

重组人白细胞介素 21 在毕赤酵母中的分泌表达及活性分析

李栋¹, 俞慧清^{2,3}, 火蓉芬³, 陈建泉³, 成国祥^{1,2,3}

1 同济大学生命科学与技术学院, 上海 200092

2 上海交通大学医学院附属瑞金医院, 上海 200025

3 上海转基因研究中心, 上海 201210

摘要: 为了获得有活性的重组人白细胞介素 21(rhIL-21), 本研究建立了在毕赤酵母 (*Pichia pastoris*) 中分泌表达 rhIL-21 的技术。首先, 通过 RT-PCR 从人外周血淋巴细胞中扩增 IL-21cDNA, 克隆到酵母表达载体 pPIC9K 中, 构建了重组酵母表达载体 pPIC9K-hIL21cDNA; 然后, 线性化的载体转化毕赤酵母表达菌株 GS115, 经抗性梯度筛选获得了多拷贝重组酵母菌; 加入甲醇诱导培养后, SDS-PAGE 和 Western blotting 检测到培养液中有 rhIL-21 的分泌表达, 相对分子量约为 16 kD, ELISA 结果显示摇瓶表达量可达 229.28 mg/L; 表达上清经阳离子交换介质 SP Sepharose Fast Flow 纯化后, 目的蛋白纯度达到 95%。细胞增殖试验结果显示该 rhIL-21 联合刀豆蛋白 A(Con A)对人淋巴细胞的增殖具有显著的促进作用。本研究首次成功在毕赤酵母表达系统中分泌表达了有生物活性的 rhIL-21, 为相关疾病免疫治疗的研究奠定了基础。

关键词: 白细胞介素 21, 毕赤酵母, 分泌表达

Expression and analysis of the recombinant human interleukin-21 (rhIL-21) in *Pichia pastoris*

Dong Li¹, Huiqing Yu^{2,3}, Rongfen Huo³, Jianquan Chen³, and Guoxiang Cheng^{1,2,3}

1 School of Life Science and Technology, Tongji University, Shanghai 200092, China

2 Rui Jin Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200025, China

3 Shanghai Transgenic Research Center, Shanghai 201210, China

Abstract: Interleukin-21 is a type I cytokine mainly produced by activated CD4⁺ T cells that acts as a regulator of immune system. In this work, hIL-21cDNA was amplified from human peripheral blood lymphocytes by RT-PCR, and then inserted into pPIC9K. The recombinant vector pPIC9K-hIL21cDNA was linearized by *Sac* I, and transformed into *Pichia pastoris* strain GS115 by electroporation. Transformants were selected by G418 and confirmed by PCR. The recombinant protein was expressed and secreted into the supernatant after inducing by methanol. SDS-PAGE analysis indicated the molecular weight of rhIL-21 was about 16 kD. ELISA results show that the yield of rhIL-21 reach 229.28 mg/L, rhIL-21 was purified from culture supernatants, and it was purified to about 95% purity with ion-exchange chromatography. When co-stimulate with Con A, rhIL-21 can promote the proliferation of

Received: July 27, 2009; **Accepted:** September 22, 2009

Supported by: National High Technology Research and Development Program of China (863 Program) (No. 2007AA100502).

Corresponding author: Guoxiang Cheng. Tel: +86-21-51380608; E-mail: chenggx@cngenon.com

国家高技术研究发展计划(863 计划)(No. 2007AA100502)资助。

human lymphocytes. This is the first expression of bio-active rhIL-21 in *Pichia pastoris*. It lays a foundation for further research in immunotherapy and cancer therapy.

Keywords: Interleukin-21, *Pichia pastoris*, secreted expression

白细胞介素 21(Interleukin-21, IL-21)是 Parrish Novak 等在 2000 年发现的 类细胞因子^[1], 主要由活化的 CD4⁺ T 细胞产生, 与 IL-2、IL-4、IL-15 有较高的同源性, 属于 γc 家族成员, 具有广泛的免疫调节功能, 是免疫调控网络中的重要细胞因子。IL-21 能特异地结合白细胞介素 21 受体(IL-21R), 激活 JAK/STAT 等信号传递途径, 表现出复杂的生物学效应, 它可以调控 B 细胞的分化、凋亡及产生抗体的亚类, 促进 T 细胞介导的获得性免疫, 增强 NK 细胞的细胞毒性及产生 IFN- γ 的能力, 介导主动免疫与被动免疫之间的转换。IL-21 在过敏反应^[2]、炎症反应^[3]、自身免疫反应^[4]、肿瘤治疗^[5]以及控制慢性病毒感染^[6-7]中发挥重要作用。近年来的研究显示, 人白细胞介素 21(hIL-21)可有效用于乳腺癌、肾细胞癌和结肠癌的治疗^[8]。

