

· 技术与方法 ·

人 DNA 聚合酶 δ 2 真核载体的构建及在 HEK293 细胞中的表达*白书媛^{1,2}, 王培昌^{1△}

(1. 首都医科大学宣武医院检验科, 北京 100053; 2. 北京市宣武区疾病预防控制中心, 北京 100053)

摘要:目的 构建人 DNA 聚合酶 δ 2(DNA Pol δ 2)真核表达载体, 转染人胚胎肾细胞(HEK293)并观察其表达水平。方法 用逆转录 PCR(RT-PCR)方法从人胚肺成纤维细胞(WI38 细胞)扩增目的基因 DNA Pol δ 2 cDNA 片段, 与 pMD-18T 载体连接, 构建质粒 pMD-18T-Pol δ 2; 将目的片段 DNA Pol δ 2 从质粒 pMD-18T-Pol δ 2 切下, 与真核表达载体 pcDNA 3.1(+)连接, 构建正义及反义真核表达载体 pcDNA 3.1-Pol δ 2。应用脂质体转染试剂, 分别将正义、反义真核表达载体 pcDNA 3.1-Pol δ 2, 空载体 pcDNA 3.1(+)转染至 HEK293 细胞, 同时设置阴性对照; 用 RT-PCR 和 Western blot 方法检测目的基因 DNA Pol δ 2 mRNA 及蛋白表达水平。**结果** 正义和反义 DNA Pol δ 2 真核表达载体 pcDNA3.1-Pol δ 2 中插入的目的片段与 GENE BANK 上 DNA Pol δ 2 cDNA 序列完全一致。RT-PCR 方法显示正义及反义真核表达载体转染组细胞的目的基因 DNA Pol δ 2 mRNA 表达均明显高于空载体转染组及阴性对照组; Western blot 显示正义真核表达载体转染组细胞 DNA Pol δ 2 蛋白表达明显增强, 反义真核表达载体转染组细胞 DNA Pol δ 2 蛋白表达阴性。**结论** 人 DNA Pol δ 2 正义及反义真核表达载体 pcDNA3.1-Pol δ 2 构建成功。

关键词: DNA 聚合酶 III; 真核载体; 细胞

doi: 10.3969/j.issn.1671-8348.2013.13.020

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2013)13-1499-03

Construction of eukaryotic expression vectors of human DNA polymerase δ 2 and their expression in HEK293 cells*Bai Shuyuan^{1,2}, Wang Peichang^{1△}

(1. Department of Laboratory, Xuanwu Hospital, Capital Medical University, Beijing 100053, China;

2. Xuanwu District Center for Disease Control and Prevention, Beijing 100053, China)

Abstract: **Objective** To construct the DNA Pol δ 2 eukaryotic expression vector and to observe their transfection and expression in human embryonic kidney 293(HEK293) cells. **Methods** The total RNA was extracted from human embryonic lung cells (WI38 cells), and RT-PCR was used to amplify DNA Pol δ 2. The PCR products were ligated to the vector of pMD-18T to construct the plasmid of pMD-18T-Pol δ 2. The DNA Pol δ 2 was cut off from the plasmid of pMD-18T, and ligated to the vector of pcDNA 3.1(+) to construct pcDNA3.1-Pol δ 2. The sense vector and the antisense vector of pcDNA3.1-Pol δ 2 and the blank vector of pcDNA3.1(+) were transfected to HEK293 cells by the transfection reagent, while HEK293 cells were regarded as the negative control. The expression levels of mRNA of DNA Pol δ 2 and the level of proteins of DNA Pol δ 2 were detected by RT-PCR and Western blot. **Results** Gene sequence-measurement and BLAST analysis showed that inserted fragments of pcDNA3.1-Pol δ 2 were consistent with the cDNA sequence of DNA Pol δ 2 published in GENE BANK. The expression of mRNA of DNA Pol δ 2 in the sense and the antisense vector groups were obviously higher than that in the blank vector group and the negative control group. The expression of protein of DNA Pol δ 2 in the sense vector group was increased significantly contrast to the blank vector group and the negative control group while that in the antisense vector group was negative. **Conclusion** The sense and antisense eukaryotic expression vectors of pcDNA3.1-Pol δ 2 are successfully constructed.

