

研究报告

Arresten 在烟草中的表达及其生物学活性分析

李红民, 郝建国, 贾敬芬

西北大学生命科学学院陕西省生物技术重点实验室, 西安 710069

摘要: 采用 5'端引入 His-tag 的引物从携带有 Arresten 基因的质粒 pCA 中扩增血管生成抑制因子 Arresten 编码基因, 构建其植物表达载体 pCAMBIAarr 并通过冻融法转化根癌农杆菌 LBA4404, 获得携带目的基因的重组农杆菌。采用叶盘法以重组农杆菌转化烟草, 在 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 潮霉素 B 为选择压力下获得再生烟草植株, 经过 Southern 杂交、RT-PCR 和 Western blotting 检测, 获得稳定整合有 Arresten 编码基因的烟草转基因植株。牛血管内皮细胞 BCE 增殖抑制实验表明, 采用镍离子螯合次氨基三乙酸亲和层析法从转基因烟草叶片中分离纯化的重组 Arresten 蛋白具有明显的抑制牛血管内皮细胞增殖的生物活性。

关键词: 血管生成抑制因子, Arresten, 转基因烟草, 生物学活性

Expression of Biologically Active Recombinant Arresten in *Nicotiana tabacum*

Hongmin Li¹, Jianguo Hao, and Jingfen Jia

School of Life Science, Northwest University, Xi'an 710069, China

Abstract: In this report, the biological activity of the recombinant Arresten expressed in *Nicotiana tabacum* was studied. The gene coding for the tumor angiogenesis inhibitor Arresten was PCR-amplified from the plasmid pCA and its plant expression vector named pCAMBIAarr was constructed by inserting the Arresten cDNA fragment into the *NcoI/BstEII* sites of the plant binary expression vector pCAMBIA1301. Then pCAMBIAarr was transferred into *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 by the freeze-thaw method. The adventitious shoots and regenerated plants of *Nicotiana tabacum* with hygromycinB-resistance were obtained via *Agrobacterium*-mediated leaf disk transformation method. Southern hybridization, RT-PCR and Western blotting analysis showed that the Arresten cDNA was integrated into the genome of some of the regenerated plants and the recombinant Arresten was expressed with a molecular size of 26 kD. Recombinant Arresten purified from transgenic tobacco leaves had an anti-proliferative effect on bovine endothelial cells. We speculate that biologically active recombinant Arresten can be produced by using plants as bioreactors.

Keywords: tumor angiogenesis inhibitor, Arresten, biological activity, transgenic tobacco plant

Arresten 是一种特异性抑制内皮细胞增殖和血管生成的多肽因子, 是 Colorado 等^[1]人发现并命名的、源自人 IV 型胶原蛋白 $\alpha 1$ 链 NC1 非胶原结构域。它是由 690 bp 的开放读码框编码的 230 个氨基酸残

Received: January 24, 2008; **Accepted:** July 1, 2008

Supported by: the science and technology key projects foundation of Xi'an Science & Technology bureau (No. GG06078) and the Scientific Research Foundation of the Northwest University (No. okyqdf173).

Corresponding author: Hongmin Li. Tel: +86-29-88303484; E-mail: hlhm2002@yahoo.com.cn, lih2006@nwu.edu.cn
西安市科技局科技攻关项目(No. GG06078); 西北大学科研启动经费项目(No. okyqdf173)资助。

基组成的蛋白, 相对分子质量 26 kD。重组 Arresten 已经在大肠杆菌^[1-9]、毕赤酵母^[10]和哺乳动物细胞^[2-4]中获得成功表达。已有的研究结果显示, 纯化的重组 Arresten 在离体条件下可以有效抑制血管内皮细胞增殖, 在荷瘤小鼠体内能够抑制肿瘤增殖、迁移和血管形成, 揭示出 Arresten 是一种具有潜在应用价值的血管生成抑制因子。这些研究结果为实现 Arresten 的实际应用和规模化生产奠定了良好的前期工作基础。

与上述几种表达系统相比, 植物具有生物量大、容易培养/种植、生产成本相对较低等优点, 因此植物表达系统也成为近年来药用蛋白基因工程研究领域的热点之一。但是, 利用植物表达 Arresten 的研究尚未见报道。作者在研究中采用植物双元表达载体 pCAMBIA1301 将 CaMV35S 启动子驱动的 Arresten 编码基因导入烟草基因组中, 并对转基因烟草中表达的 Arresten 的生物学活性进行了初步研究, 旨在为利用植物表达系统制备重组 Arresten 提供实验依据。

