

# *hNoc4L* 基因重组慢病毒表达载体的构建与鉴定

王婷婷<sup>1,2</sup>, 王淑娟<sup>3</sup>, 严景华<sup>1</sup>

1 中国科学院微生物研究所 中国科学院病原微生物与免疫学重点实验室, 北京 100101

2 中国科学院研究生院, 北京 100049

3 中国动物卫生与流行病学中心, 青岛 266032

**摘要:** 核糖体前体的形成和核运输需要多种核仁复合物的参与, *hNoc4L* 是酿酒酵母 *S. cerevisiae* 的核仁复合物相关蛋白 4 的同源蛋白, 并含有保守的 Noc 结构域, 但其功能未知。为了构建 *hNoc4L* 基因过表达的慢病毒载体, 本实验通过将 EF1 $\alpha$  启动子替换原 shRNA 慢病毒载体 pII3.7 的 U6 启动子, 成功构建了慢病毒表达载体 pII3.7-EF1, 并进一步得到了 *hNoc4L* 基因过表达的慢病毒载体。利用慢病毒包装系统对不同物种的细胞进行感染, 以此检测该重组慢病毒载体的包装效率, 并通过构建的 *hNoc4L* 过表达的 RAW264.7 稳定细胞系检测了该载体的免疫原性和稳定转染能力。结果表明成功构建了高效、长期稳定表达和免疫原性低的 *hNoc4L* 特异性表达的慢病毒载体, 为进一步研究 *hNoc4L* 蛋白在哺乳动物核糖体生物发生中的调控作用奠定了基础。

**关键词:** *hNoc4L* 基因, 慢病毒表达载体, 核糖体生物发生

## Construction and identification of recombinant lentiviral vector of *hNoc4L* gene

Tingting Wang<sup>1,2</sup>, Shujuan Wang<sup>3</sup>, and Jinghua Yan<sup>1</sup>

1 CAS Key Laboratory of Pathogenic Microbiology and Immunology, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Science, Beijing 100101, China

2 Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

3 China Animal Health and Epidemiology Center, Qingdao 266032, China

**Abstract:** Formation and nuclear export of pre-ribosomes requires many nucleolar complexes. *hNoc4L* which contains a conserved Noc domain is a homolog of nucleolar complex associated 4 (*S. cerevisiae*), but its function is completely unclear. Here, we successfully got the recombinant lentiviral vector pII3.7-EF1-*hNoc4L*-Flag by replacing the U6 promoter in pII3.7 with EF1 $\alpha$  promoter, and then inserted *hNoc4L* to down-stream of the EF1 $\alpha$  promoter. We determined the transduction efficiency in different mammalian cell lines based on lentiviral packaging system. Subsequently, we analyzed the immunogenicity of the recombinant lentivirus and stable expression of *hNoc4L* in RAW264.7 cells. The results showed that the recombinant lentivirus characterized a high transduction efficiency, long-term expression and low immunogenicity. Therefore, we pave the way for further identification of the biological activity of *hNoc4L* protein during ribosome biogenesis in mammalian.

**Keywords:** *hNoc4L* gene, lentiviral expression system, ribosome biosynthesis

**Received:** April 23, 2010; **Accepted:** May 11, 2010

**Supported by:** National Natural Science Foundation of China (No. 30870118).

**Corresponding author:** Jinghua Yan. Tel: +86-10-64807569; Fax: +86-10-64807598; E-mail: yanjh@im.ac.cn

国家自然科学基金项目 (No. 30870118) 资助。

从细菌到人类所有生命的细胞中都存在着成千上万的核糖体,核糖体是蛋白质的翻译场所,负责细胞内蛋白质的合成,对细胞的生长、组织的分化和发育十分重要。细胞的大部分物质与能量都用于核糖体的合成,正在生长的细胞中,与核糖体生物发生相关的基因的转录约占整个细胞转录体系的60%以上<sup>[1]</sup>。由此可知,对核糖体生物合成的调控是细胞调控的关键步骤。目前,对于真核生物核糖体生物发生的基本过程已有初步的认识,但其中详细的机制尚不清楚,仍是一个研究热点。

