

基因芯片技术筛选家蝇抗菌肽相关基因

刘雷山¹, 金小宝², 朱家勇², 肖平³, 李沅湘⁴, 龚建武⁴

1, 4 长沙市第四医院检验科中心实验室, 长沙 410006

2 广东药学院基础学院病原生物研究室, 广州 510006

3 中南大学湘雅二医院肾病研究所, 长沙 410011

摘要: 用生物学软件对 GenBank 中部分昆虫抗菌肽基因编码区保守域设计探针, 用直接点样法将探针点印在特制玻片上构建寡核苷酸(Oligonucleotide, oligo)探针微阵列; 提取诱导后 24 h 的家蝇三龄幼虫脂肪体总 RNA, 逆转录成 cDNA 并标记上荧光标记物 Cy3, 与构建的 oligo 探针微阵列杂交, 经洗片、扫描处理后进行数据分析。结果在两次重复实验中均检测到有效杂交信号的基因点有 15 个(不包括阳性对照基因), 为进一步发现其新基因提供了依据。

关键词: 基因芯片, 家蝇, 抗菌肽基因, 昆虫抗菌肽基因, 筛选

Application of Microarrays in Screening the Antibacterial Peptide Associated Genes of *Musca domestica*

Leishan Liu¹, Xiaobao Jin², Jiayong Zhu², Ping Xiao³, Yuanxiang Li⁴, and Jianwu Gong⁴

1, 4 Department of Clinical Laboratory, the Fourth Hospital of Changsha, Changsha 410006, China

2 Department of Biotechnology, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China

3 Department of Nephrology, the Second Xiangya Hospital of Central South University, Changsha 410011, China

Abstract: To screen the candidate genes associated with *Musca domestica* antibacterial peptides using DNA microarray technique, the hybrid probes were designed from the conservative domains of the encoded area of the insect antibacterial peptide genes in GenBank with biology software Designer 2.0, and were synthesized by a chemical process, with the assistance of the automated Gen III Microarray Spotter, those oligo probes were printed on a special ready-made glass, and a cDNA microarray was constructed. The total RNA was extracted from the fat body of *Musca domestica* third-instar larve induced after 24 hours by *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*, the strands of cDNA were labeled with fluoresceine Cy3 using the method of reverse transcription PCR, after prehybridization, hybridization and washing procedure, the results of hybridization were scanned using computer system, and the data were analyzed using the software of MIDAS, fifteen valid hybridization signals were detected through two times of hybridization and scanning(the positive samples as a control were excluded). DNA microarray technique can be successfully applied screen the candidate genes associated with *Musca domestica* antibacterial peptides, and further provide significant evidence to discover its antibacterial peptide new genes.

Keywords: DNA microarray, *Musca domestica*, antibacterial peptide genes, Insect antibacterial peptide genes, screening

Received: October 29, 2007; **Accepted:** March 14, 2008

Supported by: the National Natural Science Foundation of China(No. 30671832).

Corresponding author: Jiayong Zhu. Tel: +86-20-39352222; E-mail: zhujiy@gdpu.edu.cn

国家自然科学基金项目(No. 30671832)资助。

家蝇抗菌肽是一类由结构基因编码的小分子肽类物质,是构成其自身免疫系统的重要组成部分^[1],具有广谱的抗细菌、抗病毒、抑肿瘤细胞、原虫等多种生物活性,对耐药菌株也有明显的杀伤作用,且对正常生物体细胞无害,亦无免疫原性,其热稳定性强,水溶性好,作用的机理非常独特^[2]。国外有关家蝇抗菌肽的研究少有报道,国内学者采用传统的分离纯化方法研究发现其体内存在有多种高活性的抗菌物质^[3],在其他昆虫体内也是如此,如从双翅目果蝇(*Drosophila*)体内已发现了 7 种不同类型的抗菌肽^[4],鳞翅目家蚕(*Bombyx mori*)体内也发现了 8 种不同的抗菌肽^[5];目前从家蝇体内所克隆到的抗菌肽基因还只有 Cecropin、Attacin、Defensin 三个^[6-8],这与传统分离研究所发现的抗菌活性物质数量明显不相符,预示着其体内可能还有其他新抗菌肽基因未被发现。

