

SV40增强子对奶牛 β -酪蛋白启动子活性的影响

钟宇¹ 邵正² 江黎明^{3*}

(¹广东医学院分析中心, 湛江 524023; ²广东医学院寄生虫学教研室, 湛江 524023; ³广东医学院生物化学与分子生物学研究所, 湛江 524023)

摘要 该文采用重叠PCR方法在奶牛 β -酪蛋白启动子(op0)中插入SV40增强子构建重组启动子op0-SV40enh, 并分析其活性。首先PCR扩增op0 5'-端2.1 Kb片段、op0 3'-端1 Kb片段和SV40增强子序列, 重叠PCR拼接三种片段得到插入SV40增强子的op0-SV40enh启动子并测序鉴定后, 酶切连接将其插入pGL3-Basic中的指定克隆位点, 构建重组载体pGL3-op0-SV40enh。将重组载体pGL3-op0和pGL3-op0-SV40enh分别瞬时转染乳腺癌MCF-7细胞, 采用双荧光素酶报告基因检测系统检测启动子op0和op0-SV40enh的相对活性。结果显示, 重叠PCR拼接出长度为3.4 Kb的片段, 测序结果与预期结果一致, 表明成功构建了重组载体pGL3-op0-SV40enh; op0-SV40enh启动子的活性远高于op0启动子的活性, 表明奶牛 β -酪蛋白启动子中插入SV40增强子序列可显著提高其引导荧光素酶报告基因表达的活性。

关键词 SV40增强子; 奶牛op0; 双荧光素酶报告基因检测系统

Effect of SV40 Enhancer on Cow β -casein Promoter Activity

Zhong Yu¹, Shao Zheng², Jiang Liming^{3*}

(¹Analysis Center of Guangdong Medical College, Zhanjiang 524023, China; ²Department of Parasitology, Guangdong Medical College, Zhanjiang 524023, China; ³Institute of Biochemistry and Molecular Biology, Guangdong Medical College, Zhanjiang 524023, China)

Abstract By overlapping PCR method SV40 enhancer was inserted into the op0 promoter to construct recombinant promoter op0-SV40enh, and its activity was analyzed. Firstly, PCR amplified 5'-2.1 Kb fragment of cow β -casein promoter, 3'-1 Kb fragment of cow β -casein promoter and SV40 enhancer sequence. Secondly, three fragments were connected by overlap PCR and inserted into multiply clone sites of pGL3-Basic vector and a recombinant vector named pGL3-op0-SV40enh was constructed. Finally, the activity of op0 promoter and op0-SV40enh promoter were detected by Dual-Luciferase Reporter Assay System. Overlapping PCR spliced out of the length of 3.4 Kb fragments, and the sequencing results consistent with the expected results. These indicated that the recombinant pGL3-op0-SV40enh vector be constructed successfully. The results of Dual-Luciferase Reporter Assay indicated that Op0-SV40enh promoter activity well above op0 promoter activity. It could be conclusion that SV40 Enhancer inserted into cow β -casein promoter op0 can significantly improve expression activity of luciferase report gene.

Key words SV40 enhancer; cow β -casein promoter; Dual-Luciferase Reporter Assay System

收稿日期: 2012-10-29 接受日期: 2012-12-03

广东省自然科学基金(批准号: 5011595)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0759-2388582, E-mail: lmjiang9@yahoo.com

Received: October 29, 2012 Accepted: December 3, 2012

This work was supported by the Natural Science Foundation of Guangdong Province (Grant No.5011595)

*Corresponding author. Tel: +86-759-2388582, E-mail: lmjiang9@yahoo.com,

乳腺生物反应器是通过各种转基因技术, 将具有重要价值的生物活性蛋白的基因导入动物体内, 使其在动物乳腺组织中高效表达并从乳汁中提取目的基因产物的生物技术, 具有巨大的市场前景。目前, 制约其产业化发展的主要原因之一仍是对乳腺

