

## 鸡卵清蛋白基因启动子调控 GFP 基因在鸡原代输卵管上皮细胞和中国仓鼠卵巢细胞的表达

# GFP Reporter Gene under the Direction of Chicken Ovalbumin Gene Promoter Expressed in the CHO Cell and in the Primary Cell Cultures of Chicken Oviduct

逢 越, 李庆伟\*

PANG Yue and LI Qing-Wei\*

辽宁师范大学生命科学学院, 大连 116029

College of Life Sciences, Liaoning Normal University, Dalian 116029, China

**摘 要** 特异性扩增家鸡卵清蛋白基因上游调控序列-1340bp ~ +1655bp 片段和第一内含子 +49bp ~ +1655bp 片段, 去除 pGFP-N2 载体自身的 CMV 启动子, 分别构建了 P<sub>2.9k<sub>oval</sub></sub>-GFP 和 P<sub>1.5k<sub>oval</sub></sub>-GFP 两种表达载体, 经测序和酶切鉴定表达载体构建正确。采用脂质体转染法分别将这两种载体、pGFP-N2 (阳性对照) 质粒及阴性对照转染鸡原代输卵管上皮细胞和中国仓鼠卵巢细胞。用荧光倒置显微镜观测绿色荧光蛋白的表达。结果表明: 两种表达质粒在鸡原代输卵管上皮细胞和中国仓鼠卵巢细胞中都可以表达荧光蛋白。结果既显示卵清蛋白第一内含子对基因的表达起到一定的调控作用, 也显示卵清蛋白启动子对输卵管上皮细胞和卵巢细胞不存在特异性, 并且不存在种属差异性。

**关键词** 卵清蛋白基因, 启动子, 脂质体, GFP, 细胞培养

**中图分类号** Q786 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(2005)01-0154-05

**Abstract** To research GFP reporter gene under the control of chick ovalbumin gene regulatory elements express in the CHO cell and in the primary cell cultures of chicken oviduct. 1.5kb fragment and 2.9kb fragment were amplified by PCR method, two fragments were subcloned to mammalian expression vector pGFP-N2 by recombinant DNA technology, the CMV promoter was cut off from pGFP-N2, so two expression vectors were constructed, one is the P<sub>2.9k<sub>oval</sub></sub>-GFP including promoter, first exon, first intron of chicken ovalbumin gene, the other is the P<sub>1.5k<sub>oval</sub></sub>-GFP including first intron of chicken ovalbumin gene. Restriction enzyme digestion and DNA sequence analysis revealed that 5' upstream regions of ovalbumin gene were not only identical to those of the published chicken ovalbumin gene, but also were contained in the recombinant vector. They were transfected into the CHO cell and the primary cell cultures of chicken oviduct by Lipofectin, they were used for fluorescence detection. GFP protein existed in GFP transfected the CHO cell and the primary cell cultures of chicken oviduct. It is demonstrated that GFP reporter gene under the direction of chick ovalbumin gene promoter could be expressed in the CHO cell and in the primary cell cultures of chicken oviduct.

**Key words** chicken ovalbumin gene, promoter, lipofectin, GFP, cell culture

Received: June 17, 2004; Accepted: September 6, 2004.

This work was supported by the Grant of Science and Technology Item of Liaoning (No. 002057).

