

慢病毒载体转录通读率检测方法的建立

何佳平^{1*}, 方戡聃^{1,2*}, 张帆¹, 孙凤强¹, 王娟^{1,2}, 张敬之^{1,2}

1 上海市儿童医院 上海交通大学附属儿童医院 上海交通大学医学遗传研究所, 上海 200040

2 卫生部医学胚胎分子生物学重点实验室暨上海市胚胎与生殖工程重点实验室, 上海 200040

何佳平, 方戡聃, 张帆, 等. 慢病毒载体转录通读率检测方法的建立. 生物工程学报, 2013, 29(7): 1006-1015.

He JP, Fang YD, Zhang F, et al. Establishment of the methodology for quantifying lentiviral vector transcriptional read-through rate. Chin J Biotech, 2013, 29(7): 1006-1015.

摘 要: 慢病毒载体作为一种有效的生物研究和基因治疗载体, 近年来正受到广泛关注, 而转录通读现象则是限制其被使用的主要生物安全性瓶颈之一。为了评估慢病毒载体在整合入染色体后的转录通读的实际情况, 需要建立一种有效的检测转录通读率的方法。文中运用分子生物学等手段, 将相关质粒瞬时转染入 293T 细胞, 模拟野生型和自灭活型慢病毒载体整合入染色体后的情况, 利用实时荧光定量 PCR 分别定量转录通读和总转录本在慢病毒载体上的特征序列, 并计算出转录通读率; 同时使用流式细胞计数等技术, 检测转录通读后的 GFP 蛋白产物。两种检测结果均与理论相符, 即自灭活型载体具有更高的转录通读率。说明文中所建立的方法有效可靠, 为进一步评估和降低慢病毒载体的转录通读率, 提高慢病毒载体的生物安全性的研究提供技术支持。

关键词: 慢病毒载体, 自灭活慢病毒载体, 转录通读率, 安全性

Received: December 26, 2012; **Accepted:** February 22, 2013

Supported by: National Natural Science Foundation of China (No. 81271690), National Basic Research Program of China (973 Program) (No. 2010CB945202), Natural Science Foundation of Shanghai, China (No. 11ZR1429900).

*These authors contributed equally to this study.

Corresponding author: Jingzhi Zhang. Tel: +86-21-62472308; Fax: +86-21-62475476; E-mail: jzhang38@hotmail.com

国家自然科学基金 (No. 81271690), 国家重大基础研究发展计划(973 计划) (No. 2010CB945202), 上海市自然科学基金 (No. 11ZR1429900) 资助。

Establishment of the methodology for quantifying lentiviral vector transcriptional read-through rate

Jiaping He^{1*}, Yudan Fang^{1,2*}, Fan Zhang¹, Fengqiang Sun¹, Juan Wang^{1,2},
and Jingzhi Zhang^{1,2}

1 Shanghai Institute of Medical Genetics, Children's Hospital of Shanghai, Children's Hospital Affiliated to Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200040, China

2 Key Laboratory of Embryo Molecular Biology, Ministry of Health & Shanghai Key Laboratory of Embryo and Reproduction Engineering, Shanghai 200040, China

Abstract: As an effective vehicle for bio-research and for gene therapy, Lentiviral Vector (LV) has been drawn large attention in recent years. However, transcriptional read-through limits its application. In order to understand the extend of LV read-through in chromosome, a reliable method to assess transcriptional read-through rate is needed. Here, we report the method as follows: 293T cells were transfected with the lentiviral transfer vectors which borne with two LTRs at its two ends in order to mimic the state of "proviral vectors" in chromosome. Using the primers specific for 3'U5 and 3'U3, read-through and total transcripts were reverse transcribed, respectively. These two cDNAs were quantified by realtime PCR using the primers and probe specific for 5'end of 3'U3. Read-through rate was then calculated by the division of the two. Meanwhile, read-through product of green fluorescence protein was also analyzed by Fluorescence Activated Cell Sorter. They both reciprocally proved the principal and confirmed that self-inactivated LV appeared higher read-through rate than the wild type one. The method described in this article, therefore, provides a useful technique to study how to reduce read-through rate, and improve the bio-safety of LV.

