

颗粒裂解肽 G13 结构域在大肠杆菌中的高效融合表达

刘小强, 查向东, 肖亚中, 杨金环, 李能树

安徽大学生命科学学院 安徽省生态工程与生物技术重点实验室, 合肥 230039

摘要: 为高效表达颗粒裂解肽 G13 结构域并避免 G13 对宿主菌的毒性, 将人工合成的编码 G13 的基因片段, PCR 扩增后克隆于原核表达载体 pThioHisA 中, 构建了重组表达载体 pThioHisA-G13, 将其转化于大肠杆菌 BL21(DE3)中, 经 IPTG 诱导表达融合蛋白 Trx-G13, 表达产物以包涵体的形式存在, 其表达量约占细菌总蛋白的 58%。包涵体蛋白经 8 mol/L 尿素溶解后, 再经 CNBr 切割, 阳离子交换层析, 得到纯化的重组 G13 结构域。琼脂糖扩散法检测表明重组 G13 结构域多肽具有抗菌活性。

关键词: 颗粒裂解肽, G13 结构域, 融合表达, 阳离子抗菌肽

Efficient fusion expression of G13 domain derived from granulysin in *Escherichia coli*

Xiaoqiang Liu, Xiangdong Zha, Yazhong Xiao, Jinhuan Yang, and Nengshu Li

Key Laboratory of Ecological Engineering and Biotechnology of Anhui Province, School of Life Science, Anhui University, Hefei 230039, China

Abstract: The G13 domain derived from granulysin shows high antimicrobial activities against Gram-positive and Gram-negative bacteria but does not lyse Jurkat cells or liposomes. To explore a new approach for high expression of the G13 domain, we fused the sequence encoding G13 to thioredoxin (Trx) gene to construct the recombinant expression vector (pThioHisA-G13). A cyanogen bromide (CNBr) cleavage site was introduced between the Trx and G13 to facilitate final release of the recombinant G13. The recombinant expression vector, pThioHisA-G13, was transformed into *E. coli* BL21 (DE3). Upon induction by IPTG, Trx-G13 fusion protein was expressed and took the form of inclusion bodies counting 58% (W/W) of total cellular proteins. The inclusion body was solved by urea (8 mol/L) and then cleaved by CNBr. We purified the recombinant peptide G13 by one-step cation exchange chromatography. Results of agarose diffuse assay analysis indicated that the recombinant G13 exhibited antibacterial activity. The procedure described in this study will provide a reliable and simple method for highly efficient production of some cationic antimicrobial peptides.

Keywords: Granulysin, G13 domain, fusion expression, cationic antimicrobial peptide

抗菌肽(Antimicrobial peptide)是生物体内产生的一种阳离子小分子多肽, 广泛存在于植物和动物体内, 是天然免疫防御系统的一部分^[1]。当前, 抗生

素的大量使用导致耐药性菌株的产生, 因而开发新型抗生素显得越来越重要。抗菌肽是通过物理作用造成细胞膜的穿孔而达到广谱抗菌的效果, 所以不

Received: August 5, 2008; **Accepted:** December 16, 2008

Supported by: Key Program of Natural Science Research of Anhui Provincial Universities (No. KJ2007A091), and the Innovation Research Team of the 211 Projects of Anhui University (No. 02203109).

Corresponding author: Xiangdong Zha. Tel: +86-551-5579103; E-mail: xdcha@163.com

安徽省高校省级自然科学研究重点项目(No. KJ2007A091), 安徽大学 211 工程学术创新团队项目(No. 02203109)资助。

容易导致耐药性菌株的产生和交叉抗性反应,被认为是抗生素的替代品和增效剂^[2],其潜在的价值已经受到人们的广泛关注。

颗粒裂解肽(Granulysin)是细胞毒性淋巴细胞CTL和天然杀伤细胞NK内的颗粒中含有的一种阳离子抗菌肽,对革兰氏阴性菌、革兰氏阳性菌、真菌、寄生虫均有杀菌活力,尤其是对结核分枝杆菌有直接的细胞毒性^[3]。G13结构域是颗粒裂解肽中含有一个 α 螺旋和loop结构的肽段,由19个氨基酸残基组成。Wang等^[4]化学合成不同大小的granulysin肽段,发现G13肽段可抑制细菌、真菌的活性,但对动物细胞和脂质体没有影响,因此具有重要的研究和应用价值。