在真核生物中,核糖体的生物发生是一个高度复杂和协同进行的过程,发生在不同的亚细胞器中,需要3种RNA聚合酶共同协调转录上百个基因,其中包括核仁区的RNA聚合酶I负责转录的pre-rRNA,细胞质中的RNA聚合酶II负责转录的核糖体蛋白基因以及细胞核内的RNA聚合酶III负责转录的5S rRNA<sup>[2]</sup>。对酵母的研究发现,核糖体的生物发生主要在核仁里,后期的成熟过程是在细胞核和细胞质中进行的,主要为pre-rRNA经过多种剪切、修饰等步骤加工为成熟的18S、5.8S和28S rRNA,与进入核仁的5S rRNA以及来自细胞质的多种相关蛋白质相结合,组装成核糖体的大小亚基的前体,再分别转运至细胞质中进一步成熟,组装成有功能的核糖体<sup>[3-4]</sup>。

在核糖体的大小亚基的组装、运输和成熟的过程中,反式调控因子发挥着十分重要的作用<sup>[5-7]</sup>,Noc(Nucleolar complex)类蛋白复合物就是新发现的影响核糖体成熟和核运输的重要的反式调控因子。Noc类蛋白是一类核仁复合物相关蛋白,在以酵母为模式生物的研究中发现,Noc1、Noc3和Noc4均有一个由45个氨基酸组成的保守的Noc结构域<sup>[8-9]</sup>,其中Noc1-Noc2和Noc3-Noc2同源二聚体在60S核糖体前体的成熟和出核运输中发挥重要作用,而Noc4-Nop14(Nucleolar protein 14)同源二聚体在40S核糖体前体的成熟和核运输中发挥重要作用<sup>[9]</sup>。*hNoc4L*(Human nucleolar complex associated 4 homolog),人核孔复合物蛋白4同源体,NCBI编号为Homo sapiens(mRNA, MGC3162),其编码产物为516个氨基酸组成的多次跨膜蛋白hNoc4L,与酵母Noc4有相同的保守的Noc结构域,但其功能尚

未有研究报道。因此本文构建了*hNoc4L*基因特异性表达的慢病毒载体,该重组病毒能感染小鼠成纤维细胞NIH3T3、猴肾细胞Marc145、小鼠巨噬细胞RAW264.7和狗肾细胞MDCK,并得到了稳定表达*hNoc4L*基因的RAW264.7细胞株,检测了重组病毒的感染效率及免疫原性,为后续研究hNoc4L蛋白的功能奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 细胞株

人胚肾细胞293T、猴肾细胞Marc145、狗肾细胞MDCK、小鼠成纤维细胞NIH3T3和小鼠巨噬细胞系RAW264.7细胞,均为本实验室保存。

#### 1.1.2 菌种与载体

大肠杆菌DH5 $\alpha$ 为本实验室保存,质粒pEF-BOS、pcDNA3.0-hNoc4L-Flag为本实验室保存,shRNA慢病毒载体pI3.7、包装质粒pLP1、pLP2和pLP/VSVG由中国科学院微生物研究所高斌研究员惠赠。pMD-18T载体购自TaKaRa公司。

#### 1.1.3 工具酶及其他

DNA聚合酶、各种限制性内切酶均购自TaKaRa公司;转染试剂PEI购自ROCHE公司,Polybrene购自INTROVIGEN公司;去内毒素超纯质粒大提试剂盒购自博大泰克生物技术公司,DNA凝胶回收纯化试剂盒购自OMEG公司,完全培养基为含10%胎牛血清(FBS)的DMEM培养基,为GIBCO产品;小鼠IL-6和TNF- $\alpha$  ELISA预包被试剂盒购自北京达科为生物技术公司。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 重组质粒的构建<sup>[10]</sup>

真核表达载体pI3.7-EF1的构建:首先,PCR获得EF1 $\alpha$ 启动子全序列,即以pEF-BOS为模板,以F1、R1为引物扩增EF1 $\alpha$ 启动子全序列。PCR反应参数:94 $^{\circ}$ C预变性5min;94 $^{\circ}$ C变性30s,55 $^{\circ}$ C退火30s,72 $^{\circ}$ C延伸2min,30个循环;72 $^{\circ}$ C延伸10min,16 $^{\circ}$ C保温5min。用1%琼脂糖凝胶电泳鉴定并分离产物,应用OMEG公司的DNA凝胶回收试剂盒回收并纯化EF1 $\alpha$ 启动子片段,目的片段大小约1200bp。用T4DNA连接酶将目的片段连接到

pMD-18T 载体上并转入 DH5 $\alpha$  感受态细胞, 挑取克隆进行菌液 PCR 和双酶切鉴定正确后, 进行测序。用 *Xba* I 和 *Xho* I 对质粒 p113.7 双酶切以切除 U6 启动子, 凝胶电泳回收纯化 p113.7 的片段。酶切后 p113.7 的大小约为 7 100 bp。同样的方法对质粒 pMD-18T-EF1 $\alpha$  进行双酶切, 回收 EF1 $\alpha$  片段。将两者用 T4 DNA 连接酶连接, 对所得克隆进行菌液 PCR 和双酶切鉴定, 获得重组质粒 p113.7-EF1, 构建结构图见图 1。所用引物如下(5'-3'): F1: GCTCTAGAC

