

脂联素调控序列荧光素酶报告基因荧光素酶活性的分析

崔琳¹, 李强^{1,2*}, 路玲玲³, 宰军华^{1*}, 张莎莎³

(1. 河南中医学院第一附属医院, 郑州 450000;

2. 河南省病毒性疾病中医药防治重点实验室, 郑州 450000; 3. 河南中医学院, 郑州 450008)

[摘要] **目的:**通过将 1 100 bp 长度的人脂联素(adiponectin, AD)启动子上游的调控基因(包括启动子, -1066 To +4 bp)插入荧光素酶报告基因载体 pGL3-Basic 中,构建成含启动子调控序列的荧光素酶报告基因(pGL3-Basic-ADI1100),用于脂联素在中国仓鼠卵巢细胞(CHO)中的表达调控研究。**方法:**利用 PCR 技术扩增 1 100 bp 长度 AD 启动子片段,与 PUC19T 载体连接,将 PUC19T-ADI1100 质粒,及荧光素酶报告基因 pGL3-Basic 质粒转染大肠杆菌(DH5a)后扩增,提取并纯化 PUC19T-ADI1100 和 pGL3-Basic;分别以 KpnI, XhoI 酶切 pGL3-Basic;电泳并回收 ADI1100 片段和 pGL3-Basic 酶切大片段,在 T4 DNA 连接酶的作用下,将 ADI1100 片段插入荧光素酶报告基因 pGL3-Basic 中,并转染 CHO 细胞,检测荧光素酶报告基因活性。**结果:**通过酶切及基因测序的方法证实所构建质粒含有脂联素启动子上游调控序列;瞬时转染实验显示 AD 启动子在 CHO 细胞中的转录表达随时间的变化而升高,转染后 48 h 的双报告基因活性是 pGL3-Basic 的 30 倍。**结论:**该荧光素酶报告基因构建成功,为后续筛选有抑制肥胖作用的中药提供基础。

[关键词] 脂联素; 启动子; 荧光素酶报告基因

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)06-0211-05

Cloning the Promoter of the Human Adiponectin Gene and Research on its Luciferase Activity

CUI Lin¹, LI Qiang^{1,2*}, LU Ling-ling³, ZAI Jun-hua^{1*}, ZHANG Sha-sha³

(1. The First Affiliated Hospital of Henan College of Traditional Chinese Medicine (TCM),

Zhengzhou 450000, China; 2. Key Laboratory of Viral Diseases Prevention and Treatment of TCM of Henan Province, Zhengzhou 450000, China;

3. Henan College of TCM, Zhengzhou, 450008 China)

[Abstract] **Objective:** To clone the promoter of the adiponectin gene and investigate its transcriptional activity in the Chinese hamster ovary cells (CHO) cell lines. **Method:** The promoter of the human adiponectin gene was amplified from human genomic DNA by PCR, and then it was subcloned into PUC-19T and luciferase reporter gene. The Luciferase report systems with the promoter of the adiponectin gene were used to transfer CHO cells. The luciferase activities of the transferred cells were compared by luciferase assay. **Result:** The luciferase activity demonstrated that the constructed vector had the promoter activity. The CHO cells presented a stronger adiponectin promoter activity in 48 h than pGL-3basic vector. **Conclusion:** The human adiponectin luciferase reporter gene vector has been constructed successfully, and it will become essential material for further study of obesity therapy with the traditional Chinese medicine.

[Key words] adiponectin; promoter; luciferase report gene

[收稿日期] 20120903(016)

[基金项目] 河南省教育厅自然科学研究计划项目(2010B360009);郑州市科技公关计划项目(0910SGYS33391-1)

[第一作者] 崔琳, 硕士, 主管药师, 从事药理学研究, Tel: 0371-66233478, E-mail: cuilin1234_2006@126.com

