

人骨形态发生蛋白2和人成纤维细胞生长因子2双基因共表达腺病毒载体的构建及鉴定*☆

郭伟韬, 刘思景, 王辉, 肖启贤, 陈子秋, 黄云, 王斌

Construction and identification of recombinant adenovirus vector co-expressing human bone morphogenetic protein 2 and fibroblast growth factor 2 genes

Guo Wei-tao, Liu Si-jing, Wang Hui, Xiao Qi-xian, Chen Zi-qiu, Huang Yun, Wang Bin

Abstract

Department of Orthopaedics, Affiliated Hospital of Guangdong Medical College, Zhanjiang 524001, Guangdong Province, China

Guo Wei-tao ☆, Doctor, Associate chief physician, Department of Orthopaedics, Affiliated Hospital of Guangdong Medical College, Zhanjiang 524001, Guangdong Province, China
Guoweitao2000@sina.com

Supported by: the Natural Science Foundation of Guangdong Province, No. 8452402301001081*

Received: 2010-03-23
Accepted: 2010-04-30

广东医学院附属医院骨科, 广东省湛江市 524001

郭伟韬 ☆, 男, 1969 年生, 河南省禹州市人, 汉族, 2005 年华南科技大学同济医学院毕业, 博士, 副主任医师, 主要从事骨科基础与临床研究。广东医学院附属医院骨科, 广东省湛江市 524001
Guoweitao2000@sina.com

中图分类号: R318
文献标识码: B
文章编号: 1673-8225 (2010)24-04402-05

收稿日期: 2010-03-23
修回日期: 2010-04-30
(20100323025/WJ-Z)

BACKGROUND: The upstream and downstream genes can be co-transcribed by internal ribosome entry site (IRES) sequence, by which human bone morphogenetic protein 2 (hBMP2) and human fibroblast growth factor 2 (hFGF2) genes can be highly co-expressed, thus, it provides a new way for repairing bone defects.

OBJECTIVE: To construct the recombinant adenovirus vector co-expressing hBMP2 and hFGF2 depending on IRES sequence by λ phage-site specific recombination systems and to verify the correct recombination.

METHODS: BMP-2cDNA and FGF-2 cDNA were amplified by PCR, and were subcloned into the pIRES2-EGFP plasmid to obtain pHMP2-IRES-hFGF2 plasmid. It was subcloned into entry vector pDONR221 by BP reaction and subcloned into pAd/CMV/V5-DEST vector by LR reaction and linearization transfection 293 cells to obtain pAd-hBMP2-IRES-hFGF2.

RESULTS AND CONCLUSION: The target gene of hBMP2-IRES-hFGF2 was transferred into AD/CMV/V5-DEST vector correctly and it was confirmed by sequencing. The expression clone pAd-hBMP2-IRES-hFGF2 was packaged into matured adenovirus successfully; the titer of Ad-hBMP2-IRES-hFGF2 was 2.82×10^{10} ifu/mL. The results demonstrated that adenovirus vector co-expressing hBMP2 and hFGF2 are constructed successfully.

Guo WT, Liu SJ, Wang H, Xiao QX, Chen ZQ, Huang Y, Wang B. Construction and identification of recombinant adenovirus vector co-expressing human bone morphogenetic protein 2 and fibroblast growth factor 2 genes. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2010;14(24): 4402-4406. [http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

摘要

背景: 内部核糖体进入位点序列载体能将上下游基因共同转录, 故通过此载体可使连接在一起的人骨形态发生蛋白 2 和人成纤维细胞生长因子 2 同时高表达, 可为骨缺损的治疗提供新方法。

目的: 实验通过引入内部核糖体进入位点序列, 采用基于 attLXattR 的 λ 噬菌体位点特异性重组系统的 Gateway™ 技术构建带有人骨形态发生蛋白 2 和人成纤维细胞生长因子 2 双基因重组腺病毒载体并进行鉴定。

