

SV40T外显子的拼接及逆转录病毒载体pLLTSN的构建

李俊刚, 陈耀凯, 王宇明

李俊刚, 陈耀凯, 王宇明, 中国人民解放军第三军医大学西南医院全军感染病研究所 重庆市 400038

李俊刚, 男, 1975-06-10 生, 贵州省平坝县人, 汉族. 2001 年第三军医大学硕士生, 主要从事生物人工肝细胞材料的研究.

国家自然科学基金资助项目, No. 30100080

全军医学“十五”计划面上项目, No.01MA177

项目负责人: 陈耀凯, 400038, 重庆市, 中国人民解放军第三军医大学西南医院全军感染病研究所. yaokaichen@hotmail.com

电话: 023-68754475-8006 传真: 023-65397072

收稿日期: 2003-12-10 接受日期: 2004-02-01

Splicing of SV40T gene exons and construction of a retroviral vector pLLTSN

Jun-Gang Li, Yao-Kai Chen, Yu-Ming Wang

Jun-Gang Li, Yao-Kai Chen, Yu-Ming Wang, Institute of Infectious Diseases, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China

Supported by the National Natural Science Foundation of China, No. 30100080, and PLA Tenth Five-Year Medicine Project, No. 01MA177
Correspondence to: Yao-Kai Chen, Institute of Infectious Diseases, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China. yaokaichen@hotmail.com

Received: 2003-12-10 Accepted: 2004-02-01

Abstract

AIM: To construct an immortalization vector for hepatocytes immortalization, and two exons of simian virus 40 large T antigen gene (SV40T) were spliced and a retroviral vector pLLTSN without intron was constructed.

METHODS: The two exons of SV40T were amplified respectively by high fidelity polymerase chain reaction (PCR) by using the plasmid pUC19-SV40T as the template. Then SV40T gene was spliced by overlapping extension (SOE), and cloned into the *EcoR* I and *BamH* I sites of the retroviral vector pLXSN. The positive recombinant clones were screened and identified by PCR by using colonies directly as templates, and by restriction endonuclease digestion analysis, and DNA sequence analysis.

RESULTS: The 2.1 kb SV40T gene was spliced. Among the ten colonies randomly screened, four were proved positive, and one of them was verified by plasmid DNA sequencing.

CONCLUSION: The retroviral vector pLLTSN containing SV40T without intron is successfully constructed.

Li JG, Chen YK, Wang YM. Splicing of SV40T gene exons and construction of a retroviral vector pLLTSN. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2004;12(5):1104-1107

摘要

目的: 为构建肝细胞永生载体, 对猿猴病毒 40 大 T 抗原

基因(SV40T)外显子进行拼接并以其为外源片段构建逆转录病毒永生载体pLLTSN.

方法: 以质粒 pUC19-SV40T 为模板, 高保真 PCR 扩增 SV40T 的 2 个外显子, 重叠延伸拼接法将两个外显子拼接到一起, 然后用双粘端连接法将其克隆到空载体 pLXSN 的 *EcoR* I 和 *BamH* I 位点之间, 通过菌落 PCR 和酶切法筛选, 鉴定阳性克隆并经 DNA 测序验证.

结果: 拼接成 2.1 kb 的 SV40T, 用菌落 PCR 和酶切法随机筛选的 10 个菌落中 4 个为阳性, 均含有 2.1 kb SV40T 插入片段. 经质粒 DNA 测序分析的阳性克隆, 确证无内含子.

结论: 获得重组的 2.1 kb 无内含子的 SV40T, 成功构建了逆转录病毒载体 pLLTSN.