特异基因表达调控机制认识不足和缺乏可在乳腺中高效、特异表达的载体。 β -酪蛋白在各种哺乳动物乳腺中均有高水平的表达。 β -酪蛋白启动子的近端和远端有多种调控序列(如: BCE-1、C/EBP、milk box、TATA box)^[1], 可使外源基因特异性地在乳腺中表达, 是构建乳腺定位表达载体良好材料。但是, 天然的奶牛 β -酪蛋白启动子(op0)活性表达相对较弱, 因此, 改造奶牛op0以提高其驱动基因表达的活性是一个重要的研究方向。本实验尝试通过重叠PCR方法在op0中插入SV40增强子来增强其驱动基因表达的活性, 用以构建奶牛乳腺高效定位表达载体, 为开展奶牛乳腺生物反应器的研究奠定基础, 并提供一定的参考依据。

1 材料与amp;方法

1.1 材料与主要试剂

大肠杆菌JM109为本实验室保存, 荧光素酶报告基因质粒pGL3-Basic、pGL3-Control、pRL-SV40购于Promega公司, 质粒pGL3-op0为前期实验室构建并保存于-80℃超低温冰箱。乳腺癌MCF-7细胞株, 购于北京肿瘤细胞库, 宫颈癌Hela细胞和肺癌A549细胞为本实验室保存。质粒小量提取试剂盒TaKaRa MiniBEST Plasmid Purification、DNA切胶回收试剂盒TaKaRa Agarose Gel DNA Purification Kit Ver.2.0、Wide rang DNA Ladder Marker、PrimeSTAR™ HS DNA polymerase、T4 DNA连接酶(TaKaRa公司); 脂质体转染试剂盒Lipofectamine™ 2000(Invitrogen公司); 双荧光素酶报告基因检测系统Dual-Luciferase® Reporter Assay System(Promega公司); 限制性内切酶Hind III和Kpn I (NEB公司); 细胞培养液RPMI-1640、DMEM(Gibco公司); 胎牛血清(杭州四季青微生物材料工程公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 重叠PCR引物的设计和合成 根据Genbank提供的奶牛 β -酪蛋白基因序列(X14711)和SV40增强子的核酸序列参考质粒pGL3-Control(Accession number: U47296), 遵循PCR引物设计原则, 用Primer5软件设计引物, 在op0 5'-端2.1 Kb的上游引物和op0 3'-端1 Kb的下游引物分别加入Kpn I和Hind III限制性酶切位点, 下划线部分表示引物酶切位点, 斜体为所加的保护碱基。所用引物由上海英骏生物技术有限公司合成。(1) op0 5'-端2.1 Kb扩增引物, 正向引物:

GAG AGG TAC CGA ATG GGA AGG ACA TGC TTT CTT TTG, 反向引物: TCT CCG CTC CAT CGA TGT TCT GAG CAA TT。(2) op0 3'-端1 Kb扩增引物, 正向引物: CAC ACA TTC CAC AGC CCA AAT TTC AAG TTT, 反向引物: GAA TAA GCT TTC TGG GAT TAG AGC AGT G。(3) SV40增强子扩增引物, 正向引物: AAT TGC TCA GAA CAT CGA TGG AGC GGA GAA T, 反向引物: AAC TTG AAA TTT GGG CTG TGG AAT GTG TGT。

