

DOI:10.3724/SP.J.1008.2014.00447

• 短篇论著 •

## 新基因 *mgt-16* 反转录病毒载体的构建及其在小鼠间充质干细胞中的表达

王明科<sup>1,2,3</sup>, 孙慧勤<sup>2</sup>, 程晋<sup>4</sup>, 姜帆<sup>4</sup>, 粟永萍<sup>2\*</sup>, 邹仲敏<sup>4\*</sup>

1. 海军医学研究所舰艇卫生研究室, 上海 200433

2. 第三军医大学军事预防医学院全军复合伤研究所, 创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室, 重庆 400038

3. 解放军 441 医院防疫科, 福鼎 355200

4. 第三军医大学军事预防医学院毒理学研究所, 重庆 400038

**[摘要]** **目的** 构建表达小鼠新基因 *mgt-16* 的反转录病毒载体, 并观察其在小鼠胚胎间充质干细胞 C3H/10T1/2(简称 10T1/2 细胞)中的表达。**方法** 以含小鼠新基因 *mgt-16* 的 DNA 序列为模板 PCR 扩增得到 *mgt-16* 编码序列, T-A 克隆后测序获得 pMD18T-16 质粒, 与真核表达载体 pEGFP-N1 酶切、连接、转化, 通过 PCR、酶切鉴定和测序获得正确的 pEGFP-N1-16 载体。将 pEGFP-N1-16 载体中含 *mgt-16* 的片段克隆至反转录病毒载体 pLEGFP-N1, 通过酶切鉴定和测序获得正确的 pLEGFP-N1-16 反转录病毒载体。将 pLEGFP-N1-16 转染反转录病毒包装细胞 Phoenix, 制备携带 *mgt-16* 与增强型绿色荧光蛋白(enhanced green fluorescent protein, EGFP)的反转录病毒, 感染小鼠间充质干细胞 10T1/2 后, 400  $\mu\text{g}/\text{mL}$  G418 筛选获得稳定表达 *mgt-16* 与 EGFP 融合蛋白的 10T1/2 细胞克隆。荧光显微镜观察 MGT-16 蛋白的表达及亚细胞定位。**结果** PCR 扩增得到大小约 300 bp 的 *mgt-16* 条带, T-A 克隆后测序显示获得的 *mgt-16* 序列与 Genbank 数据库序列相同。构建的 pEGFP-N1-16 载体经 PCR、酶切鉴定和测序验证构建成功, 构建的反转录病毒载体 pLEGFP-N1-16 经酶切鉴定和测序验证构建成功。荧光显微镜观察 MGT-16 主要在 Phoenix 细胞和小鼠间充质干细胞的细胞质表达, 核周表达水平较高。**结论** 成功构建了小鼠新基因 *mgt-16* 的反转录病毒载体, 并在间充质干细胞中表达, 为进一步研究新基因 *mgt-16* 在间充质干细胞中的功能奠定了基础。

**[关键词]** *mgt-16*; 过表达; 反转录病毒; 间质干细胞**[中图分类号]** R 349.83**[文献标志码]** A**[文章编号]** 0258-879X(2014)04-0447-05

### Construction of retroviral vector containing novel gene *mgt-16* and its expression in mouse mesenchymal stem cells

WANG Ming-ke<sup>1,2,3</sup>, SUN Hui-qin<sup>2</sup>, CHENG Jin<sup>4</sup>, JIANG Fan<sup>4</sup>, SU Yong-ping<sup>2\*</sup>, ZOU Zhong-min<sup>4\*</sup>

1. Department of Ship Sanitation, Naval Medical Research Institute, Shanghai 200433, China

2. State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Institute of Combined Injury of PLA, College of Preventive Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China

