

一种新的双元表达质粒 pCMV-Myc-IRES-EGFP 的构建及其表达 Construction and Expression of a Novel Bisbicistronic Expression Vector : pCMV-Myc-IRES-EGFP

严 飞^{1,2} 赵新宇^{1,2} 邓洪新^{2*} 魏于全²

YAN Fei^{1,2} ZHAO Xin-Yu^{1,2} ,DENG Hong-Xin^{2*} and WEI Yu-Quan²

1 四川大学生命科学院 ,成都 610041

2 四川大学华西医院生物治疗国家重点实验室 ,成都 610041

1 College of Life Sciences of Sichuan University ,Chengdu 610041 ,China

2 State Key Laboratory of the Biotherapy and Cancer Center ,West China Hospital ,West China Medical School ,Sichuan University ,Chengdu 610041 ,China

摘 要 为了研究基因的特征、理化特性及其功能机制 ,通常需要构建多个真核表达载体 ,涉及到多次的引物设计、酶切、连接和鉴定等繁琐的亚克隆过程。构建携带易于多种实验研究的多用或通用载体是基因工程载体的发展方向。为此 ,利用 pIRES 载体为骨架质粒 ,在 A 和 B 多克隆位点上分别插入 c-Myc 标签蛋白序列和增强型绿色荧光蛋白(EGFP)序列 ,从而构建了一个包含 c-Myc 标签蛋白序列并携带有核糖体结合位点(IRES)介导的增强型绿色荧光蛋白的真核表达载体 :pCMV-Myc-IRES-EGFP。通过荧光检测和免疫印迹实验证实该载体能在哺乳细胞中表达。该载体可用于监测细胞的转染效率、分选稳定表达的阳性细胞群体、体外转录和翻译、检测或纯化目的蛋白以及捕获相关作用蛋白等多种实验研究 ,为基因功能研究提供了便利。

关键词 载体构建 ,绿色荧光蛋白 ,核糖体结合位点

中图分类号 Q7 Q78 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2007)03-0423-06

Abstract It is often necessary to construct more than one recombinant plasmids when investigating the characteristics ,physicochemical features and functional mechanisms of genes or proteins . Repeated sub-cloning procedures including design of primers , enzyme digestion ,ligation and verification of recombinant plasmids ,have to be involved with . For this reason ,it has become a tendency to developing new genetic vectors which can be used in multitude of experiments . Therefore ,by using pIRES vector as a backbone ,here we reported the construction of a mammalian expression vector :pCMV-Myc-IRES-EGFP which contains the N-terminal c-Myc epitope tag and the enhanced green fluorescent protein (EGFP) translated in an IRES-dependent manner . This novel vector can be used to testify the efficiency of cell transfection ,to collect successfully transfected cell population via cytometry ,to conduct transcription and translation in vitro ,to purify target proteins or to trap their interactional proteins . The availability of this vector can facilitate function study of genes .

Key words vector construction , enhanced green fluorescent protein , internal ribosome entry site

Received : October 30 , 2006 ; Accepted : November 27 , 2006 .

This work was supported by the grant from National Basic Research Program of China(No.2004CB51880) .

* Corresponding author . Tel : + 86-28-80661202 ;E-mail : dlenghongx@yahoo . com . cn

国家 973 基因治疗的应用基础研究项目(No.2004CB51880)

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

在基因功能研究中,为了研究基因的特征、蛋白的生化特性及其功能机制,通常需要构建多种表达载体。例如,筛选转基因细胞株需要构建携带真核细胞抗生素抗性基因的重组载体;使用目的基因与标签基因的融合表达载体,不仅可以通过免疫印迹检测目的蛋白的表达,而且可以减少纯化目的蛋白的难度;此外,在体外转录或体外翻译实验中,载体中含有来源于原核生物的 T3、T7 或 SP6 等 RNA 聚合酶启动子元件就显得特别重要。基因功能研究往往需要从多角度、多层次开展实验,将基因构建于不同研究目的的真核表达载体是其中不可或缺的环节,这涉及到多次的引物设计、酶切、连接和鉴定等繁琐的亚克隆过程。近年来,虽然出现一些携带多个元件特征的载体,但是,能同时包含以上各个元件特征的多用载体仍鲜见报道。因此,为了克服在进行基因功能研究中繁琐而费时的亚克隆过程,我们在此构建了一个包含 c-Myc 标签序列并携带有核糖体结合位点(IRES)介导的绿色荧光蛋白(EGFP)报告基因的真核表达载体 pCMV-Myc-IRES-EGFP。

