

研究报告

鸭疫里默氏杆菌外膜蛋白生物学特性研究

刘燕, 韦强, 鲍国连, 季权安

浙江省农科院畜牧兽医研究所, 杭州 310021

摘要: 血清 2 型鸭疫里默氏杆菌强毒菌株体外传 200 代获得了无毒力无免疫原性菌株, 采用超声波裂解和超速离心法提取二株菌的外膜蛋白, 以比较分析鸭疫里默氏杆菌外膜蛋白的生物学特性。电镜观察细菌超微结构显示传代菌株外膜膜密度降低, 外膜泡的数量明显减少, 细胞质不均匀、内有空泡产生; 免疫印迹结果表明二株菌的外膜蛋白免疫原性多肽存在明显区别; 原代菌株的外膜蛋白仅与 2 型 RA 抗体出现特异性凝集, 而传代菌株的外膜蛋白与 1、2、10 与 11 型 RA 抗体均出现凝集; 二株菌的外膜蛋白均可诱导雏鸭产生抗体, 但原代菌株外膜蛋白诱导雏鸭产生抗体滴度显著高于 200 代次菌株; 原代菌株外膜蛋白免疫鸭对同源 RA 菌株的攻击可产生 100% 的免疫保护, 而传代菌株外膜蛋白免疫鸭对同源 RA 菌株的攻击不产生免疫保护。序列分析显示两者的外膜蛋白 A 同源性达到 99.9%。结果表明强毒菌株的外膜蛋白为良好的亚单位疫苗候选, 体外连续传代对 RA 外膜蛋白生物学特性影响显著。

关键词: 鸭疫里默氏杆菌, 外膜蛋白, 血清型

Analysis of Outer Membrane Proteins of *Riemerella Anatepester*

Yan Liu, Qiang Wei, Guolian Bao, and Quan'an Ji

Institute of Animal Husbandry and Veterinary, Zhejiang Academy of Agricultural Sciences, Hangzhou 310021, China

Abstract: An isolated virulence *Riemerella anatepester* strain passaged 200 times on TSB agar were used for the virulent to avirulent conversion. The effects of passage on biological properties of outer membrane proteins (OMPs) were investigated using the virulent and avirulent strains. Transmission electron microscopy demonstrated that the avirulent strain produced lower amounts of outer membrane vesicles and the outer membrane decreased, the cytoplasmic appearance jumbled. The OMPs of the virulent strain agglutinated only in RA serotype 2 antisera, whereas the OMPs of the avirulent strain agglutinated in antisera of RA 1, 2, 10 and 11. SDS-PAGE Analysis showed the OMPs profiles of both strains were similar but the immunoblotting profiles were different. The protective immunity against *Riemerella anatepester* infection was investigated by immunizations with OMPs in ducks. ELISA results showed that the OMPs induced the production of antibodies in immunized ducks, but the OMPs of virulence strain induced higher antibody titers than the attenuated strain ($P < 0.05$). RA2 group showed significantly higher survival rates (100%) than RA200 group (0%) after challenged with the homologous virulent strain. The *ompA* gene of both stains were also amplified by PCR, nucleotide homology was 99.9%. In conclusion, OMPs of virulent RA strain are suitable candidates for vaccine development.

Received: September 2, 2007; **Accepted:** November 16, 2007

Supported by: the Science and Technology Plan of Zhejiang Province (Nos. 2005C12021, 2005E60014).

Corresponding author: Guolian Bao. Tel/Fax: +86-571-864400373; E-mail: Baogl@zaas.org

浙江省科技厅重点项目基金 (Nos. 2005C12021, 2005E60014) 资助。

Biological properties of OMPs undergoes significant changes during serial passage and suggest that vigilance should be used when extrapolating data obtained from the study of high-passage strains.

