IS1301 PCR 扩增阳性菌株为 34 株(15.53%), 分布于血清群 A、B、C、H、X、Y 群和不能分群菌株中, IS1301 阳性率分别为 A 群 11.11% (6/54)、B 群 20.75% (11/53)、C 群 6.17% (5/81) 和不可分群 28.57% (6/21), 这 4 个血清群的 IS1301 阳性率差异有统计学意义($\chi^2=295.96$, $P<0.001$)。3 株 Y 群 *Nm* 均检出 IS1301, 2 株 W₁₃₅ 群 *Nm* 未检出 IS1301(表 1)。

2. IS1301 的地区分布: 34 株 IS1301 PCR 扩增阳性 *Nm* 菌株来自 13 个省、市、自治区(表 2)。

3. IS1301 扩增产物测序分析: 采用 NCBI Blast 进行同源性比较 IS1301 扩增序列, 分别与 GenBank 登记编号为 Z49092.1 的 *Nm* 菌 IS1301 比较, 相似度

表 1 34 株 IS1301 PCR 阳性 *Nm* 菌株的来源、血清群及插入拷贝数

菌株编号	血清群	分离地区	标本来源	IS1301 拷贝数	菌株编号	血清群	分离地区	标本来源	IS1301 拷贝数
210714	A	辽宁	健康人群(咽拭)	13	330715	C	浙江	健康人群(咽拭)	13
210715	A	辽宁	健康人群(咽拭)	7	420802	C	湖北	患者(血液)	12
150716	A	内蒙古	健康人群(咽拭)	13	330722	C	浙江	健康人群(咽拭)	10
420716	A	湖北	健康人群(咽拭)	12	210717	C	辽宁	患者(血液)	6
310810	A	上海	患者(咽拭)	12	360813	C	江西	健康人群(咽拭)	7
310811	A	上海	健康人群(咽拭)	12	510701	H	四川	健康人群(咽拭)	12
310803	B	上海	患者(咽拭)	7	640706	X	宁夏	健康人群(咽拭)	16
440715	B	广东	健康人群(血液)	8	420815	X	湖北	健康人群(咽拭)	12
440705	B	广东	健康人群(咽拭)	10	630804	Y	青海	健康人群(咽拭)	13
440707	B	广东	健康人群(咽拭)	13	630802	Y	青海	健康人群(咽拭)	13
420702	B	湖北	健康人群(咽拭)	13	630805	Y	青海	健康人群(咽拭)	17
420703	B	湖北	健康人群(咽拭)	10	640705	N	宁夏	健康人群(咽拭)	9
130816	B	河北	健康人群(咽拭)	8	150704	N	内蒙古	健康人群(咽拭)	17
310822	B	上海	患者(血液)	12	420713	N	湖北	健康人群(咽拭)	15
330740	B	浙江	健康人群(咽拭)	7	640702	N	宁夏	健康人群(咽拭)	13
360822	B	江西	健康人群(咽拭)	8	340708	N	安徽	患者(血液)	14
360856	B	江西	健康人群(咽拭)	6	520701	N	贵州	健康人群(咽拭)	11

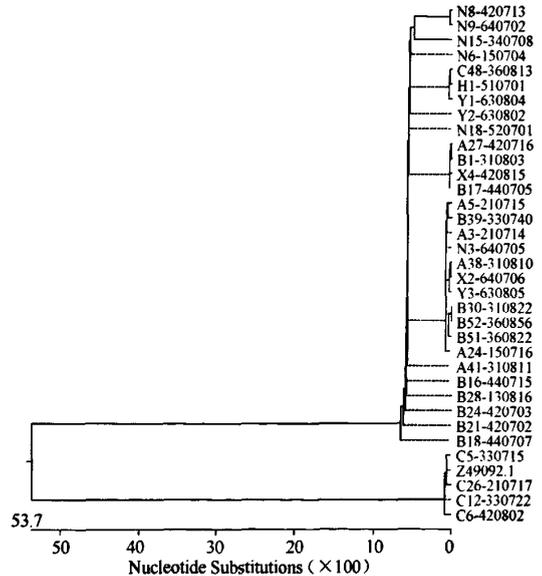
注: N 为不可分群

表 2 34 株 IS1301 PCR 扩增阳性 *Nm* 菌株的地区分布

分离地区	血清群(菌株数)							合计*
	A	B	C	H	X	Y	N	
辽宁	2	0	1	0	0	0	0	3/10
广东	0	3	0	0	0	0	0	3/8
青海	0	0	0	0	0	3	0	3/5
上海	2	2	1	0	0	0	0	5/22
浙江	0	1	2	0	0	0	0	3/23
湖北	1	2	1	0	1	0	1	6/9
宁夏	0	0	0	0	1	0	2	3/8
江西	0	2	0	0	0	0	0	2/38
内蒙古	1	0	0	0	0	0	1	2/11
河北	0	1	0	0	0	0	0	1/1
四川	0	0	0	1	0	0	0	1/8
安徽	0	0	0	0	0	0	1	1/11
贵州	0	0	0	0	0	0	1	1/14