人的 PNAS-4 是一个新发现的受 DNA 损伤激活的蛋白,它的过表达能够促进肿瘤细胞的凋亡,但其作用机制仍不清楚(Penelope J. Duerksen-Hughes, PNAS-4: a novel pro-apoptotic gene activated during the early response to DNA damage, AACR 96th Annual Meeting, Proceedings, 2005)。为了能更详细地探讨 PNAS-4 的促凋亡机制,同时也为了验证 pCMV-Myc-IRES-EGFP 载体的有效性,我们进而构建了双元表达载体 pCMV-Myc-PNAS-4-IRES-EGFP。为进一步对 PNAS-4 的基因功能研究奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 材料

宿主菌 *E. coli* XL1-Blue 购自 Startgene 公司, pEGFP-N1 和 pCMV-Myc 购自 Clontech 公司, pCDNA3-PNAS-4 为本实验室构建, Pyrobst DNA 聚合酶购自大连宝生物工程公司, T4 DNA 连接酶, 各种限制性内切酶均购自 Ferments 公司, DNA 胶回收试剂盒为 MBI 公司产品, In-Fusion 重组试剂盒为 BD 公司产品, HEK293 细胞购自中国科学院细胞研究所, Lipofectamine-2000 为 Invitrogen 公司产品。

1.2 载体构建

1.2.1 pIRES-EGFP 的构建:将含 EGFP 的 pEGFP-N1 质粒用 *Sal* I 和 *Not* I 双酶切, 低熔点胶分离并回收 EGFP 片段, 克隆入已行相应酶切(*Sal* I +

Not I) 的 pIRES 的 B 多克隆位点中, 构建成 pIRES-EGFP 质粒。

1.2.2 pCMV-Myc-IRES-EGFP 的构建:以含 c-Myc 标签序列的 pCMV-Myc 质粒为模板, 设计引物: 5'引物 5'-ACTTCTAGGCCTGTACGGAAGTG-3' 3'引物 5'-TGCATTCTAGTTGTGGTTTGTCC-3'。PCR 扩增条件为 94°C 4min, 94°C 30s, 60°C 30s, 72°C, 10s, 共 30 个循环。扩增产物采用 *Nhe* I 和 *Xho* I 双酶切, 低熔点胶分离并回收 c-Myc 片段, 定向克隆入已行相应酶切(*Nhe* I + *Xho* I) 的表达载体 pIRES-EGFP 的 A 多克隆位点中, 从而得到 pCMV-Myc-IRES-EGFP 载体。

1.2.3 pCMV-Myc-PNAS-4-IRES-EGFP 的构建:以含 PNAS-4 基因的 pCDNA3.1-PNAS-4 质粒为模板, 设计引物。5'引物: 5'-ATAGGCTAGCCTCGAATGGGGGCTAACCAGTTAGTGGTG-3'; 3'引物: 5'-TGCATGCTC GACGCGTTATAGTTTACTGTGGCGCCCGG-3'。PCR 扩增条件为: 94°C 4min, 94°C 30s, 55°C 30s, 72°C 40s, 共 35 个循环。扩增产物直接纯化回收后, 将 PCR 产物通过 In-Fusion 重组酶直接克隆入 pCMV-Myc-IRES-EGFP(*Xho* I + *Mlu* I 酶切)载体中, 得到 pCMV-Myc-PNAS-4-IRES-EGFP 双元表达质粒, 方法参照 In-Fusion™ PCR Cloning 说明书进行。

