

微生物转化法生产度洛西汀中间体手性醇菌株的鉴定

杨凤萍¹ 许善峰² 沈云霞¹ 王爱勤¹ 杨生妹^{1*}

(1. 扬州大学 生物科学与技术学院 江苏 扬州 225009)

(2. 德尔生物制品研究所有限公司 江苏 镇江 221000)

摘要: 【目的】获得以 DKTP 为底物合成度洛西汀关键中间体手性醇(S)-DHTP 的菌株。【方法】采用常规及改进的微生物转化法从土壤中进行筛选。【结果】筛选获得一株菌株, 能够将底物 DKTP 对映选择性地还原为(S)-DHTP, 且具有较高的转化率(>90%)和几乎绝对的对映体过量值(e.e.>99%), 改进的筛选方法更为简便高效。形态学特征和 26S rDNA 序列分析综合判断, 该菌株属于红酵母属, 命名为红酵母 *Rhodotorula* sp. 507。【结论】供试菌株能够高效地、不对称地生物还原 DKTP 成度洛西汀前体物(S)-DHTP, 使大量获得度洛西汀前体原料变得经济可行。

关键词: 红酵母, 微生物转化法, DKTP, 筛选, 鉴定

Identification of the fungus capable of biotransforming N, N-dimethyl-3-keto-3-(2-thienyl)-1-propanamine

YANG Feng-Ping¹ XU Shan-Feng² SHEN Yun-Xia¹ WANG Ai-Qin¹
YANG Sheng-Mei^{1*}

(1. College of Bioscience and Technology, Yangzhou University, Yangzhou, Jiangsu 225009, China)

(2. Deer Institute of Biological Product Co., LTD, Zhenjiang, Jiangsu 221000, China)

Abstract: [Objective] To obtain a fungus capable of reducing N, N-dimethyl-3-keto-3-(2-thienyl)-1-propanamine (DKTP) to (S)-DHTP, a key precursor to synthesize Duloxetine. [Methods] Routine and an improved biotransformation method were used to screen fungus

*通讯作者: Tel: 86-514-87979054; ✉: smyang@yzu.edu.cn

收稿日期: 2011-07-21; 接受日期: 2011-10-11

from soil, and the type of the fungus was identified by analysis of morphological characters and DNA sequence of 26S rDNA. **[Results]** A fungus was obtained which was capable of asymmetrically reduce DKTP to (S)-DHTP with high yield (more than 90%) and high enantiometric excess (more than 99%), and the improved method was more convenient and efficient. The identification showed that the fungus belong to the Genus of *Rhodotorula* Harrison, and was named as *Rhodotorula* sp. 507. **[Conclusion]** The screened fungus could efficiently and asymmetrically reduce DKTP to (S)-DHTP, which makes it possible to get enough precursor for the synthesis of Duloxetine easily and economically.

Keywords: *Rhodotorula*, Biotransformation, DKTP, Screening, Identification

抑郁症是一种常见的精神疾患,到2020年可能成为仅次于心脏病的第二大疾病,具有高发病率、高自杀率及知晓率低、治疗率低等特点^[1]。随着对抑郁症病因学研究的深入,逐步确立了药物治疗的主导地位^[2],因此疗效确切、安全性高的抗抑郁药物逐渐成为研发热点。

度洛西汀,商品名欣百达,化学名(S)-N-甲基-3-(1-萘氧基)-3-(2-噻吩)-丙胺,是美国 Eli Lilly 公司 2004 年研发上市的 5-羟色胺及去甲肾上腺素再摄取抑制剂,具有稳定性好、安全有效、与其它神经系统亲和力低等特点,治疗抑郁症效果比目前其他西汀类药物好,其(R)型和(S)型两种对映异构体中只有(S)型具有抗抑郁药理活性^[3-4]。目前,因起始原料不同,合成度洛西汀方法较多^[5-7],其中,化学法生产手性醇较为复杂且转化率和光学纯度较低,而微生物合成法则由于酶的多样性和立体选择性弥补了这一缺陷^[8-9]。

