

一种多拷贝毕赤酵母表达载体的构建及人脑源性神经营养因子的表达

梁伟锋 张朝春 杨希才*

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

摘 要 利用 PCR 技术扩增出 pPIC9K 载体的 HIS4-Kan 序列片段,与 pPICZ α 重组 构建结合了两个载体特点的适合体外构建多拷贝基因表达盒的毕赤酵母表达载体 pPICZ α 1,改造后的载体含 HIS4-Kan 序列,能整合到酵母染色体上,具有筛选方便、外源基因多拷贝组建迅速、蛋白产物分泌表达和易纯化等优点。将人脑源性神经营养因子(hBDNF)的 cDNA(357bp)克隆入载体 pPICZ α 1,利用同尾酶 *Bgl* II、*Bam*HI 不可逆连接方式,分别构建含有 1、2、3、6 个拷贝 hBDNF 表达盒的重组表达载体,电击法转化毕赤酵母 GS115 菌株,用 G418 和 Zeocin 筛选转化子,筛选到的阳性转化子用 0.5% 甲醇诱导,获得分泌型表达。表达产物类似于天然神经营养因子单体大小、分子量约 14kD。多拷贝 hBDNF 表达盒的表达水平亦高于单拷贝 hBDNF 表达盒,ELISA 和 Western blot 检测表明:表达的蛋白能与鸡抗人脑源性神经营养因子抗体特异结合,证实该表达蛋白具有 hBDNF 的免疫原性。

关键词 多拷贝表达载体,人脑源性神经营养因子,毕赤酵母,分泌表达

中图分类号:Q786 文献标识码:A 文章编号:1001-6209(2005)01-0034-05

pPIC9K、pPICZ α 、pAO815 是 Invitrogen 公司开发的系列载体,各有其特点,适合不同的外源基因克隆策略,适合体外构建多拷贝的载体 pAO815,没有形成信号肽功能的 α 因子基因序列,属于胞内表达载体,克隆位点只有一个限制性酶 *Eco*R I,对一些要求特殊的外源基因或特异克隆策略,会造成不便,已有实验室通过在载体 pAO815 上加入 α 因子的方式改造载体,克服内源表达造成的不便^[1]。本研究介绍一种新的方法,通过 PCR 技术获得 pPIC9K 载体上的 HIS4-Kan 序列片段,插入到 pPICZ α 载体上,利用 pPICZ α 载体具有 α 因子信号肽,具有多克隆位点的特点,构建适合体外组建多拷贝基因表达盒和分泌型表达的毕赤酵母表达载体 pPICZ α 1。

脑源性神经营养因子(Brain derived neurotrophic factor, BDNF)是在神经生长因子(Nerve growth factor, NGF)被发现近 30 年后由德国 Barde^[2]及其同事首次从猪脑中分离纯化的具有防止神经元死亡效能的一种活性多肽,属于神经生长因子家族第二个成员。其生理作用是促进多种神经元早期增殖、分化及维持成熟神经元存活等^[3,4],最近的研究表明 BDNF 的生物学作用和作用机制可能更丰富,它在中枢疼痛反应中可能起调节作用^[5];对情绪失调疾

病的改善和治疗方面的作用也在动物试验与人体试验得到验证^[6-8];与其他神经营养因子的协调作用的机制研究也在进展中,因此,随着研究、了解的深入 BDNF 的应用前景变得十分光明^[9],由于天然 BDNF 含量很低,获取困难,无法满足生物学功能研究和临床应用的需要,而利用基因工程的手段生产可以有效解决这个问题,所以利用基因工程的手段生产 BDNF 具有重大的研究和应用价值。

毕赤酵母(*Pichia pastoris*)表达系统是近 10 年来得到广泛应用的表达外源基因最成功的系统之一,到目前为止,已经有 200 多种蛋白在此系统中得到表达。已有报导利用原核生物大肠杆菌和真核生物酿酒酵母工程菌表达 BDNF,目前还没有在毕赤酵母中表达的报导,为了提高 BDNF 的表达量,把 BDNF 基因克隆到经过改造的 pPICZ α 1 载体上,构建含有多拷贝表达盒的重组载体,转化甲醇酵母 *Pichia pastoris* 并在其中进行了表达。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 质粒、菌株和主要试剂:载体 pPIC9K、pPICZ α 、大肠杆菌(*Escherichia coli*)DH5 α 菌株、含有