1 材料与amp;方法

1.1 菌株和质粒

大肠杆菌(*Escherichia coli*)菌株 DH5 α 用于载体构建与扩增, 根癌农杆菌菌株 LBA4404 用于烟草转化, Arresten 表达载体 pCA 由本实验室构建保存^[11]、质粒 pCAMBIA1301 由澳大利亚 CAMBIA 惠赠, pMD18-T 载体为 TaKaRa 公司产品。

1.2 材料

烟草(*Nicotiana tabacum*)种子“秦烟 95”由陕西省烟草研究所提供; 牛血管内皮细胞 BCE 由西安交通大学医学院提供。

1.3 试剂和工具酶

各种限制性内切酶、Taq DNA polymerase、T4 DNA ligase 等购自日本 TaKaRa 公司; 凝胶回收试剂盒购自西安杨森生物技术有限公司; TRIzol、RT-PCR 试剂盒为 Invitrogen 公司产品; 1.0 kb DNA Ladder 及 150 bp DNA Ladder 为西安海碧基因生物技术有限公司产品; DEPC 购自 Sigma 公司; RNA 分离试剂盒 (RNeasy® Mini Kit, Cat. No. 74104)和反转录试剂盒购自 Qiagen 公司; DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II (Roche); 蛋白质分离用

Ni-NTA resin (Qiagen, Valencia, CA) 购自西安润德生物技术有限公司; 蛋白质含量测定用 Bradford protein assay kit (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)、Western blot 用 PVDF 膜、一抗(兔抗人 Arresten 多克隆抗体)、二抗(羊抗兔 IgG-HRP)、牛成纤维细胞生长因子 bFGF 以及牛血清白蛋白购自北京博奥森生物技术有限公司; 其他各种试剂均为进口或国产分析纯试剂。

1.4 Arresten 植物表达载体的构建及其对根癌农杆菌的转化

Arresten 基因扩增用引物设计如下:

正义引物: 5'-CATCATGACTCACCACCACCA
CCACCACATGTCTGTTGATCACGGCTTC-3'

反义引物: 5'-TTGGTCACCCTATGTTCTTCTC
ATACAGACTTG-3'

注: 下划线部分为引入的限制性内切酶位点, 其中上游引入的限制性内切酶位点为 *Nco* I, 下游引入的限制性内切酶位点为 *Bst*E II; 加粗部分为 His-tag 编码序列; 引物由 TaKaRa 公司合成。

目的基因的扩增: 以携带有 Arresten cDNA 的质粒 pCA 作为模板扩增 Arresten 编码基因。PCR 循环: 94°C, 4 min; 94°C 30 s, 40°C 30 s, 72°C 1 min, 3 个循环; 94°C 30 s, 50°C 30 s, 72°C 1 min, 25 个循环; 72°C 5 min。PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳初步检测后采用凝胶回收试剂盒从凝胶中回收 Arresten cDNA 扩增产物。

Arresten 植物表达载体的构建及其对根癌农杆菌的转化: 从凝胶中回收的 Arresten cDNA 扩增产物经过 *Nco* I 和 *Bst*EII 双酶切处理后与经同样双酶切处理并回收的 pCAMBIA1301 载体大片段连接, 连接产物转化 *Escherichia coli* 菌株 DH5 α , 经过卡那霉素筛选, 从卡那霉素抗性克隆中小量制备质粒并对其进行双酶切检测和序列测定(委托 TaKaRa 公司进行), 构建出 Arresten 植物表达载体 pCAMBIAarr。pCAMBIAarr 转化根癌农杆菌的操作、烟草的转化及再生等参考文献进行^[11]。

1.5 转基因烟草的鉴定

1.5.1 转基因烟草的 Southern 杂交检测

CTAB 法^[11]大量制备转化植株和亲本植株的基因组 DNA 并用苯酚抽提纯化, TE 重悬后调节浓度达到 1.0 μ g/ μ L, 取 30 μ g 进行 0.8% 琼脂糖凝胶电泳。

电泳结束后进行 Southern 杂交实验, 杂交操作方法按照 DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II 试剂盒说明书进行。

