

· 论 著 ·

FasL 和 Der p2 双基因共表达真核表达载体的构建 及其在树突状细胞中的表达^{*}

王 彦, 吴 奎, 毕玉田, 王长征[△]

(第三军医大学新桥医院全军呼吸疾病研究所, 重庆 400037)

摘 要:目的 构建小鼠 FasL 基因和屋尘螨主要抗原 Der p2 双基因共表达载体,并检测其在树突状细胞(DC)中的表达。方法 以 plambd-Der p2 为模板扩增 Der p2 基因,双酶切 pIRES2EGFP 和 Der p2 基因,将 Der p2 基因克隆入 pIRES2EGFP 得 pIRES2EGFP-Der p2。双酶切 pMD18T-FasL 质粒获得 FasL 片段,克隆入 pIRES2EGFP-Der p2,获得 FasL 和 Der p2 共表达重组载体 pIRES2EGFP-FasL-Der p2,采用酶切及测序鉴定重组质粒。将重组质粒转染 DC,采用 RT-PCR 和 Western Blot 法检测 FasL 和 Der p2 基因的 mRNA 及蛋白水平的表达。结果 测序证实 FasL 和 Der p2 基因序列完全正确。重组质粒转染 DC 后,能表达 FasL 和 Der p2 的 mRNA 和蛋白。结论 成功构建 FasL 和 Der p2 双基因共表达重组载体 pIRES2EGFP-FasL-Der p2,转染 DC 后能在体外正确表达 FasL 和 Der p2 基因。

关键词: FasL; Der p2; 共表达; 树突状细胞

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2010.20.001

中图分类号: R562.25; R446.61

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2010)20-2697-03

Construction of plasmid co-expressing FasL and Der p2 gene and its expression in dendritic cells^{*}

WANG Yan, WU Kui, BI Yu-tian, et al.

(Institute of Respiratory Diseases, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To construct eukaryotic expression vector co-expressing murine FasL and Der p2 gene, and to detect their expressions in bone marrow-derived dendritic cell(DC). **Methods** Plasmid plambd-Der p2 as a template, Der p2 gene is amplified using PCR. The plasmid pIRES2EGFP and Der p2 gene were double digested using restriction endonuclease BstX1 and Not1, then Der p2 gene was ligated in pIRES2EGFP(pIRES2EGFP-Der p2). The FasL gene was excised from the plasmid pMD18T-FasL as a BamH1-Sal1 fragment and cloned in pIRES2EGFP-Der p2. Plasmid pIRES2EGFP-FasL-Der p2 containing both FasL gene and Der p2 gene was obtained. After transfected into DC, the expressions of FasL and Der p2 mRNA were detected by RT-PCR, and the expressions of FasL and Der p2 proteins were assayed by Western Blot. **Results** The cloned full reading frame of FasL and Der p2 cDNA was in coincidence with the sequence registered in GenBank. In the DC after transfection of pIRES2EGFP-FasL-Der p2, the expressions of mRNA and protein of FasL and Der p2 were detected. **Conclusion** The eukaryotic expression vector pIRES2EGFP-FasL-Der p2 co-expressing FasL and Der p2 gene is constructed successfully, and FasL and Der p2 gene could be expressed correctly in vitro after transfecting DC.