\* Corresponding author. Tel: 86-411-84258247; E-mail: liqw@263.net

辽宁省科技攻关项目基金资助(No:002057)。

随着转基因动物表达系统的研究,哺乳动物的乳腺生物反应器已有成功的报道。作为禽类的生物反应器研究也已经起步,鸡是禽类中最常见、数量最多的物种。鸡蛋成分简单,由白蛋白、卵黄、卵壳组成。白蛋白又包括卵清蛋白、卵转铁蛋白、卵粘蛋白、溶菌酶,其中卵清蛋白的含量占总量的65%,在产蛋母鸡输卵管管状腺体细胞总合成蛋白中占55%~60%,卵清蛋白的高表达量促使研究者利用它的启动子,高效启动外源蛋白的表达。1997年Ochiai等用长约1.35kb卵清蛋白基因启动子调控hEPO基因表达,其表达量是其它三种不同构建载体中表达量最少的<sup>[1]</sup>。1999年,宇丽等克隆了鸡卵清蛋白上游调控序列,并将CAT基因与卵清蛋白基因上游调控序列融合,构建了表达载体,并转染鸡原代输卵管上皮细胞和鸡成纤维细胞,48h表达量最高为0.67 $\mu$ g/L<sup>[2]</sup>。

本实验曾用GFP作为报告基因来探讨鸡卵清蛋白基因启动子的调控能力,构建了P<sub>1.5k<sub>oval</sub></sub>-GFP和P<sub>2.9k<sub>oval</sub></sub>-GFP两种表达载体,构建过程详见引文[3]。而本文报道了这两种表达载体通过脂质体包裹法转染鸡原代输卵管上皮细胞<sup>[2]</sup>和中国仓鼠卵巢细胞系中表达的情况,探讨两种表达载体在两种不同细胞中的表达差异,为进一步转基因鸡的研究奠定了基础。同时本文发现卵清蛋白第一内含子作为启动子可以调控GFP的表达,为内含子的研究奠定了实验基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

1.1.1 实验材料:10日龄母鸡(海兰褐)购自大连韩伟集团。

1.1.2 质粒、细胞系:P<sub>1.5k<sub>oval</sub></sub>-GFP和P<sub>2.9k<sub>oval</sub></sub>-GFP由本实验室构建(详见引文[3])。中国仓鼠卵巢细胞购自北京细胞中心。

1.1.3 主要试剂:胎牛血清、F12培养液均购自北京细胞中心。Lipofectin<sup>TM</sup> Reagent、雌二醇、皮质酮、胰岛素均购自华美公司。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 鸡输卵管上皮细胞的原代培养:

细胞培养:将10日龄雏鸡处死,取输卵管及卵巢,去除额外脂肪等组织后,剪成1~2mm碎块,研磨,过滤,离心,去除上清,沉淀用无血清培养液溶解,以 $1 \times 10^6$  cell/孔接种到24孔培养板,立即转染。

转染:转染液A:5 $\mu$ L P<sub>1.5k<sub>oval</sub></sub>-GFP/P<sub>2.9k<sub>oval</sub></sub>-GFP(2 $\mu$ g)加95 $\mu$ L F12无血清培养液,B:15 $\mu$ L脂质体加85 $\mu$ L F12无血清培养液,A与B混匀,室温放置15min,加到24孔培养板,放置37 $^{\circ}$ C 5%二氧化碳培养箱中4h,之后加入含有10%胎牛血清的F12培养液和 $10^{-7}$  mol/L的雌二醇, $10^{-6}$  mol/L的皮质酮,40 $\mu$ g/L的胰岛素继续孵育培养。

#### 1.2.2 中国仓鼠卵巢细胞的培养:

细胞培养:CHO细胞用含10%胎牛血清F12培养液中培养于25mL培养瓶中,长满约70%,胰酶消化后收集细胞,按 $1 \times 10^5$  cell/孔接种到24孔板,37 $^{\circ}$ C 5%二氧化碳培养,直至细胞40%~60%连片。

转染:转染液A:5 $\mu$ L P<sub>1.5k<sub>oval</sub></sub>-GFP/P<sub>2.9k<sub>oval</sub></sub>-GFP(2 $\mu$ g)加95 $\mu$ L F12无血清培养液,B:15 $\mu$ L脂质体加85 $\mu$ L F12无血清培养液,A与B混匀,室温放置15min,加到去除培养液的细胞中,放在37 $^{\circ}$ C 5%二氧化碳培养箱孵育4h。吸去培养液,添加含有10%胎牛血清的F12培养液,同时加入雌二醇 $10^{-7}$  mol/L、皮质酮 $10^{-6}$  mol/L、胰岛素40 $\mu$ g/L,在37 $^{\circ}$ C 5%二氧化碳培养箱中培养。