hIL-21 作为一种新的有效药物引起了生物医药界的兴趣, Chan 等^[9]最早利用大肠杆菌表达系统获得了重组人白细胞介素 21(rhIL-21), 但原核表达的 rhIL-21 存在一个共同的缺点: 表达产物以包涵体形式存在, 为了得到有活性的蛋白, 就需要进行变性溶解及复性等繁琐操作。作为一种真核来源的蛋白, 真核表达系统可更好地表达出有活性的 hIL-21。毕赤酵母是一种可以在以甲醇为唯一碳源和能源的培养基中生长的酵母菌, 具有翻译后修饰功能, 如信号肽加工、蛋白质折叠、二硫键形成和糖基化作用等, 其糖基化位点与其他哺乳动物细胞相同, 生成的糖链较短, 一般只有 8~14 个甘露糖残基, 抗原性较低, 特别适合于表达医用蛋白^[10]。基于此, 本研究尝试利用毕赤酵母真核表达系统来进行 hIL-21 的表达, 通过载体构建、转化、诱导表达等条件的摸索, 获得了分泌表达 rhIL-21 的重组酵母菌, SDS-PAGE 及 Western blotting 检测到 rhIL-21 的相对分子量为 16 kD, ELISA 检测结果显示, 摇瓶诱导时 rhIL-21 的表达量可达 229.28 mg/L, 略高于目前大肠杆菌表达的最高水平^[11], 本研究中分泌表达的目的蛋白占总

蛋白的 50%左右, 表达上清经阳离子交换介质 SP Sepharose Fast Flow 纯化后, 目的蛋白纯度达到 95%。初步的活性检测显示: rhIL-21 联合刀豆蛋白 A(Con A)能促进人淋巴细胞的增殖。本研究为大规模发酵生产 rhIL-21 以及进一步进行 rhIL-21 相关的抗病毒、抗肿瘤研究奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 材料

大肠杆菌 DH5 α 、毕赤酵母 GS115、质粒 pPIC9K 为本实验室保存。Taq DNA 聚合酶、限制性内切酶、修饰酶及 T4 DNA 连接酶、RT-PCR 试剂盒购自 TaKaRa 公司, 预染蛋白 Marker 购自 Fermentas 公司, 酵母氮源无氨基酸培养基(YNB)购自 Difco 公司, 酵母提取物和蛋白胨购自 Oxoid 公司, 淋巴细胞分离液购自天津灏洋生物制品科技有限公司, RNA 提取试剂盒购自 Qiagen 公司, Con A、植物凝集素(PHA)、佛波醇酯(PMA)均购自 Sigma 公司, ELISA 分析试剂盒购自上海麦约尔生物技术有限公司, 层析介质 SP Sepharose Fast Flow 购自 Amersham Biosciences 公司, CCK-8 细胞增殖试剂购自日本同仁化学研究所, 其余常规试剂均为进口分装或国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 pPIC9K-IL21cDNA 重组载体的构建

从健康人体外周静脉血分离得到淋巴细胞, 加入 PHA 于 37°C 培养 48 h, 提取细胞总 RNA 并反转录成 cDNA, 分析 GenBank 公布的 hIL-21cDNA 序列(Accession No. AF254069), 该序列在毕赤酵母中表达的 CAI 值为 0.74, 具有编码高水平表达蛋白的潜能, 因此, 将该序列直接用于下一步克隆。设计引物扩增去除内源性信号肽的 hIL21 阅读框, 分别在上下游引物中引入 *Mun* I 及 *Not* I 酶切位点, 引物序列如下:

IL21F: 5'-GCTCAATTGCAAGATCGCCACAT GATTAG-3'; IL21R: 5'-AATGCGGCCGCTCAGGAA TCTTCACTCCGT-3'。PCR 反应条件为: 94°C

5 min; 94°C 30 s, 62°C 30 s, 72°C 30 s, 30 个循环; 72°C 10 min, 扩增产物经 *Mun*I、*Not*I 双酶切后与经 *Eco*R I、*Not*I 双酶切的表达载体 pPIC9K 相连, 转化后挑取重组克隆进行鉴定, 并送测序。

