

多杀性巴氏杆菌 *aroA* 基因缺失突变株的构建及鉴定

郭东春¹, 卢艳^{1,2}, 刘家森¹, 原冬伟¹, 张爱芹^{1,2}, 姜骞¹, 林欢¹, 司昌德¹, 曲连东^{1*}

¹中国农业科学院哈尔滨兽医研究所, 兽医生物技术国家重点实验室, 实验动物研究室, 哈尔滨 150001

²黑龙江八一农垦大学动物科技学院, 大庆 163319

摘要: 【目的】构建多杀性巴氏杆菌 *aroA* 基因缺失突变株, 并验证其致病性。【方法】采用正向筛选同源重组技术构建多杀性巴氏杆菌 *aroA* 基因缺失突变株, 利用 PCR 对突变株进行鉴定, 分析其遗传稳定性、生长特性和致病性。【结果】成功构建多杀性巴氏杆菌 *aroA* 基因缺失突变株, 连续传代 20 代, 遗传稳定; 突变株体外生长曲线表明, 在前 6h 生长速度稍慢于亲本菌, 随后两者生长速度一致。对小鼠的致病性试验表明: 经腹腔注射 *aroA* 基因缺失突变株在 1.0×10^6 CFU 对小鼠无致死性, 而亲本菌株在 1.0×10^2 CFU 对小鼠是致死性的。【结论】本研究获得多杀性巴氏杆菌 *aroA* 基因缺失突变株, 对小鼠的致病性是减弱的。多杀性巴氏杆菌突变株的构建有助于研究其致病机理。

关键词: 多杀性巴氏杆菌, *aroA* 基因, 基因缺失株, 毒力

中图分类号: Q933 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2012) 04-0526-06

多杀性巴氏杆菌 (*Pasteurella multocida*, Pm) 作为巴氏杆菌属最主要的代表菌, 能够引起多种动物感染, 导致急性、败血性传染病, 包括禽霍乱、牛出血性败血症、猪肺炎和猪萎缩性鼻炎、兔出血性败血症。多杀性巴氏杆菌属于革兰氏阴性菌, 巴氏杆菌科巴氏杆菌属, 主要以荚膜抗原和菌体抗原区分血清型, 荚膜抗原有 5 群, 分别为 A、B、D、E、F 群; 菌体抗原分为 16 个型, 分别为 1、2、3、4、5、……、16。本菌呈世界性分布, 给动物养殖业造成巨大的经济损失, 被列为重点防治的疫病之一^[1]。

随着多杀性巴氏杆菌基因组序列的解析^[2], 其毒力因子主要有荚膜、脂多糖、鞭毛和粘附素、毒素、铁调蛋白、唾液酸代谢、透明质酸酶和外膜蛋白等^[3]。利用信号标签突变技术和细菌突变体技术

构建的多杀性巴氏杆菌突变株对阐明多杀性巴氏杆菌不同的毒力因子在致病中的作用也起着重要作用^[4]。

Boyce 等利用 DNA 芯片技术在感染的鸡血液中, 筛选到多杀性巴氏杆菌 *aroA* 基因表达上调^[5], 提示 *aroA* 基因与感染过程相关。*aroA* 基因编码 5-烯醇丙酮酞莽草酸-3-磷酸合成酶, 该酶催化芳香族氨基酸的合成, 芳香族生物合成途径是革兰氏阴性菌和阳性菌共有的途径, 而哺乳动物不具备该合成途径。Homchampa 等在 1992 年首次将卡那霉素 (Kanamycin, Km) 抗性表达盒插入到多杀性巴氏杆菌 *aroA* 基因构建了 *aroA* 突变株, 该突变株对小鼠是高度致弱, 并对亲本菌有完全的免疫保护力^[6]; 1997 年获得没有标记的 *aroA* 突变株, 并对鸡的致病

基金项目: 黑龙江省科技攻关 (PC09S02); 兽医生物技术国家重点实验室课题 (NKLVB201014)

