

文章编号:1000-0615(2007)03-0317-06

斑点叉尾鲟源嗜麦芽寡养单胞菌胞外蛋白酶的纯化及性质研究

黄小丽, 汪开毓, 耿毅, 苏秀梅, 陈德芳
(四川农业大学动科院鱼病研究中心, 四川 雅安 625014)

摘要:采用硫酸铵盐析, DEAE Sephadex A-50 凝胶层析等方法从嗜麦芽寡养单胞菌胞外产物中提纯了一种分子量为 45.7 ku 的单一多肽蛋白酶。该酶对小鼠和斑点叉尾鲟具有明显的致死作用, 其 LD₅₀ 分别为 4.33 μg·g⁻¹ 体重和 3.49 μg·g⁻¹ 体重。酶的最适温度为 20 ℃, 热稳定性差, 100 ℃ 作用 15 min 酶活完全丧失, 最适 pH 为 9.0, PMSF 对酶活无影响, 部分金属离子如 Ca²⁺、Hg²⁺、Cu²⁺ 能使酶活性明显下降, 而 Co²⁺ 对酶有一定程度的激活作用, EDTA 能完全抑制酶活性, 表明该酶为一种金属蛋白酶。

关键词:斑点叉尾鲟; 嗜麦芽寡养单胞菌; 胞外蛋白酶; 纯化; 性质

中图分类号:S 943 **文献标识码:**A

Purification and characterization of extracellular protease of *Stenotrophomonas maltophilia* isolated from *Ictalurus punctatus*

HUANG Xiao-li, WANG Kai-yu, GENG Yi, SU Xiu-mei, CHEN De-fang
(Fish Disease Research Center of Sichuan Agricultural University, Sichuan Ya'an 625014, China)

Abstract: A strain of *Stenotrophomonas maltophilia* was isolated from the diseased *Ictalurus punctatus* of a fishfarm in Sichuan province, and an extracellular protease was partially purified from the culture solution of the *S. maltophilia* by ammonium sulfate and DEAE Sephadex A-50 fast flow. The result showed that the molecular weight of the purified protease from *Ictalurus punctatus* by SDS-PAGE was 45.7 ku. The purified protease was injected to rats and *Ictalurus punctatus* intraperitoneally. It resulted in heavy fatalities. The LD₅₀ of extracellular protease to rats and *Ictalurus punctatus* were 4.33 μg·g⁻¹ and 3.49 μg·g⁻¹ respectively. It showed that the optimal temperature was 20 ℃ and the optimal pH was 9.0. PMSF couldn't affect the activity but EDTA, Ca²⁺, Hg²⁺, Cu²⁺ could reduce the activity of protease greatly. However, Co²⁺ could enhance the activity. It demonstrated that the protease was a metal-protease.

Key words: *Ictalurus punctatus*; *Stenotrophomonas maltophilia*; extracellular protease; purification; characterization

嗜麦芽寡养单胞菌 (*Stenotrophomonas maltophilia*) 或嗜麦芽黄单胞菌 (*Xanthomonas maltophilia*)^[1], 为一种需氧非发酵

收稿日期: 2006-10-17

资助项目: 农业部渔业局资助

作者简介: 黄小丽 (1979-), 重庆铜梁人, 博士研究生, 从事水生动物病害学的研究。Tel: 0835-2885753, E-mail: hxldyq@126.com