迄今为止,已有筛选到转化西汀类药物中间体手性醇菌株的相关报道^[10],Liu 等^[1-2]曾尝试利用面包酵母催化还原 N,N-二甲基-3-酮-3-(2-噻吩)-1-丙胺(DKTP)生成(S)-N,N-二甲基-3-羟基-3-(2-噻吩)-1-丙胺[(S)-DHTP],但未成功。Soni 和 Banerjee 筛选到酵母菌株 *Candida tropicalis* PBR-2,成功地将 DKTP 还原生成(S)-DHTP,并获得 84%–88%的转化率和高对映体过量值

(>99%)^[11]。目前国内相关生物转化研究主要集中在含苯环的手性醇^[12-13],但含噻吩的手性醇(度洛西汀的生产中间体)的研究尚未见报道。本研究利用生物转化法生产含噻吩基的度洛西汀中间体手性醇,以 DKTP 作为转化底物,筛选高度转化菌株,合成度洛西汀的关键中间体(S)-DHTP,进而优化培养工艺和不对称转化工艺,以弥补手性醇市场的不足,为度洛西汀的经济合成寻找新的生产途径。

1 材料与方 法

1.1 材料

初筛平板培养基 1 (g/L): Na₂HPO₄ 0.20, K₂HPO₄ 0.10, NH₄Cl 0.04, MgCl₂ 0.04, 苯乙酮 1 mol/L 或 DKTP 1 mol/L (过滤除菌)。

初筛平板培养基 2 (g/L): 尿素 0.10, 硫化铵 0.10, K₂HPO₄ 0.25, Na₂HPO₄ 0.05, MgSO₄·7H₂O 0.01, 苯乙酮 1 mol/L (过滤除菌), 孟加拉红 0.003, 抗生素(氯霉素、庆大霉素, 过滤除菌) 0.05。

复筛培养基 1 (g/L): 蛋白胨 0.50, 牛肉浸膏 0.15, 酵母膏 0.15, NaCl 0.50, 葡萄糖 1.00。

复筛培养基 2 (g/L): 酵母膏 1, 蛋白胨 2, 葡萄糖 2, 苯乙酮 1 mol/L (接种或培养一定时间加入, 过滤除菌), DKTP 1 mol/L (接种或培养一定时间加入, 过滤除菌)。

固体种子培养基(YPD) (g/L): 酵母膏 1, 蛋

白朊 2, 葡萄糖 2, 琼脂 2。

斜面保存培养基(YPD): 同固体种子培养基。

主要化学试剂: DKTP 标准品、(R)-和(S)-DHTP 标准品, 泰洲新科生物技术有限公司; 苯乙酮, 国药集团化学试剂有限公司; 乙二胺、乙腈等, 上海森灏精细化工有限公司。

1.2 方法

1.2.1 土样采集: 土壤采自葡萄园等果园。采集时, 铲去表土层 2 cm–3 cm, 取 3 cm–10 cm 深层土壤 10 g, 装入灭菌的牛皮纸袋, 4 °C 保存。

1.2.2 菌种筛选: (1) 参考文献[14]提供的方法进行常规的初筛和复筛。初筛时做两组实验, 一组加 1 mol/L DKTP, 另一组加 1 mol/L 苯乙酮。(2) 改进的筛选方法: 初筛时将菌液接种到固体初筛平板培养基 2 中; 复筛时将菌液接种至复筛培养基 2 中后每隔 12 h 补加 0.5% 葡萄糖和 1 mol/L DKTP。(3) 检测及高效液相色谱(HPLC)分析, 色谱条件: OJH (5 μ m) 0.46 mm \times 250 mm 手性色谱柱, 流动相用正己烷: 异丙醇: 乙二胺(98:2:0.2, V/V/V), 流速为 0.5 mL/min, 检测波长为 241 nm。

1.2.3 菌种鉴定: (1) 划线法将目的菌株接种于孟加拉红培养基上, 28 °C 培养 3–7 d, 肉眼观察。取 16 μ L 菌液至洁净载玻片, 油镜显微观察。