* 通信作者。Tel/Fax: +86-451-51997176; E-mail: qld@hvri.ac.cn

作者简介: 郭东春 (1979-) 男, 河南南阳人, 助理研究员, 研究方向为预防兽医学。E-mail: gdongchun@hvri.ac.cn

收稿日期: 2011-10-08; 修回日期: 2011-12-31

性降低^[7]。Hodgson 等构建了 B:2 型多杀性巴氏杆菌 *aroA* 基因突变株的对小鼠模型的动物实验表明:缺失 *aroA* 基因的突变株毒力减弱^[8]。对溶血性巴氏杆菌^[9]、绿脓假单胞菌^[10]、胸膜肺炎放线杆菌^[11]、嗜水气单胞菌^[12] 和金黄色葡萄球菌^[13] 等 *aroA* 基因突变株的研究表明,缺失突变株的毒力都有减弱。肠炎沙门氏菌和白痢沙门氏菌的 *aroA* 基因缺失菌株的毒力大大减弱,同时沙门氏菌的 *aroA* 基因缺失株作为活疫苗载体表达异源细菌或病毒的保护性抗原,并有一定的保护力^[14]。Kim 利用缺失 *aroA* 的支气管波氏杆菌作为载体表达猪圆环病毒 cap 基因构建重组细菌疫苗,可作为预防猪圆环病毒的疫苗^[15]。

鉴于国内未有构建多杀性巴氏杆菌的突变菌株的报道,本研究以 A 型多杀性巴氏杆菌为对象,利用正向筛选同源重组技术将 Km 抗性表达盒插入多杀性巴氏杆菌 *aroA* 基因,构建 *aroA* 基因缺失突变株,并研究突变株的生物学特性和对小鼠的致病性。多杀性巴氏杆菌突变株的构建有助于开展多杀性巴氏杆菌功能基因组学和基因工程疫苗的研究。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株、质粒和实验动物:本试验所用的菌株和质粒见表 1。30 只清洁级 ICR 小鼠由中国农业科学院哈尔滨兽医研究所实验动物提供。

表 1 本研究中所用菌种和质粒

Strains and plasmids	Genotype and phenotype	Source
Strain		
C51-17	Wild-type rabbit <i>P. multocida</i> sero-type A	China Institute of Veterinary Drug Control (CVDC)
C51-17(<i>aroA</i>)	<i>aroA</i> mutant of C51-17, Km ^R	This study
Plasmid		
pBC-SK	Cm ^R pUCori	Stratagene
pUC-4K	Km ^R Amp ^R	Pharmacia
pBC- <i>aroAF</i>	Cm ^R	This study
pBC- <i>aroAFR</i>	Cm ^R	This study
pBC- <i>aroA-Tn903</i>	Cm ^R Km ^R	This study

1.1.2 引物:本试验所用引物均由上海生工生物技术有限公司合成,序列见表 2。

表 2 本研究中所用引物

Table 2 Primers used in this study

Primers	Sequence(5'→3')	Restriction site	Size/ bp
PAroAF1	TTTGTGACGATGCGACCGC TATTACTC	Sal I	600
PAroAR1	CCCGAATTCGTAGGCTATCA TTACAATC	EcoR I	
PAroAF2	TTTGAATTCCTACAGATAAG TACTCAGC	EcoR I	650
PAroAR2	CCCGAGCTCCGTTTATGCTA TATTGCACAG	Sac I	
PAroCK1	ACAGGCAATAAGTGATAAAAC		1800
PAroCK2	GATTATATTTCTATACAC		
PKanF	CCCTCTAGAATGAGCCATATTCAAC		750
PKanR	CCCTCTAGTTAGAAAACTCTCG		