GTGAGGCTCCGGTGCCCGTC; R1: CCGCTCGAG TCACGACACCTGAAATGGAA。

重组表达载体 p113.7-EF1-hNoc4L-Flag 的构建: 用 *Xho* I 和 *Not* I 对质粒 p113.7-EF1 和 pcDNA3.0-hNoc4L-Flag 进行双酶切, DNA 凝胶电泳回收纯化 p113.7-EF1 和 hNoc4-Flag-His 的片段。将两者用 T4 DNA 连接酶连接转入 DH5 $\alpha$  感受态细胞, 对所得克隆进行菌液 PCR 和双酶切鉴定, 获得重组质粒 p113.7-EF1-hNoc4L-Flag。

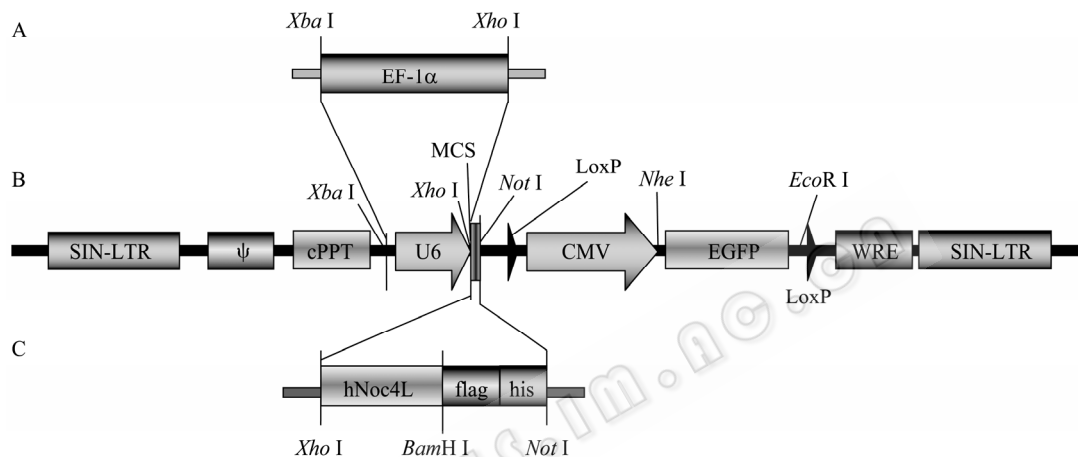


图 1 重组质粒载体的构建示意图

Fig. 1 Construction of recombinant plasmids. A: EF-1 $\alpha$ ; B: p113.7-U6; C: hNoc4L-Flag-his.

### 1.2.2 重组慢病毒的包装

重组表达型慢病毒载体 p113.7-EF1-hNoc4L-Flag、包装质粒 pLP1、pLP2 和 pLP/VSVG 分别用试剂盒进行超纯去内毒素大量提取, 利用 PEI 法共转染 HEK 293T 细胞。转染主要步骤 (以 10 cm 培养皿为例): 将 18  $\mu$ g 质粒 (载体和包装质粒各 4.5  $\mu$ g) 和 144  $\mu$ g PEI 分别溶于生理盐水中, 使其终体积均为 200  $\mu$ L, 混匀; 静置 5 min 后, 将两者混合, 再静置 20 min, 将质粒-PEI 混合物逐滴加入到细胞培养皿中, 4~6 h 后更换新鲜的完全培养基 (DMEM+ 10% FBS, 下同)。转染 24 h 后, 在倒置荧光显微镜下观察细胞的绿色荧光蛋白的表达情况, 确认转染成功后, 收集 48~72 h 病毒上清。3 000 r/min 低速离心 15 min 去除细胞碎片, 短期 4 $^{\circ}$ C 保存备用, 长期保存则 1 mL 分装, 于 -80 $^{\circ}$ C 保存。