1.2.2 op0 5'-端2.1 Kb片段、op0 3'-端1 Kb片段和SV40增强子的PCR扩增和纯化 各取10 μ L保存菌种pGL3-op0和pGL3-Control分别接种于4 mL含Amp的LB液体培养基中, 37℃、220 r/min振荡培养12~16 h, 分别取1.5 μ L的菌液提取质粒, 具体操作参见Takara公司质粒小提试剂盒说明书。取1 μ L的质粒DNA稀释100倍为模板, 进行PCR反应。(1) op0 5'-端2.1 Kb片段的扩增程序: 94℃ 4 min; 98℃ 10 s, 55℃ 10 s, 72℃ 2 min, 30个循环; 72℃ 10 min; 最后于12℃保存。(2) op0 3'-端1 Kb片段的扩增程序: 94℃ 4 min; 98℃ 10 s, 55℃ 10 s, 72℃ 1 min, 30个循环; 72℃ 10 min; 最后于12℃保存。(3) SV40增强子序列扩增程序: 94℃ 4 min; 98℃ 10 s, 55℃ 10 s, 72℃ 30 s, 30个循环; 72℃ 10 min; 最后于12℃保存。PCR产物用1%琼脂糖凝胶电泳鉴定其长度, 并用PCR产物回收试剂盒回收纯化, 操作按试剂盒说明书进行。取1 μ L纯化产物电泳, 鉴定其长度。

1.2.3 重叠PCR法拼接三种片段, 构建插入SV40增强子的重组 β -酪蛋白启动子op0-SV40enh 第一步PCR加样体系: 以PCR产物op0 5'-端2.1 Kb片段200 ng、op0 3'-端1 Kb片段50 ng和SV40增强子20 ng为模板, 配制反应体系: Buffer 5 μ L, dNTP(2.5 mmol/L) 2 μ L, pfu(5 U/ μ L) 0.25 μ L, ddH₂O加至25 μ L。扩增程序为: 94℃ 4 min; 98℃ 10 s, 55℃ 10 s, 72℃ 190 s, 5个循环; 72℃ 10 min; 最后于12℃保存。第二步PCR加样体系: 取出反应液, 补充以下试剂: Buffer 5 μ L, dNTP(2.5 mmol/L) 2 μ L, op0 5'-端2.1 Kb上游引物, op0 3'-端1 Kb下游引物各1 μ L, pfu(5 U/ μ L) 0.25 μ L, ddH₂O加至25 μ L。扩增程序为: 94℃ 4 min; 98℃ 10 s, 55℃ 10 s, 72℃ 200 s, 30个循环; 72℃ 10 min; 最后于12℃保存。PCR产物用1%琼脂糖凝胶电泳鉴定其长度, 并用PCR产物回收试剂盒回收纯化, 操作按试剂盒说明书进行。取1 μ L重叠PCR产物电泳,

鉴定其长度。

1.2.4 重组质粒pGL3-op0-SV40enh的构建 用含有 *Hind* III和 *Kpn* I 两种限制性内切酶的双酶切反应体系对质粒pGL3-Basic和重叠PCR产物进行双酶切。20 μ L酶切反应体系如下: 质粒pGL3-Basic和重叠PCR产物各5 μ g, 10 \times M Buffer 2 μ L, *Hind* III和 *Kpn* I 各1 μ L, ddH₂O加至20 μ L。37 $^{\circ}$ C水浴过夜酶切。酶切产物按照PCR切胶回收试剂盒说明书进行回收, 各取1 μ L的回收产物进行1%琼脂糖凝胶电泳, 然后与标准DNA Marker比较亮度, 大致估算回收产物的浓度。T4 DNA连接酶进行连接, 25 μ L连接反应体系如下: 10 \times Buffer 2.5 μ L, 质粒pGL3-Basic双酶切产物0.03 ng, 重叠PCR双酶切产物0.3 ng, T4 DNA Ligase 1 μ L, ddH₂O加至25 μ L。16 $^{\circ}$ C连接过夜。连接产物的转化: 取10 μ L连接产物加入已制备好的JM109感受态细菌中, 轻轻混匀, 放置冰上30 min; 42 $^{\circ}$ C热休克90 s; 立刻放回冰上2 min; 然后在无菌台中加800 μ L的无AMP的LB液体培养基, 于37 $^{\circ}$ C缓慢(150 r/min)振荡培养45 min; 然后10 000 \times g离心5 min, 去掉约800 μ L的上清, 余下液体混匀后用玻璃涂布器涂在含有100 mg/L Amp的LB固体培养基平板上; 37 $^{\circ}$ C恒温箱中倒置培养过夜; 次日观察菌落生长情况, 挑取单菌落接种于含有100 mg/L Amp的LB液体培养液中, 37 $^{\circ}$ C振荡培养过夜。取5 mL菌液, 用质粒纯化试剂盒制备少量质粒, 用PCR、*Hind* III单酶切、*Hind* III和 *Kpn* I 双酶切三种方法鉴定, 将得到的阳性克隆送往上海英骏生物技术有限公司测序。

