

# 两种真核启动子体内外转录活性比较研究

刘彦礼 于亚楠 杨 坤 林俊堂\*

(新乡医学院生命科学技术学院, 河南省医用组织再生重点实验室, 新乡 453003)

**摘要** 启动子作为基因工程表达载体的核心组成部分, 在很大程度上决定了目的基因的转录活性。为筛选出一个转录活性较高的真核启动子, 以目的蛋白与增强型绿色荧光蛋白融合表达的形式, 在体内外检测CMV和CAG两种真核启动子的转录活性。首先, 通过常规分子生物学技术将神经钙黏着蛋白(N-cad)克隆到pCAG-MCS-EGFP质粒中(携带CAG启动子), 菌落PCR、双酶切及测序验证; 与pEGFP-N-cad质粒(携带CMV启动子)一起通过磷酸钙法分别转染HEK293T细胞, 比较两种质粒在体外细胞水平转染目的基因效率; 随后, 通过已建立的鸡胚脊髓活体电转方法比较两种质粒在活体鸡胚脊髓内转录目的基因效率, 冷冻切片后进行荧光强度观察; 而体内外实验均应用常规Western blot和RT-PCR技术验证目的基因N-cad在蛋白及基因水平上的表达。荧光显微镜观察结果表明, CMV启动子仅能在体外细胞水平上行使其转录活性, 而CAG启动子可在体内体外高效行使其转录活性, 进一步的Western blot和RT-PCR结果与荧光观察结果一致。该研究结果可为体内研究目的基因功能时的载体构建提供借鉴。

**关键词** 启动子; 转录活性; 活体电转技术; 增强型绿色荧光蛋白

## Transcriptional Activity Assessment of Two Different Eukaryotic Promoters *In Vitro* and *In Vivo*

Liu Yanli, Yu Yanan, Yang Kun, Lin Juntang\*

(College of Life Science and Technology, Henan Key Lab of Medical Tissue Regeneration, Xinxiang Medical University, Xinxiang 453003, China)

**Abstract** As a key element of a plasmid, the promoter determines the transcriptional activity of the exogenous genes. In order to screen for the effective promoter inside plasmid used in studying gene function, the transcriptional activity of two commonly used promoters, CMV and CAG were compared *in vitro* and *in vivo* by the fluorescence intensity of enhanced green fluorescent protein (EGFP). Firstly, the target gene N-cadherin (*N-cad*) was cloned into the plasmid of pCAG-MCS-EGFP, and confirmed by colony PCR, double digestion and sequence. Subsequently, these two plasmids (pEGFP-N-cad and pCAG-N-cad-EGFP) were transfected into HEK293T *in vitro* by calcium phosphate coprecipitation technique, and imaged under a fluorescence microscope, then the expression of N-cad was confirmed by Western blot and RT-PCR. Thirdly, the two plasmids were transfected into chicken embryonic spinal cord by electroporation, and imaged under a stereo fluorescence microscope. Finally, the EGFP positive spinal cords were selected and confirmed by frozen section under a fluorescence microscope, Western blot

收稿日期: 2015-04-30 接收日期: 2015-09-14

河南省高等学校重点科研项目计划(批准号: 15A180009)和河南省高校科技创新人才支持计划(批准号: 14HASTTT032)资助的课题

\*通讯作者。Tel: 0373-3831679, E-mail: linjltin@126.com

Received: April 30, 2015 Accepted: September 14, 2015

This work was supported by the University Key Scientific Research Fund of Henan Province (Grant No.15A180009) and Henan University Innovation Talents Support Program (Grant No.14HASTTT032)

\*Corresponding author. Tel: +86-373-3831679, E-mail: linjltin@126.com

网络出版时间: 2015-10-16 15:26:52 URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20151016.1526.002.html>

and RT-PCR. The results showed that these two promoters had equivalent transcriptional activity *in vitro*, but the artificially designed CAG promoter could effectively drive target gene expression *in vivo* when compared to the CMV promoter that originated from cytomegalovirus.