### 1.2.3 重组病毒感染不同来源的细胞

将 293T 细胞接种于 6 孔板中, 以培养 24 h 后细胞密度达到 30%~40% 为宜。移去培养基, 加入

收集的病毒上清 1 mL, 补加 1 mL 新鲜的完全培养基, 并加入 Polybrene, 使其终浓度为 8  $\mu$ g/mL, 感染 8 h 后, 更换为新鲜的完全培养基。感染 48 h 后荧光显微镜下观察是否可见绿色荧光。病毒成功包装后, 同样方法分别感染 Marc145、MDCK、NIH3T3 和 RAW264.7 细胞, 并于 48 h 后观察感染情况。

### 1.2.4 过表达 *hNoc4L* 的 RAW264.7 稳定细胞株的构建

将假病毒感染的 RAW264.7 细胞通过流式细胞仪进行分选, 得到 *hNoc4L* 基因过表达的多克隆细胞。将得到的阳性细胞进行培养, 并检测静息状态下的不同 RAW264.7 细胞株的细胞因子分泌情况, 具体检测方法见 1.2.5。培养 30 d 后, 在荧光显微镜下观察稳定细胞株的阳性情况, 并通过 Western blotting 检测 *hNoc4L* 基因的表达情况。

### 1.2.5 ELISA 法检测 RAW264.7 稳定克隆株的细胞因子 IL-6 和 TNF- $\alpha$ 的分泌

本过程中使用的是达科为生物技术有限公司自

主研发的 ELISA 预包装减步法试剂盒, 原理为双抗体夹心法。步骤为: 将  $10^4$  个细胞接种于 48 孔板, 每种细胞设置 3 个重复。培养 8 h 后收集细胞上清, 按照试剂盒的要求进行操作。以试剂盒配备的标准品制作标准曲线 (0 pg/mL、31.25 pg/mL、62.5 pg/mL、125 pg/mL、250 pg/mL 和 500 pg/mL)。通过标准曲线计算细胞上清中 IL-6 和 TNF- $\alpha$  的含量。以加入 100 ng/mL LPS 刺激的 RAW264.7 细胞作阳性对照。

### 1.2.6 Western blotting 检测目的基因 *hNoc4L* 的表达情况

用裂解缓冲液 (0.5% NP-40 的 PBS, 含蛋白酶抑制剂混合物) 裂解细胞, 离心取上清, 加入上样缓冲液 (含 DTT),  $100^{\circ}\text{C}$  处理 5 min; 各取 15  $\mu\text{L}$  上样进行 SDS-PAGE 电泳 (80 V, 30 min; 120 V, 1 h); 转膜 (200 mA, 1 h); 含 5% 脱脂奶粉的 TBS 封闭 1 h, 加入含有 anti-Flag (1 : 1 000) 的封闭液摇动 1~2 h; 用 TBST (含 0.5% Tween-20) 洗 3 次; 用含有 IgG-HRP (1 : 5 000) 的封闭液摇动 1 h; 用 TBST 洗 3 次; 将膜晾干, 加显色液于膜上, 用封口膜将膜包住放入暗盒内, 加入 X 光胶片, 进行曝光、显影和定影。

## 2 结果

### 2.1 真核表达载体 pII3.7-EF1 以及 *hNoc4L* 基因特异性表达的重组慢病毒载体的构建与表达:

以 pEF-BOS 为模板, 将 PCR 扩增出的 EF1 $\alpha$  片段插入到 pMD-18T 载体上, 双酶切得到的阳性克隆质粒, 回收目的片段, 在将其插入到 pII3.7 载体的 *Xba* I 和 *Xho* I 之间, 所挑取的克隆经 *Xba* I 和 *Xho* I 双酶切鉴定, 切出约 1 184 bp 的条带, 构建的慢病毒表达载体 pII3.7-EF1 经测序鉴定正确。以 pcDNA3.0-*hNoc4L*-Flag 为模板酶切出的 *hNoc4L*-Flag-his6 片段插入到 pII3.7-EF1 $\alpha$  的 *Xba* I 和 *Xho* I 之间, 所挑的阳性克隆经酶切得到约 1 592 bp 的片段, 与目的片段大小相符, 且测序正确。由于 pII3.7-EF1-*hNoc4L*-Flag 包含有由 CMV 启动子启动的 *GFP* 基因, 因此, 可以通过荧光显微镜观察重组质粒的转染效率及重组病毒的感染效率。将构建成功的载体用 PEI 法瞬时转染 293T 细胞, 24 h 后, 在荧光显微镜下能观察到大部分细胞都被成功转染重组质粒, 收集已成功转染的 293T 细胞, 并通过 Western blotting 检测到 *hNoc4L* 基因的成功表达(图 2)。