抗菌肽的基因工程现已成为研究热点,建立了原核表达系统、酵母表达系统、昆虫系统等用于生产重组抗菌肽。然而在表达抗菌肽的过程中遇到了许多困难,主要表现在抗菌肽对宿主菌产生毒性作用、易被蛋白酶降解以及表达水平低3个方面^[5]。而本研究通过构建硫氧还蛋白(Trx)与G13的原核表达载体pThioHisA-G13,克服了G13对宿主细胞的毒性,实现了高效重组表达,琼脂糖扩散法证明了重组G13结构域多肽具有抗菌活性。这为进一步研究G13结构域的生物活性及开发经济有效的生产方法打下了基础,且有可能为其他阳离子抗菌肽的表达提供借鉴。

1 材料和方法

1.1 菌株及载体

Escherichia coli BL21 (DE3), DH5 α , 枯草芽孢杆菌,表达载体pThioHisA均由本实验室保存。

1.2 工具酶及主要试剂

Taq DNA聚合酶、IPTG、低分子量蛋白标准为上海生物工程公司产品,限制性内切酶EcoR I、Sal I为美国MBI Fermentas公司的产品,T4 DNA连接酶购自大连宝生物工程有限公司。质粒小量快速提取试剂盒、琼脂糖凝胶DNA纯化回收试剂盒为北京道普生物公司产品,酵母膏提取物、蛋白胨为OXOID公司产品,其他试剂为国产分析纯。

1.3 颗粒裂解肽G13结构域基因的克隆及原核表达载体的构建

1.3.1 颗粒裂解肽G13结构域基因的克隆

根据颗粒裂解肽G13结构域的氨基酸序列

QRSVSNAATRVCRTGRSRW,依照大肠杆菌偏爱密码子设计基因序列:5'-CAGCGTTCTGTGTCTAACGCAGCAACTCGTGTGTGCCGTACTGGTCGTTCTCGTTGG-3',由上海生工合成;根据合成的颗粒裂解肽G13基因片段设计一对特异性引物,上游引物P1:5'-AGAATTCATGCAGCGTTCTGTGTCTAAC-3',下游引物P2:5'-ATTGTCGACTTACCAACGAGAACGACCAG-3'(下划线部分分别为EcoR I酶切位点和Sal I酶切位点)。在上游引物中引入了EcoR I酶切位点和Met密码子,方便后来用CNBr将G13肽段从融合蛋白中切割下来;下游引物中引入了Sal I酶切位点和终止密码子。

以G13结构域编码序列为模板,PCR扩增G13结构域。PCR反应条件:94°C 30 s,62°C 15 s,72°C,15 s,30个循环。取5 μ L反应产物进行1.0%琼脂糖凝胶电泳,鉴定扩增产物。用凝胶回收试剂盒回收相应片段。

1.3.2 表达载体的构建与鉴定

PCR产物和载体pThioHisA均用EcoR I、Sal I双酶切,酶切产物切胶纯化后,16°C,T4 DNA连接酶连接,连接产物转化*E. coli* BL21(DE3)感受态细胞,氨苄青霉素筛选阳性克隆。重组质粒命名为pThioHisA-G13,送上海博亚生物技术有限公司测序鉴定。

1.4 融合蛋白在大肠杆菌中的诱导表达及G13结构域分离纯化

1.4.1 融合蛋白的诱导表达及包涵体的处理

将含有重组质粒pThioHisA-G13的工程菌接种到含氨苄青霉素(50 μ g/mL)的LB培养基中37°C振荡培养过夜,按1%的接种量接种到相同的LB培养基中进行放大培养,37°C振荡培养至OD₆₀₀为0.5~0.6时,加入终浓度1 mmol/L的IPTG,37°C振荡培养,诱导4 h后,8000 r/min离心10 min收集菌体,把菌体重悬于Buffer A(50 mmol/L Tris-HCl pH 7.9; 0.5 mmol/L EDTA; 50 mmol/L NaCl; 5%甘油; 0.5 mmol/L DTT)中,超声破碎菌体(超声4 s,间隔6 s,120次循环,功率500 W),12 000 r/min离心10 min,取上清、沉淀进行SDS-PAGE(5%分离胶,15%浓缩胶)电泳。

将沉淀用Buffer B(50 mmol/L Tris-HCl pH 7.9; 0.5 mmol/L EDTA; 50 mmol/L NaCl; 1% Triton X-100; 0.5 mmol/L DTT)洗涤,4°C离心(12 000 r/min)