1.2.2 重组质粒的转化及多拷贝转化菌的筛选

用 *Sac*I 酶切表达载体 pPIC9K-IL21cDNA、空载体 pPIC9K, 回收 5~10 μ g 线性化的质粒, 于 1500 V、25 μ F 和 200 Ω 条件下电击毕赤酵母感受态细胞 GS115 之后, 立即向电转杯中加入 1 mL 1 mol/L 预冷山梨醇, 30°C 温育 1 h, 涂布于含 0.5 mg/mL G418 的 YPD 平板上, 30°C 恒温培养。

将长出的克隆依次接种至含 1、2、3、4 mg/mL G418 的 YPD 平板上, 静置培养, 筛选多拷贝菌株。

1.2.3 重组酵母的 PCR 鉴定

利用煮-冻-煮方法^[12]提取重组有 pPIC9K-IL21cDNA、pPIC9K 的重组酵母基因组 DNA 及 GS115 菌基因组 DNA, 分别用 AOX1 引物及 α -factor、hIL21 两对引物检测外源基因的整合情况, 引物序列如下:

AOX1F: 5'-GACTGGTTCCAATTGACAAGC-3'; AOX1R: 5'-GCAAATGGCATTCTGACATCC-3'; α -factorF: 5'-CAGCATCCTCCGCATTAG-3'; hIL21R: 5'-GAAGGGCATGTTAGTCTGTG-3'。PCR 扩增条件: 94°C 5 min; 94°C 30 s, 58°C 30 s, 72°C 1 min, 30 个循环; 72°C 10 min。扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.2.4 阳性酵母重组克隆的活化和甲醇诱导表达

从含 4.0 mg/mL G418 的 YPD 平板上挑取多拷贝转化菌单菌落接种至新鲜的 10 mL BMGY 培养基中, 28°C~30°C、250 r/min 条件下振荡培养至菌液 OD_{600} 为 2~6 时, 离心去上清, 替换为 BMMY 培养基继续培养, 每 24 h 补加甲醇至终浓度 0.5%, 连续诱导 72 h 后, 收集菌液, 将上清和沉淀分别置于 -80°C 冻存。

1.2.5 表达产物的 SDS-PAGE 及 Western blotting 检测

取经三氯乙酸(TCA)浓缩过的表达酵母上清 10 μ L 与等量的 SDS-PAGE 上样缓冲液混合, 沸水浴 5 min 后, 加样至聚丙烯酰胺凝胶中, 80 V 电泳

120 min, 取出用于染色分析。

同样, 取适量诱导产物电泳后, 采用半干法将样品转移至 PVDF 膜上, 将膜放入含 5% 脱脂奶粉的溶液中, 37°C 封闭 1 h, 加入 1:500 稀释的羊抗人 IL-21 多抗, 37°C 孵育 2 h, 加入 HRP 标记的兔抗羊二抗, 37°C 孵育 2 h, 洗去未结合抗体, 加入 DAB 显色。

1.2.6 诱导表达时间的优化及表达量测定

挑取表达阳性菌株中的 6 号克隆接种于 100 mL BMGY 培养基中, 28°C~30°C、250 r/min 条件下振荡培养至菌液 OD_{600} 为 2~6 时, 离心去上清, 替换为 BMMY 培养基继续培养, 每 24 h 补加甲醇至终浓度 0.5%, 分别于 0、1、2、3、4、5、6、7 d 固定时间取样进行 SDS-PAGE 及 ELISA 定量(参照试剂盒说明书进行)。

1.2.7 表达蛋白的分离纯化

表达上清液用 17.5 mmol/L NaAc 稀释 2 倍后, 利用快速蛋白液相色谱系统(Δ KTA FPLC), 使用阳离子交换介质 SP Sepharose Fast Flow 对蛋白进行纯化。介质用含 25 mmol/L NaAc、100 mmol/L NaCl (pH 5.0) 的缓冲液 A 平衡, 上样后用含 25 mmol/L NaAc、1 mol/L NaCl (pH 5.0) 的缓冲液 B 与缓冲液 A 混合洗脱, 缓冲液 B 的比例由 0 逐步升至 100%, 收集各组分, SDS-PAGE 检测。

1.2.8 CCK-8 法初步检测 hIL-21 对人淋巴细胞增殖的影响

取健康人体外周静脉血, 按淋巴细胞分离液提供操作说明分离得淋巴细胞, 计数后调整细胞密度至 5×10^5 /mL, 按每孔 100 μ L 的量接种于 96 孔板中培养。