3. Department of Epidemic Prevention, No. 441 Hospital of PLA, Fuding 355200, Fujian, China

4. Institute of Toxicology, College of Preventive Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China

**[Abstract]** **Objective** To construct the retroviral vector carrying novel gene *mgt-16* and to investigate its expression in mouse mesenchymal stem cells C3H/10T1/2(10T1/2). **Methods** DNA sequences containing mouse novel gene *mgt-16* was used as a template for PCR amplification of full length *mgt-16* cDNA. Then the DNA fragment was cloned into pEGFP-N1 vector to produce pEGFP-N1-16 vector after T-A cloning with pMD18T plasmid and sequencing. The pEGFP-N1-16 vector was confirmed by PCR, restriction enzyme digestion and sequencing analysis. The retroviral vector, pLEGFP-N1-16, was constructed using retroviral vector, pLEGFP-N1, and pEGFP-N1-16 vector including *mgt-16* gene. The pLEGFP-N1-16 vector was verified by restriction enzyme digestion, sequenced, and then transfected into packaging cell line Phoenix to prepare EGFP fused *mgt-16* retrovirus particles, which were collected and used to infect 10T1/2 cells. G418 (400  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) continuous selection

**[收稿日期]** 2013-08-28**[接受日期]** 2013-10-22**[基金项目]** 国家自然科学基金(31201035), 国家重点基础研究发展计划(973 计划, 2005CB522605), 全军医学科技“十二五”重大项目(AWS11C004). Supported by the National Natural Science Foundation of China (31201035), National Basic Research Program (973 Program, 2005CB522605), and the PLA Major Medical S & T Project for the “12<sup>th</sup> Five-year Plan” (AWS11C004).**[作者简介]** 王明科, 博士, 主治医师. E-mail: mingkew@gmail.com

\* 通信作者(Corresponding authors). Tel: 023-68752285, E-mail: zouzhuimin@yahoo.com; Tel: 023-68752279, E-mail: suyp2003@163.com

was conducted to obtain 10T1/2 cell clones stably overexpressing EGFP fused *mgt-16*. Fluorescence microscope was employed to determine the expression and subcellular localization of MGT-16 in Phoenix and 10T1/2 cells. **Results** A band of about 300 bp size was observed by agarose gel electrophoresis after PCR amplification for *mgt-16* gene, and the result of sequencing showed that the sequence of insert fragment in T-A clones was identical to *mgt-16* gene reported in Genbank. PCR, restriction enzyme digestion and sequencing revealed that the pEGFP-N1-16 plasmid was successfully constructed. Restriction enzyme digestion and sequencing revealed that the pLEGFP-N1-16 plasmid was also successfully constructed. Phoenix and 10T1/2 cells overexpressing MGT-16 showed green fluorescence distribution in the cytoplasmic, especially around the perinuclear area. **Conclusion** We have successfully constructed a recombinant retroviral vector carrying novel gene, *mgt-16*, and expressed it in mouse mesenchymal stem cells, which provides a basis for studying the role of novel gene *mgt-16* in mesenchymal stem cells.

[**Key words**] *mgt-16*; over-expression; retrovirus; mesenchymal stem cells

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2014, 35(4): 447-451]

随着人类基因组计划及越来越多真核生物基因组的完成,生物医学研究已进入后基因组时代,研究的热点从基因测序转移到基因的功能研究<sup>[1]</sup>。探明基因功能常用的方法是基因突变,包括自发突变、理化诱导突变、基因打靶及基因捕获等。自发突变频率较低,且只有出现表型可见才能被研究。X射线或化学诱导等理化因素诱导的突变常引起染色体重排而影响多个基因或产生点突变,但却无基因克隆的标记<sup>[2]</sup>。基因打靶需要其定点突变的基因序列明确,且比较耗时、耗力,对“多效”、“多余”的基因则力不从心<sup>[3]</sup>。基因捕获结合报告基因和筛选基因,能够追踪基因的时空表达模式,可以分离出“多效”、“多余”的基因<sup>[4]</sup>;基因捕获载体插入还可使基因失活,达到“基因敲除”的效果<sup>[5]</sup>,适合于检测短暂表达或表达水平较低的基因<sup>[6]</sup>、多效基因<sup>[4]</sup>,还可能发现新基因<sup>[7]</sup>。目前,它已被广泛应用于胚胎发育<sup>[5]</sup>、细胞分化<sup>[8]</sup>及恶性转化<sup>[9]</sup>等重要生命过程相关基因的研究。本课题组前期利用基因捕获技术建立了小鼠胚胎间充质干细胞 C3H/10T1/2(简称 10T1/2 细胞)基因捕获阳性克隆库<sup>[10]</sup>,并分离获得一个新基因 *mgt-16*<sup>[11]</sup>。本实验旨在构建小鼠新基因 *mgt-16* 的反转录病毒载体,并观察其在 10T1/2 细胞中的表达,为进一步研究新基因 *mgt-16* 在间充质干细胞中的功能奠定基础。

