

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2012.50.012

[http://www.crter.org/crter-2012-qikanquanwen.html]

邱俊钦, 尹承慧, 曾昭勋, 陈宗雄. 人骨形态发生蛋白2基因重组腺病毒的构建与鉴定[J]. 中国组织工程研究, 2012, 16(50): 9376-9381.

人骨形态发生蛋白2基因重组腺病毒的构建与鉴定**

邱俊钦, 尹承慧, 曾昭勋, 陈宗雄

解放军南京军区
福州总医院骨科
研究所, 福建省福
州市 350025邱俊钦★, 男,
1984年生, 福建
省长乐市人, 汉
族, 福建医科大学
福总临床医学院
在读硕士, 主要从
事脊柱伤病与四
肢创伤研究。
shengqiu031304
7@yahoo.
com.cn通讯作者: 尹承
慧, 副主任医师,
解放军南京军区
福州总医院骨科
研究所, 福建省福
州市 350025
chenghuiyin@
hotmail.com中图分类号:R318
文献标识码:B
文章编号:2095-4344
(2012)50-09376-06收稿日期:2012-04-01
修回日期:2012-05-23
(20120201018/D·T)

文章亮点: 于体外构建并鉴定表达人骨形态发生蛋白 2 基因的重组腺病毒, 将带有目的基因的腺病毒表达载体和携带有腺病毒大部分基因的辅助包装质粒共转染 293 细胞进行病毒包装扩增, 成功构建了携带有人骨形态发生蛋白 2 基因的重组腺病毒载体。

关键词: 人骨形态发生蛋白 2; 病毒; 293 细胞; 腺病毒载体; 基因转染;

摘要

背景: 骨形态发生蛋白 2 是诱导成骨关键物质, 参与调节从细胞增殖、决定种系分化方向到细胞死亡等一系列的生物过程。

目的: 利用 AdMax 系统构建人骨形态发生蛋白 2 基因的重组腺病毒载体并鉴定。

方法: 以人 cDNA 为模板 PCR 扩增人骨形态发生蛋白 2 基因, 转化 *E.coli* 感受态细胞, 经菌落 PCR 鉴定阳性转化子、阳性克隆测序无误后, 扩增、抽提。将带有目的基因的腺病毒表达载体和携带有腺病毒大部分基因的辅助包装质粒共转染 293 细胞进行病毒包装扩增, PCR 检测目的基因、Western Blot 检测目的蛋白及终点稀释法检测病毒滴度。

结果与结论: PCR 获得长度为 1 223 bp 的人骨形态发生蛋白 2 目的基因片段, 同源重组表达载体经阳性克隆 PCR 及测序鉴定, 结果正确。293 细胞内包装、扩增, 经 Western blot 及 PCR 鉴定无误后, 获得病毒滴度为 5×10^{13} pfu/L 的重组腺病毒。实验成功构建携带有人骨形态发生蛋白 2 基因的重组腺病毒载体。

Construction and identification of recombinant adenovirus vectors encoding human bone morphogenetic protein 2

Qiu Jun-qin, Yin Cheng-hui, Zeng Zhao-xun, Chen Zong-xiong

Abstract

BACKGROUND: Bone morphogenetic protein 2 plays a key role in inducing osteogenesis. It involves in a series of bioprocess, including cell proliferation, determining the differentiation direction of germ line and cell death.

OBJECTIVE: To construct and identify the recombinant adenovirus vectors encoding human bone morphogenetic protein 2 gene by using AdMax system.

METHODS: First, human bone morphogenetic protein 2 gene sequencing was amplified by PCR from human cDNA template and then cloned. Second, the recombinant shuttle plasmid was constructed and transformed into *Escherichia coli* competent cells DH5 α . After the positive colonies were identified by colonies PCR and sequencing, the expression vectors were amplified and extracted. Next, the adenovirus expression vectors with target gene and the helper packaging plasmid carrying a majority of adenovirus genes were co-transfected into 293 cells for virus packaging and amplification. Finally, target genes were detected by PCR, and target protein was detected by Western blot method, as well as infectious titer of the recombinant adenovirus was detected by end point dilution method.