细胞增殖试验设 3 组, 一组加入浓度分别为 25、50、100 ng/mL 的 rhIL-21, 另一组分别加入浓度为 50 ng/mL 的 hIL-21 及 5、10、20 μ g/mL 的 Con A, 同时设阴性对照组(只加细胞和培养液), 空白调零组(仅加培养液), 每组 3 个复孔。将淋巴细胞置于二氧化碳培养箱中培养 72 h 后, 加入 CCK-8 20 μ L, 孵育 4 h, 用酶标仪测定各孔 OD 值, 检验波长 490 nm, 参比波长 600 nm。

2 结果与分析

2.1 重组酵母表达载体的构建

将获得的重组克隆进行 *Sac* I 和 *Not* I 双酶切鉴定, 重组克隆酶切后可产生 8.3 kb、1.5 kb 两条带, 而 pPIC9K 阴性对照酶切后只产生 8.3 kb、1.0 kb 两条带, 结果见图 1。将酶切鉴定正确的表达载体送测序, 结果与预期相符, 重组载体中的 hIL-21cDNA 与表达载体 pPIC9K 拼接完整, hIL-21cDNA 位于酵母表达载体 pPIC9K α -factor 信号肽序列的下游, 无碱基突变与移码, 表达载体命名为 pPIC9K-IL21cDNA。

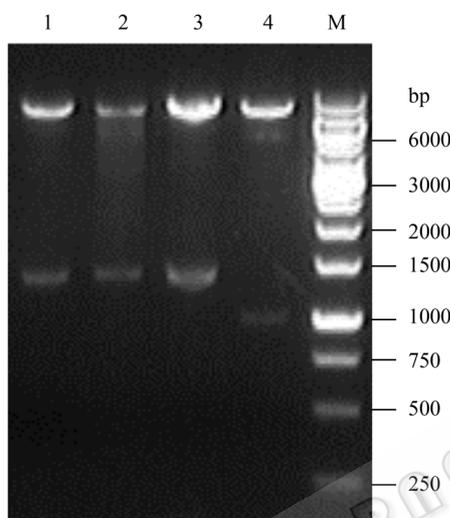


图 1 重组表达质粒双酶切鉴定结果

Fig. 1 Identification of recombinant expression vector by *Sac* I and *Not* I digestion. 1-3: recombinant clones digested with *Sac* I and *Not* I; 4: pPIC9K digested with *Sac* I and *Not* I; M: DNA marker.

2.2 重组酵母菌的鉴定

转化阳性菌落经 G418 梯度筛选后, 获得的多拷贝阳性菌株的检测结果见图 2。从图 2 可以看出, 用 AOX1 引物检测时, 转化 pPIC9K-IL21cDNA 的酵母菌(GS115/pPIC9K-IL21cDNA)可扩增出 883 bp 的片段, 转化空载体 pPIC9K 的酵母(GS115/pPIC9K)扩增出 493 bp 的片段, GS115 菌未扩增出目的条带, 与预期相符。用 α -factor、hIL21 引物检测时, GS115/pPIC9K-IL21cDNA 可扩增出 521 bp 的片段, 而 GS115/pPIC9K、GS115 对照则未扩增出目的条带, 与预期相符。PCR 检测结果说明 pPIC9K-IL21cDNA 成功重组进入了 GS115 菌基因组中。

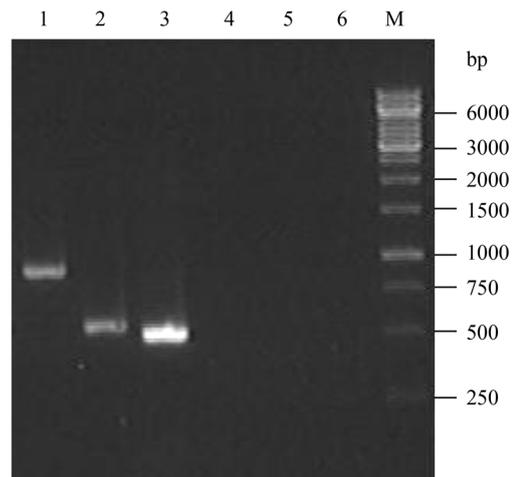


图 2 酵母重组子的 PCR 鉴定

Fig. 2 Identification of GS115 recombinants by PCR. Fragments amplified by primer (AOX1F, AOX1R); 1: GS115/pPIC9K-IL21cDNA; 2: GS115/pPIC9K-IL21cDNA; 3: GS115/pPIC9K; 4: GS115/pPIC9K; 5: GS115. Fragments amplified by primer(α -factorF, hIL21R); 6: GS115; M: DNA marker.