Keywords: *riemerella anatipestifer*, outer membrane proteins, serotype

鸭疫里默氏杆菌(*Riemerella anatipestifer*, RA)感染是目前危害养鸭业的一种严重的细菌性传染病。RA的血清型复杂,各血清型之间缺乏有效的交叉免疫保护,这给使用全菌灭活疫苗或弱毒疫苗进行免疫预防带来许多困难^[1-4]。外膜蛋白(Outer membrane proteins, OMPs)是细菌的免疫原蛋白之一,用其制备亚单位疫苗具有良好前景^[5-7]。对血清2型RA(RA2)及该菌株传200代(RA200)的菌株超微结构、两菌株外膜蛋白的组成、免疫原性、凝集特性、免疫保护力以及亚单位成分外膜蛋白A(Outer membrane protein A, *ompA*)的基因序列进行了比较研究,探讨了鸭疫里默氏杆菌外膜蛋白生物学特性,为进一步了解鸭疫里默氏杆菌外膜蛋白免疫保护作用机制奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 主要材料

2型鸭疫里默氏杆菌强毒株,由本实验室分离、鉴定和保存。1日龄北京鸭,购自某北京鸭父母代场,用1-21型RA抗原以琼扩试验和凝集试验检测雏鸭血清抗体均呈阴性。鸭抗、兔抗1、2、10与11型RA阳性血清,由本实验室制备和保存。酶标羊抗鸭IgG抗体,深圳晶美生物工程公司。十二烷基肌氨酸钠, Sigma公司。低分子量蛋白标准及分子生物学试剂购自上海宝生物公司。生化试剂为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 RA体外传代

2型鸭疫里默氏杆菌强毒株RA接种于TSA平板上,37℃培养24~36h后传代,连续传200代次,获得了无毒力无免疫原性菌株。

1.2.2 RA外膜蛋白的提取

参照文献[5]进行。(1)RA接种于TSA平板上,37℃培养24h。以0.01 mol/L PBS洗下菌落,于4℃、8000 r/min离心15 min,弃上清液,重复洗至上清液透明,将菌泥悬浮于20 mmol/L Tris-HCl(pH7.4)缓冲液中。(2)用超声波裂解器充分裂解菌体。(3)8000 r/min离心20 min,弃沉淀(除去大的细菌碎

片)。(4)100 000 r/min 4℃离心2 h。(5)将沉淀溶解于1%十二烷基肌氨酸钠溶液中,37℃作用30 min。(6)100 000 r/min 4℃离心1 h,最后用超纯水溶解沉淀即为外膜蛋白提取物, Folin-酚法定量, -70℃冻存备用。

1.2.3 RA外膜的凝集试验

参照文献[1]进行。采用1、2、10与11型RA抗体以玻片凝集试验检测2型RA及RA200代次菌株的外膜蛋白的凝集特性。

1.2.4 外膜蛋白电镜形态观察

将细菌滴至铜网上,用滤纸从边缘将水分吸干后,用2%醋酸铀染液染色1~2 min,吸去多余染料,晾干后, H-600透射电镜下观察。

1.2.5 RA外膜蛋白SDS-PAGE

按常规方法进行。分离胶的浓度为12%,浓缩胶浓度为5%。60V恒压电泳至溴酚蓝进入分离胶后,电压改为120 V,直到指示剂移至接近胶底1 cm时停止电泳。取出凝胶后,蒸馏水漂洗2~3次,每次5 min;用考马斯亮蓝染液染色过夜,倾去染液,用蒸馏水漂洗数次。往平皿中加入考马斯亮蓝脱色液脱色,其间多次更换脱色液至蛋白条带清晰,背景无色。将获得的RA外膜蛋白SDS-PAGE电泳胶条,用蛋白质凝胶成像系统进行分析。

1.2.6 RA外膜蛋白免疫印迹试验

按常规方法进行。将电泳后的凝胶膜取出,在3 V恒压,电转移2 h。将纤维素膜置于TTBS(含0.05% Tween-20的TBS)中漂洗3次。将膜置于封闭液中37℃作用1 h,洗3次,每次5 min。加入1:30稀释的RA阳性血清,37℃作用1 h,再以TTBS漂洗3次。加入酶标记羊抗鸭IgG抗体(1:100稀释),37℃作用1 h,以TTBS漂洗3次。加入底物溶液,置暗处反应15 min,出现深色带为阳性,用蒸馏水洗涤终止反应,避光晾干。