家蝇从幼虫到成虫常生活在垃圾堆、禽畜粪便等有多种病原菌孳生的环境中,携带有害病原微生物约 60 多种,能在人、畜中通过机械传播多种疾病,而自身并不染病,且不具有高等动物那样高度专一的免疫系统,亦缺乏 B、T 淋巴细胞系统,也无免疫球蛋白和补体的存在,仅依赖于其独特的天然免疫系统抵抗各种微生物的感染,其中抗菌肽在其免疫防御中起着主要的作用。但该作用是否是因各抗菌肽协同所产生的合力所致还是每一抗菌肽作用于不同病原微生物所产生的结果还不很清楚,因此,为了进一步揭示家蝇抗菌肽在其免疫防御中所起的作用,给下一步研究其抗菌肽在体内的时空表达模式奠定基础,也为今后用基因工程方法研究其抗菌肽提供基因源,有必要进一步寻找其新抗菌肽基因。

对已克隆到的这三个家蝇抗菌肽基因经进一步分析,发现与其他昆虫同类抗菌肽基因存在很大的同源性,在其编码区的同源性最高,且存在有高度保守的结构域^[8,9]。本研究拟 GenBank 中部分昆虫抗菌肽基因保守域设计高特异性探针,构建 oligo 探针微阵列,与 Cy3 标记的诱导后 24 h 的家蝇三龄幼虫脂肪体 cDNA 杂交,以对家蝇抗菌肽相关基因进行有效筛选。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 样本与菌种来源

家蝇(广东株)由广东省疾病预防控制中心提供,

饲养方法参照文献[10];大肠杆菌(*E. coli*)和金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)由本实验室保存。

1.1.2 主要试剂、设备及分析软件

RNeasy Mini Kit、PCR Purification Kit (QIAGEN, Inc.), CyScribe cDNA Labeling Kit (Amersham Pharmacia Biotech, Ltd), 其他常用化学试剂均为分析纯;主要设备及相关软件有台式微型离心机、5810R 冷冻桌面离心机 (Eppendorf, Ltd), 芯片点样仪 III、芯片扫描仪 III (Amersham Pharmacia Biotech, Ltd), 恒温杂交箱(Shellab, Ltd)、电泳设备(Bio-Rad, Ltd), DU520 紫外分光光度计(Beckman Coulter, Ltd), 凝胶成像仪(Vilber, Ltd), 紫外交联仪(Viber Lourmat, France), 扫描图像显示软件(Amersham Pharmacia Biotech, Ltd), 图像分析用软件(Imaging Research, Ltd.), 数据分析软件(Chipscreen Biosciences, Ltd.), 蛋白质分析系统(Expert Protein Analysis System)、美国国家生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information, NCBI)开发的生物信息学软件及基因芯片探针设计软件 Array Designer 2.0, GenBank 数据库。其中 oligo 探针序列由上海生物工程技术有限公司合成,基因芯片委托深圳微芯生物科技有限责任公司生产。

1.2 方法

1.2.1 探针设计及 oligo 微阵列的构建

在 GenBank 数据库中获取部分昆虫抗菌肽基因序列,其序列号分别为: AMU15956、L34403、L76300、AB104817、AB191477、AB128064、AB128065、AF442147、AY423049、NM 001011617、AF233589、AY533675、S79612、AB006915、AB100428、AY232301、AY611631、AY847955、AB014092、U30289、D49415、D49929、AB094343、NM079848、AF322252、AF334181、AI297596、AF368906、AY431779、M55432、NM079063、X15851、AF334182、NM079020、NM079177、NM139546、AY333924、AY338359、AY351398、AY351402、NM168020、AB059626、AY351397、AJ544540、AY433717、AY440356、AY189807、AY432799、AF466602、AY388563、X91060、NM079028、NM001011616、AY333923、NM001011638、NM001011642、AF442148、NM001011613、X72576、AB190866、AF233590、AY232303、AB190363、AB190864、