**Keywords** promoter; transcriptional activity; electroporation *in vivo*; enhanced green fluorescent protein

随着基因工程及蛋白质组学研究的不断深入,对基因功能的研究也逐渐从细胞水平的验证过渡到组织水平。早期,通过病毒转染技术可实现外源基因在组织中异常表达(过表达或抑制表达),达到对相关基因功能研究的目的。然而,该技术在使用中因转染效率与病毒活力呈正相关、转染区域不明确及病毒本身对组织的潜在影响等因素,限制了该技术在体内基因功能研究中的广泛应用<sup>[1-2]</sup>。近年来,利用质粒自身所带负电的特性,已成功建立通过活体电转技术实现外源基因在体内(鸡胚、鼠胚等)的异常表达,促进相关基因在体内的功能研究<sup>[3-4]</sup>。而启动子作为基因工程表达载体的核心组成部分,在很大程度上决定了外源基因在细胞及组织水平的转录活性,并直接影响其最终产物的表达水平<sup>[5]</sup>。

因此,本研究首先比较携带有两种常用启动子(CMV和CAG)的真核表达载体在细胞水平上的转录效率,进一步通过本课题组已建立的鸡胚脊髓电转技术验证上述两种质粒在体内的转录效率,最终为在组织水平上研究基因功能时载体的构建提供借鉴<sup>[6]</sup>。此外,本研究选择基因长约2 700 bp的神经钙黏着蛋白(N-cadherin, *N-cad*)为目的基因与EGFP融合表达,一方面使用大片段目的基因可以更加真实地反映启动子的转录效率,另一方面与EGFP融合表达有利于实验结果的可视化(绿色荧光),更直观地反映转录效率。

## 1 材料与方法

### 1.1 质粒、菌株、细胞及实验动物

pEGFP-N-cad质粒购自Addgene公司(Plasmid #18870),其载体骨架为pEGFP-N1(图1A),由本课题组保存。pCAG-MCS-EGFP质粒(图1B)由西北农林科技大学赵善廷教授馈赠。大肠杆菌DH5 $\alpha$ 感受态细胞购自TaKaRa公司。HEK293T细胞由本课题组保存。受精鸡蛋由本地养鸡场提供。

### 1.2 主要试剂与仪器

限制性核酸内切酶、高保真*pyrobest* DNA聚合酶、T4 DNA连接酶及RNA提取试剂(RNAiso

plus)购自TaKaRa公司。DNA纯化及胶回收试剂盒、质粒大提试剂盒、反转录试剂盒、2 $\times$ Taq MasterMix(含染料)及BCA蛋白定量试剂盒购自北京康为世纪生物科技有限公司。DMEM高糖培养基购自Hyclone公司。胎牛血清购自Gibco公司。磷酸钙细胞转染试剂盒及RIPA裂解液购自碧云天生物技术公司。一抗Anti-GAPDH抗体(ab181603,兔单克隆抗体,抗人和鸡)和Anti-N Cadherin抗体(ab76011,兔单克隆抗体,抗鼠)及二抗Goat Anti-Rabbit IgG H&L(HRP, ab6721,多克隆抗体,山羊抗兔)均购自Abcam公司。所需引物及测序服务均由苏州金唯智生物科技有限公司完成。所用仪器包括:Veriti<sup>TM</sup> 96-Well PCR仪(美国ABI公司)、CUY-21型多功能活体电转化仪(日本NEPA公司)、M205FA型倒置体视荧光显微镜(德国Leica公司)、倒置荧光显微镜及CMI850型冷冻切片仪(德国Leica公司)、Nanodrop 2000分光光度计(Thermo公司)。

### 1.3 pCAG-N-cad-EGFP载体构建及质粒大提

以pEGFP-N-cad为模板,常规PCR扩增获得*N-cad*基因片段,所需引物见图1C。*N-cad*片段纯化后经*EcoR* I和*Bgl* II双酶切,并与经同样双酶切的表达空载体pCAG-MCS-EGFP进行连接,连接产物转化大肠杆菌感受态细胞DH5 $\alpha$ 。筛选获得的阳性克隆进行菌液PCR和双酶切验证后测序。将测序正确的携带pCAG-N-cad-EGFP、pEGFP-N-cad、pCAG-MCS-EGFP和pEGFP-N1菌株分别活化后接种于400 mL LB培养基中(根据自身载体抗性添加相应抗生素),37  $^{\circ}$ C过夜,离心收集菌体后按质粒大提试剂盒说明完成质粒提取,并统一将质粒浓度调至1  $\mu$ g/ $\mu$ L备用。

### 1.4 HEK293T细胞转染

将HEK293T细胞以 $1 \times 10^5$ /mL的密度接种于12孔培养板中,待细胞融合达70%~80%时进行转染。转染前1 h更换不含抗生素的新鲜培养基;随后分别将6  $\mu$ g pCAG-N-cad-EGFP、pEGFP-N-cad、pCAG-MCS-EGFP和pEGFP-N1质粒混匀加入到100  $\mu$ L氯化钙溶液中,每种质粒3个重复;将质粒-氯化钙混合液加入100  $\mu$ L BBS溶液中,混匀后室温静置20 min。然后将