15 min。将洗涤后的包涵体溶于尿素溶液(8 mol/L Urea, 0.1 mol/L HCl), 4°C 离心(12 000 r/min) 15 min, 收集上清, 进行 SDS-PAGE 电泳, 用凝胶分析软件 BandScan 进行灰度扫描分析融合蛋白在包涵体中所占的比例, Bradford 法测定包涵体溶解液中的蛋白含量。

1.4.2 重组 G13 结构域的纯化及鉴定

按照蛋白质: CNBr 为 1:5 的比率(W/W), 将 CNBr 溶液(400 mg/mL)加入到包涵体溶解液中, 于室温下避光反应 24 h^[6], 加 1 倍体积的 ddH₂O 终止反应, Tricine-SDS-PAGE(16.5%)电泳分析切割效果, 剩余样对 2000 mL PB 缓冲液透析 48 h。透析产物经 0.45 μm 的滤膜过滤后上 PB 缓冲液(20 mmol/L, pH 8.0)预平衡的 CM-32 阳离子交换柱, 0~1 mol/L NaCl 线性梯度洗脱, 收集目的峰。Tricine-SDS-PAGE 分析纯化产物, ESI-MS 检测其分子量。纯化后的样品透析脱盐后冻干, 溶于 pH 7.2、10 mmol/L 的 PBS 缓冲液中。

1.5 重组 G13 结构域的活性检测

利用琼脂糖扩散法进行抑菌试验。将大肠杆菌 DH5α 配制成 0.5 个麦氏单位(1.5×10^8 CFU/mL), 取 200 μL 均匀涂布在 LB 培养板上, 然后取制备好的抗菌肽进行抑菌试验, 对照为 PBS 溶液, 于 37°C 过夜培养, 观察抑菌效果。

最小抑菌浓度的测定^[7]: 将处于对数生长期的大肠杆菌 DH5α、枯草芽孢杆菌, 用 LB 培养基稀释到菌液浓度为 $10^4 \sim 10^5$ CFU/mL, 取 100 μL 菌液和 10 μL 不同浓度的重组 G13 加入 EP 管中, 以溶解重组 G13 的 PBS 缓冲液作阴性对照, 37°C 振荡培养 3 h, 然后测 OD₆₀₀, 以吸光值无变化处所对应的重组肽的浓度定义为最小抑菌浓度(MIC)。

2 结果

2.1 G13 结构域的克隆及表达载体的构建

利用引物 P1、P2, PCR 扩增得到颗粒裂解肽 G13 基因(图 1); 酶切后与载体 pThioHisA 相连, 转化 BL21(DE3)。阳性克隆经测序鉴定, 确定编码 G13 的基因已正确插入到载体中。

2.2 融合蛋白的诱导表达

含有 pThioHisA-G13 重组质粒的 BL21 工程菌, 经 IPTG 诱导后, SDS-PAGE 检测(图 2), 在大约 16 kD

位置处有明显的蛋白条带, 与预期的融合蛋白的分子量一致。Bandscan 软件分析表明, 融合蛋白的表达量约占菌体总蛋白的 58%; Bradford 法测定每升工程菌发酵液产生的包涵体约为 200 mg。

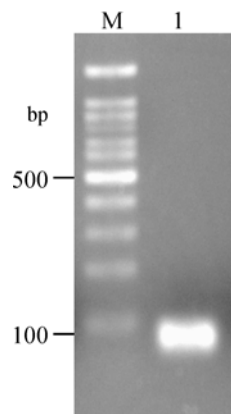


图 1 PCR 扩增的 G13 结构域电泳图谱

Fig. 1 Electrophoretic profile of G13 domain amplified by PCR. M: DNA marker DL100; 1: PCR products (79 bp).

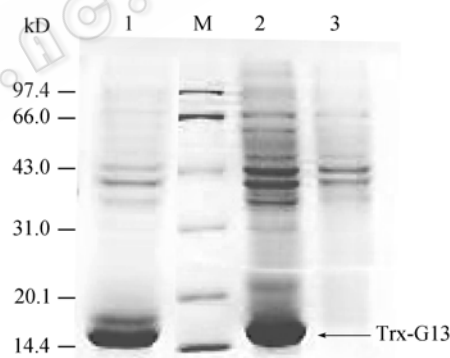


图 2 SDS-PAGE 检测融合蛋白在大肠杆菌 BL21(DE3) 中的表达

Fig. 2 SDS-PAGE profile of recombinant G13 fusion protein expressed in *E. coli* BL21 (DE3). M: protein marker; 1: inclusion body after ablation; 2: total proteins after induction; 3: total proteins before induction.