1.2.5 重组质粒pGL3-op0-SV40enh的活性检测 使用脂质体转染方法, 分别将pGL3-op0、pGL3-op0-SV40enh、pGL3-Basic和pGL3-Control质粒与pRL-SV40共转染至MCF-7乳腺癌细胞中。其中, pGL3-Basic为阴性对照, pGL3-Control为阳性对照, pRL-SV40为内参照。步骤如下: (1) MCF-7、Hela和A549细胞分别接种于24孔板中, 每孔接种 1×10^5 细胞, 转染时细胞的汇合度要达到80%, 转染前24 h更换无抗生素的DMEM完全培养基。分别将0.8 μ g的pGL3-op0、pGL3-op0-SV40enh和pGL3-Basic、pGL3-Control与0.04 μ g的内参质粒pRL-SV40, 以20:1的比例混合共转染细胞。转染步骤参照转染试剂说明书进行, 每组实验样品3个平行试验孔, 并至少进行3次重复实验。(2)转染48 h后采用双荧光素

酶报告基因检测系统检测上述细胞中报告基因的表达水平: 除去培养细胞中的培养基, 并用1 \times PBS清洗细胞两次, 去PBS, 向24孔培养板的每孔中加入100 μ L的1 \times 裂解buffer, 在室温轻晃培养板15 min, 并吸取细胞裂解液12 000 r/min, 4 $^{\circ}$ C离心30 s, 取裂解上清液转移至检测用的96孔板。向96孔板的每孔中加入20 μ L裂解上清液, 加入100 μ L的LAR II, 执行程序, 检测萤火虫荧光素酶活性; 加入100 μ L的Stop Glo试剂, 检测海肾荧光素酶的活性。各孔细胞之间的转染效率通过pRL-SV40活性进行校正。样品校正染效率后的活性, 通过以下方法计算相对荧光活性值。以pGL3-Control的活性为1, pGL3-op0和pGL3-op0-SV40enh活性与pGL3-Control活性的比值为相对活性。(3)用SPSS统计软件对个样品的相对活性进行单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 三种片段和重叠PCR产物的PCR扩增

op0 5'-端2.1 Kb片段, op0 3'-端1 Kb片段和SV40增强子的PCR扩增产物以及这三种片段的重叠PCR产物的1%琼脂糖凝胶电泳结果显示, 在2 000 bp和2 500 bp之间出现一特异条带, 长度与理论长度2.1 Kb片段相符; 在1 000 bp处出现一特有条带, 长度与理论长度1 Kb片段相符; 在250 bp处出现一特异条带, 长度与SV40增强子237 bp理论长度相符。所扩增的片段均条带清晰, 无非特异性扩增现象(图1)。