Key words: DNA polymerase III; eukaryotic expression vectors; cell

有研究发现, DNA 损伤随龄积累, 修复能力随龄下降, 最终导致细胞衰老和生物体整体衰老^[1]。进一步研究发现, 在氧化应激状态下, DNA 单链断裂水平与细胞代龄呈显著正相关, 与修复能力呈显著负相关^[2]; DNA 聚合酶 δ (DNA Pol δ) 在 DNA 合成、损伤及修复中起关键作用^[3], 其表达水平与增龄间存在明显相关^[4]。而 DNA Pol δ 在衰老过程中的作用, 以及对复制性衰老的影响目前尚少见报道。基于此, 本研究拟选取 DNA Pol δ 的核心亚基之一 p50(DNA Pol δ 2) 为研究对象, 利用分子克隆和重组载体技术构建人 DNA Pol δ 2 的正义及反义真核表达载体, 为深入研究 DNA Pol δ 在衰老过程中的作用及机制等奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料 菌株: 大肠埃希菌(E. Coli DH5 α), 购自北京天根生化科技有限公司。质粒: 载体 pMD18-T, 购自大连宝生物公

司; 真核表达载体 pcDNA3.1(+), 购自美国 Invitrogen 公司。细胞株: 人胚肺成纤维细胞(WI38 细胞株), 购自中国科学院细胞生物学研究所(上海); 人胚胎肾细胞(HEK293 细胞株), 由北京大学医学部衰老研究中心赠送。DNA Pol δ 2 引物参照 GENE BANK 中人 DNA Pol δ 2 全长 cDNA(Gene ID: 5425) 设计。上游引物: 5'-GGA GTG TGG CCA TGT TTT CT-3', 下游引物: 5'-AGG GAA TGA ACA GCC TCCA T-3', 由上海生物工程技术有限公司合成。主要试剂及仪器: Trizol(美国 invitrogen); 2 \times Power Taq PCR Master Mix, 多功能 DNA 纯化回收试剂盒、质粒提取试剂盒(北京百泰克); ReverTra Ace- α -cDNA 试剂盒(日本 TOYOBO); BamH I 限制性内切酶、Hind III 限制性内切酶(美国 MBI); EntransterTM-H 转染试剂(北京英格恩); 鼠抗人 DNA Pol δ 2 单克隆抗体(美国 Ab-

* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30672469)。 作者简介: 白书媛(1978~), 主管技师, 本科, 主要从事临床微生物检验工作。

 Δ 通讯作者, Tel: (010)83198688; E-mail: peichangwang@yahoo. com。

cam,鼠抗人单克隆抗体,货号 ab53741)、Veriti PCR 仪(美国 BIORAD);DYY-6C 型电泳仪(北京六一厂)等。

1.2 方法

1.2.1 真核载体构建 用 Trizol 法提取 24~25 代 WI38 细胞的总核糖核酸(RNA),按照 ReverTra Ace- α -cDNA 试剂盒方法说明逆转录反应成 cDNA 作为 PCR 反应的模板;PCR 扩增条件为 94 ℃ 预变性 7 min,95 ℃ 变性 30 s,62.5 ℃ 退火 30 s,72 ℃ 延伸 2 min,共 35 个循环;PCR 产物加至 1.5% 琼脂糖凝胶孔,电泳检测后回收纯化目的基因,与 T 载体 pMD18-T 连接后,转化、挑取阳性菌落和提取质粒均按常规方法进行;阳性质粒经多次测序及筛选后,选取正、反方向各一个 TA 克隆质粒 pMD18-T-Pol δ 2;用限制性内切酶 BamH I 及 Hind III 双酶切正反 TA 克隆质粒 pMD18-T-Pol δ 2 及 pcDNA3.1(+),酶切得到的 DNA 目的片段(正反 TA 克隆酶切目的片段)分别与 pcDNA3.1(+)线性大片段连接。转化后挑选阳性菌落,经 PCR 确认后,阳性菌落增菌,提取质粒,测序鉴定,外源片段与 GENE BANK 上序列完全一致且正向插入 pcDNA3.1(+)的质粒为正义真核表达载体 pcDNA3.1-Pol δ 2,序列与 GENE-BANK 完全一致且反向插入 pcDNA3.1(+)的质粒为反义真核表达载体 pcDNA3.1-Pol δ 2。

