

· 基础研究 ·

## 大鼠 ZnT1 基因重组腺病毒载体的构建及鉴定\*

胡英明<sup>1</sup>,梅晰凡<sup>1△</sup>,宋长威<sup>1</sup>,李 湛<sup>2</sup>

(辽宁医学院附属第一医院:1.骨科;2.中心实验室,辽宁锦州 121000)

**摘要:**目的 利用 Gateway™ 技术构建含大鼠锌转运体 1(ZnT1)基因重组腺病毒载体,鉴定外源基因在真核细胞中的良好表达。方法 采用化学合成的方法,合成 ZnT1/RES/EGFP 目的基因片段,通过 PCR 方法在基因片段两端加入 attB 重组位点,与含有 attP 重组位点的 pDonr221 供体载体 BP 反应形成入门载体 pDown-ZnT1。将含有 attL 重组位点的入门载体与含有 attR 位点目的载体 Ad/CMV/V5-DEST 通过 LR 反应形成腺病毒表达载体 pAd-ZnT1。酶切和测序鉴定后,由 Pac I 酶切线性化转染 HEK293A 细胞包装,提取病毒颗粒。采用终点稀释法测定重组腺病毒滴度;Western blotting 技术分析目的蛋白表达情况。结果 目的基因按正确的方向重组入克隆载体中,重组腺病毒表达载体在 HEK293A 细胞中包装成功,获得成熟的腺病毒颗粒,病毒滴度为  $1.6 \times 10^8$  pfu/L,在 HEK293A 细胞中高表达。结论 该实验采用 Gateway™ 技术构建了含有大鼠 ZnT1 基因的重组腺病毒载体,为下一步研究该基因在脊髓神经细胞中的表达以及与 BDNF/TrkB 信号调节通路的关系奠定了基础。

**关键词:**锌转运体-1;重组腺病毒, Gateway

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2012.20.020

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2012)20-2055-03

## Construction and identification of a recombinant adenovirus vector containing rat ZnT1 gene\*

Hu Yingming<sup>1</sup>, Mei Xifan<sup>1△</sup>, Song Changwei<sup>1</sup>, Li Chen<sup>2</sup>

(1. Department of Orthopaedics; 2. Central Laboratory, the First Affiliated Hospital, Liaoning Medical University, Jinzhou, Liaoning 121000, China)

**Abstract:** **Objective** To establish a recombinant adenovirus vector containing rat ZnT1 gene and to express the gene efficiency in eukaryotic cells. **Methods** Using chemosynthesis method to synthesize the interest gene Znt1/IRES/EGFP. Adding attB recombination site to the interest gene both ends thought PCR method, the later and pDONR221 vector with attP site was create into a entry vector pDown-ZnT1 through BP recombination. The entry vector with attL site and the target vector Ad/CMV/V5-DEST with attR site were recombined together to create the expression vector pAd-ZnT1 under LR reaction. Enzyme digesting and sequencing appraisal were used to prove the expression vector, digesting with Pac I enzyme, and transferred into HEK293A cells to be packaged, then the maturated adenovirus were extracted. The recombinant adenovirus titre was measured by endpoint dilution method. The interest protein's expression was analyzed by western blotting. **Results** Our interest gene was transferred into target vector Ad/CMV/V5-DEST correctly with right open reading frame by LR recombination reaction, and it was confirmed by restriction enzyme analysis and sequencing appraisal. The expression clone was packaged into HEK293A cells successfully. Finally, we got maturated adenovirus particles, and virus titre was  $1.6 \times 10^8$  pfu/L. It was confirmed with high level expression by western blotting method in HEK293A cell. **Conclusion** In this experiment, we successfully and efficiently constructed the rat ZnT1 gene's recombinant adenovirus vector, and laid a good foundation for the ZnT1 gene to express in spinal cord nerve cell and the relationship with BDNF/TrkB signal regulation channel.