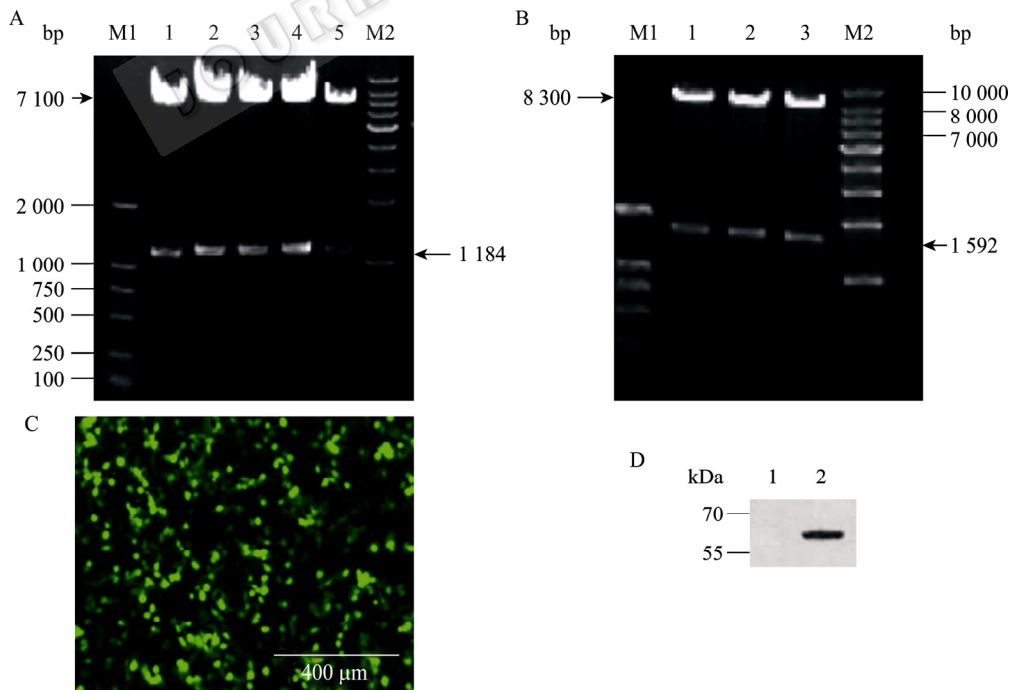


图 2 重组质粒载体的构建与表达鉴定

Fig. 2 The construction and expression of recombinant plasmids. (A) Double digestion of recombinant plasmids pII3.7-EF1 (M1: marker DL2000; M2: marker 1 kb DNA ladder; 1-5: five repeats). (B) pII3.7-EF1-*hNoc4L*-Flag (M1: marker DL2000; M2: marker 1 kb DNA ladder; 1-3: three repeats). (C) Transfecting pII3.7-EF1-*hNOC4L*-Flag in 293T cells. (D) Western blotting analyze of *hNOC4L* gene (lane 1: pII3.7-EF1 in 293T cells; lane 2: pII3.7-EF1-*hNoc4L*-Flag in 293T cells).

## 2.2 重组慢病毒的包装及鉴定

将重组表达型慢病毒载体 pII3.7-EF1-hNoc4L-Flag 和病毒包装质粒 pLP1、pLP2 和 pLP/VSVG 共转染 293T 细胞, 24 h 后可观察到绿色荧光蛋白的表达, 且转染效率较高 (数据未显示)。继续培养细胞, 72 h 后收集病毒上清, 并感染 293T 细胞, 将已感染的细胞培养 48 h 后在倒置荧光显微镜下可观察到绿色荧光, 说明重组慢病毒已成功生产 (图 3)。将同一视野自然光和荧光下的图片进行比对发现, 重组慢病毒载体可以高效感染 293T 细胞。