1.2.7 RA外膜蛋白免疫鸭抗体的测定及对同源菌株攻击的保护性试验

将外膜蛋白与等量的弗氏佐剂混合乳化制成亚单位疫苗,外膜蛋白最终质量浓度为300 mg/L。1

日龄鸭分为 3 组, 各 12 只, 网上饲养。免疫组于 7 日龄颈部皮下接种 0.5 mL 乳化好的亚单位疫苗, 第 3 组为空白对照。分别在 5、10、20 日龄颈静脉采血 0.5 mL, 分离血清, 参照文献[8]测定 ELISA 抗体滴度, 并用 SPSS 软件对两组免疫组 20 日龄血清中抗体滴度进行 *t* 检验。在免疫后第 21 天, 第 1、2 组用肌肉注射 1 mL (含菌量为 5×10^9 CFU) 2 型强毒株 RA, 观察 7 d, 记录死亡情况; 未死鸭剖杀, 记录内脏器官病变情况, 只要出现纤维索性心包炎、肝周炎、气囊炎或其中的 1 种, 即记录为“病变鸭”。

1.2.8 RA2 及 RA200 外膜蛋白 A 序列比较分析

参考 ATCC 株(GenBank Accession No. AF10493) 外膜蛋白 A 全序列, 用 DNASTAR 设计了一对特异性引物, 并分别在上游与下游插入了 *Nco* I 和 *Xho* I 酶切位点, 引物由上海英俊生物公司合成:

上游引物 P1: 5'-GCTCCATGGGTAAAGAATT-TATGTTG-3'

下游引物 P2: 5'-TGGCTCGAGTTTTCTTTTCTT-TTTTACTAC-3'

PCR 反应体系: 5 μ L 10 \times PCR buffer、4 μ L 2.5 mmol dNTP、上下游引物各 2 μ L、模板 DNA 5 μ L(用蛋白酶 K 法提取模板 DNA), *Taq* 酶 0.5 μ L, 灭菌 H₂O 补至 50 μ L。PCR 反应条件: 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 40 s, 58 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 2 min, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。用 1%琼脂糖凝胶电泳验证 PCR 产物, 并用胶回收试剂盒回收。将 *ompA* 基因片段克隆载体中, 并转化入受体菌中, 取得单菌落, 提取质粒 DNA。用限制性内切酶 *Nco* I 和 *Xho* I 双酶切分析, 筛选阳性菌, 送上海英俊生物公司, 用 ABI 377 自动序列测定仪测序。

2 结果

2.1 RA2 及 RA200 外膜蛋白的凝集特性

原代菌株的外膜蛋白与 2 型 RA 抗体反应后液体变清, 并有乳白色凝集块出现, 判定结果为阳性; 而与 2、10 与 11 型 RA 抗体反应后液体仍然浑浊, 判定结果为阴性。传代菌株的外膜蛋白与 1、2、10 与 11 型 RA 抗体反应后结果都为阳性。

2.2 RA2 及 RA200 细菌形态的电镜观察

负染后, 透射电镜观察可见体外连续传代后, 里默氏杆菌的外膜及细胞质结构有显著改变, 见图 1。传 200 代次获得的弱毒菌株与原代强毒菌株比较, 细胞质不均匀、有空泡产生(A1、B1, $1 \times 150\,000$); 膜密度明显降低(A2、B2, $1 \times 60\,000$); 外膜泡的数量明显减少(A3、B3, $1 \times 30\,000$)。

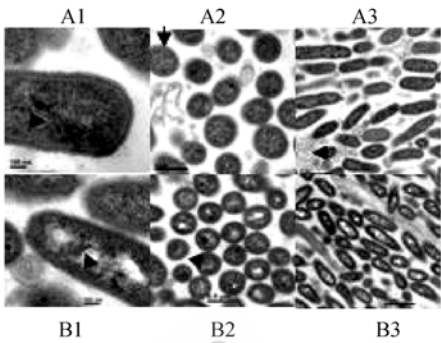


图 1 RA2 及 RA200 的电镜图
Fig. 1 Electron micrograph of RA
A1, A2, A3: electron micrograph of RA2; B1, B2, B3: electron micrograph of RA200

2.3 RA2 及 RA200 外膜蛋白 SDS-PAGE 电泳结果

本试验获得的 2 型 RA 及其传代株的外膜蛋白主要由 12 条多肽组成, Mr 在 20~100 kD 之间。外膜蛋白主要由 12 条蛋白组成, 分子量分别为 94、88、82、69、57、54、49、47、45、42、34 及 33 kD, 另外还有一些含量较少的次要蛋白多肽, 二者的电泳图谱没有明显差异。RA2 外膜蛋白的组成及其分子量见图 2、表 1。