方法: 用聚合酶链反应方法扩增人骨形态发生蛋白 2 和人成纤维细胞生长因子 2 目的基因, 将两个基因亚克隆至 pIRES2-EGFP 载体中, 构建 pHMP2-IRES-hFGF2 载体, 通过 BP 反应将 hBMP2-IRES-hFGF2 重组到载体 pDONR221 中, 再通过 LR 反应将其转移到腺病毒载体 pAd/CMV/V5-DEST 中, 线性化后转染 293 细胞进行包装获得重组腺病毒 Ad-hBMP2-IRES-hFGF2。

结果与结论: pHMP2-IRES-hFGF2 经酶切及测序鉴定正确, 带 hBMP2-IRES-hFGF2 的载体在 293 细胞中包装成功, 获得成熟的病毒颗粒, 病毒滴度为 2.82×10^{10} ifu/mL, 证实成功构建了带有人骨形态发生蛋白 2 和人成纤维细胞生长因子 2 双基因重组腺病毒载体。

关键词: 人骨形态发生蛋白 2; 人成纤维细胞生长因子 2; 腺病毒载体; 内部核糖体进入位点序列; 转染; 基因治疗

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2010.24.008

郭伟韬, 刘思景, 王辉, 肖启贤, 陈子秋, 黄云, 王斌. 人骨形态发生蛋白 2 和人成纤维细胞生长因子 2 双基因共表达腺病毒载体的构建及鉴定[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010, 14(24):4402-4406.

[http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

0 引言

骨缺损和骨不连一直是骨科治疗的难题。通过基因治疗将骨诱导因子基因导入特定部位, 持续表达细胞因子并以自分泌/旁分泌形式可诱导骨再生, 将使骨缺损和骨不连的治疗发生革命性变化。具有提高骨愈合能力的各种因子已被研究, 在众多骨生长因子中, 人骨形态发生蛋白 2 (human bone morphogenetic protein-2, hBMP-2) 和人成纤维细胞生长因子 2

(human fibroblast growth factor-2, hFGF-2) 在骨愈合过程中发挥重要作用, 两者具有协同效应, 联合应用比单独应用更有效促进骨修复^[1]。目前基因转染的方法较多, 腺病毒载体因具有宿主范围广, 对人致病性低^[2-3], 繁殖滴度高, 性质稳定包容量大及不整合等优点, 而成为目前基因治疗中广泛使用的载体之一^[4]。

实验通过内部核糖体进入位点序列 (internal ribosome entry site, IRES) 构建携带 hBMP2 和 hFGF2 双基因的重组腺病毒载体, 为骨缺损和骨不连的治疗提供新的思路和方法。

1 材料和方法

设计: 细胞基因学实验。

时间及地点: 于2009-09/2010-02在广东医学院附属医院中心实验室完成。

试剂及仪器:

试剂及仪器	来源
pUC57-FGF2, pOTB7-hBMP2	美国 ATCC 公司
pIRES2-EGFP, pDONR221, pAD/CMV/V5-DEST, 病毒载体重组酶, PCR 试剂盒, Opti-MEM Lipofectamine 2000	美国 Invitrogen 公司
荧光显微镜	德国 Zeiss 公司

实验方法:

phBMP2-IRES-hFGF2载体构建: 通过PCR技术从质粒pUC57-hFGF2克隆出FGF序列。

两条引物FGF2-F, FGF2-R信息:

Gene	Primer (5'-3')	Product size (bp)
FGF2-F	GTG TAG cca caa cca tgg CAG CCG GGA GCA TC	468 bp
FGF2-R	GCG CAT tct aga TCA GCT C TTA GCA GAC ATT GGAAG	
BMP2-F	ATG CAT aga tct ATG GTG G CCG GGA CCC GCT G	1 191 bp
BMP2-R	CTG GAA gaa ttc CTA GC GAC ACC CAC AAC CC	
BMP2-F1	GGT TTT CCG AGAAC AGA TGCA	183 bp
BMP2-R1	GCG GGG GTG ACAT CAA AAC	

正向添加*Bst* XI酶切位点, 反向添加*Xba* I酶切位点, 回收PCR产物, 用*Bst* XI和*Xba* I对目的基因FGF2和载体pIRES2-EGFP进行双酶切, 回收目的基因的片段和载体, 构建载体pIRES-hFGF2。转化至DH5 α 感受态细胞。通过菌落PCR筛选阳性克隆^[6], 将菌落PCR和双酶切鉴定正确的重组克隆进行测序验证。