2.3 重组 G13 结构域的纯化及鉴定

包涵体溶液经 CNBr 切割后, 将 G13 结构域从融合蛋白中释放出来, 切割产物经 CM-32 阳离子交换层析分离纯化, Tricine-SDS-PAGE 检测, 在大约 2200 D 处有单一条带(图 3), 与预期结果相符, 经 Bandscan 软件分析其纯度达到 97%。纯化步骤及纯化效率的计算结果见表 1。经过纯化后, 每升工程菌发酵液可获得大约 5.82 mg 重组 G13。经

ESI-MS 检测分子量, m/z 平均值为 439.28 ($[M+5H]^{5+}$)与 548.85 ($[M+4H]^{4+}$)的 2 个峰(图 4,5), 对应的分子量为 2191.4 D, 与理论值(2191 D)相符。

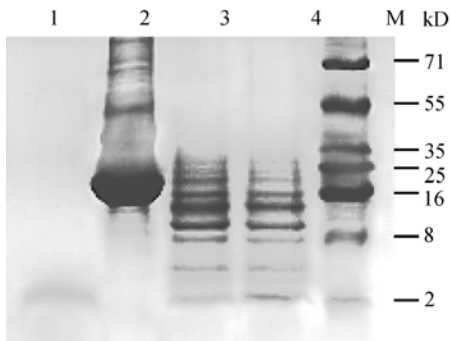


图 3 Tricine-SDS-PAGE 检测 CNBr 切割效果和纯化后的重组 G13 结构域

Fig. 3 Tricine-SDS-PAGE analysis of the cleavage results with CNBr and recombinant G13 domain after purification. 1: purified GranulysinG13 domain; 2: inclusion body without CNBr digestion; 3, 4: products after CNBr digestion; M: low molecular weight marker.

表 1 重组颗粒裂解肽 G13 结构域的纯化

Table 1 Purification of recombinant G13

Step	Total protein (mg ^a)	Recombinant G13 (mg)	Yield (%)
Inclusion body	200.0	20 ^b	
Cleavage, dialysis	87.3	10.48 ^c	52.4
Cation exchange Chromatography	6.0	5.82 ^c	29.1

^aTotal protein concentration was determined by Bradford assay.

^bTheoretical calculated from the difference in the molecular masses of G13 and Trx-G13.

^cThe amounts of recombinant G13 after each purification step were determined by densitometric analysis of SDS-PAGE gels.

2.4 重组 G13 结构域的活性检测

琼脂糖扩散法抑菌实验结果表明, 重组 G13 结构域多肽具有抑菌活性, 在加样孔周围有透明的抑菌圈, 而阴性对照孔周围没有抑菌圈(图 6), 通过液相测定法确定了重组 G13 结构域对大肠杆菌 DH5 α 和枯草芽孢杆菌的最小抑菌浓度(表 2), 表明重组 G13 结构域对革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌都具有明显的抑制作用。