RESULTS AND CONCLUSION: Gene fragment of a length of 1 223 bp human bone morphogenetic protein 2 was obtained by PCR. The expression vectors constructed by homologous recombination techniques were identified by PCR cloning and sequencing; the results were correct. After virus packaging and amplification in 293 cells were identified by Western blot and PCR methods, the virus titer of recombinant adenovirus was 5×10^{13} pfu/L. These results suggest that the recombinant adenovirus vectors carrying human bone morphogenetic protein 2 gene have been constructed successfully.

Qiu JQ, Yin CH, Zeng ZX, Chen ZX. Construction and identification of recombinant adenovirus vectors encoding human bone morphogenetic protein 2. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2012;16(50): 9376-9381.

0 引言

骨形态发生蛋白是多功能生长因子, 属于转化生长因子 β 超家族^[1], 是一组具有类似结构的高度保守的功能蛋白, 现有40余种亚型, 其中以骨形态发生蛋白2作用最强^[2]。骨形态发生蛋白2是诱导成骨关键物质^[3, 4], 它参与调节从细胞增殖、决定种系分化方向到细胞死亡等一系列的生物过程。因此, 实验通过基因工程技术, 于体外构建并鉴定表达人骨形态发生蛋白2基因的重组腺病毒, 为进一步研究其转染靶细胞修复骨缺损的机制及疗效奠定基础。

1 材料和方法

设计: 单一样本观察。

时间及地点: 实验于2010年4月至2011年3月在解放军南京军区福州总院实验室完成。

材料:

试剂	来源
人骨形态发生蛋白2 cDNA引物合成	Open biosystems 公司 上海捷瑞生物工程 有限公司
In-Fusion™ PCR Cloning Kit	Clontech 公司
人 cDNA、DH5 α 感受态细胞, 琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒	Takara 公司
pAV-MCMV-GFP-3FLAG (sbo-bio)、SunBio Trans-EZ 病毒载体制备转染试剂	上海生博医学生物工程 科技有限公司
EcoR I	NEB 公司
QIAamp DNA Blood Mini Kit	Qiagen 公司
BCA Protein Assay Kit HEK293、CA293	HyClone-Pierce 公司 ATCC、Microbix 公司

方法:

PCR引物设计及扩增目的基因: 根据人骨形态发生蛋白2基因的Genebank信息NM_001200, 运用Primer Premier 5.0软件, 设计引物。

引物序列:

上游引物: 5' CGG GTA CCG GAA TTC GCC ACC ATG GTG GCC GGG ACC C 3'
下游引物: 5' CAT GGT GGC GGA ATT GCG ACA CCC ACA ACC CTC 3'

PCR扩增目的基因行产物琼脂糖凝胶电泳、鉴定及纯化按照试剂盒要求, 以人骨形态发生蛋白2 cDNA为模板进行PCR扩增, 条件为98 °C 预变性3 min; 98 °C 10 s、55 °C 15 s、72 °C 延伸2 min(30 cycle); 72 °C 终延伸10 min。PCR产物经琼脂糖凝胶电泳、鉴定及纯化后获得目的基因人骨形态发生蛋白2克隆。

目的基因同源重组入表达载体酶切: 用EcoR I 对表达载体(pAV-MCMV-EGFP-3FLAG)进行酶切, 将PCR产物与线性化的pAV-MCMV-EGFP-3FLAG 连接转化Ecoli.DH5 α 感受态细胞, 含氨苄青霉素的LB培养基筛选, 经PCR和测序鉴定后提抽。

人骨形态发生蛋白2基因重组腺病毒包装、扩增及鉴定: ①重组腺病毒质粒转染293A细胞: 通过Trans-EZ病毒载体制备转染试剂, 将鉴定正确的重组穿梭质粒和腺病毒骨架质粒共转染293A细胞进行细胞同源重组, 观察细胞出毒迹象。待细胞大部分出现明显噬斑并从底部脱落后回收病毒, 将其加入293A细胞中继续培养, 直至扩增出足量的腺病毒。②重组腺病毒的PCR鉴定: 利用前面合成的人骨形态发生蛋白2基因的特异性引物进行PCR鉴定, PCR产物进行琼脂糖凝胶电泳分析。③重组腺病毒的Western blot鉴定: 取转染后开始病变的细胞和空病毒分别转染的293A细胞, 分别提取细胞总蛋白进行Western blot。