1.2.2 HEK293 细胞瞬时转染 用 6 孔板培养 HEK293 细胞,按照转染试剂说明,将正义真核载体 pcDNA3.1-Pol δ 2、反义真核载体 pcDNA3.1-Pol δ 2、空载体 pcDNA3.1 分别转染

HEK293 细胞,同时设置未转染细胞作为对照。

1.2.3 转染细胞目的基因 mRNA 表达 提取转染 48 h 后的细胞总 RNA,PCR 扩增目的基因,经琼脂糖凝胶电泳,观察各组细胞的目的基因 mRNA 表达水平。应用 Quantity One software 进行条带扫描,得到待检条带光密度值与甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)光密度值的比值,分析条带的相对强度。

1.2.4 Western blot 用 RIPA Lysis Buffer(RIPA 裂解液)提取白细胞总蛋白,加十二烷基硫酸钠(SDS)上样缓冲液,煮沸 5 min 使蛋白变性,8% 聚丙烯酰胺凝胶电泳;转膜 300 mA,120 min;5% 脱脂奶粉封闭 1 h,一抗封闭,4 ℃ 过夜,洗脱一抗,每次 5 min,共 3 次;室温封闭二抗 2 h,洗脱二抗,每次 10 min,共 4 次;于纤维膜上加超敏蛋白发光液,暗盒中曝光。

2 结 果

2.1 DNA Pol δ 2cDNA 的分子克隆 收集 24~25 代 WI38 细胞提取总 RNA,逆转录 PCR(RT-PCR),以全长 cDNA 为模板,以 DNA Pol δ 2 上、下游引物行 PCR,PCR 产物凝胶电泳可见约 1 400 bp 的特异性条带,与目的基因片段(1 410 bp)大小一致(图 1),完整克隆了 DNA Pol δ 2 的 cDNA 片段。

2.2 TA 克隆质粒 pMD-18T-Pol δ 2 的构建与筛选鉴定 目的基因片段 DNA Pol δ 2 与 T 载体 pMD-18T 连接后,混合产物转化后,经 PCR 筛选,增菌后提取质粒,命名为 pMD-18T-Pol δ 2 (图 2)。构建了含 DNA Pol δ 2 完整片段的 TA 克隆质粒。

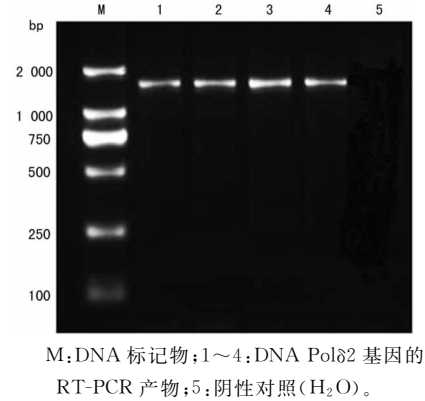


图 1 DNA Pol δ 2 RT-PCR 扩增产物(1 410 bp)