[通讯作者] *李强, 硕士, 副主任药师, 从事中药药理研究, Tel: 0371-66244621, E-mail: strongmz@163.com

*宰军华, 硕士, 主任医师, 从事内分泌疾病研究, Tel: 0371-66233478, E-mail: zaijunh@163.com

随着生活水平的不断提高,肥胖已经在全球范围内流行^[1]。它可以引起多种疾病,与胰岛素抵抗、2 型糖尿病及心血管疾病 (cardiovascular disease, CVD) 的发生密切相关^[2-3]。脂肪组织可以产生多种具有生物活性的物质,称为脂肪细胞分泌因子 (adipokines, ADS)。很多研究证实,ADS 的表达异常是导致肥胖相关的胰岛素抵抗及 CVD 发生的重要原因。其中脂联素 (adiponectin, AD) 是最为重要的 ADS,它在肥胖引起的胰岛素抵抗、糖尿病及 CVD 的发生、发展中起着重要的作用。其基因定位于 3q27,长 16 Kb,由 3 个外显子和 2 个内含子构成。该基因编码产物为 244 个氨基酸多肽,包含一个公认的氨基末端信号序列,一个小的非螺旋区,一段 22 个胶原重复延伸序列和一个球型区域。

根据文献报道,选取若干可能具有减肥作用的中药作为备选药物,为了验证其分子生物学作用是否通过干预其转录调节过程,我们利用 PCR 技术扩增脂联素基因启动子片断,并构建了调控荧光素酶报告基因的真核载体,作为进一步研究中药及其有效成分对脂联素基因的启动子区调控及其生物学作用的前期工作。

1 材料

1.1 细胞株 中国仓鼠卵巢细胞 (CHO) 细胞株购自中国科学院上海细胞所。

1.2 试剂 报告基因表达载体 pGL3-basic (E6721)、内参质粒 pRL-TK (E2241)、双荧光素酶检测试剂盒 [Dual luciferase assay system (E1910)] 购自美国 Promega 公司; PUC19T 载体 (D102A, TAKARA 公司); 大肠杆菌 DH5 α 感受态菌株 (D9057A, TAKARA 公司)、人血基因组 DNA 提取试剂盒 (DP318-03, TIANGEN 公司); PCR 扩增试剂盒、DNA marker V, 500 bp DNA marker (上海莱枫生物科技有限公司, lifefeng), DNA 凝胶回收试剂盒 (AP-GX-50)、DNA 质粒小量提取试剂盒 (AP-MN-P-50), 购自 Axygen 公司; 限制性内切酶 KpnI 和 XhoI, T4 DNA 连接酶 (Fermentas 公司); 琼脂糖 (111860)、脂质体 Lipofectamine 2000 转染试剂 (926996, 购自美国 Invitrogen 公司); 胰蛋白酶、胎牛血清、DMEM 培养基 (北京 Solarbio 公司); EB 溶液、胰蛋白酶 (TN5250)、酵母提取物 (G0961)、琼脂 (AN5255), 生工生物工程有限公司。

1.3 仪器 PCR 仪 (美国, Applied Biosystems 公司), 电泳系统 (美国, Bio-Rad 公司), UVipro 型凝胶

成像分析系统 (英国, Silver Uvitec 公司)、Milli-Q 型超纯水仪 (美国, Milipore 公司), CK40 倒置显微镜 (日本, Olympus 公司), Thermo-I368 超低温冰箱、CO₂ 细胞培养箱 (美国, Thermo 公司), 高速低温离心机 (德国, Heraeus 公司)。

2 方法

2.1 ADI1100 片断的扩增及 PUC19-ADI1100 连接反应 按照血液基因组 DNA 提取试剂盒 (DP318-03, TIANGEN 公司) 操作提取基因组 DNA。待干燥后加入 30 μ L 56 $^{\circ}$ C 预热的 TE 缓冲液溶解 DNA, 用紫外分光光度计测定 DNA 的纯度和含量。根据设计的引物扩增 ADI1100 片断, 根据 PUC19T 载体 (D102A, TAKARA 公司) 试剂盒操作进行连接反应。具体反应体系如下: ADI1100 目的基因 4 μ L, PUC19T 载体 1 μ L, Solution I 5 μ L, 16 $^{\circ}$ C 连接反应 2 h。并将连接反应产物命名为 PUC19-ADI1100。

