

工程菌 DH5 α /pCW-PL-XE-TNF α m2 的遗传稳定性

路金芝¹, 杜志荣¹, 赵庆¹, 张琳¹, 杨晶², 陈伟京¹,
蒋虹³, 李涛¹, 王欣¹, 王憬惺², 卢圣栋¹

(1. 中国医学科学院基础医学研究所, 2. 中国医学科学院输血研究所, 3. 中国医学科学院实验动物研究所, 北京 100005)

【摘要】 目的 本基因工程大肠杆菌 DH5 α /pCW-PL-XE-TNF α m2 所表达的靶向融合蛋白 XE-TNF α m2 已被初步证明具有用于清除艾滋病患者体内 HIV 病毒的前景。其目的蛋白表达水平为 32% ~ 36% 细胞总蛋白。本研究旨在验证其遗传稳定性。方法 工程菌株 DH5 α /pCW-PL-XE-TNF α m 分别在 LBAm⁺ 与 LBAm⁻ 二种固体培养基上逐日单菌落划线传代, 32 $^{\circ}$ C 培养过夜。每间隔十代运用一般温控表达技术, 确定其 XE-TNF α m2 的蛋白含量, 最后比较分析各代之间目的蛋白 (20.3 kDa) 表达水平的差异情况。结果 该重组基因工程菌连续传 100 代后 XE-TNF α m2 的蛋白表达水平没有明显差异 ($P > 0.05$); 只是在上述两种情况下传至 100 代后将其置于 4 $^{\circ}$ C 保藏 4、5、6 个月, 其目的蛋白表达水平有 8% 的下降。本载体质粒含有的 *CIts857* 序列、PL 启动子与 T1T2 末端终止序列, 是确保目的基因稳定高表达的 3 个关键元件。结论 本研究结果证明该工程菌 DH5 α /pCW-PL-XE-TNF α m2 具有良好的遗传稳定性。

【关键词】 基因工程菌; 靶向融合蛋白; 传代; 遗传稳定性

【中图分类号】 R33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2012)04-0043-06

doi:10.3969/j.issn.1671.7856.2012.04.011

Hereditary Stability of an Engineered *E. coli* Strain DH5 α /pCW-PL-XE-TNF α m2

LU Jin-zhi¹, DU zhi-yong¹, ZHAO qing¹, ZHANG lin¹, YANG Jing², CHEN Wei-jing¹,
JIANG Hong³, LI Tiao¹, WANG xin¹, WANG Jing-xing², LU Sheng-dong¹

(1. Institute of Basic Medical Sciences, Chinese Academy of Medical Sciences, CAMS, School of Basic Medicine, Beijing, China 100005; 2. Institute of Blood Transfusion, CAMS, Chengdu 610081; 3. Institute of Laboratory Animal Sciences, CAMS, Beijing 100021)

【Abstract】 **Objective** The targeting fusion protein XE-TNF α m2 produced by the genetic engineered *E. coli* strain DH5 α /pCW-PL-XE-TNF α m2 was shown a prospect to effectively eliminate the HIV in AIDS patients. Its expression level reached 32% ~ 36% of total cell soluble proteins. The purpose of this study was to investigate the hereditary stability of this engineered strain. **Methods** This strain was transferred on LBAm⁺ and LBAm⁻ solid culture media day by day as generation by generation for a total of 100 generations, and then stored at 4 $^{\circ}$ C for 4, 5, 6 months, respectively. Finally, to check the protein XE-TNF α m2 (20.3 kDa) expression levels of each transferred generation strain on LBAm⁺ and LBAm⁻ media cases, respectively, by general protocol for temperature control expression, so as to compare the expression