重组腺病毒滴度测定: ①在实验前24 h, 向96孔板每孔加入100 μ L HEK293细胞悬液, 约 1×10^3 个细胞。②准备10个无菌的Ep管, 在第一个Ep管中加入990 μ L的完全培养液, 其余的9个管子中各加入900 μ L的完全培养液。③待测病毒液的稀释: 取10 μ L腺病毒原液加入990 μ L的Ep管中做1:100稀释(10^{-2}); 然后以此为起点, 再取100 μ L稀释液加入到900 μ L的Ep管中做1:10稀释(10^{-3}), 直至稀释到 10^{-14} 。④从孵箱中取出96孔板, 在显微镜下确定每孔的细胞均生长良好。吸弃旧培养液, 然后依次将 10^{-7} - 10^{-14} 稀释的病毒液加入96孔板中, 每一稀释度占用一行, 每一行10孔重复, 每孔加入90 μ L病毒稀释液, 而每一行的第11-12孔均加入90 μ L不含病毒的完全培养基作为对照。⑤将96孔板置于置37 °C, 体积分数5%CO₂细胞培

Institute of Orthopedics, Fuzhou General Hospital of Nanjing Military Area Command of Chinese PLA, Fuzhou 350025, Fujian Province, China

Qiu Jun-qin★, Studying for master's degree, Institute of Orthopedics, Fuzhou General Hospital of Nanjing Military Area Command of Chinese PLA, Fuzhou 350025, Fujian Province, China shengqiu0313047@yahoo.com.cn

Corresponding author: Yin Cheng-hui, Associate chief physician, Institute of Orthopedics, Fuzhou General Hospital of Nanjing Military Area Command of Chinese PLA, Fuzhou 350025, Fujian Province, China chenghuiyin@hotmail.com

Supported by: Innovation Program for Young Scientific and Technological Talents of Fujian Province, No. 2005J075*

Received: 2012-04-01
Accepted: 2012-05-23

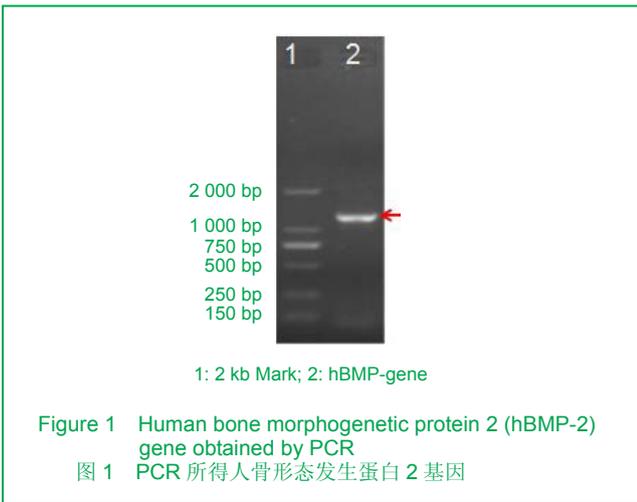
养箱中继续培养。10 d后观察细胞病变现象, 并对CPE孔进行计数, 计算每一行的阳性率, 计算病毒滴度 (Spearman-Karber Method):

$$\text{病毒滴度} = 10(x+0.8) \text{ pfu/mL} (x=10^{-1} \sim 10^{-14} \text{ 依次稀释度下 CPE 阳性率总和})$$

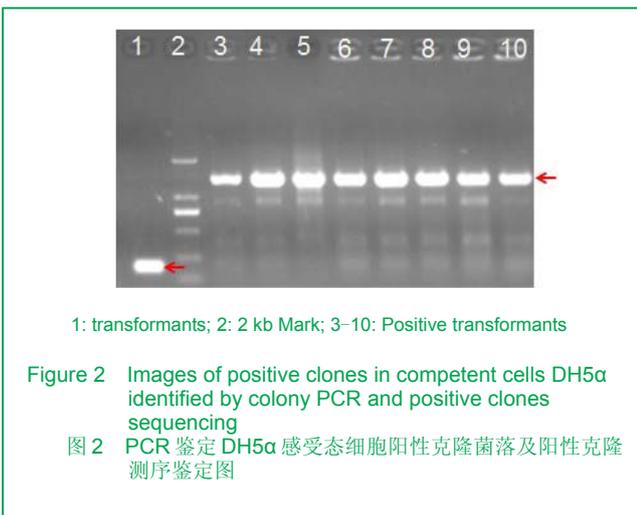
主要观察指标: ①琼脂糖凝胶电泳鉴定PCR产物条带。②目的基因重组载体转化后阳性克隆菌落PCR鉴定。③琼脂糖凝胶电泳重组腺病毒PCR产物。④Western Blot检测目的基因的表达。

