

酵母工程菌制备紫穗槐-4,11-二烯的研究

孔建强, 沈君豪, 黄 勇, 王 伟, 程克棣, 朱 平*

(中国医学科学院、北京协和医学院药物研究所 卫生部天然药物生物合成重点实验室&
中草药物质基础与资源利用教育部重点实验室, 北京 100050)

摘要: 构建了两种能产生紫穗槐-4,11-二烯的酿酒酵母工程菌, 其中附加体型工程菌 W303-1B[pYeDP60/G/ADS]含有表达载体 pYeDP60/G/ADS。整合体型工程菌 W303-1B[rDNA:ADS]是将 ADS 基因的表达式序列通过同源重组的方式整合到酿酒酵母 W303-1B 基因组中。GC-MS 检测发酵产物, 结果表明这两种工程菌均能产生紫穗槐-4,11-二烯, 但附加体型工程菌产生的紫穗槐-4,11-二烯的产量要高于整合体型工程菌的产量。Southern 杂交检测表明, ADS 基因以单拷贝的形式整合到 W303-1B 基因组中, 低于附加体型工程酵母中的 ADS 基因拷贝数。这些结果表明, ADS 基因的拷贝数与酵母工程菌中紫穗槐-4,11-二烯的产量呈正相关。

关键词: 紫穗槐-4,11-二烯合酶; 酵母工程菌; 紫穗槐-4,11-二烯

中图分类号: R915

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2009) 11-1297-07

Production of amorpha-4,11-diene in engineered yeasts

KONG Jian-qiang, SHEN Jun-hao, HUANG Yong, WANG Wei, CHENG Ke-di, ZHU Ping*

(Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College (Key Laboratory of Biosynthesis of Natural Products, Ministry of Health of PRC & Key Laboratory of Bioactive Substances and Resources Utilization of Chinese Herbal Medicine, Ministry of Education of PRC), Beijing 100050, China)

Abstract: Plasmid-carrying *Saccharomyces cerevisiae* (W303-1B[pYeDP60/G/ADS]) and genome-transformed *S. cerevisiae* (W303-1B[rDNA:ADS]), both harboring amorpha-4,11-diene synthase (ADS) gene were constructed to investigate the production of amorpha-4,11-diene. The recombinant plasmid pYeDP60/G/ADS that harbors the ADS gene was transformed into *S. cerevisiae* W303-1B, resulting in the engineered yeast W303-1B[pYeDP60/G/ADS], which contains multi-copies of the plasmid. The ADS gene expression cassette was obtained by PCR amplification of the pYeDP60/G/ADS template, and then introduced into *S. cerevisiae* W303-1B to obtain the engineered yeast W303-1B[rDNA:ADS], in which the ADS gene was integrated into the rDNA locus of the yeast genome through the homologous recombination. GC-MS analysis confirmed that both of the engineered yeasts could produce amorpha-4,11-diene. Moreover, the amorpha-4,11-diene yield of W303-1B[pYeDP60/G/ADS] was higher than that of W303-1B[rDNA:ADS]. Southern blot analysis showed that there is only one copy of ADS gene in the genome of W303-1B[rDNA:ADS]. It implied that the amorpha-4,11-diene yield can be improved by increasing the ADS gene copies.

Key words: amorpha-4,11-diene synthase; engineered yeast; amorpha-4,11-diene

收稿日期: 2009-05-22.

基金项目: 科技部“863”重点项目资助项目 (2007AA021501); 国家自然科学基金资助项目 (30701061); 北京市自然科学基金资助项目 (7082063); 教育部博士点新教师基金资助项目 (20070023077); 药物所基本科研业务费资助项目 (2006QN05).

*通讯作者 Tel: 86-10-63165197, Fax: 86-10-63017757,
E-mail: zhuping@imm.ac.cn

紫穗槐-4,11-二烯合酶 (amorpha-4,11-diene synthase, ADS) 是抗疟药物青蒿素生物合成途径中的关键酶, 它能催化 FPP (farnesyl pyrophosphate, 法尼基焦磷酸) 环化形成紫穗槐-4,11-二烯^[1]。1999 年, 荷兰的 Bouwmeester 等^[2]首次从青蒿中分离纯化得到 ADS。此后, ADS 编码基因被不同课题组从青蒿中