(2) PCR 扩增及序列分析: 取保存的菌株 5 μ L, YPD 培养过夜, 酚-氯仿-异戊醇法提取 DNA, 通用引物为 NL1 (5'-GCATATCAATAAGC GGAGGAAAAG-3')和 NL4 (5'-GGTCCGTGTTT CAAGACGG-3')。PCR 扩增体系: ddH₂O 35.5 μ L, 10 \times PCR buffer 5 μ L, 2.5 mmol/L dNTPs 3.5 μ L, 20 mmol/L MgCl₂ 3 μ L, 引物各 1 μ L, 2 U/ μ L *Taq* 酶 0.5 μ L, 离心混匀。PCR 反应程序: 95 °C 1 min; 94 °C 1 min, 45 °C–55 °C 1 min, 72 °C 1.5 min, 36 个循环; 72 °C 8 min; 4 °C 保存。1.5% 琼脂糖凝胶检测 PCR 产物, Bio-Rad 凝胶成像系统观察并拍

照。回收试剂盒纯化 PCR 产物, 连接到 pMD18-T 载体上, 转化感受态 *E. coli* DH5 α 宿主菌, 蓝白斑筛选, 获得阳性克隆。上海生工生物工程公司测序。

2 结果与分析

2.1 转化 DKTP 形成(S)-DHTP 菌株的筛选

2.1.1 筛菌结果: 加 1 mol/L DKTP 的一组初筛平板培养基上未长任何菌, 其余均长菌。

2.1.2 检测结果: 底物添加 12 h 时, 菌株转化效果不明显; 24 h 时, 数株菌株有转化效果, 其中一株橙红色的菌株有荚膜, 菌落光滑, 为(S)-菌, 一株是(S,R)-菌株, 其余均为无荚膜, 菌落粗糙的(R)-菌株。

由图 1 可知, 标准品(R)-DHTP 出峰大约在 14.645 min 处, (S)-DHTP 出峰大约在 16.866 min 处。由图 2 可知, (R)-DHTP 出峰大约在 12.349 min 处, (S)-DHTP 出峰大约在 16.452 min 处。峰面积比较可知, 该(S)-菌株将大部分底物 DKTP 转化成了目的产物(S)-DHTP, 转化率达到 90%, e.e.值大于 99%, 转化效果较好。因此选择该(S)-菌株作为供试菌株继续研究。

2.2 菌种鉴定

2.2.1 培养特征及形态学鉴定结果: 油镜观察 YPD 液体培养基上生长 3 d 的菌株(图 3), 细胞卵圆形, 长 6 μ m–9 μ m, 宽 3 μ m–5 μ m, 出芽生殖。与液面接触的瓶壁上出现橙红色环。孟加拉红培养基上的菌株符合酵母属形态, 菌落中心红色, 菌落粘稠湿润, 表面平坦光滑, 边缘整齐。固体平板上培养 7 d 时, 皿盖上无镜生成, 不掷孢(图 4)。从以上描述初步判定, 该菌株可能属于红酵母属(*Rhodotorula Harrison*)。

2.2.2 26S rDNA D1/D2 区域 PCR 扩增结果: 供试菌株 26S rDNA 基因扩增结果显示其 DNA 片段大小为 600 bp 左右(图 5)。

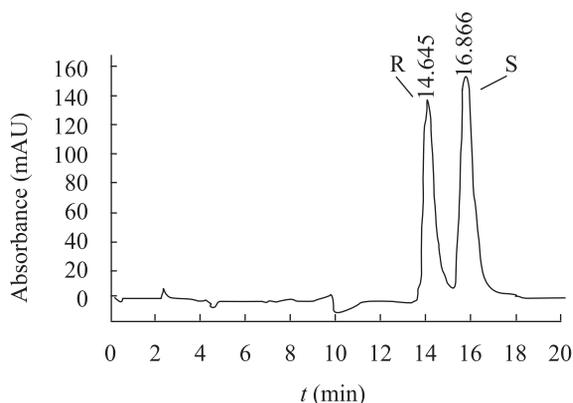


图1 (R)-DHTP 和(S)-DHTP 标准品的高效液相色谱
Fig. 1 HPLC chromatograms of standard sample (R)-DHTP and (S)-DHTP