1.1.3 主要试剂和仪器:EX-Taq DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶和限制性内切酶购自 TaKaRa 公司;DNA 凝胶回收试剂盒购自 Promega 公司。透明质酸酶购自 Sigma 公司。脑心浸出液(BHI)培养基购自 BD 公司。常规细菌生化试管购自杭州天和微生物试剂有限公司。其它常规试剂均为国产分析纯级产品;抗生素使用浓度为:氯霉素(Chloramphenicol, Cm) 30 mg/L,卡那霉素(Km) 50 mg/L。PCR 仪和电转化仪,美国 BioRAD 公司;紫外分光光度计,德国 Eppendoff 公司。

1.2 同源重组质粒 pBC-*aroA*-Tn903 的构建

多杀性巴氏杆菌基因组的提取按照常规蛋白酶 K 裂解法进行制备。以多杀性巴氏杆菌 C51-17 基因组为模板,用引物 pAroAF1/pAroAR1;pAroAF2/pAroAR2 分别扩增 *aroA* 基因侧翼序列的 DNA 片段。PCR 反应条件:94℃ 4 min;94℃ 30 s,55℃ 30 s,72℃ 1 min 30 s,32 个循环;72℃ 10 min。1% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物。

aroA 基因上游 PCR 产物用 Sal I/EcoR I,插入到 pBC-SK 质粒的 Sal I/EcoR I 位点构建质粒 pBC-*aroAF*。*aroA* 基因下游 PCR 产物用 EcoR I/Sac I 酶切插入到 pBC-*aroAF* 的 EcoR I/Sac I 位点构建质粒 pBC-*aroAFR*。将 EcoR I 酶切 pUC-4K 获得 Km^R 抗性表达盒的片段插入到 pBC-*aroAFR*,构建重组质粒 pBC-*aroA*-Tn903,PCR 进行鉴定。

1.3 多杀性巴氏杆菌 *aroA* 基因缺失突变株的筛选及鉴定

多杀性巴氏杆菌电转化感受态细胞的制备:将多杀性巴氏杆菌 C51-17 培养到 OD₆₀₀ 约 0.5-0.6

时按照 100 U/mL 的比例加入透明质酸酶,37℃ 作用 1h 后,按常规电转化感受态细胞制备。将重组质粒 pBC-aroA-Tn903 加入到制备的感受态细胞中以 2.5 KV/cm,600Ω 的条件进行电击,37℃ 复苏 2-4 h 后涂布于 50 mg/L Km^R 的 BHI 培养基上,筛选抗性交换子。筛选对 Cm^S 而对 Km^R 的交换子即为双交换子,分别用 pKanF/pKanR 和 pAroACK1/pAroACK2 引物对 Km 基因和 *aroA* 基因进行 PCR 鉴定。由于 *aroA* 基因全长 1.2kb,与插入的 Km 表达盒长度相差较小,PCR 鉴定之后,进行测序验证。

1.4 多杀性巴氏杆菌 *aroA* 基因缺失突变株的生物学特性

按照细菌学常规技术进行生化特性鉴定。将鉴定正确的多杀性巴氏杆菌 *aroA* 基因缺失突变株连续传代 20 代,每隔 5 代进行 Km^R 基因检测,验证其遗传稳定性。将多杀性巴氏杆菌 C51-17 和 *aroA* 基因缺失突变株分别在化学限制培养基中和含有苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸的化学限制培养基中生长,验证其在培养基中的生长情况。C51-17 与 *aroA* 基因缺失突变株在 37℃ 培养过夜后,按照 1:100 的比例加入到新鲜的 BHI 培养基中,37℃ 培养,每 1 h 取样,测 OD₆₀₀ 值,绘制细菌体外生长曲线。

1.5 致病性试验

将 30 只 7 周龄的清洁级 ICR 小鼠随机分为 3 组,其中 C51-17 攻毒组 10 只,*aroA* 基因缺失突变株 15 只,对照组 5 只。对 C51-17 株和 *aroA* 基因缺失突变株进行计数,C51-17 株按照 1.0×10^2 和 1.0×10^4 CFU;*aroA* 基因缺失突变株按照 1.0×10^2 、 1.0×10^4 和 1.0×10^6 CFU 进行腹腔注射攻菌,对照组注射 0.2 mL 的 PBS,每天上下午各一次记录小鼠的死亡数,并以心血作细菌分离鉴定,直到接种后 10 d 为止,10 d 后仍存活的小鼠进行扑杀,观察病变并作细菌分离鉴定。