2.2 PUC19-ADI1100 及 pGL3-Basic 的转化 参照分子克隆实验指南, 取 3 支 1.5 mL EP 管先分别加入 50 μ L 感受态菌, 再分别加入 1 μ L 的 PUC19-ADI1100, pGL3-Basic, LB 培养液 (阴性对照) 混均, 冰浴 30 min, 置 42 $^{\circ}$ C 水浴, 90 s 后立即取出, 加入 0.8 mL 不含氨苄青霉素的 LB 培养液, 150 $r \cdot \text{min}^{-1}$, 37 $^{\circ}$ C 孵育 1.5 h。离心后取沉淀, 在超净台中将培养液涂于 LB (含 100 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 氨苄青霉素) 平板上, 37 $^{\circ}$ C 过夜。PUC19-ADI1100 及 pGL3-Basic 的转化菌筛选鉴定: 挑取转化菌落种于含 LB (氨苄青霉素 100 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 培养液的离心管 (5 mL) 中 (每种质粒取 5 个克隆), 150 $r \cdot \text{min}^{-1}$, 37 $^{\circ}$ C 过夜。用 DNA 质粒小量提取试剂盒 (AP-MN-P-50, Axygen 公司) 小量提取细菌质粒, 琼脂糖凝胶电泳。再用 Kpn I 分别酶切 PUC19-ADI1100 及 pGL3-Basic 使之成为线状, 1% 琼脂糖凝胶电泳, 以鉴定其相对分子质量, 并保存转化菌。挑取 PUC19-ADI1100 及 pGL3-Basic 转化菌分别种于含 200 mL LB (氨苄青霉素 100 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 的锥形瓶中, 150 $r \cdot \text{min}^{-1}$, 37 $^{\circ}$ C 过夜。用试剂盒大量提取细菌质粒, 并酶切、电泳鉴定。

2.3 质粒的连接重组 用 T4 DNA 连接酶连接目的基因 ADI1100 与载体 pGL3-Basic, 连接反应体系: ADI1100 6 μ L, pGL3-Basic 1 μ L, 10 \times 连接 Buffer 1 μ L, T4DNA 连接酶 0.6 μ L, 最后加双蒸水配体积至 10 mL, 22 $^{\circ}$ C 反应 2 h。4 $^{\circ}$ C 冰上放置 5 min。取 5 μ L 的连接反应物做细菌转化, 然后涂于 LB 平板 (氨苄青霉素 100 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$), 37 $^{\circ}$ C 过夜。挑取 8 个菌落分别增菌, 快速小量法提取质粒, 酶切初步鉴定

重组质粒。Invitrogen 公司测序鉴定重组质粒。

2.4 细胞培养及转染 取指数生长期的 CHO 细胞,按 1×10^5 个/mL 的密度接种于 24 孔板中,用 RPMI 1640 完全培养基(含有 $100 \text{ mL} \cdot \text{L}^{-1}$ 胎牛血清, $100 \text{ kU} \cdot \text{L}^{-1}$ 青霉素, $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 链霉素)在 37°C , 5% CO_2 培养箱中培养 24 h,直到细胞达到 80% 以上汇合,更换 Opti-MEM 无血清培养基,在 1.5 mL EP 管中配置重组质粒与载体 pGL3-Basic-AD1100,内参质粒 pRL-TK,转染脂质体 lipofectamine 2000 复合物。将重组质粒 pGL3-Basic-AD1100,内参载体质粒 pRL-TK 各 $0.8 \mu\text{g}$ /孔脂质体悬液 $2 \mu\text{L}$ 用加样枪混合均匀,在室温孵育 5 min,最后将两者混合在一起,充分混匀静置 20 min,使质粒与脂质体充分结合。培养板每孔中加入 $60 \mu\text{L}$ 的质粒/脂质体混合物。在 37°C , 5% CO_2 培养箱中培养 2 h 后,吸弃培养板中的转染培养液,向各孔加入 Opti-MEM 无血清培养基,在在 37°C , 5% CO_2 培养箱中培养 24 ~ 48 h。收集 24, 48 h 处理样品,进行双荧光素酶活性检测。

2.5 双荧光素酶报告基因活性测定 收集转染有 pGL3-Basic-AD1100 和 pRL-TK 的 CHO 细胞,吸弃培养基,用 PBS 洗 1 次。加入裂解液 $100 \mu\text{L}$ /孔,室温摇动 15 min。按照双荧光素酶检测试剂盒(Dual Luciferase Assay System)的操作说明书,将全部细胞裂解液加入到白色不透光培养板孔中,放入多功能酶标仪中测读萤火虫荧光素酶发光值;再加入 $100 \mu\text{L}$ Stop&Glo Reagent,测读海肾荧光素酶发光值。