Keywords: lentiviral vector, self-inactivating lentiviral vector, transcriptional read-through rate, safety

转录通读 (Read-through) 是指 RNA 聚合酶复合物在转录过程中遇到转录终止信号 (如 AAUAAA signal) 时不能被正常终止, 而是读过终止信号继续转录下游 DNA 序列的现象 (图 1)。它经常发生在病毒或病毒载体基因的转录过程中。目前广泛使用的第 3 代慢病毒载体经过了自灭活改造 (删除 U3 启动子), 进一步降低其产生重组型活病毒的可能性。然而, 自灭活改造同时亦删除了 3'端的转录终止上游序列 (USE) 从而提高了载体的转录通读水平^[1]。转录通读现象的发生将有可能激活下游原本沉默的基因, 这为慢病毒载体用以基因治疗带来了生物安全性方面的风险^[2]。为了规避这种风险, 研究者尝试在病

毒载体中插入隔离子来降低通读率^[3-7]。而建立一种快速有效的通读率检测方法, 对于评估以上工作的效果, 提高病毒载体的生物安全性具有重要意义。

目前测定转录通读水平的方法主要是通过流式细胞仪等手段, 定量转录通读 mRNA 所表达的蛋白产物。为了建立一种检测转录通读实际情况的方法, 我们利用整合入染色体上的慢病毒载体原病毒 (Pro-viral vector) 的转录本中不存在 5'端 U3, 而只存在 3'端 U3 的原理, 首先将总的病毒载体转录本以及其转录通读转录本用相应的不同的下游特异引物进行分别反转录, 然后使用特异针对 3'端的 U3 定量引物和探针, 通过

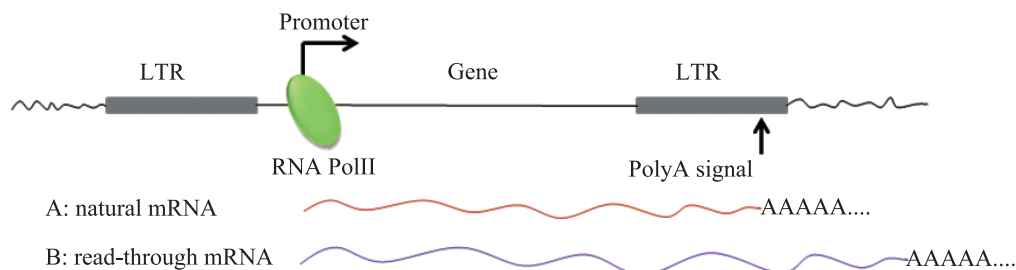


图 1 病毒载体的转录通读现象

Fig. 1 Phenomenon of transcriptional Read-through in viral vectors.

qRT-PCR 来对转录通读率进行绝对定量。在此，我们的转录通读率定义是：通读 mRNA 的数量/（正常 mRNA 的数量+通读 mRNA 的数量） $\times 100\%$ 。

本研究以携带野生型 LTR (wLTR) 和自灭活 LTR (Δ LTR) 的两种慢病毒载体作为研究对象进行通读率的检测，同时运用检测通读相对量的传统方法加以验证，以显示该方法的有效性和准确性。

1 材料与方法

1.1 材料

大肠杆菌 TPO10 宿主菌、pEGFP-N1 载体 (Invitrogen, 美国) FUGW, NL4.3 (Addgene), Pyrobest TaqE, Ex TaqE, T4 DNA 连接酶, *Apa* I, *Xho* I, *Mlu* I, *Nhe* I, dNTPs, RTase M-MLV, RNase Inhibitor (TaKaRa, 日本), *Pac* I (New England Biolabs, NEB, 美国) lipofectimin2 000, Trizol (Invitrogen 公司), 引物合成 (Generay 公司, 上海), 定量引物及 MGB 探针合成 (GeneCore 公司, 上海)。

1.2 方法

1.2.1 载体构建

用 PCR 方法扩出 HIV-1 病毒株 NL4.3 的 3'

野生型 wLTR，扩增引物为 wLTR-*Xho* I -F 和 wLTR-*Apa* I -R。扩增产物经 *Xho* I 和 *Apa* I 双酶切后，接入 pEGFP-N1 多克隆位点 *Sal* I 和 *Apa* I 之间，构建出 pEGFP-N1-wLTR 载体 (图 2A)。用 *Xho* I 和 *Apa* I 双酶切下慢病毒载体 FUGW 上的经删减 U3 的 3'LTR，接入 pEGFP-N1 的 *Sal* I 和 *Apa* I 之间，构建出 pEGFP-N1- Δ LTR 载体 (图 2B)。上述两个载体主要用于检测 3'LTR 的通读情况。

用分子克隆手段在 FUGW 的 U5 和 flap 之间插入一个单一的 *Nhe* I 位点，得到 FUGW (*Nhe* I) 载体。随后在此基础上，将 3'LTR 接入 *Mlu* I 和 *Nhe* I 之间获得 proFUGW- Δ LTR 载体 (图 2D)；将两个 3'wLTR 分别接入 *Mlu* I、*Nhe* I 之间和 *Xho* I、*Apa* I 之间获得 proFUGW-wLTR 载体 (图 2C)。上述两个载体可以用来模拟慢病毒整合入宿主基因组的情况，使检测更接近于实际的通读情况。