2 结果

2.1 重组质粒 pBC-aroA-Tn903 的鉴定

按照材料和方法中构建重组质粒 pBC-aroA-Tn903,以引物 PAroAF1/PAroAR1; PAroAF2/PAroAR2; pKanF/pKanR; PAroAF1/PAroAR2 分别扩增 *aroA* 基因上、下游同源臂,卡那霉素基因, *aroA* 基因上下游同源臂和卡那霉素基因,PCR 扩增结果与

预期结果相符(图 1)。

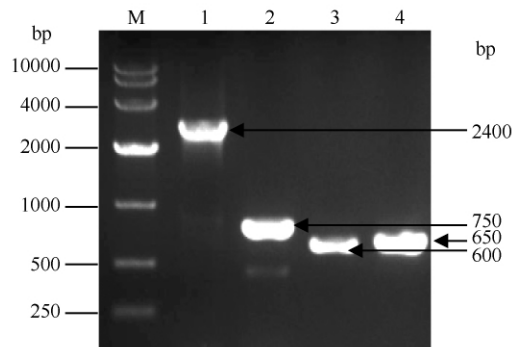


图 1 pBC-aroA-Tn903 PCR 结果

Fig.1 PCR results of recombinant plasmid pBC-aroA-Tn903. M. DL10000; 1. *aroA* gene and Km gene; 2. Km gene; 3. *aroA* R gene; 4. *aroA* F gene.

2.2 *aroA* 基因缺失突变株的鉴定

经过电转化的多杀性巴氏杆菌在 Km^R 的 BHI 培养基上,长出大约 50 到 100 个菌落,挑取 12-24 个单个菌落培养过夜后,分别在 Cm 和 Km 抗性培养基上筛选具有 Km^R 和 Cm^S 的交换子,即为双交换子。这些双交换子通过 PCR 鉴定其 Km^R 基因和 *aroA* 基因,结果见图 2。同时采用测序的方法验证了突变株中 Km^R 基因的存在。

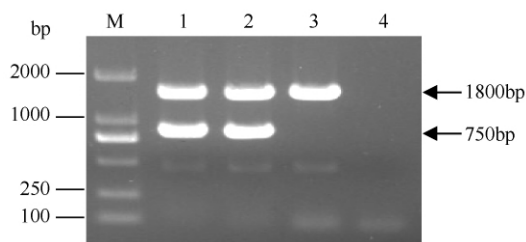


图 2 *aroA* 突变缺失株的 PCR 结果

Fig.2 PCR results of *aroA* deletion strain. M. DL2000; 1. *aroA* mutant strain1; 2. *aroA* mutant strain 2; 3. C51-17; 4. H₂O.

2.3 *aroA* 基因缺失突变株的体外培养特性

多杀性巴氏杆菌 C51-17 和 *aroA* 缺失突变株的生化特性未发生改变,均能发酵葡萄糖、乳糖、麦芽糖、蔗糖;不产生 H₂S;枸橼酸盐利用、MR 试验、V-P 试验均为阴性;不液化明胶。C51-17 可在化学限制培养基中生长,而 *aroA* 基因缺失突变株在含有苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸的化学限制培养基中才能生长,否则无法生长。

经过 PCR 和测序鉴定的 *aroA* 缺失突变株进行

传代培养至 20 代,每 5 代收集菌体提取基因组,PCR 鉴定其 Km^R 基因,在 20 代以内,遗传稳定。

根据多杀性巴氏杆菌 C51-17 和 *aroA* 缺失突变株体外培养生长曲线图可知:*aroA* 缺失突变株在 1-6 h 生长速度稍慢于亲本菌,在 6h 之后生长速度趋于一致(图 3)。