**Key words:** ZnT1; recombinant adenovirus vector; Gateway™ clone technology

锌转运体-1(zinc transporter1, ZnT1)是锌转运蛋白家族的重要成员之一,在调解机体锌代谢以及神经活动过程中发挥着极其重要的作用<sup>[1]</sup>。研究显示,ZnT1在正常鼠脊髓有少量的分布,在脊髓损伤(spinal cord injury, SCI)后显著增加,且与脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)的表达呈正相关,提示它可能是调控内源性 BDNF 表达量增加,促进损伤脊髓神经元及其轴突修复的主要原因<sup>[2-4]</sup>。然而,SCI后 BDNF 总量的增加不足以维持损伤处神经元的存活和轴突的再生,人们采用外源性 BDNF 来修复 SCI 虽然取得了一定的疗效<sup>[5-7]</sup>,但是,外源性 BDNF 存在着宿主排斥反应、难以通过血脑屏障以及基因治疗的长期安全性等问题。如果能寻找出调控内源性 BDNF 及其受体表达的有效途径,促进内源性 BDNF 的合成、释放及与受体结合,将在体内建立有

效的保护机制,从而减轻脊髓继发性损伤。由 Invitrogen 公司开发的 Gateway™ 技术是一种基于  $\lambda$  噬菌体位点特异性重组系统,能够快速、特异性地将一个或多个目的基因片断克隆到入门载体<sup>[8-9]</sup>,该技术大大地简化了基因克隆的步骤,且效率高达 95% 或以上<sup>[10]</sup>。本研究采用 Gateway™ 技术构建大鼠 ZnT1 基因重组腺病毒载体,为下一步研究 ZnT1 基因在脊髓神经细胞中的表达以及与 BDNF/TrkB 信号调节通路的关系奠定了基础。

## 1 材料与方法

**1.1 材料** 目的基因片段 ZnT1/IRES/EGFP 委托赛业(广州)生物科技有限公司化学合成;pDonr221 载体供体、pDown 入门载体、Ad/CMV/V5-DEST 载体、BP Clonase™ 酶、LR Clonase™ 酶 Invitrogen 公司;Pac I、EcoRV、Nde I、BstB I

NEB 公司;质粒大提试剂盒、质粒小提试剂盒购自 Promega 公司;HEK293A 细胞由本实验室保存;DNA Marker、DMEM 培养基及胎牛血清购自 Hyclone 公司。

## 1.2 方法

**1.2.1 含重组位点 attB 目的基因片段的获取** 在 GenBank 中检索大鼠 ZnT1cds 序列,委托赛业(广州)生物科技有限公司化学合成 ZnT1/RES/EGFP 目的基因片段,采用 PCR 方法在该基因片段两侧添加 attB 重组特异位点,重叠延伸 PCR 技术扩增基因片段 attB1-ZnT1/IRES/EGFP-attB2,用 1% 的琼脂糖凝胶进行电泳,反应产物参照 QIAquick 的琼脂糖凝胶电泳回收试剂盒进行回收, -20 °C 冰箱保存。

**1.2.2 入门克隆的构建** 将 2 μL 目的基因片段、2 μL 含有 attP 位点 pDonor221 供体载体、1 μL BP Clonase™ 酶和适量 TE 缓冲液混合 25 °C, BP 反应 3 h, 加入蛋白酶 K 终止反应 10 min, 取反应终产物转化感受态大肠杆菌 Stbl3, 转化物涂到含有卡那霉素的 LB 培养基, 37 °C 孵育过夜, 无菌操作下挑取单个阳性克隆, 小量提取质粒, 并对提取质粒进行 EcoRV 酶切筛选并送交阳性克隆进行测序, 测序引物为: Forward, 5'-CGG CCA GTC TTA AGC TCG GG-3'; Reverse, 5'-AAT ACG ACT CAC TAT AGG GGA-3'。将正确克隆命名为 pDown-ZnT1。