1.2.3 倒置荧光显微镜观察:每隔12h,将其置于倒置荧光显微镜上,观察P<sub>2.9k<sub>oval</sub></sub>-GFP质粒、P<sub>1.5k<sub>oval</sub></sub>-GFP质粒、pGFP-N2质粒阳性对照和空白对照在鸡原代输卵管上皮细胞和中国仓鼠卵巢细胞中绿色荧光蛋白的表达。用Image-Pro Plus Analysis Software程序进行分析。

## 2 结果

### 2.1 两种质粒在鸡原代输卵管上皮细胞中的表达

将P<sub>1.5k<sub>oval</sub></sub>-GFP质粒、P<sub>2.9k<sub>oval</sub></sub>-GFP质粒、pGFP-N2质粒分别转染鸡原代输卵管上皮细胞,P<sub>1.5k<sub>oval</sub></sub>-GFP质粒在转染鸡原代输卵管上皮细胞24h后出现少量表达,GFP荧光阳性细胞的数目随着时间延长而增加,在48h达到最高。P<sub>2.9k<sub>oval</sub></sub>-GFP质粒在转染鸡原代输卵管上皮细胞12h出现少量表达,GFP荧光阳性细胞的数目随着时间延长而增加,在48h达到最高。阴性对照组的细胞没有表达,阳性对照组的细胞表达量高。结果见图1(A,B,C,D)、图2。

### 2.2 两种质粒在中国仓鼠卵巢细胞中的表达

将P<sub>1.5k<sub>oval</sub></sub>-GFP质粒、P<sub>2.9k<sub>oval</sub></sub>-GFP质粒、pGFP-N2质粒分别转染中国仓鼠卵巢细胞,P<sub>1.5k<sub>oval</sub></sub>-GFP质粒在转染中国仓鼠卵巢细胞12h后出现少量表达,GFP荧光阳性细胞的数目随着时间延长而增加,在48h达到最高。P<sub>2.9k<sub>oval</sub></sub>-GFP质粒在转染中国仓鼠卵巢细胞12h后出现少量表达,GFP荧光阳性细胞的数目随着时间延长而增加,在48h达到最高。阴性对照组的细胞没有表达,阳性对照组的细胞表达量高。结果见图1(E,F,G,H)、图3。

### 2.3 两种质粒在两种细胞中表达的比较

pGFP-N2、P<sub>1.5k<sub>oval</sub></sub>-GFP和P<sub>2.9k<sub>oval</sub></sub>-GFP质粒转染鸡原代输卵管上皮细胞和CHO细胞48h后,对GFP荧光阳性细胞灰度值进行比较,P<sub>2.9k<sub>oval</sub></sub>-GFP质粒转染细胞后GFP荧光阳性细胞的灰度值高于P<sub>1.5k<sub>oval</sub></sub>-GFP质粒低于正对照pGFP-N2,三种质粒在CHO细胞中GFP荧光阳性细胞的灰度值高于鸡原代输卵管上皮细胞(见图4)。CHO细胞中GFP荧光阳性细胞数和灰度值高于原代输卵管上皮细胞中的阳性细胞数和灰度值,分析可能因为CHO是一种稳定的细胞系,容易培养,受外界温度、湿度、二氧化碳的影响小,而原代输卵管上皮细胞在体外培养受多种条件影响,除苛刻的外界条件外,对激素、生长因子的种类、浓度有要求。