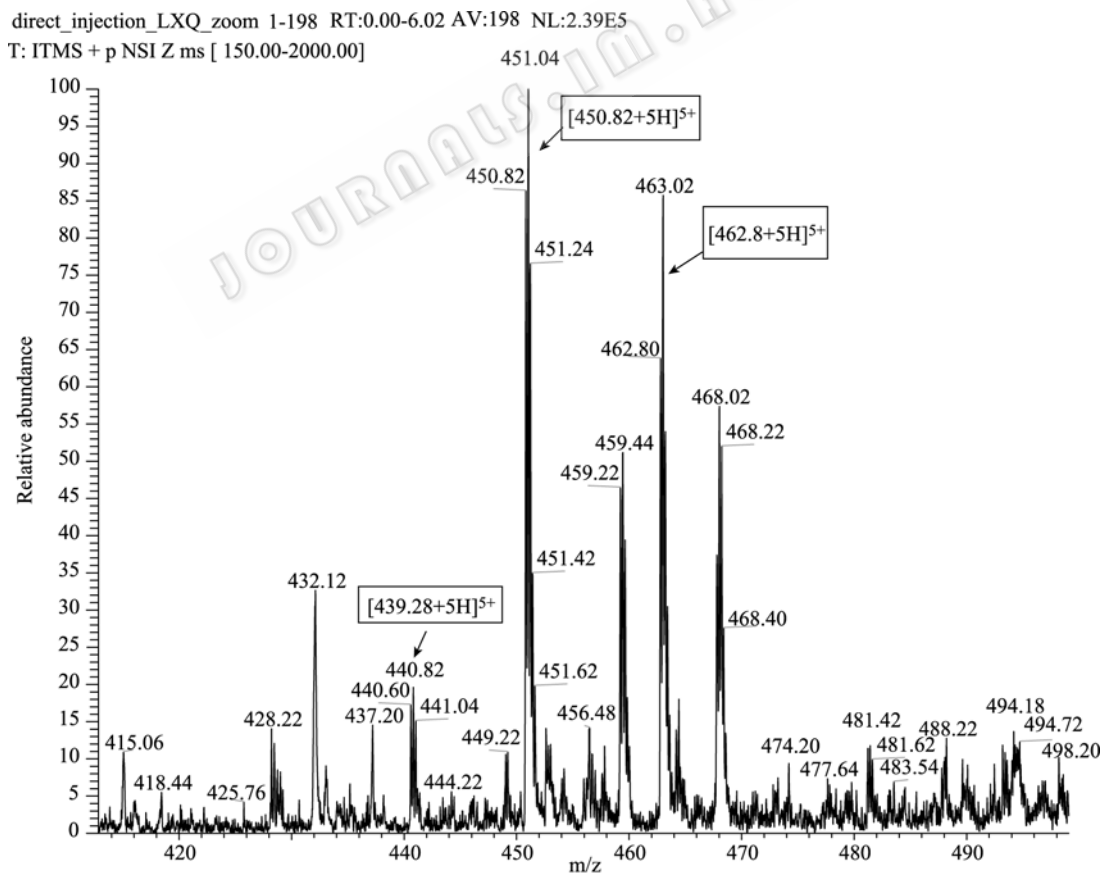


图 4 重组 G13 的分子量质谱图

Fig. 4 Mass spectrometry(ESI-MS) of recombinant G13.

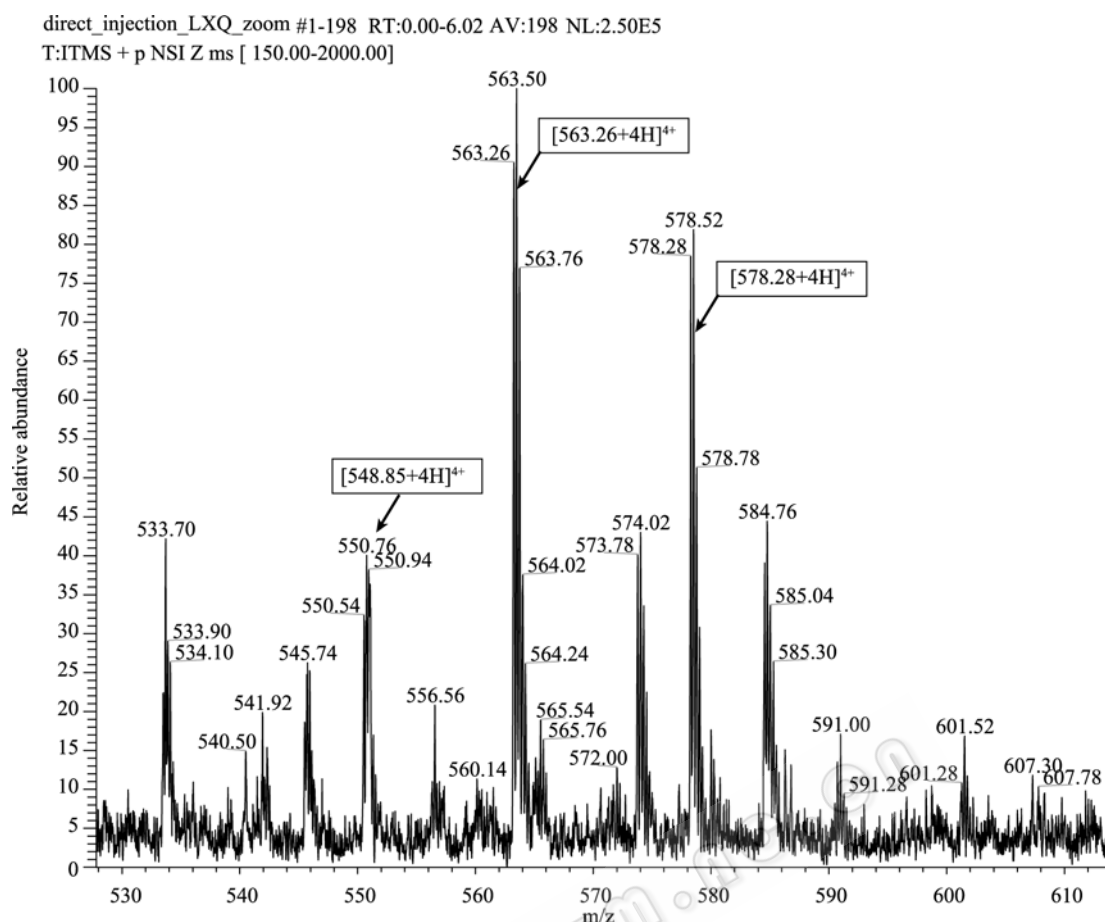


图 5 重组 G13 的分子量质谱图

Fig. 5 Mass spectrometry(ESI-MS) of recombinant G13.