2 结果

2.1 PCR法扩增人骨形态发生蛋白2基因 人骨形态发生蛋白2基因的PCR扩增产物预期长度为1.22 kb, 包含信号肽、前肽区、成熟肽及引入的酶切位点和保护碱基。PCR产物琼脂糖凝胶电泳、鉴定可见相应位置有一条高特异性条带, 见图1。

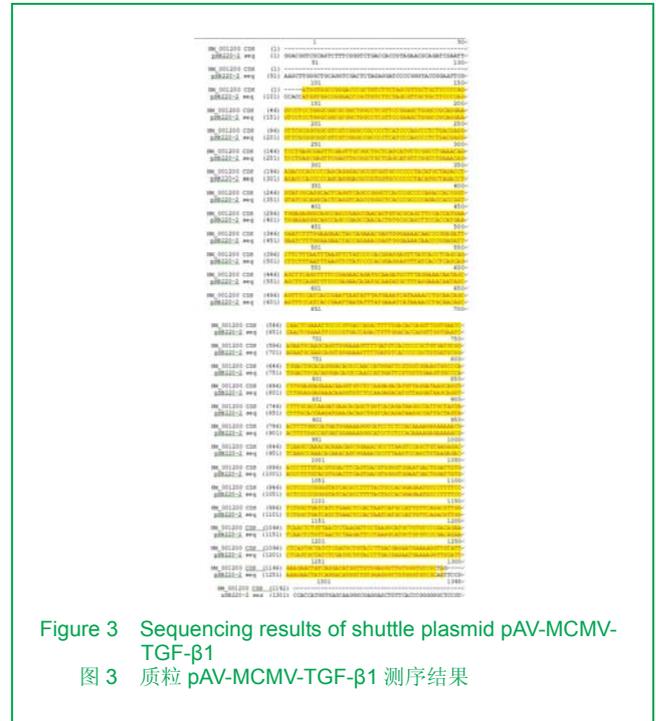


2.2 目的基因重组载体转化 DH5α, PCR 鉴定阳性克隆菌落及阳性克隆测序鉴定 见图 2。

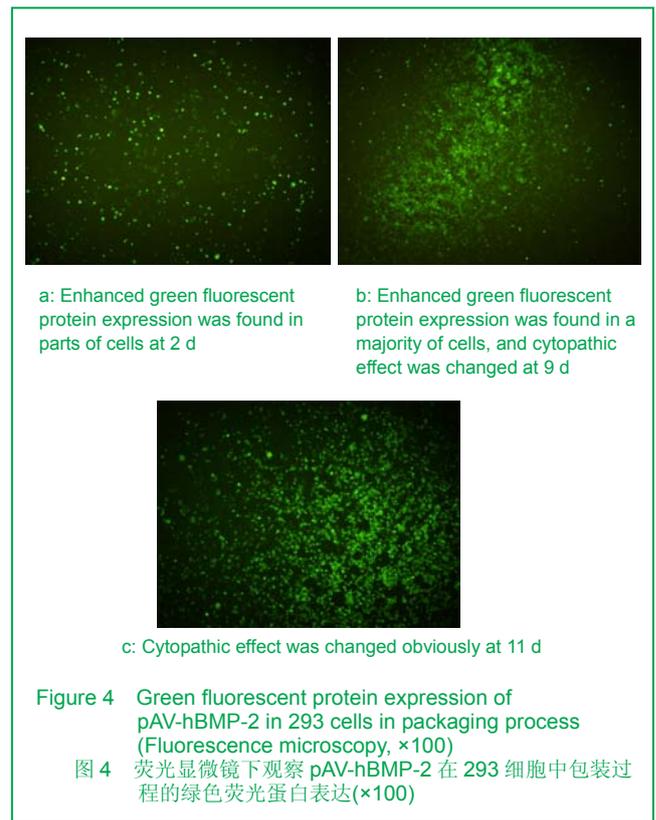


阳性克隆菌落PCR鉴定, 阳性转化子得到1 395 bp的片段, 阴性转化子得到196 bp的片段。

提取质粒pAV-MCMV-TGF-β1经上海生博生物医药科技有限公司测序, 结果与GeneBank公布的序列完全一致, 见图3。



2.3 腺病毒重组质粒包装过程增强型绿色荧光蛋白表达鉴定 见图4。



通过 Trans-EZ 病毒载体制备转染试剂转染 293 细胞, 包装第 2, 9 及 11 天拍照结果, 见图 4, 于转染第 11 天, 细胞出现明显 CPE 改变。转染后第 13 天时观察, HEK293 细胞大量飘落, 细胞已经完全病变。

2.4 PCR 鉴定 293 细胞包装后目的基因和编码蛋白 Western blot 检测 目的基因 PCR 后, 经 1% 琼脂糖凝胶电泳 40 min 后于相应位置出现目的条带, 见图 5。

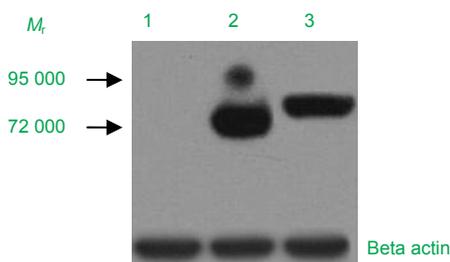


1: 2 kb Mark; 2: hBMP gene

Figure 5 Expression of human bone morphogenetic protein 2 (hBMP-2) gene after 293 cells packaging was identified by PCR

图 5 PCR 鉴定 293 细胞包装后人骨形态发生蛋白 2 基因的表达