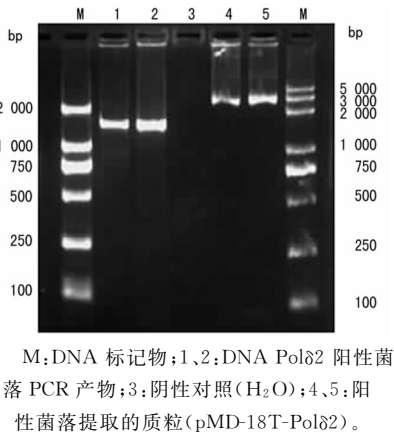


图 2 DNA Pol δ 2 阳性菌落 PCR 产物及质粒电泳图

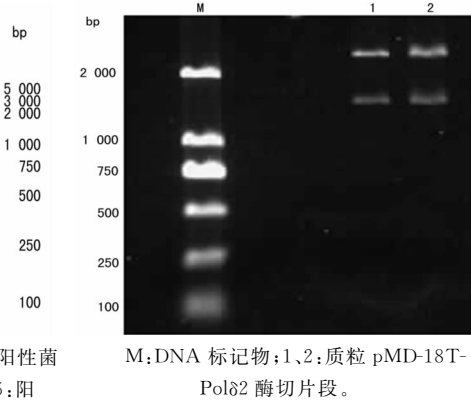


图 3 质粒 pMD-18T-Pol δ 2 的酶切分析

2.3 质粒 pMD-18T-Pol δ 2 的酶切鉴定与测序 经 BamH I 和 Hind III 双酶切后,切出大小约 1 410 bp 的线性片段,与预期一致,表明目的片段 DNA Pol δ 2 插入 T 载体 pMD-18T 中。鉴定后的质粒经测序,得到两个目的基因 DNA Pol δ 2 插入方向相反的质粒 pMD-18T-Pol δ 2,测序显示与 GENE BANK 上 DNA Pol δ 2cDNA 序列完全一致,见图 3。

2.4 真核表达载体的构建与鉴定 正向、反向 TA 克隆质粒,pcDNA3.1(+)分别经 BamH I 和 Hind III 双酶切后,正向及反向目的片段,与 pcDNA3.1 线性片段连接,产物转化大肠埃希菌 DH5 α ,经 LB 平板培养,筛选白色菌落增菌后经 PCR 验证及测序,质粒命名为正义和反义真核表达载体 pcDNA3.1-Pol δ 2(图 4)。此步骤构建完成了正反义真核表达载体 pcDNA3.1-Pol δ 2。

2.5 各组细胞 DNA Pol δ 2 mRNA 表达水平 正义真核载体转染组、反义真核载体转染组、空载体 pcDNA3.1 转染组、未转染细胞对照组细胞培养 48 h 后 DNA Pol δ 2 mRNA 表达,正义、反义真核载体转染组 DNA Pol δ 2 mRNA 表达水平明显高于空载体 pcDNA3.1 转染组及未转染细胞对照组(图 5),增加

了约 2.77 倍;即正义、反义真核载体转染组细胞均明显表达了 DNA Pol δ 2 mRNA。

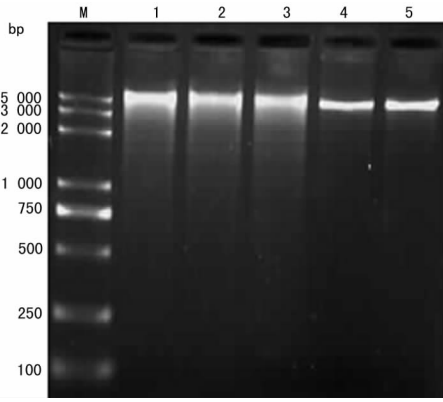
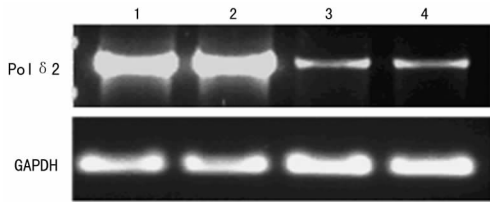