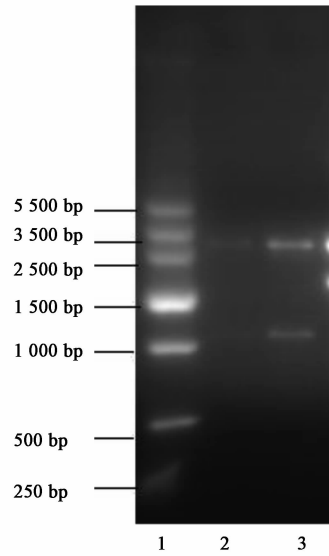
2.6 统计学处理 统计数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 17.0 软件的 One way ANOVA 进行统计学分析。 $P < 0.05$ 具有统计学意义。

3 结果

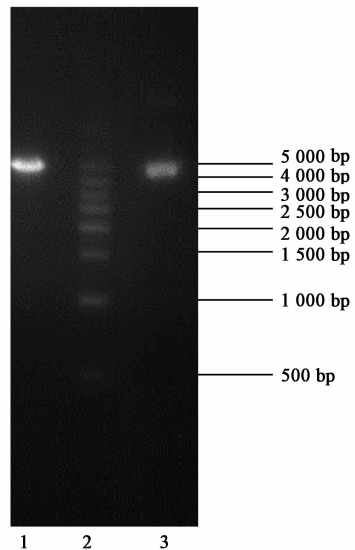
3.1 亚克隆 PUC19-AD1100 载体和报告基因载体 pGL3-basic 的电泳 经 Kpn I, XhoI 分别酶切 PUC19T-AD1100 及 pGL3-Basic, PUC19T-AD1100 电泳结果出现 2 686 bp 和 1 100 bp 两个条带。其中 2 686 bp 为 PUC19T 载体,1 100 bp 为 AD 调控序列,酶切结果与设计相符(图 1)。pGL3-Basic 质粒未酶切为两条条带,分别为超螺旋结构和开环结构。Kpn I, XhoI 双酶切为单一的一条条带,长度为 4 818 bp(图 2)。

3.2 AD1100 测序 经测序鉴定与 NCBI 上脂联素启动子片断一致。结果未显示。

3.3 重组质粒的功能鉴定 参考文献[4-5],重组质粒 pGL3-Basic-AD1100、内参载体质粒 pRL-TK



1. DNA Marker V;
2,3. PUC19-AD1100 载体/KpnI + XhoI 双酶切
图 1 PUC19T-AD1100 载体酶切后 1% 琼脂糖电泳



1. pGL3-basic 载体/KpnI + XhoI 双酶切;
2. 500 bp Ladder; 3. pGL3-basic 载体
图 2 报告基因载体 pGL3-basic 酶切后 1% 琼脂糖电泳

瞬时转染 CHO 细胞后,测定萤火虫荧光素酶和海肾荧光素酶报告基因活性,并将两者的比值作为衡量 AD 启动子活性的依据,pRL-TK 作为内参可以消除由于细胞数目及转染效率等不同所带来的组间差异。结果显示,与载体质粒 pGL3-Basic 相比,转染 CHO 细胞 24 h 后,重组质粒的荧光素酶活性无统计学意义。重组质粒 pGL3-Basic-AD1100 转染 CHO 细胞 48 h 后,荧光素酶表达增强,是 pGL3-Basic 的 30 倍,两者相比,具有统计学意义。见表 1,图 3。

表 1 CHO 细胞萤火虫荧光素酶与海肾荧光素酶活性分析 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

质粒	24 h 荧光强度		48 h 荧光强度	
	萤火虫荧光素酶	海肾荧光素酶	萤火虫荧光素酶	海肾荧光素酶
pGL3-basic	23.25 ± 0.69	226.19 ± 18.13	23.35 ± 8.93	432.21 ± 147.58
pGL3-Basic-ADII100	21.95 ± 3.60	404.52 ± 46.39	385.11 ± 51.66	232.31 ± 27.80
pGL3-Basic-Promoter	375.91 ± 154.18	335.34 ± 105.72	35 749.50 ± 760.13 ¹⁾	9 851.65 ± 406.37 ¹⁾

注:与 pGL-3 Basic 组相比¹⁾ $P < 0.05$ 。

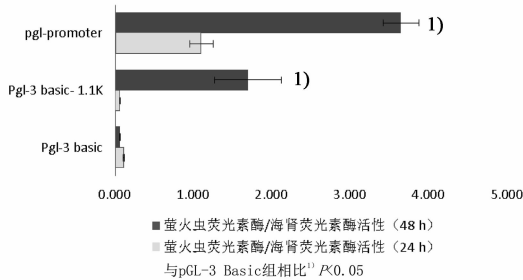


图 3 CHO 细胞萤火虫荧光素酶活性分析 ($\bar{x} \pm s$)