AM293324、DQ666495、AM293319、AB011246、AB182995、AY515322、AB220992、AF453868、AY529704、AY232302、M23661、AY130768、E01229、M18873、M25612、L76300、J04053、S80571、AB021307、AF487907、NM001011607、X02007、D13744、AY431999、AY642897、AY642908、D17670、U21482、AB117641、AY945211、AF453824、AY238440、AY829857、AF054616、D13797、AF467987、AY221108、AY223516、AB081620、X75595、AY278991、NM001011582、AB076385、AY945212、AF005384、AB186416、DQ180321、AY440486、AJ237664、DQ323126、DQ308606、DQ308607、DQ308608、DQ308609、DQ311192、DQ377066、CK594686、CK594687、AY440570、AY693973、DQ007317、NM057481。

用 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> 及蛋白质分析系统中相关软件分析出各自的编码区和保守结构域,用 Array Designer 2.0 生物学软件对其保守结构域序列设计特异性 oligo 探针,探针设计时遵循以下原则:①探针的 T_m 值接近一恒定值,上下波动 5°C ;②每个探针重复碱基连续不超过 6 个;③G+C 含量为 40%~60%;④各探针分子内部互补碱基数少于 6 bp;⑤经 BLAST 比较,各探针相互间序列的相似性小于 40%。据此原则,共设计出长 50 bp、 T_m 值为 $65\sim 70^\circ\text{C}$ 的高度特异性探针 372 条,部分探针序列如下:

```
1: tctacgataagaatggaatgacaggagacgcctatggtggactaaacatt
2: gcaggattcgagtttgggaagaatataagaatggttcatcaaaggaca
3: ttgtggttaagcggagtttaggtgtgtgatttcaggagcaaagaaagt
4: caacaggcagaagatttgtagagggtacacctgaagagactttgta
5: ctgcaatcaaatatgtttccgagacttggaagctgttactacaacacat
6: aattgtcagattgttattaccgtggaaccaacccttattgcaacgag
7: cgtatcactggaacaacgcactcatggactgtgaagagctatctacat
8: taattggttagtatcaaaaggaaacgtgtgtactgttaaagacagtgtgc
9: caacgtgtaaagtgtctgaagggtgcgtcaatgtgcaaagtactattc
   :
372: atgcagttggtgaggccgatccctcgatataacaaaactcaatataaaa
```

探针分别溶解于磷酸盐缓冲液(pH 8.0)中,用芯片点样仪 III 将探针有序地点印在预制好的玻片上,每一探针重复点样 3 次,每一玻片设计 12 个独立的小矩阵,每个小矩阵由 4 行 16 列组成,同时以家蝇管家基因 GAPDH(序列号: AY675185)、Hex-L(序列号: AY146634)片段、家蝇 RNA 28S(序列号: AF502983)、家蝇 RNA 18S(序列号: DQ133074)及已

克隆到的一个抗菌肽基因 Cecropin(序列号: EF175878)作为阳性对照,以植物拟南芥基因组(序列号: AM236861)中一个基因片段作为阴性对照(对照探针也同样遵循上述原则),以磷酸盐缓冲液为空白对照。点制好的玻片在 70%湿度条件下水合 2 h,室温下先后用 0.2% SDS、去离子水和 0.2% NaBH_4 中浸渍 10 min,再室温干燥 30 min 后经紫外交联等处理,制备成 oligo 芯片,制备好的芯片放暗盒中保存备用。

1.2.2 诱导方法

取家蝇三龄期幼虫,用昆虫针蘸取金黄色葡萄球菌和大肠杆菌混合菌液,从腹部进行刺针,再放回饲养 24 h 后收集作为提取总 RNA 的材料^[10]。

1.2.3 总 RNA 的提取及质量鉴定

随机取上述诱导后的三龄期幼虫适量(约 100 mg),用 DEPC 处理水清洗后滤干,解剖出脂肪体组织,置于经去 RNA 酶处理后的预冷的研磨器中,加入适量液氮、TRIZOL 溶液充分研磨,按照 QIAGEN 公司提供的 RNeasy Mini Kit 操作说明抽提和纯化其总 RNA,用分光光度法检测其量和纯度、1.1%甲醛变性琼脂糖凝胶电泳检测其完整性。