Key words: FasL; Der p2; Co-transfection; Dendritic cell

支气管哮喘是由多种炎性细胞参与的气道慢性炎症性疾病。过去认为, Th1/Th2 比例失衡导致 Th2 细胞过度活化是哮喘的主要发病机制。但是, 目前研究认为, 单纯的 Th1/Th2 比例失衡并不能完全解释哮喘的发病, 免疫耐受缺陷和(或)异常可能是哮喘发病的重要机制^[1-2]。Fas/FasL 系统在诱导外周免疫耐受、保护免疫豁免组织逃避机体免疫系统的攻击和维持免疫系统平衡, 甚至肿瘤免疫逃逸中均起重要作用^[3]。近年来, 将 FasL 基因转染树突状细胞(dendritic cell, DC)获得可以诱导 T 细胞凋亡的“杀手 DC”(FasL-DC), 在诱导免疫耐受的研究中已越来越受到重视^[4-5]。屋尘螨是哮喘患者的常见过敏原。因此, 如果构建屋尘螨主要抗原 Der p2 和 FasL 基因共表达载体并转染 DC, 有望诱导机体对屋尘螨过敏原产生特异性免疫耐受, 从而达到防治哮喘的目的。在本实验中, 作者构建 FasL 和屋尘螨变应原 Der p2 双基因共表达载体, 并检测了它们在小鼠骨髓来源的 DC 中的表达情况, 为下一步研究奠定实验基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物和主要试剂 C57BL/6 小鼠 15 只, 雌雄不拘, 体质量 20~30 g, 6~8 周龄, 购自重庆医科大学实验动物中心; pIRES2EGFP 质粒购自 Clontech 公司; plambd-Der p2 质粒购自美国 HESKA 公司; PCR 引物用 DNASTAR 软件设计并订购于赛百盛公司; 重组小鼠粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(rmGM-CSF)购自 Peprotech 公司; 高保真 RT-PCR 试剂盒购自 Toyobo 公司; 限制性内切酶购自 Takara 公司; 脂质体转染剂 LipofectamineTM 2000 购自 Invitrogen 公司; 质粒提取试剂盒购自 Omega 公司; TRI reagent 购自 MRC 公司; RPMI-1640 培养基和胎牛血清(FBS)购自 Hyclone 公司; 小鼠抗 Der p2 单抗购自英国 IB 公司; 兔抗小鼠 FasL 一抗、HRP 标记或 cy3 标记的羊抗兔 IgG 二抗分别购自 Santa Cruz 和中山公司。

1.2 PCR 扩增 Der p2 基因 以 plambd-Der p2 为模板扩增 Der p2 质粒, 引物如下, Der p2 引物: 扩增片段为 426 bp (Der p2 全长基因 396 bp+酶切位点+保护碱基), 上游: 5'-CTG

^{*} 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30470772)。 [△] 通讯作者, 电话: 023-68774603; E-mail: czwang@netease.com。

CAG AAC CAC AAC CAT GGA TCA AGT CGA TGT CAA AGA-3'(BstX I); 下游:5'-ATA AGA ATG CGG CCG CTT TAA TCG CGG ATT TTA GCA TGA G-3'(Not I)。反应条件:95℃、4 min→95℃、0.5 min→66℃、1 min→68℃、1 min。后 3 步进行 35 个循环,循环完成后 68℃、5 min 终止。经 1% 琼脂糖凝胶电泳后,胶回收 Der p2 产物。

1.3 pIRES2EGFP-Der p2 重组载体的构建及鉴定 BstX I 和 Not I 双酶切 pIRES2EGFP 和 Der p2,切除 pIRES2EGFP 中位于 IRES 序列下游的 EGFP 片段,切胶回收线性 pIRES2EGFP 载体片段和 Der p2 基因,在 T₄DNA 连接酶作用下进行连接反应(16℃、16 h),将 Der p2 基因片段克隆入 pIRES2EGFP 原 EGFP 片段位置得 pIRES2EGFP-Der p2。将 pIRES2EGFP-Der p2 转化 E. coli DH5 α 感受态细菌,氨苄青霉素(Kan)抗性筛选,阳性菌落扩增后抽提重组质粒,采用 Not I 和 BstX I 双酶切和 PCR 鉴定。

