

一种新型慢病毒载体制备体系的初步建立*

马 强 李 明 董文其 吴英松**

(南方医科大学生物技术学院, 广州 510515)

摘要 为了建立新型、高产量的慢病毒载体制备体系, 将构建好的主框架质粒 pVECRNA、包装质粒 pGAGPOL 及包膜质粒 pVSVG 通过脂质体共转染至 BHK21 细胞. 再用含有 T7RNA 聚合酶基因的重组痘苗病毒 vTF-3 感染细胞, 培养 4 天后, 收集培养上清. 提取培养上清的 RNA, 进行 RT-PCR 反应, 将培养上清进行免疫印迹鉴定, 将培养上清感染正常的 293T 细胞、HepG2 细胞、Vero 细胞, 荧光显微镜下观察细胞 GFP 的表达情况, 采取 3×3 析因分析方法, 优化系统产量, Real-time PCR 方法测定细胞培养上清中病毒载体的拷贝数, 利用流式细胞术检测病毒载体滴度. RT-PCR 及 p24 免疫印迹结果均提示在细胞上清中存在慢病毒载体; 通过荧光显微镜观察到感染组 293T 细胞、HepG2 细胞、Vero 细胞均表达绿色荧光蛋白 GFP, 说明此系统制备出的慢病毒载体具有感染性; 系统经优化后, 培养上清中慢病毒载体拷贝数达到 $1.1 \times 10^{12}/\text{ml}$, 培养上清原始滴度达到 $1.3 \times 10^8 \text{ tu}/\text{ml}$, 高出目前常用制备体系产量 1 个数量级. 上述结果表明, 新型慢病毒载体制备体系已初步建立, 为今后该系统的大规模应用提供客观的科学依据.

关键词 慢病毒载体, 痘苗病毒, 基因治疗

学科分类号 R394

慢病毒载体^[1](lentivectors)可以有效地感染所有哺乳动物细胞, 包括一些较难感染的细胞, 如原代细胞、干细胞、未分化的细胞等. 引入宿主细胞的目的基因借助于慢病毒极易整合到宿主基因组, 从而稳定、长期表达目的基因(siRNA、cDNA 或是报告基因), 并且慢病毒载体感染应用于细胞尤其是活体实验时, 不会像其他化学感染一样引起非特异性反应. 然而目前慢病毒载体的生产系统产量偏低, 影响了慢病毒载体的推广应用. 痘苗病毒 VV/T7 表达系统^[2]蛋白表达迅速, 产量高, 是比较理想的瞬时表达系统, 本实验以痘苗病毒 VV/T7 表达系统为基础构建了新型慢病毒载体制备系统, 并对此系统进行了初步优化, 为今后该制备系统的大规模应用提供客观的科学依据.

1 材料和方法

1.1 试剂

DMEM 培养基、Opti-MEM 培养基、脂质体 Lipofectamin2000TM 购自 Invitrogen 公司, 无内毒素质粒抽提试剂盒、病毒 RNA 提取试剂盒购自 Qiagen 公司, 胎牛血清购自 Hyclone 公司, 羊抗 p24 蛋白抗体购自 Biorad 公司, 重组 p24 蛋白

购自晶美公司, 无 RNA 酶的 DNA 酶、无 DNA 酶的 RNA 酶和蛋白酶 K 均购自 Promega 公司, RNasin 购自 TaKaRa 公司; 质粒 pVECRNA、pGAG-POL、pVSVG 为本室构建^[3]; pWPXL、pMDL_gp_RRE、pMD2G、pRSV-Rev 为日内瓦大学 Trono 教授惠赠^[4]; 重组痘苗病毒 vTF7-3 为美国冯愈博士惠赠; BHK21、HepG2、Vero 细胞为本研究室保存; 293T 细胞购自 ATCC.

1.2 方法

1.2.1 慢病毒载体的制备.

本制备系统制备方法^[2,3](图 1): 在六孔板中每孔接种约 5×10^5 个 BHK₂₁ 细胞, 培养过夜, 第 2 天按脂质体 Lipofectamin2000TM 说明书步骤将 pVECRNA、pGAG-POL、pVSVG 共同转染细胞, 其中主框架质粒 pVECRNA 含有 T7 启动子和终止子控制下的载体 RNA 的 DNA 模板, 包装质粒 pGAGPOL 含有克隆于痘苗病毒早/晚期启动子和

*国家自然科学基金资助项目 (30300316).