1.2.2 细胞转染

将 pEGFP-N1、pEGFP-N1-LTR、pEGFP-N1-wLTR、proFUGW- Δ LTR 和 proFUGW-wLTR 5 种载体，以等摩尔方式用 lipofectimin 2 000 转染入 293T 细胞后，在 37 °C、5% CO₂ 的条件下培养

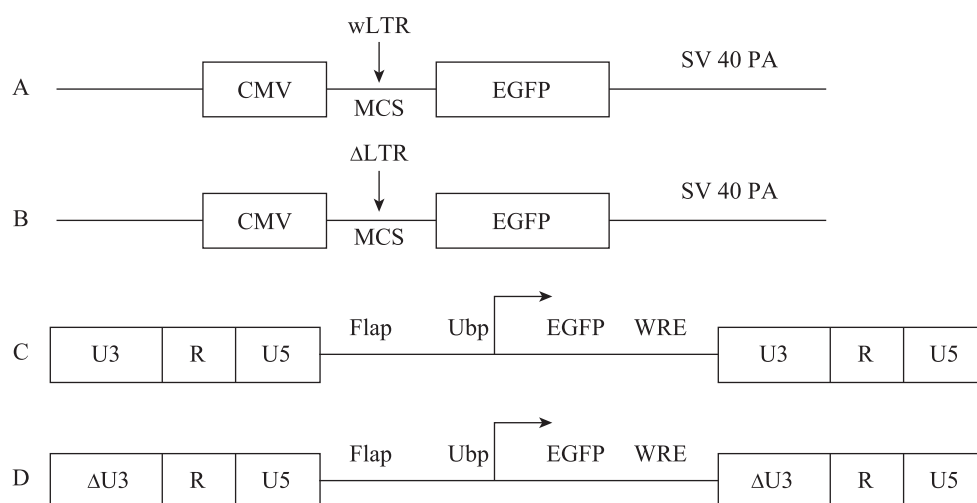


图2 载体构建图

Fig. 2 Schematic diagram of the vectors. (A) pEGFP-N1-wLTR. (B) pEGFP-N1-ΔLTR. (C) proFUGW-wLTR. (D) proFUGW-ΔLTR.

48 h, 经 0.25%胰酶消化细胞 5~10 min 后用含血清培养液终止反应。将细胞和培养液收集入 1.5 mL 的管中, 离心弃上清后待用。

1.2.3 qRT-PCR 检测转录通读率

用 Trizol 提取 pEGFP-N1-LTR、pEGFP-N1-wLTR、proFUGW-LTR 和 proFUGW-wLTR, 4 种载体转染细胞后的总 RNA。待分光光度计测定浓度后, 取相同量的 RNA, 分别用引物 RP 和 LTR3 进行反转录。这两条引物分别设计在 3'LTR 的 R 区域中 PolyA 信号 (AAUAAA) 位点的前后 (图 3)。取 cDNA 产物作为模版, 以 FP、RP 作为引物, 以 MGB-Probe 作为探针, 进行定量 PCR。反转录及定量反应体系同参考文献[8], 所用引物探针序列见表 1。ABI 7 500 实时定量 PCR 仪上进行反应, 反应条件为: 95 °C 变性 5 min; 95 °C 30 s, 59 °C 30 s, 40 个循环; 59 °C 时采集荧光, 荧光检测波长为 FAM 510 nm。反应结束

后通过定量 PCR 仪的分析软件对实验结果进行分析, 并计算出通读率的变化: 通读率=通读 mRNA (以 LTR3 为引物进行逆转录获得 cDNA)/总 mRNA (以 PA-RP 为引物进行逆转录获得 cDNA)。

1.2.4 荧光显微镜检测

在已离心弃上清的转染细胞沉淀中加入 100 μL PBS, 取少量单细胞悬液置于荧光显微镜下镜检, 并检测 GFP 阳性细胞数及荧光强度。

1.2.5 FACS 检测转染细胞荧光强度

取 50 μL 细胞的单细胞悬液, 3 000 r/min 离心 5 min, 弃上清, 加入 200 μL 以 PBS 为主的鞘液, 经流式细胞仪检测, 计数 5×10^4 个细胞, 计算 GFP 平均荧光强度。