1.3 细胞转染和相关检测

1.3.1 质粒的转染:将 pIRES、pCMV-Myc-IRES-EGFP、pCMV-Myc-PNAS-4-IRES-EGFP 及对照质粒 pEGFP-N1 转染 HEK293 细胞, 按照转染试剂 Lipofectamine 2000(Invitrogen)说明书操作。

1.3.2 EGFP 蛋白的荧光检测:将转染 24h 后的细胞用倒置荧光显微镜观察, 照相。

1.3.3 Western 印迹检测:于转染 36h 后收集各组细胞, 用 RIPA 细胞裂解液裂解细胞(参照分子克隆第二版)^[1], 抽提细胞总蛋白, 用鼠源抗 c-Myc 的抗体按常规 Western 印迹方法检测 PNAS-4 的表达。

2 结果与分析

2.1 双顺反子表达载体的构建

绿色荧光蛋白由于其对宿主细胞没有毒性, 稳定性好、易于观察等优点而得到了广泛的使用, 它在监测细胞的转染效率、基因表达强度以及转染细胞的分选上均有着非常重要的作用^[2,3]。c-Myc 标签已成功应用在 Western blot 杂交、免疫沉淀、亲和纯化和流式细胞计量术中^[4,5]。核糖体结合位点(IRES)是存在于一些真核细胞的 mRNA 或病毒基因

组上的一类保守的顺式作用元件,它能与核糖体结合从而介导 5' 帽非依赖方式启动下游基因的翻译表达,已广泛应用到各种双元表达载体^[5]。首先,将 pEGFP-N1 质粒经 *Sal* I 和 *Not* I 双酶切,回收 EGFP 片段并将其克隆至 pIRES 质粒的第二个多克隆位点(即 MCS B)中;再将 pCMV-Myc 质粒中扩增出 c-Myc 标签序列,用 *Nhe* I 和 *Xho* I 双酶切后,将其克隆入 pIRES 质粒的第一个多克隆位点(即 MCS A)中;从而获得 pCMV-Myc-IRES-EGFP 质粒。为了验证 pCMV-Myc-IRES-EGFP 表达载体的可用性,我们将人的 PNAS-4 基因通过同源重组将其克隆到 pCMV-Myc-IRES-EGFP 质粒中,PNAS-4 基因重组后与 c-Myc 标签序列融合,由此得到 pCMV-Myc-PNAS-4-IRES-EGFP 二元表达载体。