【基金项目】 国家十一五重大新药创制候选药物研究, 编号 2009ZX09103。

【作者简介】 路金芝 (1966 -), 女, 主管技师, 研究方向: 医药生物技术。E-mail: lujinzi@pumc.edu.cn。

【通讯作者】 卢圣栋 (1937 -), 男, 教授, 博导, 研究方向: 医药生物技术。E-mail: lused@pumc.edu.cn。

levels in the above different cases. The samples were taken from generations transferred for 1, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 days on LBamp⁺ and LBamp⁻ media, respectively. **Results** The protein XE-TNF α 2 expression levels were not obviously changed from the 1st generation to 100th generation under LBamp⁺ and LBamp⁻ cases, respectively ($P > 0.05$). Only in the case that after the strains were transferred for 100 generations on LBamp⁺ or LBamp⁻ media and then stored at 4°C for 4, 5 or 6 months, respectively, the protein XE-TNF α 2 expression levels were reduced by 8%. **Conclusions** *CIts857* sequence, PL promoter and termination T1T2 sequence, existing in this plasmid vector, are three key elements to maintain such a high expression level. This genetic engineering *E. coli* strain DH5 α /pCW-PL-XE-TNF α 2 has good hereditary stability.

【Key words】 Genetic engineered *E. coli* strain; Targeting fusion protein; Transfer from generation to generation; hereditary stability

在自行设计的靶向融合蛋白 XE-TNF α 2 中, XE 是 HIV 辅助受体 CXCR4 的第二胞外域^[1,2]。TNF α 2 是经缺失突变的肿瘤坏死因子 TNF α 的衍生物。二者的编码基因均来源于人体正常组织的染色体 DNA。已有的初步研究结果表明,此融合蛋白可准确靶向杀灭受 SIV/HIV 感染的细胞,可结合失活游离的 SIV/HIV,且可激活潜伏的 HIV、继之将其杀灭。该融合蛋白的毒副作用已被最小化^[3,4]。本研究旨在考察此工程菌的遗传稳定性、特别是考察 *CIts857-PL-SD-XE-TNF α 2-T1T2* 的重组基因的构建可否确保融合蛋白 XE-TNF α 的稳定高表达,为其进一步研制提供可靠的基因工程菌菌种。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 本重组体的由来是:大肠杆菌质粒 pBR322 在 EcoRV 位点下游被依次克隆入 PL 启动子、SD 序列及多克隆位点,称之为 pKC30^[5,6],继之在 NdeI 位点与 BamHI 位点之间被插入 PI 噬菌体的 *ref* 基因,称之为 pLSD13^[7]。pKC30 与 pLSD13 相对应的宿主细胞均为 N6405。它是大肠杆菌 C600 rk⁻mk⁺ 被 λ *CIts857N*⁺ 噬菌体所溶源化(lysogenic)^[7]。这样配对的目的在于,当工程菌在 32°C 培养时,N6405 染色体上的 *CIts857* 可表达出 *cIts857* 从而阻遏质粒上的 PL 去驱动其下游目的基因的表达;而当温度升高至 42°C 时,*cIts857* 不再表达,质粒上的 PL 则去阻遏,从而驱动其下游目的基因的表达。但,这样地运用 *cIts857* 的阻遏作用是不完全的。因此,本实验室把 *CIts857* 插入到 pLSD13 的 *Ori* 与 *EcoRV* 之间;把转录终止子 *T1T2* 插入到目的基因的末端。改建后的载体称 pCW111。与此相对应的宿主细胞则为 *E. Coli* DH5 α 。在 pCW111 的 NdeI 与 BamHI

之间插入本目的融合基因 *XE-TNF α 2*,则成为本工程重组体,如图 1 所示。

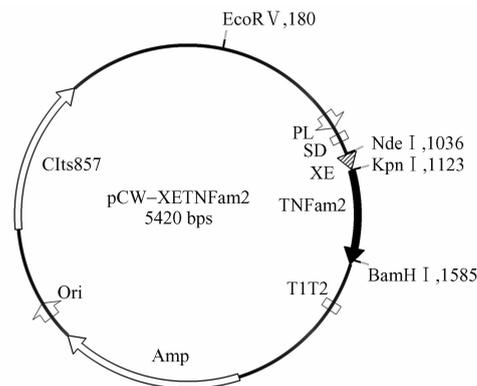


图 1 靶向融合蛋白 XE-TNF α 2 编码基因的表达型重组体图谱

Fig. 1 The map of recombinant encoding for targeting fusion protein XE-TNF α 2

1.1.2 菌株:*E. Coli* DH5 α ;基因型为 [*supE44* Δ *lac169* (Φ 80 *lacZ* Δ M15) *hsdR17* *recA1* *endA1* *gyrA96* *thi-redA1*] 用于作为本重组质粒的宿主细胞(本组保存)。