克隆出来^[3-6]。由于 ADS 的重要作用, ADS 基因的克隆极大地推动了青蒿素代谢工程的发展。

青蒿素代谢工程就是将青蒿素生物合成相关酶基因导入微生物, 在微生物中重构一条青蒿素生物合成途径, 利用微生物生长繁殖快的特点, 批量生产青蒿素前体, 进而半合成青蒿素。近年来, 由于青蒿素代谢工程取得了一系列重要成果, 人们相信这种方法有可能成为未来青蒿素生产的主要方法^[7, 8]。

酿酒酵母是一种单细胞真核生物, 拥有转录后修饰功能, 操作简单、培养方便、繁殖迅速, 并能大规模发酵, 是理想的真核蛋白表达系统之一。酿酒酵母遗传背景较清楚, 次生代谢产物较简单, 能简化代谢工程产物的纯化。就萜类化合物的代谢工程而言, 酿酒酵母中存在一条萜类化合物(麦角甾醇)的合成途径, 含有萜类合成的共同前体 IPP (isopentenyl diphosphate, 异戊烯焦磷酸) 和 DMAPP (dimethylallyl pyrophosphate, 二甲丙烯焦磷酸), 因此, 酿酒酵母适合于作为萜类化合物, 包括青蒿素的代谢工程宿主菌。

本研究构建了两种紫穗槐-4,11-二烯合酶基因酵母工程菌: 附加体型和整合体型酵母工程菌。GC-MS 检测发现这两种酵母工程菌均能产生紫穗槐-4,11-二烯, 而且产量和 ADS 基因的拷贝数呈正相关。

材料与方法

工具酶和试剂 KOD Plus 高保真 DNA 聚合酶购自 Toyobo 公司; DNA 凝胶回收试剂盒购自百泰克公司; 鲑鱼精 DNA 购自 Wako 公司; PEG4000 购自欣经科公司; 醋酸锂购自 Sigma 公司; 酵母基因组提取试剂盒购自天为时代公司; Southern 杂交试剂盒 ECLTM Direct Nucleic Acid Labelling and Detection System 购自 Amersham 公司; 朱栾倍半萜标准品 (valencene) 购自 Fluka 公司; 正十二烷购自 TCI 公司。其他试剂均为分析纯。

质粒, 菌种和培养基 宿主菌 *E. coli* TG1 和酿酒酵母 W303-1B (*MATa*; *ade2-1*; *his-11*, -15; *leu2-3*, -112; *ura3-1*; *trp1-1*) 为本实验室保存。含有紫穗槐-4,11-二烯合酶基因的酵母表达载体 pYeDP60/G/ADS 为本实验室构建, 该基因受 GAPDH3 启动子调控^[9, 10]。

LB 培养基用于大肠杆菌的培养 (10 g·L⁻¹ 胰蛋白胨; 5 g·L⁻¹ 酵母提取物; 10 g·L⁻¹ NaCl; 固体培养基添加 1.5% 琼脂粉); YPD 培养基 (10 g·L⁻¹ yeast extract; 20 g·L⁻¹ bactopectone; 20 g·L⁻¹ glucose; 固体培养基

添加 2% 的琼脂粉) 用于酵母的培养; SC drop out 培养基 (6.7 g·L⁻¹ yeast nitrogen base; 2 g·L⁻¹ drop-out 混合物; 20 g·L⁻¹ glucose; 固体培养基添加 2% 的琼脂粉) 用于酵母的胁迫培养。

附加体型酵母工程菌构建 从 *E. coli* [pYeDP60/G/ADS] 中提取 pYeDP60/G/ADS 质粒, 通过 LiAc 法^[11] 将其导入酿酒酵母 W303-1B, 转化产物涂布在 SC-Ade-Ura 筛选培养基上, 28 °C 倒置培养 5~7 d, 挑取克隆接种到液体 SC-Ade-Ura 培养基上, 28 °C 培养 3~5 d。12 000×g, 离心 2 min 收集菌体, 提取质粒, 通过 PCR 检测目的质粒的存在, 从而确定阳性克隆。