## 3 讨论

组织特异性调控元件可以启动任何基因在特定的组织中表达,以鸡输卵管作为靶组织表达转基因产物,最重要的

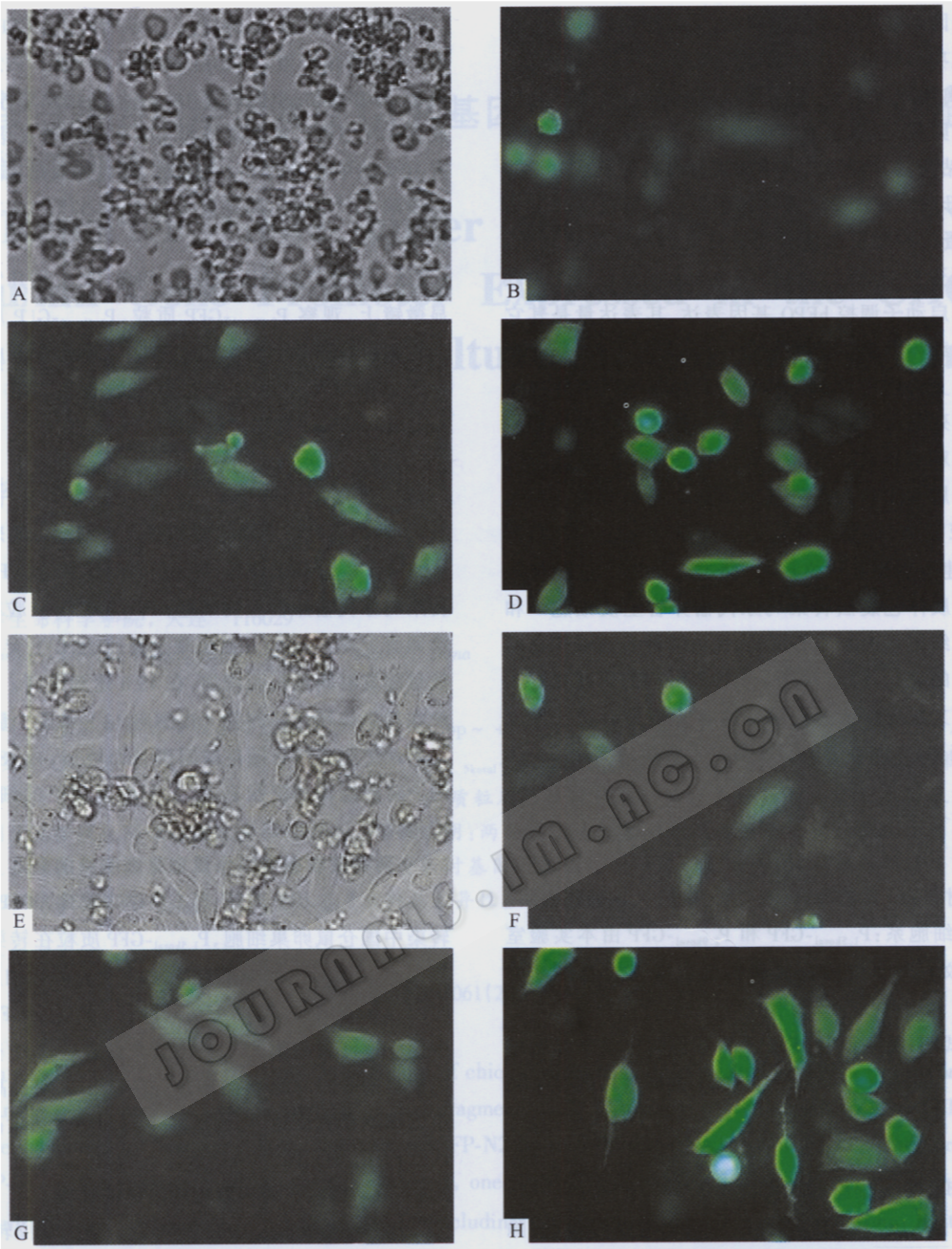


图1 P<sub>1.5koval</sub>-GFP 和 P<sub>2.9koval</sub>-GFP 在鸡原代输卵管上皮细胞和 CHO 细胞中的表达

Fig.1 Expression of P<sub>1.5koval</sub>-GFP and P<sub>2.9koval</sub>-GFP vector in the primary cell cultures of chicken oviduct and CHO cell