1.5.2 转基因烟草的 RT-PCR 检测

烟草叶片总 RNA 提取和 RT-PCR 操作按照 Invitrogen 公司对应产品的说明书进行。

1.5.3 转基因烟草的 Western blotting 检测

转基因烟草的叶片在液氮中迅速研磨至细粉状, 加入缓冲液抽提。抽提液于 4°C、27 000 g、20 min 离心两次, 收集上清液作为蛋白质样品。12% 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离各蛋白, 用半干转印仪(Hoefer TE 70, Amersham Biosciences, USA)将蛋白质条带转移至 PVDF 膜上。蒸馏水洗膜至褪色, 用 PBS +20% 脱脂奶+10% Tween20 封闭液封闭 4 h, 加一抗(兔抗人 Arresten 多克隆抗体, 1:100 稀释)室温孵育 1.5 h, PBS 洗去多余一抗, 加辣根过氧化物酶标记羊抗兔二抗(1:1000 稀释)室温孵育 1.5 h, 漂洗后加入 DAB 显色液显示, 显色条带出现后立即终止反应, 拍照。

1.6 转基因烟草中重组 Arresten 的分离纯化

转基因烟草的叶片在液氮中迅速研磨至细粉状, 加入 pH 8.0 的磷酸缓冲液抽提。抽提液离心后收集上清液。按照产品说明书, 用 Ni-NTA resin 柱分离纯化目的蛋白, 真空冷冻浓缩。蛋白质含量测定以牛血清白蛋白为对照, 采用 Bradford protein assay kit 操作说明书进行。

1.7 重组 Arresten 生物学活性测定

牛血管内皮细胞 BCE 细胞系在 EGM 培养基中扩增。将 0.5 mL 约含 2×10^4 cells 的 EGM 培养液加至 24 孔板上, 37°C、5% CO₂、培养 24 h。更换培养液, 加入 PBS 溶解、母液浓度为 38.46 nmol/mL 的重组 Arresten, 浓度梯度为 7.69 pmol/mL、15.38 pmol/mL、23.07 pmol/mL、30.76 pmol/mL、38.45 pmol/mL、46.14 pmol/mL、53.83 pmol/mL、61.52 pmol/mL, 培养 30 min 后, 用 bFGF 刺激培养细胞, 并加入新鲜 EGM 至终体积 0.5 mL。培养 72 h 后, 胰酶裂解, 血球计数板计数。同时设 PBS 替代重组 Arresten 作为阴性对照, 处理同上。每组处理设 6 个重复, 以每个处理的细胞密度平均值进行统计学分析。对 BCE 细胞增殖的抑制百分率=[(阴性对照 PBS 处理组的平均细胞密度-重组 Arresten 处理组的平均细胞密度)/

阴性对照 PBS 处理组的平均细胞密度] × 100%。

2 结果与分析

2.1 Arresten 植物表达载体 pCAMBIAarr 的构建

arresten 定向插入植物双元表达载体 pCAMBIA1301 所得的重组质粒经过 *Hind* III 和 *Bst*E II 双酶切分析, 限制性酶切电泳图谱显示, 重组质粒能够被切割产生预期的带有部分载体序列和目的基因的片段(大小为 1473 bp)和载体大片段(图 1 第 4 泳道), 说明目的片段已经正确插入 pCAMBIA1301 的 *Nco* I/*Bst*E II 位点。序列测定结果显示, *arresten* 读码框完整、正确。

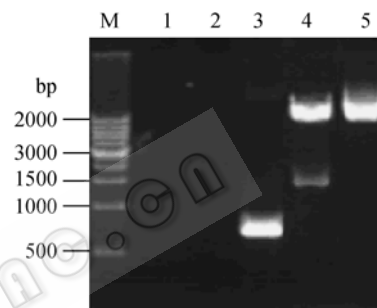


图 1 重组质粒 pCAMBIAarr 的鉴定

Fig. 1 Identification of recombinant plasmid pCAMBIAarr
M: 1.0 kb DNA ladder; 1: negative Control (water as template); 2: negative control (pCAMBIA1301 as template); 3: PCR products of pCAMBIAarr; 4: *Hind* III & *Bst*E II digested pCAMBIAarr; 5: pCAMBIAarr DNA

2.2 转基因烟草的 Southern 杂交检测

以亲本“秦烟 95”及转基因植株的基因组 DNA 作为检测样品进行 Southern 杂交实验的结果显示, 有 3 个转化植株的基因组 DNA 出现阳性杂交信号, 而亲本基因组 DNA 没有杂交信号。说明 3 个转化植株都是转基因植株, 目的基因已经整合到烟草基因组中(图 2)。