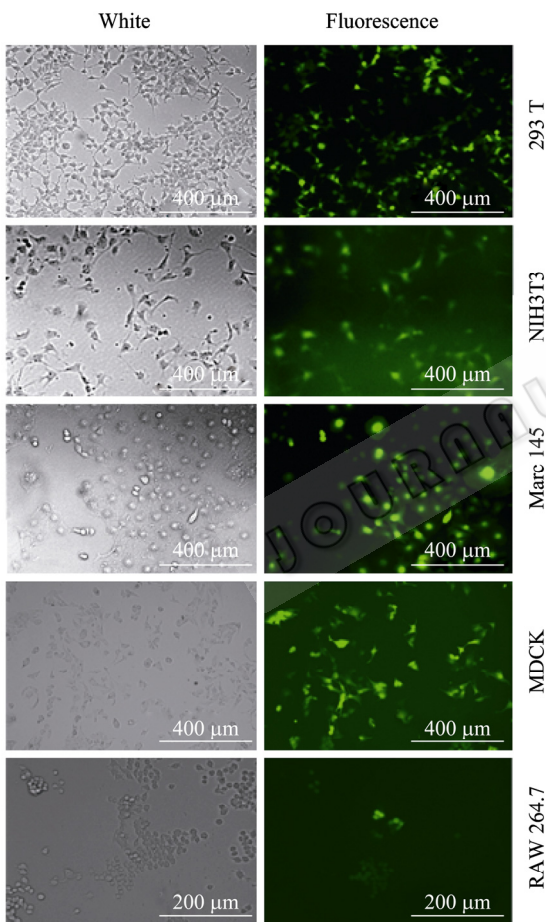


图3 重组慢病毒对不同细胞的感染后观察 EGFP 的表达  
Fig. 3 EGFP expression after transducing recombinant lentiviral construct into the mammalian cell lines of choice under light microscope and fluorescence microscope.

## 2.3 慢病毒假病毒对不同细胞的感染结果

为了进一步检验重组慢病毒表达载体对不同细胞的感染情况, 用收集的病毒分别感染 4 种不同物种来源的细胞系: 猴肾细胞 Marc145、狗肾细胞

MDCK、小鼠成纤维细胞 NIH3T3 和小鼠巨噬细胞 RAW264.7。感染 48 h 后倒置荧光显微镜下观察发现这 4 种细胞均可见绿色荧光 (图 3), 说明包装出的慢病毒能成功感染目标细胞, 其中 Marc145、MDCK 及 NIH3T3 细胞有较高的感染效率, 而 RAW264.7 细胞感染效率较低。

## 2.4 过表达 *hNoc4L* 基因的 RAW264.7 稳定细胞系的构建以及细胞特性的鉴定

感染重组病毒的 RAW264.7 细胞经过 3 周的培养后, 通过流式细胞仪分选, 得到了 *hNoc4L* 基因过表达的稳定细胞系 (图 4)。RAW264.7 细胞是小鼠巨噬细胞系, 有外界刺激时会释放大量的炎症因子。为了了解病毒感染 RAW264.7 细胞是否会引起细胞强烈的免疫原性, 我们用 ELISA 法检测了 RAW264.7 细胞及 *hNoc4L* 过表达的稳定细胞系静息状态的细胞因子 IL-6 和 TNF- $\alpha$  的分泌情况 (表 1)。结果显示, 与没有感染病毒的 RAW264.7 细胞相比, 重组慢病毒感染的 RAW264.7 细胞 (包括 RAW264.7-pII3.7-EF1 及 RAW264.7-pII3.7-EF1-hNoc4L-Flag) 的 TNF- $\alpha$  和 IL-6 的含量都没有升高, 表明构建的重组病毒没有引起 RAW264.7 细胞发生明显的免疫反应。为了检测 *hNoc4L* 基因在细胞中的持续表达情况, 我们将上述细胞株连续培养 30 d 后收集该细胞, 用 Flag 抗体检测 *hNoc4L* 蛋白的表达, 在约 57 kDa 大小处检测到特征带, 符合预期大小, 说明 *hNoc4L* 基因成功地稳定表达 (图 5)。用荧光显微镜观察, 同一视野自然光和荧光对比发现细胞的阳性率无明显改变 (数据未显示)。

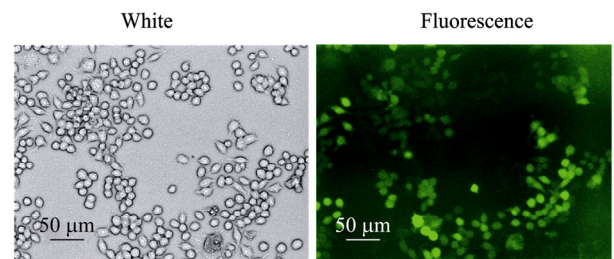


图4 稳定表达 *hNoc4L* 基因的 RAW264.7 细胞系  
Fig. 4 Stable expression of *hNoc4L* gene in RAW264.7 cell line.