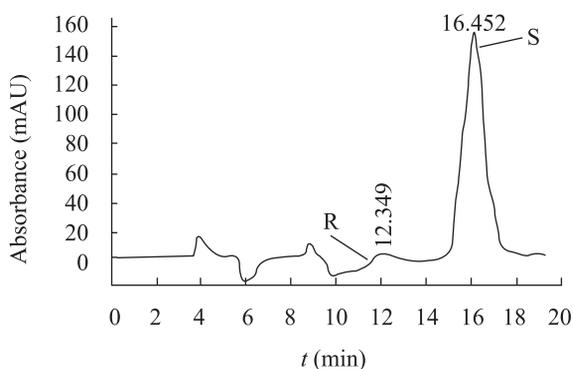


图2 供试菌株转化产物的高效液相色谱图谱
Fig. 2 HPLC chromatograms of the conversion product of isolated strain (R)-DHTP and (S)-DHTP

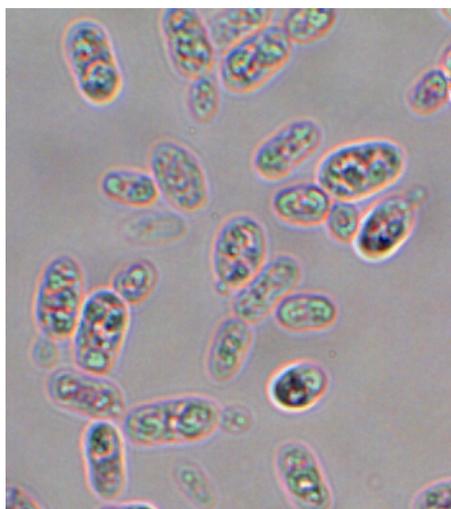


图3 供试菌株的细胞形态
Fig. 3 The cell morphology of the isolated strain



图4 供试菌株的菌落形态
Fig. 4 The colonial morphology of the isolated strain

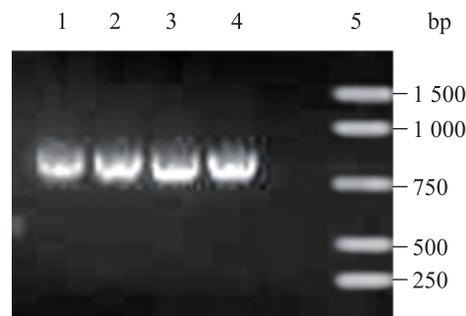


图5 供试菌株 26S rDNA D₁/D₂ 区域基因扩增产物
Fig. 5 The PCR results of 26S rDNA D₁/D₂ region of the isolated strain
注: 1-4: 菌株 26S rDNA 扩增片段; 5: DL2000 marker.
Note: 1-4: PCR products of 26S rDNA; 5: DL2000 marker.

2.2.3 供试菌株 26S rDNA 序列分析结果: GenBank 在线 BLAST 比对显示(图 6), 供试菌株 26S rDNA D₁/D₂ 区域序列与 *Rhodotorula* sp. CBS10104 序列同源性达到 99%, 系统进化树显示出该菌株与酵母菌其他种属间的系统进化关系(图 7), 结合供试菌株形态学特征, 可以确定该菌株属于红酵母属。

3 讨论

3.1 土壤筛菌法的改进

筛选方法对土壤中筛菌成功起着至关重要的作用。转化还原羧基生成醛或醇的酶大多来自真

菌, 其中以酵母为最多^[14]。本研究发现, 利用常规酵母筛菌法, 尽管获得了具有转化能力的橙红色(S)-菌株, 但不易操作, 也不易得到单菌落, 有的平板长出了菌苔, 有丝状真菌菌丝蔓延; 而在筛菌过程中同时加入抗生素和孟加拉红, 抗生素能够抑制细菌生长, 孟加拉红能够限制菌丝蔓延, 这种改进的筛菌法, 得到单菌落比较容易, 大大提高了筛选效率。