通过 Western Blot 检测转染 293A 的样品, 可以观察 M_r 72 000–95 000 有阳性条带, 见图 6, 其大小和 hBMP2-EGFP-FLag 融合蛋白 (M_r 44 000+ M_r 28 000+ M_r 2 000= M_r 74 000) 相吻合。Ad220(pAV-MCMV-hBMP2) 质粒为人骨形态发生蛋白 2 的过表达腺病毒载体, 目的基因融合增强型绿色荧光蛋白和 FFlag 共同表达, 其表达克隆中插入目的基因片段大小: 1 191 bp。(说明: AD219 为该课题的另一部分, 共同进行实验)。



1: Control; 2: The samples after transforming growth factor β adenovirus was infected into 293 cells; 3: AD220 was the sample after bone morphogenetic protein 2 adenovirus was infected into 293 cells

Figure 6 Recombinant adenovirus expression in 293A cells detected by Western blot method

图 6 Western blot 检测重组腺病毒 293A 样品的表达

2.5 病毒滴度的测定 根据终点稀释法检测病毒滴度, 测得重组腺病毒 Ad-hBMP2 的滴度为: 5×10^{13} pfu/L。

3 讨论

3.1 骨形态发生蛋白 2 与骨生成 骨形态发生蛋白是多功能生长因子, 属于转化生长因子 β 超家族, 是一组具有类似结构的高度保守的功能蛋白, 现有 40 余种亚型, 其中以骨形态发生蛋白 2 作用最强^[2]。1988 年, 人们首次纯化分离出天然骨形态发生蛋白 2, 这是相对分子质量约为 30 000 的碱性降解糖蛋白质其降解产物的相对分子质量分别为 30 000、18 000、16 000。其中 30 000 的分子以二聚体形式存在, 是天然骨形态发生蛋白 2 的主要形式^[4]。骨形态发生蛋白 2 是诱导成骨关键物质^[3-4], 它参与调节从细胞增殖、决定种系分化方向到细胞死亡等一系列的生物过程。