1.2.4 逆转录 PCR 及 cDNA 荧光标记

取总 RNA 20 μg , Oligo(dT)₁₈ primer 1 μL ,加 Nuclease-free water 至 10 μL , 70°C 变性 5 min,冰上冷却 5 min 后再加入 $5\times$ Buffer 4 μL 、0.1 mol/L DTT 2 μL 、dNTP mix 1 μL 、dye-dCTP 1 μL 、Ribonuclease Inhibitor 1 μL 、RT 1 μL , 42°C 反应 2 h 后用 0.5 mol/L NaOH 调 pH 值为中性,再按 QIAquick PCR Purification Kit 操作说明对产物进行纯化。

1.2.5 预杂交

将 200~250 mL 预杂交缓冲液倒入杂交缸中,液面高度与杂交芯片同高,小心取出芯片放杂交缸中,置摇床上于室温缓慢摇晃 20~30 min 后取出甩干,并用气罐轻轻吹干表面至整个玻片完全干燥。

1.2.6 杂交

将纯化、标记好的 cDNA 抽干,加入 $4\times$ 杂交缓冲液、甲酰胺各 7.5 μL ,加灭菌水至总体积 30 μL ,混匀后短暂离心, 95°C 水浴 5 min,立即冰上放置 1 min,振荡混匀后短暂离心,将之铺在预杂交过的芯片阵列上,轻轻盖上盖玻片,放入杂交盒内,于 37°C 下杂交 16 h。

1.2.7 洗片

取出玻片放于片夹上, 将放入盛有去离子水的染色缸中, 让盖玻片垂直并自然滑落; 取出片夹, 迅速放入另一个盛有 200~250 mL 洗脱液 I (0.1% SSC) 的染色缸中, 置摇床上于室温缓慢摇晃 20 min; 取出片夹, 再重复洗涤一次后取出玻片甩干, 并用气罐轻轻吹干表面直至玻片完全干燥。

1.2.8 杂交芯片的检测分析

用 Generation III array scanner 扫描仪扫描芯片, 用 Imagequant 5.0 扫描图像显示软件与 Array Vision 6.0 扫描图像分析软件将图像转化为基于荧光强度的数字信号, 对数据进行合并, 用 MIDAS 芯片数据分析软件对数据进行分析 and 有效筛选, 并以如下条件作为判断阳性的标准: 以阴性对照点的杂交信号数值为参照, 只有杂交信号大于所有空白对照点的平均信号强度加上 3 倍标准差(>空白点平均信号强度+3×STDEV)的基因点数据才被认为是有效数据。

2 结果

2.1 总 RNA 的提取

从诱导 24 h 后的家蝇三龄期幼虫脂肪体中提取到总 RNA 258 μg, RNA 浓度为 12.9 μg/μL, 吸光度 A₂₆₀/A₂₈₀ 为 1.97, 说明总 RNA 的量和纯度较高; 电泳显示 28 S 和 18 S 条带均清晰, 说明所提取的总 RNA 完整性较好, 适于作基因芯片检测(如图 1)。



图 1 总 RNA 1.0% 琼脂糖凝胶电泳
Fig. 1 1.0% agarose gel electrophoresis of totle RNA

2.2 基因芯片杂交与结果分析

用逆转录 PCR 标记技术对诱导后家蝇三龄幼虫脂肪体总 RNA 反转录成 cDNA 并进行 Cy3 荧光素标记, 与所构建的 oligo 探针微阵列杂交, 经扫描仪扫描, 所有阳性对照信号清晰, 阴性对照和空白对照为阴性, 说明实验无污染且检测体系正常, 从而证实了实验的可靠性, 结果如图 2; 杂交结果经