李俊刚, 陈耀凯, 王宇明. SV40T 外显子的拼接及逆转录病毒载体 pLLTSN 的构建. *世界华人消化杂志* 2004;12(5):1104-1107

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1104.asp>

0 引言

肝细胞是生物人工肝支持系统中核心生物成分^[1-7]. 由正常肝细胞转化而来的肝细胞株具有正常肝细胞的某些主要功能^[8], 且在体外培养时增生能力强, 可迅速达到人工肝支持所需的细胞数量^[9]. 构建逆转录病毒永生载体是肝细胞永生化的重要步骤. 猿猴病毒 40 T 抗原基因(simian virus 40 large T antigen, SV40T)是常用的细胞永生基因. 野生型 SV40T 由 2 个外显子和 1 个内含子组成, 在转录表达过程中, 可因其 mRNA 的剪接与否而表达 T 抗原或 t 抗原. 由于仅 T 抗原即可引起细胞的永生^[10-12], 国外学者采用不表达 t 抗原的 SV40T 逆转录病毒载体成功永生化了包括肝细胞在内的多种细胞^[13]. 我们在构建肝细胞永生载体过程中, 为了避免 t 抗原的表达, 同时缩短 DNA 长度, 采用重叠延伸拼接法(splicing by overlapping extension, SOE)法^[14-15]将 SV40T 的 2 个外显子拼接起来, 去除了内含子, 并将重组的 SV40T 克隆到逆转录病毒载体 pLXSN 的多克隆位点, 构建成含 2.1 kb SV40T 的逆转录病毒载体 pLLTSN, 旨在为肝细胞永生奠定基础.

1 材料和方法

1.1 材料 逆转录病毒载体 pLXSN 及其位于多克隆位点两侧测序引物 P5' 和 P3' 购于美国 Clontech 公司; 质

粒 pUC19-SV40 T 由第四军医大学段小红博士惠赠^[16], 该质粒含有 SV40T 的全部基因序列; 限制性内切酶 EcoR I, BamH I 等购自英国 NEB 公司; T4 DNA 连接酶为美国 Promega 公司产品; 大肠杆菌 DH5 α 株为本研究所保存菌种; pfu DNA 聚合酶购自北京鼎国公司; 2 \times PCR 混合液和玻璃珠法 DNA 胶回收纯化试剂盒购自上海生工生物工程技术有限公司; 重组 SV40T (r SV40T) PCR 引物由上海生工生物工程技术有限公司合成, 序列如下: P1: 5' -GCGAATTC(EcoRI)ACCATGGATAAAGTTTAAAC-3'; P2: 5' -CATCAGTTCCATAGGTTGGAATCTCAGTTGCATCCCAGAAGCC-3'; P3: 5' -CCAACCTATGGAAGTATGAATGGGAG-3'; P4: 5' -CCGGATCC(BamH I)TTATGTTTCAGGTTTCAGGG-3'. 其中 P2 和 P3 为内引物, 二者之间有 19 个碱基重叠互补. PCR 产物纯化试剂盒为德国 Roche 公司产品.

1.2 方法 SV40T 外显子 1 的扩增: 在 100 μ L 反应体系中分别加入无菌水 91 μ L, 10 \times PCR Buffer 10 μ L, dNTP 2 μ L, P1, P2 各 2 μ L, 2.5 MU/L 的 pfu DNA 聚合酶 2 μ L, 模板 pUC19-SV40 T 质粒 1 μ L. 反应条件: 94 $^{\circ}$ C 预变性 2 min; 然后 94 $^{\circ}$ C 1 min, 58 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 1 min 共 30 个循环; 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min. 反应产物经 8 g/L 琼脂糖凝胶电泳分析, 目的片段应为 279 bp. SV40T 外显子 2 的扩增: 在上述 PCR 体系中将 P1 和 P2 换为 P3 和 P4, 其余成分不变. 反应条件: 94 $^{\circ}$ C 预变性 2 min; 然后 94 $^{\circ}$ C 1 min, 60 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 3 min 共 30 个循环; 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min. 目的片段约为 1.9 kb. PCR 产物的纯化按试剂盒说明书进行操作. 每 100 μ L PCR 产物纯化后浓缩为 10 μ L. SV40T 基因 2 个外显子的拼接: 在上述 PCR 体系中, 引物换为 P1 和 P4, 模板换为纯化的外显子 1 和 2 各 1 μ L, 反应条件: 94 $^{\circ}$ C 预变性 2 min; 然后 94 $^{\circ}$ C 1 min, 58 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 3 min 共 30 个循环; 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min. 产物经 8 g/L 琼脂糖凝胶电泳分析后用 PCR 产物纯化试剂盒纯化. pLLTSN 载体的构建: 按图 1 所示流程进行. 同时用 EcoR I 和 BamH I 分别双酶切载体 pLXSN 和纯化的 2.1 kb rSV40T, 8 g/L 琼脂糖凝胶电泳分离 5.9 kb 线性 pLXSN 和 2.1 kb rSV40 T, 玻璃珠法 DNA 胶回收纯化试剂盒从凝胶中回收纯化目的片段. 将回收的 pLXSN 和 rSV40T 片段按约 1 : 3 的摩尔比混合(共约 100 ng), 45 $^{\circ}$ C 水浴 5 min, 再冷却到 0 $^{\circ}$ C, 在 10 μ L 体系中用 T4 DNA 连接酶 16 $^{\circ}$ C 过夜连接. 次日取 5 μ L 连接产物转化氯化钙法制备的感受态 DH5 α 细胞. pLLTSN 阳性克隆的筛选和鉴定: (1) 菌落 PCR 法^[17-18]: 用分别与载体序列和 SV40T 序列互补的引物 P5' 和 P4 配对进行 PCR, 可同时鉴定重组体是否确为 pLXSN 与 rSV40T 嵌合体, 以及 SV40T 在载体中插入的方向. 在 20 μ L 反应体系中加入无菌水 19.2 μ L, 2 \times PCR 混合液 10 μ L, P5' 和 P4 引物各 0.8 μ L, 以高压灭菌牙签沾取单个菌落少许, 点入反应体系中作为模板. 反应条件: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min;