1.2.6 数据分析

用 Excel 自带统计软件包, 进行实验组间单因素方差分析。

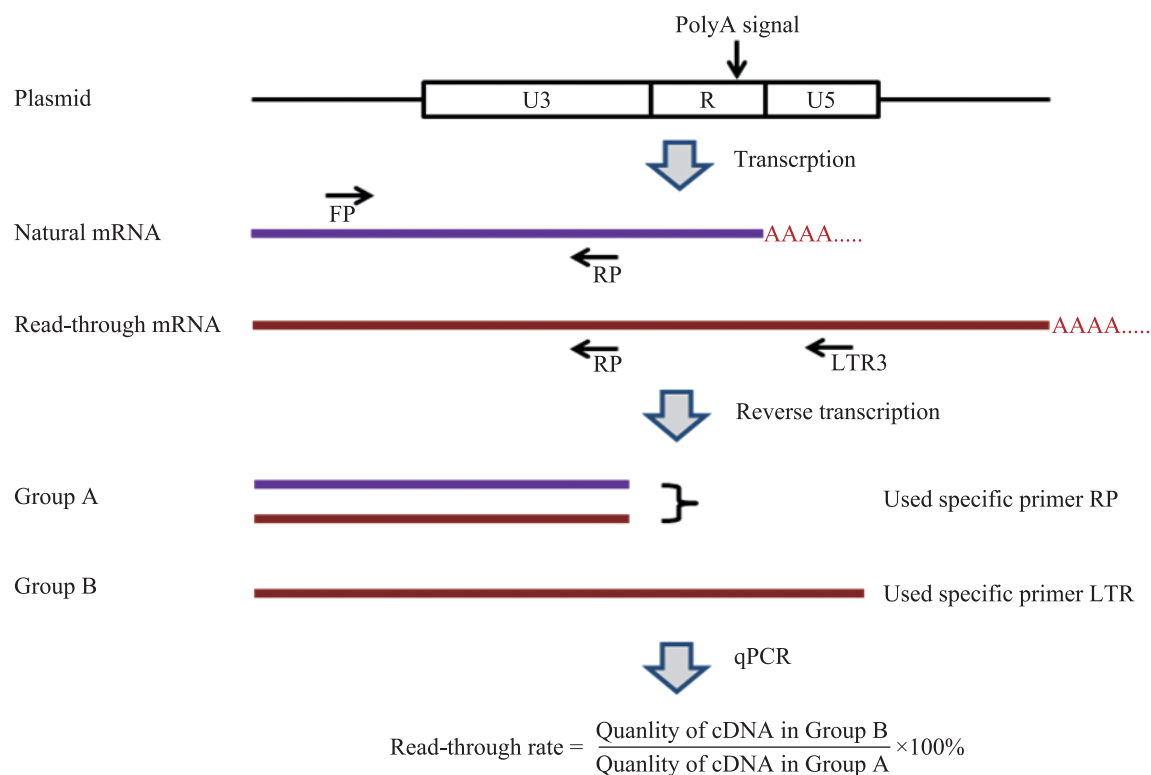


图3 基于 qRT-PCR 检测转录通读率的方法

Fig. 3 Flowchart of detecting Read-through rate by qRT-PCR.

表1 引物和探针序列

Table 1 List of primers and probes

Primer	Primer sequence (5'-3')
wLTR- <i>Xho</i> I -F	GCAGTATCTCGAGACCTAGA
wLTR- <i>Apa</i> I -R	CCTGGGCCCTGCTAGAGATT
LTR3	GAGAGCTCCCAGGCTCAGATC
FP	TTTAAGACCAATGACTTACAAGGCA
RP	TTGTCTTCGTTGGGAGTGAATTAG
MGB-probe	CTGTAGATCTTAGCCACTTT-MGB

2 结果与分析

2.1 在 pEGFP-N1 报告基因载体系统中检测病毒元件 LTR 的转录通读率

HIV 载体的转录终止信号位于 3'LTR 的 R

上。为了研究 LTR 的转录终止能力，我们把野生型 HIV 的 LTR (wLTR) 和自灭活慢病毒载体的 LTR (Δ LTR) 分别插入到表达载体 pEGFP-N1 中的多克隆位点 (MCS) 上 (图 2A, B)，即位于

CMV 启动子和报告基因 EGFP 之间。EGFP 表达越强表明 LTR 的转录终止能力越弱,而转录通读水平越高。

2.1.1 qRT-PCR 检测转录通读率

带有两种类型 LTR 元件的表达载体 pEGFP-N1- Δ LTR 和 pEGFP-N1-wLTR 分别瞬时转染 293T 细胞。转染 48 h 后提取细胞的总 RNA,经 DNase I (RNase free) 处理去除残留的质粒 DNA 和基因组 DNA。通过 qRT-PCR 的方法检测 LTR 的转录通读率。结果显示 (图 4),自灭活慢病毒载体的 Δ LTR 转录通读率达到了 64%,而 HIV 病毒野生型 wLTR 的转录通读率较低,约为 36% ($n \geq 5$, $P < 0.01$)。