2.3 转基因烟草的 RT-PCR 检测

采用 TRzol 法提取 1、2、3 号转基因植株及亲本植株的总 RNA, 经反转录产生 cDNA 第一链作为 PCR 扩增反应的模板、以目的基因 *arresten* 作为检测对象进行 PCR 反应。1% 的琼脂糖凝胶电泳检测结果显示, 亲本植株总 RNA 的反转录产物没有扩增信号, 1 至 3 号转基因植株总 RNA 的反转录产物都能够被目的基因引物扩增出预期的目的产物(见图 3)。

说明转基因植株中存在目的基因的 mRNA, 目的基因在转基因植株中获得了转录水平上的表达。但是根据凝胶成像系统的扫描分析, Arresten mRNA 在总 RNA 中的比例很低。

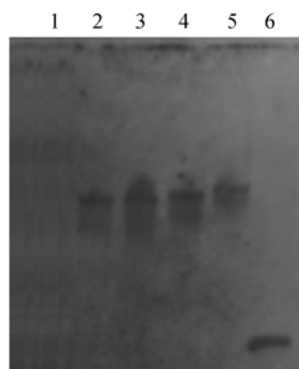


图 2 Southern 杂交检测转基因植株

Fig. 2 Southern blot analysis of Genomic DNA from transgenic *Nicotiana tabacum* "Qinyan 95"

1: genomic DNA of "Qinyan 95"; 2: genomic DNA of the transgenic plant 1; 3: genomic DNA of the transgenic plant 2; 4 & 5: genomic DNA of the transgenic plant 3; 6: positive control (pCAMBIAarr DNA)

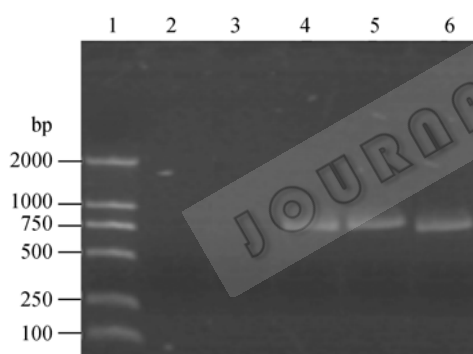


图 3 RT-PCR 法检测目的基因转录水平上的表达

Fig. 3 RT-PCR analysis of total RNA from parent and transgenic plants of *Nicotiana tabacum*

1: DNA marker; 2: negative control; 3: Qinyan95; 4, 5, 6: RT-PCR product from the transgenic plants 1, 2 and 3 respectively

2.4 转基因烟草的 Western blotting 检测

根据蛋白质印迹分析结果表明, 来自 3 个转基因植株的总可溶性蛋白质样液中都有分子量为 26 kD 的目的蛋白存在(见图 4), 大小与基因序列推测的结果一致, 但“秦烟 95”的总可溶性蛋白中未出现目的蛋白。间接说明 3 个转基因植株中目的基因都获得了蛋白质水平上的表达。

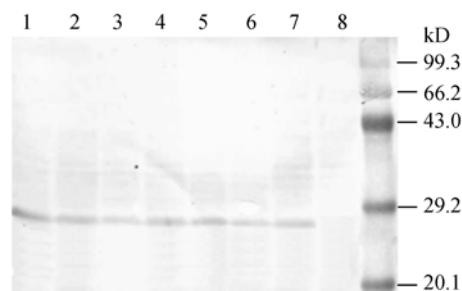


图 4 转基因植株的 Western blotting 检测

Fig. 4 Western blotting analysis of recombinant Arresten from transgenic plants of *Nicotiana tabacum*

1~2: soluble protein from the transgenic plant 1; 3, 4: soluble protein from the transgenic plant 2; 5~7: soluble protein from the transgenic plant 3; 8: soluble protein from Qinyan95