MIDAS 等软件进一步分析和统计学处理, 对杂交信号的可可靠性进行有效的分步筛选, 每个荧光通道 (CY3) 的扫描数据, 包括了每个基因点的扫描数值 (Vol-RFU)、背景数值 (Bkgd) 以及扣除背景后的实际数值 (sVOL) 三个部分, 它代表了每个样品在该基因点上的杂交信号强度, 进行数据合并时把芯片上每个探针 6 次重复点样所得数据以其中值为标准, 每一点周围区域的局部背景数值被从这一点的总信号值中减去, 以扣除背景后的实际数值进行数据合并

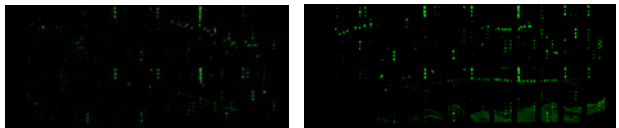


图 2 芯片杂交后扫描结果
Fig. 2 The hybridization and screening result

表 1 阳性基因点分析数据
Table 1 The analytic data of the positive fifteen valid hybridization singals

No.	Gene	DNA microarray 1	DNA microarray 2
E5143	14A-1	8923.5305	46811.299
E5147	14D-1	23710.2855	35388.165
E5195	28A-1	17991.3075	64140.649
E5202	31A-1	16984.684	48498.053
E5273	31A-1	6673.2465	10148.492
E5274	31A-2	17845.4685	22801.812
E5276	31B-2	16492.66	41850.422
E5231	44B-2	9005.5285	182338.219
E5148	14E-1	27019.887	32222.676
E5149	14E-2	13015.819	30929.283
E5108	3-1	7531.825	14510.203
E5209	34-2	7137.249	11260.965
E5217	37-2	16119.216	24381.887
E5232	45-1	7478.3145	17302.713
E5116	7-7A-1	8233.0955	19166.233
E5255	Positive control-1	7084.0655	36594.161
E5256	Positive control-2	19061.0735	112352.082
mdo18S	mdo18s	44247032.17	67263188.66
mdo28S	mdo28s	638195.6815	8497573.558
GAPDH	mdoGAPDH	14043.7075	452967.944
Hex-L	mdoHex-L	116345.9685	1884070.772
Average(blank)+3*SD:		5768.190 104	8666.569 866

分析, 按照有效数据的筛选标准对芯片上基因点杂交信号的有效性进行判断, 在两次重复实验中均检

测到有效杂交信号的基因点有 15 个(不包括阳性对照基因, 分析数据如表 1 所示), 其中一个有效杂交信号点所对应的基因(登录号: J04053)在家蝇抗菌肽基因中已有相关报道, 其编码区氨基酸序列与家蝇 Defensin (登录号: EF175879)相同^[8], 其余有效杂交信号点所对应的基因在家蝇中尚未见相关研究, 可能是其抗菌肽新基因。

3 讨论

随着人们对基因研究的重点逐渐向探索基因的功能转换, 迫切需要一种能进行大规模、高通量的新方法并研究数以万计的基因功能, 这一发展要求催生了基因芯片的产生^[11]。基因芯片技术就是将大量生物分子作为探针用点样仪有序地点印在特制玻片、硅片等支持物表面, 组成密集的二维分子阵列, 与已标记的待测生物样品中靶分子杂交, 通过对杂交信号进行检测分析, 达到大规模分析出检测样品遗传信息的一整套技术, 具有高通量、特异性好、快速等优点, 克服了传统方法一次只能研究一条或少数几条基因的局限性, 已被广泛应用于生命科学研究领域^[12]。传统寻找新基因的方法如差异显示 PCR、抑制性消减杂交等或是操作繁琐, 或是假阳性率较高^[13], 具有低通量等不足。基于此, 本研究用基因芯片技术来对家蝇抗菌肽相关基因进行有效筛选。

设计高特异性和高灵敏度的杂交探针是制备高质量基因芯片的关键, 本研究选取已知基因的保守域为设计目标, 用 Array Designer 2.0 生物学软件的批量 BLAST 功能对设计出的探针进行相互间同源性和筛选, 避免了探针相互之间的交叉同源性, 保证杂交信号的准确性和忠实性, 大大减少非特异性杂交; 同时对探针的长度、 T_m 、GC 含量、自身二聚体、发夹结构的自由能等进行了限制, 保证在相同的杂交和洗片条件下得到较好、较忠实的杂交效果; 同时, 限制探针内部的发夹结构长度不超过 6 bp, 保证探针内部不会形成稳定的二级结构而影响杂交的效率和检测的准确度。