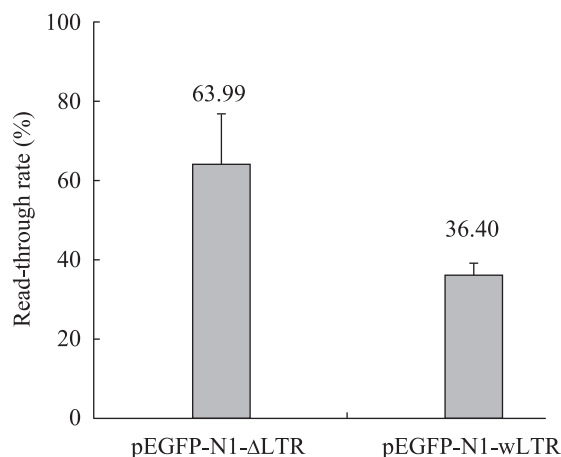


图 4 qRT-PCR 检测 pEGFP-N1-wLTR 和 pEGFP-N1- Δ LTR 的转录通读率

Fig. 4 Read-through rate of pEGFP-N1-wLTR and pEGFP-N1- Δ LTR detected by qRT-PCR.

2.1.2 通过检测 EGFP 的蛋白表达来验证转录通读的效率。

基于 qRT-PCR 检测转录通读的方法检测到的是通读率的绝对数值。为了验证该方法的准确

性,我们在蛋白水平检测了转录通读的相对水平。表达载体 pEGFP-N1- Δ LTR 和 pEGFP-N1-wLTR 分别瞬时转染 293T 细胞 (以转染 pEGFP-N1 的 293T 作为阴性对照)。转染 24 h 后在荧光显微镜下观察 EGFP 的表达水平。荧光图片显示 (图 5) 插入 Δ LTR 和 wLTR 以后 EGFP 阳性细胞数与阴性对照组相比均有显著的减少。这说明这两种 LTR 均有转录终止能力。但是,插入 wLTR 组比插入 Δ LTR 组的阳性细胞数要少的多,这说明 Δ LTR 比 wLTR 的转录通读率要高。上述细胞经胰酶消化,进行 FACS 检测。FACS 结果 (图 6) 与荧光镜检的结果相一致,插入 wLTR 组的平均荧光强度比插入 Δ LTR 组弱 55% 左右 ($n \geq 5$, $P < 0.01$)。也就是说 Δ LTR 的转录通读率高于 wLTR,这一结果与 qRT-PCR 的结果相一致。因此,荧光显微镜镜检结果和 FACS 结果均验证了我们建立的基于 qRT-PCR 检测转录通读率方法的准确性。

2.2 模拟病毒载体整合入染色质后的转录通读率检测

病毒载体颗粒感染细胞后,释放出 mRNA,经反转录形成两端带有两个相同 LTR 的双链 DNA,并且整合入染色体中。整合入染色体中的病毒 DNA 被称为原病毒。检测病毒载体整合入细胞基因组中的转录通读率比检测单个 LTR 的通读率更能反映其在染色体上的实际情况。由于慢病毒载体的随机整合特性,载体整合位点附近的染色体环境将极大地影响转录通读率。为了规避染色体环境因素的影响,我们用质粒来模拟病毒载体整合入基因组的序列,进行转录通读率的检测。