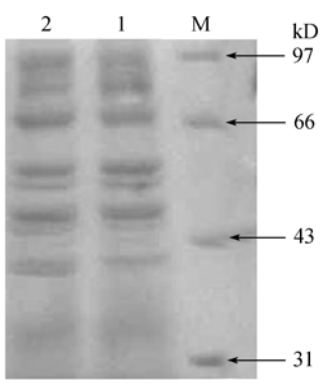


图 2 RA2 及 RA200 外膜蛋白 SDS-PAGE 电泳图
Fig. 2 SDS-PAGE analysis of the OMPs
1: OMPs of RA2; 2: OMPs of RA200; M: protein marker

表 1 RA2 外膜蛋白的主要组成蛋白分析
Table 1 Outer membrane protein composition of RA2

Peptides	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Mw (kD)	94	88	82	69	57	54	49	47	45	42	34	33

2.4 RA2 及 RA200 外膜蛋白免疫印迹试验结果

RA2 及 RA200 的外膜蛋白与同型的鸭抗 RA 血清进行反应结果见图 3，均出现了多条阳性反应带，反应较强的 5 条带分子量 94、69、57、49、34 kD，二者的免疫原性多肽存在明显区别。RA2 在 47 kD 出现明显反应条带，而 RA200 则反应较弱；RA200 在 67 kD 及 88 kD 左右出现明显反应条带，而 RA2 则反应较弱。

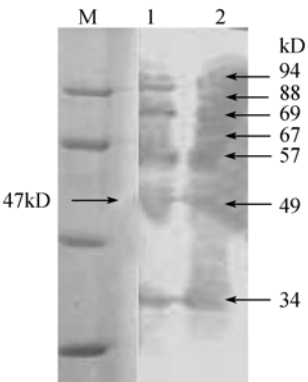


图 3 RA2 及 RA200 外膜蛋白免疫印迹图

Fig. 3 Detection of OMPs by Western blotting analysis
M: protein marker; 1: OMPs of RA2 strain;
2: OMPs of RA200 strain

2.5 外膜蛋白免疫雏鸭的及对同源 RA 菌株攻毒保护试验

ELISA 检测结果显示，强毒株外膜蛋白免疫组 20 日龄血清中抗体滴度 $0.578 \pm 0.03 (n=12)$ ，弱毒株外膜蛋白免疫组抗体滴度为 $0.416 \pm 0.02 (n=12)$ 。结果表明 RA2 与 RA200 外膜蛋白诱导产生的抗体滴度差异显著 $P=0.003$ ，小于 0.05。用同源 2 型 RA 强毒株攻毒后，强毒菌株外膜蛋白免疫组无一死亡；对这些未死鸭剖杀，观察内脏器官病变，未发现“病变鸭”，免疫保护率为 100%。而 200 代次的 12 只免疫雏鸭，受攻击后死亡 8 只，剖检 4 只未死鸭，均为

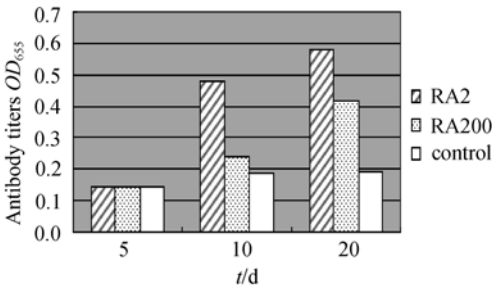


图 4 外膜蛋白免疫雏鸭的 ELISA 抗体滴度
Fig. 4 Ab response in ducks receiving OMPs and unvaccinated control

“病变鸭”，其保护率为 0。对照组 12 只未免疫雏鸭，受攻击后死亡 9 只，剖检 3 只未死鸭，也为“病变鸭”，其保护率为 0。

2.6 RA2 及 RA200 外膜蛋白 A 序列比较分析

PCR 扩增产物均为 1200 bp 左右的特异性条带与预期的大小相同(图略)。

用 DNASTar 软件比较 RA2(Genbank Accession No. EU10493)、RA 200 及 GenBank 中不同血清型、不同地区的鸭疫里默氏杆菌 *ompA* (Genbank Accession No. AY606216, AY606216, DQ532121, and EF408264) 基因序列，显示其同源性的 92.9%~100%，二者的同源性达到了 99.9% (图 5)。