通讯作者: 汪开毓, Tel: 0835-2885753, E-mail: kywang@sicau.edu.cn

条件致病菌,广泛分布于自然界,是医院感染的重要病原^[2],能引起人出血性肺炎,心内膜炎,败血症等,可导致较高的死亡率^[3]。近年来发现,该菌的感染范围在不断扩大,不仅感染人,对动物和植物也可感染^[4-5]。在水生动物感染致病上也有陆续报道,包括卵形鲳^[6]、闭壳龟^[7]和鳄鱼^[8]在内的多种水生动物均可感染致病。自2004年以来,我们首次发现该菌感染网箱养殖的斑点叉尾鲷,相继在四川、重庆、贵州及湖北等地出现一种以肠套叠为特征的嗜麦芽寡养单胞菌感染引起的大规模死亡^[9-10],此病危害极大,从2004年至今,已经连续几年造成了大批斑点叉尾鲷发病死亡,据不完全统计,仅2005年,其直接经济损失就达800多万元,并有越演越烈的趋势,严重地威胁着斑点叉尾鲷养殖的健康发展。故研究该菌的致病机理,并制定相应的防治措施成了阻断该病继续发展的当务之急。

胞外蛋白酶(extracellular protease)是嗜水气单胞菌、霍乱弧菌、创伤弧菌等许多细菌病原的毒力因子。Alberto^[11]等从嗜水气单胞菌内提纯了一胰蛋白酶,可引起虹鳟出血性败血症及各组织器官的广泛坏死。Farto从海利斯顿氏菌中提纯到一分子量为39 ku的胞外蛋白酶,对比目鱼具有致死性,其LD₅₀为1.77 mg·g⁻¹鱼体重^[12]。有报道表明,医源嗜麦芽寡养单胞菌可产多种胞外酶^[13],其中胞外蛋白酶是其主要的致病因子之一^[14]。但斑点叉尾鲷源嗜麦芽寡养单胞菌胞外蛋白酶是否是感染斑点叉尾鲷的一重要毒力因子,该酶的酶学性质如何等均未见报道。本研究从嗜麦芽寡养单胞菌胞外产物中分离纯化了一种单一多肽蛋白酶,并进行了酶的理化性质研究,旨在为探讨该菌胞外产物对鱼类组织损伤及致病作用的机制提供基础资料。

1 材料与方 法

1.1 材 料

试验菌株 致病性菌株分离自四川某养殖场网箱养殖斑点叉尾鲷,经细菌形态学,生理生化及16S RNA鉴定为嗜麦芽寡养单胞菌。

实验动物及主要试剂 小鼠,平均体重25 g,购自四川大学华西动物试验中心;斑点叉尾鲷平均体重50 g,购自四川斑点叉尾鲷养殖基地。DEAE Sephadex A-50 购自 Whatman 公司;SDS、丙

稀酰胺、双丙稀酰胺购自成都玛柯特生物科技有限公司;偶氮酪蛋白购自厦门泰尔生物技术有限公司。

1.2 试验方法

细菌胞外产物提取 将保种的嗜麦芽寡养单胞菌接种培养于20 mL TSB 液体培养基中,20 ℃,120 r·min⁻¹振荡培养48 h,再将已培养生长良好的菌液接入480 mL TSB 液体培养基中,20 ℃,120 r·min⁻¹继续振荡培养48 h,菌液4 ℃ 3000 r·min⁻¹离心30 min,上清液经0.22 μm 微孔滤膜除菌后即为所需的细菌胞外产物。

胞外蛋白酶的分离纯化 **硫酸铵盐析:**将制得的胞外产物中加入硫酸铵至70%的饱和度,4 ℃盐析过夜,4 ℃ 4000 r·min⁻¹离心30 min,弃上清,沉淀用20 mL 0.05 mol·L⁻¹ pH 7.4 Tris-HCl 溶解,4 ℃透析过夜。

DEAE Sephadex A-50 层析:填料装柱后用0.05 mol·L⁻¹ pH 7.4 Tris-HCl 平衡,将透析后的样品过0.22 μm 滤膜后上样,用含0~0.6 mol·L⁻¹ NaCl 的相同缓冲液洗脱,流速0.3 mL·min⁻¹,每管3 mL,收集洗脱液,于紫外分光光度计下测定A₂₈₀值和每管的酶活力,绘制洗脱峰。收集酶活峰,浓缩后进行SDS-PAGE电泳,测定酶的纯度和大小。