然后 94 $^{\circ}$ C 30 s, 58 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 50 s 共 30 个循环; 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min. 将 PCR 产物进行 8 g/L 琼脂糖凝胶电泳, 出现 2.1 kb 条带者为阳性. (2) 酶切法: 取 PCR 阳性克隆接种于 5 mL 含 100 kU/L 氨苄西林的 LB 培养基, 37 $^{\circ}$ C 摇床中 250 r/min 振荡培养过夜. 碱裂解法提取质粒 DNA, 以 EcoR I 和 BamH I 双酶切和 8 g/L 琼脂糖凝胶电泳分析, 电泳分离出 2.1 kb 条带者为阳性. 同时以空载体 pLXSN 行相同双酶切作为对照. 随机取一株鉴定为阳性的 pLLTSN 克隆进行 rSV40T 的 DNA 序列测定, 由上海生工生物工程技术有限公司完成, 测序引物为 P5' 和 P3'.

2 结果

2.1 SV40T 基因的拼接 通过 PCR 成功地扩增出了 SV40T 基因 279 bp 和 1.9 kb 两个外显子 DNA 片段; 再以两个 DNA 片段为模板, 使用 SOE 法成功地将两个片段顺序连接成连续的, 无内含子的 2.1 kb rSV40T 基因(图 2).

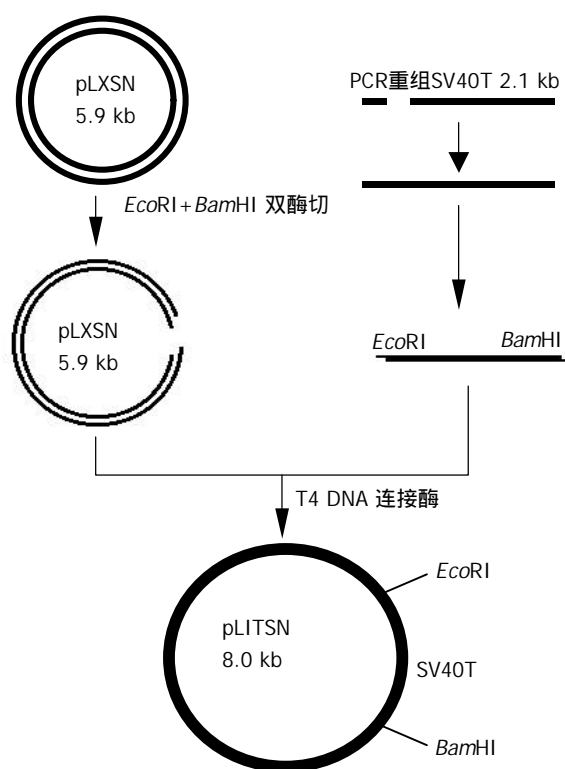


图 1 pLLTSN 构建流程.

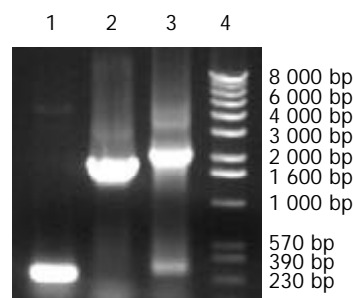


图 2 PCR 重组 2.1 kb SV40T 基因. 1: 外显子 1; 2: 外显子 2; 3: 重组后的 2.1 kb SV40T; M: 标准参照物.