A: the primary cell culture of chicken oviduct; B: P<sub>1.5koval</sub>-GFP expresses GFP in the primary cell cultures of chicken oviduct in 48 h; C: P<sub>2.9koval</sub>-GFP expresses GFP in the primary cell cultures of chicken oviduct in 48 h; D: pGFP-N2 expresses GFP in the primary cell culture of chicken oviduct in 48 h; E: the primary cell cultures of chicken oviduct; F: P<sub>1.5koval</sub>-GFP expresses GFP in the CHO cell in 48 h; G: P<sub>2.9koval</sub>-GFP expresses GFP in the CHO cell in 48 h; H: means that pGFP-N2 express GFP in the CHO cell in 48 h.

因素之一就是选择较好的功能完整的调控元件,卵清蛋白基因的内含子,外显子以及特异表达的顺式调控元件和反式作用因子的研究已十分明确<sup>[4-7]</sup>。并且应用鸡卵清蛋白基因调控序列启动外源基因表达的研究已有部分报道(如表1)。从表中可见,鸡输卵管生物反应器定点整合、定位表达问题已经解决,目前亟待解决的问题之一是确定鸡卵清蛋白基因5'端究竟需要多长序列才能包含绝大多数必要的调控元件;

之二是提高表达量、产生能长期稳定表达的个体。

将卵清蛋白基因 ATG 之前 5'非编码区序列输入 NCBI 网站和 IFTI 网站进行基因启动子和其它调控位点分析,结果显示有两个核心区:一个区段位于 - 894 ~ 29 调控区,另一区段位于第一内含子区。近年来有研究表明真核生物基因的内含子中有顺式调控元件,这些元件是某些转录因子或调控蛋白的结合位点。内含子的存在不仅可以促进基因表达,如胆

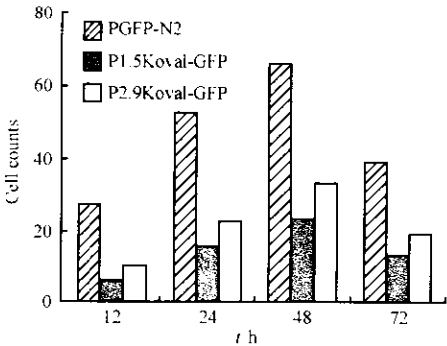


图2 转染不同载体后在鸡原代输卵管上皮细胞中 GFP 表达阳性细胞出现的时间和数目(三组数据的平均值)

Fig.2 GFP-Positive cells in the primary cell cultures of chicken oviduct transfected with pGFP-N2、P<sub>1.5kval</sub>-GFP、P<sub>2.9kval</sub>-GFP respectively (GFP-positive cells in 3 groups)

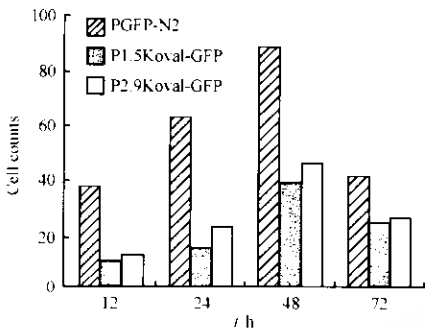


图3 转染不同载体后在中国仓鼠卵巢巢细胞中 GFP 表达阳性细胞出现的时间和数目(三组数据平均值)

Fig.3 GFP-Positive cells in CHO transfected with pGFP-N2、P<sub>1.5kval</sub>-GFP、P<sub>2.9kval</sub>-GFP respectively (GFP-positive cells in 3 groups)