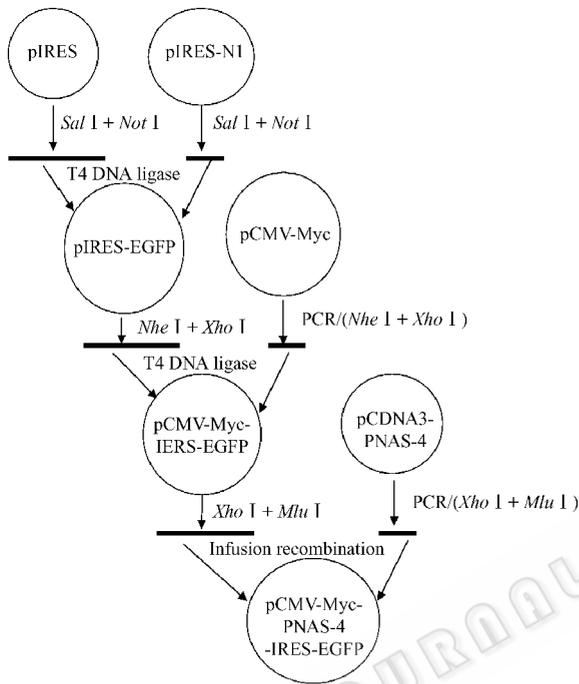


图 1 双顺反子载体 pCMV-Myc-PNAS-4-IRES-EGFP 构建示意图

Fig.1 Schematic map of bicistronic pCMV-Myc-PNAS-4-IRES-EGFP vector construction

先,将 pEGFP-N1 质粒经 *Sal* I 和 *Not* I 双酶切,回收 EGFP 片段并将其克隆至 pIRES 质粒的第二个多克隆位点(即 MCS B)中;再将 pCMV-Myc 质粒中扩增出 c-Myc 标签序列,用 *Nhe* I 和 *Xho* I 双酶切后,将其克隆入 pIRES 质粒的第一个多克隆位点(即 MCS A)中;从而获得 pCMV-Myc-IRES-EGFP 质粒。为了验证 pCMV-Myc-IRES-EGFP 表达载体的可用性,我们将人的 PNAS-4 基因通过同源重组将其克隆到 pCMV-Myc-IRES-EGFP 质粒中,PNAS-4 基因重组后与 c-Myc 标签序列融合,由此得到 pCMV-Myc-PNAS-4-IRES-EGFP 二元表达载体。

2.2 基因表达载体 pCMV-Myc-IRES-EGFP 的结构特征

构建的表达载体 pCMV-Myc-IRES-EGFP 是一个能在哺乳动物细胞中表达 N 端 c-Myc 融合蛋白和绿色荧光蛋白的通用表达载体(图 2),由于绿色荧光蛋白由 IRES 控制其蛋白翻译,这不仅可以用来检测基因表达或转染效率,同时可以利用 c-Myc 标签蛋白开展诸如免疫印迹、免疫沉淀、亲和纯化和流式细胞计数等多项实验的研究。该载体含有来自大肠杆菌的 T7 启动子、SV40 终止子、来自质粒 pCMV-Myc 的 c-Myc 标签序列、来自大肠杆菌的 ColE1 复制子、绿色荧光蛋白报告基因、氨苄抗性基因 b-lactamase 和新霉素 *Neo^r* 抗性基因以及可在广泛哺乳动物细胞中工作的高效增强子/启动子 CMV/IE 元件。

2.3 pCMV-Myc-PNAS-4-IRES-EGFP 的酶切鉴定

为了检测 pCMV-Myc-PNAS-4-IRES-EGFP 载体的可用性,我们将人的 PNAS-4 基因构建到载体的多克隆位点中,依据 In-Fusion 重组试剂说明书设计引

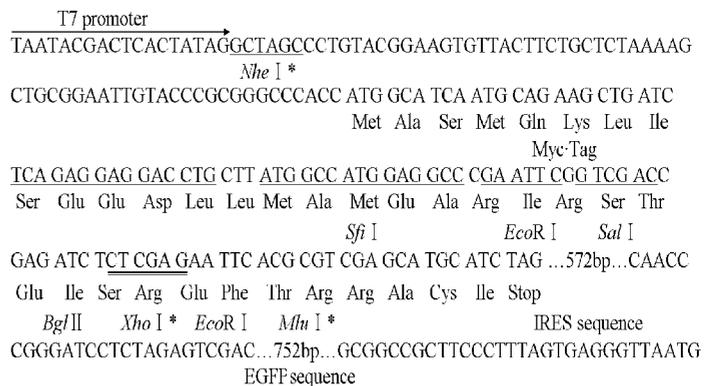
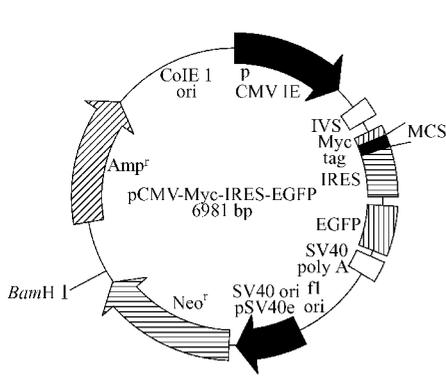


图 2 表达载体 pCMV-Myc-IRES-EGFP 的序列标记

Fig.2 pCMV-Myc-IRES-EGFP sequence landmarks

T7 promoter 1067 ~ 1085 ; Myc-Tag coding sequence 1150 ~ 1189 ; MCS, *Sfi* I - *Mlu* I 1193 ~ 1247 ; IRES sequence 1262 ~ 1834 ; EGFP sequence 1859 ~ 2611 ; Note : * standing for unique digestion site in the vector.