## 1 材料和方法

1.1 材料 大肠杆菌 *E. coli*, DH5 $\alpha$ 、质粒 pEGFP-N1、含小鼠新基因(*mgt-16*)的 DNA 序列由本实验室保存。反转录病毒载体 pLEGFP-N1 由第三军医

大学解剖教研室惠赠。反转录病毒包装细胞 Phoenix 由第三军医大学生化教研室惠赠。小鼠间充质干细胞株 C3H/10T1/2 购自 ATCC 细胞库。DMEM 高糖培养基购自 HyClone 公司,胎牛血清(FBS)购自 Gibco 公司,胰酶购自 Amersco 公司。质粒提取试剂盒、胶回收试剂盒购自 Omega 公司。限制性内切酶 *Bgl* II、*Pst* I、*Not* I、*Sal* I 以及 T4 连接酶购自 New England 公司。*Taq* 聚合酶、DNA Marker、高保真 PrimeSTAR HS DNA 多聚酶购自 TaKaRa 公司。G418 购自 Calbiochem 公司。Lipofectamine 2000 购自 Invitrogen 公司。聚凝胺(polybrene)购自 Chemicon 公司。PCR 引物及基因测序均由上海 Invitrogen 公司完成。氨苄青霉素(Amp)、卡那霉素(Kan)购自华北制药集团有限责任公司。二甲亚砜(DMSO)购自成都科龙化工厂。

1.2 PCR 法获取目的基因片段 以本实验室保存的小鼠新基因(*mgt-16*)的 DNA 序列为模板,使用 primer premier 5.0 设计含 *Bgl* II 酶切位点的上游引物 5'-GAA GAT CTG TCA TGG CCT CCG TCA AC-3'及含 *Pst* I 酶切位点的下游引物 5'-AAC TGC AGC CCC AGT AAA ATC TCA TCT G-3',使用高保真 PrimeSTAR HS DNA 多聚酶进行 PCR 扩增,1%琼脂糖凝胶电泳分析 PCR 扩增结果。

1.3 T-A 克隆及 PCR 法鉴定 取含 *mgt-16* 基因编码序列的 PCR 产物 20  $\mu$ L 加入 0.1  $\mu$ L 普通 *Taq* 酶混匀,PCR 仪上 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min,4 $^{\circ}$ C 维持 10 min 进行 PCR 产物末端加 A 反应后取 1  $\mu$ L T-A 克隆。反应体系如下:pMD18T vector 1  $\mu$ L,加 A PCR 产物 1  $\mu$ L, Solution I 5  $\mu$ L, Milli-Q H<sub>2</sub>O 3  $\mu$ L,共 10

$\mu\text{L}$ 。16℃ 恒温仪连接 1 h 后,进行转化、涂 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Amp<sup>+</sup> LB 平板培养过夜。挑取 5 个 LB 平板上分隔良好的单克隆菌落,于 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Amp<sup>+</sup> LB 培养液,37℃ 950 r/min 过夜摇菌,取菌液各 1  $\mu\text{L}$  为模板进行 PCR 反应。1%琼脂糖凝胶电泳分析 PCR 扩增结果。选择 3 个可疑阳性克隆菌株,委托上海 Invitrogen 公司进行测序。