1.1.3 重组质粒:pCW-PL-XE-TNF α 2 为温控型原核表达重组体,由本组构建。其所表达的 XE-TNF α 2 的 N 端第 1~15 个氨基酸的序列已检测无误。如上图所示,该质粒含 *CIts857* 序列、PL 启动子、SD 序列、XE-TNF α 2 编码序列、下游的转录终止序列 *T1T2* 以及 *ori* 序列与氨苄青霉素的抗性基因 *Amp*^r(本组保存)。

1.1.4 主要试剂:标准蛋白 marker 购自 TaKaRa 公司;SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳试剂购自碧云天公司;LB 培养基中所加的氨苄青霉素(Amp)为 50 μ g/mL,Amp 保存于 -20°C,购自华北制药股份有限公司;LB 培养基购自 Oxoid 公司;其它试剂均为国产

分析纯。

1.2 方法

1.2.1 实验方法:把重组质粒 pCW-PL-XE-TNF α 2 转化进入宿主菌 DH5 α ,得到表达型菌株 DH5 α /pCW-PL-XE-TNF α 2;经鉴定确认其为第一代表达菌,将此菌株分别在 Amp⁺ (含氨苄青霉素)和 Amp⁻ (不含氨苄青霉素)LB 固体培养基上逐日单菌落传代;32 $^{\circ}$ C 培养箱过夜培养为一代,以此传至 100 代。每间隔十代将相应的传代菌株接种进入相应的 5 mL LB 液体培养基中,32 $^{\circ}$ C 振荡培养过夜,按 5% 菌液接种量再转种于相应的 5 mL LB 液体培养基中,32 $^{\circ}$ C 振荡培养至 A₆₀₀ 约为 0.4 ~ 0.6;将温度调至 42 $^{\circ}$ C 继续振荡培养诱导 4 h,取出 3 mL 菌液 4 $^{\circ}$ C 离心收集菌体,加 150 μ L 缓冲液至上述样品,沸水浴处理 3 min,经 12% SDS-PAGE 凝胶电泳分析,用激光扫描仪检测目的融合蛋白在可溶性细胞总蛋白中的含量。同一样品实验重复三次做统计学分析比较。

1.2.2 统计学分析:所测实验数据的统计描述以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。采用 SPSS 13.0 软件进行统计学分析,组间均数比较采用方差分析。

2 结果

2.1 工程菌传代后靶向融合蛋白 XE-TNF α 2 的表达水平

在 LBamp⁺ 与 LBamp⁻ 两种情况下传代至 1、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100 d 后,所诱导表达的靶向融合蛋白 XE-TNF α 2 的 SDS-PAGE 电泳结果(图 2-1 与图 2-2)。随着传代次数的增加可见融合蛋白 XE-TNF α 2 (20.3 kDa) 表达的电泳条带。

2.2 传代后靶向融合蛋白 XE-TNF α 2 表达水平的激光密度扫描分析结果

靶向融合蛋白 XE-TNF α 2 工程菌株分别在 LBamp⁺ 与 LBamp⁻ 培养基上传代,在 1、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100 d 后的进行表达,将 XE-TNF α 2 (20.3 kDa) 目的蛋白带水平的激光密度扫描结果进行统计学分析(表 1)。结果表明,在两种情况下,随着传代次数的增加融合蛋白的表达水平差异无显著性 ($P > 0.05$) (图 3)。

2.2.1 工程菌经传 100 代再经 4 $^{\circ}$ C 保藏后的 XE-TNF α 2 表达水平:工程菌分别经在 LBamp⁺ 与 LBamp⁻ 两种培养基上传 100 代再经 4 $^{\circ}$ C 0、4、5、6 个月保藏后其靶向融合蛋白 XE-TNF α 2 表达水平