2.2 重组载体pGL3-op0-SV40enh的PCR、双酶切和单酶切鉴定

重组载体pGL3-op0-SV40enh为阳性的初步鉴定。首先PCR鉴定重叠PCR片段, 然后酶切鉴定重组载体pGL3-op0-SV40enh, 载体pGL3-Basic的多克隆位点分别含*Hind* III和 *Kpn* I 酶切位点, 所以用 *Hind* III和 *Kpn* I 双酶切载体, 并用 *Hind* III单酶切载体。重叠PCR片段的PCR, 单酶切和双酶切产物的1%琼脂糖凝胶电泳结果显示, 在3 000 bp和4 000 bp之间出现一特异性条带, 长度与重叠PCR片段3.4 Kb相符; 双酶切产物有两条清晰的条带, 其中含有重叠PCR 3.4 Kb片段和4.8 Kb的线性载体片段, 长度均与理论值相符; 单酶切产物片段长度约为8.2 Kb, 长度与理论值相符。所有产物的条带清晰无杂带(图2)。

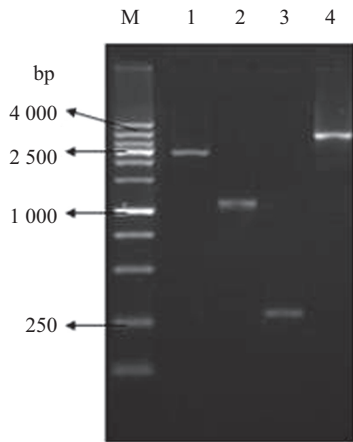
2.3 重叠PCR产物测序鉴定

经鉴定的阳性质粒送上海英骏生物技术有限

公司测序, 测序结果与GenBank数据库中提供的op0序列和SV40增强子的核酸序列比对完全一致, 未发现碱基插入、缺失和替换等突变(图3)。

2.4 SV40增强子插入op0中的模式图

重叠PCR法拼接op0 5'-端2.1 Kb片段、op0 3'-端1 Kb片段和SV40增强子三种片段, 构建插入SV40增强子的重组 β -酪蛋白启动子op0-SV40enh(图4)。



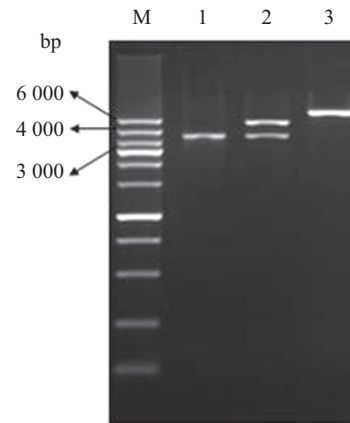
M: marker; 1: op0 5'-端2.1 Kb片段的PCR产物; 2: op0 3'-端1 Kb片段的PCR产物; 3: SV40增强子的PCR扩增产物; 4: 重叠PCR产物。
M: marker; 1: PCR product of op0 5'-2.1 Kb fragment; 2: PCR product of op0 3'-1 Kb fragment; 3: PCR product of SV40 enhancer; 4: overlap PCR product.

图1 三种片段的PCR产物及其重叠PCR产物电泳图

Fig.1 Electrophoresis of three fragments of PCR products and overlap PCR product

2.5 重组 β -酪蛋白启动子的相对活性

pGL3-op0、pGL3-op0-SV40enh在乳腺癌细胞MCF-7、宫颈癌细胞Hela和肺癌细胞A549引导荧光素酶报告基因表达活性的差异: 瞬时转染细胞, 48 h后进行荧光素酶活性检测显示, 启动子op0-SV40enh在细胞MCF-7、Hela和A549的相对活性分别为75.72%、58.75%和59.67%。启动子op0在细胞MCF-7、Hela



M: marker; 1: PCR产物; 2: 双酶切产物; 3: 单酶切产物。

M: marker; 1: PCR product; 2: double-digestion; 3: single-digestion.