混合液均匀滴加到相应孔中,混匀后置于37 °C、5% CO<sub>2</sub>培养箱中培养。转染48 h后,弃去培养液,PBS冲洗3次后于倒置荧光显微镜下观察。随后,将上述四种质粒转染的HEK293T细胞分别消化、离心收集于适量RNAiso plus及RIPA裂解液中,-80 °C保存待用。

### 1.5 鸡胚脊髓电转

参考文献[6]的方法,取新鲜受精鸡蛋消毒后放入孵化箱,在温度37.8 °C、湿度为60%的条件下培养。待培养至第2.5 d(embryonic day 2.5, E2.5)取出鸡蛋置于超净工作台内,在鸡蛋钝端侧面与正上方用钢锯条轻锯相隔1 cm的两条缝,在两条缝上用剥离分针轻钻两个小孔,用10 mL无菌注射器从钝端侧面进针吸取3~4 mL蛋清,然后用眼科手术剪从钝端侧面小孔处将上面蛋壳剪开椭圆形开口,口的直径约1.5 cm,可见鸡胚浮于蛋黄上方。随后,将1 μL浓度为1 μg/μL的质粒用显微注射毛细玻璃针在体视显微镜下注射到脊髓腔,将电极放在脊髓的两侧,正极在拟转染一侧,确保电极与组织之间有一定空隙。使用电转仪进行电转,电转条件为电压18 V,电脉冲60 ms,间隔90 ms,电脉冲5次。电转完之后,用医用胶布密封,在蛋壳上记录电转时间,放回孵化箱继续培养,整个过程在超净工作台内完成,每种质粒至少电转5个鸡蛋。

### 1.6 EGFP阳性胚胎取材及冷冻切片

将电转后的鸡胚继续培养至E5,通过倒置体视荧光显微镜观察pCAG-N-cad-EGFP、pEGFP-N-cad、pCAG-MCS-EGFP和pEGFP-N1四种质粒转染的鸡胚,筛选EGFP阳性表达胚胎,并在显微镜下用尖镊子小心取出脊髓。将上述四种质粒转染的胚胎一部分收集脊髓于适量RNAiso plus及RIPA裂解液中,匀浆后-80 °C保存待用。另一部分胚胎用小勺将脊髓转移至4 °C预冷处理的PBS液漂洗3次,置于4%多聚甲醛(PFA)中,4 °C摇床过夜,取出组织吸干

液体,转移到18%蔗糖溶液中,4 °C摇床过夜,待沉淀到管底部时取出组织吸干液体。用锡箔纸做一直径为1 cm的柱状模型,加入适量OCT包埋剂,使脊髓朝上竖立,确定脊髓位于柱状模型的正中央,置于液氮中冷冻后放-80 °C冰箱保存;切片时取出已包埋的组织在冷冻切片机上切片,厚度15~20 μm。切片后,于烤片机上37 °C烤片30 min以上,常规DAPI染核后于荧光显微镜下观察,每条脊髓至少切5张片子。

### 1.7 RT-PCR检测N-cad基因表达

将收集于RNAiso plus中的HEK293T细胞及鸡胚脊髓按RNA提取试剂说明提取各样本总RNA,所提取的样品RNA D<sub>260</sub>/D<sub>280</sub>>1.8,且琼脂糖凝胶电泳后可见明显的28S和18S两条带,说明RNA提取效果理想。Nanodrop 2000定量后取200 ng总RNA样品,应用反转录试剂盒合成cDNA。采用2×Taq MasterMix推荐的25 μL体系,引物(10 μmol/L)用量为1 μL,相关目的基因引物见表1<sup>[7-9]</sup>。PCR反应条件为:94 °C预变性5 min;30个循环(94 °C变性30 s,退火30 s,72 °C延伸30 s);72 °C后延伸10 min。PCR产物通过1.2%琼脂糖凝胶电泳进行检测,实验结果重复3次以上。

### 1.8 Western blot检测N-cad蛋白表达

将收集于RIPA裂解液中的HEK293T细胞及鸡胚脊髓,匀浆后于冰上静置40 min,间歇性充分混匀5~6次,提取各样本总蛋白。蛋白定量并稀释到浓度为5 μg/μL,常规SDS-PAGE(上样量为20 μL)后转PVDF膜;脱脂牛奶封闭后一抗4 °C孵育过夜。TBST洗涤3次后,二抗室温孵育1 h;TBST洗涤3次后,ECL发光试剂盒显影,化学发光仪检测,实验结果重复3次以上。