4 讨论

肥胖可以引起多种疾病,它与胰岛素抵抗、2 型糖尿病及心血管疾病 (cardiovascular disease, CVD) 的发生密切相关。脂肪组织可以产生多种具有生物活性的物质,称为脂肪细胞分泌因子 (adipokines, ADS)。ADS 参与机体的能量代谢、炎症反应及心血管功能等病理生理过程中。中草药中含有大量不同种类的化合物,结构多样,是新药研发的宝贵资源。利用细胞生物学和分子生物学的理论和方法,从天然化合物众多化合物成分迅速发现对某一靶点具有作用的化合物,不但对于减肥新药的开发有重要的意义,也将在细胞和分子水平上阐明肥胖的发生机理提供重要依据^[6-7]。

脂联素 (adiponectin, 又名 adipoQ, Acrp30, apM1 等),是一种主要由白色脂肪组织分泌的蛋白,具有调节糖脂代谢、增强胰岛素敏感性、抗炎和抗动脉粥样硬化等多种作用^[8-11]。它是由 apM1 基因编码,在正常人血浆 ADPN 质量浓度约 $1.9 \sim 17 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$,而在肥胖人群中较低,约 $3.7 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$,仅在脂肪组织中表达,在骨骼肌,小肠,胎盘,子宫,卵巢,肾脏,肝,肺,脑或心脏中未检测到其表达。其基因定位于 3q27,长 16 Kb,由 3 个外显子和 2 个内含子构成。该基因编码产物为 244 个氨基酸多肽,包含一个公认的氨基末端信号序列,一个小的非螺旋区,一段 22 个胶原重复延伸序列和一个球型区域^[12]。

启动子是基因的一个组成部分,控制基因表达 (转录) 的起始时间和表达程度,像“开关”一样,通

过与转录因子结合控制基因的活动。研究显示启动子的一个显著特点是富含 A-T 区, A/T 易解链,有利于转录起始,其既可以作为正调控因子,也可以扮演负调控因子的角色。一些与 A/T 区域结合的蛋白质及其序列特征也已被确定。启动子上还存在着一些与反式作用因子相互作用的正负调控序列。对转录的正确起始可能起重要作用^[13-14]

结果显示,重组质粒 pGL3-Basic-ADII100、内参载体质粒 pRL-TK 瞬时转染 CHO 细胞后,与空白载体质粒 pGL3-Basic 相比,转染 CHO 细胞 24h 后,重组质粒的荧光素酶活性无统计学意义,推测可能是因为重组质粒的启动子活性较低,所以转染 CHO 细胞 24 h 其下游的萤火虫荧光素酶报告基因蛋白表达量较低,所以检测结果偏低。而当重组质粒 pGL3-Basic-ADII100 转染 CHO 细胞 48 h 后,荧光素酶表达增强,与空白载体质粒 pGL3-Basic 相比相比,具有统计学意义。

综上所述,重组质粒 pGL3-Basic-ADII100 构建成功,为后期筛选具有减肥功能的中药提供分子生物学基础。

[参考文献]

- [1] Eckel R H, York D A, Rossner S, et al. Prevention Conference VII: Obesity, a worldwide epidemic related to heart disease and stroke: executive summary [J]. Circulation, 2004, 110(18): 2968.
- [2] 张永鹏, 刘静, 靳国印, 等. 糖平煎对 2 型糖尿病大鼠炎症细胞因子的干预作用 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(21): 235.
- [3] 李楠, 范颖, 贾旭鸣, 等. 黄芪不同有效部位配伍干预糖尿病模型大鼠的药效研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(6): 150.
- [4] 王炎, 刘宁宁, 周利红, 等. 健脾解毒方介导 p38MAPK 信号转导下调幽门螺杆菌诱导的胃癌细胞环氧合酶 2 启动子活性 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(14): 105.
- [5] 张菊梅, 周小燕, 吴慧清. 荧光素酶研究进展 [J]. 微生物学通报, 2001, 28(5): 98.