图2 重组载体pGL3-op0-SV40enh的PCR产物和双酶切、单酶切鉴定

Fig.2 Recombinant plasmid pGL3-op0-SV40enh identified by PCR product and restriction enzyme digestion, single restriction enzyme

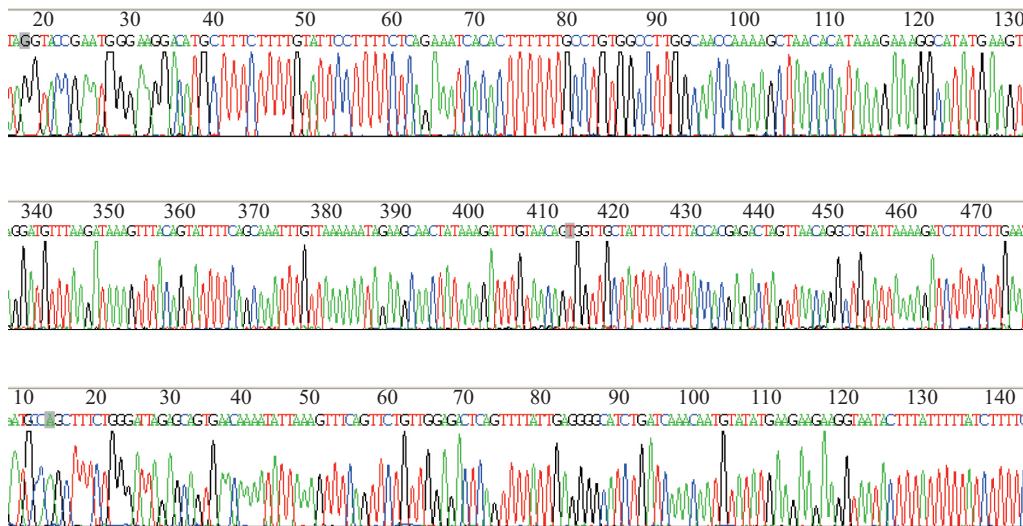


图3 重叠PCR产物的测序结果部分截图

Fig.3 Partial screenshots of overlap PCR product sequencing results

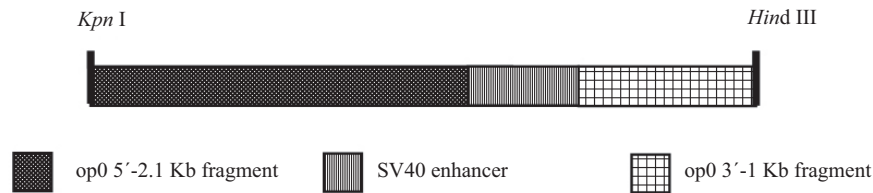
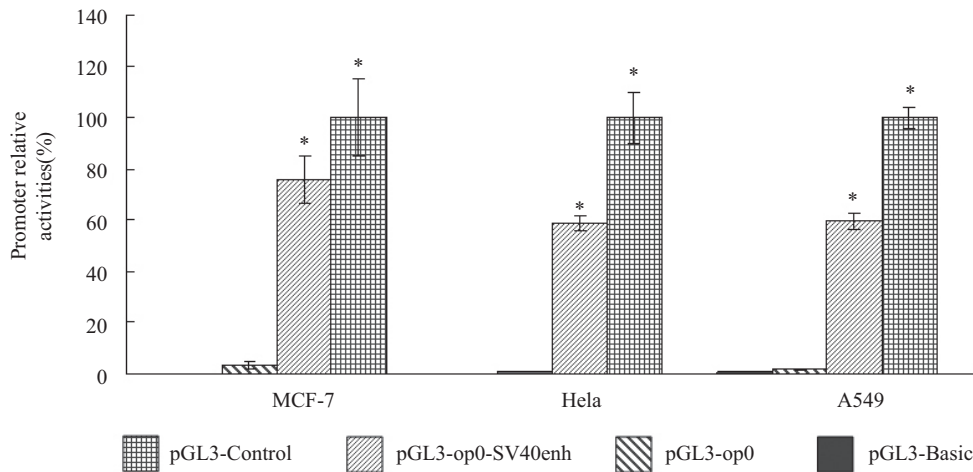


图4 SV40增强子插入op0中的模式图
Fig.4 Pattern map of SV40 enhancer inserted into op0



* $P < 0.05$.