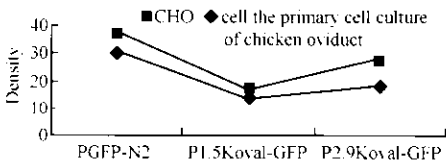


图4 转染48h后, pGFP-N2、P<sub>1.5kval</sub>-GFP、P<sub>2.9kval</sub>-GFP 表达载体在鸡输卵管上皮细胞和 CHO 细胞中阳性细胞的灰度值

Fig.4 density of pGFP-N2、P<sub>1.5kval</sub>-GFP、P<sub>2.9kval</sub>-GFP vectors in the primary cell

cultures of chicken oviduct and in the CHO cell after 48 h

列,在转录过程中起着启动子或增强子的作用,而转录效率较低的基因内含子则缺乏这些序列。鸡卵清蛋白基因的第一内含子序列长,约 1.6 kb,含有大量的 TATA 元件和 GATA、CCAAT 等元件。TATA 元件是调控转录的基础,在基因上游和基因下游都有调控转录的作用<sup>[16]</sup>,GATA、CCAAT 也是转录调控的关键,内含子中的 GATA 也可成为转录因子的作用位点<sup>[17]</sup>。因此本研究克隆了卵清蛋白基因第一内含子序列,构建了 P<sub>1.5kval</sub>-GFP 表达载体。P<sub>1.5kval</sub>-GFP 质粒在细胞中可以表达(见图 1、B 和 F),分析原因可能是鸡卵清蛋白基因第一内含子中确实有对基因表达起调控作用的位点或元件,这些元件往往是某些转录因子或调控蛋白结合位点<sup>[18、19]</sup>;或者可能由于随机插入到某个启动子的下游而调控 GFP 表达,有待于以后的深入研究。如果是前者,本文的结果将对内含子具有调控基因表达功能的理论研究奠定了实验基础,并且为今后揭示内含子调控转录机理的研究提供了实验依据。

有研究表明非编码区的外显子具有促进基因转录的序列特征,如  $\beta$ -酪蛋白的非编码区外显子 1<sup>[20]</sup>。本文构建的 P<sub>2.9kval</sub>-GFP 表达载体的调控区除含有 ov 基因组织特异因子(TSE)、鸡卵清蛋白上游启动子(COUP)、负调节成分(NRE)、依赖雌激素应答元件(SDRE)、核因子结合元素(NF1BE)等 DNA 序列之外,还保留了卵清蛋白基因第一内含子和第一外显子序列。以前关于鸡卵清蛋白基因启动子的研究只限于转录起始点上游的区域,并未包括第一内含子和非编码区的第一外显子成分。本文表达 GFP 的阳性细胞数目及灰度值的结果显示(见图 2、3、4),P<sub>2.9kval</sub>-GFP 质粒的表达量高于 P<sub>1.5kval</sub>-GFP 质粒,说明前者具有提高基因转录效率的调控元件多于后者。卵清蛋白基因 5'调控序列能够使它调控的 GFP 基因在两种细胞中都能表达,证明此调控序列确实具有调控功能,为今后外源基因与卵清蛋白基因同源重组促使外源基因高效表达奠定了基础。

宇丽等<sup>[21]</sup>报道用 1.1kb 卵清蛋白基因启动子调控 CAT 基因在鸡输卵管细胞和鸡成纤维细胞中表达的比较,结果在鸡原代输卵管上皮细胞转染后 48h 表达量最高,为 0.67 $\mu$ g/L;而在鸡成纤维细胞,有类固醇存在,均不表达,提示输卵管细胞中存在细胞特异性转录因子。本文报道了 GFP 基因在不同物种(鸡和仓鼠)及不同的组织(输卵管和卵巢)中表达的情况,显示两种质粒在中国仓鼠卵巢巢细胞和鸡原代输卵管上皮细胞中均可表达,提示卵清蛋白启动子对输卵管上皮细胞和卵巢巢细胞不存在特异性,且不存在种属差异性。