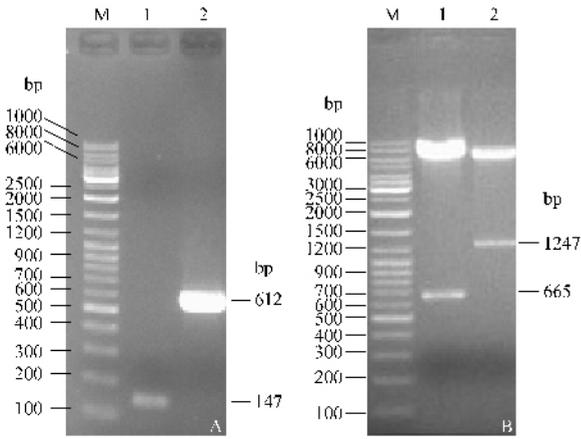


图3 pCMV-Myc-IRES-EGFP 和 pCMV-Myc-PNAS-4-IRES-EGFP 的质粒构建

Fig.3 Construction of pCMV-Myc-IRES-EGFP and pCMV-Myc-PNAS-4-IRES-EGFP plasmids

A: the amplification of c-Myc tag sequence and PNAS gene. M: marker; 1: Myc tag fragment after digestion with *Nhe* I and *Xho* I; 2: the product of PNAS-4 amplification. B: identification of pCMV-Myc-IRES-EGFP and pCMV-Myc-PNAS-4-IRES-EGFP plasmids. M: marker; 1: digestion product of pCMV-Myc-IRES-EGFP plasmid with *Sal* I; 2: digestion product of pCMV-Myc-PNAS-4-IRES-EGFP plasmid.

物,成功扩增出 612bp 片段(图 3A),将载体 pCMV-Myc-PNAS-4-IRES-EGFP 用 *Xho* I 和 *Mlu* I 线性化后,直接通过 In-Fusion 试剂重组构建 pCMV-Myc-PNAS-4-IRES-EGFP 质粒,由于重组后的 pCMV-Myc-PNAS-4-IRES-EGFP 质粒上 *Xho* I 和 *Mlu* I 的酶切位点消失,遂改用 *Sal* I 酶切验证,重组质粒酶切后可见 1247bp 和 6316bp 的酶切片段,而对照质粒的酶

切片段为 665bp 和 6316bp(图 3B),可见双元质粒 pCMV-Myc-PNAS-4-IRES-EGFP 重组成功。T7 引物测序(3730 测序仪,Invitrogen)结果进一步确认 PNAS-4 基因能与 c-Myc 标签融合表达。

2.4 转染细胞检测报告基因 EGFP 的表达

EGFP 是 GFP 的突变体,含有 1 个更适合于在人类细胞中表达的开放阅读框,其 EGFP mRNA 的翻译效率更高,蛋白表达更强,产生的荧光远远强于野生型的 GFP,更适用于检测各类细胞中 EGFP 和 EGFP 融合蛋白的表达情况^[6]。为了检测 pCMV-Myc-IRES-EGFP 载体是否能够用于监测体外细胞转染,我们将 pIRES, pCMV-Myc-IRES-EGFP, pCMV-Myc-PNAS-4-IRES-EGFP 及对照质粒 pEGFP-N1 转染 HEK293 细胞,24h 后用倒置荧光显微镜检测 EGFP 的表达情况(图 4)。从图中可以看出,转染 pCMV-Myc-IRES-EGFP, pCMV-Myc-PNAS-4-IRES-EGFP 及对照 pEGFP-N1 质粒的细胞可以发出绿色荧光,而转染 pIRES 质粒的细胞检测不到绿色荧光。这表明, IRES 能够成功的启动下游基因 EGFP 的翻译并表达出有功能的 EGFP 荧光蛋白。此外,我们发现通过与 pEGFP-N1 转染细胞的荧光强度相比, pCMV-Myc-IRES-EGFP 载体所表达的 EGFP 荧光强度相对较弱,这有可能是由于 IRES 引导的帽非依赖性翻译效率较低造成的。在转染 pCMV-Myc-PNAS-4-IRES-EGFP 的细胞中,我们发现表达绿色荧光蛋白的细胞没有凋亡,这可能与 PNAS-4 促进细胞凋亡与细胞类型有关。