2.2 pLLTSN 重组体阳性克隆的 PCR 鉴定 转化平板长出几百个菌落, 随机挑取10个克隆进行筛选和鉴定. 应用 P5' 和 P4 为引物, 以单个菌落的少许菌体为模板, 同时以载体 pLXSN 质粒作为阴性对照模板进行 PCR 扩增. 用 8 g/L 琼脂糖凝胶电泳分析 PCR 产物, 结果随机筛选的 10 个菌落中有 4 个可见 2.1 kb 的阳性条带, 阴性对照并未见任何条带.

2.3 pLLTSN 重组体阳性克隆的酶切鉴定 挑取4个PCR阳性克隆进行碱裂解法提取质粒 DNA, 以 EcoR I 和 BamH I 双酶切和 8g/L 琼脂糖凝胶电泳分析. 结果 4 个克隆均被切为 5.9kb 和 2.1kb 两个片段(图 3).

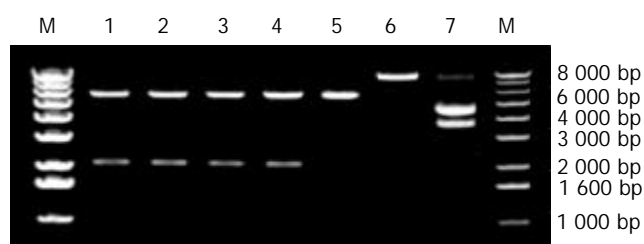


图3 重组 pLLTSN 克隆的酶切鉴定. M: 标准参照物; 1-4: pLLTSN 克隆 1-4 EcoR I 和 BamH I 双酶切; 5: pLXSN 双酶切对照; 6: EcoR I 单酶切 pLLTSN 克隆 1; 7: 未酶切 pLLTSN 克隆 1 质粒对照.

2.4 pLLTSN 重组体的测序验证 经过测序, pLLTSN 中的 rSV40T 全长 2 127 bp, 共有 4 处点突变, 即 G888A, T1063C, A1701G 和 T1868C 突变, 但皆为同义突变, 其编码蛋白的氨基酸序列并无改变. 突变处(下划线)部分序列如下:

```
851 ATGTGTTGTT ATTGCTTGGG ATGTACTTGG AATTTCAATA CAGTTTTGAA...
1051 GATAGCCTAC AACTAAGTAG AGAACAAATG TTAACAAACA GATTTAATGA...
1701 GATAATTCAA AGTGGCATTG CTTTGCTTCT TATGTTAATT TGGTACAGAC...
1851 TAATGTGGCT ATGGGAACTG GAGTTTGTAG TTGGCTAAGA AACAGTGATA...
```

3 讨论

基因的重叠延伸拼接(SOE)^[14]又称重组 PCR, 是将不相邻的两个基因或 DNA 片段拼接起来构成融合基因/DNA 的 PCR 方法. 其原理是: 使用两对引物 P1, P2 和 P3, P4 经过第一轮 PCR 分别扩增出两个 DNA 片段 A 和 B, 其中 P2 和 P3 为内引物, 具有部分序列重叠互补, 使 A 的 3' 端和 B 的 5' 端具有同源互补序列; 第二轮 PCR 再以 A 和 B 混合作为模板, 经变性, 退火, 复性时, A 的正链和 B 的负链的 3' 端同源互补序列将结合在一起, 使两条链互为引物, 通过 PCR 得到延伸和扩增, 从而连接 A 和 B. 其特点是不需要使用限制性内切酶和连接酶, 可以避免引入限制性酶切位点的核苷酸序列, 可将两个 DNA 片段精确地连接在一起. 使用这种方法时, 为了尽可能避免或减少碱基错配, 往往需加大模板, 引物和 dNTP 的用量, 同时减少 PCR 的循环数, 因此有时在其 PCR 产物的凝胶电泳图像中仍可见模板 DNA 的相应条带. 在图 2 中第三泳道出现与外显子 1 相同大小的较

弱条带即属此种情况. 一方面是由于模板过多, 另一方面是因为内引物 P2 较长, 在外显子 1 的 PCR 产物纯化过程中有所残留, 导致第二轮 PCR 过程中产生一定扩增. 因此应用 SOE 时, 第一轮 PCR 产物最好经电泳分离后切胶回收纯化以除去多余的引物和其他非特异序列.