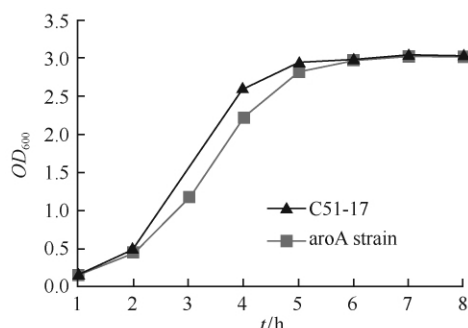


图 3 C51-17 和 *aroA* 缺失突变株体外生长曲线结果

Fig. 3 Growth rates of C51-17 and *aroA* gene delete strain in vitro.

2.4 *aroA* 基因缺失突变株对小鼠的致病性试验

多杀性巴氏杆菌 C51-17 经腹腔注射和肌肉注射的 LD_{50} 均小于 30 CFU。C51-17 在 1.0×10^2 CFU 时,在 36h 内小鼠全部死亡;而 *aroA* 基因缺失突变株在 1.0×10^6 CFU 时,对 ICR 小鼠无致病性(见表 3),连续观察 10 天,对存活小鼠剖杀,也未分离回收到细菌。同时,对照组 5 只小鼠注射 PBS,连续观察 10 天,全部存活。

表 3 多杀性巴氏杆菌 C51-17 和 *aroA* 基因缺失突变株对小鼠的致病性结果

Table 3 Virulence of *P. multocida* C51-17 strain and *aroA* gene delete strain as determined by intraperitoneal injection in mice

Strain	Dose	No. of Survivors/No. of Challenges
C51-17	1.0×10^2 CFU	0/5
	1.0×10^4 CFU	0/5
C51-17 (<i>aroA</i>)	1.0×10^2 CFU	5/5
	1.0×10^4 CFU	5/5
	1.0×10^6 CFU	5/5
PBS	0.2mL	5/5

3 讨论

同源重组序列的长度是影响基因同源重组效率的主要因素,Leloup 等的研究表明:同源片段长度在

0.3-1.2kb 范围内,同源重组的效率呈对数增长^[16]。本研究构建 0.6 kb 和 0.65 kb 的上下游同源臂,经过电转后表明该同源臂的重组效率较高。

AroA 主要催化芳香族氨基酸的合成。缺失 *aroA* 基因的细菌,不能合成芳香族氨基酸,导致细菌的毒力大大降低。多杀性巴氏杆菌 *aroA* 基因缺失突变株已经证实:A 型、B 型多杀性巴氏杆菌基因缺失突变株的毒力明显减低^[6-8]。本研究构建的多杀性巴氏杆菌 *aroA* 基因缺失突变株通过腹腔注射对小鼠的致病性明显降低,这与报道的多杀性巴氏杆菌 *aroA* 基因缺失突变株一致。

目前,革兰氏阴性细菌突变株构建技术主要采用正向筛选技术和负向筛选技术:正向筛选技术主要利用抗生素作为筛选标记;而负向筛选技术主要利用枯草芽胞杆菌 *sacB* 基因或者温度敏感型质粒介导重组筛选技术。本研究构建的多杀性巴氏杆菌 *aroA* 基因缺失突变株主要采用正向筛选技术构建,这有助于开展多杀性巴氏杆菌功能基因组学和基因工程疫苗的研究。但由于抗生素基因的存在限制了利用抗生素作为筛选标记的突变株作为疫苗在兽医临床中的应用。

多杀性巴氏杆菌和溶血性巴氏杆菌已有成功构建无分子标记的 *aroA* 缺失突变株的报道^[7,9],我们目前正在采用负向筛选技术,预期获得无分子标记的多杀性巴氏杆菌 *aroA* 缺失突变株,研究其作为减毒疫苗株的可能性。同时,沙门氏菌和支气管波氏杆菌 *aroA* 突变株已作为活载体,表达多种外源基因作为疫苗的报道^[14-15],下一步无分子标记的多杀性巴氏杆菌 *aroA* 缺失突变株也可能成为活载体疫苗,表达其他病原的保护性基因。