蛋白酶活力测定 参照Allan和Stevenson的方法稍加改进^[15]。以偶氮酪蛋白为底物,在试剂中分别加入0.05 mol·L⁻¹ pH 7.4 Tris-HCl 缓冲液1.15 mL,酶样品0.05 mL,偶氮酪蛋白0.05 mL,混匀,30 ℃保温30 min,立即加入5%三氯醋酸1.25 mL,室温放置20 min后,4 000 r·min⁻¹离心10 min,取上清液1 mL与2 mL 1 mol·L⁻¹ NaOH 混合,于440 nm处测定其分光光度值,在此测定条件下,以样品每增加0.001吸光度值为一个酶活单位。

蛋白酶性质研究 **蛋白含量的测定:**利用考马斯亮蓝法测定各样品蛋白质含量。

SDS-PAGE 电泳分析:DEAE Sephadex A-50 层析后,分别收集酶活峰,采用SDS-PAGE电泳法分析蛋白纯度及分子量,浓缩胶5%,分离胶12.5%,考马斯亮蓝R-250染色。低分子量标准蛋白与样品在同一条件下进行电泳。外界条件及抑制剂对酶的影响:温度,pH,PMSF、EDTA及金属离子对酶活的影响参照Herbert等^[16]的方法进

行。以相同条件下未做处理的酶活作为 100%，分析不同处理后的残余酶活力。

提纯蛋白酶的致病性研究:将纯化的蛋白酶用 0.22 μm 微孔滤膜除菌后,用无菌 0.05 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ pH 7.4 Tris-HCl 倍比稀释后腹腔注射小鼠 [每只体重(25 \pm 2) g,购自四川大学华西动物试验中心]和斑点叉尾鲷 [每尾(50 \pm 5) g,购自四川斑点叉尾鲷养殖基地],每个稀释度 0.5 mL,每组 10 只(尾),观察记录 7 d 内死亡数,记录症状及死亡率,根据寇氏法计算 LD_{50} ,以灭菌洗脱液做对照。

2 结果

2.1 嗜麦芽寡养单胞菌胞外蛋白酶的分离纯化
各步骤提纯及回收率见表 1。

2.2 SDS-PAGE 测定胞外蛋白酶分子量

收集 DEAE Sephadex A-50 层析后的酶活峰,经 SDS-PAGE 电泳,考马斯亮蓝 R250 染色后发现 DEAE Sephadex A-50 层析后的酶活峰为一提纯的分子量为 45.7 ku 的单一多肽蛋白质,观察结果如图 1。

表 1 嗜麦芽寡养单胞菌胞外蛋白酶的纯化

Tab.1 Purification of extracellular protease of *Stenotrophomonas maltophilia*

纯化步骤 purification process	体积(mL) volume	总蛋白(mg) total protein	总活力(U) total activity	比活力($\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$) specific activity	纯化倍数 relative purification
细菌发酵液 culture filter	500	113	7.4×10^4	6.55×10^2	0
硫酸铵盐析 ammonium sulfate	20	35.04	1.84×10^5	5.24×10^3	8.0
DEAE Sephadex A-50 柱层析 DEAE Sephadex A-50 fast flow	10	11.21	0.92×10^5	8.22×10^3	12.5