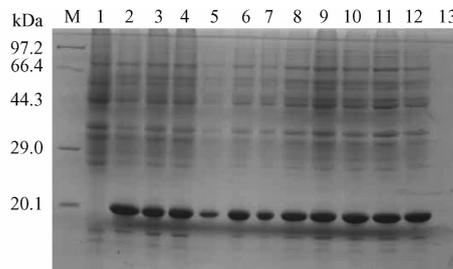


图 2-1 在 Amp⁺ 条件下经不同天数传代后诱导表达的 XE-TNF α 2 融合蛋白的 SDS-PAGE 结果

Fig. 2-1 Expression levels of the fusion protein XE-TNF α 2 of the engineered strain transferred for different generations on LBamp⁺ medium.

M: Standard protein marker; 1: Non-induced sample; 2 ~ 12: Induced samples taken from the strains transferred through 1, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 days, respectively, on LBamp⁺ medium.

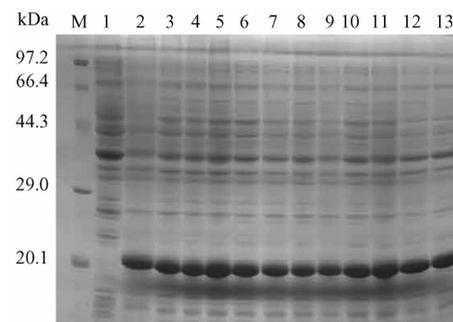


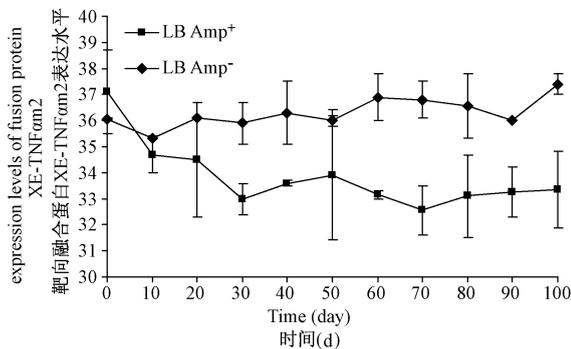
图 2-2 Amp⁻ 条件下经不同天数传代后诱导表达的 XE-TNF α 2 融合蛋白的 SDS-PAGE 结果

Fig. 2-2 Expression levels of fusion protein XE-TNF α 2 of the engineered strains transferred for different generations on LBamp⁻ medium.

M: Standard protein marker; 1: Non-induced sample; 2 ~ 12: Induced samples taken from the strains transferred for 1, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 days, respectively, on LBamp⁻ medium.

的 SDS-PAGE 电泳结果(图 4-1 与图 4-2)。两种条件下可见融合蛋白 XE-TNF α 2 (20.3 kDa) 表达的电泳条带。

2.2.2 工程菌经传 100 代再经 4 $^{\circ}$ C 保藏后的 XE-TNF α 2 表达水平的激光密度扫描结果:工程菌经分别在 LBamp⁺ 与 LBamp⁻ 两种培养基上传 100 代,再经 4 $^{\circ}$ C 0、4、5、6 个月保藏后,将其靶向融合蛋白 XE-TNF α 2 (20.3 kDa) 表达的 SDS-PAGE 电泳条带激光密度扫描结果加以统计分析 ($P > 0.05$) (表 1)。



靶向融合蛋白的表达水平以其所占可溶性细胞总蛋白的百分比表示。

图 3 经分别在 LB Amp⁺ 和 LB Amp⁻ 培养基上传 1~100 代后工程菌的 XE-TNFα2 蛋白电泳条带激光密度扫描分析的结果

Fig. 3 Results of optical density analysis of expression levels of the fusion protein XE-TNFα2 using a laser densitometer after the engineered strains were transferred for different generations on LB Amp⁺ and LB Amp⁻ media, respectively.

Note: The expression levels of the targeting fusion protein XE-TNFα2 are indicated by its percentage of total cell soluble protein.