1.4 pEGFP-N1-16 载体的构建及鉴定 将含 pEGFP-N1 或测序正确的菌落(命名为 pMD18T-16),37℃ 过夜摇菌,按试剂盒说明书提取质粒。pMD18T-16 和 pEGFP-N1 质粒均用 *Bgl* II 和 *Pst* I 双酶切 10 管。酶切产物经 1%琼脂糖凝胶电泳,按胶回收试剂盒说明书切胶回收。根据载体与目的片段摩尔数比为 1:(3~10)的原则进行连接反应。取 3 管 DH5 $\alpha$  感受态菌液各 50  $\mu\text{L}$ ,第 1 管加入连接反应产物,第 2 管加入载体 DNA 作为阳性对照,第 3 管不加外源 DNA 作为阴性对照。将 DNA 与感受态菌液混匀进行电击转化。然后立即加入 1 mL LB 培养液混匀并移入 EP 管内,37℃,950 r/min,培养 1 h。各管离心,10 000  $\times g$  1 min。吸弃约 900  $\mu\text{L}$  上清后混匀沉淀,各取 100  $\mu\text{L}$  涂布 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Kan<sup>+</sup> LB 平板,37℃ 孵箱培养 16 h。挑取转化平板上阳性菌落接种 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Kan<sup>+</sup> LB 培养液中,37℃,950 r/min,培养 16 h。提取质粒 DNA、进行菌液 PCR 鉴定。同时,对 PCR 鉴定初步筛选为阳性重组子的 pEGFP-N1-16 质粒进行 *Bgl* II 和 *Not* I 双酶切鉴定。将鉴定获得的可疑阳性克隆菌株送上海 Invitrogen 公司进行测序。

1.5 pLEGFP-N1-16 载体的构建及酶切鉴定 将反转录病毒载体 pLEGFP-N1 用 *Bgl* II 和 *Not* I 双酶切,酶切产物经 1%琼脂糖凝胶电泳。将经测序正确连接的 pEGFP-N1-16、酶切鉴定正确的 pLEGFP-N1 转化的菌液,37℃,950 r/min 振荡过夜,提取质粒、用 *Bgl* II 和 *Not* I 双酶切、切胶回收、连接及转化,挑取转化平板上阳性菌落,接种 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Amp<sup>+</sup> LB 培养液中,37℃,950 r/min,培养过夜。重组质粒 pLEGFP-N1-16 以 *Bgl* II 和 *Sal* I 双酶切鉴定。将获得的可疑阳性克隆菌株送上海 Invitrogen 公司进行测序。

1.6 反转录病毒的包装及滴度测定 取生长状态良好的 Phoenix 培养于 DMEM 高糖培养液(含 10% FBS),以  $9 \times 10^5$ /孔接种于 6 孔板 2 孔,置 37℃,5% CO<sub>2</sub> 培养箱培养 18~24 h;待细胞贴壁生长达 80% 融合时,以 Lipofectamine 2000 转染 pLEGFP-N1、pLEGFP-N1-16 各 1 孔,24 h 后荧光显微镜下观察绿色荧光。72 h 后收集病毒上清,1 500 r/min 离心 3 min,取上清 -70℃ 保存。10T1/2 细胞的培养参考文献[12]。取生长状态良好的 10T1/2 细胞以  $1 \times 10^4$ /孔接种于 24 孔板,细胞贴壁后加入含终浓度 8  $\mu\text{g}/\text{mL}$  polybrene 的病毒上清 125  $\mu\text{L}$  感染 10T1/2,24 h 后用新鲜培养液取代感染培养液,继续培养 48 h 后荧光显微镜下观察结果。

1.7 10T1/2 细胞的感染及 *mgt-16* 基因的分布 取生长状态良好的 10T1/2 细胞以  $3 \times 10^4$ /孔接种于 24 孔板,细胞贴壁后加入 1 000  $\mu\text{L}$ /孔病毒上清感染 10T1/2 细胞,并加入 polybrene 至终浓度为 8  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,24 h 后用新鲜培养液取代感染培养液,继续培养 48 h 后加入 400  $\mu\text{g}/\text{mL}$  G418 筛选并扩大培养。荧光显微镜下观察结果。

## 2 结果

2.1 目的基因 *mgt-16* PCR 扩增产物电泳结果 以含 *mgt-16* 基因的 DNA 序列为模板,用高保真 *Taq* 聚合酶进行 PCR 扩增,产物琼脂糖凝胶电泳后出现约 300 bp 条带,片段大小与预期值一致,表明目的基因克隆成功。