研究还发现, 以 1 mol/L DKTP 作唯一碳源的一组初筛平板培养基上未长菌, 而以 1 mol/L 苯乙酮作唯一碳源的另一组则长出了菌株, 表明了底物 DKTP 对微生物生长具有强烈的毒性抑制作用, 这与 Banerjee 报道一致^[11]。因此, 本研究选择与 DKTP 有同样酮基结构的苯乙酮为初筛过程中的底物和唯一的碳源^[13]。

3.2 (S)-菌株的鉴定

目前已有关于微生物转化法或酶法还原酮报道^[14-15], 但有关微生物转化法还原含噻吩环酮的报道却较少, 而不对称催化还原含噻吩环酮的酶类几乎未见报道。

本实验筛选到的(S)-菌株能够不对称催化还原 DKTP 主要形成(S)-DHTP, 少部分形成(R)-DHTP, 起催化作用的关键酶是(S)-酶, 初筛过程中加入的苯乙酮是一种诱导剂, 能够诱导产生(S)-导向酶, 最终产生(S)-酶。结合形态学特征和 26S rDNA 序列分析, 确定该菌为红酵母属的一种, 因此命名为红酵母 *Rhodotorula* sp. 507。系统进化分析表明, *Rhodotorula* sp. 507 与红酵母属中胶红酵母(*Rhodotorula mucilaginosa*)和粘红酵母(*Rhodotorula glutinis*)亲缘关系较近。

Query	1	GGTCCGTGTTTCAAGACGGGTCGTTTTAAAGCCATTCCACCAGCATCCTAAGCGTGAAAGG	60
CBS 10104	631		572
Query	61	ACCGAAGCCCTCGCCATACGGCACGCTGCGTTCCTCAGTCCCCAGGACGTATCCAGCAG	120
CBS 10104	571		512
Query	121	AAAGCTATAACACAGCCGAGACTGCTACATTCTAACTGCCATTATCGGCCCGGAAAAC	180
CBS 10104	511		452
Query	181	GATGCTGGCCTGCAAACCGAGCAAGCCCGGAAGCAAGTCTGACTTCAAGCGTTTCCCTT	240
CBS 10104	451		392
Query	241	CGAACAATTTACGTACTTTTAACTCTCTTCCAAAGTGCTTTTCATCTTCCCTCAGGG	300
CBS 10104	391		332
Query	301	TACTTGTTCGCTATCGGTCTCTCGCCAATATTTAGCTTTAGATGGAATTTACCACCCAAT	360
CBS 10104	331		272
Query	361	TTGAGCTGCATTCCCAAACAACCTCGACTCGTCGAAAAGTGTATCACAAAGCGCTGGCGTC	420
CBS 10104	271		212
Query	421	CGCACCGTGTAATGGGGTATCACCACATATGCCGCTGTATTCCAACAGACTTGTGTGCGGT	480
CBS 10104	211		152
Query	481	CCAACGCGGAAAACACTTTTATAGATTACAACCTCGGACACCGAAGGTGCCAGATTACAAA	540
CBS 10104	151		92
Query	541	TTTGAGCTCTTCCCGCTTCGCTCGCCGCTACTAGGGGAATCCTTGTAGTTTCTTTTCCT	600
CBS 10104	91		32
Query	601	CCGCTTATTGATATGC	616
CBS 10104	31		16

图 6 供试菌株 26S rDNA 序列与 *Rhodotorula* sp. CBS 10104 的序列比对

Fig. 6 Gene sequences blast between 26S rDNA of the isolated strain and *Rhodotorula* sp. CBS 10104