1.4 pIRES2EGFP-FasL-Der p2 重组载体的构建及鉴定 BamH I 和 Sal I 双酶切 pMD18T-FasL 和 pIRES2EGFP-Der p2,从 pMD18T-FasL 质粒双酶切获得 FasL 片段,切胶回收 876 bp FasL 条带和线性 pIRES2EGFP-Der p2 载体片段,在 T₄DNA 连接酶作用下进行连接反应(16℃、16 h),将 FasL 基因克隆入 pIRES2EGFP-Der p2 的 IRES 序列上游多克隆位点区获得 FasL 和 Der p2 双基因共表达重组载体 pIRES2EGFP-FasL-Der p2。将 pIRES2EGFP-FasL-Der p2 转化 E. coli DH5 α 感受态细菌,氨苄青霉素(Kan)抗性筛选,阳性菌落扩增后抽提重组质粒,用 Not I 和 BstX I 双酶切,BamH I 和 Sal I 双酶切分别鉴定 Der p2 和 FasL,并将鉴定正确的重组质粒测序。

1.5 pIRES2EGFP-FasL-Der p2 转染树突状细胞 无菌条件下取 C57BL/6 小鼠完整的股骨、胫骨,离断于骺端,以 RPMI-1640 培养液 1 mL 冲洗髓腔,获得单细胞悬液,2 000 r/min 离心 10 min,弃上清液,重悬于 RPMI-1640 培养基,加入重组小鼠粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(rmGM-CSF)至终浓度为 20 ng/mL,继续培养 10 d 后收获细胞,用流式细胞仪(FACS)鉴定 DC 相对特异性表面分子 CD11c 表达后,进行下一步实验。pIRES2EGFP-FasL-Der p2 重组质粒与 LipofectamineTM2000 按 1 μ g:3 L 混合于 50 μ L 培养基,室温下放置 30 min,形成转染液复合物,加入培养在 6 孔板的 DC 中,常规培养 24 h 后,细胞换液并加入 G418 至 200 μ g/mL,48 h 后进行下一步实验(FasL-Der p2-DC 组)。以未转染质粒和转染空白质粒的 DC 为对照,每组 5 个样本($n=5$)。

1.6 RT-PCR 检测基因表达 合成 FasL、Der p2 和 GAPDH 共 3 对 PCR 引物:FasL 引物(446 bp)上游:5'-GGG CTC CTC CAG GGT CAG TTT T-3';下游:5'-TCC AGA GAT CAG AGC GGT TCC ATA-3'。Der p2 引物 2 (234 bp)上游:5'-CGA AGC CAA CCA AAA CAC AA-3';下游:5'-CAG GCC AAA ACA CCA TCA TC-3'。GAPDH (311 bp)上游:5'-CCT CTG GAA AGC TGT GGC G-3';下游:5'-GGT GGA AGA GTG GGA GTT G-3'。用 TRI reagent 以一步法提取各组 DC (10⁷)总 RNA,取 RNA 2 g 进行 cDNA 合成:70℃、5 min→42℃、60 min→70℃、10 min→冰上;PCR 扩增:(1)FasL(33 循环)和 GAPDH(27 循环):94℃预变性 1.5 min→94℃、0.25 min→55℃、0.5 min→68℃、1 min→68℃延伸 5 min;(2)Der p2 (33 循环)和 GAPDH (27 循环):将 PCR 管置于 PCR 仪中,95℃、4 min→95℃、0.25 min→50℃、0.5 min→68℃、1

min。后 3 步进行 33 个循环,PCR 产物以 1.5% 琼脂糖凝胶电泳 1~1.5 h 后,图像扫描,用 GAPDH 为内参照进行分析。

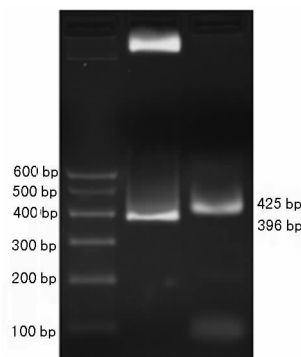
1.7 Western Blot 检测蛋白表达 用 TRI reagent 提取各组细胞蛋白质。取蛋白质 20 μ g 以 10% SDS-PAGE 电泳分离;半干电转移蛋白到 PVDF 膜,5% 脱脂奶粉封闭,加一抗[兔抗小鼠 FasL(1:500)或小鼠抗 Der p2 单抗(1:500)或兔抗小鼠 GAPDH (1:500)]4℃杂交过夜,二抗(HRP 标记的羊抗兔 IgG 或 FITC 标记羊抗小鼠二抗)室温孵育 1 h,二氨基联苯胺(DAB)染色。扫描蛋白条带,以 GAPDH 为内参照进行分析。