2.2 pEGFP-N1-16 载体的构建及鉴定 将含 *mgt-16* 基因编码序列的 PCR 产物 T-A 克隆后取 5 个菌落菌液 PCR 鉴定获得 4 个阳性菌落。将测序正确的 pMD18T-16 菌落与 pEGFP-N1 质粒均用 *Bgl* II 和 *Pst* I 双酶切后电泳,pMD18T-16 出现大小为 2 702 bp 和 291 bp 条带,pEGFP-N1 出现大小为 4 704 bp 和 29 bp 条带。胶回收 pEGFP-N1 酶切后的 4 704 bp 片段为骨架,pMD18T-16 酶切后的 291 bp 片段为目的片段,用 T4 连接酶连接,转化,摇菌后取 5 个菌落菌液 PCR 电泳,均出现约 300 bp 目的条带,对 PCR 鉴定初步筛选为阳性重组子的 pEGFP-N1-16 质粒用 *Bgl* II 和 *Not* I 双酶切后琼脂糖凝

胶电泳,出现了 3 941 bp 和 1 055 bp 两条目的条带,再次证实 pEGFP-N1-16 重组子构建成功。

2.3 pLEGFP-N1-16 载体的构建及鉴定 反转录病毒载体 pLEGFP-N1 用 *Bgl* II 和 *Not* I 双酶切后琼脂糖凝胶电泳,出现了 6 099 bp 和 792 bp 两条带,与预期结果一致(图 1A)。胶回收 pLEGFP-N1 双酶切后的 6 099 bp 片段,以此为基础骨架,将 pEGFP-N1-16 载体 *Bgl* II 和 *Not* I 双酶切,胶回收含 *mgt*-16 与增强型绿色荧光蛋白(EGFP)片段的条带,以含 *mgt*-16 与 EGFP 的条带为外源片段亚克隆至 pLEGFP-N1 载体,构建重组质粒 pLEGFP-N1-16,以 *Bgl* II 和 *Sal* I 双酶切鉴定、琼脂糖凝胶电泳,出现了 6 861 bp 和 293 bp 两条带,与预期结果一致(图 1B)。经测序验证 pLEGFP-N1-16 构建成功。

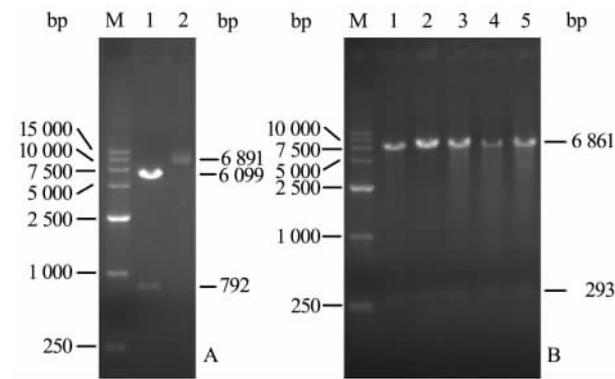


图 1 pLEGFP-N1 和 pLEGFP-N1-16 双酶切鉴定结果 M: DNA 标记物; A: 1 为 pLEGFP-N1 双酶切产物; 2 为 pLEGFP-N1; B: 1-5 为 pLEGFP-N1-16 双酶切产物

2.4 病毒滴度测定和 *mgt*-16 在 10T1/2 细胞的稳定表达 将对照组 pLEGFP-N1 和构建的 *mgt*-16 融合 EGFP 的重组载体 pLEGFP-N1-16 转染包装细胞 Phoenix 24 h, 荧光显微镜下观察,可见对照组 pLEGFP-N1 转染的 Phoenix 细胞绿色荧光呈泛细胞表达(图 2A),而 pLEGFP-N1-16 转染的 Phoenix 细胞绿色荧光明显呈胞质表达,局部有聚集现象(图 2B)。加入含终浓度 8 μg/mL polybrene 125 μL 病毒上清感染 10T1/2, 24 h 后换成新鲜培养液,继续培养 48 h 后观察细胞的荧光效率,以此判断病毒的滴度为 2.98 × 10<sup>4</sup> CFU/mL。收集病毒上清感染 10T1/2 细胞,400 μg/mL G418 筛选 14 d 建立了稳

定表达克隆,对照组 pLEGFP-N1 感染的 10T1/2 细胞绿色荧光还是呈泛细胞表达(图 2C),而重组载体 pLEGFP-N1-16 感染的 10T1/2 细胞绿色荧光还是呈胞质表达,核周表达水平较高(图 2D)。