* 通讯作者。Tel: 86-10-62625603; E-mail: yangxc@sun.im.ac.cn

作者简介 梁伟锋(1976-)男,河南许昌人,硕士研究生,研究方向为分子病毒学与基因工程。E-mail: liang1976@hotmail.com

收稿日期 2004-04-30,修回日期 2004-06-02

hBDNF cDNA 的重组载体 pPIC9K-hBDNF, *E. coli* JM83、*P. pastoris* GS115 为本室保存, DNA 限制性内切酶、T4 DNA 连接酶购自 TaKaRa 公司, 高保真 *Pfu* 酶购自北京天为时代公司, 通用引物为上海博亚生物公司惠赠, 一抗 Anti-human BDNFpAb、酶联二抗 Anti-chicken IgY HPR 购自 Promage 公司, Zeocin、Yeast Nitrogen Base (YNB) D-生物素购自 Invitrogen 公司。

1.1.2 培养基和培养方法: YPD、MM、MD、BMGY、BMMY 培养基配制和毕赤酵母的培养方法参照 Invitrogen 公司操作手册。

1.2 引物和 PCR 扩增

依据 Invitrogen 公司载体操作手册提供的 pPIC9K 载体序列和构建多拷贝策略设计两条引物: P1: 5'-GAGGATCCTTAAATAAGTCCAG-3' (划线部分为 *Bam*H I 酶切位点); P2: 5'-AGAGATCTTACAAGGGGTGTTA-3' (划线部分为 *Bgl* II 酶切位点。以纯化的 pPIC9K 质粒为模板, 以 P1、P2 为引物进行扩增, 使用高保真 *Pfu* 酶, 扩增片段为 pPIC9K 的 HIS4-Kan 序列, 大小为 3.6kb。PCR 反应条件 (50 μ L) 5 μ L 10 \times PCR 缓冲液, 引物 500nmol/L, dNTP 100 μ mol/L, 模板质粒 DNA 50ng, 高保真 *Pfu* 酶 2U, 无菌水补充至 50 μ L。扩增条件: 94 $^{\circ}$ C 3min; 94 $^{\circ}$ C 2min, 56 $^{\circ}$ C 40s, 72 $^{\circ}$ C 2min, 30 个循环, 72 $^{\circ}$ C 10min。用限制性内切酶 *Bgl* II / *Bam*H I 双酶切 PCR 产物, 经 0.8% 琼脂糖凝胶电泳, 切胶, 玻璃奶法回收酶切后的片段, 具体操作依据天文时代公司产品说明。

1.3 表达载体构建和酶切鉴定

限制性内切酶 *Bgl* II 线性化质粒 pPICZ α 与 *Bgl* II / *Bam*H I 双酶切 HIS4-Kan 序列片段连接, 构建了载体 pPICZ α 1, 连接产物转化大肠杆菌 DH5 α , 在含有 Kan 和 Zeocin 双抗培养基平板上筛选阳性克隆, 用限制性酶 *Sac* I / *Eco*R I, *Bgl* II / *Eco*R I 分别酶切, 0.8% 琼脂糖凝胶电泳分析鉴定插入片段的方向。

1.4 BDNF 基因的亚克隆和含有多个拷贝表达盒的质粒构建和酶切鉴定

用 *Sac* I / *Eco*R I 双酶切 pPIC9K-hBDNF 载体, 切出含 hBDNF 基因的片段与同样双酶切的 pPICZ α 1 连接, 形成具有单个表达盒的重组载体, 具体亚克隆方法参照文献 [12], 将具有单个表达盒的重组载体用 *Bgl* II / *Bam*H I 双酶切, 取出单表达盒, 在重组载体的 *Bgl* II 位点插入, 构建含有两个表达盒的重组载体, 依次类推, 连续亚克隆, 分别构建含有 1、2、3、6 个拷贝表达盒的重组载体, 构建方法参照

Invitrogen 公司操作手册。重组载体用 *Bgl* II / *Bam*H I 双酶切, 经 0.8% 琼脂糖凝胶电泳分析鉴定。

1.5 酵母转化子筛选和 PCR 鉴定目的基因的整合

酵母感受态细胞的制备参照 Invitrogen 公司操作手册, 重组载体电转化 GS115 菌株, 分别涂 MM 和 MD 平板, 30 $^{\circ}$ C 培养 2d 后获得转化子的单菌落。根据转化子的生长情况, 挑取在两个平板上生长大小相当的单菌落, 这种表型为 Mut⁺ 型, 在 MM 平板上较小而 MD 平板上较大的为 Mut_s 型。提取转化子的总 DNA 为模板, 用多克隆位点两端的测序通用引物和 *Taq* 酶进行 PCR 扩增, 反应条件 (50 μ L) 5 μ L 10 \times PCR 缓冲液, 引物 500nmol/L, dNTP 100 μ mol/L, 模板总 DNA 50ng, *Taq* 酶 2U, 无菌水补充至 50 μ L。反应条件: 94 $^{\circ}$ C 3min; 94 $^{\circ}$ C 2min, 56 $^{\circ}$ C 40s, 72 $^{\circ}$ C 2min, 25 个循环, 72 $^{\circ}$ C 10min。0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.6 Mut⁺ 重组子的诱导和表达