表 1 ELISA 检测 RAW264.7 和 hNoc4L 稳定细胞系的 IL-6 和 TNF- $\alpha$  分泌情况

Table 1 Determination of IL-6 and TNF- $\alpha$  of different cell lines by ELISA

Cell line	IL-6	TNF- $\alpha$
RAW264.7	<1 pg/mL	<1 pg/mL
RAW264.7-pII3.7-EF1	<1 pg/mL	<1 pg/mL
RAW264.7-pII3.7-EF1-hNoc4L-Flag	<1 pg/mL	<1 pg/mL

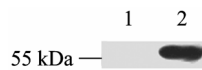


图 5 Western blotting 检测稳定细胞系中 hNoc4L 基因的表达

Fig. 5 Western blotting assay of hNoc4L gene in stable cell lines of RAW264.7. 1: pII3.7-EF1 in RAW264.7 cells; 2: pII3.7-EF1-hNoc4L-Flag in RAW264.7 cells.

### 3 讨论

细胞生长和繁殖的快慢取决于细胞内蛋白质合成的速率，而蛋白质合成的速率又取决于核糖体的生成和核糖体 RNA 基因的转录速率，由此可知，核糖体的生物合成对细胞的生长有着决定性的作用。核糖体的生物合成是一个极其复杂的过程，在基因结构水平上，核糖体 RNA 基因通常以多拷贝的形式存在于染色体上形成串联重复单位序列，这些序列上还包含了一些重要的顺式调控元件，配合着一些反式调控因子调控核糖体 RNA 基因的转录；在核糖体的大小亚基的成熟过程中，反式作用因子也发挥着重要的作用，如核酸酶对 pre-rRNA 非编码序列的切除、SnoRNP 对 35S pre-rRNA 的假尿嘧啶化和甲基化修饰、RNA 螺旋酶和 RNA 分子伴侣介导的 RNP 折叠和重构、GTPase 和 ATPase 催化的蛋白质的聚合和解聚过程等<sup>[7,11-13]</sup>。在以酵母为模式生物对核糖体生物发生的调控机制进行研究的过程中不断有新的发现。在酿酒酵母 *S. cerevisiae* 中，Noc 类蛋白复合物是一类影响核糖体大小亚基装配和核运输的重要的反式调控因子，但其在哺乳动物中的功能未知。因此研究 Noc 类蛋白在哺乳动物的核糖体生物合成中的作用是十分重要的，本实验选择了 hNoc4L 蛋白为研究对象。

在实验研究中，常用的病毒载体有腺病毒、逆转录病毒和慢病毒载体等。腺病毒可以携带大 DNA

片段并能转染多种细胞，但转染效率较低，有较高的抗原性和毒性，只能短暂表达目的蛋白<sup>[14]</sup>；而慢病毒属于逆转录病毒的一种，基于 HIV-I 型病毒构建的慢病毒载体可以高效感染处于分裂期和非分裂期的细胞，能够携带大片段基因，且不易诱发宿主免疫反应，更重要的是能将目的基因高效整合到宿主细胞染色体中，不易引起插入突变，理论上能够在细胞内永久表达并在子代中稳定表达<sup>[15]</sup>，而且改造后的慢病毒假病毒没有复制能力，具有较好的生物安全性，是一种理想的基因转移载体<sup>[16]</sup>。因此，本研究选择慢病毒载体作为特异性表达 hNoc4L 基因的载体。

pII3.7 载体是一个用于表达 shRNA 进行 RNAi 的慢病毒载体 (Invitrogen 公司)，有 2 个转录框，一个是在 CMV 启动子控制下的 EGFP 的转录，另一个是在 U6 启动子控制下的 shRNA 的转录。本实验将 EF1 $\alpha$  启动子取代 U6 启动子来控制目的基因的表达，改造后的表达载体不仅能够表达较高水平的 hNoc4L 蛋白，也为其他目的基因的表达提供了很好的工具。

慢病毒载体的另一个优点是有广泛的细胞感染谱，为了检测我们所获得的重组慢病毒载体的感染效果，我们感染了不同来源的细胞株，发现其能高效感染来源于人、鼠、犬等不同物种的细胞系。MDCK 细胞和 Marc145 细胞的常规转染效率不高，约在 5%~20% 之间；而利用本实验中构建的载体，可以达到 70% 以上的阳性率，因此使用该载体可以方便地解决不易转染的细胞系的外源基因难以高效导入的问题。