注: 同表 1; *阳性株数/检测株数

为 94% ~ 100%。用 DNASTAR, MegAlign 分析软件对 IS1301 序列进行进化树分析(图 1)。34 株 *Nm* 可聚类为两簇, 簇间相似度为 53.7%, 其中 5 株 C 群 *Nm* 中的 4 株菌(80%) 与 Z49092.1 聚类一簇, 其余 30 株 *Nm* 聚类为一簇。C 群 *Nm* 菌株的 IS1301 序列有别于其他 *Nm* 血清群, 4 株聚类为一簇的 C 群 *Nm* 的 IS1301 5' ~ 3' 序列中的 401 ~ 404 bp 处带有“-TGTC-”4 个碱基, 而其他 30 株 *Nm* 缺失此 4 个碱基, 同时在 498 ~ 502 bp 和 620 ~ 624 bp 处还分别缺失 4 个碱基“-GACA-”和 5 个碱基“-TTCC-”, 除此之外, C 群的 IS1301 序列还存在多处的 1 个碱基丢失或者错配。



注: 字母分别代表 *Nm* 血清群 A、B、C、H、X、Y 群, N 为不可分群; 横线前数字为实验序号, 后为菌株编号; Z49092.1 为 GenBank 登记的 *Nm* 序列号

图 1 34 株 *Nm* 携带 IS1301 序列进化树分析

4. PFGE 聚类分析: IS1301 阳性 *Nm* 菌株 PFGE 聚类分析见图 2。浙江、江西和湖北省的 3 株 C 群 *Nm* 与 1 株不可分群 *Nm* 相似度为 100%, 可以认为此 4 株不同地区的 *Nm* 为同一来源株, 均携带有 IS1301 的插入。另外相同地区相同血清群的 *Nm* 有来自上海的 2 株 A 群 *Nm* 相似度为 100%, 辽宁 2 株 A 群 *Nm* 相似度为 100%, 青海的 2 株 Y 群 *Nm* 相似度为

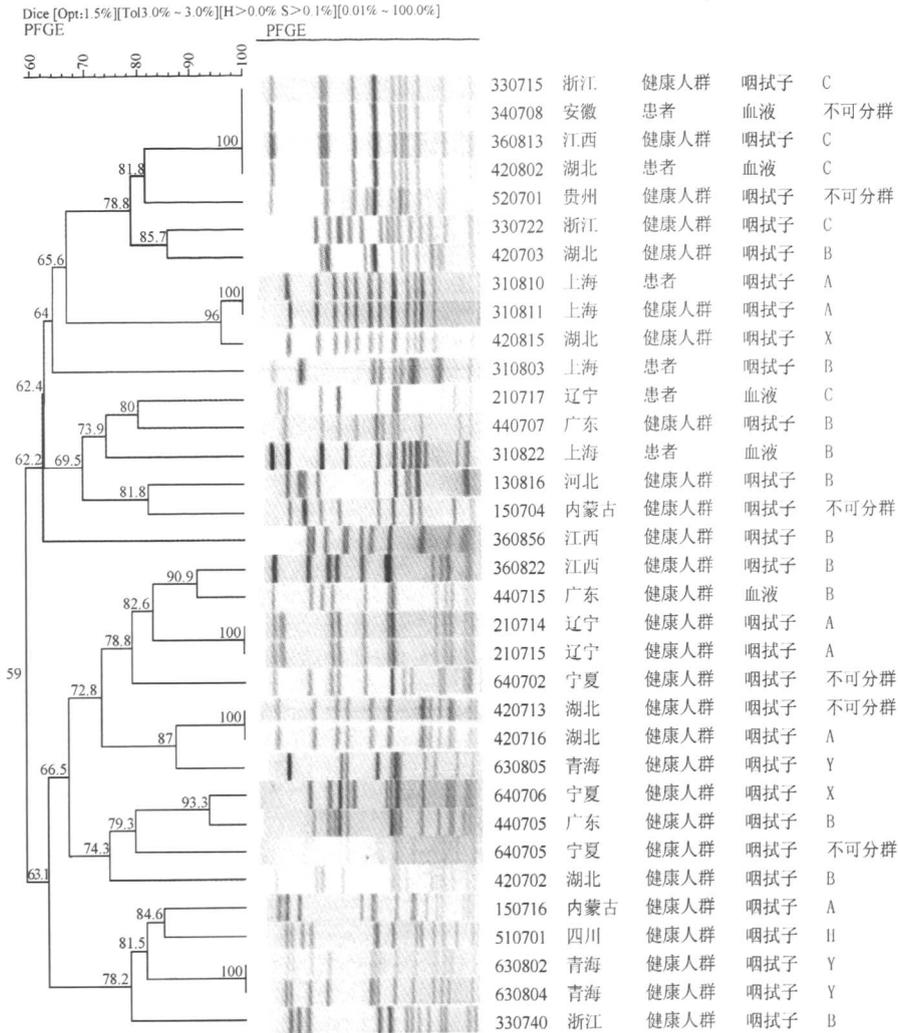
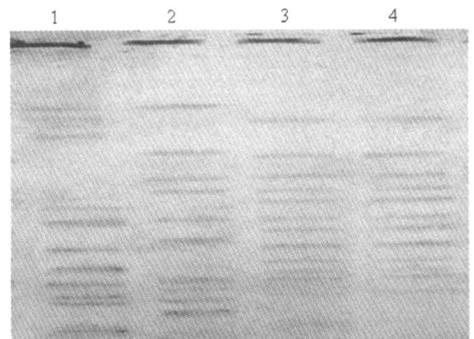