## 2 结果

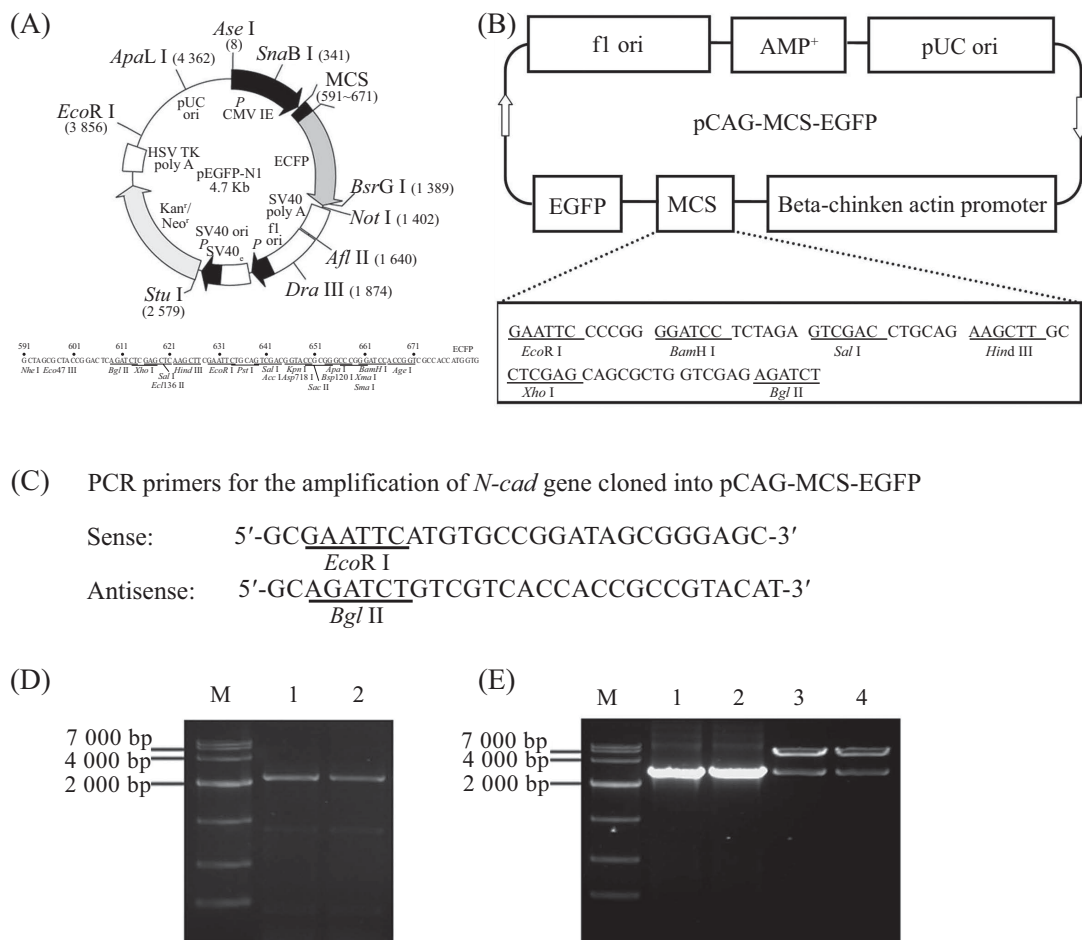
### 2.1 pCAG-N-cad-EGFP载体构建及验证

常规PCR获得N-cad片段(约2 700 bp),如图1D所

表1 引物序列

Table 1 Primer sequences

基因 Gene	核苷酸序列(5'→3') Oligonucleotide sequence (5'→3')	退火温度(°C) Temperature (°C)	种属 Species	片段大小(bp) Size (bp)
<i>N-cad</i>	Sense: CCA CAG ACA TGG AAG GCA ATC C	60	Mouse	198
	Antisense: CAC TGA TTC TGT ATG CCG CAT TC			
<i>GAPDH</i>	Sense: GAA GGT GAA GGT CGG AGT	60	Human	226
	Antisense: GAA GAT GGT GAT GGG ATTTC			
<i>GAPDH</i>	Sense: TAA AGG CGA GAT GGT GAA AG	53	Chicken	244
	Antisense: ACG CTC CTG GAA GAT AGT GAT			



A: pEGFP-N1质粒结构图及多克隆位点; B: pCAG-MCS-EGFP质粒结构图及多克隆位点; C: PCR扩增*N-cad*所需引物; D: PCR扩增*N-cad*的琼脂糖凝胶电泳结果; E: 菌落PCR(1和2泳道)及*EcoR* I和*Bgl* II双酶切(3、4泳道)的琼脂糖凝胶电泳结果。

A: map of the vector pEGFP-N1; B: map of the vector pCAG-MCS-EGFP; C: the primers used in the amplification of *N-cad* gene; D: PCR products of *N-cad* were analyzed by electrophoresis; E: the results of colony PCR (lane 1 and 2) and digestion of pCAG-Ncad-EGFP by *EcoR* I and *Bgl* II (lane 3 and 4).