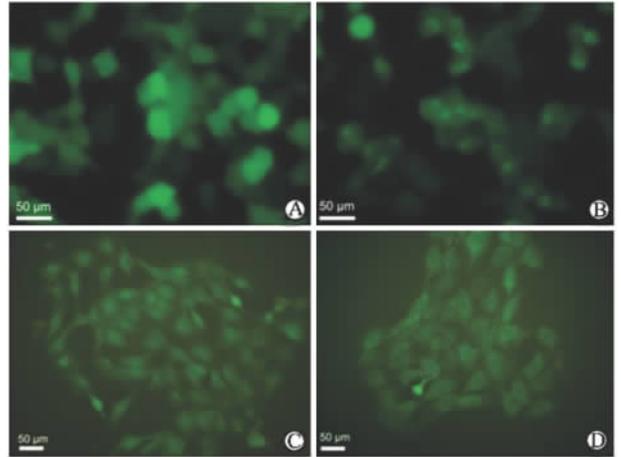


图 2 荧光显微镜检测 *mgt*-16 在包装细胞 Phoenix 和间充质干细胞 10T1/2 中的表达 A,B: pLEGFP-N1 和过表达 *mgt*-16 pLEGFP-N1-16 转染的 Phoenix; C,D: pLEGFP-N1 和过表达 *mgt*-16 pLEGFP-N1-16 感染的 10T1/2 细胞

### 3 讨论

研究基因功能常见的策略是基因过表达,基本过程是通过载体将目的基因转入某一特定细胞使其过表达,观察过表达该基因后细胞生物学行为的变化,从而了解该基因的功能<sup>[1,13]</sup>。目前常用的方法有病毒法和非病毒法两种。非病毒法操作简便,但转染效率和整合效率较低而难以达到预期效果;病毒法利用病毒 RNA 能整合到宿主细胞基因组的特性,通过辅助系统将目的基因传递到受体细胞<sup>[14]</sup>。本研究所用载体 pLEGFP-N1 为反转录病毒载体,可以高效地将外源基因整合入分裂期靶细胞的基因组中,从而长期、稳定地表达外源基因。研究表明,利用 pLEGFP-N1 反转录病毒载体转染包装细胞,提取病毒上清,感染骨髓间充质干细胞,可获得稳定表达绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)的间充质干细胞,且其生物学特性无明显改变<sup>[15]</sup>。

本研究通过高保真 PCR、T-A 克隆、PCR 鉴定及测序分析获得了 *mgt*-16 编码序列,构建了 *mgt*-16 融合 EGFP 的 pEGFP-N1-16 真核表达载体,但此载体转染细胞存在表达目的基因时间短的缺点,因此,

通过 *Bgl* II 和 *Not* I 双酶切后将含 *mgt-16* 与 EGFP 的片段克隆至反转录病毒载体 pLEGFP-N1 上, 构建了重组反转录病毒载体 pLEGFP-N1-16, 经酶切鉴定和测序分析, 说明重组的反转录病毒载体 pLEGFP-N1-16 构建成功。此外, 除获得只能短暂表达但无需病毒包装的 pEGFP-N1-16 真核表达质粒及可稳定表达但需病毒包装的 pLEGFP-N1-16 反转录病毒载体外, 我们还将 pLEGFP-N1 和 pIRES2-EGFP 两种质粒酶切构建了带内核糖体插入序列 (internal ribosome entry site, IRES) 的 pL-IRES-EGFP-N1 及 pL-IRES-EGFP-16 反转录病毒载体 (另文报道), 为方便同时构建 pLEGFP-N1-16、pL-IRES-EGFP-N1 及 pL-IRES-EGFP-16 反转录病毒载体, 也需要先构建 pEGFP-N1-16 真核表达质粒。用 pLEGFP-N1 及构建的 pLEGFP-N1-16 反转录病毒载体转染包装细胞 Phoenix 24 h 后, 荧光显微镜下可见对照组 Phoenix 细胞绿色荧光呈泛细胞表达, 而重组载体 pLEGFP-N1-16 转染的 Phoenix 细胞绿色荧光明显呈胞质表达, 且在局部有聚集。收集病毒上清感染 10T1/2 细胞, 400  $\mu\text{g}/\text{mL}$  G418 筛选 14 d 建立了稳定表达克隆, 对照组 pLEGFP-N1 感染的 10T1/2 细胞绿色荧光仍呈泛细胞表达, 而 *mgt-16* 融合 EGFP 的重组载体 pLEGFP-N1-16 感染的 10T1/2 细胞绿色荧光也依旧呈胞质表达。由于在反转录病毒载体 pLEGFP-N1-16 中, EGFP 和 *mgt-16* 的编码区是在一个表达框里, 表达的是 EGFP-MGT-16 融合蛋白, 而 MGT-16 蛋白的表达水平可以通过荧光强弱直观观察到, 并且 MGT-16 蛋白在细胞内的分布定位可以通过 EGFP 融合蛋白的定位来指示。本研究通过荧光显微镜观察发现新基因 *mgt-16* 为胞质表达基因, MGT-16 蛋白在核周分布较高。