图2 IS1301阳性Nm菌株PFGE聚类分析

100%。来自湖北的1株A群与1株不可分群Nm相似度为100%，可以认为该不可分群Nm属于A群，且两株Nm为同源株。

5. Southern blot杂交: 34株IS1301阳性Nm菌株PFGE胶块上的DNA大分子酶切片段能与IS1301特异探针进行杂交, Southern blot杂交指纹图谱见图3。根据杂交结果, 在Nm基因组中至少存在6~17个IS1301拷贝, 34株IS1301阳性Nm菌株中IS1301拷贝数见表1。

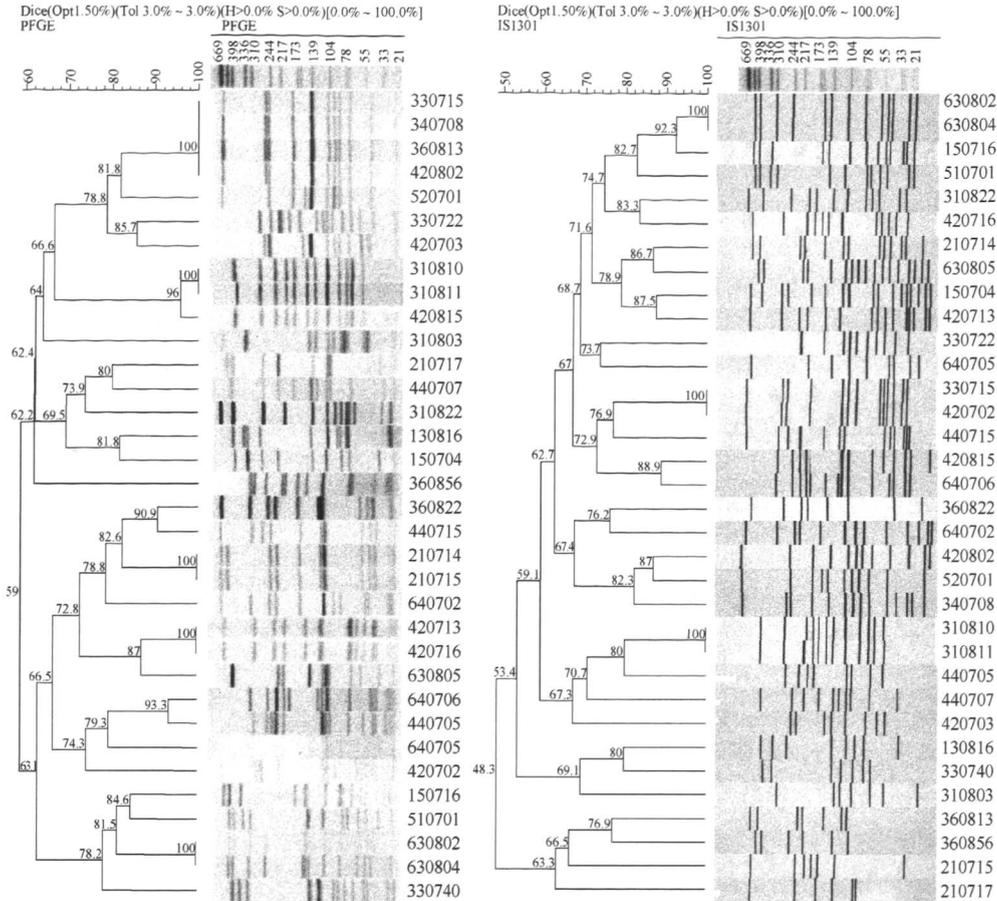
6. PFGE与Southern blot聚类分析比较: 34株IS1301阳性Nm菌株PFGE与Southern blot聚类分析比较见图4, 结果表明具有相同的PFGE带型Nm所携带的IS1301拷贝数不一定相同, 但也存在两者完全相同的Nm菌株, 来自青海的2株Y群Nm的PFGE带型与杂交带型完全一致, 上