2.5 转基因烟草中重组 Arresten 的分离纯化及其生物学活性测定

采用材料方法中提及的 Ni^{2+} 螯合亲和层析分离纯化转基因烟草叶片中的重组 Arresten, 透析脱盐、去除小分量的成分后, SDS-PAGE 电泳和考马斯亮蓝染色检测结果表明分离的重组 Arresten 蛋白样品中没有其他杂蛋白污染(结果未显示)。重组 Arresten 以 PBS 溶解, 作用于用 bFGF 刺激后的牛血管内皮细胞 BCE。实验结果表明, 阴性对照 PBS 处理组细胞密度平均为 10.5×10^4 /mL, 重组 Arresten 各处理组(从 7.69 pmol/mL 到 61.52 pmol/mL)的平均细胞密度分别为 9.4×10^4 /mL、 9×10^4 /mL、 8.2×10^4 /mL、 7.6×10^4 /mL、 6.8×10^4 /mL、 6.3×10^4 /mL、 6.1×10^4 /mL 和 6.06×10^4 /mL, 各组组内标准偏差最大为 0.064, 最小为 0.050, 均低于对照组(图 5a)。对 BCE 细胞增殖的抑制百分率分别为 10.48%、14.29%、21.9%、27.62%、35.24%、40%、41.9%和 42.3%(图 5b)。T 检验显示, 当重组 Arresten 浓度达到 15.38 pmol/mL 以上时, 在 $P=0.05$ 的置信区间内, 重组 Arresten 各处理组的平均细胞密度与阴性对照 PBS 处理组的平均细胞密度之间均存在显著性差异, 说明重组 Arresten 作用对 bFGF 刺激后的 BCE 增殖能力具有明显抑制作用, 而且表现出一定的剂量依赖性, 但是当 Arresten 作用浓度达 53.83 pmol/mL 以上时, 抑制效率的增幅趋缓(图 5)。该结果与 Colorado 等人^[1]的研究结果相似, 但作用浓度偏高。

3 讨论

植物生物量大, 可在田间直接种植, 无需特殊的生物反应器和营养要求, 因而成为近年来药用多

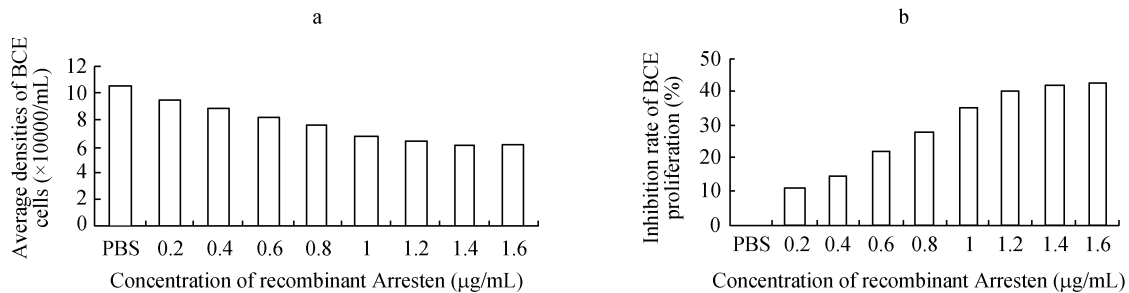


图 5 纯化的重组 Arresten 对 BCE 细胞的增殖抑制作用

Fig. 5 Inhibition effects on BCE proliferation of recombinant Arresten purified from transgenic *Nicotiana tabacum* plants

a, b: 0.2 μg/mL=7.69 pmol/mL

肽或蛋白表达系统研究开发的热点之一。本研究将血管生成抑制因子 Arresten 编码基因插入植物双元表达载体 pCAMBIA1301 中, 构建成携带 Arresten cDNA 的表达载体并转化烟草, 经过 Southern 杂交、RT-PCR、Western blotting 分析以及生物学活性初步研究, 证实转基因烟草中能够表达出具有血管内皮细胞增殖抑制作用的重组 Arresten, 从而为 Arresten 的规模化生产提供了一条新的思路。到目前为止, 这是首篇利用植物表达系统获得具有生物活性的人源重组 Arresten 的研究报道。