1.8 统计学方法 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS10.0 统计软件进行单因素方差分析。

2 结果

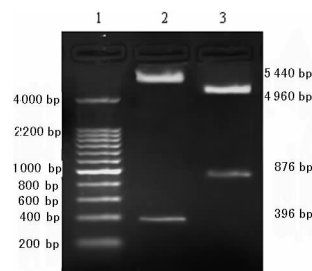
2.1 重组 pIRES2EGFP-Der p2 的鉴定 采用 Not I、BstX I 双酶切法和 PCR 法鉴定重组 pIRES2EGFP-Der p2。Not I 和 BstX I 双酶切后,可得 396 bp Der p2 片段和 4 585 bp 线性 pIRES2EGFP 载体片段(图 1)。以 pIRES2EGFP-Der p2 质粒为模板,采用 PCR 扩增 Der p2,可扩增得 426 bp 的 Der p2 片段(图 1)。表明 pIRES2EGFP-Der p2 构建成功。

2.2 pIRES2EGFP-FasL-Der p2 的鉴定 采用双酶切鉴定和测序法鉴定。Not I 和 BstX I 双酶切后,可得 396 bp Der p2 片段和 5 440 bp 线性 pIRES2EGFP-FasL-Der p2 载体片段(图 2);BamH I 和 Sal I 双酶切后,可得 876 bp FasL 片段和 4 960 bp 线性 pIRES2EGFP-FasL-Der p2 载体片段(图 2)。经测序后表明 pIRES2EGFP-FasL-Der p2 中所含有的 Der p2 基因和 FasL 基因与 Genbank 中的 Der p2 基因(AF276239)和 FasL 基因(NM_010177)的编码区序列完全一致。表明 pIRES2EGFP-FasL-Der p2 构建成功,Der p2 和 FasL 基因序列完全正确。



1:marker;2:Not I 和 BstX I 双酶切鉴定;3:PCR 鉴定。

图 1 pIRES2EGFP-Der p2 质粒酶切和 PCR 鉴定



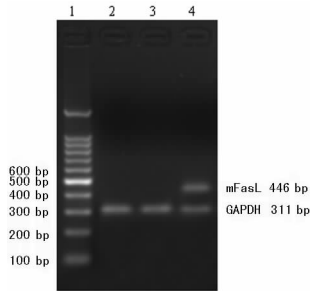
1:marker;2:Not I 和 BstX I 双酶切;3:BamH I 和 Sal I 双酶切。

图 2 pIRES2EGFP-FasL-Der p2 双酶切鉴定

2.3 pIRES2EGFP-FasL-Der p2 重组质粒功能鉴定 FACS 检测表明,第 10 天培养细胞表达 CD11c (DC 特异性表面分

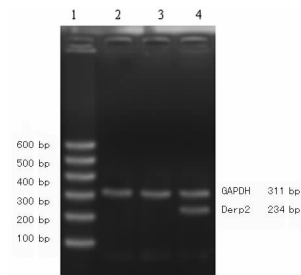
子)阳性率为 79.63%,提示大多数骨髓细胞已分化为 DC。

2.3.1 RT-PCR 检测重组质粒转染 DC 后 FasL 和 Der p2 mRNA 表达 RT-PCR 分别检测转染 48 h 后基因转染 DC 表达 FasL 和 Der p2 mRNA 情况。结果显示,3 组均可见 311 bp 的 GAPDH 条带。pIRES2EGFP-FasL-Der p2 转染 DC 组(FasL-Der p2-DC)可见明显的 446 bp 的 FasL 条带和 234 bp Der p2 条带(图 3、4),而未转染 DC 组、转染空质粒 DC 组均未见 FasL 和 Der p2 条带。提示 FasL-Der p2-DC 能表达 FasL 和 Der p2 mRNA,目的基因 FasL 和 Der p2 在 FasL-Der p2-DC 中能有效地翻译转录。