通过PCR技术从质粒pOTB7-hBMP2克隆出hBMP-2序列, 两条引物BMP2-F和BMP2-R和用于测序和菌落PCR鉴定的两条引物为BMP2-F1和BMP2-R1的信息见上表。

正向添加*Bgl* II酶切位点, 反向添加*EcoR* I酶切位点, 回收PCR产物, 用*Bgl* II和*EcoR* I对目的基因hBMP-2和载体pIRES-hFGF2进行双酶切, 回收目的基因的片段和载体, 构建载体phBMP2-IRES-hFGF2。转化至DH5 α 感受态细胞。通过菌落PCR筛选阳性克隆,

将菌落PCR和双酶切鉴定正确的重组克隆进行测序验证。

腺病毒表达载体pAd-hBMP2-IRES-hFGF2重组: 设计BP重组引物。

引物信息:

Gene	Primer (5'-3')
BMP2-ATTB1	GGG GAC AAG TTT GTA CAA AAA AGC AGG C TTC GCC ACC ATG GTG GCC GGG ACC CGC T
FGF2-ATTB2	GGG GAC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GTC TCA GCT CTT AGC AGA CAT TGG AAG

以构建好的phBMP2-IRES2-hFGF2载体为模板, 扩增hBMP-2-IRES-hFGF2重组片段。回收PCR产物后, 使用美国Invitrogen公司的BP重组系统将目的片段hBMP-2-IRES-hFGF2重组到载体pDONR221上, 筛选阳性克隆^[6]。

使用美国Invitrogen公司的LR重组系统将目的序列hBMP2-IRES-hFGF2重组到腺病毒载体pAd/CMV/V5-DEST。命名为: pAd/CMV/V5-DEST-hBMP2-IRES-hFGF2(简称pAd-hBMP2-IRES-hFGF2)筛选阳性克隆并测序验证, 保留测序验证正确的LR重组质粒。质粒经PacI线性化后酶切质粒纯化^[7]。

重组腺病毒Ad-hBMP2-IRES-hFGF2的包装、扩增及纯化: 质粒pAd-hBMP2-IRES-hFGF2经PacI线性化后, 将4 μ g DNA稀释于250 μ L无血清无抗生素的Opti-MEM培养液中轻轻混匀; 将10 μ L Lipofectamine 2000转染293细胞, 同时取平行对照质粒pAd-EGFP转染293细胞, 细胞密度约在80%, 转染后24~48 h荧光显微镜观察转入基因表达情况, 收集包装好的病毒上清液, 取1/2病毒上清感染293细胞, 4~7 d后收集细胞, 反复冻融收集病毒上清液, 再感染293细胞^[8]。重复上述步三四次, CsCl密度梯度离心纯化, 透析收集病毒, 通过免疫法快速检测病毒滴度, 病毒液分装于-80 $^{\circ}$ C保存。

重组腺病毒Ad-hBMP2-IRES-hFGF2 PCR鉴定: 以提取的pAd-hBMP2-IRES-hFGF2病毒液的基因组DNA为模板, 以pAd-EGFP病毒液的基因组DNA为模板作对照, 引物分别对应FGF2, BMP2(F1/R1), BMP2(F/R), 进行PCR, 产物用质量浓度10 g/L琼脂糖电泳进行鉴定。

主要观察指标: 重组质粒载体phBMP2-IRES-hFGF2的鉴定, 重组腺病毒Ad-hBMP2-IRES-hFGF2的鉴定及滴度测定。

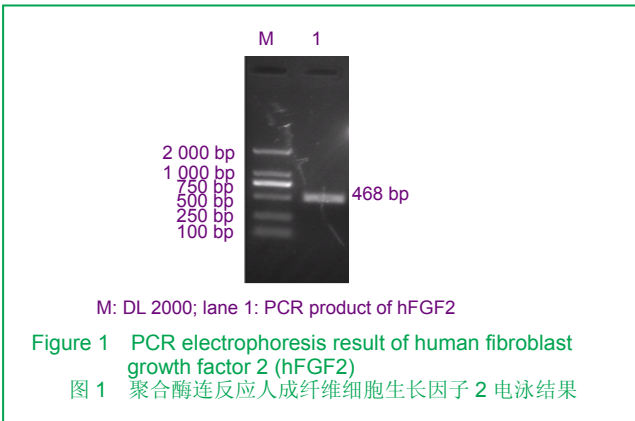
设计、实施、评估者: 实验设计、实施、评估均为文章全部作者, 均经过系统培训, 未采用盲法评估。