图1 pCAG-N-cad-EGFP载体构建及验证

Fig.1 The construction and identification of pCAG-N-cad-EGFP

示。转化后所得阳性克隆菌株首先进行菌落PCR, 产物进行琼脂糖凝胶电泳, 如图1E(1、2泳道)所示。随后, 将鉴定正确的阳性克隆菌株扩大培养后进行质粒提取, 所提质粒进行*EcoR* I和*Bgl* II双酶切, 酶切鉴定结果如图1E(3、4泳道)所示。菌落PCR和双酶切结果均表明, pCAG-N-cad-EGFP载体构建正确, 随后送往苏州金唯智生物科技有限公司测序进行最终确定。

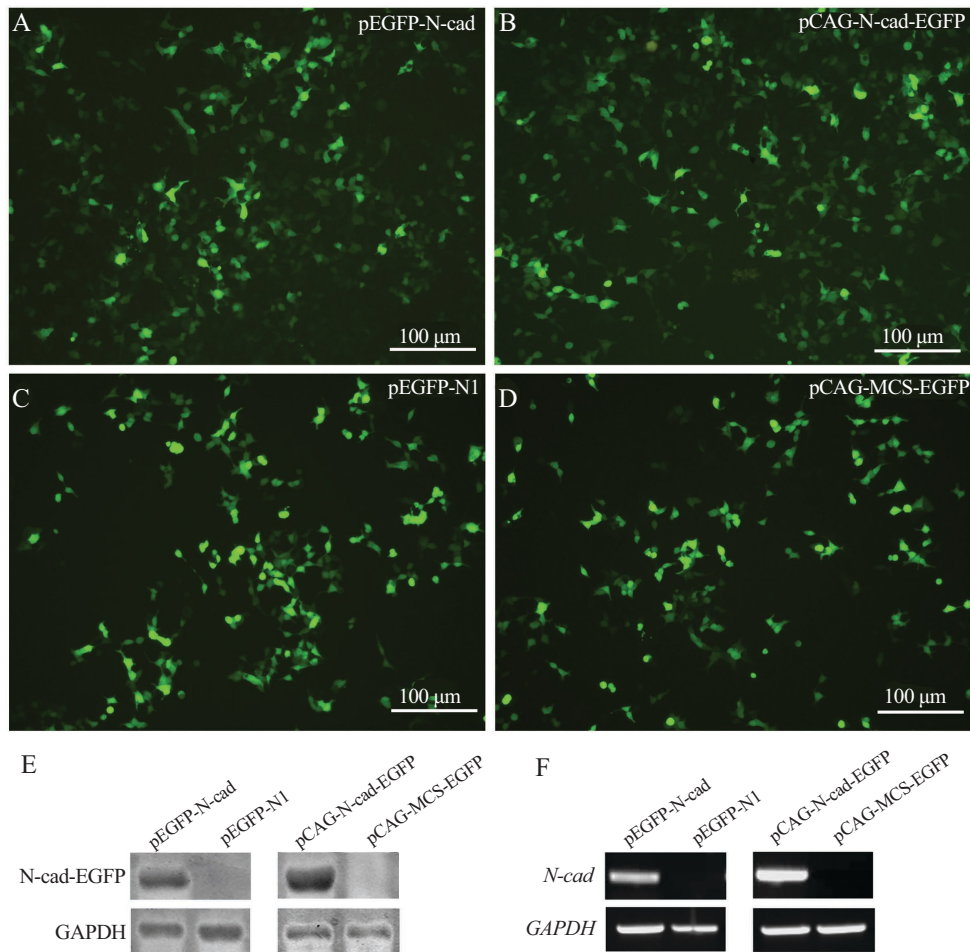
## 2.2 体外HEK293T细胞转染结果

将pEGFP-N-cad和pCAG-N-cad-EGFP及对应的空质粒pEGFP-N1和pCAG-MCS-EGFP分别转染HEK293T细胞48 h后, 于荧光倒置显微镜下观察。结果显示, 四种质粒转染细胞后, 均能使转染细胞呈现绿色荧光(图2A~图2D); 进一步通过Western blot和RT-PCR验证发现, 相较于空质粒pEGFP-N1和

pCAG-MCS-EGFP转染组, pEGFP-N-cad和pCAG-N-cad-EGFP转染组均能在蛋白质水平(图2E)和mRNA水平(图2F)上高效表达目的基因*N-cad*。