RAW264.7 细胞是小鼠的巨噬细胞，当有外界刺激时，该细胞极易分化，外形由正常状态下的圆球形向不规则的形状转变，并且伴随有炎症因子的释放，所以可以用来检测我们所构建的 hNoc4L 基因特异性表达载体的免疫原性。实验数据表明，该载体通过感染进入细胞后，并没有引起细胞形状的改变，也没有造成强烈的免疫反应。此外，RAW264.7 细胞也是一种极难利用常规化学试剂转染的细胞，常用的方法就是电转，而电转是瞬时转染，成本高，转化后的细胞又容易分化。我们所获得的 hNoc4L 基

因特异性表达的载体因其带有 EGFP 标签, 可以通过 FACS 分选得到阳性细胞, 又加之慢病毒载体可以通过本身具有的 5'LTR 和 3'LTR 稳定整合到细胞基因组中并长期表达, 因此免去使用抗生素筛选稳定克隆所需的较长的时间周期。实验结果也表明, 我们所获得的稳定细胞系能够长期稳定表达 *hNoc4L* 基因。

综上所述, 本研究成功构建了 *hNoc4L* 基因特异性表达的重组慢病毒载体, 该载体具有高效、长期稳定表达和免疫原性低的特点, 为后续研究 *hNoc4L* 蛋白在哺乳动物核糖体生物发生中的调控作用奠定了基础。

## REFERENCES

- [1] Warner JR. The economics of ribosome biosynthesis in yeast. *Trends Biochem Sci*, 1999, **24**(11): 437–440.
- [2] Woolford JL. The structure and biogenesis of yeast ribosomes. *Adv Genetics Incorporating Mol Genetic Med*, 1991, **29**: 63–118.
- [3] Venema J, Tollervey D. Ribosome synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Ann Rev Genetics*, 1999, **33**: 261–311.
- [4] Poll G, Braun T, Jakovljevic J, *et al.* rRNA maturation in yeast cells depleted of large ribosomal subunit proteins. *PLoS One*, 2009, **4**(12): e8249.
- [5] Kressler D, Linder P, dela Cruz J. Protein trans-acting factors involved in ribosome biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cellular Biol*, 1999, **19**(12): 7897–7912.
- [6] Zemp I, Kutay U. Nuclear export and cytoplasmic maturation of ribosomal subunits. *FEBS Lett*, 2007, **581**(15): 2783–2793.
- [7] Henras AK, Soudet J, Gerus M, *et al.* The post-transcriptional steps of eukaryotic ribosome biogenesis. *Cellular Mol Life Sci*, 2008, **65**(15): 2334–2359.
- [8] Milkereit P, Gadad O, Podtelejnikov A, *et al.* Maturation and intranuclear transport of pre-ribosomes requires Noc proteins. *Cell*, 2001, **105**(4): 499–509.
- [9] Kuhn H, Hierlmeier T, Merl J, *et al.* The Noc-domain containing C-terminus of Noc4p mediates both formation of the Noc4p-Nop14p submodule and its incorporation into the SSU processome. *PLoS One*, 2009, **4**(12): e8370.
- [10] Liu QJ, Han HM, Zhang ZS, *et al.* Comparison of two transmembrane proteins as fusion partner for protein expression on the surface of cell. *Chin J Biotech*, 2008, **24**(11): 1188–1194.  
刘庆军, 韩化敏, 张兆山, 等. 两种跨膜蛋白携带 myc 于细胞表面的能力比较. *生物工程学报*, 2008, **24**(11): 1188–1194.
- [11] Tollervey D. Trans-acting factors in ribosome synthesis. *Exper Cell Res*, 1996, **229**(2): 226–232.
- [12] Tollervey D. Making ribosomes. *Biochem Society Trans*, 2002, **30**(1): A19.
- [13] Tschochner H, Hurt E. Pre-ribosomes on the road from the nucleolus to the cytoplasm. *Trends Cell Biol*, 2003, **13**(5): 255–263.
- [14] Schaffer DV, Koerber JT, Lim KI. Molecular engineering of viral gene delivery vehicles. *Ann Rev Biomed Eng*, 2008, **10**: 169–194.
- [15] Cockrell AS, Kafri T. Gene delivery by lentivirus vectors. *Mol Biotechnol*, 2007, **36**: 184–204.
- [16] Follenzi A, Santambrogio L, Annoni A. Immune responses to lentiviral vectors. *Curr Gene Ther*, 2007, **7**(5): 306–315.