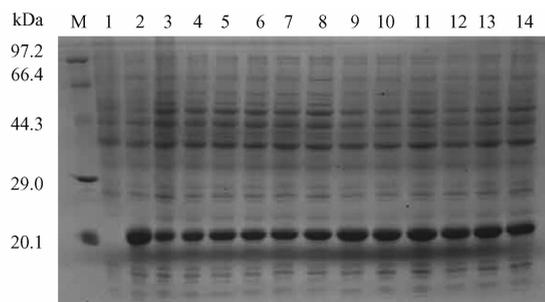


图 4-1 工程菌在 LB Amp⁺ 传 100 代再经 4°C 0、4、5、6 个月保藏后融合蛋白 XE-TNFα2 表达水平的 SDS-PAGE 结果

Fig. 4-1 Expression levels of the fusion protein XE-TNFα2 of the engineered strains transferred on LB Amp⁺ medium for 100 generations and then stored at 4°C for 0, 4, 5, 6 months, respectively.

Note: M: Standard protein marker; 1: Non-induced; 2: Original induction products of the strain without transfer and stored at 4°C for 0 month; 3, 4, 5: Induction products of the strain transferred for 100 generations then stored at 4°C for 0 month; 6, 7, 8: Induction products of the strain transferred for 100 generations then stored at 4°C for 4 months; 9, 10, 11: Induction products of the strain transferred for 100 generations then stored at 4°C for 5 months; 12, 13, 14: Induction products of the strain transferred for 100 generations then stored at 4°C for 6 months.

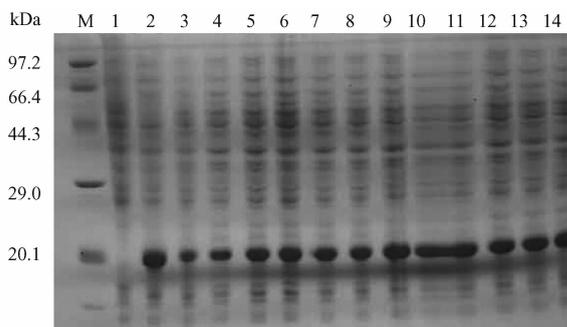


图 4-2 工程菌在 LB Amp⁻ 传 100 代再经 4°C 0、4、5、6 个月保藏后融合蛋白 XE-TNFα2 表达水平的 SDS-PAGE 结果

Fig. 4-2 Expression levels of the fusion protein XE-TNFα2 of the engineered strains transferred on LB Amp⁻ medium for 100 generations and then stored at 4°C for 0, 4, 5, 6 months, respectively.

M: Standard protein marker; 1: Non-induced; 2: Original induction products of the strain without transfer and stored at 4°C for 0 month; 3, 4, 5: Induction products of the strain transferred for 100 generations then stored at 4°C for 0 month; 6, 7, 8: Induction products of the strain transferred for 100 generations then stored at 4°C for 4 months; 9, 10, 11: Induction products of the strain transferred for 100 generations then stored at 4°C for 5 months; 12, 13, 14: Induction products of the strain transferred for 100 generations then stored at 4°C for 6 months.

表 1 经分别在 LB Amp⁺ 和 LB Amp⁻ 培养基上传 100 代再经 4°C 0、4、5、6 个月保藏后工程菌的融合蛋白 XE-TNFα2 蛋白电泳条带激光密度扫描分析结果*

Tab. 1 Results of optical density analysis of the expression levels of the fusion protein XE-TNFα2 using a laser densitometer after the engineered strains were transferred for 100 generations and then stored at 4°C for 0, 4, 5, 6 months on LB Amp⁺ and LB Amp⁻ media, respectively.

时间(月) Time(months)	含氨苄青霉素 LB 培养基 LB Amp ⁺	不含氨苄青霉素 LB 培养基 LB Amp ⁻
0	31.358 ± 0.130	31.596 ± 0.526
4	31.102 ± 0.077	31.168 ± 0.206
5	31.333 ± 0.482	33.834 ± 0.945
6	33.018 ± 2.598	33.341 ± 2.340
Control	36.364 ± 2.400	37.249 ± 1.963

* 表内数据为 $\bar{x} \pm s$ 。

Note: n = 3; P = 0.17, compared with the control (time); P = 0.85, compared with the control (LB Amp⁺, LB Amp⁻).