## 2.3 鸡胚脊髓电转结果

利用活体电转基因技术成功将携带N-cad-EGFP融合基因的质粒(pEGFP-N-cad和pCAG-N-cad-EGFP)及其对应的空质粒pEGFP-N1和pCAG-MCS-EGFP转染到E2.5的鸡胚脊髓腔内, 待鸡胚发育至E5时, 取出完整鸡胚于体视荧光显微镜下观察并筛选EGFP阳性胚胎。图3B为pEGFP-N-cad转染后绿色荧光检查结果, 结果中无明显绿色荧光, 暗示转染pEGFP-N-cad质粒在活体内工作效率较低或不工作。进一步通过Western blot和RT-PCR实验发现, N-cad在鸡胚脊髓内无论在蛋白还是mRNA水平均



A~D: 依次为pEGFP-N-cad、pCAG-N-cad-EGFP、pEGFP-N1和pCAG-MCS-EGFP四种质粒分别转染HEK293T细胞后的荧光结果; E: Western blot检测上述四种质粒分别转染HEK293T细胞后N-cad-EGFP在蛋白水平上的表达; F: RT-PCR检测上述四种质粒分别转染HEK293T细胞后N-cad在基因水平上的表达。

A~D: the fluorescence results of HEK293T cells after being transfected by the plasmid of pEGFP-N-cad, pCAG-N-cad-EGFP, pEGFP-N1 and pCAG-MCS-EGFP, respectively; E: protein expression of N-cad-EGFP in HEK293T cells after being transfected by the plasmids mentioned above; F: gene expression of *N-cad* in HEK293T cells after being transfected by the plasmids mentioned above.

图2 pEGFP-N-cad及pCAG-N-cad-EGFP质粒转染HEK293T细胞结果

Fig.2 The results of HEK293T cells after being transfected by the plasmid of pEGFP-N-cad and pCAG-N-cad-EGFP

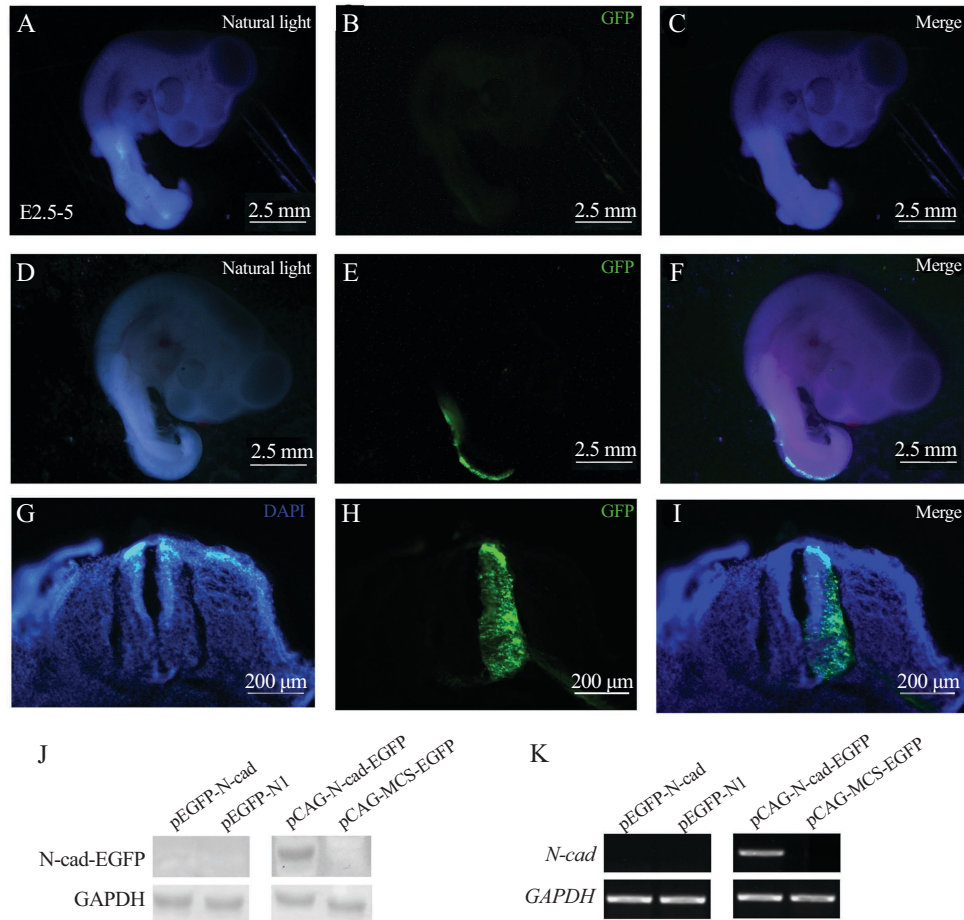
未表达(图3J和图3K)。而图3E为pCAG-N-cad-EGFP转染后绿色荧光检查结果, 图中可观察到较强的绿色荧光; 随后的冷冻切片(图3G~图3I)结果进一步表明, pCAG-N-cad-EGFP可在体内高效表达; 而最终的Western blot和RT-PCR实验结果(图3J和图3K)验证了上述推测, 表明目的基因N-cad在蛋白质及mRNA水平上均可高效表达。