另外, 基因工程领域的大量研究文献表明, 外源基因在宿主体内(细胞)的表达效率不仅与外源基因的表达载体有关, 而且与宿主本身的特性有着直接或间接的关系。作者在研究中虽然获得了能够表达产生具有一定生物学活性的重组 Arresten 的转基因烟草株系, 但是该重组蛋白在转基因烟草叶片中的表达量很低, 仅占宿主可溶性蛋白的 0.2% 左右, 远低于外源基因在大肠杆菌和酵母中的表达水平。这种外源基因在宿主植物中表达量很低的现象在植物基因工程操作中比较普遍^[12]。这可能与显花植物基因组很大、而转入并整合到宿主基因组中的外源基因拷贝数低有关, 或是外源基因在与宿主基因组发生整合的过程中诱发了核酸结构的微小变化, 使得外源基因被启动转录和翻译的效率降低。而且, 由于植物与人类在遗传密码的偏好上和基因表达产物的修饰加工、调控上存在一定差异, 使得表达出的蛋白在生物活性上出现一些差异, 作者在研究中观察到的重组 Arresten 达到与 Colorado 等人^[1]的研究中相同的 BCE 细胞增殖抑制率所需要的浓度偏高, 可能就是与上述原因有关。目前, 已经可以通过选择更加适合的宿主植物、利用叶绿体等细胞器基因

组进行外源基因的表达、选择更加强效的基因启动子和外源基因两翼的 5' 和 3' 非翻译区序列、使用植物宿主的偏好密码、基因融合技术、改变外源基因在宿主植物中的亚细胞定位等方法来提高外源基因在宿主植物中的表达效率和生物学活性^[13-15]。作者也在进行这方面工作的探索。伴随着植物基因工程中这些关键问题的解决, 以植物作为表达系统生产药用蛋白的用途将会越来越广泛。

REFERENCES

- [1] Colorado PC, Torre A, Kamphaus G, *et al.* Anti-angiogenic cues from vascular basement membrane collagen. *Cancer Res*, 2000, **60**: 2520-2526.
- [2] Lu CR, Chen L, Dou CQ, *et al.* Arresten expressed *in vivo* suppresses the growth of SGC27901 tumor xenografts in nude mice. *Chin J Surg*, 2005, **43**(21): 1391-1394.
卢灿荣, 陈凛, 窦春青, 等. Arresten 对人胃癌细胞 SGC27901 裸鼠移植瘤生长抑制作用的研究. 中华外科杂志, 2005, **43**(21): 1391-1394.
- [3] Xiong J, Song ZF, Lu X, *et al.* Inhibition of endothelial cell migration by transient transfection of Arresten gene. *Tumor*, 2005, **25** (5): 420-421.
熊俊, 宋自芳, 卢昕, 等. 瞬时转染 Arresten 基因对血管内皮细胞迁移的影响. 肿瘤, 2005, **25**(5): 420-421.
- [4] Hu QG, Zheng QC, Long MY, *et al.* Arresten inhibited human umbilical vein endothelial cells proliferation and tube formation. *Tumor*, 2007, **27**(3): 179-180, 198.
胡青钢, 郑启昌, 龙淼云, 等. Arresten 抑制 HUVEC 细胞增殖和管腔形成的实验研究. 肿瘤, 2007, **27**(3): 179-180, 198.
- [5] Song ZF, Zheng QC, Zhu L, *et al.* Construction of prokaryotic expression vector of human angiogenesis inhibitor *arresten* and its expression in *E. coli*. *Chin J Pathophysiol*, 2003, **19**(9): 1161-1164.
宋自芳, 郑启昌, 朱林, 等. 血管生成抑制因子 *arresten* 基因原核表达载体的构建及其在大肠杆菌中的表达.