挑取 Mut⁺ 表型转化株, 接种到 10mL BMGY 培养基中, 30 $^{\circ}$ C 200r/min 培养至 A₆₀₀ 为 5.0, 5000r/min 离心收集菌体, 用生理盐水洗涤 1 次, 50mL BMMY 培养基稀释到 OD₆₀₀ 为 1.0 左右, 每 24h 补加 100% 甲醇至终浓度为 0.5%, 连续诱导 6d, 每 24h 取样 1mL, 离心取上清, -20 $^{\circ}$ C 保存备用检测。

1.7 表达产物 SDS-PAGE 分析

将 1.6 节得到的上清样品用 TCA 沉淀法浓缩, 15% SDS-PAGE 分析, 上样量 10 μ L (上清液 50 μ L), 考马斯亮蓝 R-250 染色, 然后脱色观察分析。根据 SDS-PAGE 蛋白质电泳图谱, 扫描测定上清液中的表达产物的含量。

1.8 表达产物 ELISA 和 Western blot 检测鉴定

ELISA 和 Western blot 检测方法参照文献 [12], ELISA 方法通过上清样品 (抗原) 与特异性抗体 (一抗) 结合后再用二抗 (偶联辣根过氧化物酶) 显色, 根据 A₄₉₅ 数值分析确定上清样品中是否存在表达产物和表达水平。Western blot 检测是用甲醇诱导第 5 天的上清液 (TCA 沉淀) 经 SDS-PAGE、转膜, 用 Anti-human BDNFpAb 抗体结合和二抗 (偶联辣根过氧化物酶) 显色, 确定表达产物的位置和大小。

2 结果和分析

2.1 pPICZ α 1 载体构建和酶切鉴定

从载体 pPIC9K 扩增 HIS4-Kan 序列片段, 扩增产物经电泳分析, 有一条扩增条带, 大小约 3.76kb, 与预期片段大小一致。用 *Sac* I / *Eco*R I 或 *Bgl* II / *Eco*R I 双酶切重组质粒 pPICZ α 1, 酶切片段的大小和

理论值一致,证明构建的载体正确;pPICZ α 质粒含有 Zeocin 抗性而不含卡那抗性,含重组 pPICZ α 1 载体的大肠杆菌转化子获得 Kan 和 Zeocin 抗性,也表明构建的载体正确。改造后的表达载体 pPICZ α 1C(约 7.36kb)含有可插入外源基因的多克隆位点,适合于构建外源基因的多拷贝表达盒。

2.2 含有不同拷贝表达盒重组载体的构建^[1]、转化子表型筛选和阳性克隆鉴定

将 hBDNF 克隆表达载体 pPICZ α 1 上,获得含有 1 个拷贝表达盒的 pPICZ α 1-hBDNF 重组表达载体,酶切分离出单个表达盒,连续亚克隆,分别构建出 1、2、3、6 个拷贝含 hBDNF 基因表达盒的重组载体。1、2、3、6 个拷贝表达盒重组载体经 BamH I / Bgl II 双酶切分析结果显示,表达盒的大小分别为 2033bp、4066bp、6099bp、12198bp,与预期结果一致。

线性含有 1、2、3、6 拷贝表达盒的重组载体,分别转化 GS115 菌株,转化子转移到平板上进行表型筛选,获得 MUT⁺ 转化子。用 hBDNF 的 3'和 5'端引物对转化子总 DNA 进行 PCR 扩增,得到一条与目的基因(357bp)相同的片段,未转化菌总 DNA 不能扩增出该片段,证明线化的表达质粒已经整合到宿主的基因组中,利用该方法可以筛选鉴定重组子,排除假阳性。

2.3 表达产物的 SDS-PAGE 检测

挑取经过筛选的阳性克隆菌株进行诱导表达,连续诱导 6d,取培养上清液制备样品,15% SDS-PAGE 分析,结果显示(图 1)含 1、2、3、6 拷贝 hBDNF 基因表达盒的转化子诱导第 5d 表达产物的电泳分析结果,分析表明,不同拷贝的转化子在 14kD 都有