2.3 诱导表达产物的 SDS-PAGE 和 Western blotting 分析

重组酵母菌株经甲醇诱导 72 h 后, 取部分上清 TCA 浓缩后 SDS-PAGE 检测, 可见在 16 kD 处有明显的外源蛋白条带, 见图 3A, 与理论值相符。通过 BANDLEAD 凝胶扫描软件分析, 结果显示 6 号菌株目的蛋白的表达量相对其他菌株稍高。图 3B 为重组酵母诱导产物的 Western blotting 检测结果, 可见目的蛋白与 hIL-21 有相似的抗原性, 可特异地与 hIL-21 多抗结合, 说明获得的蛋白为 rhIL-21, 转化 pPIC9K-IL21cDNA 的酵母菌特异地表达了 rhIL-21。

2.4 最佳诱导表达时间的确定及表达蛋白的分离纯化

6 号重组酵母菌按终浓度 0.5% 加入甲醇诱导培养, 7 d 内的 SDS-PAGE 结果见图 4A, 结果显示未加甲醇诱导时 rhIL-21 不表达, 加入甲醇诱导前 2 天 rhIL-21 表达量较低, 之后随着诱导时间的延长, rhIL-21 在上清中的含量呈上升趋势。ELISA 检测结果显示第 6 天表达量最高, rhIL-21 含量为 229.28 mg/L, 第 7 天略有下降, 分析可能是表达产物的增加产生了负反馈抑制作用。

使用阳离子交换介质 SP Sepharose Fast Flow 对

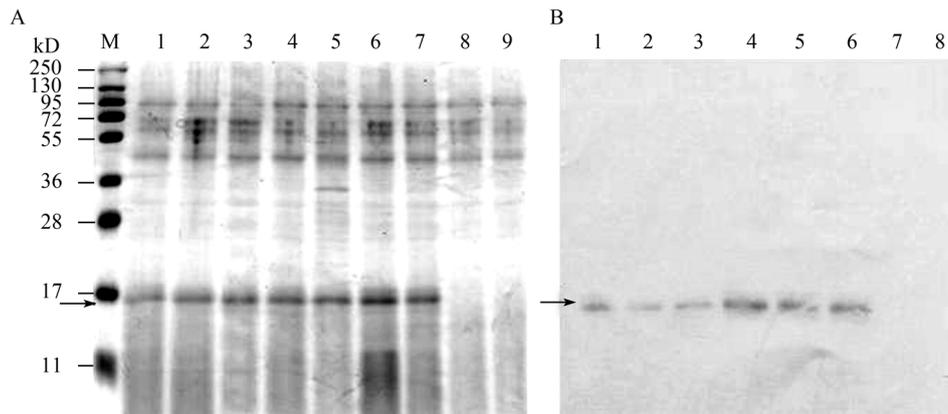


图 3 GS115/pPIC9K-IL21cDNA 酵母培养上清液的 SDS-PAGE (A)和 Western blotting (B)分析

Fig. 3 SDS-PAGE (A) and Western blotting (B) analysis of culture supernatant of GS115/pPIC9K-IL21cDNA. (A) M: protein markers; 1-7: culture supernatant sample from GS115/pPIC9K-IL21cDNA; 8: culture supernatant sample from GS115/pPIC9K; 9: culture supernatant sample from GS115. (B) 1-6: culture supernatant sample from GS115/pPIC9K-IL21cDNA; 7: culture supernatant sample from GS115/pPIC9K; 8: culture supernatant sample from GS115.