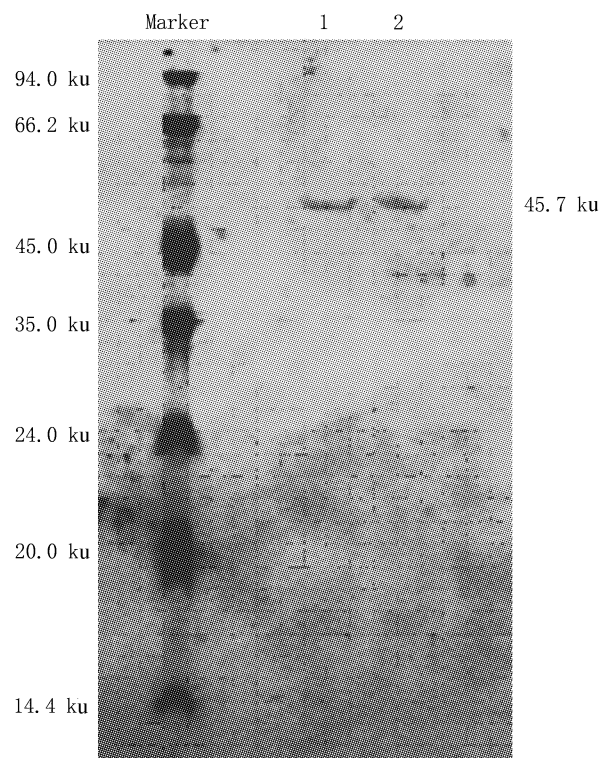


图 1 SDS-PAGE 电泳测定嗜麦芽寡养单胞菌胞外蛋白酶的分子量

Fig.1 Molecular weight analysis of protease from *S. maltophilia* by SDS-PAGE

1,2.提纯的蛋白酶

1,2.purified extracellular protease

2.3 嗜麦芽寡养单胞菌胞外蛋白酶的性质

温度对酶活的影响 温度对酶活影响较大,20 $^{\circ}\text{C}$ 时酶活性最高,酶在 50 $^{\circ}\text{C}$ 时作用 15 min,其酶活降到对照组的 60%,在 70 $^{\circ}\text{C}$ 作用 30 min,其酶活仅为对照组的 11.6%,而当在 100 $^{\circ}\text{C}$ 下作用 15 min,酶活完全丧失。

pH 对酶活的影响 pH 对酶活的影响较明显。pH 偏碱性时酶活较高,当 pH 达 9.0 时,酶活达到最高,此后酶活逐渐降低,当 pH 为 13.0 时,酶活性下降到最高时的一半,与 pH 3.0 时相当。

PMSF、EDTA 及金属离子对酶活的影响
纯化的胞外蛋白酶经 EDTA 作用后酶活被明显抑制,当 EDTA 浓度为 25 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 使,其酶活几乎完全丧失,仅为对照组的 4.6%。而 PMSF 对酶活的影响较小,当 PMSF 浓度高达 100 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,相对酶活仍有对照组的 94%,同时,不同金属离子对酶活的影响不同。 Ba^{2+} 、 Mn^{2+} 对酶活影响不大, Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Hg^{2+} 、 Cu^{2+} 和 Cd^{2+} 能显著降低酶活性,而 Co^{2+} 能使酶活性增强(表 2)。

提纯蛋白酶的致病性 将提纯的蛋白酶腹腔注射小鼠,小鼠出现不同程度的死亡,其 LD_{50} 为 4.33 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 体重。同时将提纯的胞外蛋白酶腹腔注射健康斑点叉尾鲷后也出现不同程度死亡现象,其 LD_{50} 为 3.49 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 体重。病鱼鳃丝肿胀;肝脏及肾脏肿大,质地脆,有大小不等的坏死区,

肝细胞肿胀,严重空泡变性,大量细胞溶解消失,出现不同程度的液化性坏死现象;肾小管上皮细胞严重空泡变性,细胞淡染,逐渐溶解,消失,隐约可见细胞轮廓。

表2 金属离子对嗜麦芽寡养单胞菌胞外蛋白酶活性的影响

Tab.2 The effect of metal ions on the activity of extracellular protease of *Stenotrophomonas maltophilia*

金属离子 metal iron	Mg ²⁺	Ca ²⁺	Hg ²⁺	Cu ²⁺	Cd ²⁺	Ba ²⁺	Mn ²⁺	Co ²⁺
剩余酶活(%) residual activity of protease	0	5.4	0	0	37.7	66.7	70.4	187.7

表3 嗜麦芽寡养单胞菌胞外蛋白酶腹腔注射斑点叉尾鲷死亡率

Tab.3 The death rate of channel catfish injected *S. maltophilia* extracellular protease intraperitoneally