基因表达调控受甾体激素诱导,鸡输卵管细胞在甾体激素信号刺激下引起细胞受体蛋白的变化,产生信号并传送到卵清蛋白基因上游调控区引起卵清蛋白的表达<sup>[4、5]</sup>。本实验在研讨过程中发现雌二醇、皮质酮、胰岛素可诱导 GFP 报告基因的表达,促使绿色荧光蛋白表达量上升,也就是说雌二醇、皮质酮、胰岛素不仅能够调控卵清蛋白的表达,还可以调控外源基因(GFP 基因)的表达,但绿色荧光蛋白表达量增加对卵清蛋白自身表达状况有何影响,有待于我们进一步研究。

碱脂酶基因第一内含子中的 499 bp 片段<sup>[13]</sup>, $\beta$ -酪蛋白第一内含子,而且内含子的存在还能促进 RNA 的剪接,避免错误表达<sup>[15]</sup>。酵母基因转录效率的研究显示,转录效率高的基因的内含子序列比转录效率低的基因的内含子序列长,提示转录效率高的基因内含子可能含有某些增强转录效率的信号序

表 1 鸡卵清蛋白调控区的研究进展

Table 1 research progress of regulator region of chicken ovalbumin gene

| Regulator region        | Foreign gene                              | Host   | Expression result      | Referenes   |
|-------------------------|---|--|------------------------|-------------|
| 1.35kb( - 1300 ~ + 1)   | HEPO gene                                 | Primary cultured oviduct cells and ovi-duct of laying hens | Little                 | [8],[9]     |
| 1.1kb( - 1047 ~ + 39)   | CAT gene                                  | chicken primary oviduct cell<br>chicken fibroblasts cell   | 0.67μg/L<br>no result  | [2]         |
| 1.2kb                   | Fusion gene of Lysozyme cDNA and GFP gene | chicken fibroblasts cell and SHZ-88 cell                   | Expression             | [10]        |
| 1.1kb( - 1047 ~ + 39)   | Swine interferon β gene                   | FP2293 cell  | 10 <sup>7</sup> CFU/mL | [11]        |
| 3kb( - 1279 ~ + 1714)   | LacZ gene                                 | oviduct of laying hens                                     | 116.7Mu/mL             | [12]        |
| 2.9kb( - 1340 ~ + 1655) | GFP gene<br>hmlAT gene                    | Primary cultured oviduct cells and CHO cell                | my paper 0.62μg/L      | [3]received |
| 1.5kb( + 49 ~ + 1655)   | GFP gene                                  | Primary cultured oviduct cells and CHO cell                | my paper               | [3]         |

致 谢:辽宁省大连农科院生物技术研究所李文利博士惠赠 pGFP-N2,王林美老师在细胞培养方面给予悉心的指导,特此感谢。

REFERENCES(参考文献)

[1] Ochiai H, Park H. Synthesis of human eryther opoietion *in vivo* in the oviduct of laying hens by localized *in vivo* gene transfer using electroporation. *Poultry Science*, 1998, **77**(2):299 - 302

[2] Yu L(宇丽), Zhao J(赵君), Zhang YL(张艳玲) *et al.* Construction of the expression vector 5'flanking regulatory regions of the chicken ovalbumin gene and its transient expression in chicken primary oviduct cell and chicken fibroblasts cell cultures. *Chinese Journal of Veterinary Science*(中国兽医学报), 2001, **21**(1):21 - 24

[3] Pang Y(逢越), Yuan XD(袁晓东), Tang MQ(汤敏谦) *et al.* Determination of transcription initiation site of chicken ovalbumin gene and construction of its expression vector. *Acta Genetica Sinica*(遗传学报), 2004, **31**(2):151 - 158

[4] Woo SL, Beattie WG, Catterall JF *et al.* Complete nucleotide sequence of the chicken chromosomal oval gene and its biological significance. *Biochemistry*, 1981, **20**(22):6437 - 6446