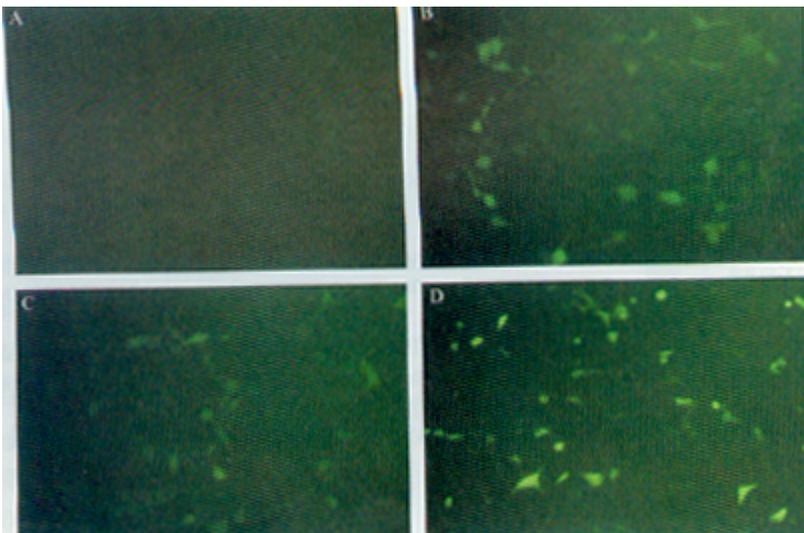


图4 绿色荧光蛋白在 293 细胞中的表达

Fig.4 Expression of the enhanced green fluorescent protein in 293 cells(200×)

A, B, C, D: expression of the enhanced green fluorescent protein after transfecting pIRES (negative control), pCMV-Myc-IRES-EGFP, pCMV-Myc-PNAS-4-IRES-EGFP and pEGFP-N1 plasmid (positive control), respectively.

2.5 Western blot 检测 PNAS-4 的表达

c-Myc 标签蛋白在蛋白纯化、通过免疫共沉淀等技术鉴定相关作用蛋白以及测定蛋白的亚细胞定位等研究中具有非常重要的作用。为了测定 c-Myc 标签蛋白是否与目的基因融合并获得表达,我们将人的 PNAS-4 基因重组到 pCMV-Myc-IRES-EGFP 的多克隆位点中,得到 pCMV-Myc-PNAS-4-IRES-EGFP 重组质粒,将重组质粒和对照质粒(pCMV-Myc-IRES-EGFP)转染 HEK293 细胞,36h 后收集细胞,提取总蛋白后,用鼠源抗 c-Myc 抗体检测 PNAS-4 蛋白的瞬时表达情况。结果图 5 所示,转染重组质粒的细胞在 24.8kD 处可见有一明显的杂交条带,表明 PNAS-4 成功与 c-Myc 标签融合并获得表达。

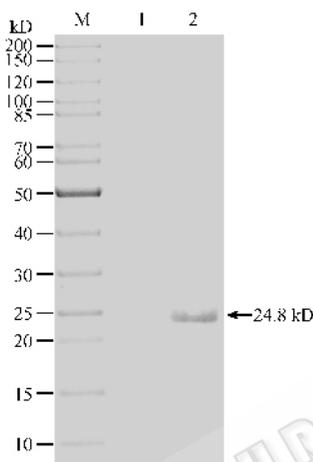


图 5 Western 印迹检测 PNAS-4 的表达

Fig.5 Western blot analysis to examine PNAS-4 protein expression

1: cells were transfected with pCMV-Myc-IRES-EGFP; 2: cells were transfected with pCMV-Myc-PNAS-4-IRES-EGFP.