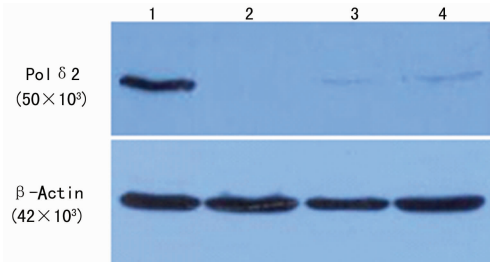
图 4 正义及反义真核表达载体 pcDNA3.1-Pol δ 2 电泳图



1:正义真核载体转染组;2:反义真核载体转染组;3:空载体 pcDNA3.1 转染组;4:未转染细胞对照组。

图 5 各组细胞 DNA Polδ2 mRNA 表达水平

2.6 各组细胞 DNA Polδ2 蛋白表达水平 Western blot 结果显示,正义真核载体转染组细胞、空载体 pcDNA3.1 转染组细胞及未转染细胞对照组均有约 50×10^3 的目的蛋白条带存在;正义真核载体转染组细胞中 DNA Polδ2 蛋白水平明显升高;反义真核载体转染组细胞无蛋白条带显示;空载体 pcDNA3.1 转染组及未转染细胞对照组有微弱的内源性蛋白条带存在(图 6),正义真核载体转染组细胞蛋白较空载体 pcDNA3.1 转染组和未转染细胞对照组增加了 3 倍以上,提示正义真核载体可增强 HEK293 细胞的 DNA Polδ2 蛋白表达水平;反义真核载体可明显抑制 HEK293 细胞的 DNA Polδ2 蛋白表达。



1:正义真核载体转染组;2:反义真核载体转染组;3:空载体 pcDNA3.1 转染组;4:未转染细胞对照组。

图 6 各组细胞 DNA Polδ2 蛋白质表达

3 讨 论

衰老自由基学说认为,自由基水平随龄累积,损伤核酸、蛋白质等生物大分子,并促进过氧化脂质的形成,最终引起衰老^[1,5-6]。本课题前期研究发现,在氧化应激状态下,DNA 单链断裂水平、DNA 损伤修复能力与增龄显著相关,进一步研究发现,DNA 聚合酶 δ 亦与增龄间存在密切关系^[2]。

DNA Polδ 是最保守的真核生物 DNA 聚合酶,具有 5'—3'聚合酶活性及 3'—5'核酸外切酶活性。在 DNA 复制、DNA 损伤修复、细胞周期调控、肿瘤及 Werner 综合征发生等中均具有重要作用^[7-14]。哺乳动物 DNA 聚合酶 δ 由 4 个相对分子质量分别为 125×10^3 、 50×10^3 、 66×10^3 、 12×10^3 的亚基组成,即 p125(δ1)、p50(δ2)、p66(δ3)和 p12(δ4),其中 p125 为催化亚基,p50 是结合亚基。

本研究应用 RT-PCR 方法,设计引物从 WI38 细胞中扩增出涵盖全部开放读码框的人 DNA Polδ2 全长 cDNA,在构建真核表达载体过程中采用了 TA 克隆的方法,分别得到目的片段与 GENE BANK 上序列 100%一致的正向和反向的 TA 克隆质粒,真核表达载体 pcDNA3.1(+)全长 5 428 bp,能在多种哺乳动物细胞中高效表达,多克隆位点上游有增强启动子元件人巨细胞病毒(CMV),是决定编码基因表达水平的重要元件;自主复制信号猴空泡病毒(SV40)可增强有细胞启动子启动的基因转录作用,该结构使 pcDNA3.1(+)能在细胞和细菌中高效复制,确保进入多克隆位点的外源性基因稳定高水平表达,为构建正义和反义真核表达载体奠定了基础。

经过 48 h 转染后,RT-PCR 结果显示:4 组细胞均扩增出

了目的基因条带;其中,正义和反义真核载体转染组目的基因 mRNA 与空载体 pcDNA3.1 转染组比较,表达均明显增强,增加了约 2.77 倍;空载体 pcDNA3.1 转染组和未转染细胞对照组比较,mRNA 无改变,均为内源性表达量;上述结果说明正义及反义真核载体 pcDNA3.1-Polδ2 显著提高了 DNA Polδ2 mRNA 表达水平。Western blot 结果显示:空载体 pcDNA3.1 转染组和未转染细胞对照组均检测到微量的内源性 DNA Polδ2 蛋白,且二者无明显差异,说明空载体 pcDNA3.1 对细胞 DNA Polδ2 蛋白表达未产生影响;正义真核载体转染组蛋白水平明显增加,较空载体 pcDNA3.1 转染组和未转染细胞对照组增加了 3 倍以上,说明正义真核表达载体 pcDNA3.1-Polδ2 显著提高了转染细胞的 DNA Polδ2 蛋白表达水平;反义真核载体转染组未检测到任何条带,说明反义真核表达载体抑制了细胞的 DNA Polδ2 蛋白表达,其具体机制可能是反义真核表达载体产生出反义 RNA,反义 RNA 可与内源性 mRNA 分子互补,抑制了 mRNA 的加工、翻译和 DNA 的复制,特异阻断了该基因在细胞的表达^[15-16]。