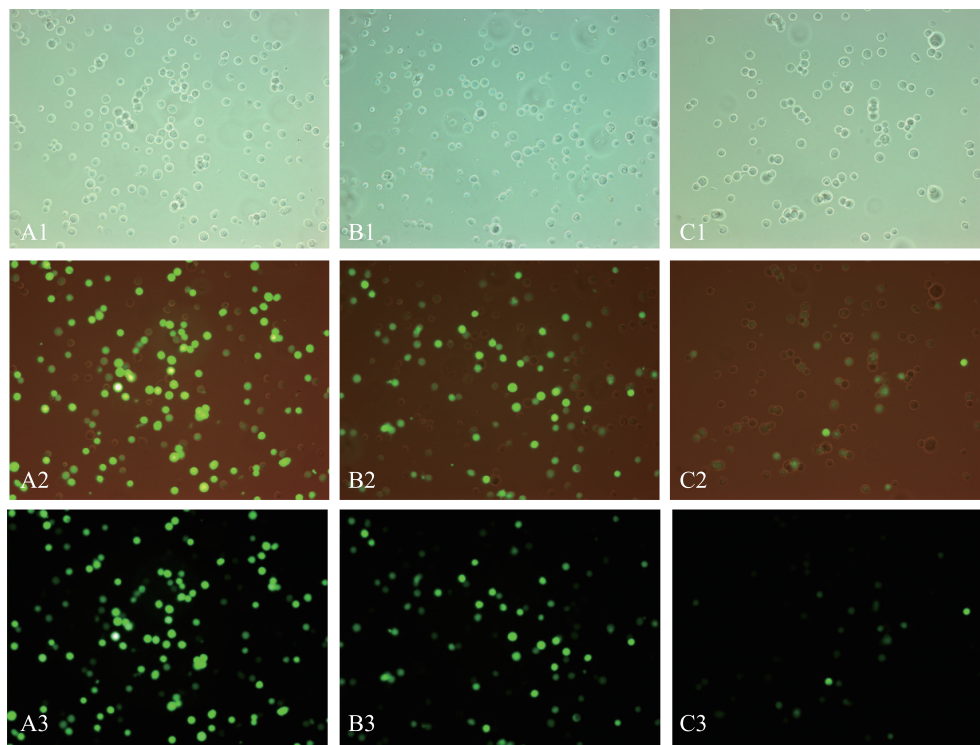


图5 pEGFP-N1、pEGFP-N1-wLTR 和 pEGFP-N1-ΔLTR 转染 293T 的荧光显微镜镜检图 (400×)

Fig. 5 Microscopic observation of 293T cells transfected with pEGFP-N1, pEGFP-N1-wLTR and pEGFP-N1-ΔLTR (400×). (A) 293T cells transfected with pEGFP-N1. (B) 293T cells transfected with pEGFP-N1-ΔLTR. (C) 293T cells transfected with pEGFP-N1-wLTR. A1, B1, C1: microscopic photos under the natural light; A2, B2, C2: microscopic photos under the natural light plus fluorescence; A3, B3, C3: microscopic photos under the fluorescence.

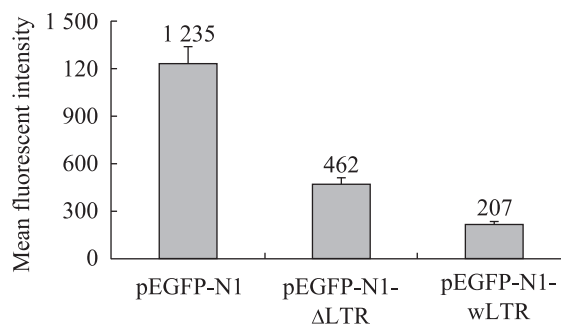


图6 pEGFP-N1、pEGFP-N1-wLTR 和 pEGFP-N1-ΔLTR 的平均荧光强度

Fig. 6 Mean fluorescent intensity of pEGFP-N1, pEGFP-N1-wLTR and pEGFP-N1-ΔLTR by FACS.

原病毒模拟载体 proFUGW-ΔLTR 和 proFUGW-wLTR (图 2C, D) 分别转染 293T 细胞。转染 48 h 后, 通过基于 qRT-PCR 的方法检测转录通读率。检测结果显示 (图 7), 自灭活慢病毒载体的转录通读率为 59% 左右, 而携带 wLTR 的慢病毒载体转录通读率约为 22% ($n \geq 9$, $P < 0.01$)。

3 讨论

慢病毒载体是研究者们对人类 1 型艾滋病 (Human immunodeficiency virus type 1,

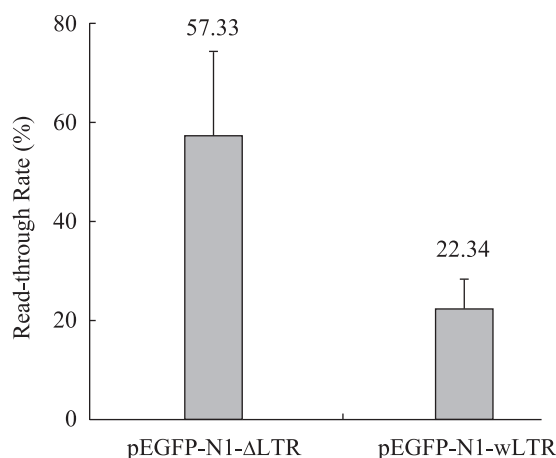


图7 qRT-PCR 检测 proFUGW-wLTR 和 proEGFP-N1-ΔLTR 的转录通读率

Fig. 7 Read-through rate of proFUGW-wLTR and proEGFP-N1-ΔLTR detected by qRT-PCR.