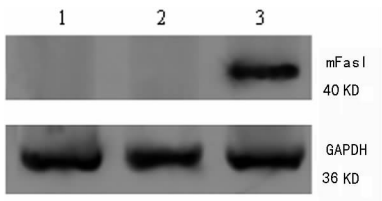
1:marker;2 未转染 DC;3:转染空质粒 DC;4:FasL-Der p2-DC。

图 3 pIRES2EGFP-FasL-Der p2 转染 DC (FasL-Der p2-DC)的 FasL mRNA 表达



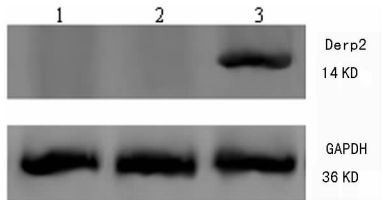
1:marker;2:未转染 DC;3:转染空质粒 DC;4:FasL-Der p2-DC。

图 4 pIRES2EGFP-FasL-Der p2 转染 DC (FasL-Der p2-DC)的 Der p2 mRNA 表达



1:marker;2:未转染 DC;3:FasL-Der p2-DC。

图 5 pIRES2EGFP-FasL-Der p2 转染 DC (FasL-Der p2-DC)的 FasL 蛋白表达



1:marker;2:未转染 DC;3:FasL-Der p2-DC。

图 6 pIRES2EGFP-FasL-Der p2 转染 DC (FasL-Der p2-DC)的 Der p2 蛋白表达

2.3.2 Western Blot 检测重组质粒转染 DC 后 FasL 和 Der p2

蛋白表达 Western Blot 检测基因转染 DC 中 FasL 和 Der p2 蛋白的表达情况。结果表明,各组在 36 KD 处皆显现明显的 GAPDH 内参照蛋白印迹。未转染 DC 组和转染空质粒 DC 组无 FasL 和 Der p2 蛋白条带。FasL-Der p2-DC 可见明显的 40 KD FasL 蛋白条带和 14 KD Der p2 蛋白条带(图 5、6)。提示 pIRES2EGFP-FasL-Der p2 转染 DC 能表达 FasL 和 Der p2 蛋白。

3 讨 论

FasL 分子属于肿瘤坏死因子家族成员,Fas/FasL 介导的 T 细胞凋亡是机体维持对自身抗原免疫耐受(外周免疫耐受)的重要机制^[6]。有研究发现,FasL 基因转染的同种异体 DC 能够通过抑制同种混合淋巴细胞反应,从而导致机体对同种异体抗原的低反应性;将 FasL 基因转染的供者 DC 注入受者腹腔后进行异位心血管移植,虽然不能完全阻止排斥反应的发生,但能显著提高移植物的存活期^[7]。FasL 基因转染的 DC 注入卵蛋白(OVA)特异性 Th2 细胞诱导的哮喘小鼠体内后可以诱导 OVA 特异性 T 细胞凋亡,显著抑制气道高反应性和气道变应性炎症^[8]。表明 FasL 基因转染的 DC 在诱导免疫耐受中有重要作用。

屋尘螨是过敏性哮喘患者常见的过敏原,最重要的是 I 类(Der p1)和 II 类(Der p2)变应原^[9]。编码 Der p1、Der p2 质粒 DNA 疫苗能有效抑制屋尘螨提取液诱导的气道变应性炎症^[10-11]。将 DNA 疫苗质粒转染 DC 能增强 DNA 疫苗的治疗作用。若 DC 能同时独立表达 FasL 和 Der p2,DC 在将 Der p2 抗原呈递给 T 细胞的同时,亦将 FasL 信号传递给 T 细胞,则可能诱导屋尘螨过敏原特异性 T 细胞凋亡,而诱导抗原特异性免疫耐受,为哮喘的治疗提供新的方法。为了使 DC 能同时独立表达两种蛋白,本研究成功构建了 FasL 和 Der p2 双基因共表达的真核载体。