整合体型酵母工程菌构建 采用 PCR 介导的方法^[12] 将 ADS 表达盒序列整合到 W303-1B 的 rDNA 位点上。设计引物 FYG 和 RYG (表 1)。这对引物长均为 59 nt (nucleotide, 核苷酸), 每条引物由两部分组成, 3' 端 (41~59 nt, 用大写字母表示) 是 ADS 表达盒序列特异序列, 5' 端 (1~40 nt, 用小写字母表示) 是 rDNA 序列。以 pYeDP60/G/ADS 质粒为模板, FYG/RYG 为引物 (表 1), 通过 PCR 扩增得到含 ADS 基因表达盒 (包括 GAPDH3 启动子, ADS 基因和 PGK 终止子序列) 和 *ura* 营养缺陷标记的序列, 该序列两端是和 W303-1B 基因组 rDNA 发生同源整合的交换臂。通过 LiAc 法将该 PCR 片段导入酿酒酵母 W303-1B, 转化产物涂布在 SC-Ade-Ura 筛选培养基上, 28 °C 倒置培养 5~7 d, 挑取克隆接种到液体 SC-Ade-Ura 培养基上, 28 °C 培养 3~5 d。12 000×g, 离心收集菌体, 提取酵母基因组, 通过 PCR 检测目的片段的存在, 从而确定阳性克隆。

工程菌发酵 将筛选的阳性工程菌株接种到 10 mL SC-Ade-Ura 液体培养基中, 30 °C 培养至 OD₆₀₀ 达到 1.0。然后取 1 mL 转接到 50 mL 新鲜的 YPD 液体培养基中, 同时加入 3 mL 正十二烷覆盖培养, 28 °C 培养 5 d, 静置 30 min, 吸取 10 μL 正十二烷进行 GC-MS 定性定量检测。

GC-MS 检测发酵产物 根据 Lindahl 等^[13] 的方法对紫穗槐-4,11-二烯进行分析。分析条件如下: 仪器为日本岛津公司 QP2010 系统, 色谱柱是 DB-5 (30 m × 0.25 μm × 0.25 mm); 进样口温度 250 °C; 流速 2 mL·min⁻¹; 分流比 10 : 1; 柱箱温度: 100 °C 保持 2 min, 然后以 5 °C·min⁻¹ 速度升温到 200 °C, 再以 25 °C·min⁻¹ 速度升温到 250 °C, 在 250 °C 保持 25 min。总离子流图表示出了所有的分子离子峰, 然后通过提取离子色谱的方法, 选择离子 *m/z* 204 和 *m/z* 119, 189。

Southern 杂交 采用天为时代公司的酵母基因组提取试剂盒提取整合型酵母工程菌基因组, 采用 Amersham 公司 ECLTM Direct Nucleic Acid Labelling and Detection System 进行 Southern 杂交。详细实验方案根据试剂盒提供的说明书进行。

结果

1 附加体型酵母工程菌的构建

提取附加体型酵母工程菌的质粒, 以提取的质粒为模板, *ADS* 基因特异引物 AR2/AR3 为引物 (表 1), 通过 PCR 反应检测工程菌中 pYeDP60/G/ADS 的存在。结果如图 1 所示。从结果可以看出, 挑选的 3 个工程菌均扩增出长约 1.6 kb 的特异条带, 与理论值相符, 表明 pYeDP60/G/ADS 已经导入了酿酒酵母中, 构建的工程菌命名为 W303-1B[pYeDP60/G/ADS]。

2 整合型酵母工程菌的构建

提取整合型酵母工程菌基因组, 以该基因组为模板, *gapdhpr*/AR3 为引物, 通过 PCR 检测工程菌中是否整合了 *ADS* 基因表达盒。结果如图 2 所示。从结果可以看出, 挑选的工程菌扩增出长为 2 kb 左右的特异条带, 与理论值相符, 表明 *ADS* 基因已整合到酿酒酵母中, 构建的工程菌命名为 W303-1B[rDNA:ADS]。

3 GC-MS 检测紫穗槐-4,11-二烯

两种工程菌各挑取 3 个克隆, 对这些克隆的发酵产物进行 GC-MS 检测。首先进行总离子流检测, 从

总离子图上可以看出, 各组分得到了很好的分离 (图 3-A, 4-A)。然后选择离子 *m/z* 204 和 *m/z* 119, 189 进行提取离子扫描 (图 3-B, 4-B), 结果表明, 在保留时间 13.65 min 同时检测到了上述 3 种碎片。对保留时间为 13.65 min 组分 (图 3-A, 4-A, 标记为“1”) 进行质谱检测, 结果表明是紫穗槐-4,11-二烯 (图 3-C, 4-C)。根据朱奕倍半萜标准曲线, 对上述两种酵母工程菌中的紫穗槐-4,11-二烯进行了定量测定 (表 2)。从结果可以看出, W303-1B[pYeDP60/G/ADS] 工程菌发酵液中紫穗槐-4,11-二烯的浓度要高于 W303-1B[rDNA:ADS] 工程菌发酵液中紫穗槐-4,11-