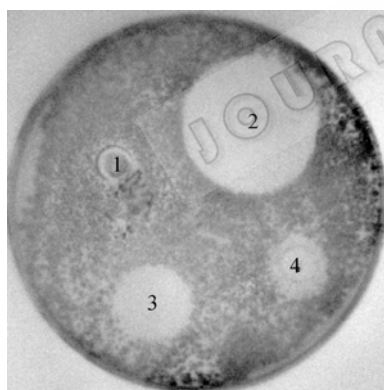
图 6 重组 G13 结构域对大肠杆菌 DH5 α 的抑菌效果

Fig. 6 The results of antibacterial experiment of the recombinant G13 domain to *E. coli* DH5 α strain. 1: negative control (PBS); 2: AMP control (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$); 3: recombinant peptide G13 (100 μL); 4: recombinant peptide G13 (50 μL).

表 2 重组 G13 结构域对 2 种细菌的最小抑菌浓度(MIC)
Table 2 MIC ($\mu\text{g}/\text{mL}$) of the recombinant G13 domain on two strains of bacteria

Microorganism	MIC ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
<i>E. coli</i> DH5 α	250
<i>Bacillus subtilis</i>	400

3 讨论

颗粒裂解肽是细胞毒性淋巴细胞 CTL 和天然杀伤细胞 NK 内的颗粒中含有的一种多肽, 为 SAPLIP (Saposin like protein) 家族成员之一, 与 NK-lysin 结构最近似 (43% 序列一致, 67% 相似, 均具有抗菌活性^[7]). Anderson 等^[8]对颗粒裂解肽的晶体结构研究发现, 颗粒裂解肽含有 5 个 α -螺旋(H1-H5) 结构。Wang 等^[4]对 Granulysin 不同区域的抗菌活性检测发现, 中央区域含 H2、H3 的部位抗菌活性最强, 颗粒裂解肽 G13 是含有 H2 的肽段, 该肽段含有 5 个 Arg 残基, 净电荷为 +5, 能与带负电的磷脂膜相互作用, 可抑制细菌、真菌的活性, 但对动物细胞和脂质体没有影响。

抗菌肽对宿主细胞有不同程度的毒性, 且易被宿主细胞内蛋白酶的降解, 因而不易直接进行表达^[9]。为了克服这一障碍, 又因抗菌肽所带的正电荷数对杀菌活力非常重要, 一般采用将抗菌肽与带有

阴离子的伴侣蛋白融合表达的策略^[10]。这样不仅可以中和抗菌肽的正电荷数降低其对宿主菌的毒性,又可以增加其稳定性^[11]。目前常用的伴侣蛋白包括谷胱甘肽 S 转移酶(GST)^[12,13]、麦芽糖结合蛋白(MBP)^[14]和硫氧还蛋白(Trx)^[15,16]。而伴侣蛋白中的阴离子片段被认为与其中和抗菌肽正电荷的能力及使目的蛋白得以有效表达密切相关^[5]。杨金环等^[17]虽成功构建了 pBAD/TOPO-G13 原核表达载体,但诱导后融合蛋白 Trx-G13 仍然对宿主菌产生毒性,产量很低。而本研究通过融合表达的方式将 G13 结构域基因克隆到 pThioHisA 中,利用载体上带负电荷的硫氧还蛋白实现了 Trx-G13 的高效表达(占菌体总蛋白的 58%)。通过 Omega 软件分析发现 pThioHisA-G13 中融合头所带净电荷为 -9.752, pBAD/TOPO-G13 中融合头所带净电荷为 -6.848; 肠激酶切点至 G13 结构域 N-端之间的肽段所带电荷数分别为 pThioHisA: -5.905, pBAD/TOPO: -3.005, 这些都说明 pThioHisA 融合头中和正电荷的能力更强,尤其是靠近 G13 结构域 N 端的阴离子肽段所起的作用更大(靠近 C 端亦是如此,该结果另文发表),能够有效抑制 G13 对宿主菌的毒性,从而使融合蛋白得以大量积累。