参考文献

- [1] 中国农业科学院哈尔滨兽医研究所主编. 动物传染病学. 北京:中国农业出版社,2008:52-65.
- [2] May BJ, Zhang Q, Li LL, Paustian ML, Whittam TS, kapur V. Complete genomic sequence of *Pasturella multocida* Pm70. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, 2001(98): 3460-3465.

- [3] Harper M , Boyce JD , Adler B. *Pasteurella multocida* pathogenesis: 125 years after Pasteur. *FEMS Microbiology Letter* ,2006 ,265 (1) :1-10.
- [4] Harper M , Boyce JD , Wilkie IW , Adler B. Signature-tagged mutagenesis of *Pasteurella multocida* identifies mutants displaying differential virulence characteristics in mice and chicken. *Infection and Immunity* ,2003 ,71 : 5440-5446.
- [5] Boyce JD , Wilkie IW , Harper M , Paustian ML , Kapur V , Adler B. Genomic scale analysis of *Pasteurella multocida* gene expression during growth within the natural chicken host. *Infection and Immunity* ,2002 ,70 : 6871-6879.
- [6] Homchampa P , Strugnell RA , Adler B. Molecular analysis of the *aroA* gene of *Pasteurella multocida* and vaccine potential of a constructed *aroA* mutant. *Molecular Microbiology* ,1992 ,6(23) :3585-93.
- [7] Homchampa P , Strugnell RA , Adler B. Cross protective immunity conferred by a marker-free *aroA* mutant of *Pasteurella multocida*. *Vaccine* ,1997 ,15(2) :203-208.
- [8] Hodgson JC , Finucane A , Dagleish MP , Ataei S , Parton R , Coote JG. Efficacy of vaccination of calves against hemorrhagic septicemia with a live *aroA* derivative of *Pasteurella multocida* B:2 by two different routes of administration. *Infection and Immunity* ,2005 ,73 (3) : 1475-1481.
- [9] Tatum FM , Briggs RE. Construction of in-frame *aroA* deletion mutants of *Mannheimia haemolytica* , *Pasteurella multocida* and *Haemophilus somnus* by using a new temperature-sensitive plasmid. *Applied and Environmental Microbiology* ,2005 ,71 (11) : 7196-7202.
- [10] Zaidi TS , Priebe GP , Pier GB. A live-attenuated *Pseudomonas aeruginosa* vaccine elicits outer membrane protein-specific active and passive protection against corneal infection. *Infection and Immunity* ,2006 ,74 (2) :975-983.
- [11] Garside LH , Collins M , Langford PR , Rycroft AN. *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1 carrying the defined *aroA* mutation is fully avirulent in the pig. *Research of Veterinary Science* 2002 ,72(2) :163-167.
- [12] Vivas J , Razquin BE , López-Fierro P , Naharro G , Villena A. Correlation between production of acyl homoserine lactones and proteases in an *Aeromonas hydrophila aroA* live vaccine. *Veterinary Microbiology* ,2004 ,101(3) :167-176.
- [13] Buzzola FR , Barbagelata MS , Caccuri RL , Sordelli DO. Attenuation and persistence of and ability to induce protective immunity to a *Staphylococcus aureus aroA* mutant in mice. *Infection and Immunity* ,2006 ,74(6) : 3498-3506.
- [14] Titball RW , Howells AM , Oyston PC , Williamson ED. Expression of the *Yersinia pestis* capsular antigen (F1 antigen) on the surface of an *aroA* mutant of *Salmonella typhimurium* induces high levels of protection against plague. *Infection and Immunity* ,1997 ,65 (5) :1926-1930.
- [15] Kim T , Toan NT , Seo J , Jung B , Lee J , Lee B. *Bordetella bronchiseptica aroA* mutant as a live vaccine vehicle for heterologous porcine circovirus type 2 major capsid protein expression. *Veterinary Microbiology* ,2009 ;138(3-4) :318-324.
- [16] Leloup L , Ehrlich SD , Zagorec M , Morel-Deville F. Single-crossover integration in the *Lactobacillus sake* chromosome and insertional inactivation of the *ptsI* and *lacL* genes. *Applied and Environmental Microbiology* ,1997 ,63(6) :2117-2123.