**1.2.3 表达克隆的构建** 将 1 μL 入门克隆产物、1 μL 目的载体 Ad/CMV/V5-DEST, 1 μL 的 LR Clonase™ 酶, 2 μL 的 TE 缓冲液混合, 25 °C, LR 反应 16 h, 使入门克隆与目的载体发生体外特异位点重组。取反应终产物转化感受态大肠埃希菌 Stbl3, 转化物涂到含有氨苄霉素的 LB 培养基, 无菌操作下挑取单个阳性克隆, 小量提取质粒, Nde I 和 BstB I 酶切筛选送交阳性克隆测序鉴定, 序引物为: Forward, 5'-GAA CCC ACT GCT TAC TGG CTT-3'; Reverse, 5'-AGA CCG AGG AGA GGG T-3'。将重组后质粒命名为 pAd-ZnT1。

**1.2.4 重组腺病毒载体的包装与扩增** HEK293A 细胞的准备: 转染前将处于对数生长期的 HEK293A 细胞用 0.25% 胰蛋白酶消化, 含体积分数 10% FBS 的 DMEM 完全培养基调整细胞密度为 30%~40%, 重新接种于 25 cm<sup>2</sup> 的细胞培养瓶, 37 °C、体积分数 5% CO<sub>2</sub> 培养箱内培养, 待细胞密度达 60%~70% 时即可用于转染。细胞处于对数生长期及较少的传代次数对于病毒包装至关重要。

**重组腺病毒颗粒的形成:** 用质粒大提试剂盒提取质粒, Pac I 酶切使其线性化, 暴露病毒的 ITRs 端(inverted terminal repeat sequence, 病毒基因组复制所需的重复序列), 采用酚/仿异戊醇抽提法提纯质粒 DNA, 在 Lipofectamine 2000 转染试剂的介导下转染 HEK293A 细胞, 当有明显的细胞病态反应(CPE)现象, 且有大于 50% 细胞脱壁时即收集细胞。于 -80 °C 深低温冰柜中 30 min, 37 °C 恒温水浴箱中 20 min 反复冻融 3 次, 室温下 1 000 r/min 离心 3 min, 获得重组腺病毒颗粒 Ad-ZnT1 上清液即为原代病毒液, 取部分原代病毒液再次感染 HEK293A 细胞, 获得较高滴度第 2 代病毒, 如此获得高滴度的第 3 代病毒液。

**重组腺病毒的滴度测定:** 病毒滴度测定采用终点稀释法。检测前 24 h 在 96 孔平底培养板内, 每孔加入 100 μL 约含 10<sup>4</sup> 个 HEK293A 细胞的悬液(含 5% FBS 的 DMEM), 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中孵育待用。取第 3 代腺病毒病毒液 10 μL 加入含有 990 μL DMEM 的 EP 管内作 1:100 稀释, 浓度即为原病毒液的 10<sup>-2</sup>, 以此浓度为起点, 作病毒液的 1:10 倍比稀释, 即成 10<sup>-3</sup>~10<sup>-10</sup> 各种梯度浓度的病毒稀释液。从细胞培养箱

中取出 96 孔板, 确定每孔的细胞均生长良好, 吸弃旧培养液, 然后依次将 10<sup>-3</sup>~10<sup>-10</sup> 稀释的病毒液加入 96 孔板中, 每一稀释度占用一行。每一行前 10 孔加入 100 μL 病毒稀释液, 第 11、12 孔均加入 100 μL 不含病毒的完全培养基作为对照。培养 10 d 左右, 观察 CPE 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-Kärber Method): 病毒滴度 = 10(X+0.8) pfu/mL。

