本研究用此策略获得了目的蛋白 Delta1 与 EGFP 的共表达，荧光显微镜下可以观察到明亮的绿色荧光，RT-PCR 显示 NIH3T3 细胞 Delta1 表达阳性。

逆转录病毒载体也存在一些缺陷，其中最常见的是病毒滴度低，这也是本实验遇到的最大难题。病毒滴度决定了病毒的临床应用价值，目前一般较好的逆转录病毒滴度在 10^6 CFU/ml，通过超滤能提高 10 倍左右，进一步浓缩则效果不明显。

影响逆转录病毒滴度的主要因素有温度、pH 值、血清浓度等[8,9]。据此，曾对实验操作进行了如下改进：①在收获病毒前 24～48 h，将包装细胞移入 32 ℃孵箱培养；②尽量保持包装细胞培养基的 pH 值稳定于 7.2；③血清浓度降低至 5%；④PA317 和 GP+E86 混合培养，进行“乒乓球”法相互感染，同时在培养基中加入较高浓度的 polybrene(15 μg/ml)。通过改进，病毒滴度提高 10 倍以上。经反复比较，认为“乒乓球”法[10]对提高病毒滴度最有效，其它方面也有一定的效果。

选择 EGFP 作为转染细胞标记，借助荧光显微镜或流式细胞仪，可以快速、方便地辨别转染与非转染细胞。根据包装细胞绿色荧光的表达强度，可以大致比较各克隆外源基因的表达情况，推测病毒滴度。通过具备细胞分选功能的流式细胞仪，可根据 GFP 表达情况，直接进行转染细胞的快速分离，筛选出目的基因高表达的细胞，而无需进行传统的药物方法筛选，从而大大提高工作效率，节约时间和经费。同时，作为 Delta1 表达的报告分子，EGFP 也将在后续研究中发挥作用。

总之，本研究利用双顺反子逆转录病毒载体，获得了功能性目的蛋白 Delta1 与 EGFP 的共表达，证实为一种有效的基因转导方式，为进一步研究 Notch-Delta 信号打下良好基础；同时 EGFP 作为目的蛋白表达的报告分子，为逆转录病毒体外包装、病毒转导细胞的生物学特性检测过程提供一种方便、快捷的监测手段。

参考文献：

[1] Artavanis-Tsakonas S, Rand M D, Lake R J. Notch signaling: cell fate control and signal integration in development[J]. Science, 1999, 284(5415): 770-776.

[2] Artavanis-Tsakonas S, Matsuno K, Fortini M E. Notch signaling[J]. Science, 1995, 268(5208): 225-232.

[3] Mitsiadis T A, Hirsinger E, Lendahl U, *et al*. Delta-notch signaling in odontogenesis: correlation with cytodifferentiation and evidence for feedback regulation[J]. Dev Biol, 1998, 204(2): 420-431.

[4] Mitsiadis T A, Henrique D, Thesleff I, *et al*. Mouse Serrate-1 (Jagged-1): expression in the developing tooth is regulated by epithelial-mesenchymal interactions and fibroblast growth factor-4[J]. Development, 1997, 124(8): 1473-1483.

[5] Imreh G, Beckman M, Iverfeldt K, *et al*. Noninvasive monitoring of apoptosis versus necrosis in a neuroblastoma cell line expressing a nuclear pore protein tagged with the green fluorescent protein[J]. Exp Cell Res, 1998, 238(2): 371-376.

[6] Jaleco A C, Neves H, Hooijberg E, *et al*. Differential effects of Notch ligands Delta-1 and Jagged-1 in human lymphoid differentiation[J]. J Exp Med, 2001, 194(7): 991-1002.

[7] Wang X, Wan H, Korzh V, *et al*. Use of an IRES bicistronic construct to trace expression of exogenously introduced mRNA in zebrafish embryos[J]. Biotechniques, 2000, 29(4): 814-816,818,820.

[8] McTaggart S, Al Rubeai M. Effects of culture parameters on the production of retroviral vectors by a human packaging cell line[J]. Biotechnol Prog, 2000, 16(S): 859-865.

[9] McTaggart S, Al Rubeai M. Retroviral vectors for human gene delivery[J]. Biotechnol Adv, 2002, 20(1): 1-31.

[10] Kozak S L, Kabat D. Ping-Pong amplification of a retroviral vector achieves high-level gene expression: human growth hormone production[J]. J Virol, 1990, 64(7): 3500-3508.

（编辑 王 红）

参考文献类型及标识

根据 GB 3469 规定，以单字母方式标识以下各种参考文献类型：

参考文献类型	专著	论文集	报纸文章	期刊文章	学位论文	报告	标准	专利
文献类型标识	M	C	N	J	D	R	S	P

对于专著、论文集中的析出文献，其文献类型标识建议采用单字母“A”；对于其他未说明的文献类型，建议采用单字母“Z”。

对于数据库(database)、计算机程序(computer program)及电子公告(electronic bulletin board)等电子文献类型的参考文献，建议以下列双字母作为标识：

电子参考文献类型	数据库	计算机程序	电子公告
电子文献类型标识	DB	CP	EB

本刊编辑部