- 中国病理生理杂志, 2003, **19**(9): 1161-1164.
- [6] Zheng QC, Song ZF, Zheng YW, *et al.* Cloning and Expression of Human Arresten Gene. *J Chin Biotechnol*, 2002, **22**(4): 89-92.
郑启昌, 宋自芳, 郑幼伟, 等. 血管生成抑制因子 *arresten* 基因的克隆表达. 中国生物工程杂志, 2002, **22**(4): 89-92.
- [7] Song ZF, Zheng QC, Shu XG, *et al.* Cloning and expression of human *arresten* gene and effect of its recombinant protein on endothelial cell proliferation. *Chin J Exp Surg*, 2005, **22**(5): 616-622.
宋自芳, 郑启昌, 舒晓刚, 等. 人 *arresten* 基因的克隆表达及其对内皮细胞增殖的影响. 中华实验外科杂志, 2005, **22**(5): 616-622.
- [8] Zheng JP, Tang H, Xie J, *et al.* Expression in *E. coli* JM109 and pharmacology on anti-angiogenesis of endogenous anti-angiogenesis inhibitor Arresten gene. *Chin Pharm Acol Bull*, 2006, **22**(10): 1229-1232.
郑金平, 唐海英, 解军, 等. 内源性血管生成抑制因子 Arresten 在 *E. coli* JM109 中的表达及抗新生血管生成的药理学研究. 中国药理学通报, 2006, **22**(10): 1229-1232.
- [9] He AB, Zeng ZC. Direct cloning of the newest angiogenesis inhibitor, *arresten*. *J Chongqing Med Univ*, 2004, **29**(3): 337-339.
何爱彬, 曾昭淳. 血管生成抑制剂 *arresten* 的 cDNA — 步法克隆与原核表达. 重庆医科大学学报, 2004, **29**(3): 337-339.
- [10] Zeng ZC, He AB, Ma LX, *et al.* Expression and identification of recombinant *arresten* in *Pichia pastoris*. *Chin J Biotech*, 2003, **19**(5): 572-576.
曾昭淳, 何爱彬, 马立新, 等. Arresten 在毕赤酵母中的表达和鉴定. 生物工程学报, 2003, **19**(5): 572-576.
- [11] Li HM, Hao RW, Hao JG, *et al.* Cloning of the gene coding for tumor angiogenesis inhibitor Arresten and its transference to *Nicotiana tabacum*. *J Northwest A & F Univ (Nat Sci Ed)*, 2007, **35**(4): 86-90.
李红民, 郝瑞文, 郝建国, 等. 肿瘤血管生成抑制因子 Arresten 基因克隆及其对烟草的转化. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2007, **35**(4): 86-90.
- [12] Warzechaa H, Mason HS. Benefits and risks of antibody and vaccine production in transgenic plants. *J Plant Physiol*, 2003, **160**: 755-764.
- [13] Daniell H, Streatfield SJ, Wycoff K. Medical molecular farming: production of antibodies, biopharmaceuticals and edible vaccines in plants. *Trends Plant Sci*, 2001, **6**: 219-226.
- [14] Cramer CL, Boothe JG, Oishi KK. Transgenic plants for therapeutic proteins: linking upstream and downstream strategies. *Curr Top Microbiol Immunol*, 1999, **240**: 95-118.
- [15] Richter LJ, Thanavala Y, Arntzen CJ, *et al.* Production of hepatitis B surface antigen in transgenic plants for oral immunization. *Nat Biotechnol*, 2000, **18**: 1167-1171.

科学出版社科学出版中心生命科学分社新书推介

基因转移: DNA 和 RNA 的转运与表达 (译)

[美] T 弗里德曼 J 罗西主编 殷勤伟 等译

本书是一本目前最为全面而详尽地介绍各种基因转移技术的基础理论、必需的用品器材、具体的操作步骤及注意事项等方面的实验室手册。本手册从实用角度出发, 着重阐述了 70 多项实验操作, 内容包括各类病毒载体和非病毒载体的特点、构建、制备和应用以及调控基因表达的高新技术。手册既注重培养初学者的基本操作技能, 又利于提高研究者分析和解决问题的能力。书中的实验可自行拆分, 便于研究者根据实际需求灵活选择。

本书可供细胞生物学、分子生物学、功能基因组学、RNA 组学、遗传学、基础与临床医学、生物技术、药学以及农、林、牧等方面的科研、教学、技术人员, 以及研究生、临床医生和生物医药公司的研发者参考使用。



结构生物学与现代药学研究

杨铭 主编

978-7-03-022253-4 ¥75.00 2008年8月10日出版

结构生物学是以生物大分子三维结构及其运动性的研究为基础, 定量阐明生命现象的学科, 而现代药物的合理设计大多是以结构生物学的研究成果为基础。本书侧重于药学研究中的结构生物学问题, 作为《结构生物学与药学研究》的新版, 更力求反映这一领域的最新研究进展。除了第一章绪论外, 全书分为两篇: 上篇为专论篇, 共十五章; 下篇为方法与技术篇, 共十二章。首先概述结构生物学的研究现状和发展趋势, 再从分子水平上探讨主要生物大分子的三维结构与生物功能的关系及药学研究前沿领域中的一些重要科学问题, 最后介绍结构生物学研究的主要方法与技术。

本书可供生命科学相关领域中从事药学基础研究的科学工作者及医药院校、科研单位的教师、科研人员及研究生等参考。



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 科学出版中心 生命科学分社 邮编: 100717

联系人: 阮蕊 联系电话: 010-64034622 (带传真)

更多精彩图书请登陆网站 <http://www.lifescience.com.cn>