组别 group	数量(尾) number	蛋白浓度(mg·mL ⁻¹) protein concentration	注射剂量(mL) inject volume	死亡数(尾) death	死亡率(%) death rate
1	10	0.860	0.5	10	100
2	10	0.430	0.5	6	60
3	10	0.215	0.5	2	20
4	10	0.108	0.5	0	0
对照 control	10	0	0.5	0	0

表4 嗜麦芽寡养单胞菌胞外蛋白酶腹腔注射小鼠死亡率

Tab.4 The death rate of mouse which injected *S. maltophilia* extracellular protease intraperitoneally

组别 team	小鼠数(只) number	蛋白浓度(mg·mL ⁻¹) protein concentration	注射剂量(mL) inject volume	死亡数(只) death	死亡率(%) death rate
1	10	0.860	0.5	10	100
2	10	0.430	0.5	10	100
3	10	0.215	0.5	8	80
4	10	0.108	0.5	4	40
5	10	0.054	0.5	2	20
6	10	0.027	0.5	0	0
对照 control	10	0	0.5	0	0

3 讨论

胞外蛋白酶是许多细菌的重要毒力因子。研究表明嗜水气单胞菌、鳃弧菌、溶藻弧菌等多种主要水产动物致病菌的胞外蛋白酶是其主要致病因子之一^[17-19]。有报道证实,医源嗜麦芽寡养单胞菌能产生胞外酶,如DNA酶、RNA酶、纤维蛋白溶酶、脂酶、透明质酸酶、蛋白酶和弹性蛋白酶等^[20-22],且这些酶在该菌感染致病中扮有重要角色^[23]。但鱼源嗜麦芽寡养单胞菌胞外蛋白酶的性质及致病机制还不是很清楚。本研究通过(NH₄)₂SO₄沉淀,DEAE Sphadex A-50色谱柱纯化得到一分子量为45.7 ku的单一多肽蛋白酶,具有热稳定性差,偏碱性环境酶活性高,不受PMSF影响,多种金属离子能严重降低其活性的特点,这与前人在人源嗜麦芽寡养单胞菌上提取到的胞外蛋白酶略有差异,如: Sabine等从人的洗胃装置上分离的嗜麦芽寡养单胞菌中提纯到一分子量为47

ku的蛋白酶^[24]。而de Toni等分离提纯到的蛋白酶为36 ku^[25]。究其原因,可能与病原菌的不同来源有直接关系。

对于该菌胞外蛋白酶的检测目前多采用脱脂奶平板法和底物水解法。其中脱脂奶平板法只能对蛋白酶做定性分析,而底物水解法可以对蛋白酶定量。本文采用的偶氮酪蛋白为底物,是目前很多学者研究蛋白酶定量分析的一种最有效的经典方法。虽然目前在医源嗜麦芽寡养单胞菌上也发现有蛋白酶的产生^[26],但对其编码基因的研究还很少,只有Sabine Windhorst对其进行过克隆测序^[24],因此,基因测序和基因表达的工作在该病的预防和亚单位疫苗的制作上将具有重大意义。

有大量报道证实胞外蛋白酶在细菌的致病性和毒力上发挥了重大的作用。将提纯的嗜水气单胞菌的胞外蛋白酶注射鲫,可引起明显的败血症,实验鱼出现大量死亡^[27]。同样,铜绿假单胞菌分泌的一种胞外蛋白酶IV是该菌重要的毒力因子,