据不同的实验目的, 有多种方法产生芯片探针。近年来随着核酸合成技术的进步, 使得人工合成寡核苷酸做探针点样制备基因芯片已成现实, 且人工合成 oligo 探针简单直接, 所构建的微阵列具

有更好的特异性和较均一的 T_m 值等优点, 可提高芯片杂交时的稳定性和可重复性^[14]; 研究表明长度为 50~70 bp 的 oligo 探针足以代表一个基因, 且其灵敏度和特异性两方面都最佳^[15], 因此本研究采用人工合成长度为 50 bp 的 oligo 探针来构建微阵列, 作为高特异性探针来筛选家蝇抗菌肽相关基因。

mRNA 质量对芯片进行杂交的结果至关重要, 其质量要求包括: ①完整性, 实验采用新鲜的三龄幼虫脂肪体作提取物, 器具均经去 RNA 酶处理, 研磨时加入液氮和 TRIZOL 试剂进行充分裂解, 直至完全匀浆, 并尽量减少 RNA 的降解。②纯净性, 采用氯仿多次抽提, 乙醇洗涤, 尽可能将蛋白质去除干净; 实验中采用纯化柱对总 RNA 进行纯化, 以去除 5 S RNA、rRNA 及基因组 DNA 的影响。与其它昆虫抗菌肽一样, 家蝇抗菌肽的产生是其在外界环境、生物因素等作用下进行免疫反应的生物效应, 通常在免疫后的一段时间内抗菌蛋白的表达大大增加, 因此在提取 RNA 之前对其进行了免疫诱导, 使其体内有丰富的抗菌肽 mRNA 产生, 以确保杂交时模板的丰度。

为了保证杂交的可靠性和消除实验中的非特异性杂交信号, 本研究连续采用两次重复实验, 结果所有阳性对照信号清晰, 阴性对照和空白对照为阴性, 说明整个实验的质量得到了较好的控制, 忠实性较可靠。本研究单位正着手对筛选出的 14 个(已有报道一个除外)有效杂交信号所对应的基因进行克隆, 从目前的研究工作来看, 所筛选出的结果有效性较真实。

REFERENCES

- [1] Kamysz W, Turecka K. Antimicrobial preservative effectiveness of natural peptide antibiotics. *Acta Pol Pharm*, 2005, **62**(5): 341-344.
- [2] Gong X, Shi YH, Le GW. Purification of antimicrobial peptide MDL-1 from *Musca domestica* larvae and its effect on *Escherichia coli* ultrastructure. *Acta Entomologica Sinica*, 2004, **47**(1): 8-13.
宫霞, 施用晖, 乐国伟. 家蝇幼虫抗菌肽 MDL-1 的分离纯化及其对大肠杆菌超微结构的影响. *昆虫学报*, 2004, **47**(1): 8-13.
- [3] An CJ, Geng H, Hao YJ, et al. The influences of different factors in extraction on antibacterial activity of protein crude extracts in housefly larvae. *Acta Entomologica*