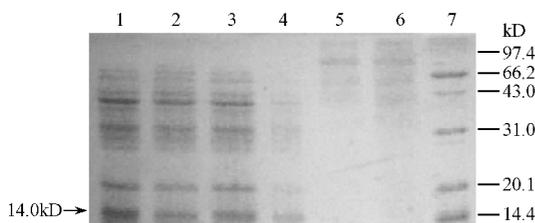


图 1 含不同拷贝数表达盒的转化子表达产物 SDS-PAGE 分析

Fig.1 SDS-PAGE analysis of the expression product of transformants with different copies of expression cassettes

1~3. Condensed cultural supernatant of transformants with 6 3 2 copies of expression cassettes; 4. Cultural supernatant of transformant with 1 copy of expression cassette; 5. Cultural supernatant of *Pichia pastoris*; 6. Cultural supernatant of *Pichia pastoris* transformed by pPICZ α ; M. Marker.

一条特异性的蛋白条带,电泳图谱经扫描、电脑软件 BandsScan 分析表明,第 4 泳道的单拷贝表达盒转化子表达的目的蛋白占总分泌蛋白的 14.3%,第 3 泳道的 2 拷贝表达盒转化子表达的目的蛋白占总分泌蛋白的 16.1%,第 2 泳道的 3 拷贝表达盒转化子表达的目的蛋白占总分泌蛋白的 17.6%,第 1 泳道的 6 拷贝表达盒转化子表达的目的蛋白占总分泌蛋白的 26.2%,6 拷贝表达盒转化子表达量比单拷贝提高了约 83%,达到 20mg/L 左右,说明在培养条件一致的情况下,含不同拷贝数表达盒重组载体的转化子表达量随着拷贝数的增加而增大。

超声波破碎菌体,离心,取上清液制备样品,SDS-PAGE 分析,结果显示,在目的蛋白大小位置,有微弱的条带,表明有少量未分泌的蛋白存在,与外分泌的蛋白相比,所占比例较小,表明绝大部分的目的蛋白被分泌到细胞外。

2.4 表达产物的 ELISA 和 Western blot 鉴定分析

取第 5 天的表达上清液进行 ELISA 和 Western blot 检测,取 4 种不同拷贝的表达盒转化子各 5 个,诱导培养,用第 5d 的上清液作为样品,进行 ELISA 分析,以各种类型的转化子 A_{495} 值的平均值对其表达盒拷贝数作图(图 2)。阴性对照 A_{495} 读数平均值为 0.136,以 $P/N \geq 2$ 作为判断阳性的依据,分析 20 个转化子上清液 ELISA 测定数据,结果表明 20 个转化子均为阳性克隆,证明不同拷贝表达盒转化子均得到分泌表达。它们 A_{495} 值的分布表明高拷贝数表达盒转化子的表达量较高,同时也说明上清样品中含有能与抗 hBDNF 的特异性抗体产生结合反应的活性产物 hBDNF。表达产物 Western blot 检测结果显示(图 3),在 14kD 附近有一条杂交带出现,表明该条带具有人脑源性神经营养因子抗原活性,反映转化子在甲醇诱导条件下表达了目的蛋白。分子量

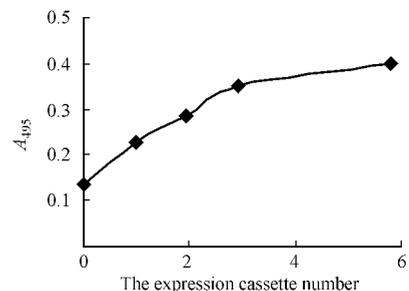


图 2 含不同拷贝数表达盒的转化子表达产物的 ELISA

Fig.2 ELISA analysis of the expression product of transformants with different copies of expression cassettes