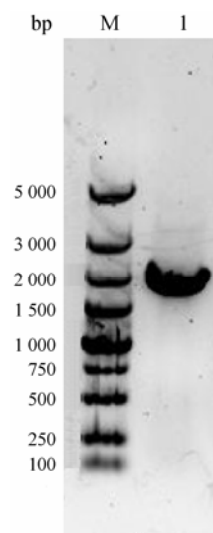


Figure 2 Genome PCR result of W303-1B[rDNA:ADS]. M: DL5000; 1: W303-1B[rDNA:ADS]

Table 2 The production of amorpha-4,11-diene produced by the engineered yeasts

Yeast strain	Production of amorpha-4,11-diene/mg·L ⁻¹
ADS-1	0.157
ADS-2	0.145
ADS-3	0.146
Genome-1	0.025 8
Genome-2	0.017 4
Genome-3	0.020 1

ADS: W303-1B[pYeDP60/G/ADS]; genome: W303-1B[rDNA:ADS]

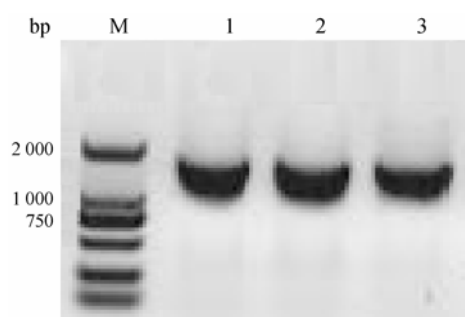


Figure 1 PCR results of W303-1B[pYeDP60/G/ADS]. M: DL2000; 1, 2, 3: W303-1B[pYeDP60/G/ADS]

Table 1 The primers used in the paper

Primer	Function
AR2: 5'-GGGATCCCTTACAGAAGAAAAACC-3'	To amplify <i>ADS</i> gene
AR3: 5'-CCTCGAGTCATATACTCATAGGATA-3'	To amplify <i>ADS</i> gene
AR4: 5'-GACGGAACCATAAGGAAGAGCGG-3'	To amplify <i>ADS</i> gene
gapdhpr: 5'-GGCACAACCTCAATGGAGTGATG-3'	To amplify <i>ADS</i> gene in W303-1B[pYeDP60/G/ADS]
FYG: 5'-ggaacctctaatcattcgctttacctataaaactgatacgTATGACCATGATTACGCC-3'	To amplify <i>ADS</i> expression cassette in W303-1B[rDNA:ADS]
RYG: 5'-aacgaacgagacaccttaacctactaataatgtggtgctagcatAACCTGCAGGAAACGAAG-3'	To amplify <i>ADS</i> expression cassette in W303-1B[rDNA:ADS] □