骨形态发生蛋白 2 通过与不同细胞, 特别是未分化干细胞的特异性表面受体发挥作用。骨形态发生蛋白 2 是目前研究最广泛、诱导成骨活性最强的因子之一; 是能够单独诱导间充质干细胞向骨组织方向分化的生长因子; 是骨组织形成过程中最关键的调节因子。Wozney 等^[5]实验表明, 低浓度骨形态发生蛋白可以促进间充质细胞向骨组织形成区移行; 中等浓度骨形态发生蛋白则能促进间充质细胞向软骨及成骨细胞方向分化; 高浓度骨形态发生蛋白则能促进间充质细胞增生。大量的实验及临床研究证实骨形态发生蛋白 2 能提高组织的成骨能力, 促进骨及软骨修复。1986 年, Urist 等首次报告将 50 mg 人骨形态发生蛋白植入指骨内生性软骨瘤残腔, 4 周有明显新骨形成, 2 个月残腔四周有皮质骨出现, 9 个月残腔完全愈合, 无不良反应。骨形态发生蛋白诱导骨形成应具备 3 个必要条件: ①局部浓度达到有效骨形态发生蛋白程度, 才可诱导骨生成, 其成骨量与骨形态发生蛋白的浓度成正比, 与扩散距离成反比。②允许骨生长的正常环境, 即始于一组未分化的前体细胞移行到损伤部位, 然后再生长因子刺激下开始发生形态变化, 定向分化为成骨细胞, 合成胶原, 形成钙化的骨组织。③存在靶细胞群: 体内骨髓中诱导性成骨细胞、结缔组织中未分化有活力的间充质细胞、成纤维细胞及骨膜细胞等^[6-7]。

目前, 关于骨形态发生蛋白 2 的研究大多数应用生物材料为缓释载体使重组型骨形态发生蛋白 2 发挥作用。目前研究较多的有 4 类: 无机材料、人造多聚物、生物材料及这些材料的复合物。合适的载体系统可使骨形态发生蛋白 2 更好的发挥作用, 其越来越多的应用于骨缺损的基础及临床研究^[8-10]。但由于生物材料来源少、安全性差, 可能引起免疫反应等弊端^[11], 同时重组型蛋

白纯化困难、治疗剂量大、作用时间短、在体内易被清除以及载体的生物相容性低、不易吸收等缺点,限制了其广泛应用于临床。基因治疗的兴起,可以很好的解决以上难题。

3.2 基因载体的选择 基因治疗的原则就是把治疗性基因转入特定的靶细胞,使其产生基因编码的蛋白质,进而发挥生物学作用。首次合法的基因治疗研究已距今约20年^[12],随着分子生物学的发展和多种遗传性疾病病理机制的明确,基因治疗越来越受到重视。

目前,基因治疗中细胞转染按载体可分为非病毒载体和病毒载体。非病毒载体主要指阳离子聚合物、阳离子多肽和阳性脂质体等^[13]。理想的非病毒载体需要满足以下条件:①保护DNA不被细胞外DNA降解酶的降解。②携带DNA穿透细胞膜。③保护DNA在进入核前不被细胞内容酶体和酶等降解。④能有效将有活性的基因插入目的区。⑤可生物降解,从细胞中消除。⑥无细胞毒性^[14],但相对较低的转染效率让其应用受到限制。病毒型载体则没有此类缺陷,转染效率多可达90%以上。

病毒载体包括反转录病毒、腺病毒、疱疹病毒等^[15],分为整合型和非整合型。整合型病毒载体目前常用有反转录病毒、慢病毒、单纯疱疹病毒等,因其可能携带基因随机整合到宿主细胞,有诱发肿瘤的可能性,以及免疫原性的问题现已少用。非整合型重组腺病毒载体是目前应用最广泛的一种病毒载体^[16]。腺病毒的基因组为线形双链DNA,长度约为36 kb,分为编码区和非编码区。目前应用的腺病毒载体主要是在人类腺病毒C亚群的Ad2和Ad5的基础上构建的。与其他基因载体相比,腺病毒载体有其独特的优势^[17-18]:①宿主广泛,对人致病性低。腺病毒载体系统可广泛用于人类及非人类蛋白的表达。腺病毒的复制基因和致病基因均已相当清楚,在人群中早已流行,70%~80%成人体内都有腺病毒的中和抗体存在。人类感染野生型腺病毒后仅产生轻微的自限性症状,且病毒唑治疗有效。②可在增殖和非增殖细胞中感染和表达基因,它可以使转化细胞和原代细胞中得到的结果直接进行对比,较之反转录病毒载体只能感染分裂期细胞有明显优势。③因基因组较大,可构建较高容量的载体。④病毒滴度高、转染效率高。⑤不整合到染色体中,无插入致突变性。⑥能在悬浮培养液中扩增。⑦可同时表达多个基因。⑧与人类基因同源,为人类蛋白进行准确的翻译后加工和适当的折叠提供了一个理想的环境。因此,它是本研究较理想的基因载体。