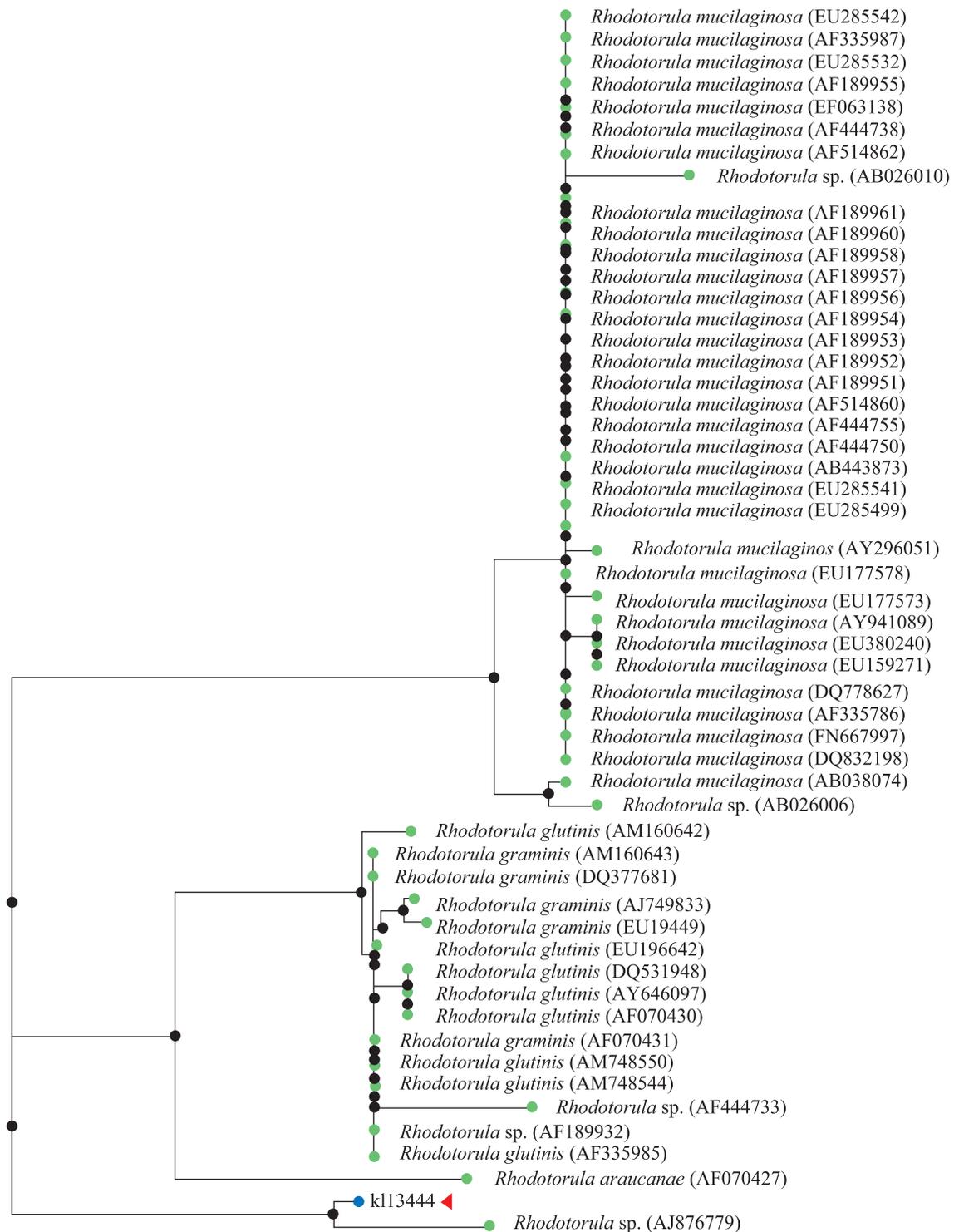


图 7 供试菌株 26S rDNA 序列与酵母其他种属间的系统进化树

Fig. 7 Phylogenetic tree drawn from 26S rDNA of the isolated strain and other yeasts

注: 邻接法构建系统进化树; 最大序列差异为 0.75; 括号内为 GenBank 登录号。◀: 供试菌株。

Note: This tree was produced using BLAST pairwise alignments on line. The method was Neighbor Joining, Max Seq. Difference was 0.75, and the number in brackets was the accession number of each strain. The strain which mark "◀" was the isolated one.