正义和反义真核表达载体 pcDNA3.1-Polδ2 的成功构建及在 HEK293 细胞内的成功表达,为下一步进行其基因功能验证、蛋白质活性检测、复制性衰老干预研究等奠定了基础。

参考文献:

- [1] 陈作舟. 筛选机制与细胞衰老的 DNA 损伤假说[J]. 遗传,2001,10(6):559-563.
- [2] Wang JL,Wang PC. The effect of aging on the DNA damage and repair capacity in 2BS cells undergoing oxidative stress[J]. Mol Biol Rep,2012,39(1):233-241.
- [3] Lu X,Tan CK,Zhou JQ,et al. Direct interaction of proliferating cell nuclear antigen with the small subunit of DNA polymerase delta[J]. J Biol Chem,2002,277(27):24340-24345.
- [4] 郭宏林,王培昌. 北京市健康人群 DNA 聚合酶 δ1 的增龄性变化[J]. 中国老年学杂志,2011,31(3):369-371.
- [5] 马宏,张宗玉,童坦君. 衰老的生物学标志[J]. 生理科学进展,2002,33(1):65-68.
- [6] 单海燕,白小涓,陈香美. 衰老生物学标志研究简介[J]. 中华老年医学杂志,2008,27(4):309-312.
- [7] Goldsby RE,Lawrence NA,Hays LE,et al. Defective DNA polymerase-delta proofreading causes Cancer susceptibility in mice[J]. Nat Med,2001,7(6):638-639.
- [8] Goldsby RE,Hays LE,Chen X,et al. High incidence of epithelial cancers in mice deficient for DNA polymerase delta proofreading[J]. Proc Natl Acad Sci U S A,2002,99(24):15560-15565.
- [9] Venkatesan RN,Treuting PM,Fuller ED,et al. Mutation at the polymerase active site of mouse DNA polymerase delta increases genomic instability and accelerates tumorigenesis[J]. Mol Cell Biol,2007,27(21):7669-7682.
- [10] Li H,Xie B,Rahmeh A,et al. Direct interaction of p21 with p50,the small subunit of human DNA polymerase delta [J]. Cell Cycle,2006,5(4):428-436.
- [11] Fazlieva R,Spittle CS,Morrissey D,et al. Proofreading exonuclease activity of human DNA polymerase delta and its effects on lesion-bypass DNA synthesis(下转第 1505 页)

向建等^[15]对重庆市女性职业认知现状与提升对策的研究一致,认为可能与重庆女性对职业认知合理,切实自身的优势有关。另外,结合访谈和其他地区政策分析原因,可能由于重庆市选拔、培训、任用大学生村干部制度较合理,服役期满后考评合格就可以直接录用为正式公务员等优厚待遇有关。

相关分析表明,大学生村干部 SCL-90 得分与神经质、精神质、消极应对方式有显著的正相关,与积极应对方式和内外向有显著的负相关;神经质和应对方式能显著地预测心理健康,解释率达 58.91%。人格是构成一个人的思想、情感及行为的特有模式,人格特征影响心理健康水平^[16-17];应对方式作为调节心理健康的一种中介变量,受到个性和情绪的影响,也与心理健康密切相关^[18-19]。通过结构方程模型可以看出,积极应对方式对心理健康产生直接正性的影响,而神经质和消极应对方式却对心理健康水平起着反作用,而且不同个性的大学生村干部也通过积极应对方式对心理健康有积极的影响。这提示:大学生村干部心理健康与个性和应对方式有密切的关系。大学生村干部外向开朗的性格、稳定的情绪和积极的应对方式有利于心身健康,在面临困扰时,理智地分析问题,积极主动地采取行动,能有效地减轻压力事件对个体心身的不良影响。因此,应重视大学生村干部培训中积极应对方式的训练,对于进一步做好大学生村干部培养和选任工作,加快农村人才队伍建设的步伐,具有重要的现实意义。

参考文献:

[1] 孙萍,杨建平. 大学生情商水平与职业成熟度相关分析[J]. 重庆医学,2011,40(9):920-921.
[2] 杜文好. 大学生村干部压力及其应对方式调查[J]. 中国健康心理学杂志,2012,20(2):291-293.
[3] 李景华,白瑾. 173 名大学生村官心理健康现状调查研究[J]. 中国健康心理学杂志,2012,20(1):47-50.
[4] 王卫平,牛利,薛朝霞,等. 大学生村干部应付方式特点及其对心理健康水平的影响[J]. 山西高等学校社会科学学报,2011,23(11):103-104.
[5] 廖文斌,余定波. 大学生村干部心理健康状况调查[J]. 中国健康心理学杂志,2010,18(4):503-504.
[6] 张作记. 行为医学量表手册[M]. 北京:中华医学电子音像出版社,2005.

[7] 龚耀先. 修订艾森克个性问卷手册[M]. 长沙:湖南地图出版社,1992.
[8] 汪向东,王希林,马弘. 心理卫生评定量表手册[M]. 增订版. 北京. 中国心理卫生杂志社,1999.
[9] 童辉杰. SCL-90 量表及其常模 20 年变迁之研究[J]. 心理学科学,2010,33(4):928-930.
[10] 金华. 中国正常人 SCL-90 评定结果的初步分析[J]. 中国神经精神疾病杂志,1986,12(5):260-263.
[11] 王挺,杜文东. 江苏省大学生 SCL-90 常模修订[J]. 南京中医药大学学报:社会科学版,2007,8(1):38-41.
[12] 张怡,刘艳萍,高宝营,等. 大学生心理健康状况调查及其分析[J]. 第四军医大学学报,2007,28(22):2112.
[13] 邢海燕,王建华,高向华,等. 普通高校大学生心理健康状况调查分析[J]. 现代预防医学,2009,36(23):4496-4497,4450.
[14] 任丹阳,张津凡. 公务员心理健康状况及其心理援助对策[J]. 沈阳师范大学学报:社会科学版,2011,35(1):132-134.
[15] 向建,都沙,欧书阳. 重庆市女性职业认知现状与提升对策-基于对重庆女性素质的实证调查[J]. 商场现代化,2010(24):160-161.
[16] 马红霞,李建明,崔向军,等. 医学院校大学新生人格特征与心理健康的关系研究[J]. 中国健康心理学杂志,2010,18(7):858-860.
[17] Peng L, Zhang J, Li M, et al. Negative life events and mental health of Chinese medical students; the effect of resilience, personality and social support[J]. Psychiatry Res, 2012,196(1):138-141.
[18] Luo Y, Wang H. Correlation research on psychological health impact on nursing students against stress, coping way and social support[J]. Nurse Educ Today, 2009, 29(1):5-8.
[19] Steiner H, Erickson SJ, Hernandez NL, et al. Coping styles as correlates of health in high school students[J]. J Adolesc Health, 2002,30(5):326-335.

(收稿日期:2012-09-18 修回日期:2012-12-20)

(上接第 1501 页)

[J]. Nucleic Acids Res, 2009,37(9):2854-2866.
[12] Michael WS, Yoshihiro M, Lawrence AL. High fidelity and lesion bypass capability of human DNA polymerase [J]. Biochimie, 2009,91(9):1163-1172.
[13] Narita T, Tsurimoto T, Yamamoto J, et al. Human replicative DNA polymerase δ can bypass T-T(6-4) ultraviolet photoproducts on template strands[J]. Genes Cells, 2010, 15(12):1228-1239.

[14] Meng X, Zhou YJ, Lee EC, et al. The p12 subunit of human polymerase δ modulates the rate and fidelity of DNA synthesis[J]. Biochemistry, 2010,49(17):3545-3554.
[15] 张德勇,周继勇,陈吉刚. 反义核酸技术的研究进展[J]. 中国预防兽医学报,2002,24(2):79-82.
[16] 易浚飞,兰小鹏. 反义核酸技术应用难点及研究进展[J]. 生物技术通讯,2007,82(4):655-659.

(收稿日期:2012-09-08 修回日期:2012-12-22)