图5 载体在细胞MCF-7、HeLa和A549中引导荧光素酶报告基因表达活性的检测

Fig.5 Detection of luciferase activity in MCF-7, HeLa and A549 cells transfected with different recombination vectors

和A549的相对活性分别为3.37%、0.70%和0.76%。启动子op0-SV40enh的相对活性显著高于启动子op0的相对活性,差异具有统计学意义,但启动子op0-SV40enh的组织特异性不显著(图5)。

3 讨论

β-酪蛋白是在乳腺中特异表达的蛋白,在各种哺乳动物乳腺中均有高水平的表达。对β-酪蛋白基因启动区参与催乳激素调控的顺式作用元件的研究已有很好的进展^[2-4]。在转基因小鼠实验中,羊β-酪蛋白基因的(-524) bp~(+490) bp区足以引导报告基因在转基因小鼠的乳腺中表达。β-酪蛋白基因的5'-端调控区包含有一个增强子序列(BCE-1)和许多重要的转录因子结合位点,尤其是STAT、C/EBP、1/2GRE、milk box及TATA box。正是这些β-酪蛋白基因的核心调控序列的存在,保证了5'-端调控区能够驱动外源基因特异性地在乳腺中的高效表达。SV40增强子是最早发现的病毒增强子,它可以提高很多宿主细胞的基因表达水平^[5]。SV40 72 bp

重复序列中的5'-GCATGCAT-3'顺序具有嘌呤与嘧啶交替出现的特征,可形成有利于与特定蛋白结合,促进转录的正旋DNA结构^[6]。研究表明,如果把这些核苷酸序列从它们原来的位点切下,然后放在距其他基因启动子一定距离的位置,它们仍可发挥功能。Barash等^[7]将SV40增强子插入β-乳球蛋白(BLG)启动子,转染COS-7细胞,可使其相对活性提高近100倍。

我们采用重叠PCR方法构建重组启动子op0-SV40enh,然后采用双酶切方法将启动子op0和op0-SV40enh分别定向克隆至pGL3-Basic载体,得到重组载体pGL3-op0和pGL3-op0-SV40enh。应用荧光素酶报告基因检测系统对启动子进行定量研究,探讨分析SV40增强子对启动子op0引导荧光素酶报告基因表达活性的影响。实验结果表明,SV40增强子能显著提高启动子op0的活性,初步探讨了以增强子序列修饰提高启动子op0活性的途径,为以后奶牛乳腺高效定位表达载体的构建奠定实验基础,也为开展奶牛乳腺生物反应器的研究提供参考依据。本实验用重组载体pGL3-op0-SV40enh转染非乳腺组织细

(下转187页)