### 3 讨论

近年来, 利用活体电转技术研究相关基因在组织水平的功能已经建立并逐步完善, 并在研究大脑、脊髓及视顶等组织内相关基因功能方面已取得重大进展<sup>[3-4,10]</sup>。而质粒作为活体电转技术的重要组成部

分, 其上的核心元件启动子对目的基因在组织内的异常表达起决定性作用, 因此筛选具有较强转录活性的启动子的载体将为研究体内目的基因功能提供有利工具。本研究重在评价两种常用启动子: CMV启动子<sup>[11]</sup>(源于巨细胞病毒)和CAG启动子<sup>[12]</sup>(源于鸡的 $\beta$ -actin启动子)在体外及体内的转录活性, 以期为体内研究基因功能时的载体构建提供借鉴。

基于常规分子生物学技术将目的基因N-cad克隆到pCAG-MCS-EGFP质粒中, 验证后分别将pEGFP-N-cad和pCAG-N-cad-EGFP及其对应的空质粒转染HEK293T细胞。荧光强度、基因及蛋白质水平上的检测结果均表明, pEGFP-N-cad和pCAG-N-cad-EGFP在体外均能高效诱导融合蛋白N-cad-



A~C: E2.5鸡胚脊髓电转pEGFP-N-cad质粒后继续孵化至E5时体式荧光显微镜观察结果; D~F: E2.5鸡胚脊髓电转pCAG-N-cad-EGFP质粒后继续孵化至E5时体式荧光显微镜观察结果; G~I: E2.5鸡胚脊髓电转pCAG-N-cad-EGFP质粒后继续孵化至E5取材, 冷冻切片后倒置荧光显微镜观察结果; J: Western blot检测pEGFP-N-cad、pCAG-N-cad-EGFP、pEGFP-N1和pCAG-MCS-EGFP四种质粒分别电转鸡胚脊髓后N-cad-EGFP在蛋白水平上的表达; K: RT-PCR检测上述四种质粒分别电转鸡胚脊髓后N-cad在基因水平上的表达。

A~C: the results of pEGFP-N-cad being transfected into chicken spinal cord by electroporation; D~F: the results of pCAG-N-cad-EGFP being transfected into chicken spinal cord by electroporation; G~I: the results of frozen section after pCAG-N-cad-EGFP being transfected into chicken spinal cord by electroporation; J: protein expression of N-cad-EGFP in chicken spinal cord by electroporation; K: gene expression of N-cad in chicken spinal cord by electroporation.

图3 鸡胚脊髓活体电转pEGFP-N-cad和pCAG-N-cad-EGFP质粒结果

Fig.3 Target gene expression of pEGFP-N-cad and pCAG-N-cad-EGFP after being transfected by electroporation

EGFP的表达。随后, 对所得结果的进一步分析发现, pCAG-N-cad-EGFP质粒转染能够较pEGFP-N-cad质粒产生更多的目的基因mRNA及蛋白质(图2E和图2F中目的基因条带的灰度值), 暗示CAG启动子能够在体外显著促进目的基因mRNA的转录水平, 并最终引起目的基因在蛋白质水平上的高表达。通过本课题组已建立的鸡胚脊髓活体电转方法, 进一步比较两种质粒在活体鸡胚脊髓内的转录目的基因N-cad的效率。结果表明, 二者体内转录活性差异明显, pEGFP-N-cad质粒电转后观察不到明显绿色荧光, 且在mRNA及蛋白质水平上均未检测到N-cad的表达, 表明CMV启动子在活体内转录目的基因活性较

低甚至不工作; 而pCAG-MCS-EGFP质粒以相同浓度转染情况下即可观察到较强的绿色荧光, 后续结果亦验证了N-cad在mRNA及蛋白质水平上的高表达, 表明CAG启动子在活体内具有较高的转录活性。