		Percent identity						Divergence	
		1	2	3	4	5	6		
1			99.9	93.3	93.2	99.9	99.5	1	EU10493
2	0.1			93.4	93.3	100	99.6	2	RA200
3	6.6	6.5			99.0	93.4	92.9	3	AY606216
4	6.7	6.6	0.9			93.3	92.9	4	AY606229
5	0.1	0.0	6.5	6.6			99.6	5	DQ532121
6	0.5	0.4	7.0	7.1	0.4			6	EF408264
		1	2	3	4	5	6		

图 5 克隆 *ompA* 基因与 GenBank 上 *ompA* 序列同源性比较

Fig. 5 Comparison of the *ompA* nucleotide sequences

3 讨论

近年来国内外科学工作者对鸭疫里默氏杆菌外膜蛋白免疫原性做了初步的研究，证实鸭疫里默氏杆菌外膜蛋白能对感染起到良好的免疫保护作用，鸭疫里默氏杆菌外膜蛋白可作为细菌疫苗的候选蛋白。因此，研究鸭疫里默氏杆菌外膜蛋白的生物学特性对研究鸭疫里默氏杆菌病免疫保护作用机理有一定意义。

电镜观察 RA 及该菌传代菌株超微结构，结果显示，传 200 代次后，外膜泡(OMV)的数量明显减少，细菌的外膜及内部结构都较原代稀薄。OMV 是外膜的一部分，其主要成分是脂多糖(LPS)、磷脂和少量的蛋白质(主要是微孔蛋白)，各结构均具有重要的生物学活性。与整个菌体相比，OMV 体积小，易于通过整个菌体不易通过的解剖学屏障，可以作为毒力因子或毒力因子的运载工具，通过多种途径增强细菌的致病性^[9]。OMV 数量的明显减少可能是传代菌株丧失毒力的重要原因，推测 OMV 在里默氏

杆菌的致病性方面起至关重要的作用。传代菌株外膜及内部结构都较原代稀薄,外膜蛋白的构象可能也发生了改变。

以玻片凝集试验检测 2 型 RA 及该菌株传 200 代的菌株的外膜蛋白的凝集特性,原代菌株的外膜蛋白仅与 2 型 RA 抗体出现特异性凝集,而传代菌株的外膜蛋白与 1、2、10、11 型 RA 抗体均出现凝集,结果表明 RA 的外膜蛋白为凝集原样成分,而且经过连续传代后,这种凝集特性发生改变,表明其型的特异性丢失,同时 RA 外膜蛋白的失去免疫保护作用,这与 RA 不同血清型之间缺乏交叉免疫保护作用相一致。

OMPs 是革兰氏阴性菌外膜的主要结构,一些革兰氏阴性菌如幽门螺旋杆菌、志贺氏菌等的外膜蛋白具有免疫原性,不仅可激发机体的体液免疫,而且可引起细胞免疫,被用于试制疫苗的研究并展现出良好的应用前景^[10,11]。两株菌外膜蛋白与 2 型的抗血清反应后,均出现了多条阳性反应带,但免疫原性多肽存在区别。推测 RA 外膜的免疫原性蛋白是非单一的,而且传代后外膜蛋白中的免疫原性蛋白组成成分发生了变化。二者的电泳图谱差别不明显,可能是由于 SDS-PAGE 技术的限制,某些分子量相同但等电点不同的差别蛋白质点被覆盖,有待用差异蛋白质组学开展进一步研究。以两株 RA 外膜蛋白制备的亚单位疫苗免疫鸭后,可以激发机体产生较强的抗体反应,但强菌株诱导产生的 ELISA 抗体滴度显著高于传代菌株。人工攻击同源 RA 后,RA 强毒菌株外膜蛋白制备的抗原显示出良好的免疫保护性,保护率达 100%,但 200 代及对照组则不能产生免疫保护。Huang-bin^[12] 等曾采用 15 型鸭疫里默氏杆菌的 *ompA* 和 *P45N2* 重组谷胱甘肽 S-转移酶(GST)融合蛋白免疫鸭,并对其保护性进行了研究,二者都引起了较强的免疫反应,但针对血清 15 型攻毒,重组蛋白则不能提供有效保护。综合上述试验,我们认为连续传 200 代后外膜蛋白免疫保护性的丧失,是由几种亚单位成分表达量的变化所导致的。原代及传代株外膜蛋白亚单位成分 *ompA* 基因序列非常保守,同源性达到了 99.9%,但由于 RA 其它亚单位成分都是未知的,基因变异与免疫原性关系尚不能定论。