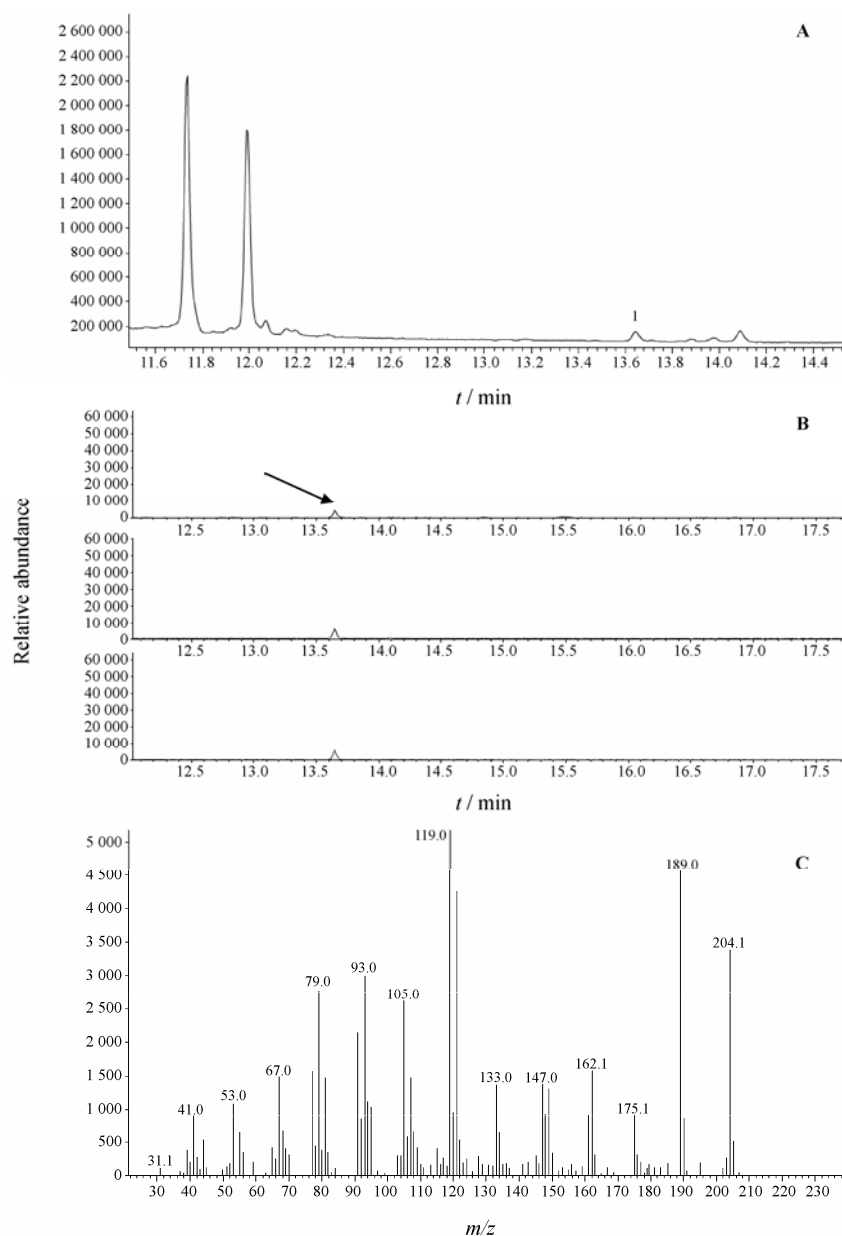


Figure 3 GC-MS identification of amorphadiene produced by W303-1B[rDNA:ADS]. A: The total ion chromatogram of W303-1B[rDNA:ADS]; B: Selected ion m/z 204 and m/z 119, 189; C: MS spectrum of the peak of retention time 13.653 min; 1: Peak of retention time 13.65 min

二烯的浓度。

4 Southern 杂交检测 *ADS* 基因的拷贝数

以整合型酵母 W303-1B[rDNA:ADS]基因组为模板, AR2/AR4 为引物, 扩增得到长为 326 bp 的部分 *ADS* 基因, 将其作为 Southern blot 的探针。分别用 *EcoR* I / *Pst* I 和 *EcoR* I / *Sac* I 过夜酶切 W303-1B [rDNA:ADS]基因组, 然后依次进行浓缩、电泳、印迹转膜、杂交、显色。结果如图 5 所示, 两种酶切的方式均只得到一条带, 而且两条带的大小存在区别, 表明 *ADS* 基因是以单拷贝形式整合到酵母染色体上

的 (图 5, 泳道 1 和 3)。以 W303-1B 基因组为对照, 用上述同样的方法进行 Southern blot, 没有得到条带 (图 5, 泳道 2 和 4)。

讨论

在工程菌优化过程中, 增加外源基因拷贝数往往能增加目的产物的产量。在青蒿素生物合成途径中, 增加 FPP 和 HMG 还原基因的拷贝数, 提高前体物的来源, 显著改善了紫穗槐-4,11-二烯的产量。紫穗槐-4,11-二烯合酶是青蒿素合成的一个关键酶。为