Construction and characterization of *aroA* deletion mutant of *Pasteurella multocida* strain C51-17

Dongchun Guo¹, Yan Lu^{1,2}, Jiasen Liu¹, Dongwei Yuan¹, Aiqin Zhang^{1,2}, Qian Jiang¹, Huan Lin¹, Changde Si¹, Liandong Qu^{1*}

¹ State Key Laboratory of Veterinary Biotechnology, Harbin Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences (CAAS), Harbin 150001, China

² College of Animal Science and Veterinary Medicine, Heilongjiang August First Agricultural University, Daqing 163319, China

Abstract: [Objective] We constructed *Pasteurella multocida* strain C51-17 *aroA* mutant and characterized its virulence. [Methods] Suicide recombinant plasmid of pBC-*aroA*-Tn903 was constructed with kanamycin gene and transformed into *Pasteurella multocida* by electroporation. *aroA* mutant strain of *P. multocida* was screened by kanamycin resistance and chloromycetin sensitivity and identified by PCR. Virulence of *aroA* mutant strain was tested in mice by intraperitoneal injection. [Results] The *aroA* mutant strain of *P. multocida* C51-17 was successfully constructed. Growth rate of *aroA* mutant strain was slower within the first 6 hour and similar to the wild-type strain *in vitro*. The virulence test indicated that *aroA* mutant strain was significant attenuated and no death was found in mice even inoculated at a dosage of 1.0×10^6 CFU. [Conclusion] The virulence of *aroA* mutant strain of *P. multocida* was highly attenuated in mice. The results of this study will contribute to a better understanding of pathogenesis of *P. multocida*.

Keywords: *Pasteurella multocida*, *aroA* gene, gene deletion mutant, Virulence

(本文责编:王晋芳)

Supported by the Key Programs for Science and Technology Development of Heilongjiang Province (PC09S02) and by the State Key Laboratory of Veterinary Biotechnology (NKLVB201014)

* Corresponding author. Tel/Fax: +86-451-51997176; E-mail: qld@hvri.ac.cn

Received: 8 October 2011 / Revised: 31 December 2011

科学出版社新书推介(2011年9、10月)

新一代基因组测序 – 通往个性化医疗



M. 贾尼特; 科学出版社生物分社; 定价: 48; 书号: 978-7-03-033007-9; 装帧: 平装

内容简介: 本书由工业界和学术界领域的专家, 集中于最新的新一代 DNA 测序技术及其对基因研究的影响和药物发现研究的发展。因此, 它提出了对商用平台下的基因组测序技术的详细比较分析, 以及替代性的见解, 全面介绍了新出现的测序技术。此外, 该书不仅涵盖了 DNA 测序技术, 而且包含其在社会、伦理和商业方面的原则, 以及个性化医疗和 DNA 测序发展的未来五年规划。

获取更多图书信息请您关注

<http://www.lifescience.com.cn/>; 欢迎各界人士邮购科学出版社各类图书

购书网站:

学士书店: <http://www.xueshi.com.cn/>; 当当网: <http://www.dangdang.com/>; 亚马逊:

<http://www.Amazon.cn>; 京东图书: <http://book.360buy.com/>

科学出版社 科学销售中心

联系人: 周文宇; 电话: 010-64022646 010-64017321; <http://shop.sciencepress.cn/>;

E-mail: zhouwenyu@mail.sciencepress.com