真武汤对渗透泵恒释 ADR 肾病综合征大鼠的干预作用

梁春玲, 周玖瑶*, 周园, 吴俊标, 丑安, 华静
(广州中医药大学药理学教研室, 广州 510006)

[摘要] 目的:通过渗透泵恒释技术建立阿霉素肾病综合征(NS)模型,以真武汤干预治疗,评价真武汤对NS大鼠的治疗效果。方法:阿霉素($14.5 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)按渗透泵灌注要求填充,手术植入大鼠腹腔,通过渗透压恒释阿霉素诱发肾病综合征模型,将大鼠随机分为真武汤高、低剂量组($24, 12 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$),地塞米松组($0.9 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$),给药4周,观察动物一般情况,尿蛋白、血压、血脂、血清蛋白及肾功能指标变化,肾小球IgG表达,评价阿霉素渗透泵肾病综合征模型以及真武汤的干预作用。结果:阿霉素渗透泵NS大鼠成活率显著提高,实验过程中无动物死亡;模型组大鼠第2周出现典型的肾病综合征症状,与空白组比较,24 h尿蛋白、血压、血脂明显升高,血清蛋白及肾功能明显降低($P < 0.01$);与模型组比较,真武汤高、低剂量组能显著改善NS大鼠精神、活动、摄食量、毛色等状况,明显减轻NS大鼠24 h尿蛋白(109.85 ± 14.65), (49.75 ± 5.14), (51.43 ± 4.46) mg,恢复大鼠血清总蛋白(TP):(57.64 ± 3.64), (61.26 ± 2.21), (60.85 ± 1.91) $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$,白蛋白(ALB):(21.70 ± 2.18), (25.93 ± 2.74), (25.00 ± 2.64) $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 水平,降低大鼠血清总胆固醇(2.91 ± 0.50), (2.17 ± 0.26), (2.12 ± 0.31) $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、甘油三酯(1.05 ± 0.29), (0.49 ± 0.12), (0.61 ± 0.15) $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 水平,降低大鼠血压、血清尿素氮(BUN)、肌酐(Scr)($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);减少大鼠肾小球系膜区IgG的沉积。结论:通过渗透泵恒释阿霉素建立肾病综合征模型,可提高造模成功率和模型稳定性,真武汤能减少NS大鼠尿蛋白,提高血浆蛋白水平,减少血液高凝状况,恢复肾功能及肾小球结构,改善NS症状。

[关键词] 肾病综合征; 阿霉素; 渗透泵; 真武汤

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)06-0215-05

Efficacy of Zhenwu Decoction on Adriamycin-caused Nephritic Syndrome by Osmotic

LIANG Chun-ling, ZHOU Jiu-yao*, ZHOU Yuan, WU Jun-biao, CHOU An, HUA Jing

[收稿日期] 20120829(015)

[基金项目] 广东省自然科学基金委重点项目(S2011020005170);教育部博士点基金项目(20114425110011)

[第一作者] 梁春玲,在读硕士, Tel:020-39358084, E-mail:lvchuanlynn@163.com

[通讯作者] *周玖瑶,教授,博士生导师,从事中药防治肾脏病学研究, Tel:020-39358084, E-mail:zhoujiuyao@tom.com

- [6] 谢春燕,李强翔. 脂联素在肥胖、胰岛素抵抗中作用的研究进展[J]. 中国老年学杂志, 2011, 31(11):2141.
- [7] 沈丽雅,钟卫鸿,沈寅初. 天然来源减肥用脂肪酶抑制剂的进展[J]. 中国医药工业杂志, 2006, 37(1):62.
- [8] 郭晓红,吴立玲,李丽. 脂联素调节糖脂代谢相关信号通路的研究进展[J]. 生理科学进展, 2010, 41(6):471.
- [9] 贾玫,乔博明,张正,等. 脂联素启动子基因多态性和脂联素水平与高血压及并发症的相关性研究[J]. 中国实验诊断学, 2008, 12(2):222.
- [10] 余其美,王佑民. 重组脂联素真核表达质粒的构建与鉴定[J]. 安徽医科大学学报, 2004, 39(3):189.
- [11] 李建平,赵峰. 脂联素水平与运动及机体肥胖的相关性[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2007, 11(51):10339.
- [12] 时照明,王佑民,周剑. 人脂联素基因全长 cDNA 克隆[J]. 安徽医科大学学报, 2004, 39(2):116.
- [13] 黄玉,杨波,迟小华,等. 真核生物启动子的研究及应用[J]. 生物技术通讯, 2010, 21(2):275.
- [14] 高兴,蔡云,辛海明,等. 人 Bax 启动子荧光素酶报告基因的构建和鉴定[J]. 肿瘤学杂志, 2009, 11(1):46.

[责任编辑] 聂淑琴