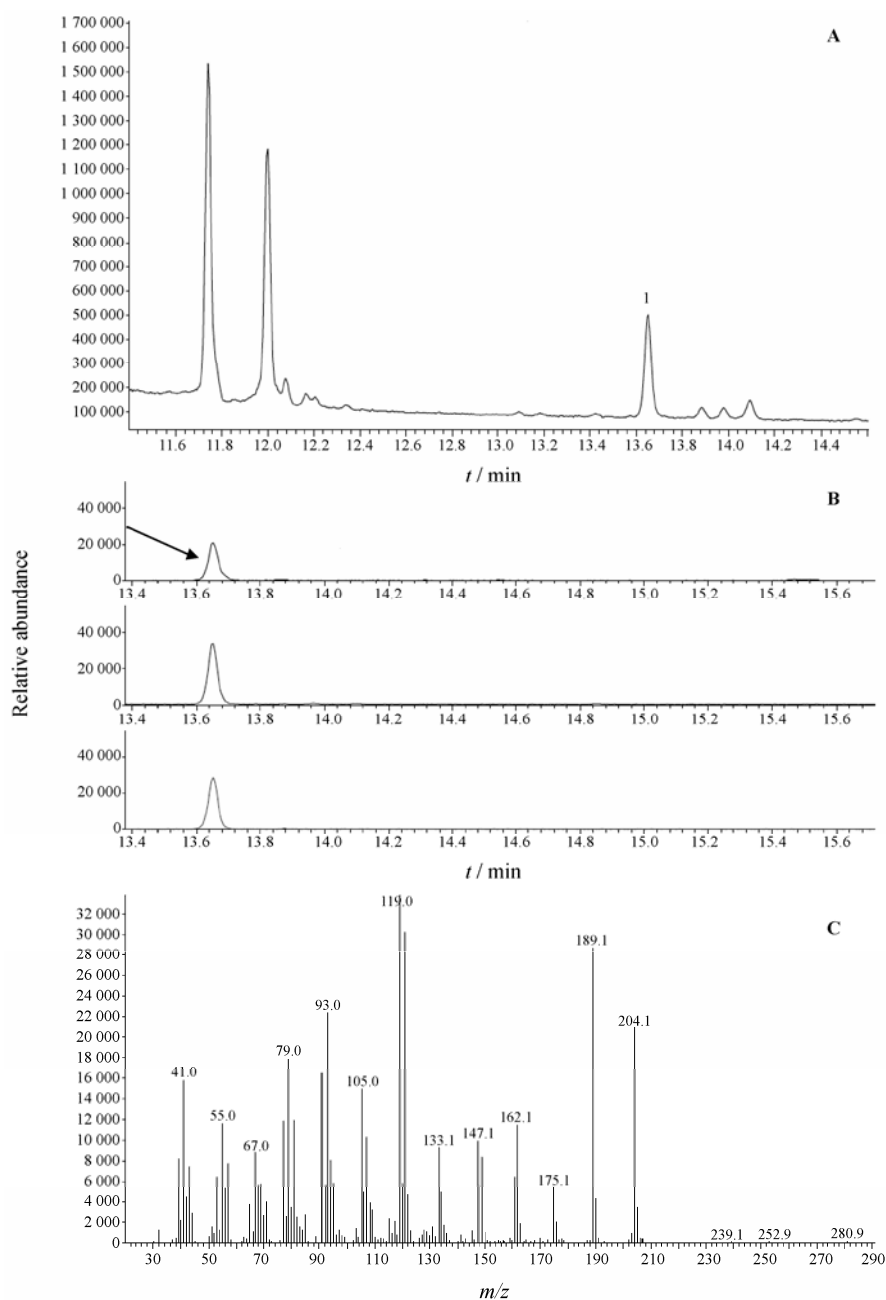


Figure 4 GC-MS identification of amorph-4,11-diene produced by W303-1B[pYeDP60/G/ADS]. A: The total ion chromatogram of W303-1B[pYeDP60/G/ADS]; B: Selected ion m/z 204 and m/z 119, 189; C: MS spectrum of the peak of retention time 13.653 min; 1: Peak of retention time 13.653 min

了探究 *ADS* 基因的组合形式与工程菌产量的影响, 本实验构建了两种酿酒酵母紫穗槐-4,11-二烯工程菌: 附加体型酵母工程菌与整合体型酵母工程菌。其中, 附加体型酵母工程菌中 *ADS* 基因存在 5~20 个拷贝数^[14], 而在整合体型酵母工程菌中, 只检测到了 1 个拷贝。对这两个工程菌发酵产物进行 GC-MS 检测, 发现附加体型酵母工程菌中紫穗槐-4,11-二烯产量要高于整合体型酵母工程菌。这表明 *ADS* 基因拷贝数和工程菌产量呈正相关。

ADS 基因主要通过如下 3 种方式整合到酵母基因组中: ① 单拷贝整合到酵母基因组中; ② 多拷贝分散整合到酵母基因组中; ③ 多拷贝正相或反相串联整合到酵母基因组上。第二和第三种方式可能会提高紫穗槐-4,11-二烯的产量, 也可能导致基因沉默。本研究首先通过 GC-MS 确认了整合型酵母工程菌能产生紫穗槐-4,11-二烯。然后, 利用 Southern blot 确认整合型酵母工程菌中 *ADS* 基因的拷贝数。本试验设计采用 *EcoR* I / *Pst* I 和 *EcoR* I / *Sac* I 两种双