**1.2.5 Western blotting 分析重组腺病毒 Ad-ZnT1 的表达** 实验组(Ad-ZnT1)、阴性对照组(Ad-EGFP)用最佳感染复数(MOI=100)感染 HEK293A 细胞, 第 3 组为正常细胞。48 h 后将培养液弃掉, 预冷的 PBS 轻洗 3 次。收集细胞, 通过反复冻融法裂解细胞获取蛋白。紫外分光光度计法测定提取的蛋白浓度。聚丙烯酰胺凝胶电泳法制备蛋白胶(体积分数 5% 浓缩液, 10% 分离胶)电泳, 将蛋白胶转移至 PVDF 膜上。用丽春红染液染色, 经 5% 脱脂奶粉封闭 1 h, 一抗抗鼠 ZnT1(稀释比例为 1:500)孵育 1 h, TBST 中洗涤 3 次, 继续用 HRP 标记的二抗羊抗鼠(稀释比例为 1:5 000)孵育 1 h, ECL 试剂盒显色, 通过观察重组腺病毒目的蛋白表达情况。

## 2 结果

**2.1 含 attB 位点基因片段的鉴定** PCR 扩增 attB1-ZnT1 第 1 外显子、attB1-ZnT1 第 2 外显子、IRES/EGFP-attB2 基因片段(图 1), 1% 琼脂糖凝胶进行电泳, 泳道 1、2、3 分别是 PCR 扩增第 1 外显子约 0.6 kb, 第 2 外显子约 0.9 kb, IRES/EGFP-attB2 片段约 1.3 kb, 重叠延伸 PCR 后扩增基因片段 attB1-ZnT1/IRES/EGFP-attB2 电泳, 片段大小约 2.8 kb, 为前三者之和, 证实含有 attB 特异位点的目的基因片段完成连接, 见图 2。

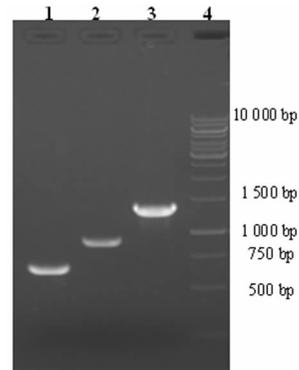


图 1 含 attB 特异位点基因片段的 PCR 扩增



图 2 含 attB 特异位点基因片段的 PCR 重叠延伸扩增

**2.2 入门克隆的酶切筛选和测序鉴定** 以 *EcoRV* 酶切筛选入门克隆 pDown-ZnT1, 泳道 1~3 分别是不同克隆后的酶切结果, 1% 琼脂糖凝胶电泳。泳道 3 可见有大小约为 1.9 kb 和 3.3 kb 的目的片段, 小片段是入门载体 pDown 骨架部分, 这与入门载体骨架大小相符, 大片段为含特异位点基因片段部分(图 3)。选取泳道 3 克隆测序鉴定(封 2 图 4), 证实目的基因已经克隆至入门载体中。

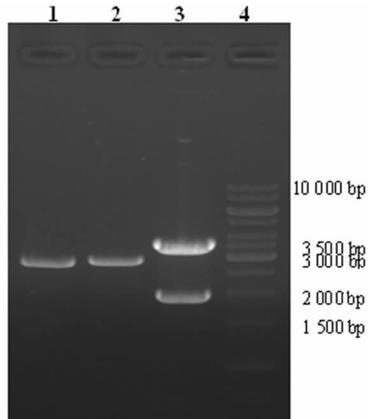


图 3 *EcoRV* 酶切筛选阳性入门克隆 pDown-ZnT1

**2.3 重组腺病毒载体的酶切筛选和测序鉴定** 重组腺病毒表达载体经 *Nde I*、*BstB I* 双酶切后 1% 琼脂糖凝胶电泳, 可见约 3.3 kb 处有目的条带的强表达(图 5), 该条带与入门载体酶切筛选结果基本符合, 证实经过 LR 反应后含有 attB 特异位点的 attB1-ZnT1/IRES/EGFP-attB2 基因片段已克隆至表达载体中。送交阳性克隆测序鉴定(封 2 图 6), 目的基因 ZnT1 克隆至表达载体中。