总之,本研究无需人工添加阴离子片段,直接利用 pThioHisA 载体系统本身的硫氧还蛋白特别是其 C 端酸性氨基酸,成功高效表达了颗粒裂解肽 G13 结构域。表达的融合蛋白以包涵体的形式存在于菌体中,包涵体经简单洗涤就可使融合蛋白的纯度达到 82% 以上,经尿素溶解后可以直接进行 CNBr 切割,切割产物由一步阳离子交换层析就可以获得纯度达 97%、具有生物学活性的重组 G13。方法简便实用、成本低、效率高,为 G13 结构域多肽以及类似阳离子抗菌肽的大量制备和药物学研究打下基础。但质谱检测结果出现 m/z 平均值为 451.04($[M+5H]^{5+}$)、563.5($[M+4H]^{4+}$)、463.02($[M+5H]^{5+}$)及 578.52($[M+4H]^{4+}$) 4 个主峰(图 4、5),前两者对应的分子量为 2249.1 D; 后两者对应的分子量为 2309.1 D,据分析计算正好对应 2 个或 4 个自由氨基的甲酰化修饰,可能是尿素处理产生的异氰酸盐,或溴化氰切割时其他条件的选择所引起的^[18]。由于抗菌肽碱性氨基酸的自由氨基在抗菌活性中起着重要作用,甲酰化问题在分离纯化阶段需要引起特别

重视,在进一步的实验中需要设法避免。

致谢 感谢中国科学技术大学实验中心在质谱测定重组 G13 分子量实验中所提供的帮助。

REFERENCES

- [1] Guerreiro CI, Fontes CM, Gama M, *et al.* *Escherichia coli* expression and purification of four antimicrobial peptides fused to a family 3 carbohydrate-binding module (CBM) from *Clostridium thermocellum*. *Protein Expr Purif*, 2008, **59**(1): 161–168.
- [2] Bonomo RA. Multiple antibiotic-resistant bacteria in long-term-care facilities: an emerging problem in the practice of infectious diseases. *Clin Infect Dis*, 2000, **31**(6): 1414–1422.
- [3] Clayberger C, Krensky AM. Granulysin. *Curr Opin Immunol*, 2003, **15**(5): 560–565.
- [4] Wang Z, Choice E, Kaspar A, *et al.* Bactericidal and tumoricidal activities of synthetic peptides derived from granulysin. *J Immunol*, 2000, **165**(3): 1486–1490.
- [5] Xu XX, Jin FL, Yu XQ, *et al.* High-level expression of the recombinant hybrid peptide cecropinA (1–8)–magainin2 (1–12) with an ubiquitin fusion partner in *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif*, 2007, **55**(1): 175–182.
- [6] Rodríguez JC, Wong L, Jennings PA. The solvent in CNBr cleavage reactions determines the fragmentation efficiency of ketosteroid isomerase fusion proteins used in the production of recombinant peptides. *Protein Expr Purif*, 2003, **28**(2): 224–231.
- [7] Li BC, Chen YQ, Liu P, *et al.* Expression of the antibacterial peptide CM4-Like gene of Chinese silkworm bombyxmori in *Escherichia coli* and its antibacterial activity analysis. *J Mol Cell Biol*, 2007, **40**(2): 98–101.
李保存, 陈玉清, 刘平, 等. 中国家蚕抗菌肽 ABP-CM4 在 *E. coli* 中的融合表达及活性分析. *分子细胞生物学报*, 2007, **40**(2): 98–101.
- [8] Stenger S, Hanson DA, Teitelbaum R, *et al.* An antimicrobial activity of cytolytic T cells mediated by granulysin. *Science*, 1998, **282**(5386): 121–125.
- [9] Lu HR, Li GD, Wu HY, *et al.* Fusion expression of the antimicrobial peptide GK1 in *Escherichia coli*. *Chin J Biotech*, 2008, **24**(1): 21–26.
陆海荣, 李国栋, 吴宏宇, 等. 抗菌肽 GK1 在大肠杆菌中的融合表达. *生物工程学报*, 2008, **24**(1): 21–26.
- [10] Zha XD, Xu KS, Liu J. Research advances in cationic antimicrobial peptides. *Chin Pharmacol Bull*, 2003, **19**(7): 735–740.
查向东, 徐康森, 刘兢. 阳离子抗菌肽研究进展. *中国药理学通报*, 2003, **19**(7): 735–740.
- [11] Tuo XY, Chai JK. Research progress in gene engineering of antimicrobial peptide. *Lett Biotechnol*, 2007, **18**(2): 298–300.