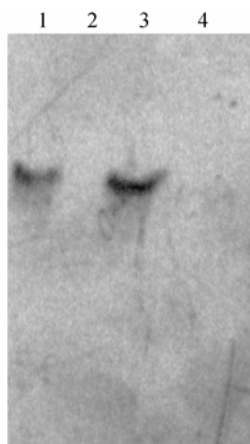


Figure 5 Southern blot result of W303-1B[rDNA:ADS]. 1: Southern blot result of W303-1B[rDNA:ADS] genome cut with *EcoR* I / *Pst* I; 2: Southern blot result of W303-1B genome cut with *EcoR* I / *Pst* I; 3: Southern blot result of W303-1B[rDNA:ADS] genome cut with *EcoR* I / *Sac* I; 4: Southern blot result of W303-1B genome cut with *EcoR* I / *Sac* I

酶切的方式进行酵母基因组的酶切, 其中, *EcoR* I / *Pst* I 是 *ADS* 表达盒序列中没有的酶切位点, 通过双酶切可以确认分散整合到酵母基因组中的 *ADS* 基因的拷贝数, *Sac* I 在 *ADS* 表达盒序列中存在单一位点, 通过 *EcoR* I / *Sac* I 双酶切, 可以确认多拷贝串联整合时, *ADS* 基因在酵母中的拷贝数。结果表明, 利用两种酶切方式进行 Southern blot 时, 均只得到一条带, 表明 *ADS* 基因是单拷贝整合到酵母基因组中的。

为了提高整合型工程菌中 *ADS* 基因的拷贝数, 本试验选择了酿酒酵母基因组中的重复单位 rDNA 序列作为重组整合单位。rDNA 序列在酵母基因组中存在 100~200 个拷贝数^[15], 选择其作为整合位点, 能有效地提高 *ADS* 基因整合的频率。尽管试验结果表明在整合型工程菌中 *ADS* 基因的拷贝数与理论上的整合位点数相差较大, 但这个结果的意义也是显而易见。

首先, 为获得高产紫穗槐-4,11-二烯和青蒿酸的工业用酵母工程菌奠定了基础。一般来说, 外源基因可以通过质粒转化和同源重组两种方式导入宿主中。其中, 质粒转化比较容易, 技术成熟, 是工程菌构建的首选方法, 但质粒在附加体型工程菌中不稳定, 容易丢失; 同源重组效率比较低, 筛选较为困难, 但通过同源重组构建的工程菌外源基因稳定, 不需要抗生素或营养缺陷标记进行压力选择, 更适合用作工业化生产菌株。本实验将 *ADS* 基因通过同源重组的方式导入酿酒酵母基因组, 目的就是为了获得一株能用于工业化生产的菌株。结果表明, 该工程菌能生

产紫穗槐-4,11-二烯。这样, 在以后的实验中可以通过改进方法, 增加青蒿酸生物合成途径基因在基因组中的拷贝数, 获得高产紫穗槐-4,11-二烯和青蒿酸的工程菌。

其次, 可以利用该工程菌更便利地进行条件优化。*ADS* 基因整合到酵母基因组, 使酿酒酵母获得了生产紫穗槐-4,11-二烯的性质, 从而克服了外源质粒不稳定的性质。这样可以利用该工程菌进行培养基的优化、代谢途径的优化以及其他因素对工程菌产量影响等的研究, 加速青蒿素前体代谢工程的研究。

当然, 这种多拷贝外源基因同源重组的方法也存在很大的风险。随着外源基因在酿酒酵母中拷贝数的提高, 基因同源序列之间的相互作用会导致外源基因“反式失活”。因此, 怎样解决目的产物增量和外源基因沉默之间的矛盾将是构建高效青蒿酸前体酵母工程菌的关键之一。