本研究通过原代及 200 代次外膜蛋白比较分析

证实,血清 2 型 RA 强毒株的外膜蛋白具有良好的免疫保护性,是用于制备疫苗的良好抗原来源,外膜泡在里默氏杆菌的致病性方面起至关重要的作用,外膜蛋白的凝集特性与免疫保护作用密切相关,RA *Omp* 起保护作用并非由其单一的亚单位成分完成的,而是由几种亚单位成分协同作用的结果,外膜蛋白某几种亚单位成分表达量的变化可能导致其免疫原性丧失。本研究为鸭疫里默氏杆菌病致病及免疫保护作用机制研究奠定了良好的基础。

REFERENCES

- [1] Zhang DB, Guo YP. Serotype detection of *Riemerella anatipestifer* of China. *Chinese Journal of Animal and Veterinary Sciences*, 1999, **30**(6): 536-542.
张大丙, 郭玉璞. 我国鸭疫里默氏杆菌血清型鉴定. 畜牧兽医学报, 1999, **30**(6): 536-542.
- [2] Timms LM, Marshall RN. Laboratory assessment of protection given by experimental *Pasteurella anatipestifer* vaccine. *Bri Vet J*, 1989, **145**: 483-493.
- [3] Teo TP, Tan HC, Loh H. Protective efficacy of a bivalent *Pasteurella anatipestifer* broth-grown bacterin in ducklings. *Singapore J Prim*, 1992, **20**: 53-60.
- [4] Pathanasphon P, Sawada T, Pramoolsinsap T, et al. Immunogenicity of *Riemerella anatipestifer* broth culture bacterin and cell-free culture filtrate in ducks. *Avian Pathol*, 1996, **25**: 705-719.
- [5] Peng XX, Ye XT, Wang SY. Identification of novel immunogenic proteins of *shigella flexneri* 2a by proteomic methodologies. *Vaccine*, 2004, **22**(21-22): 2750-2758.
- [6] Gebriel AM, SubRamaniam G, SekaRan SD. The detection and characterization of pathogenic *Leptospira* and the use of OMPs as potential antigens and immunogens. *Trop Biomed*, 2006, **23**(2): 194-207.
- [7] Cheema PS, Srivastava SK, Chaudhuri P, et al. Thangapandian E Cloning and Sequencing of a 21 kDa Outer Membrane Protein Gene of *Leptospira interrogans* serovar Canicola strain Hond Utrecht IV. *Vet Res Commun*, 2007, **13**(2): 184-194.
- [8] Huo CM, Wei Q. Development of an ELISA method for detection of *Riemerella anatipestifer*. *Acta Agriculture Zhejiangensis*, 2007, **22**(9): 329-331.
霍翠梅, 韦强, 鲍国连, 等. 鸭疫里默氏杆菌 ELISA 检测方法的建立. 浙江农业科学, 2007, **22**(9): 329-331.
- [9] Keenan J, Day T, Neel S, et al. A role for the bacterial outer membrane in the pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *FEMS Microbiol Lett*, 2000, **182**: 259-264.