注: 1、2为两株携带不同拷贝数的Nm基因组; 3、4为两株携带相同拷贝数而且分布所在酶切条带也相同的Nm基因组

图3 部分IS1301阳性Nm菌株PFGE的Southern blot指纹图

海的2株A群Nm中PFGE带型与IS1301杂交带型也是一致的。



注:左图为 PFGE 聚类分析,右图为 Southern blot 所得的 IS1301 拷贝数与分布聚类分析;分子质量标准用 H9812,分子质量大小单位为 kb
 图 4 34 株 IS1301 阳性 *Nm* 菌株 PFGE 与 Southern blot 聚类分析比较

讨 论

研究结果显示,219 株 *Nm* IS1301 总阳性率为 15.53%,其中 A、B、C 群和不可分群的阳性率分别为 11.11%、20.75%、6.17% 和 28.57%。虽然 H、X 和 Y 群的群内总体样本数过少,其阳性率的差异无统计学意义,但是所检测的 3 株 Y 群菌株均为 IS1301 扩增阳性,结果与 Hilse 等^[2]对 118 株 *Nm* 进行 IS1301 筛查的结果相近,Hilse 等发现约 30% 的 B、C 和 W₁₃₅ 血清群的菌株含有 IS1301,而在 Y 群中这一比例高达 86.7%。Hilse 等随后对 496 株不同血清群的分析表明,IS1301 总阳性率为 12.9%,A、B 和 C 群阳性率为 13% ~ 27%,在 W₁₃₅、29E、Y 群中,阳性率为 46% ~ 89%^[5]。实验仅对 2 株 W₁₃₅ 群 *Nm* 进行检测,虽然结果阴性,但不能说明在我国 W₁₃₅ 群 *Nm* 中的分布状况,鉴于国外报道存在 W₁₃₅ 群 *Nm* 中的阳性率较高,今后应累积我国 W₁₃₅ 群 *Nm* 样本后进行的研究。*Nm* 血清分群依据是以菌体荚膜多糖分型,结果显示,不

可分群 *Nm* 携带 IS1301 阳性率最高(28.57%),而 IS1301 的插入可以导致菌体荚膜合成和转运表达变异,IS1301 的插入显然影响了部分 *Nm* 的血清分群,导致出现不可分群的 *Nm* 菌株。根据 PFGE 的结果显示,来自湖北的一株不可分群 *Nm* 与另一株 A 群 *Nm* 为同源株,更加说明 IS1301 的插入可以影响部分 *Nm* 的血清分群。

本研究结果显示,血清 C 群 *Nm* 所携带的 IS1301 与其他血清群 IS1301 序列某些位点的碱基有较大差别,存在与其他血清群的 IS1301 遗传多样性,这是否成为 C 群 *Nm* 菌株上升为我国流脑主要的致病菌群的原因之一还有待深入研究。以往我国健康人群鼻咽部携带 *Nm* 菌株以 A、B 群为主要的血清群,C 群菌株构成比例很小,目前 C 群流脑在我国已经逐渐成为流行的优势菌群^[6]。*Nm* 是寄居于人体的变异最大的细菌之一,是一种重要模式微生物,具有小而多变的基因组^[7]。*Nm* 种内和种间的基因水平转移是其遗传多样性的来源^[8,9]。Hilse 等^[5]研究发

现, IS1301 插入位点序列特征为 5'-ACTAG-3' 和 5'-ATTAG-3' 的序列特征, 是最常见的插入位点序列, 二者合称为 5'-AYTAG-3' 插入特征序列。本研究在 C 群 *Nm* 的 IS1301 序列与其他血清群的 IS1301 序列发现了差异性, 那么很可能也存在插入位点和上下游遗传基因表达的差异性。我国 C 群 *Nm* 的 IS1301 插入位点特征、IS1301 基因分布及其插入后对上下游基因表达调控和影响等功能就是今后研究的方向之一。