References

- [1] Anthony JR, Anthony LC, Nowroozi F, et al. Optimization of the mevalonate-based isoprenoid biosynthetic pathway in *Escherichia coli* for production of the anti-malarial drug precursor amorpha-4,11-diene [J]. *Metab Eng*, 2009, 11: 13-19.
- [2] Bouwmeester HJ, Wallaartb TE, Janssen MH A, et al. Amorpha-4,11-diene synthase catalyses the first probable step in artemisinin biosynthesis [J]. *Phytochemistry*, 1999, 52: 843-854.
- [3] Mercke P, Bengtsson M, Bouwmeester HJ, et al. Molecular cloning, expression, and characterization of amorpha-4,11-diene synthase, a key enzyme of artemisinin biosynthesis in *Artemisia annua* L [J]. *Arch Biochem Biophys*, 2000, 381: 173-180.
- [4] Chang YJ, Song SH, Park SH, et al. Amorpha-4,11-diene synthase of *Artemisia annua*: cDNA isolation and bacterial expression of a terpene synthase involved in artemisinin biosynthesis [J]. *Arch Biochem Biophys*, 2000, 383: 178-184.
- [5] Wallaart TE, Bouwmeester HJ, Hille J, et al. Amorpha-4,11-diene synthase: cloning and functional expression of a key enzyme in the biosynthetic pathway of the novel antimalarial drug artemisinin [J]. *Planta*, 2001, 212: 460-465.
- [6] Li ZQ, Liu Y, Liu BY, et al. Cloning, *E.coli* expression and molecular analysis of amorpha-4,11-diene synthase from a high-yield strain of *Artemisia annua* L [J]. *J Integr Plant Biol*, 2006, 48: 1486-1492.

- [7] Ro DK, Paradise EM, Ouellet M, et al. Production of the antimalarial drug precursor artemisinic acid in engineered yeast [J]. *Nature*, 2006, 440: 940–943.
- [8] Martin VJJ, Pitera DJ, Withers ST, et al. Engineering a mevalonate pathway in *Escherich coli* for production of terpenoids [J]. *Nat Biotechnol*, 2003, 21: 796–803.
- [9] Kong JQ, Cheng KD, Wang LN, et al. Increase of copy number of HMG-CoA reductase and FPP synthase genes improves the amorph-4,11-diene production in engineered yeast [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2007, 42: 1314–1319.
- [10] Kong JQ, Wang W, Wang LN, et al. The improvement of amorph-4,11-diene production by a yeast-conform variant [J]. *J Appl Microbiol*, 2009, 106: 941–951.
- [11] Gietz RD, Schiestl RH, Willems AR, et al. Studies on the transformation of intact yeast cells by the LiAc/ss-DNA/PEG procedure [J]. *Yeast*, 1995, 11: 355–360.
- [12] Walker M, Vystavelova A, Pedler S, et al. PCR-based gene disruption and recombinatory marker excision to produce modified industrial *Saccharomyces cerevisiae* without added sequences [J]. *J Microbiol Methods*, 2005, 63: 193–204.
- [13] Lindahl AL, Olsson ME, Mercke P, et al. Production of the artemisinin precursor amorph-4,11-diene by engineered *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Biotechnol Lett*, 2006, 28: 571–580.
- [14] Pompon D, Louerat B, Bronine A, et al. Yeast expression of animal and plant p450s in optimized redox environments [J]. *Meth Enzymol*, 1996, 272: 51–64.
- [15] Petes TD, Botstein D. Simple mendelian inheritance of the reiterated ribosomal DNA of yeast [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1977, 74: 5091–5095.

《世界临床药物》杂志

原名《国外医药——合成药、生化药、制剂分册》

《世界临床药物》由国资委直属企业上海医药工业研究院主管主办，在国内医药、医疗卫生企事业单位颇具影响。依托主办单位药物研究开发实力以及其在全国医药行业的影响力，凭借上海乃至全国各大医院和医学药学高等院校专家教授编委参与和支持，本刊 30 年坚持不懈倡导安全用药、合理用药理念，积极推进国内临床用药水平的提高。

本刊关注全球医药研发进展、涵盖临床各科用药，是一本服务临床医师、药师，面向医药行业及医疗卫生从业人员的综合性药学学术期刊。本刊聚焦药物临床应用、研发进展和市场管理等各个环节，精心组织临床热点专题综述，凸现学术性、权威性，又不乏时效性。

主要栏目：医药专论，研究论文，综述评论，信息。

把握世界药物研发趋势，探讨临床用药焦点问题，请看《世界临床药物》！

月刊，大 16 开，64 页，印刷装帧精良。邮发 4-302，全国各地邮局均可订阅。

定价：26 元，全年 312 元。

出版：《世界临床药物》编辑部；地址：上海市北京西路 1320 号；邮编：200040

编辑部联系：电话 021-62894305，传真 021-62890581，电子邮箱 wcd@pharmadl.com

发行部联系：电话 021-62899252，传真 021-62890581，电子邮箱 wcdfx@pharmadl.com

广告部联系：电话 021-62897075，62477965；电子邮箱 ggd@pharmadl.com