- 庾晓晔, 柴家科. 抗菌肽的基因工程研究进展. 生物技术通讯, 2007, **18**(2): 298-300.
- [12] Feng XJ, Wang JH, Shan AS, *et al.* Fusion expression of bovine lactoferricin in *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif*, 2006, **47**(1): 110-117.
- [13] Skosyrev VS, Kuleskiy EA, Yakhnim AV, *et al.* Expression of the recombinant antibacterial peptide sarcotoxin IA in *Escherichia coli* cells. *Protein Expr Purif*, 2003, **28**(2): 350-356.
- [14] Hara S, Yamakawa M. Production in *Escherichia coli* of Moricin, a novel type antibacterial peptide from the silkworm, *Bombyx mori*. *Biochem Biophys Res Commol*, 1996, **220**(3): 664-669.
- [15] Li BC, Zhang SQ, Dan WB, *et al.* Expression in *Escherichia coli* and purification of bioactive antibacterial peptide ABP-CM4 from the Chinese silk worm, *Bombyx mori*. *Biotechnol Lett*, 2007, **29**(7): 1031-1036.
- [16] Li Y, Li X, Wang G. Cloning, expression, isotope labeling, and purification of human antimicrobial peptide LL-37 in *Escherichia coli* for NMR studies. *Protein Expr Purif*, 2006, **47**(2): 498-505.
- [17] Yang JH, Zha XD, Fang H, *et al.* Recombinant expression and toxic effect on the host bacterial viability of G13 domain from granulysin. *Chin J Biol*, 2008, **21**(6): 467-470.
杨金环, 查向东, 方红, 等. 颗粒裂解肽 G13 结构域的重组表达及对大肠杆菌活力的影响. 中国生物制品学杂志, 2008, **21**(6): 467-470.
- [18] Richardsonand JP, MacmillanD. Optimisation of chemical protein cleavage for erythropoietin semi-synthesis using native chemical ligation. *Org Biomol Chem*, 2008, **6**: 3977-3982.

科学出版社科学出版中心生命科学分社新书推介

精编免疫学实验指南 (精装) (译)

(美) J. E. 科利根 B. E. 比勒 D. H. 马古利斯 E. M. 舍瓦奇 W. 斯特罗贝尔 编著
曹雪涛等 译

978-7-03-021997-8 ¥158.00 2008年12月出版

本书是国际权威的生命科学实验方法学丛书之《现代免疫学方法》的精华版, 共 15 章。分别介绍了多克隆抗体和单克隆抗体的制备、纯化和鉴定, 人和小鼠 T 细胞、B 细胞、NK 细胞和树突细胞、巨噬细胞等及其亚群的分离、鉴定和各种功能分析, T 细胞、B 细胞克隆和 T 细胞杂交瘤的构建, 细胞因子及其受体和分泌细胞因子细胞的检测, 免疫细胞活化的信号分子分析, 用分子生物学方法制备 Fv、构建噬菌体抗体库和研究 TCR 等免疫分子等。还介绍了构建自身免疫病、炎症性疾病和感染性疾病等的动物模型的方法。本书内容涵盖目前免疫学常用实验技术的基本原理、标准方案和最新进展, 具有简明规范、步骤清晰、可行性强等特点。

本书可供免疫学、医学基础研究工作者以及临床实验工作者参考使用。



酵母遗传学方法实验指南 (2005 版) (译)

(美) D.C. 安伯格 等编著 霍克克 主译

978-7-03-022605-1 ¥56.00 2008年12月出版

本书作为冷泉港实验室出版社的经典酵母实验教程的第二版, 收录了酵母研究中最常用的减数分裂作图、转化、基因置换等实验, 以及酵母蛋白抽提、活体染色、RNA 分离等 28 种技术方法。文字简洁明了, 内容全面而详细, 兼顾经典和前沿, 是该领域的权威之作。

适合于大学院校、科研单位的教师、学生及研究人员作为实验指导书, 亦可供从事酵母相关生物制品行业的科技人员参考



欢迎各界人士邮购科学出版社各类图书 (免邮费)

邮购地址: 北京东黄城根北街 16 号 科学出版社 科学出版中心 生命科学分社 邮编: 100717

联系人: 阮芯 联系电话: 010-64034622 (带传真)

更多精彩图书请登陆网站 <http://www.lifescience.com.cn>