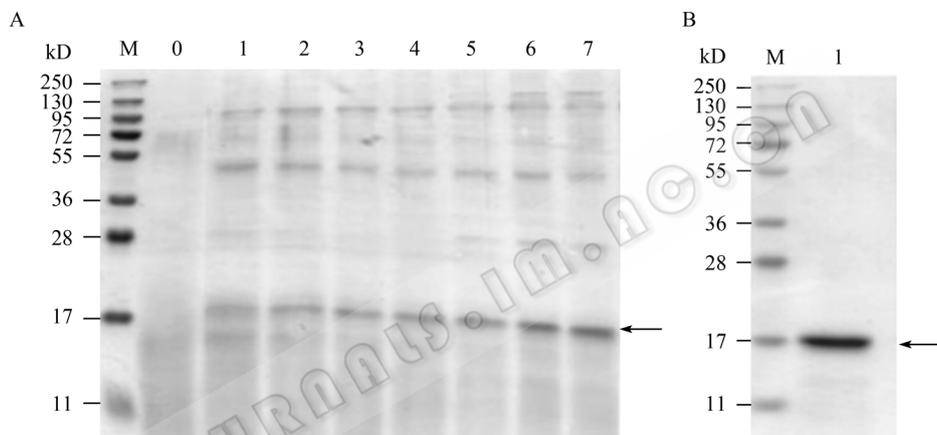


图 4 SDS-PAGE 分析 6 号酵母菌不同时间蛋白表达情况(A)及目的蛋白的纯化(B)

Fig. 4 SDS-PAGE analysis the expression of rhIL-21 in different time after induction with methonal (A) and purification through ion-exchange chromatography (B). (A) 0-7: results of strain No.6 after 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 d induction respectively. (B) 1: purified rhIL-21 through ion-exchange chromatography; M: molecular weight markers.

蛋白进行纯化, SDS-PAGE 检测各峰, 结果表明 rhIL-21 可被 100%缓冲液 B 洗脱下来, 凝胶扫描分析显示, 洗脱液中 rhIL-21 的含量达到 95%, 见图 4B, 使用 5 kD 超滤管超滤浓缩后, BCA Protein Assay Kit 测定蛋白含量, -20°C 保存。

2.5 CCK-8 法测定 rhIL-21 对人淋巴细胞增殖的影响

使用 CCK-8 法测定 rhIL-21 及 Con A 对人淋巴细胞的增殖效果(图 5), 结果显示 rhIL-21 单因子作用浓度为 50 ng/mL 促进人淋巴细胞增殖效果较好, 50 ng/mL rhIL-21 联合 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Con A 促进人淋巴细胞增殖效果显著, 说明表达的 rhIL-21 能够促进人

淋巴细胞的增殖, 具有一定的生物活性。

3 讨论

自 2000 年 IL-21 被发现以来, 随着对 IL-21 的研究日益深入, 其功能也越来越清晰。IL-21 作为免疫调控网络中重要的细胞因子, 对免疫细胞具有调节作用, 通过共刺激, IL-21 可以促进 B 细胞的增殖与分化或者凋亡; 可以增强抗 CD3 抗体激活的 CD8^+ T 细胞的增殖; 抑制活化后的 CD8^+ T 细胞的自发死亡现象, 并对细胞毒性 T 淋巴细胞(CTL)的分化起重要作用^[13]; IL-21 可以促进 NK 细胞的分化和成熟, 与 IL-2、IL-15 协同增强 NK 细胞表达穿孔素和 INF-

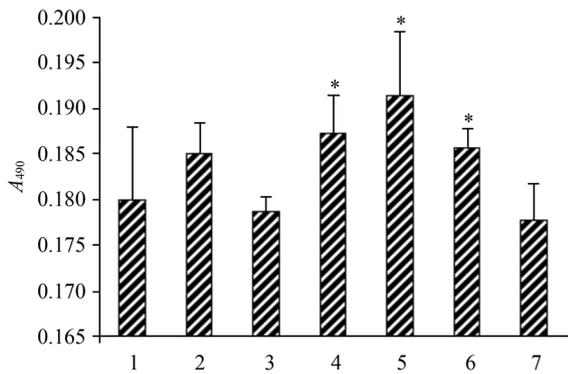


图5 rhIL-21 对人淋巴细胞的增殖效果

Fig. 5 Effect of rhIL-21 on the proliferative of human lymphocytes. 1: 100 ng/mL rhIL-21; 2: 50 ng/mL rhIL-21; 3: 25 ng/mL rhIL-21; 4: 50 ng/mL rhIL-21 + 20 μg/mL Con A; 5: 50 ng/mL rhIL-21 + 10 μg/mL Con A; 6: 50 ng/mL rhIL-21 + 5 μg/mL Con A; 7: human lymphocytes only. Values plotted represent the mean value (± SD). * $P < 0.05$.