** 通讯联系人.

Tel: 020-33354072, 61648321, E-mail: wg@fimmu.com

收稿日期: 2007-01-08, 接受日期: 2007-01-31

终止子之间的 gag-pol 编码区，包膜质粒 pVSVG 含有克隆痘苗病毒早 / 晚期启动子和终止子之间的 VSV-G 编码区，4 h 后，加入含有 T7RNA 聚合酶基因的重组痘苗病毒 vTF7-3，此重组痘苗病毒表达 T7RNA 聚合酶，直接指导 pVECRNA 转录慢病毒载体主框架 RNA，并且直接指导 pGAGPOL 和 pVSVG 的蛋白表达，2 h 后，吸去培养上清，用无血清 DMEM 洗涤 3 次，每孔加入 2.5 ml 含 10%

FCS 的 DMEM，37℃、5% CO₂ 培养箱中培养，pVSVG 表达的蛋白 VSV-G 包装由 pVECRNA 转录的主框架 RNA 以及 pGAGPOL 表达的参与慢病毒载体逆转录整合所需酶类，形成慢病毒载体，经胞吐作用释放到培养上清中，96 h 后收集培养上清，0.22 μm 滤膜过滤，将上清于 4℃ 下 2 000 r/min 离心 15 min，去沉淀，于 4℃ 溶解，-70℃ 冻存。

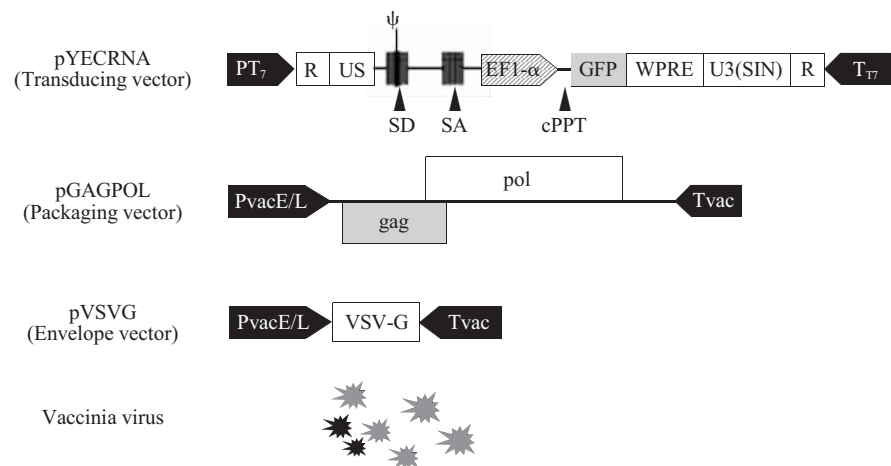


Fig. 1 The representation of our three-plasmid expression system used for generating a pseudotyped HIV-1 based vector by transient transfection

The essential viral *cis*-acting elements and *trans*-act factors have been indicated, such as the splice signals (SD, SA), the packaging signal (Ψ), the reading frames of gag and pol. In the transducing vector pVECRNA, the transducing vector backbone is flanked by a bacteriophage T7 promoter (P_{T7}) and a bacteriophage T7 terminator (T_{T7}). In the packaging vector pGAGPOL, the gag/pol polyprotein-coding region is flanked by a vaccinia early/late promoter ($P_{vacE/L}$) and a vaccinia terminator (T_{vac}). In the envelop vector pVSVG, the vesicular stomatitis virus G (VSV-G) protein-coding region is flanked by a vaccinia early/late promoter ($P_{vacE/L}$) and a vaccinia terminator (T_{vac}). The helper virus vaccinia virus contains the bacteriophage RNA polymerase gene driven by a vaccinia promoter.