野生型 SV40T 基因全长 2 473 bp, 其中前 246 bp 为第一外显子, 247-592 bp 为内含子, 593-2 476 bp 为第二外显子, 两个外显子连接后编码序列长 2 127 bp. 所使用的外引物引入了额外的酶切位点序列, 所以第 1 外显子 PCR 产物长 279 bp. SV40T 第 1 外显子和内含子部分序列(前 561 bp)又可编码 t 抗原. 在 SV40 转录表达过程中, 其 mRNA 发生剪接时则转译为 T 抗原, 而不剪除内含子序列时则表达 t 抗原. t 抗原在细胞中的作用复杂, 可以促进 T 抗原对细胞的转化^[19], 也可增加细胞凋亡的敏感性^[20], 而 T 抗原却可通过 PI3 激酶途径激活 Akt 抑制细胞凋亡^[21]. 为了避免 t 抗原表达引起的其他不确定因素^[10], 我们用 SOE 法成功地连接了 SV40T 的两个外显子, 删除其内含子序列, 同时减少 SV40T 在载体中所占容量以利于载体后续加入其他基因, 并将拼接的 2.1 kb SV40T 克隆到 pLTSN 的 EcoR I 和 BamH I 酶切位点之间, 构建了只有 T 抗原可得到表达的逆转录病毒载体 pLLTSN.

SV40T 是使用最广泛的永生基因, 他不但能刺激细胞增生, 延长培养细胞的生命期, 而且诱导细胞分化却不完全转化细胞. 如通过分子克隆的 SV40 DNA 转染而永生化的猫成纤维细胞, 培养传代长达 6 mo 之久而不显示与其原代细胞不同的表型^[22]. 应用 SV40T 基因永生化的多种哺乳动物细胞, 这已为国内外许多研究报道所证实^[8, 23-28]. 体外培养的二倍体细胞是不能无限分裂增生的, 而用基因转移技术将 SV40T 转到二倍体细胞中并稳定表达^[29], 可获得永生化的细胞^[30-34]. p53 与 pRB 是调控细胞增生和细胞凋亡的抑癌基因, p53 的突变和 pRB 的失活都可导致细胞增生周期的失控, 引起细胞的无限生长. SV40T 抗原与 p53^[35]及 pRB^[36-37]结合并使后者失活, 从而延长细胞生命. 为探索用 SV40T 基因永生化的肝细胞的可行性, 我们构建了含 SV40T 的逆转录病毒表达载体. 该载体的真核表达元件为莫洛尼小鼠白血病病毒(moloney murine leukemia virus, MoMuLV)长末端重复序列(long terminal repeat, LTR), SV40T, SV40 早期启动子以及新霉素耐药基因(Neo^r), 因此命名为 pLLTSN.

逆转录病毒载体是目前哺乳动物细胞基因转移最有效的工具, 可高效转导骨髓细胞等^[38], 已被应用于遗传性疾病及癌症基因治疗的临床试验^[39-40]. pLXSN 是基于 MoMLV 构建的经典逆转录病毒载体之一. 当含目的基因的 pLXSN 转染包装细胞后, 可产生无复制活性的感染性病毒. 这些病毒颗粒可感染靶细胞并转移目的基因, 但不能在靶细胞中复制. 将 pLLTSN 包装为多嗜性复制缺陷病毒, 可感染包括人在内的多种哺乳动物

细胞. 病毒颗粒感染细胞后, 其基因可整合到宿主细胞基因组, 稳定表达 SV40T 和 Neo^r. 用其感染人肝细胞可望建立永生化人肝细胞系.