也可造成严重的组织损伤^[28]。Sakai 发现杀鲑气单胞菌蛋白酶缺失变异株毒力大大减弱甚至无毒^[29]。本实验结果表明,嗜麦芽寡养单胞菌胞外蛋白酶对小鼠及斑点叉尾鲷具有明显的致死作用,在感染发病的斑点叉尾鲷上表现为肝肾肿大,间质水肿,实质细胞的变性、坏死等。说明提纯得到的 45.7 ku 的蛋白酶是嗜麦芽寡养单胞菌的一重要毒力因子,根据该酶易被 EDTA、Ca²⁺、Hg²⁺、Cu²⁺ 等金属离子抑制的特性,提示生产上可以利用 EDTA、钙制剂和硫酸铜等作为治疗药物,同时辅以蛋白抑制剂及变性剂如二氧化氯、聚维铜碘等消毒剂,对有效的控制该病的发生和有重要意义。

参考文献:

- [1] Palleroni N J, Bradbury J F. *Stenotrophomonas*, a new bacterial genus for *Xanthomonas maltophilia* (Hugh 1980) Swings *et al.* 1983[J]. *Int J Syst Bacteriol*, 1993, 43: 606.
- [2] Pathmanathan A, Waterer G W. Significance of positive *Stenotrophomonas maltophilia* culture in acute respiratory tract infection[J]. *Eur Respir J*, 2005,25:911-914.
- [3] Denton M, Kerr K G. Microbiological and clinical aspects of infection associated with *Stenotrophomonas maltophilia*[J]. *Clin Microb Rev*,1998,11(1):57-80.
- [4] Johnson E H, Busaidy R, Hameed M S. An outbreak of lymphadenitis associated with *Stenotrophomonas (Xanthomonas) maltophilia* in Omani goats[J]. *Journal of Veterinary Medicine Series B*,2003,50(2):102-104.
- [5] Singh N I, Swings I J, Devi R K T, *et al.* White stripe, a new disease of rice caused by *Stenotrophomonas maltophilia* in India[J]. *Indian Phytopathology*,2001,54(2):276.
- [6] 周永灿,朱伟华. 卵形鲳鲹大规模个体病原及其防治[J].*海洋科学*, 2001,(4):40-44.
- [7] 黄 斌,陈世峰.黄缘闭壳龟囊肿病的研究[J].*淡水渔业*, 2002,(5):44-46.
- [8] Harris N B, Rogers D G. Septicemia associated with *Stenotrophomonas maltophilia* in a West African dwarf crocodile (*Osteolaemus tetraspis* subsp. *tetraspis*) [J]. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 2001, 13(3):255-258.
- [9] 耿 毅,汪开毓,陈德芳,等.斑点叉尾鲷一株致病菌的分离、鉴定与系统发育分析[J].*微生物学报*,2006,46(4):28-31.
- [10] 耿 毅,汪开毓,黄小丽,等.一种斑点叉尾鲷急性暴发性细菌性传染病初报[J].*科学养鱼*,2005,(3):51-52.
- [11] Alberto C, Javier Y, Alejandro T, *et al.* A major secreted elastase is essential for pathogenicity of *Aeromonas hydrophila*[J]. *Infect Immun*, 2000,68:3233-3241.
- [12] Farto R, Perez M J, Fernandez-Briera A, *et al.* Purification and partial characterization of a fish lethal extracellular protease from *Vibrio pelagius* [J]. *Vet Microbiol*, 2002, 89(2-3):181-194.
- [13] Arella M, Sylvestre M. Production of an extracellular ribonuclease by *Pseudomonas maltophilia* [J]. *Can J Microbiol*, 1979;25:321-328.
- [14] Boethling R S. Regulation of extracellular protease secretion in *Pseudomonas maltophilia* [J]. *J Bacteriol*, 1975,123:954-961.
- [15] Allan B J, Stevenson R M N. Extracellular virulence factors of *Acromonas hydrophila* in fish infections [J]. *Canadian Journal of Microbiology*, 1981, 27: 1114 - 1121.
- [16] 周海梦,王洪睿.蛋白质化学修饰[M].北京:清华大学出版社,1988:19-49.
- [17] Chabot D J, Thune R L. P rotease of the *Aeromonas hydrophila* complex: identification, characterization and relation to virulence in channel catfish, *Ictalurus punctatus* [J]. *Journal of Fish Diseases*,1991,14:171-183.
- [18] 魏玉西,汪靖超,程殿林.鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*)胞外产物中蛋白酶的纯化及其性质[J].*应用与环境生物学报*,2002,8(4):414-418.
- [19] 张朝霞,王 军,苏永全,等.斑节对虾病原菌胞外产物的致病性研究[J].*海洋学报*,2000,22(5):94-99.
- [20] Arella M, Sylvestre M. Production of an extracellular ribonuclease by *Pseudomonas maltophilia* [J]. *Can J Microbiol*, 1979,25:321-328.
- [21] Boethling R S. Purification and properties of a serine protease from *Pseudomonas maltophilia* [J]. *J Bacteriol*, 1975,121:933-941.
- [22] Boethling R S. Regulation of extracellular protease secretion in *Pseudomonas maltophilia* [J]. *J Bacteriol*, 1975,123:954-961.
- [23] Bottone E J, Reitano M, Janda J M, *et al.* *Pseudomonas maltophilia* exoenzyme activity as a correlate in pathogenesis of *Ecthyma gangrenosum* [J]. *J Clin Microbiol*,1986,24:995-997.
- [24] Sabine W, Eva F, Kessislava N, *et al.* The major extracellular protease of the nosocomial pathogen *Stenotrophomonas maltophilia* [J]. *J Biol Chem*, 2002,