综上所述, 重组的反转录病毒载体 pLEGFP-N1-16 成功构建, 并在小鼠间充质干细胞表达, 这为进一步研究新基因 *mgt-16* 对间充质干细胞增殖、迁移、分化等生物学特性的影响及下一步开展体内研究奠定了实验基础。

#### 4 利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

#### [参考文献]

- [1] 字友梅, 王少元. 新基因功能的研究策略[J]. 医学综述, 2011, 17: 1478-1481.
- [2] Fedorov L M. [Discovery of genes active in embryogenesis by gene trapping][J]. Ontogenez, 2004, 35: 307-313.
- [3] Stanford W L, Cohn J B, Cordes S P. Gene-trap mutagenesis: past, present and beyond[J]. Nat Rev Genet, 2001, 2: 756-768.
- [4] 黄小乐. 面向后基因组研究的基因陷阱技术[J]. 中山大学研究生学刊: 自然科学与医学版, 2003, 24: 6-15.
- [5] Yoo S, Kim Y, Lee H, Park S, Park S. A gene trap knock-out of the Tiam-1 protein results in malformation of the early embryonic brain[J]. Mol Cells, 2012, 34: 103-108.
- [6] Springer P S. Gene traps: tools for plant development and genomics[J]. Plant Cell, 2000, 12: 1007-1020.
- [7] Cecconi F, Meyer B I. Gene trap: a way to identify novel genes and unravel their biological function[J]. FEBS Lett, 2000, 480: 63-71.
- [8] Dauffy J, Mouchiroud G, Bourette R P. The interferon-inducible gene, *Ifi204*, is transcriptionally activated in response to M-CSF, and its expression favors macrophage differentiation in myeloid progenitor cells[J]. J Leukoc Biol, 2006, 79: 173-183.
- [9] Yamamura K, Araki K. Gene trap mutagenesis in mice: new perspectives and tools in cancer research[J]. Cancer Sci, 2008, 99: 1-6.
- [10] 王明科, 邹仲敏, 罗成基, 粟永萍. 多用途基因捕获 C3H/10T1/2 细胞阳性克隆库的构建及鉴定[J]. 第四军医大学学报, 2008, 29: 508-512.
- [11] 王明科, 姜帆, 孙慧勤, 叶枫, 程晋, 粟永萍, 等. 基因捕获筛选 TGF- $\beta$ 1 诱导间充质干细胞 C3H/10T1/2 平滑肌分化的差异表达基因[J]. 第三军医大学学报, 2014, 36: 92-97.
- [12] 王明科, 邹仲敏, 粟永萍, 罗成基, 王军平, 冉新泽, 等. 小鼠胚胎间充质干细胞系 C3H/10T1/2 的多向分化潜能研究[J]. 第三军医大学学报, 2008, 30: 2029-2033.
- [13] Prelich G. Gene overexpression: uses, mechanisms, and interpretation[J]. Genetics, 2012, 190: 841-854.
- [14] 梁洋, 杜文敬, 苏畅, 安铁洙. 反转录病毒载体的研究进展[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2010, 9: 26-28.
- [15] 洪小伟, 曾以周, 宋晓萌. 反转录病毒介导 EGFP 基因转染骨髓间充质干细胞及其对生物学特性的影响[J]. 口腔生物医学, 2010, 1: 29-33.

[本文编辑] 周燕娟, 孙岩