2 结果

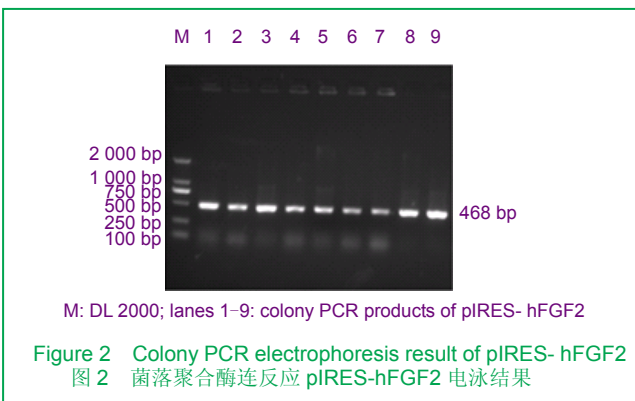
2.1 phBMP2-IRES-hFGF2载体构建及鉴定 实验成

功从pUC57-hFGF2和pOTB7-hBMP2质粒中扩增出hFGF2和hBMP2基因, 并成功的将目的基因hFGF2替换EGFP和hBMP2分别插入pIRES2-EGFP中, 对重组质粒phBMP2-IRES-hFGF2进行菌落PCR和双酶切鉴定结果正确, 测序结果经BLAST比对分析, 表明目的基因序列与GeneBank中的hBMP2 mRNA序列(BC069214)和hFGF2 mRNA序列片段(NM_002006)的编码序列完全一致, 插入方向及阅读框均正确。