4 参考文献

- Ding YT, Qiu YD, Chen Z, Xu QX, Zhang HY, Tang Q, Yu DC. The development of a new bioartificial liver and its application in 12 acute liver failure patients. *World J Gastroenterol* 2003;9:829-832
- Chen XP, Xue YL, Li XJ, Zhang ZY, Li YL, Huang ZQ. Experimental research on TECA-I bioartificial liver support system to treat canines with acute liver failure. *World J Gastroenterol* 2001;7:706-709
- Wang YJ, Li MD, Wang YM, Chen GZ, Lu GD, Tan ZX. Effect of extracorporeal bioartificial liver support system on fulminant hepatic failure rabbits. *World J Gastroenterol* 2000;6: 252-254
- Xue YL, Zhao SF, Zhang ZY, Wang YF, Li XJ, Huang XQ, Luo Y, Huang YC, Liu CG. Effects of a bioartificial liver support system on acetaminophen induced acute liver failure canines. *World J Gastroenterol* 1999;5:308-311
- Gao Y, Xu XP, Hu HZ, Yang JZ. Cultivation of human liver cell lines with microcarriers acting as biological materials of bioartificial liver. *World J Gastroenterol* 1999;5:221-224
- Wang YJ, Li MD, Wang YM, Nie QH, Chen GZ. Experimental study of bioartificial liver with cultured human liver cells. *World J Gastroenterol* 1999;5:135-137
- 李俊刚, 陈耀凯. 生物人工肝细胞材料研究进展. *世界华人消化杂志* 2002;10:699-701
- Maruyama M, Kobayashi N, Westerman KA, Sakaguchi M, Allain JE, Totsugawa T, Okitsu T, Fukazawa T, Weber A, Stolz DB, Leboulch P, Tanaka N. Establishment of a highly differentiated immortalized human cholangiocyte cell line with SV40T and hTERT. *Transplantation* 2004;77:446-451
- 陈耀凯, 王宇明. 人工肝生物成分的研究进展. *中华实验外科杂志* 2000;17:479-480
- Kobayashi N, Fujiwara T, Westerman KA, Inoue Y, Sakaguchi M, Noguchi H, Miyazaki M, Cai J, Tanaka N, Fox JJ, Leboulch P. Prevention of acute liver failure in rats with reversibly immortalized human hepatocytes. *Science* 2000;287:1258-1262
- Allain JE, Dagher I, Mahieu-Caputo D, Loux N, Andreoletti M, Westerman K, Briand P, Franco D, Leboulch P, Weber A. Immortalization of a primate bipotent epithelial liver stem cell. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:3639-3644
- Beachy TM, Cole SL, Cavender JF, Tevethia MJ. Regions and activities of simian virus 40 T antigen that cooperate with an activated ras oncogene in transforming primary rat embryo fibroblasts. *J Virol* 2002;76:3145-3157
- Westerman KA, Leboulch P. Reversible immortalization of mammalian cells mediated by retroviral transfer and site-specific recombination. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:8971-8976
- Horton RM, Hunt HD, Ho SN, Pullen JK, Pease LR. Engineering hybrid genes without the use of restriction enzymes: gene splicing by overlap extension. *Gene* 1989;77:61-68
- Warrens AN, Jones MD, Lechler RI. Splicing by overlap extension by PCR using asymmetric amplification: an improved technique for the generation of hybrid proteins of immunological interest. *Gene* 1997;186:29-35
- 段小红, 吴军正, 毛勇, 李峰, 杨元彤. SV40 诱导髌突软骨细胞永生化的实验研究. *中华口腔医学杂志* 2001;36:14-16
- Takumi T. Rapid cDNA cloning by PCR screening (RC-PCR). *Methods Mol Biol* 2002;192:385-389
- Liao CH, Shollenberger LM. Detection of Salmonella by indicator agar media and PCR as affected by alfalfa seed homogenates and native bacteria. *Lett Appl Microbiol* 2003; 36:152-156
- Bocchetta M, Miele L, Pass HI, Carbone M. Notch-1 induction, a novel activity of SV40 required for growth of SV40-transformed human mesothelial cells. *Oncogene* 2003;22:81-89
- Cole SL, Tevethia MJ. Simian virus 40 large T antigen and two independent T-antigen segments sensitize cells to apoptosis following genotoxic damage. *J Virol* 2002;76:8420-8432
- Yu Y, Alwine JC. Human cytomegalovirus major immediate-early proteins and simian virus 40 large T antigen can inhibit apoptosis through activation of the phosphatidylinositol 3'-OH kinase pathway and the cellular kinase Akt. *J Virol* 2002; 76:3731-3738