- specification of adult stem cells. *J Cardiovasc Transl Res* 2010; 3(1): 61-5.
- 10 Dong XJ, Zhang H, Pan RL, Xiang LX, Shao JZ. Identification of cytokines involved in hepatic differentiation of mBM-MSCs under liver-injury conditions. *World J Gastroenterol* 2010; 16(26): 3267-78.
 - 11 Tian H, Bharadwaj S, Liu Y, Ma H, Ma PX, Atala A, *et al.* Myogenic differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells on a 3D nano fibrous scaffold for bladder tissue engineering. *Biomaterials* 2010; 31(5): 870-7.
 - 12 Jiang TS, Cai L, Ji WY, Hui YN, Wang YS, Hu D, *et al.* Reconstruction of the corneal epithelium with induced marrow mesenchymal stem cells in rats. *Mol Vis* 2010; 16: 1304-16.
 - 13 Yoshioka T, Mishima H, Kaul Z, Ohya Y, Sakai S, Ochiai N, *et al.* Fate of bone marrow mesenchymal stem cells following the allogeneic transplantation of cartilaginous aggregates into osteochondral defects of rabbits. *J Tissue Eng Regen Med* 2011; 5(6): 437-43.
 - 14 Lee MJ, Jung J, Na KH, Moon JS, Lee HJ, Kim JH, *et al.* Anti-fibrotic effect of chorionic plate-derived mesenchymal stem cells isolated from human placenta in a rat model of CCl(4)-injured liver: Potential application to the treatment of hepatic diseases. *J Cell Biochem* 2010; 111(6): 1453-63.
 - 15 Ren C, Kumar S, Chanda D, Kallman L, Chen J, Mountz JD, *et al.* Cancer gene therapy using megenchymal stem cells expressing interferon-beta in a mouse prostate cancer lung metastasis model. *Gene Ther* 2008; 15(21): 1446-53.
 - 16 Heo SC, Lee KO, Shin SH, Kwon YW, Kim YM, Lee CH, *et al.* Periostin mediates human adipose tissue-derived mesenchymal stem cell-stimulated tumor growth in a xenograft lung adenocarcinoma model. *Biochim Biophys Acta* 2011; 1813(12): 2061-70.
 - 17 Do EK, Kim YM, Heo SC, Kwon YW, Shin SH, Suh DS, *et al.* Lysophosphatidic acid-induced ADAM12 expression mediates human adipose tissue-derived mesenchymal stem cell-stimulated tumor growth. *Int J Biochem Cell Biol* 2012; 44(11): 2069-76.
 - 18 Nishimura K, Semba S, Aoyagi K, Sasaki H, Yokozaki H. Mesenchymal stem cells provide an advantageous tumor microenvironment for the restoration of cancer stem cells. *Pathobiology* 2012; 79(6): 290-306.
 - 19 Chen Y, Cong L, Yin X, Dong B, Han Y, Tu G. The culture of temporary tumor-like bone marrow mesenchymal stem cells (TT-BMSC) and the detection of cell biology property. *Ann Transplant* 2011; 16(3): 49-58.

(接179页)

胞宫颈癌Hela细胞和肺癌A549细胞时发现其组织特异性不是很显著,这方面有待进一步的研究和探讨。

参考文献 (References)

- 1 Schmidhauser C, Casperson GF, Myers CA, Sanzo KT, Bolten S, Bissell MJ. A novel transcriptional enhancer is involved in the prolactin and extracellular matrix-dependent regulation of β -casein gene expression. *Mol Biol Cell* 1992; 3(6): 699-709.
- 2 王付龙, 徐 祥, 刘 昕. 转录因子圈套策略研究进展. *生物化学与生物物理进展*(Wang Fulong, Xu Xiang, Liu Xin. Research development of transcription factor decoy strategy. *Progress in Biochemistry and Biophysics*) 2001; 28(6): 802-4.
- 3 Jiminez-Flores R, Richardson T. Genetic engineering of the caseins to modify the behaviour of milk during processing: A review. *J Dairy Sci* 1988; 71: 2640-54.
- 4 Morris DR, Geballe AP. Upstream open reading frames as regulators of mRNA translation. *Mol Cell Biol* 2000; 20(23): 8635-42.
- 5 Ou YC, Gardner TA, Kao C, Zhou HE, Chung LW. A potential of tissue restrictive gene therapy in renal cell carcinoma using MN/CA IX promoter. *Anticancer Res* 2005; 25(2A): 881-6.
- 6 卢圣栋. 现代分子生物学实验技术, 第2版. 北京: 中国协和医科大学出版社(Lu Shengdong. *Current Protocols for Molecular Biology*, 2nd ed. Beijing: Peking Union Medical College Press), 1999, 539-40.
- 7 Barash I, Nathan M, Kari R, Ilan N, Shani M, Hurwitz DR. Elements within the β -lactoglobulin gene inhibit expression of human serum albumin cDNA and minigenes in transfected cells but rescue their expression in the mammary gland of transgenic mice. *Nucleic Acids Res* 1996; 24(4): 602-10.