3.3 腺病毒载体构建系统的选择 目前,常用制备腺病毒载体的方法有:①Adeno-XTM系统:先将目的基因克

隆入腺病毒穿梭质粒,通过对特异的酶切位点进行酶切,将含目的基因的腺病毒穿梭质粒与腺病毒骨架质粒进行体外连接,组合成含目的基因的完整重组腺病毒,再转染包装细胞系包装,即可产生复制缺陷型的重组腺病毒。此方法不混入野生型腺病毒、不需空斑纯化,构建快速准确,但包装出来的腺病毒滴度非常低。②AdEasy系统:利用Cre/loxP系统在大肠杆菌中完成外源基因插入腺病毒基因组的过程,获得环状的重组腺病毒基因组,并且具有在细菌中复制的必需元件。将重组腺病毒基因组酶切线性化后转染293细胞,避免了双质粒共转染得到重组腺病毒。但穿梭载体与病毒骨架载体重组的阳性率比较低,一般挑20个甚至更多克隆才能得到两三个阳性克隆,还可能存在假阳性。③AdMax系统:将携带外源基因的腺病毒穿梭质粒与携带了腺病毒大部分基因组的辅助包装质粒共转染HEK293细胞,利用Cre/loxP(或FLP/ftt)重组酶系统的作用实现重组,产生重组腺病毒。此系统具有操作简便、重组效率高、获得的病毒产率高、目的基因的表达水平高,故本实验选择此系统进行包装。

同时,AdMax系统穿梭质粒pAV-MCMV-EGFP-3FLAG上携带报告基因增强型绿色荧光蛋白作为示踪标记。增强型绿色荧光蛋白是一种优化的突变型绿色荧光蛋白,其所产生的荧光要比野生型绿色荧光蛋白强35倍,显著增强了其报告分子的灵敏度^[19]。与其他常用的报告基因相比较,具有荧光性质稳定、无细胞毒性、灵敏性及检测便捷等优点,在荧光显微镜下可直接观察到活细胞中的绿色荧光。绿色荧光蛋白作为报告基因广泛应用于观测基因表达,评估细胞活力,定位蛋白质等领域^[20]。故本系统利用增强型绿色荧光蛋白作为报告基因,在荧光显微镜下直视了解转染效率,快速判读病毒滴度及鉴别重组穿梭质粒、重组腺病毒等。

本实验制备出了高效稳定的含目的基因质粒,可重复利用、简单、方便,为人骨形态发生蛋白2基因转染骨髓间充质干细胞、体内移植及基因治疗骨缺损的研究奠定实验基础。

4 参考文献

- [1] Xie G, Sun J, Liu C, et al. Hydroxyapatite nanoparticles as a controlled-release carrier of BMP-2: absorption and release kinetics in vitro. *J Mater Sci Mater Med.* 2010;21(6): 1875-1880.
- [2] Sawyer AA, Song SJ, Susanto E, et al. The stimulation of healing within a rat calvarial defect by mPCL-TCP/collagen scaffolds loaded with rhBMP-2. *Biomaterials.* 2009;30(13): 2479-2488.