[5] McReynolds L, O' Malley BW, Nisbet AD *et al.* Sequence of chicken ovalbumin mRNA. *Nature*, 1978, **273**(5665):723 - 728

[6] Heilig R, Murakowsky R, Mandel JL. The ovalbumin gene family. the 5' end region of the X and Y gene. *Journal Molecular Biology*, 1982, **156**(1):1 - 19

[7] Park HM, Okumura JL, Muramatsu T *et al.* Modulation of transcriptional activity of the chicken ovalbumin gene promoter in primary cultures of chicken oviduct cells; effects of putative regulatory elements in the 5'-flanking region. *Biochemistry and Molecular Biology International*, 1995, **36**(4): 811 - 816

[8] Ochiai H, Park H. Synthesis of human eryther opoietion *in vivo* in the oviduct of laying hens by localized *in vivo* gene transfer using electroporation. *Poultry Science*, 1998, **77**(2):299 - 302

[9] Ochiai H, Park H. Gene gun-mediated human erythertopietion gene expression in primary cultured oviduct cells from laying. *AJAS*, 1999, **12**(1):9 - 14

[10] Sun MJ(孙明军), Zhao C(赵晨), Sha J(沙金) *et al.* Construction and expression of the specific secretor vector in the chicken oviduct cells. *Journal of Agriculture Biotechnology*(农业生物技术杂志), 2003, **11**(1):75 - 78

[11] Wang JY(王继英), Zhang DL(张大龙), Du LX(杜立新). Construction of recombinant retroviral vector carrying ovalbumin 5'-flanking regulatory sequence and swine interferon β gene. *Biotechnology*(生物技术), 2003, **13**(3):1 - 2

[12] Gao B(高波), Song HQ(宋红芹), Chen Q(陈芹) *et al.* Construction and *in vivo* expression of chicken oviduct specific expression vectors. *China Biotechnology*(中国生物工程杂志), 2003, **23**(8):83 - 86

[13] Chan RY, Boudreau LC, Angus LM *et al.* An intronic enhancer containing an N-box motif is required for synapse and tissue-specific expression of the acetylcholinesterase gene in skeletal muscle fibers. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, **96**(8):4027 - 4032

[14] Sury R, Martinez DP, Procaccio V *et al.* Genomic structure of the human NDUF S8 gene coding for the iron-sulfur TYKY subunit of the mitochondrial NADH: ubiquinone oxidoreductase. *GENE*, 1998, **215**(1):1 - 10

[15] Kang YK, Lee CS, Chung AS *et al.* Prolactin-induced enhancer activity of the first intron of the bovine β-casein gene. *Mol Cells*, 1998, **8**(30):259 - 265

[16] Kutach AK, Kadonaga JT. The down stream promoter element D P E appears to be widely used as the TATA box in Drosophila core promoters. *Mol Cell Biol*, 2000, **20**(13):4754 - 4764

[17] Katharina HS, Cox TC, May BK. Identification and characterization of a conserved erythroid-specific enhancer located in intron 8 of the human 5 aminolevulinate synthase 2 gene. *J Biol Chem*, 1998, **273**(27):16798 - 16809

[18] Guo ZS, Wang LH, Eisensmith RC *et al.* Evaluation of promoter strength for hepatic gene expression *in vivo* following adenovirus-mediated gene therapy. *Gene Ther*, 1996, **3**: 802 - 809

[19] Li XJ(李秀锦), Zhong F(仲飞), Wang XZ(王辛中) *et al.* Expression of adenovirus-mediated pGHeDNA with first intron in the CHO cells. *Chinese Journal of Biotechnology*(生物工程学报), 2002, **18**(2): 193 - 197

[20] Huang Z(黄赞), Yan JB(颜景斌), Huang Y(黄纛) *et al.* High expression of human FIX in transgenic mice directed by goat βcasein gene promoter. *Acta Genetica Sinica*(遗传学报), 2002, **29**(3):206 - 211