推测两种启动子在体内转录活性的显著差异源于其自身来源: CMV启动子源于巨细胞病毒, 其首先要保证病毒侵入机体后自身复制, 同时还受到宿主免疫防御机制的调节。例如, 人巨细胞病毒感染健康人群后, 大部分人无症状或仅出现较轻的临床症状<sup>[10-11]</sup>; 而CAG作为编码看家基因 $\beta$ -actin的启动子, 其产物在体内表达丰富且稳定, 暗示其较CMV启动子在体内受到宿主防御机制调节的可能

性要小。此外, CAG启动子中的CMV增强子也可促进其对目的基因的转录<sup>[12,15]</sup>。综上所述, 本研究表明, CMV启动子仅能在体外细胞水平上行使其转录活性, 而CAG启动子可在体内体外高效行使其转录活性, 因此在体内研究目的基因功能时, 可优先选择含有CAG启动子的载体。

### 参考文献 (References)

- 1 许亮, 卢向阳, 田云. 后基因组时代基因功能分析的策略. 中国生物工程杂志(Xu Liang, Lu Xiangyang, Tian Yun. Strategies of functional genes analysis in the post-genomic Era. China Biotechnology) 2003; 23(8): 29-34.
- 2 Swiech L, Heidenreich M, Banerjee A, Habib N, Li Y, Trombetta J, *et al.* *In vivo* interrogation of gene function in the mammalian brain using CRISPR-Cas9. *Nat Biotechnol* 2015; 33(1): 102-6.
- 3 dal Maschio M, Ghezzi D, Bony G, Alabastri A, Deidda G, Brondi M, *et al.* High-performance and site-directed *in utero* electroporation by a triple-electrode probe. *Nat Commun* 2012; 3: 960.
- 4 Lin J, Luo J, Redies C. Cadherin-19 expression is restricted to myelin-forming cells in the chicken embryo. *Neuroscience* 2010; 165(1): 168-78.
- 5 Liu Y, Fu S, Niu R, Yang C, Lin J. Transcriptional activity assessment of three different promoters for mouse *in utero* electroporation system. *Plasmid* 2014; 74: 52-8.
- 6 杨慈清, 毛会丽, 林俊堂. 鸡胚培养及活体电转基因方法的建立. 解剖学报(Yang Ciqing, Mao Huili, Lin Juntang. Establishment of chicken embryo culture system and *in vivo* electroporation methods. *Acta Anatomica Sinica*) 2012; 43(4): 564-8.
- 7 Gündüz V, Kong E, Bryan CD, Hinds PW. Loss of the retinoblastoma tumor suppressor protein in murine calvaria facilitates immortalization of osteoblast-adipocyte bipotent progenitor cells characterized by low expression of N-Cadherin. *Mol Cell Biol* 2012; 32(13): 2561-9.
- 8 Tricarico C, Pinzani P, Bianchi S, Paglierani M, Distant V, Pazzagli M, *et al.* Quantitative real-time reverse transcription polymerase chain reaction: Normalization to rRNA or single housekeeping genes is inappropriate for human tissue biopsies. *Anal Biochem* 2002; 309(2): 293-300.
- 9 Gao Y, Bai C, Wang K, Sun B, Guan W, Zheng D. All-trans retinoic acid promotes nerve cell differentiation of yolk sac-derived mesenchymal stem cells. *Appl Biochem Biotech* 2014; 174(2): 682-92.
- 10 Jossin Y, Cooper JA. Reelin, Rap1 and N-cadherin orient the migration of multipolar neurons in the developing neocortex. *Nat Neurosci* 2011; 14(6): 697-703.
- 11 Rodova M, Jayini R, Singasani R, Chipps E, Islam MR. CMV promoter is repressed by p53 and activated by JNK pathway. *Plasmid* 2013; 69(3): 223-30.
- 12 Alexopoulou AN, Couchman JR, Whiteford JR. The CMV early enhancer/chicken  $\beta$  actin (CAG) promoter can be used to drive transgene expression during the differentiation of murine embryonic stem cells into vascular progenitors. *BMC Cell Biol* 2008; 9(1): 2.
- 13 Damdindorj L, Karnan S, Ota A, Takahashi M, Konishi Y, Hossain E, *et al.* Assessment of the long-term transcriptional activity of a 550-bp-long human  $\beta$ -actin promoter region. *Plasmid* 2012; 68(3): 195-200.
- 14 Brown A J, Sweeney B, Mainwaring DO, James DC. NF- $\kappa$ B, CRE and YY1 elements are key functional regulators of CMV promoter driven-transient gene expression in CHO cells. *Biotech J* 2015; 10(7): 1019-28.
- 15 Ma W, Xie Z, Liu F, Ning H, Jiang Y. A significant increase of RNAi efficiency in human cells by the CMV enhancer with a tRNAlys promoter. *BioMed Res Int* 2009; 2009: 514287.