3 讨论

上述研究结果表明,本基因工程菌 DH5 α /pCW-PL-XE-TNF α m2 可稳定高水平表达靶向融合蛋白 XE-TNF α m2,具有良好的遗传稳定性。特别是在 LBamp^r 上传 100 代再经 4、5、6 个月保藏后其表达水平仍能维持在 30% 以上细胞总蛋白的水平,尤为可贵。

对该表达系统的分析研究表明,形成这一遗传稳定性的基本原因在于,该载体质粒的基因组成不同于最初运用 PL 启动子驱动目的基因高表达的载体质粒的基因组成,如 pKC30 或 pLSD13 等等。此类载体的构建在上世纪 70 ~ 80 年代较为普遍。如上所述,本重组质粒的基因组成为: *CIts857* 序列、PL 启动子、*SD* 序列、XE-TNF α m2 编码序列、下游的转录终止序列 *TIT2* 以及 *ori* 序列与氨苄青霉素抗性基因 *Amp^r*。而如上述早期被广泛应用多年的载体质粒的基因组成为: PL 启动子、*SD* 序列、多克隆位点(目的基因)、以及 *ori* 序列与氨苄抗性基因 *Amp^r*。二载体的显著不同是:原载体质粒上无 *CIts857* 序列与转录终止序列 *TIT2*。

当年在使用原质粒为载体时,使用了被 λ 噬菌体溶源化了的大肠杆菌宿主细胞。其意在于应用 λ 噬菌体上的 *CIts857* 序列在 32 $^{\circ}$ C 时所表达的 *CIts857* 蛋白阻遏 PL 启动子对其下游目的基因的表达的驱动作用;而在 42 $^{\circ}$ C 时, *CIts857* 不表达,从而使 PL 启动子去阻遏、进而驱动其下游目的基因的表达^[8]。但长期而广泛的实践结果表明,这个设计不尽人意。此类工程菌虽在重组体转化后可高表达目的蛋白^[7],但一个宿主细胞所表达的 *CIts857* 蛋白质在数量上不足以完全阻遏该细胞内上百个质粒上的 PL 启动子对其下游目的基因的表达的驱动作用;即使是在 32 $^{\circ}$ C 的情况下、甚至在 4 $^{\circ}$ C 冰箱的情况下,某些 PL 启动子仍能在一定程度上驱动其下游目的基因的表达。这样,必然在一定程度上中止了相关质粒的复制。如经约 30 次传代,32 $^{\circ}$ C 培养,仍必有相当多质粒拷贝数减少的细胞出现,而当把该细胞株置于 42 $^{\circ}$ C 诱导目的基因的表达时,结果则显著降低了目的基因的表达水平。而本研究所使用的新载体质粒上克隆有 *CIts857* 序列。这样,在 32 $^{\circ}$ C 的情况下,必有足够数量的 *CIts857* 蛋白质去阻遏上百个 PL 启动子的驱动作用;这就基本上克服了使用原 λ 噬菌体溶源化的宿主细与原载体质粒

时的副面效应。

PL 是强启动子。研究表明,强启动子启动的转录会使转录通读到复制区,造成控制质粒拷贝数的 ROP 蛋白的过量表达,从而导致质粒的不稳定。但如在编码序列下游的适当位置放置一转录终止子,则可阻止这种转录贯穿别的启动子的作用。这就是说,转录终止可增强 mRNA 的稳定性,从而提高蛋白质的表达水平。本研究使用的载体质粒已在目的基因的下游插入了 T1T2 序列:它们乃源于 *E. coli* rrB rRNA 操纵子的两个转录终止子 T1 和 T2 的串联,已知其作用效果是最佳的^[9,10]。

本研究所应用的质粒载体 pCW111 是本课题组自行构建的,其多次应用经验已表明它是一个较为易于促成目的基因高表达的载体^[11]。

参考文献:

- [1] Brelot A, Heveker N, Montes M, et al. Identification of residues of CXCR4 critical for human immunodeficiency virus coreceptor and chemokine receptor activities [J]. *J. Biol Chem*, 2000, 275 (31):23736 - 23744.
- [2] Chabot DJ, ZHANG PF. Mutagenesis of CXCR4 identifies important domains for human immunodeficiency virus type 1 X4 isolate envelope-mediated membrane fusion and virus entry and reveals cryptic coreceptor activity for R5 isolates [J]. *J. Virol*, 1999, 73(8): 6598 - 6609.
- [3] 路金芝,陈伟京,杨晶,等. 靶向融合蛋白 XE-TNF α m2 导致受 HIV/SIV 感染细胞的凋亡 [J]. *中国生物工程杂志*, 2009, 29(3):9 - 13.
- [4] 路金芝,陈伟京,丁枫,等. 靶向融合蛋白 XE-TNF α m2 激活并清除潜伏于受感染细胞内的 HIV 的研究 [J]. *中国生物工程杂志*, 2010, 30(2):23 - 26.
- [5] Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J. *Molecular cloning: a laboratory manual* [M]. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y. 1982.
- [6] Rao RN. Construction and properties of plasmid pKC30, a pBR322 derivative containing the pL-N region of phage lambda [J]. *Gene*, 1984, 31:247 - 250.
- [7] LU SD, LU DR, Gottesman M. Stimulation of ISI excision by bacteriophage P1 *ref* function [J]. *J. Bacteriol*, 1989, 171: 3427 - 3432
- [8] Breitling R, Sorokin AV, Detlev Behnke D. Temperature-inducible gene expression in *Bacillus subtilis* mediated by the *cIts857*-encoded repressor of bacteriophage lambda [J]. *Gene*. 1990, 93:35 - 40.
- [9] Brosius J, Ullrich A, Rake MA. Construction and fine mapping of recombinant plasmids containing the *rrnB* ribosomal RNA operon of *E. coli* [J]. *Plasmid*, 6:112 - 118.
- [10] Newbury SF, Smith NH. Stabilization of translationally active

mRNA by prokaryotic REP sequences [J]. Cell, 1987, 48(2): 297-310.

Eseherichia coli cell [J]. Chin Med J, 2002; 115(12): 1785-1789.

[11] Chen WJ, Hong M, Li D, et al. High-level expression of foreign genes via multiple joined operons and a new concept regarding the restricted constant of total amount of plasmid DNA per

[修回日期]2012-02-24



《中国比较医学杂志》约稿 欢迎踊跃投稿

《中国比较医学杂志》是中国实验动物学会和中国医学科学院医学实验动物研究所共同主办的全国性学术刊物(月刊),主要刊载实验动物与动物实验等生命科学各分支学科,比较医学成果和进展。本刊开设研究报告,综述与专论,研究快报,技术方法,经验交流,管理科学,国外研究进展,学术信息,简讯等。

1. 文稿内容要具有创新性、科学性和实用性,论点明确,资料可靠,文字通顺精练,标点符号准确,用词规范,图表清晰。
2. 来稿须附第一作者主管单位正式介绍信,作者单位应对稿件内容的真实性负责,声明无署名纠纷,无一稿两投或多投。
3. 文稿采用电子邮件投稿,不接受纸样投稿。投稿电子邮件信箱为: b67761337@126.com(务必注明“投杂志”字样,并附上详细通信地址,联系电话(手机号)和常用电子信箱地址)。欢迎英文来稿。

来稿一经选用将收取发表费。刊出后酌致稿酬(包括光盘版、网络版等各种介质出版物),并赠当期杂志 2 本。来稿请自留底稿,不刊用的稿件一律不再退还作者。

本刊已入万方数据网络和中国学术期刊(光盘版)电子杂志、中文生物医学期刊文献数据库、中国实验动物信息网和中国实验动物学会网站等网络文献数据库,如不同意自己论文入网,请在来稿中声明。

地址:北京朝阳区潘家园南里 5 号《中国比较医学杂志》编辑部,邮编:100021

电话:010-67779337 传真:010-67781534 E-mail:b67761337@126.com