本文 34 株携带 IS1301 的 *Nm* 基因组中, 至少存在 6~17 个 IS1301 的拷贝, 比有关文献报道数字多。德国的 Elias 和 Vogel^[4] 用 RFLP 结合 Southern blot 对 IS1301 在基因组中的拷贝数和分布情况构成的指纹图谱对流脑 ET-15 克隆株进行分型, 发现 IS1301 在基因组中的拷贝数为 6~12。这可能与两种方法所用的酶切条件不相同有关, 酶切片段不同所能检测的目的片段拷贝数有所不同, 另外 Elias 和 Vogel 的研究只限于流脑 ET-15 克隆株, 而本实验所研究的菌株来自多个血清群, 涵盖的范围较广。研究还发现具有相同 PFGE 带型的 *Nm* 所携带的 IS1301 拷贝数不尽相同, 但同时也存在两者完全相同的 *Nm* 菌株。由此, 对于同一地区或者不同地区同一时期的 *Nm* 流行菌株, 用 PFGE 结合 IS1301 分型更能从分子水平上说明流行菌株的同源性遗传多

态性, 有利于流脑暴发时的病原溯源研究。

参 考 文 献

[1] Mahillon J, Chandler M. Insertion sequences. *Microbiol Mol Biol Rev*, 1998, 62:725-774.
 [2] Hilse R, Hammerschmidt S, Bautsch W, et al. Site-specific insertion of IS1301 and distribution in *Neisseria meningitidis* strains. *J Bacteriol*, 1996, 178(9):2527-2532.
 [3] J. 萨姆布鲁克, D.W. 拉塞尔, 著. 黄培堂, 等译. 分子克隆实验指南. 3 版. 北京: 科学出版社, 2002:492-495.
 [4] Elias J, Vogel U. IS1301 fingerprint analysis of *Neisseria meningitidis* strains belonging to the ET-15 clone. *J Clin Microbiol*, 2007, 45(1):1159-1167.
 [5] Hilse R, Stoevesandt J, Caugant DA, et al. Distribution of the meningococcal insertion sequence in clonal lineages of *Neisseria meningitidis*. *Epidemiol Infect*, 2000, 124(1):337-340.
 [6] 邵祝军, 徐丽, 高源, 等. 中国流行性脑脊髓膜炎流行菌群变化趋势分析. *中国计划免疫*, 2007, 13(6):541-544.
 [7] Davidsen T, Tonjum T. Meningococcal genome dynamics. *Nat Rev Microbiol*, 2006, 4(1):11-22.
 [8] Claus H, Stoevesandt J, Frosch M, et al. Genetic isolation of meningococci of the electrophoretic type 37 complex. *J Bacteriol*, 2001, 183(8):2570-2575.
 [9] Maiden MC, Malorny B, Achtman M. A global gene pool in the neisseriae. *Mol Microbiol*, 1996, 21(6):1297-1298.

(收稿日期:2009-02-09)

(本文编辑:张林东)

· 征 稿 通 知 ·

第九届全军防生物危害医学专业学术会议征文

为进一步扩大全军防生物危害医学专业学术交流, 研讨该学科领域国内外最新研究进展, 以推动全军防生物危害医学不断发展, 全军防生物危害医学专业委员会定于 2009 年 8 月在广西桂林召开“第九届全军防生物危害医学专业学术会议”, 会议由军事医学科学院微生物流行病学研究所病原微生物安全国家重点实验室承办。会议届时将邀请全军知名防生物危害医学专家作专题报告。为进一步做好会议准备, 提高会议的学术交流水平, 现公开征集会议论文。会议热忱欢迎防生物危害医学专家和从事相关工作的同道踊跃投稿, 积极参加交流。

1. 征文内容: 防生物危害医学各方面的研究成果和经验技术, 主要包括防生物危害医学的最新进展和成果、部队在生物危害医学防护方面的技术和措施, 以及在生物反恐、生物安全管理等方面经验总结等。

2. 征文要求: (1) 未公开发表的论文或论文摘要(论文限 5000 字以内, 摘要限 400 字); (2) 文稿全文采用 word 文本, 来稿以 A4 纸打印一份, 请注明作者和联系地址(含所属单位、电话、Email), 来稿请注明“全军防生会征文”, 同时请提交电子版文档; 纸质稿件请寄: 100071 北京市丰台区东大街 20 号五所科技处韩晓娜收, 电子投稿: hanxn929@126.com, 联系电话/传真: 010-63897954; (3) 来稿请附单位论文投稿介绍信; (4) 征文截止日期: 2009 年 5 月 31 日。