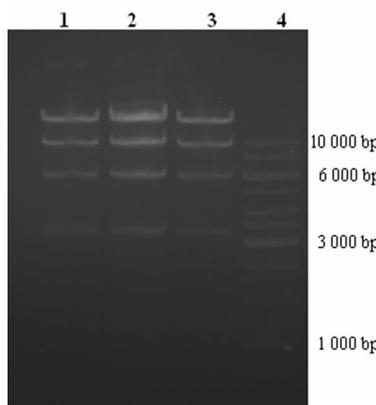


图 5 重组腺病毒表达载体经 *Nde I* 和 *BstB I* 双酶切筛选阳性克隆

**2.4 重组腺病毒滴度的测定** 重组腺病毒 pAd-CMV-ZnT1/IRES/EGFP 按上述终点稀释实验法测得各排阳性孔的比率(10<sup>-3</sup>~10<sup>-10</sup> 梯度稀释度)分别为 1、1、1、0.9、0.7、0.6、0.2、0, X=1+1+1+1+1+0.9+0.7+0.6+0.2+0=7.4, 按照(Spearman-Kärber Method)方法: 病毒滴度(pfu/mL)=10(X+0.8)=10(1+1+1+1+1+0.9+0.7+0.6+0.2+0.8)=1.6×10<sup>8</sup> pfu/mL。同理获得阴性对照腺病毒 Ad-ZnT1 滴度为 2.5×10<sup>8</sup> pfu/mL。

**2.5 重组腺病毒感染 HEK293A 细胞的荧光表达** 重组腺病毒 Ad-ZnT1 感染 HEK293A 细胞后, 随着时间的延长, 正常的多角形 HEK293A 细胞皱缩变小, 细胞间隙变大, 多个细胞聚集呈现葡萄串样改变, 荧光显微镜下观察可见明显的荧光, 见

封 2 图 7。

**2.6 腺病毒诱导的 ZnT1 基因在 HEK293A 细胞中的表达** 目的基因 ZnT1 表达蛋白相对分子质量为 36×10<sup>3</sup>, 实验组(A 组)、阴性对照组(B 组)感染 HEK293A 细胞后 48 h, Western blotting 结果显示 A 组出现 ZnT1 特异条带(图 8), 阴性 B 组及正常细胞组均未出现特异条带。证实重组腺病毒 Ad-ZnT1 可高效感染 293A 细胞, 并有目的基因 ZnT1 的强表达。

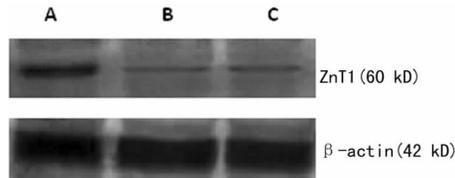


图 8 Western blotting 分析目的基因 ZnT1 蛋白的表达

**3 讨 论**

目前, 基因治疗中常用的生物病毒载体有重组逆转录病毒载体、重组慢病毒载体及重组腺病毒载体, 其中重组腺病毒载体具有宿主范围广, 外源性基因插入容量大, 病毒滴度高, 不整合于宿主基因组, 包装相对容易, 能够大量扩增及构建成本低等优点, 腺病毒能感染几乎所有的细胞类型, 除了一些抗腺病毒感染的淋巴瘤细胞<sup>[11-12]</sup>, 这对于研究目的基因在神经细胞中的表达很有意义。

目前, 大多采用 Adeasy 系统来构建重组腺病毒载体, 该系统在设计引物时, 添加了实验所需的酶切位点并在位点前加保护碱基, 先将目的基因和穿梭载体分别进行双酶切鉴定, 再由连接酶进行连接、转化、筛选穿梭载体, 酶切线性化后和病毒骨架 Adeasy 在大肠埃希菌 BJ183 感受态细胞中同源重组, 挑选阳性克隆, 酶切及测序鉴定后在 293 细胞中包装, 整个过程需要多次酶切, 连接和转化筛选并且重组阳性率很低, 耗时长、工作繁琐。