^[14]; IL-21 可增强机体的抗肿瘤能力, 其抗肿瘤作用是借助它在免疫调控网络中的机制而实现的。目前, IL-21 对肾细胞癌、黑色素瘤的研究已进入了 期临床, IL-21 联合其他细胞因子、抗肿瘤药物、单抗等用于肿瘤的治疗研究效果显著^[15]。最新的研究表明, IL-21 及其受体在控制淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒 (LCMV) 等慢性病毒感染中起着关键性作用^[6-7,16]。

CAI 值是同义密码子偏好的一个统计量度, 可以用于预测蛋白质表达的水平, 编码高水平表达蛋白的基因常常具有高的 CAI 值(>0.6)^[17], 经分析, hIL-21cDNA 在毕赤酵母表达系统中表达的 CAI 值为 0.74, 具有编码高水平表达蛋白的潜能, 且目的基因中不含有编码 Pro-Glu-Ser-Thr 这一激活蛋白水解酶的作用底物的序列, 也不含有编码易受溶酶体切割的 X-Phe-X-Arg-Gln、Gln-Arg-X-Phe-X(X=任意氨基酸)的序列。因此, 本研究直接将 hIL-21cDNA 插入到分泌型酵母表达载体 pPIC9K 中, 重组酵母菌成功表达了有生物活性的 rhIL-21。SDS-PAGE 及 Western blotting 结果显示, 其相对分子量为 16 kD 左右, 与预期相符, 无二聚体结构。将 rhIL-21 用 N-糖基酶进行酶切后, 分子量无明显变化, 说明毕赤酵母表达的 rhIL-21 没有复杂的 N-糖基化修饰现象。通过对一周内连续诱导表达蛋白量的监控发现, 随着诱导时间的延长, rhIL-21 在酵母上清中的含量呈

上升趋势, 显示该蛋白稳定性较好。本研究中 rhIL-21 摇瓶表达量达到 229.28 mg/L, 略高于目前大肠杆菌表达的最高水平, 若使用发酵罐表达, 预期目的蛋白的表达量将会进一步提高^[18]。

在 rhIL-21 的大肠杆菌表达体系中, 目的蛋白占蛋白总量的最高比例为 20%^[9], 而本研究中 rhIL-21 的含量占酵母分泌蛋白总量的 50%左右, 优于大肠杆菌表达体系, 酵母菌自身分泌的蛋白少, 培养基的成分简单, 给下游纯化带来了极大的方便。为了使 rhIL-21 更接近于天然 hIL-21, 本研究未在表达载体中加入 C-myc 表位和 His 标签, 采用阳离子交换介质 SP Sepharose Fast Flow 纯化目的蛋白, rhIL-21 的纯度达到 95%, 克服了 rhIL-21 在大肠杆菌中表达要裂解菌体并需进行变性、复性等繁琐操作的缺点, 降低了生产成本。将纯化后的产物进行淋巴细胞增殖试验, 发现 rhIL-21 联合 Con A 可有效促进人淋巴细胞增殖, 具有类似天然 hIL-21 的生物学活性。本研究首次成功地在毕赤酵母表达系统中分泌表达了有生物活性的 rhIL-21, 为进一步研究 rhIL-21 的生物学功能, 用于动物实验以及抗肿瘤、抗病毒感染等研究奠定了基础。

REFERENCES

- [1] Parrish-Novak J, Foster DC, Holly RD, *et al.* Interleukin-21 and the IL-21 receptor: novel effectors of NK and T cell responses. *J Leukoc Biol*, 2002, **72**(5): 856–863.
- [2] Leung DY, Sampson HA, Yunginger JW, *et al.* Effect of anti-IgE therapy in patients with peanut allergy. *N Engl J Med*, 2003, **348**(11): 986–993.
- [3] Monteleone G, Pallone F, MacDonald TT. Interleukin-21: a critical regulator of the balance between effector and regulatory T-cell responses. *Trends Immunol*, 2008, **29**(6): 290–294.
- [4] King C, Ilic A, Koelsch K, Sarvetnick N. Homeostatic expansion of T cells during immune insufficiency generates autoimmunity. *Cell*, 2004, **117**(2): 265–277.
- [5] Davis ID, Skrmsager BK, Cebon J, *et al.* An open-label, two-arm, phase I trial of recombinant human interleukin-21 in patients with metastatic melanoma. *Clin Cancer Res*, 2007, **13**(12): 3630–3636.
- [6] Elsaesser H, Sauer K, Brooks DG. IL-21 is required to control chronic viral infection. *Science*, 2009, **324**(5934):