3 讨论

随着人类基因组测序图谱的完成,人们对生命科学领域的研究热点也逐步转向后基因组时代,即功能基因组时代。这一时代的到来意味着科学家们将更加致力于研究和解释每一个基因的功能及其作用机制。细胞转染,让克隆的核酸进入真核细胞中,已经成为研究和控制真核细胞基因表达的重要手段。比如表达纯化特定的蛋白,鉴定基因的生物学特性,突变分析,研究基因表达对细胞生长的影响,研究基因表达的调控机制等等^[7]。为了监测细胞的转染效率,传统的方法是将目的基因和报告基因分别构建于各自独立的启动子的同一或不同表达载体上,即非融合表达系统,通过共转染的方法来达到;

或者是将目的基因和报告基因(诸如,GFP,CAT,LUC,GUS)融合,通过检测报告基因的表达来判断目的基因的转染效率和表达情况。前者由于目的基因和报告基因分别由两个独立的启动子控制,它们的转录和翻译均属于两个独立的事件,报告基因难以准确代表目的基因的表达情况;而在后者的融合表达系统中,尽管目的基因和报告基因受同一启动子的调控,其转录与翻译在时间和空间上都是相互统一的,但报告基因的融合有可能对目的基因本身的功能造成损害或改变,从而影响目的基因的功能研究。

近年来,核糖体结合位点(IRES)元件的出现,使得解决这一问题出现了新的转机。IRES 是广泛存在于一些真核细胞的 mRNA 或病毒基因组上的一类保守的顺式作用元件,主要作用是通过与核糖体小亚基结合从而启动 5' 帽非依赖方式的翻译模式。最近,已有多种 IRES 元件相继被发现和鉴定,其中,以来源于脑心肌炎病毒(EMCV)的 IRES 序列启动蛋白翻译的功能最强,应用也最为广泛^[8]。近年来,陆续出现了一些利用 EMCV 的 IRES 构建的双顺反子质粒或病毒表达载体^[9-13]。由此,本研究利用脑心肌炎病毒(EMCV)的 IRES 序列将目的基因和报告基因连接在一起,使得目的基因和报告基因受相同启动子的转录调控,但在翻译水平上却是相互独立的,这就避免了报告蛋白对目的蛋白功能的潜在影响。

绿色荧光蛋白由于其对宿主细胞没有毒性,稳定性好、易于观察等优点而得到了广泛的应用。由此,我们选用它作为报告基因来监控目的基因的表达。另外,由于 c-Myc 标签、EGFP、Neor 抗性基因和 T7 启动子等元件的存在,使得该载体在基因功能研究中具有明显的应用优势,可归纳为如下几点(1)通过荧光显微镜监测 EGFP 的表达可确定细胞的转染效率,而不必担心报告基因的融合影响目的基因的功能(2)通过流式细胞术可分选转染细胞的阳性细胞群体,从而减少了繁琐而费时的抗生素筛选过程,另外,绿色荧光蛋白的存在也可以实时监测目的基因的转录、表达情况(3)将目的基因的 N 端融合 c-Myc 标签蛋白,可用于检测或纯化目的蛋白,免疫印迹、免疫沉淀、流式细胞计数或捕获目的蛋白的相互作用蛋白(4)载体上的 T7 启动子序列还可用来进行目的基因的体外转录和翻译。

在试验中,我们发现由 IRES 介导的 EGFP 的表达相对弱于 5' 帽介导的 EGFP 表达,分析其原因可能是 IRES 介导的 5' 帽非依赖性的翻译效率比 5' 帽