利用基因间以内部核糖体结合位点(internal ribosome entry site,IRES)序列连接构建多顺反子载体,其能将多个基因在单一启动子控制下转录形成单一 mRNA,避免了在转录调控水平对基因表达的影响。IRES 元件代替内部启动子克服了采用启动子间的相互抑制现象,是近年来多基因共表达载体构建的重要方法^[12]。IRES 序列来源于某些病毒和细胞的 mRNA 5'端的一段非翻译区,具有内部核糖体结合位点功能^[13]。IRES 的优点是在上游启动子的控制下,与 IRES 相连的非相关基因可同时转录成一条单链 mRNA,但翻译是各自独立的,其以不依赖帽的方式启动远端 mRNA 的翻译,从而在同一转录本上翻译出各自独立的蛋白^[14]。IRES 连接的 2 个开放阅读框,其转录产物在翻译时核糖体能同时进入并起始翻译 IRES 上游和下游的 2 个转录子。其中,IRES 上游 mRNA 的翻译起始遵循一般的真核生物基因的翻译起始规律,IRES 下游的 mRNA 的翻译起始由核糖体直接进入 IRES 位点后起始翻译。

参考文献:

[1] Dahl ME,Dabbagh K,Liggitt D,et al. Viral-induced T helper type 1 responses enhance allergic disease by effects on lung dendritic cells[J]. Nat Immunol,2004,5(3):337.

[2] Cui J,Pazdziorko S,Miyashiro JS,et al. TH1-mediated airway hyperresponsiveness independent of neutrophilic inflammation[J]. J Allergy Clin Immunol,2005,115(2):309.

(下转第 2703 页)

能因为样本数太少;其中,LOH 与 4 种病理类型均无关,提示存在于位点 D7S486 上的 TSG 可能是一作用非常广谱的胃癌相关 TSG,与胃癌各种组织类型的发生均有关联。

参考文献:

[1] 于颖彦,计骏,陆云,等. 胃癌 5 号染色体短臂杂合性缺失的精细作图及其相关基因探讨[J]. 中华肿瘤杂志,2006,28(2):84.

[2] 郭涛,孙敬武. 喉癌前病变及喉鳞状细胞癌微卫星杂合性缺失的变化及其意义[J]. 临床耳鼻咽喉头颈外科杂志,2007,21(18):831.

[3] Zenklusen JC, Weitzel JN, Ball HG, et al. Allelic loss at 7q31. 1 in human primary ovarian carcinomas suggests the existence of a tumor suppressor gene[J]. Oncogene, 1995,11(2):359.

[4] Achille A, Biasi MO, Zamboni G, et al. Chromosome 7q allelic losses in pancreatic carcinoma[J]. Cancer Res, 1996,56(16):3808.

[5] Kawana Y, Ichikawa T, Suzuki H, et al. Loss of heterozygosity at 7q31. 1 and 12p13-12 in advanced prostate cancer[J]. Prostate, 2002,53(1):60.

[6] 王丽江,甘润良,黄幼生,等. 应用自制显微切割工具切割石蜡组织行 PCR-银染[J]. 诊断病理学杂志,2004,11(5):360.

[7] Coombs NJ, Gough AC, Primrose JN. Optimisation of DNA and RNA extraction from archival formalin-fixed tissue[J]. Nucleic Acids Res, 1999,27(16):12.

(上接第 2699 页)

[3] 覃玉桃,王仁生. Fas/FasL 系统与肿瘤免疫逃逸[J]. 广西医学,2002,24(5):663.