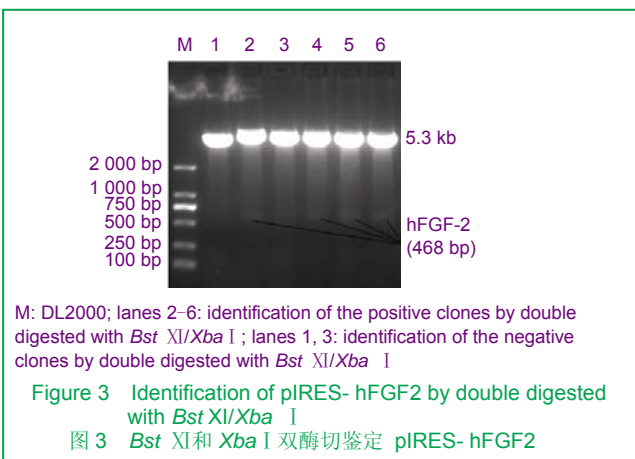
PCR扩增hFGF2琼脂糖电泳结果: 见图1。



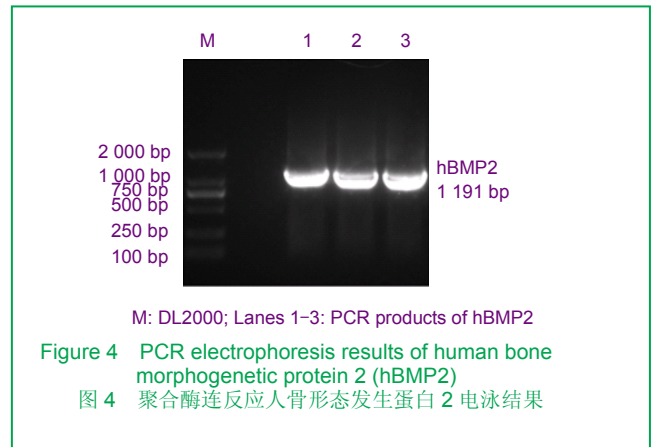
菌落PCR鉴定pIRES- hFGF2电泳结果: 见图2。



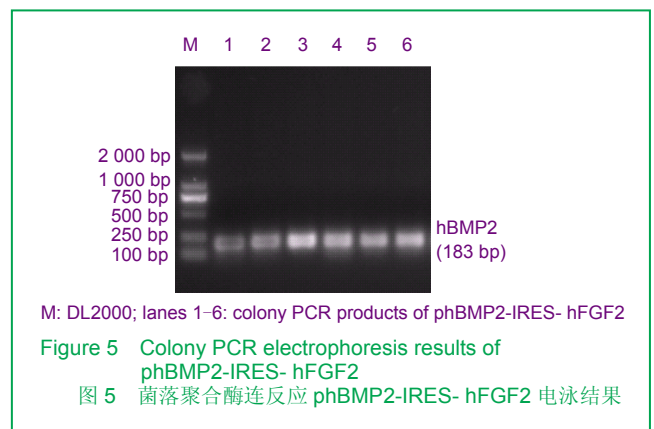
酶切鉴定pIRES- hFGF2: 见图3。



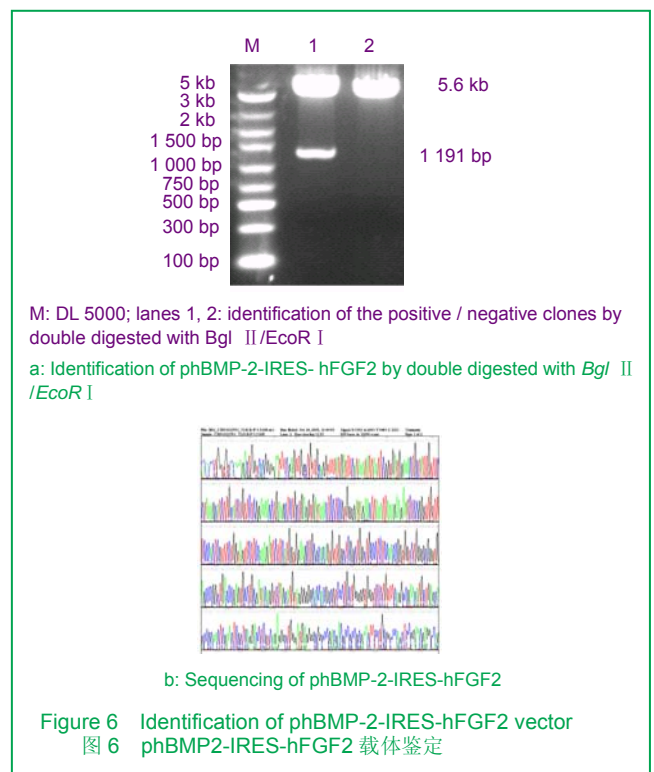
PCR扩增BMP2琼脂糖电泳结果: 见图4。



菌落PCR鉴定phBMP2-IRES- hFGF2电泳结果: 见图5。



酶切鉴定phBMP2-IRES-hFGF2电泳结果: phBMP2-IRES- hFGF2电泳结果及鉴定结果见图6。



2.2 重组腺病毒表达载体 pAd-hBMP2-IRES-FGF2 的鉴定 重组腺病毒表达载体 pAd-hBMP2-IRES-FGF2 经 BP 和 LR 重组测序后均正确, 见图 7。

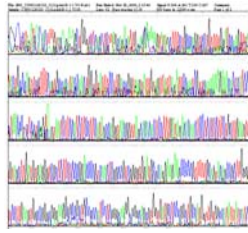


Figure 7 Identification of pAd-hBMP2-IRES-hFGF2 by sequencing
图 7 pAd-hBMP2-IRES-FGF2 测序鉴定结果

2.3 重组腺病毒 pAd-hBMP2-IRES-hFGF2 的鉴定及滴度测定

重组腺病毒 pAd-hBMP2-IRES-hFGF2 转染 293 细胞: 质粒转染 293 细胞 48 h 后显微镜下观察 pAd-BMP2-IRES-FGF2 包装组和 pAd-EGFP 平行对照组反应相似, 细胞形态未见明显变化, 细胞聚集较多, 见图 8, 9。荧光显微镜下观察 pAd-EGFP 平行对照组转染 48 h 后见绿色荧光蛋白表达, 说明重组腺病毒包装成功, 见图 9。