- 277(13):11042 - 11049.
- [25] de Toni C H, Richte M E, Chagas J R, *et al.* Purification and characterization of an alkaline serine endopeptidase from a feather-degrading *Xanthomonas maltophilia* strain[J]. *Can J Microbiol*, 2002, 48(4): 342 - 348.
- [26] Colum D, Yvan M L, Frans J, *et al.* Overproduction of an inducible extracellular serine protease improves biological control of *Pythium ultimum* by *Stenotrophomonas maltophilia* strain W81 [J]. *Microbiology*, 2000, 146: 2069 - 2078.
- [27] 储卫华, 陆承平. 嗜水气单胞菌胞外蛋白酶对鲫鱼的致病性[J]. *南京农业大学学报*, 2000, 23(2): 80 - 84.
- [28] Lee S E, James M H, Armando R. Protease IV, a unique extracellular protease and virulence factor from *Pseudomonas aeruginosa* [J]. *J Biol Chem*, 1998, 273(27): 16792 - 16797.
- [29] Sakai D K. Loss of virulence in a protease-deficient mutant of *Aeromonas salmonicida* [J]. *Infect Immun*, 1985, 48: 146 - 152.

会议预告

2007' 水产科技论坛

水产科技论坛是由中国水产科学研究院于2003年始创,其主要目的是为中国以及世界范围的科学家提供一个高水平的水产科技交流平台,并努力将之打造为中国与世界各国间的水产科技合作、以及世界各国科学家间共享研究体验与成果的新渠道。自2003年第一次成功主办了水产科技论坛后,该论坛已成为公认的重要的国际性的水产科技交流平台。2007' 水产科技论坛将锁定捕捞(捕捞技术、负责任的捕捞)、渔业资源与环境(渔业资源的可持续利用与保护、渔业环境与生态的维护和修复)、水产养殖(养鱼技术、遗传育种、营养与饲料、疾病防治)、水产品加工(加工技术、质量与安全)等议题进行交流与研讨。

联系方法: 100039 北京市永定路南青塔村150号中国水产科学研究院论坛秘书处

联系人: 陈欣然, 于瑞, 方平

电话: 010 - 68673921, 68673919

传真: 010 - 68673918, 68676685

E-mail: 07forum@cafs.ac.cn

2007' 水产科技论坛 国内人员注册表

姓名		性别	
职务职称		学位	
单位名称		邮编	
联系地址			
论文题目	中文:		
	英文:		
注册费		汇出日期	
E-mail			
传真		电话	
备注			

注: 注册表请通过传真或 E-mail 发至论坛秘书处