- Koksoy S, Phipps AJ, Hayes KA, Mathes LE. SV40 immortalization of feline fibroblasts as targets for MHC-restricted cytotoxic T-cell assays. *Vet Immunol Immunopathol* 2001;79: 285-295
- Yuan L, Yu WM, Qu CK. DNA damage-induced G2/M checkpoint in SV40 large T antigen-immortalized embryonic fibroblast cells requires SHP-2 tyrosine phosphatase. *J Biol Chem* 2003;278:42812-42820
- Jacobberger J, Frisa P. Cell density-dependent related gene expression: SV40 large T antigen levels in immortalized astrocyte lines. *BMC Cell Biol* 2002;3:10
- Ali SH, DeCaprio JA. Cellular transformation by SV40 large T antigen: interaction with host proteins. *Semin Cancer Biol* 2001; 11:15-23
- van Leeuwen EB, Wisman GB, Tervaert JW, Palmans LL, van Wijk RT, Veenstra R, Molema G, van der Zee AG, van der MJ, Ruiters MH. An SV40 large T-antigen immortalized human umbilical vein endothelial cell line for anti-endothelial cell antibody detection. *Clin Exp Rheumatol* 2001;19:283-290
- Darimont C, Avanti O, Tromvoukis Y, Vautravers-Leone P, Kurihara N, Roodman GD, Colgin LM, Tullberg-Reinert H, Pfeifer AM, Offord EA, Mace K. SV40 T antigen and telomerase are required to obtain immortalized human adult bone cells without loss of the differentiated phenotype. *Cell Growth Differ* 2002;13:59-67
- Tsao SW, Wang X, Liu Y, Cheung YC, Feng H, Zheng Z, Wong N, Yuen PW, Lo AK, Wong YC, Huang DP. Establishment of two immortalized nasopharyngeal epithelial cell lines using SV40 large T and HPV16E6/E7 viral oncogenes. *Biochim Biophys Acta* 2002;1590:150-158
- Berghella L, De Angelis L, Coletta M, Berarducci B, Sonnino C, Salvatori G, Anthonissen C, Cooper R, Butler-Browne GS, Mouly V, Ferrari G, Mavilio F, Cossu G. Reversible immortalization of human myogenic cells by site-specific excision of a retrovirally transferred oncogene. *Hum Gene Ther* 1999;10: 1607-1617
- Behrens A, Gordon EM, Li L, Liu PX, Chen Z, Peng H, La Bree L, Anderson WF, Hall FL, McDonnell PJ. Retroviral gene therapy vectors for prevention of excimer laser-induced corneal haze. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002;43:968-977
- Jha KK, Banga S, Palejwala V, Ozer HL. SV40-Mediated immortalization. *Exp Cell Res* 1998;245:1-7
- Nelson K, Melville EL, Meikle PJ, Anson DS. Immortalisation of a mucopolysaccharidosis type IIIC fibroblast cell line via expression of SV40 T antigen. *Cell Biol Int* 2003;27:567-570
- Chen W, Hahn WC. SV40 early region oncoproteins and human cell transformation. *Histol Histopathol* 2003;18:541-550
- Hattori K, Muta M, Toi M, Iizasa H, Shinsei M, Terasaki T, Obinata M, Ueda M, Nakashima E. Establishment of bone marrow-derived endothelial cell lines from ts-SV40 T-antigen gene transgenic rats. *Pharm Res* 2001;18:9-15
- Khandjian EW, Rose TM. Disruption of LT-antigen/p53 complex by heat treatment correlates with inhibition of DNA synthesis during transforming infection with SV40. *Biochem Cell Biol* 2000;78:437-445
- Modi S, Kubo A, Oie H, Coxon AB, Rehmatulla A, Kaye FJ. Protein expression of the RB-related gene family and SV40 large T antigen in mesothelioma and lung cancer. *Oncogene* 2000;19:4632-4639
- Lee C, Cho Y. Interactions of SV40 large T antigen and other viral proteins with retinoblastoma tumour suppressor. *Rev Med Virol* 2002;12:81-92
- Hong Y, Lee K, Choi JY, Yu SS, Kim E, Sugimoto Y, Ueno M, Kato I, Kim S. High efficiency gene transfer to human CD34+ cells. *Int J Hematol* 2002;76(Suppl 1):264-265
- McTaggart S, Al Rubeai M. Retroviral vectors for human gene delivery. *Biotechnol Adv* 2002;20:1-31
- Hong Y, Yu SS, Kim JM, Lee K, Na YS, Whitley CB, Sugimoto Y, Kim S. Construction of a high efficiency retroviral vector for gene therapy of Hunter's syndrome. *J Gene Med* 2003;5:18-29