Figure 8 Morphology of 293 cells at 48 h after transfected by pAd-hBMP2-IRES-hFGF2 plasmid ($\times 100$)
图 8 pAd-hBMP2-IRES-hFGF2 质粒转染 293 细胞 48 h 后细胞形态学 ($\times 100$)

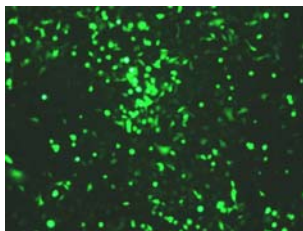
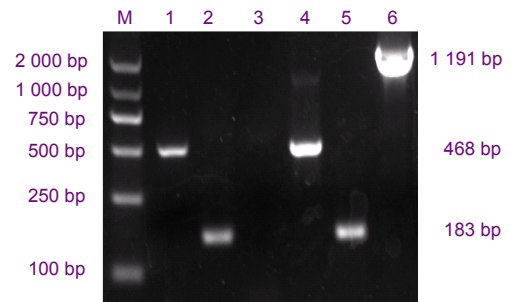


Figure 9 Morphology of 293 cells at 48 h after being transfected by pAd-EGFP plasmid (Fluorescent microscopy, $\times 100$)
图 9 pAd-EGFP 质粒转染 293 细胞 48 h 后细胞形态 (荧光显微镜, $\times 100$)

重组腺病毒 pAd-hBMP2-IRES-hFGF2 PCR 鉴定及病毒滴度测定: 见图 10。病毒液目的基因 PCR 鉴定, 1~3 泳道以 pAd-EGFP 病毒液的基因组 DNA 为模板作为对照组, 4~6 泳道以提取的 pAd-hBMP2-IRES-hFGF2 病毒液

的基因组 DNA 为模板作为实验组。1 和 4 泳道引物 FGF2(F/R) 扩增片段 468 bp, 在目的病毒和对照病毒中均扩增到片段, 但对照病毒中的条带更亮, 表明病毒液中该基因顺利整合。2 和 5 泳道引物 BMP2(F1/R1) 扩增片段 183 bp, 在目的病毒和对照病毒中均扩增到片段, 为非特异性扩增。3 和 6 泳道引物 BMP2(F/R) 在目的病毒中扩增到片段, 而在对照病毒中没有扩增到。目的病毒中成功整合了 hBMP2 和 hFGF2 基因。经多次重复感染后, 病毒滴度达 2.82×10^{10} ifu/mL。



M: DL2000; lanes 1-3: pAd-EGFP control; lanes 4-6: pAd-hBMP2-IRES-hFGF2

Figure 10 Identification of recombinant adenovirus pAd-BMP2-IRES-hFGF2 by PCR

图 10 聚合酶链反应鉴定 pAd-hBMP2-IRES-hFGF2 重组腺病毒

3 讨论

骨不连和骨缺损的治疗需要多种细胞生长因子的参与, 以 BMP-2 和 FGF-2 的研究最广泛。目前国内关于 BMP-2 基因治疗的研究也正成为热点, BMP 可诱导未分化间充质细胞向软骨细胞和成骨细胞方向分化, 进而形成新骨的能力^[9], 因此 BMP 在骨折和骨缺损的修复过程中发挥着重要作用。有研究利用基因工程技术对其基因进行克隆和表达, 制备出重组 hBMP-2 进行骨修复的研究和临床应用^[10-12]。侯锐等^[13]用重组 hBMP-2 复合骨髓间充质干细胞及珊瑚构建的组织工程骨移植到新西兰兔颅骨缺损处, 16 周后颅骨缺损得到有效修复。