本实验采用 Gateway™ 技术构建 ZnT1 腺病毒表达载体, 在此技术中起到重组作用的位点有 attB、attP、attL、attR。实验中将含有 attB 位点的基因片段与 attP 位点的供体载体 pDonr221 在 BP Clonase II 高效酶催化下生成带有 attL 位点的入门载体 pDown-ZnT1。入门载体再与带有 attR 位点的目的载体 Ad/CMV/V5-DEST 在 LR Clonase II 高效酶催化下生成表达载体 pAd-ZnT1<sup>[13]</sup>。构建过程基于上述位点特异重组不再需要限制性内切酶和连接酶的参与, 同时 DNA 片段的阅读框和方向保持不变, 这种新的表达更便利、省时。本实验构建 ZnT1 不是用来直接进行基因治疗, 而是通过目的基因在真核细胞中表达上调, 检测 BDNF 及其受体 TrkB 的表达情况, 为 SCI 寻找内部自身保护性因子, 从而为 SCI 的修复及轴突再生提供理论依据。

**参考文献:**

[1] Ng P, Cummings DT, Eveleigh CM, et al. The yeast yeast recombinase FLP functions effectively in human cells for construction of adenovirus vectors[J]. Bio Techniques, 2000, 29(3):524-526, 528.  
 [2] Wang Y, Mei X, Zhang L, et al. The correlation among the dynamic change of Zn(2+), ZnT-1, and brain-derived neurotrophic factor after acute spinal cord injury in rats [J]. Biol Trace Elem Res, 2011, 143(1):351-358.  
 [3] Ramer MS, Priestley JV, Mc Mahon SB. (下转第 2061 页)

本研究不足之处在于样本量不够大,且没有对缺血性脑卒中患者 EF 障碍的发生率进行分析。临床上,脑血管病引起的智能障碍主要表现在思维、注意力或其他能力的逐步衰退以致丧失,即呈阶梯式进展,早期部分功能缺失,而其他功能尚存在<sup>[17]</sup>。因此早期进行识别及危险因素的筛选、并进行防控,无疑为延缓痴呆的发生提供基础的依据。

#### 参考文献:

[1] 刘晓林,路配,李强,等. 脑卒中后血管性认知功能损害的临床观察[J]. 解剖与临床,2005,10(3):222-223.

[2] Manly T, Hawkins K, Evans J, et al. Rehabilitation of executive function facilitation of effective goal management on complete tasks using periodic auditory alerts[J]. *Neuropsychologia*,2002,40(3):271-281.

[3] Panza F, Dintorno A, Colacicco AM, et al. Current epidemiology of mild impairment and other predementia syndroms[J]. *Am J Geriatr Psychiatry*, 2005, 13(8): 633-644.

[4] Proctor A, Wilson B, Sanchez C, et al. Executive function and verbal working memory in adolescent with closed head injury[J]. *Brain Inj*,2000,14(7):633-647.

[5] 徐晓云,黄蕾,胡晖,等. 脑血管病危险因素与脑梗死后认知障碍相关性的研究[J]. 中华物理医学与康复杂志,2003,25(7):422-425.

[6] Rahman TT, Gaafary MM. Montreal Cognitive Assessment Arabic version: reliability and validity prevalence of mild cognitive impairment among elderly attending geriatric clubs in Cairo[J]. *Geriatr Gerontol Int*,2009,9(1):54-61.

[7] Hänninen T, Hallikainen M, Tuomainen S, et al. Prevalence of mild cognitive impairment: a population-based study in elderly subjects[J]. *Acta Neurol Scand*, 2002,

106(3):148-154.