- 1569–1572.
- [7] Yi JS, Du M, Zajac AJ. A vital role for interleukin-21 in the control of a chronic viral infection. *Science*, 2009, **324**(5934): 1572–1576.
- [8] Smyth MJ, Teng MW, Sharkey J, *et al.* Interleukin 21 enhances antibody-mediated tumor rejection. *Cancer Res*, 2008, **68**(8): 3019–3025.
- [9] Chan C, Zamost BL, Covert DC, *et al.* IL-21 production in prokaryotic hosts: US, 7250274. 2007-07-31.
- [10] Macauley-Patrick S, Fazenda ML, McNeil B, *et al.* Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system. *Yeast*, 2005, **22**(4): 249–270.
- [11] Asano R, Kudo T, Makabe K, *et al.* Antitumor activity of interleukin-21 prepared by novel refolding procedure from inclusion bodies expressed in *Escherichia coli*. *FEBS Lett*, 2002, **528**(1-3): 70–76.
- [12] Ju H, Liang DC, Guo G, *et al.* Comparison of four methods to prepare *Pichia* genomic DNA for PCR. *Tianjin Med*, 2003, **31**(5): 270–272.
 尉海, 梁东春, 郭刚, 等. 用于 PCR 实验的毕赤酵母基因组 DNA 制备方法的比较. *天津医药*, 2003, **31**(5): 270–272.
- [13] Ozaki K, Spolski R, Feng CG, *et al.* A critical role for IL-21 in regulating immunoglobulin production. *Science*, 2002, **298**(5598): 1630–1634.
- [14] Wang G, Tschöi M, Spolski R, *et al.* *In vivo* antitumor activity of interleukin 21 mediated by natural killer cells. *Cancer Res*, 2003, **63**(24): 9016–9022.
- [15] Skak K, Kragh M, Hausman D, *et al.* Interleukin 21: combination strategies for cancer therapy. *Nat Rev Drug Discov*, 2008, **7**(3): 231–240.
- [16] Fröhlich A, Kisielow J, Schmitz I, *et al.* IL-21R on T cells is critical for sustained functionality and control of chronic viral infection. *Science*, 2009, **324**(5934): 1576–1580.
- [17] Sharp PM, Li WH. The codon Adaptation index—a measure of directional synonymous codon usage bias, and its potential applications. *Nucleic Acids Res*, 1987, **15**(3): 1281–1295.
- [18] Cereghino GP, Cereghino JL, Ilgen C, *et al.* Production of recombinant proteins in fermenter cultures of the yeast *Pichia pastoris*. *Curr Opin Biotechnol*, 2002, **13**(4): 329–332.

科学出版社科学出版中心生命科学分社新书推介

遗传学工作者的生物信息学 (原书第二版)

(生物信息学数据分析丛书)

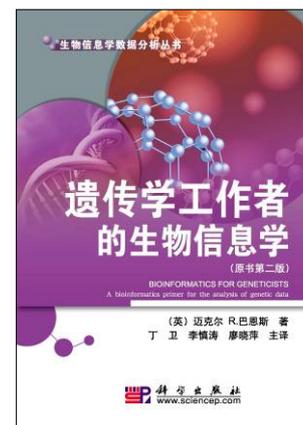
(英)迈克尔 R 巴恩斯 著 丁卫 李慎涛 廖晓萍 主译

978-7-03-025490-0 ¥ 88.00 2009 年 10 月 出版

内容简介

本书由五部分共 19 章组成,第一部分主要介绍了遗传学工作者所面临的生物信息学挑战以及遗传数据的操作和管理;第二部分主要介绍了以人类单体型图谱计划(HapMap)、人类基因组学和比较基因组学等为代表的多元化数据;第三部分主要介绍了用于遗传学研究设计和分析的生物信息学策略和手段;第四部分重点介绍了基因分析与疾病的关联及其代表案例;第五部分介绍了利用数据库界面进行全面生物信息学系统分析的流程,其中覆盖了微阵列等一些非常实用的技术,并且就药物遗传学等前沿领域展开了前瞻性的论述。

本书适合统计学和群体遗传学专业,以及具有分子遗传学和医学遗传学背景的高等院校师生和科研人员阅读,对从事人类及模式生物研究的广大实验室研究人员、临床研究人员以及实验室负责人都有较大的参考意义。



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:李韶文(010-64000849) 周文宇(010-64031535)

更多精彩图书请登陆网站 <http://www.lifescience.com.cn>, 欢迎致电索要书目