依赖性的翻译效率低导致的。在大部分以 IRES 元件所构建的双元表达载体也都遇到类似的问题,有研究发现,虽然 IRES 介导的下游基因在转录时与上游基因转录的 mRNA 是等量的,但其翻译过程是独立的,在双顺反子载体中,置于 IRES 下游的外源基因的表达效率是上游帽启动翻译基因的 20% ~ 50%,即翻译水平的表达并不等量,以 IRES 启动的翻译效率较帽依赖的翻译效率低^[14]。多数学者建议构建双顺反子载体时必须考虑外源基因的位置效应^[15,16]。因此,在我们所构建的双元载体中,我们将 EGFP 报告基因置于 IRES 的下游,这样有助于保证目的基因的表达效率。

REFERENCES (参考文献)

- [1] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [2] He QY(何琪杨), Zhang HQ(张鸿卿), Xue SB(薛绍白). Molecular probes in live cells—green fluorescent protein. *Foreign Medical Science (Molecular Biology Section)* 国外医学分子生物学分册, 1997, **19**(6): 279–283.
- [3] Takada T, Iida K, Awaji T, et al. Selective production of transgenic mice using green fluorescent protein as a marker. *Nat Biotechnol*, 1997, **15**(5): 458–461.
- [4] Kipriyanov SM, Kupriyanova OA, Little ML, et al. Rapid detection of recombinant antibody fragments directed against cell-surface antigens by flow cytometry. *Immunol Met*, 1996, **196**: 51–62.
- [5] McKern NM, Lou M, Frenkel MJ, et al. Crystallization of the first three domain of the human insulin-like growth factor-1 receptor. *Protein Sci*, 1997, **6**: 2663–2666.
- [6] Heim R, Cubitt AB, Tsien RY. Improved green fluorescence. *Nature*, 1995, **373**: 663–664.
- [7] Xue LQ(薛丽春), Tong TK(童坦君), Zhang ZY(张宗玉). The selection and research tendency of report genes. *Progress in Physiological Sciences*(生理科学进展) 2002, **33**(4): 364–365.
- [8] Martinez-Salas E, Lopez de Quinto S, Ramos R, et al. IRES elements: features of the RNA structure contributing to their activity. *Biochimie* 2002, **84**(8): 755–763.
- [9] Encarnacion Martinez-Salas. Internal ribosome entry site biology and its use in expression vectors. *Current Opinion in Biotechnology*, 1999, **10**: 458–464.
- [10] Liu XD, Constantinescu Stefan N, et al. Generation of mammalian cells stably expressing multiple genes at predetermined levels. *Analytical Biochemistry* 2000, **280**: 20–28.
- [11] Murakami M, Watanabe H, Niikura Y, et al. High-level expression of exogenous genes by replication-competent retrovirus vectors with an internal ribosomal entry site. *Gene*, 1997, **202**: 23–29.
- [12] Kurtzman GJ, Tobita K, Ozawa K, et al. A novel dicistronic AAV vector using a short IRES segment derived from hepatitis C virus genome. *Gene*, 1997, **200**: 157–162.
- [13] Rachel L Toth, Sean Chapman, Carr F, et al. A novel strategy for the expression of foreign genes from plant virus vectors. *FEBS Letters* 2001, **489**: 215–219.
- [14] Mizuguchi H, Xu Z, Ishii-Watabe A, et al. IRES-dependent second gene expression is significantly lower than cap-dependent first gene expression in a bicistronic vector. *Molecular Therapy* 2000, **11**(4): 376–382.
- [15] Borman AM, Bailly JL, Girard M, et al. Picornavirus internal ribosome entry segments: comparison of translation efficiency and the requirements for optimal internal initiation of translation in vitro. *Nucleic Acids Res*, 1995, **23**: 3656–3663.
- [16] Cao HQ(曹慧青), Ding JF(丁金凤). Construction strategy of polygene co-expression vectors, *Foreign Medical Science (Molecular Biology Section)* 国外医学分子生物学分册) 2000, **24**(1): 1–4.