- [10] Mukhopadhyaya A, Mahalanabis D, Chakrabarti MK. Role of *Shigella flexneri* 2a 34 kDa outer membrane protein in induction of protective immune response. *Vaccine*, 2006, **24**: 6028–6036.
- [11] Cheng AC, Liu ZY. Analysis of outer membrane protein polypeptide and immunity of *Riemerella anatipestifer* 2 serotypes. *Chinese Journal of Veterinary Sciences*, 2004, **24**(4): 329–331.
- [12] Huang B, Subramaniam S, Frey J, *et al.* Vaccination of ducks with recombinant outer membrane protein (*OmpA*) and a 41 kDa partial protein (*P45N'*) of *Riemerella anatipestifer*. *Vet Microbiol*, 2002, **84**(3): 219–230.
- 程安春, 刘兆宇, 汪铭书, 等. 血清 2 型鸭疫里默氏杆菌外膜蛋白多肽的组成及免疫原性研究. 中国兽医学报, 2002, **24**(4): 18–21.

科学出版社科学出版中心生命科学分社新书推介

动物细胞培养——基本技术指南(第五版, 翻译)

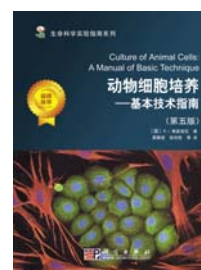
章静波 徐存拴 等译

978-7-03-02078-7 ¥138.00 2008 年 3 月 6 日出版

弗雷谢尼编著的《动物细胞培养 - 基本技术指南》历来被看作是该领域的领衔之作。自 2000 年第 4 版问世以来, 细胞培养及其相关学科的技术方法的发展更加迅猛, 诸如干细胞、组织工程、克隆以及体外毒性检测方面等均取得长足的甚至突破性的进展, 将这些内容以及其他方面的新的资料融入该书, 于是有了新的一版——第 5 版的面世。

该版除了保留原有主要内容之外, 为了适应细胞培养新手, 尤其是生物制药工业中所涌现的技术人员的需要, 专门新开辟了一章“培训纲要”, 其中包括基本技能训练, 高阶练习以及专门化实践等。另外, 如同前版一样, 本版也详尽介绍了如下内容: 原代培养、细胞系、传代、分化、癌细胞和细胞转化、三维培养、大规模培养、分子细胞学技术、污染、特殊设备、细胞培养中可能遇到的难题及对策等。因此, 本版最大特色可以概括为三个字或词: 全、新和实用。

本书可供有关大学师生尤其是研究生、科研人员、生物工程技术人员。



生理学实验指南

项辉 龙天澄 周文良 主编

978-7-03-021086-9 ¥28.00 2008 年 3 月 10 日出版

本书是在国内外优秀生理学实验教材的基础上, 结合作者多年实验教学经验编写而成的。内容包括总论、生理仪器的原理及使用、细胞生理、神经肌肉、血液、循环、消化和吸收、呼吸、代谢、尿生成及调节、中枢神经系统、感觉器官、内分泌与生殖等组织或系统的近 50 个实验; 专门用一章阐述了生理学实验常用仪器的原理, 并以图解的形式介绍了“RM6240”和“BL-420”两套计算机生理信号采集分析处理系统的操作方法; 还以附录形式列出了生理学实验中常用生理溶液的配制、常用实验动物的麻醉剂量等内容; 列举了实验中常见问题近 150 道并给出了简要答案, 便于学生进一步了解相关实验的原理、方法和注意事项。

本书适用于高等院校生命科学学院、动物科学学院、医学院、药学院等相关专业本科学生使用, 广大生理学爱好者或准备生理学专业研究生考试者可选本书作为参考书。



现代生态学(第二版)

戈峰 主编

978-7-03-021064-7 ¥68.00 2008 年 3 月 10 日出版

本书是根据生态学发展和研究生学习的需求, 系统地介绍生理生态学、种群生态学、群落生态学、生态系统生态学和系统生态学的基本原理, 论述它们在城乡建设、环境保护、可持续发展等领域的应用。其主要特点是在强调生态学基础理论与方法的同时, 还将重点介绍国内外研究的最新进展; 并结合讲课教师多年来学习与研究生生态学的实践, 分析生态学研究的方法的优缺点, 提出生态学研究的问题, 指明生态学发展的方向。目的是使生态学专业的研究生能系统地掌握生态学的基本理论与方法, 了解国内外的研究动态, 提高他们分析问题和解决问题的能力。



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 科学销售中心 邮编: 100717

联系人: 周文宇 联系电话: 010-64031535(带传真)

更多精彩图书请登陆网站 <http://www.lifescience.com.cn>, 欢迎致电索要书目