- Sinica*, 2004, **47**(5): 691–694.
- 安春菊, 耿华, 郝友进, 等. 不同提取工艺对家蝇幼虫蛋白粗提液抗菌活性的影响. *昆虫学报*, 2004, **47**(5): 691–694.
- [4] Rutschmann S, Jung AC, Zhou R, *et al.* Role of drosophila IKKc in a toll independent antibacterial immunere sponse. *Nature Immunology*, 2000, **11**(4): 342–347.
- [5] Xia QY, Zhou ZY, Lu C, *et al.* A draft sequence for the genome of the domesticated silkworm (*Bombyx mori*). *Science*, 2004, **306**(10): 1937–1940.
- [6] Liang Y, Wang JX, Zhao XF, *et al.* Molecular cloning and characterization of cecropin from the housefly (*Musca domestica*), and its expression in *Escherichia coli*. *Dev Comp Immunol*, 2006, **30**(3): 249–257.
- [7] Geng H, An CJ, Hao YJ, *et al.* Molecular cloning and expressing of *Attacin* from housefly (*Musca domestica*). *Acta Genetica Sinica*, 2004, **31**(12): 1344–1350.
- 耿华, 安春菊, 郝友进, 等. 家蝇攻击素(*Attacin*)基因的克隆与表达. *遗传学报*, 2004, **31**(12): 1344–1350.
- [8] Xu QY, Jin XB, Zhu JY, *et al.* Cloning and sequence analysis of the *Defensins* gene from *Musca domestica* larvae. *Journal of Tropical Medicine*, 2004, **4**(5): 513–517.
- 许琴英, 金小宝, 朱家勇, 等. 家蝇幼虫防御素基因 cDNA 的克隆与序列分析. *热带医学杂志*, 2004, **4**(5): 513–517.
- [9] Jin XB, Xu QY, Zhu JY, *et al.* Cloning and sequence analysis of the cDNA encoding cecropin an antimicrobial peptide from *Musca domestica* larvae. *China Tropical Medicine*, 2004, **4**(6): 903–906.
- 金小宝, 许琴英, 朱家勇, 等. 家蝇幼虫天蚕素基因的克隆与序列分析. *中国热带医学*, 2004, **4**(6): 903–906.
- [10] Jin XB, Zhu JY, Wang TT. Construction and preliminary identification of the cDNA library for *Musca domestica* larvae. *Chinese Journal of Zoonoses*, 2005, **21**(1): 52–55.
- [11] Ramachandran N, Hainsworth E, Bhullar B. Self-assembling protein microarrays. *Science*, 2004, **305**(2): 86–90.
- [12] Frigessi A, Wiel MA, Holden M, *et al.* Genome-wide estimation of transcript concentrations from spotted cDNA microarray data. *Nucleic Acids Res*, 2005, **33**(17): e143.
- [13] Nie D, Xiang Y. Molecular cloning and characterization of a novel human testis-specific gene by use of digital differential display. *Genet*, 2006, **85**(1): 57–62.
- [14] Wu C, Carta R, Zhang L. Sequence dependence of cross hybridization on short oligo microarrays. *Nucleic Acids Research*, 2005, **33**(9): e84.
- [15] He ZL, Wu LY, Li XY, *et al.* Empirical establishment of oligonucleotide probe design criteria. *Appl Environ Microbiol*, 2005, **71**(7): 3753–3760.

科学出版社科学出版中心生物分社新书推介

食品免疫论——关于胃肠黏膜免疫和细胞因子网络的科学

庞广昌 著

978-7-03-021049-4 ¥128.00 2008年5月14日出版

本书从胃肠黏膜免疫及其信号传递途径、TLR 识别和 DC 细胞成熟在先天性和获得性免疫中的关键作用、细胞因子网络、炎性-抗炎细胞因子平衡等现代免疫学视角出发,对食品在人类健康和免疫中的关键作用进行了归纳和总结,系统论证了食品在免疫控制和调节、机体防御以及信号传递中的关键作用。本书分析了肠道微生态与健康,细胞因子网络与经络、针灸、中医药,食品如何通过细胞因子网络控制机体健康,中国的农耕饮食文化和系统思想的起源与发展等。希望此书能架起中国传统医学与食品科学和现代免疫学的桥梁。

本书可供免疫学、食品科学、食品营养与卫生等领域的学者科研人员参考,也可作为相关学科的本科生或研究生教材。



城市生态学经典案例和实验指导

杨小波 主编

978-7-03-020400-4 ¥45.00 2008年5月30日出版

《城市生态学经典案例和实验指导》是《城市生态学》(第二版)的配套教材。本书包括实验指导和案例分析两部分,实验指导主要内容有城市生态系统、城市人口、城市环境等,案例分析主要内容有城市人口、城市环境、城市灾害及防治、城市景观、城市环境质量评价等。

本书可作为高等院校生态学各相关专业本科生实验教学用书,也可供从事相关工作的读者参考。



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