[8] 孙中武,朱小群,周江宁. 轻度认知功能损害的血管危险因素和认知损害[J]. 安徽医科大学学报,2007,42(3):313-316.

[9] Smith RC, Singh A, Infante M, et al. Effects of cigarette smoking and nicotine nasalspray on psychiatric symptoms and cognition in schizophrenia[J]. *Neuropsychopharmacology*,2002,27(3):479-497.

[10] Harris JG, Kongs S, Allensworth D, et al. Effects of nicotine on cognitive deficits in schizophrenia[J]. *Neuropsychopharmacology*,2004,29(7):1378-1385.

[11] Xu G, Liu X, Yin Q, et al. Alcohol consumption and transition of mild cognitive impairment to dementia[J]. *Psychiatry Clin Neurosci*,2009,63(1):43-49.

[12] 王久武,孙月吉,庞鑫鑫,等. 基底节缺血性卒中中对认知功能的影响[J]. 中华行为医学与脑科学杂志,2009,18(5):418-420.

[13] Funahashi S. Neuronal mechanisms of executive control by the prefrontal cortex[J]. *Neurosci Res*, 2001, 39(2): 147-165.

[14] Sergeant JA, Geurts H, Oosterlaan J. How specific is a deficit of executive functioning for attention-deficit/hyperactivity disorder[J]. *Behav Brain Res*,2002,130:3-28.

[15] 余丽君,姜亚芳. 病理生理学[M]. 北京:中国协和医科大学出版社,2001:5-6.

[16] 金惠铭. 病理生理学[M]. 6版. 北京:人民卫生出版社,2004:284.

[17] 毛旭强,王滨. 丁基苯酞对血管性痴呆患者脑血流动力学及神经功能的影响[J]. 中国实用神经疾病杂志,2008,11(12):58-59.

(收稿日期:2012-01-09 修回日期:2012-03-06)

(上接第 2057 页)

Functional regeneration of sensory axons into the adult spinal cord[J]. *Nature*,2000,403(6767):312-316.

[4] Vavrek R, Girgis J, Tetzlaff W, et al. BDNF promotes connections of corticospinal neurons onto spared descending interneurons in spinal cord injured rats[J]. *Brain*, 2006,129(6):1534-1545.

[5] Sasaki M, Radtke C, Tan AM, et al. BDNF-hypersecreting human mesenchymal stem cells promote functional recovery, axonal sprouting, and protection of corticospinal neurons after spinal cord injury[J]. *J Neurosci*,2009,29(47):14932-14941.

[6] liu C, Mei XF, Lv G, et al. Neuron-like differentiation of adult rat bone marrow stromal cells induced by transforming growth factor-beta and brain-derived neurotrophic factor[J]. *Neural Regeneration Res*,2009,4(4):247-251.

[7] Sharma HS. Selected combination of neurotrophins potentiate neuroprotection and functional recovery following spinal cord injury in the rat[J]. *Acta Neurochir Suppl*, 2010,106:295-300.

[8] Bushman W, Thompson JF, Vargas L, et al. Control of directionality in lambda site specific recombination[J]. *Science*,1985,230(4278):906-911.

[9] Landy A. Dynamic, structural, and regulatory aspects of lambda site-specific recombination [J]. *Annu Rev Biochem*,1989,58:913-949.

[10] 阙文忠,陈君敏. 利用 Gateway 技术构建重组腺病毒 pAd-NK4[J]. 中国药理学通报,2011,27(4):462-466.

[11] Metzen E. Enzyme substrate recognition in oxygen sensing: how the HIF trap snaps[J]. *Biochem J*, 2007, 408(2):e5-6.

[12] Poellinger L, Johnson RS. HIF-1 and hypoxic response: the plot thickens[J]. *Curr Opin Genet Dev*,2004,14(1):81-85.

[13] 蒋红梅,龙洁,汤炜,等. 采用 Gateway™ 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.

(收稿日期:2012-03-09 修回日期:2012-04-26)