骨的修复过程需要很多细胞因子的参与, 以往的研究忽视了骨组织工程的血管化, 血管的形成过程贯穿骨愈合的整个过程中。hFGF-2 是纤维细胞生长因子家族成员之一, 能诱导多种细胞分化与增殖, 促进血管系统形成, 参与组织的创伤修复, 是重要的创伤愈合因子之一。郑启新等^[14]体外将 hFGF-2 基因转入种子细胞并与 β -磷酸三钙多孔基质材料复合移植, 修复同种异体兔挠骨骨节段性骨缺损。结果表明实验组骨缺损正常修复, 有大量活跃的新骨及丰富的毛细血管生成; 且转基因细胞可持续表达 FGF-2 至少 4 周以上。

目前基因治疗研究最多的是单基因治疗, 不能满足

治疗的需要。国内外也有研究双基因转染骨髓基质细胞治疗骨缺损, 但大多是将两个目的基因分别构建在不同的载体上, 导致两个基因总表达效率低下。利用多启动子表达载体进行多基因治疗, 需要的载体过于庞大, 操作困难。双基因的融合表达的方法可能因蛋白的结构相互作用而影响其功能。由于pIRES双基因表达载体含有IRES序列, 具有内核糖体进入位点的功能, 能将其上下游基因共同转录^[15], 故可将通过IRES连接在一起的BMP-2和FGF-2同时转录成一条单链mRNA, 再各自独立的进行翻译和表达, 保证了IRES上下游基因共同的高表达。利用IRES代替内部启动子不但可以使多基因共表达载体大大减少, 而且还克服了传统多基因表达载体中启动子之间的相互抑制现象^[16]。由于腺病毒包装的容量有限, 因此利用IRES序列构建双基因共表达结构对于腺病毒的包装极为有利。本实验经鉴定证实外源目的基因已成功包装入重组腺病毒中。

基因治疗也应考虑选择安全有效的载体系统, 在骨修复的研究中, 选用复制缺陷型腺病毒载体, 目的基因在体内表达的时间持续数周或数月后消失, 正好符合骨修复基因治疗的要求, 不用担心持续的过度表达引起骨质增生过度、以及可能的致瘤性。此外, 腺病毒不整合到宿主细胞的基因组中, 无插入突变危险, 也可允许两种以上基因同时引入, 满足骨修复过程中对多种细胞因子的需求。因此, 腺病毒是骨修复研究中较为理想的基因表达载体。

鉴于以上观点, 实验以骨组织工程种子细胞的成血管和成骨为研究的出发点, 通过PCR的方法成功获得hBMP-2和hFGF-2基因, 采用GatewayTM克隆技术, 并利用IRES序列成功构建了hBMP-2和hFGF-2双基因共表达重组腺病毒载体, 经测定重组腺病毒滴度达 2.82×10^{10} ifu/mL, 为下一步转染骨髓基质细胞促进其成骨分化, 改良骨组织工程种子细胞, 最终用于治疗骨不连和骨缺损提供实验基础。

4 参考文献

[1] Alam S, Ueki K, Marukawa K, et al. Expression of bone morphogenetic protein 2 and fibroblast growth factor 2 during bone regeneration using different implant materials as an onlay bone graft in rabbit mandibles. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2007;103(1):16-26.

[2] Rubin A, Mobley B, Hogikyan N, et al. Delivery of an adenoviral vector to the Crushed recurrent laryngeal nerve. *Laryngoscope.* 2003;113(6):985-989.

[3] Connelly S, Mech C. Delivery of adenoviral DNA to mouse liver. *Methods Mol Biol.* 2004;246:37-52.

[4] Goncavle MA, de Vries AA. Adenovirus: from foe to friend. *Rev med Virol.* 2006;16(3):167-186.

[5] Hu W, Xiang H, Zhou Y, et al. Shengwujishu Tongbao. 1999;15(6):39-43.

胡维, 向华, 周艳, 等. 用PCR法直接快速筛查重组阳性克隆[J]. 生物技术通报, 1999, 15(6):39-43.

[6] liang XJ, Chen XJ, Jing L, et al. *Zhongguo Zuzhigongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu.* 2009;13(15):2931-2936.

梁旭竟, 陈小佳, 金玲, 等. 人端粒酶反转录酶和绿色荧光蛋白融合基因慢病毒表达载体的构建[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2009, 13(15):2931-2936.