的测定根据标准分子量的大小对其 SDS-PAGE 胶中迁移的距离的对数作图,可以计算出表达产物的分子量,大小与目的蛋白分子量一致,约 14kD。

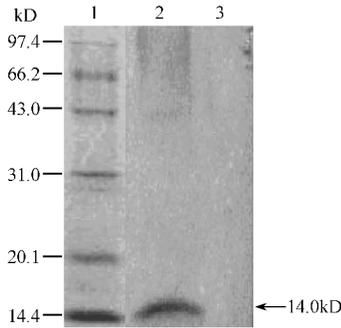


图 3 表达蛋白的 Western blot 检测

Fig.3 Western blot analysis of the expression product

1. Marker; 2. Expression product of hBDNF gene; 3. Control.

3 讨论

人脑源性神经生长因子(hBDNF)是一种在神经系统发育、成熟过程中维持神经元功能和在神经元损伤后的再生修复、防止神经细胞退化性病变等多方面发挥重要作用的细胞因子,其治疗作用在神经细胞培养和动物实验研究中得到证实,在Ⅲ期中虽然没有得到其能够治疗脊髓侧索硬化症(ALS)的结论,但是经分析,可能的原因是多方面的,给药途径和时机,以及其他未知的辅助因素,都有很大影响;另外,BDNF对帕金森病、亨廷顿病以及神经损伤的治疗效果,还有待证实,这都要求对BDNF进行更加深入的研究。近年来,对其信号通路、生物学作用机制和受体的研究成为热点,相信随着对其了解的增加会促使其早日走向临床治疗。由于BDNF天然的来源十分有限,制约了对其进一步深入研究和临床应用,因此,利用基因工程手段表达BDNF有重要的研究和应用价值。

甲醇酵母表达系统是一类最近发展十分迅速的外源蛋白质生产工具,同时具备原核生物的生长快,易于操作的特点和真核生物的翻译后修饰的功能^[13,14]。毕赤酵母表达系统是甲醇酵母表达系统类型中比较成熟的一个表达系统,因而其使用最为广泛,有许多蛋白质和多肽在该系统中成功表达并且获得较高的表达量^[10]。甲醇酵母表达系统的载体分为胞内表达和分泌表达两种,其中分泌性表达的载体具有表达量较高、糖基化完全、高级结构形成正确、后续分离纯化程序比较简单的优点,因而使用更普遍。影响工程菌表达量的因素有很多,外源性因素如培养基成份、酸碱度和培养温度、通气量等,内

源性的影响因素主要是目的基因特性和数量,虽然研究表明,基因的数量与表达量之间没有必然的联系,很少数的试验发现增加基因的数量表达量反而降低,但更多试验证实,相当数量的目的基因可以提高表达量。为了提高hBDNF的表达量和避免pAO815载体胞内表达、克隆位点单一的不足,利用毕赤酵母pPICZα分泌型载体可以体外构建多拷贝表达盒的特点,对其进行改造,实现了hBDNF在毕赤酵母表达系统中的多拷贝表达。对比发现,在其他培养条件相对一致的情况下,hBDNF表达量在多拷贝基因情况下比单拷贝有不同程度的提高,而工程菌的生长无异常;由于表达盒过多会造成重组载体过于庞大,会给构建和转化以及在酵母中的整合带来困难,因此,本研究最多构建了含有6个表达盒的重组载体,表达盒的数目继续增加是否能提高表达量,还有待研究。实验表明,使用新载体进行基因操作,无论基因操作还是克隆筛选,效率都有明显提高。用该载体构建hBDNF多拷贝基因在毕赤酵母表达系统中表达成功,而且产物绝大部分分泌到培养基内。进一步的检测表明,表达的蛋白质具有免疫学活性,分子大小与国外报道的hBDNF的分子量一致,也证实了该载体的可利用性,同时为hBDNF的深入研究和应用提供了条件。

参 考 文 献

- [1] 周 鹏,郭安平,黎小瑛,等.利用套嵌PCR技术改造酵母表达载体Pao815的研究.生命科学研究,2002,4(4):310-313.
- [2] Barde Y A, Edgar D, Thoenen H. Purification of a new neurotrophic factor from mammalian brain. *EMBO J*, 1982, 1: 549-553.
- [3] Hyman C, Hofer M, Barde Y A, et al. BDNF is a neurotrophic factor for dopaminergic of the substantia nigra. *Nature*, 1991, 350: 230-232.
- [4] Hofer M M, Barde Y A. Brain-derived neurotrophic factor prevents neuronal death *in vivo*. *Nature*, 1988, 331: 261-263.
- [5] David L H. Neurotrophic factors: important regulators of nociceptive. *The Neuroscientist*, 2001, 7(1): 13-17.
- [6] Avissar S, Schreiber G. Toward molecular diagnostics of mood disorders in psychiatry. *Trends Mol Med* 2002, 8: 294-300.
- [7] Chen B, Dowlatshahi D, MacQueen G M, et al. Increased hippocampal BDNF immunoreactivity in subjects treated with antidepressant medication. *Bio Psychiatry* 2001, 50: 260-265.
- [8] Coyle J T, Duman D S. Finding the intracellular signaling pathways affected by mood disorder treatments. *Neuron* 2003, 38: 157-160.
- [9] Anand P. Neurotrophins and neuropathy. *Biological Science*, 1996, 351: 449-453.
- [10] Lin cereghino G P, Sunga A J, Lin cereghino J, et al. Expression of foreign genes in the yeast *Pichia pastoris*. *Genet Eng(NY)*, 1993, 11(8): 905-910.
- [11] 丁云菲,刘 勇,刘红岩,等.分泌型乙型肝炎病毒包膜M蛋白在毕赤酵母中的表达.中国生物化学与分子生物学报, 2002, 18(3): 265-267.