HIV-1) 进行拆分, 改造而形成的一种高效基因介导载体^[9-11]。

在 HIV-1 的 LTR (即 wLTR) 中已知的转录终止调控序列包括: 位于 R 区的多聚腺苷酸化信号 AAUAAA 元件, AAUAAA 上游 59~76 nt、77~94 nt、141~176 nt 间的 3 个 USEs^[12-14], 位于 U5 富含 GC 的 DSE^[15-16]和位于 R 和 U5 接界的 Poly (A) 位点^[17]。慢病毒载体自灭活改造时, 在删除 U3 启动子的同时删除了 3'端的转录终止的一系列上游序列^[18]。经删减后的 LTR (即 ΔLTR) 与 wLTR 相比其通读率有显著的提高^[1]。

而转录通读的危害在临床基因治疗中已有体现。在运用 γ-逆转录病毒进行临床基因治疗的过程中, 一些接受治疗的病人却相继得了白血病^[19-21]。

与 γ-逆转录病毒载体类似, 在使用自灭活慢病毒载体进行基因治疗的过程中, 同样存在着因转录通读而造成激活下游基因的风险。正因如此, 在用慢病毒载体治疗 β-地中海贫血的过程

中, 科学家们在 ΔU3 中插入了两个拷贝的鸡隔离子 (The chicken β-globin 5' DNase I hypersensitive site 4 insulator, CHS4) 以减少转录通读率^[22]。所以, 在改造载体前后, 需要有一种能够准确检测及评估通读率的方法。文中我们描述了用 qRT-PCR 确定其转录通读的实际值的方法。在此过程中, 我们使用了两套不同的特异性引物对慢病毒载体总转录本和通读转录本分别进行了反转录; 在此基础上, 采用了同一套定量引物和探针分别对它们进行定量, 从而避免了在扩增过程中两组 cDNA 的扩增效率的差异, 保证了检测结果的准确性。

Yang 等 2007 年报道了一种检测单一 LTR 转录通读率的较为复杂的方法, 他们使用了 LacZ 报告基因表达后染色来直观地显示通读率^[1]。他们在蛋白活性上的检测数据与我们在 mRNA 水平上模拟慢病毒载体在染色体上的情况相比尽管趋势相同, 但数值小了很多, 有可能是由于额外的翻译因素所造成的, 因此, 与他们的方法相比, 我们的方法有可能更加准确地体现了转录通读的实际情况。通过对 3'LTR 和 3'wLTR 分别在转录和翻译水平上的分析, 我们认为, 我们所建立的方法能够有效和真实地体现慢病毒载体的转录通读率, 为慢病毒载体改进工作提供了技术支持。

致谢: 衷心感谢曾溢滔院士和任兆瑞教授对本文的悉心指导。

REFERENCES

- [1] Yang Q, Lucas A, Son S, et al. Overlapping enhancer/promoter and transcriptional termination signals in the lentiviral long terminal repeat.

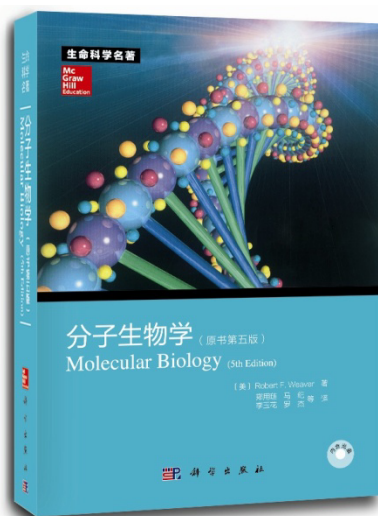
- Retrovirology, 2007, 4(4):1–8
- [2] Zaiss A, Son S, Chang L. RNA 3' readthrough of oncoretrovirus and lentivirus: implications for vector safety and efficacy. *J Virol*, 2002, 76(14): 7209–7219.
- [3] Ramezani A, Hawley TS, Hawley RG.. Combinatorial incorporation of enhancer blocking components of the chicken β -globin 5'HS4 and human T-cell receptor α/δ BEAD-1 insulators in self-inactivating retroviral vectors reduces their genotoxic potential. *Stem Cells*, 2008, 26(12): 3257–3266.
- [4] Chang L, Ding X, George S, et al. Genomic and functional assays demonstrate reduced gammaretroviral vector genotoxicity associated with use of the cHS4 chromatin insulator. *Mol Ther*, 2009, 17(4): 717–724.
- [5] Paritha I, Tomoyasu H, Fabrizio U, et al. Genotoxic potential of lineage-specific lentivirus vectors carrying the β -globin locus control region. *Mol Ther*, 2009, 17(11): 1929–1937.
- [6] Ramezani A, Hawley TS, Hawley RG. Reducing the genotoxic potential of retroviral vectors. *Methods Mol Biol*, 2008, 434: 183–203.
- [7] Hideki H, Motoko Y, Huifen Z, et al. Optimized lentiviral vector design improves titer and transgene expression of vectors containing the chicken β -globin locus HS4 insulator element. *Mol Ther*, 2009, 17(4): 667–674.
- [8] Ma H, Fang YD, Zhang JZ. A novel method for the determination of recombinant lentiviral titer and infectivity by qRT-PCR. *Life Sci Res*, 2009, 13(5): 394–398 (in Chinese).
马海燕, 方戡聃, 张敬之. 应用荧光实时定量 PCR 方法检测重组慢病毒滴度及感染率. *生命科学研究*, 2009, 13(5): 394–398.
- [9] Poznansky M, Lever A, Bergeron L, et al. Gene transfer into human lymphocytes by a defective human immunodeficiency virus type 1 vector. *J Virol*, 1991, 65(1): 532–536.
- [10] Naldini L, Blomer U, Gally P, et al. *In vivo* gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science*, 1996, 272(5259): 263–265.
- [11] Zufferey R, Nagy D, Mandel RJ, et al. Multiply attenuated lentiviral vector achieves efficient gene delivery *in vivo*. *Nat Biotechnol*, 1997, 15(9): 871–875.
- [12] Valsamakis A, Zeichner S, Carswell S, et al. The human immunodeficiency virus type 1 polyadenylation signal: A 3' long terminal repeat element upstream of the AAUAAA necessary for efficient polyadenylation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, 88(6): 2108–2112.
- [13] Gregory M, Elizabeth S, Joyce O, et al. Activation of HIV-1 pre-mRNA 3' processing *in vitro* requires both an upstream element and TAR. *EMBO J*, 1992, 11(12): 4419–4428.
- [14] Valsamakis A, Schek N, Alwine JC, et al. Elements upstream of the AAUAAA within the human immunodeficiency virus polyadenylation signal are required for efficient polyadenylation *in vitro*. *Mol Cell Boil*, 1992, 12(9): 3699–3705.
- [15] Böhnlein S, Hauber J, Cullen BR. Identification of a U5-specific sequence required for efficient polyadenylation within the human immunodeficiency virus long terminal repeat. *J Virol*, 1989, 63(1): 421–424.
- [16] Brown PH, Tiley LS, Cullen BR, et al. Effect of RNA secondary structure on polyadenylation site selection. *Genes Dev*, 1991, 5(7): 1277–1284.
- [17] Dezazzo JD, Kilpatrick JE, Imperiale MJ, et al. Involvement of long terminal repeat U3 sequences overlapping the transcription control region in human immunodeficiency virus type 1 mRNA 3' end formation. *Mol Cell Boil*, 1991, 11(3): 1624–1630.
- [18] Zufferey R, Dull T, Ronald J, et al.