[7] Jiang HM, Long J, Tang W, et al. *Xiandai Shengwu Yixue Jinzhang.* 2008;8(2):209-212.

蒋红梅, 龙洁, 汤炜, 等. 采用GatewayTM技术构建人骨形态发生蛋白-2基因重组腺病毒载体[J]. 现代生物医学进展, 2008, 8(2):209-212.

[8] Qin N, Deng YC, Che HL, et al. *Disi Junyi Daxue Xuebao.* 2009;30(9):771-774.

秦娜, 邓艳春, 车红磊, 等. ndrg2基因2种亚型重组腺病毒载体的构建[J]. 第四军医大学学报, 2009, 30(9):771-774.

[9] Yue B, Lu B, Dai KR, et al. BMP-2 gene therapy on the repair of bone defects of aged rats. *Calcified Tissue Int.* 2005;77(6):395-403.

[10] Yoneda M, Terai H, Imai Y, et al. Repair of an intercalated long bone defect with a synthetic biodegradable bone-inducing implant. *Biomaterials.* 2005;26(25):5145-5152.

[11] Wang JC, Kanim LE, Yoo S, et al. Effect of regional gene therapy with bone morphogenetic protein-2 producing bone marrow cells on spinal fusion in rats. *J Bone Joint Surgery.* 2003;85(5):905-911.

[12] Sun DM, Hou SX, Fu XB. *Chuangshang Waikexue Zazhi.* 2006;8(4):344-347.

孙大铭, 侯树勋, 付小兵. 骨形成蛋白2重组腺病毒的构建及异位诱导成骨的研究[J]. 创伤外科杂志, 2006, 8(4):344-347.

[13] Hou R, Mao TQ, Yang YW, et al. *Zhonghua Chuangshang Zazhi.* 2005;21(9):702-706.

侯锐, 毛天球, 杨耀武, 等. 复合支架材料构建组织工程骨修复兔颅骨缺损[J]. 中华创伤杂志, 2005, 21(9):702-706.

[14] Zheng QX, Guo XD, Liu Y, et al. *Zhongguo Shengwu Yixue Gongcheng Xuebao.* 2003;22(2):171-176.

郑启新, 郭晓东, 刘勇, 等. bFGF基因修饰的间充质干细胞/多孔β-TCP陶瓷复合移植修复兔节段性骨缺损[J]. 中国生物医学工程学报, 2003, 22(2):171-176.

[15] Pisarev AV, Shirokikh N E, Hellen CU. Translation initiation by factor independent binding of eukaryotic ribosomes to internal ribosomal entry sites. *C R Biol.* 2005;328(7):589-605.

[16] Huang XH, Shi ZB, Wang KZ, et al. *Zhongguo Xiufu Chongjian Waikexue Zazhi.* 2008;22(7):807-813.

黄向辉, 时志斌, 王坤正, 等. hVEGF165及hBMP-7双基因共表达腺病毒载体的构建及鉴定[J]. 中国修复重建外科杂志, 2008, 22(7):807-813.

来自本文课题的更多信息--

基金资助: 广东省自然科学基金资助项目 (8452402301001081)。

利益冲突: 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

课题的意义: 利用 IRES 序列构建双基因共表达载体。hBMP-2 和 hFGF-2 共转染骨髓基质细胞向成骨分化、体内促进骨折愈合和修复骨缺损机制, 为骨组织工程种子细胞的改良提供实验依据, 为多基因联合治疗骨不连和骨缺损奠定实验基础。

课题评估的“金标准”: 应用 DNA 测序证实 hBMP-2 基因全长和 hFGF-2 基因片段已经正确插入 pIRES 载体中, 并提取 Ad-hBMP2-IRES-hFGF2 测序鉴定, 证实重组腺病毒构建成功。

设计或课题的偏倚与不足: 课题未使用其他的双基因表达载体做对照, 也未与两个目的基因构建在不同的载体上再共转染对照。

提供临床借鉴的价值: 实验为下一步转染骨髓基质细胞促进其成骨分化, 改良骨组织工程种子细胞, 最终用于治疗骨不连和骨缺损提供实验基础。