Rhodotorula sp. 507 起催化作用的酶主要是(S)-酶,这也与前两者酶的旋光性相似。

红酵母属(*Rhodotorula harrison*)属于半只菌亚门,目前尚未发现其有性阶段,如发现其具有性阶段则被归入担子菌亚门红色冬孢酵母属(*Rhodospirium Banno*)^[6]。目前有关红酵母属研究最多的是粘红酵母 *Rhodotorula glutinis* CIBAS A1401,它是一种苯丙氨酸解氨酶(PAL)菌种,已经在我国作为工业生物催化酶源菌种,用于PAL/反式-肉桂酸生物转化途径生产 L-苯丙氨酸^[17]。重组巴斯德毕赤酵母因含有来自胶粘红酵母菌的编码环氧化物水解酶(EH)基因,从而能够将苯乙烯氧化物的外消旋混合物对映体选择性水解生产(S)-氧化苯乙烯^[18]。

本研究发现的红酵母 *Rhodotorula* sp. 507 是一株能够不对称生物还原 DKTP 成手性药物度洛西汀关键中间体 (S)-DHTP 的酵母菌,使 (S)-DHTP 的合成具有高转化率和极好的对映体纯(转化率>95%, e.e.>99%)。后续研究将以此为基础,致力于优化培养工艺和不对称转化工艺,使微生物转化法生产度洛西汀前体原料变得经济可行,从而有利于抑郁症的治疗。

参 考 文 献

- [1] 易正辉, 方贻儒, 王祖承. 抑郁症分子生物学及神经影像学研究进展[J]. 中国新药与临床杂志, 2005, 24(8): 610.
- [2] 陈玲. 抗抑郁药药理学研究进展[J]. 亚太传统医药, 2007, 3(10): 61-62.
- [3] Liu HL, Hoff BH, Anthonsen T. Chemo-enzymatic synthesis of the antidepressant duloxetine and its enantiomer[J]. Chirality, 2000a, 12: 26-29.
- [4] Liu HL, Hoff BH, Anthonsen T. Chemoenzymatic synthesis of antidepressant duloxetine and its enantiomer[J]. Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions I, 2000b, 93: 1767-1769.
- [5] Sakai K, Sakurai R, Yuzawa A, et al. Resolution of intermediate for duloxetine, with (S)-mandelic acid[J]. Tetrahedron: Asymmetry, 2003, 14: 1631-1636.
- [6] Ahmed Kamal, Ramesh Khanna GB, Ramu R, et al. Chemoenzymatic synthesis of duloxetine and its enantiomer: lipase-catalyzed resolution of 3-hydroxy-3-(2-thienyl) propanenitrile[J]. Tetrahedron Letters, 2003, 44(25): 4783-4787.
- [7] Wheeler WJ, Kuo FJ. An asymmetric synthesis of duloxetine hydrochloride, a mixed uptake inhibitor of serotonin and norepinephrine and its C-14 labeled isotopomers[J]. Label Compd Radiopharm, 1995, 36(3): 213-223.
- [8] 潘冰峰, 施邑屏, 李祖义. 不对称生物还原制备手性药物[J]. 工业微生物, 1998, 28: 42-45.
- [9] Kaoru Nakamura, Rio Yamanaka, Tomoko Matsuda, et al. Recent developments in asymmetric reduction of ketones with biocatalysts[J]. Tetrahedron: Asymmetry, 2003, 14(18): 2659-2681.
- [10] Wada Masaru, Nakamori Shigeru, Kawabata Jun, et al. New carbonyl reductase and DNA encoding the same reductase and method for producing optically active alcohol by using those[P]. 2004, JP2003063900.
- [11] Pankaj Soni, UC Banerjee. Biotransformations for the production of the chiral drug (S)-Duloxetine catalyzed by a novel isolate of *Candida tropicalis*[J]. Biotechnologically Relevant Enzymes and Proteins, 2005, 67: 771-777.
- [12] 欧志敏, 吴坚平, 杨立荣, 等. 微生物法还原羰基化合物生产手性醇的研究-生物法合成手性药物的重要手段[J]. 山东农业大学学报, 2003, 34(3): 459-462.
- [13] Ni Y, Hexu J. Asymmetric reduction of aryl ketones with a new isolate *Rhodotorula* sp. AS 2.2241[J]. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2002, 18: 233-241.
- [14] Patel RN. Microbial/enzymatic synthesis of chiral intermediates for pharmaceuticals[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2002, 31: 804-826.
- [15] Nakamura K, Yamanaka. Recent developments in asymmetric reduction of ketones with biocatalysts[J]. Tetrahedron asymmetry, 2003, 14:

- 2659-2681.
- [16] 魏艳敏, 周与良. 红酵母属同工酶谱分析及其分类研究[J]. 菌物系统, 1998, 17(1): 63-67.
- [17] 繆元颖, 李化, 杨亚力, 等. 苯丙氨酸解氨酶高活性红酵母(*Rhodotorula* sp.)CIBASA1401 菌株的鉴定[J]. 应用与环境生物学报, 2004, 10(2): 242-245.
- [18] Eun Yeol Lee, Seung-Shick Yoo, Hee Sook Kim, et al. Production of (S)-styrene oxide by recombinant *Pichia pastoris* containing epoxide hydrolase from *Rhodotorula glutinis*[J]. Enzyme and microbial technology, 2004, 35(6/7): 624-631.
- [19] Soni P, Kaul CL, Banerjee UC. A novel process for the synthesis of a duloxetine intermediate, (S)-N,N-dimethyl-3-hydroxy-3-(2-thienyl)-1-propanamine[P]. Indian patent application, 2004, No.1573/DEL/2004.

书 讯

欢迎订阅《英语科技论文撰写与投稿(第二版)》

本书是科技论文写作与投稿的指南读物, 书中全方位地分析和展示了科技论文写作的技巧与诀窍。从论文选题、科技写作的道德规范、拟投稿期刊的选择等方面阐述了科技论文写作前的准备工作, 通过大量的实例分析阐述了论文题名和摘要撰写中应遵循的基本原则, 分别从写作技巧、时态和语态的使用等角度介绍了科技论文正文的撰写, 举例说明了致谢及图表制作的注意事项, 总结了各主要参考文献体例的特点、格式及相关著录规范。

书中还较为全面地介绍了国际单位制(SI)及其使用中应注意的问题, 从选词、重要语法和文体等方面系统地阐述了科技英语写作的文法与表达, 全面总结了英文标点符号的使用, 从稿件录排、投稿信写作、在线投稿、校样改正等方面阐述了如何投稿及与编辑联系, 综述了作者、编辑和审稿人在同行评议过程中的交流与互动。此外, 还从 PPT 制作、会议讲演等方面系统地阐述了会议报告的准备与口头交流的注意事项。

本书可作为理工科研究生的教学用书或自学教材; 也可供科研人员和科技编辑的案头查阅和浏览。

作者简介

任胜利: 理学博士, 国家自然科学基金委杂志社编审, 《中国科学》杂志社副总编辑。社会兼职有中国科技期刊编辑学会理事, 《编辑学报》编委、《中国科技术语》编委、《中国科技期刊研究》副主编等。

自 1997 年博士后出站后从事科技编辑工作以来, 先后在 *Science*, *Nature*, *Scientometrics*, *Learned Publishing*, 《科学通报》、《编辑学报》、《中国科技期刊研究》等期刊上发表文献计量学和科技编辑与写作方面的论文或杂文 60 余篇。有丰富的科技编辑与写作方面的培训经验, 2007 年和 2009 年先后主持翻译了《科技英文写作与演讲》和《科技英语写作进阶》。曾获中国科学院期刊出版领域引进优秀人才择优支持、第二届中国出版政府奖优秀出版人物奖等资助和奖项。

个人博客: www.sciencenet.cn/blog/rensl.htm

订阅方式: 各地图书卖场及网上书店。

邮购: 定价: 35 元 ISBN: 978-7-03-031305-8

北京学士书店: 地址: 北京东黄城根北街 16 号(100717); 电话: 010-64000246, 64034558, 64034205;
科学出版社科学书店: 地址: 北京朝阳门内大街 135 号(100010); 电话: 010-64017892。