- Self-inactivating lentivirus vector for safe and efficient *in vivo* gene delivery. J Virol, 1998, 72(12): 9873–9880.
- [19] Hacein-Bey-Abina S, Von Kalle C, Schmidt M, et al. LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1. Science, 2003, 302(17): 415–419.
- [20] Hacein-Bey-Abina S, Garrigue A, Wang GP, et al. Insertional oncogenesis in 4 patients after retrovirus-mediated gene therapy of SCID-X1. J Clin Invest, 2008, 118(9): 3132–3142.
- [21] Hacein-Bey-Abina S, Hauer J, Lim A, et al. Efficacy of gene therapy for X-linked severe combined immunodeficiency. N Engl J Med, 2010, 363(4): 355–364.
- [22] Ramezani A, Hawley TS, Hawley RG. Performance and safety-enhanced lentiviral vectors containing the human interferon- β scaffold attachment region and the chicken-globin insulator. Blood, 2003, 101(12): 4717–4724.

(本文责编 陈宏宇)

科学出版社科学出版中心生命科学分社新书推介

分子生物学（第五版）



作者：(美) Robert F. Weaver 著

ISBN: 9787030368539

定价：160

开本：16 装帧：平装 页码：944

初版时间：3/1/2013

专业分类：01Q-3075-0101

读者对象：《分子生物学（第五版）》中理论讲述逻辑严密，实验过程提炼清晰，特色鲜明、内容详尽，图文并茂，易读易记，是一本生命科学相关专业的研究生，以及从事该方面科研、教学工作的人员不可多得优秀参考书。

内容介绍

分子生物学是生命科学发展过程中诞生的一门实验性极强的新兴学科。美国著名分子生物学家 Robert F. Weaver 遵循这一学科发展的特点，于 1999 年出版了 Molecular Biology 一书。《分子生物学（第五版）》以原始研究论文为基础，通过对实验的设计、对结果的分析而逐步展开对分子生物学理论的讲述，文字通俗流畅，叙述由浅入深。随着学科的迅速发展，几经修订再版的《分子生物学》第五版共有导论，分子生物学方法，原核生物的转录，真核生物的转录，转录后加工，翻译，DNA 复制、重组和转座，以及基因组等 8 个部分共 25 章的内容，书后还附有术语表。每一章节都以提出科学问题、展开研究过程开始，以提供思考习题、推荐阅读文献结束。