- [3] Wyatt LE, Chung CY, Carlsen B, et al. Bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) and transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) alter connexin 43 phosphorylation in MC3T3-E1 Cells. BMC Cell Biol. 2001; 2(1): 14.
- [4] Khan SN, Bostrom MP, Lane JM. Bone growth factors. Orthop Clin North Am. 2000; 31(3): 375-388.
- [5] Wozney JM, Rosen V, Celeste AJ, et al. Novel regulators of Bone formation: molecular clones and activities. Science. 1988;242(4885): 1528-1534.
- [6] Liu J, Hu Y, Ma Z. The experimental study on expression of BMP3 gene during fracture healing. Zhonghua Wai Ke Za Zhi. 1996;34(10): 585-588.
- [7] Bosch P, Musgrave DS, Lee JY, et al. Osteoprogenitor cells within skeletal muscle. J Orthop Res. 2000;18(6):933-944.
- [8] Zhou NF, Wang JW, Liu CS, et al. Zhongguo XiuFu Chongjian Waike Zazhi. 2009;23(3):257-260.
周宁峰,王金武,刘昌胜,等. 负载rhBMP-2性人工骨修复骨缺损的临床应用[J]. 中国修复重建外科杂志,2009,23(3):257-260.
- [9] Shi S, Cheng X, Wang J, et al. RhBMP-2 microspheres-loaded chitosan/collagen scaffold enhanced osseointegration: an experiment in dog. J Biomater Appl. 2009;23(4):331-346.
- [10] Xia L, Xu Y, Wei J, et al. Maxillary sinus floor elevation using a tissue-engineered bone with rhBMP-2-loaded porous calcium phosphate cement scaffold and bone marrow stromal cells in rabbits. Cells Tissues Organs. 2011;194(6):481-493.
- [11] Cao CH, Zou DR. Kouqiang Hemian Waike Zazhi. 2009; 19(5): 367-370.
曹春花,邹德荣. BMP应用于骨缺损修复的研究进展[J]. 口腔颌面外科杂志,2009,19(5):367-370.
- [12] Brenner MK, Okur FV. Overview of gene therapy clinical progress including cancer treatment with gene-modified T cells. Hematology Am Soc Hematol Educ Program. 2009: 675-681.
- [13] EH Chowdhury. Nuclear targeting of viral and non-viral DNA. Expert Opin Drug Deliv. 2009;6(7):697-703.
- [14] Roth CM, Sundaram S. Engineering synthetic vectors for improved DNA delivery: insights from intracellular pathways. Annu Rev Biomed Eng. 2004;6:397-426.
- [15] Tamura T, Kanuma T, Nakazato T, et al. A new system for regulated functional gene expression for gene therapy applications: nuclear delivery of a p16INK4A-estrogen receptor carboxy terminal fusion protein only in the presence of estrogen. Int J Oncol. 2010;36(4):905-912.
- [16] Eckard J, Dai J, Wu J, et al. Effects of cellular iron deficiency on the formation of vascular endothelial growth factor and angiogenesis. Iron deficiency and angiogenesis. Cancer Cell Int. 2010;10:28.
- [17] Warnock JN, Daigre C, Al-Rubeai M. Introduction to viral vectors. Methods Mol Biol. 2011;737:1-25.
- [18] Thaci B, Ulasov IV, Wainwright DA, et al. The challenge for gene therapy: innate immune response to adenoviruses. Oncotarget. 2011;2(3):113-121.
- [19] Cormack BP, Valdivia RH, Falkow S. FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP). Gene. 1996;173 (1 Spec No): 33-38.
- [20] Feilmeier BJ, Iseminger G, Schroeder D, et al. Green fluorescent protein functions as a reporter for protein localization in Escherichia coli. J Bacteriol. 2000;182(14): 4068-4076.

来自本文课题的更多信息--

基金资助: 福建省青年科技人才创新项目 (2005J075)。

作者贡献: 课题设计为第二作者, 课题实施为第一、三作者, 评估为第四作者, 使用盲法评估。

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。

伦理要求: 未涉及与相关伦理道德冲突的内容。

文章概要:

文章要点: 体外建立人骨形态蛋白2 联合增强型绿荧光蛋白重组腺病毒, 以其稳定高效出毒。

关键信息: 采用较为先进的 AdMax 包装系统, 周期短, 质量高。

研究的创新之处与不足: ①创新: 人骨形态蛋白2 联合增强型绿荧光蛋白经 AdMax 系统包装, 对宿主细胞无伤害, 且出毒质、量高。②不足: 实验着重于人骨形态蛋白2 及增强型绿荧光蛋白联合重组, 未能对单独增强型绿荧光蛋白重组载体相关指标进行检测。

作者声明: 文章为原创作品, 数据准确, 内容不涉及泄密, 无一稿两投, 无抄袭, 无内容剽窃, 无作者署名争议, 无与他人课题以及专利技术的争执, 内容真实, 文责自负。