- [12] Sambrook J , Fritsch E F , Maniatis T. 分子克隆试验指南. 金冬雁, 黎孟枫, 等译. 第二版. 北京: 科学出版社, 1996. 与分子生物学报, 2001, 17(2): 160-164.
- [13] 李克勤, 李春海, 颜春洪, 等. 人组织型金属蛋白酶抑制剂-1 在 *Pichia pastoris* 酵母中重组表达研究. 中国生物化学 [14] Bretthauer R K , Castellino F J. Glycosylation of *Pichia pastoris* - driven proteins. *Biotechnol Appl Biochem* ,1999, 30(2): 193-200.

Construction of a multi-copy *Pichia* expression vector and expression of human brain-derived neurotrophic factor in *Pichia pastoris*

LIANG Wei-feng ZHANG Chao-chun YANG Xi-cai*
(Institute of Microbiology , Chinese Academy of Sciences , Beijing 100080 , China)

Abstract : A pPICZ α 1 vector was reconstructed with pPICZ α vector and PCR product of His4-*Kan* sequence from pPIC9K vector. The sequence encoding human brain-derived neurotrophic factor(hBDNF) was inserted into pPICZ α 1. The expression vectors carrying 1 2 3 6 copies of expression cassettes were constructed and transformed into *Pichia pastoris* GS115 respectively. The transformants were screened with G418/Zeocin and induced by 0.5% methanol , and the results of SDS-PAGE confirmed that the expression protein was about 14kD and the percentage of the protein was about 20% of the total secreted protein. ELISA and Western blot analysis demonstrated that the protein could be specifically combined with chicken antibodies to human-BDNF.

Key words : Multi-copy *Pichia* expression vector , hBDNF , *Pichia pastoris* , Expression

* Corresponding author. Tel : 86-10-62625603 ; E-mail : yangxc@sun.im.ac.cn

Received date : 04-30-2004

生活垃圾综合处理原理与技术(专著)

郭长军, 许传森, 李泽泉 编著 2004 年 11 月黑龙江人民出版社出版

RSDNT-207-00678-3/X57 ; 字数 25 万字 ; 开本 大 32 开 ; 印数 3000 册 ; 定价 28.00 元

读者对象

大专院校相关专业师生、市容环境卫生管理部门、从事城市垃圾处理的相关单位, 以及所有关心城市垃圾处理工作的社会各界读者。

内容简介

环境保护是我国的基本国策, 而城市垃圾处理是城市环境保护的重要内容, 也是衡量城市文明程度和城市管理水平的标志之一。近几年来, 我国的大部分城市都正在积极的进行城市生活垃圾处理工程的探索和实践, 但由于国内无系统的垃圾处理理论和少有成功的实例, 而从国外引进的卫生填埋、堆肥、焚烧发电三大处理方式均不合中国国情。照搬国外垃圾处理方式建设的处理厂, 败多成少, 造成不小的浪费。至今, 全国城市垃圾无公害化处理率尚不足 20%, 在全球重视环保的今天, 城市垃圾处理工作任务十分迫切, 任重而道远。

为探索适合中国城市生活垃圾处理的科学方案, 在省市有关领导支持和参与下, 黑龙江高维企业集团于今年 6 月召开了全国首次“城市生活垃圾处理方案研讨会”。来自中国科学院、清华大学、哈尔滨工业大学、国家发改委、机械部、中石化的专家进行了认真热烈的研讨, 确定综合处理方式是适合中国国情的最佳方式, 是与卫生填埋、堆肥、焚烧发电三大方式并列的第四种新方式。

本书将依据研讨会学术成果, 系统论述生活垃圾综合处理方式的基本原理和使用技术, 明确阐述其内涵和外延。全书共分七章 30 节。