[4] Kusuvara M, Matsue K, Edelbaum D, et al. Killing of naive T cells by CD95L-transfected dendritic cells; in vivo study using killer DC-DC hybrids and CD4⁺ T cells from D011. 10 mice[J]. Eur J Immunol, 2002,32(4):1035.

[5] Matsue H, Matsue K, Walters M, et al. Induction of antigen-specific immunosuppression by CD95L cDNA-transfected 'killer' dendritic cells[J]. Nat Med, 1999,5(8):930.

[6] 刘安民,钟志光,邓跃飞,等. Fas 系统在星形细胞瘤的表达及其与细胞凋亡的关系[J]. 广东医学,2000,21(9):735.

[7] Min WP, Gorczynski R, Huang XY, et al. Dendritic cells genetically engineered to express Fas ligand induce donor specific hyporesponsiveness and prolong allograft survival[J]. J Immunol, 2000,164(1):161.

[8] Chuang YH, Suen JL, Chiang BL. Fas-ligand-expressing adenovirus-transfected dendritic cells decrease allergen-specific T cells and airway inflammation in a murine model

[8] 王丽江,甘润良,唐运莲,等. 石蜡组织提取 DNA 四种方法的比较[J]. 诊断病理学杂志,2004,11(1):57.

[9] 房殿春. 重视胃癌基因不稳的研究[J]. 重庆医学,2003,32(9):1121.

[10] 葛相栓,吴正祥. 抑癌基因 PTEN 在肿瘤发生发展中的作用[J]. 安徽医药,2007,11(11):963.

[11] Engelman JA, Zhang XL, Lisanti MP. Genes encoding human caveolin-1 and -2 are co-localized to the D7S522 locus (7q31. 1), a known fragile site (FRA7G) that is frequently deleted in human cancers[J]. FEBS Lett, 1998,436(3):403.

[12] Shatz M, Liscovitch M. Caveolin-1: a tumor-promoting role in human cancer[J]. Int J Radiat Biol, 2008,84(3):177.

[13] Zenklusen JC, Hodges LC, LaCava M, et al. Definitive functional evidence for a tumor suppressor gene on human chromosome 7q31. 1 neighboring the Fra7G site[J]. Oncogene, 2000,19(13):1729.

[14] Weng DS, Li JT, Mai SJ, et al. Identification of a new target region on the long arm of chromosome 7 in gastric carcinoma by loss of heterozygosity[J]. World J Gastroenterol, 2006,12(15):2437.

[15] 李锦添,买世娟,冯炳健,等. 胃癌 7 号染色体杂合性缺失[J]. 中国肿瘤临床,2004,31(1):4.

(收稿日期:2010-05-29 修回日期:2010-06-30)

el of asthma[J]. J Mol Med, 2006,84(7):595.

[9] 林霞,邢英梅. 变应原皮试在哮喘诊断中的应用[J]. 海南医学,2003,14(4):19.

[10] Jacquet A, Magi M, Haumont M, et al. Absence of immunoglobulin E synthesis and airway eosinophilia by vaccination with plasmid DNA encoding ProDer p1[J]. Clin Exp Allergy, 2003,33:218.

[11] Li GP, Liu ZG, Qiu J, et al. DNA vaccine encoding Der p2 allergen generates immunologic protection in recombinant Der p2 allergen-induced allergic airway inflammation mice model[J]. Chin Med J (Engl), 2005,118(7):534.

[12] 晏霆,朱满洲. 基因治疗与基因载体[J]. 安徽医药,2002,6(4):72.

[13] 李朵璐,阚全程,余祖江. 丙型肝炎病毒 IRES 基因 T 载体克隆及序列分析[J]. 医药论坛杂志,2009,30(23):4.

[14] M'hadheb-Gharbi MB, Kean KM, Gharbi J. Molecular analysis of the role of IRES stem-loop V in replicative capacities and translation efficiencies of Cocksackievirus B3 mutants[J]. Mol Biol Rep, 2009,36(2):255.

(收稿日期:2010-02-16 修回日期:2010-03-25)