按 Trono 教授构建的制备系统的方法^[4](图 2)，在六孔板中每孔接种约 5×10⁵ 个 293T 细胞，培养

过夜。第 2 天按脂质体 Lepofectamin 2000™ 说明书步骤将 pWPXL、pMDL_gp_RRE、pMD2G、

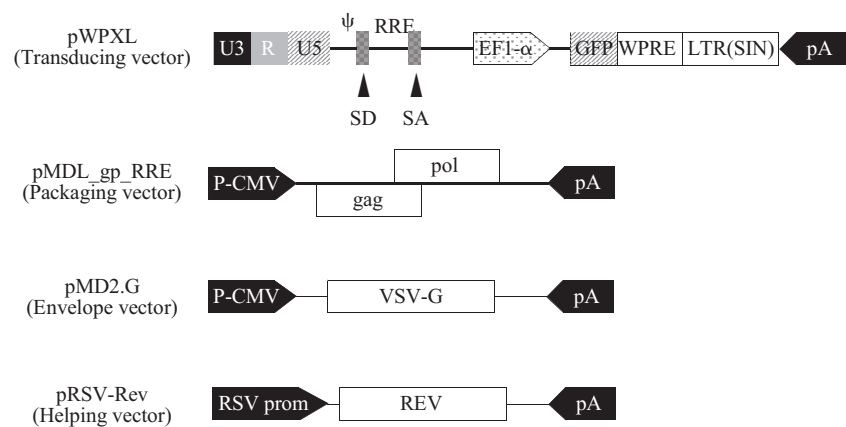


Fig. 2 The representation of the lentiviral vector production system founded by Trono ^[4]

pRSV-Rev共同感染细胞, 其中主框架质粒 pWPXL 表达慢病毒载体的主框架 RNA, pMDL_gp_RRE 主要表达慢病毒载体逆转录以及整合入宿主基因组所必需的蛋白酶类, pMD2G 表达包装慢病毒载体主框架 RNA 的包膜蛋白, pRSV-Rev 表达 Rev 蛋白, 与 RRE 元件相互作用, 促进 RNA 从胞核至胞质的转运, 质粒用量为 Trono 实验室摸索的最佳用量 (Trono 实验室惠赠). 4 h 后, 吸去培养上清, 用无血清 DMEM 洗涤 3 次, 每孔加入 2.5 ml 含 10% FCS 的 DMEM, 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养. 当 4 个质粒共转染至 293T 细胞时, pWPXL 在真核转录系统指导下转录慢病毒载体主框架 RNA, 并在 Rev 作用下加速从胞核至胞质的转运, pMDL_gp_RRE、pMD2G 分别表达慢病毒载体逆转录以及整合入宿主基因组所必需的蛋白酶类、包膜蛋白 VSVG, 在胞质中, 胞膜蛋白 VSV-G 包装慢病毒载体主框架质粒 RNA 以及载体逆转录及整合酶类, 经胞吐作用释放至培养上清中, 96 h 后, 收集上清, 2 000 r/min, 4℃ 下离心 5 min, 0.22 μm 滤膜过滤, -70℃ 冻存.

1.2.2 慢病毒载体 RNA 的 RT-PCR. 取经滤过的培养上清 140 μl, 加入 10U DNA 酶和 20U RNA 酶, 37℃ 水浴孵育 1 h, 加蛋白酶 K 至终浓度为 100 mg/L, 37℃ 孵育 30 min, 提取处理后的培养上清的病毒 RNA. 将提取的病毒 RNA 进行逆转录反应, 引物为 5' AGCTGACAGGTGGTGGCAAT 3'. 将逆转录的 cDNA 进行 PCR 反应, 上游引物为 5' CCGTTGTCAGGCAACGTG 3', 下游引物为 5' AGCTGACAGGTGGTGGCAAT 3'. 反应条件: 变性 95℃, 3 min; 变性 95℃, 30 s, 复性 56℃, 30 s, 延伸 72℃, 12 s, 36 个循环; 72℃ 延伸 10 min.

1.2.3 蛋白质印迹. 将样品进行 12% SDS-PAGE 分离, 按 80 V 恒压 2 h 电转移至 PVDF 膜上, 用含 5% 脱脂奶粉的 TTBS 封闭过夜. 将膜先后用山羊抗 p24 多抗 (Goat Polyclonal Antibody, 1 : 4 000 稀释, Biodesign 公司, Catalog:B65951G) 和兔抗山羊 IgG-HRP (Rabbit anti-Goat IgG-Fc HRP, 1 : 10 000 稀释, Bethyl 公司, Catalog:A50-104P) 室温下各孵育 2 h, 孵育前后用 TTBS 各漂洗 4 次, ECL 显影.

1.2.4 病毒载体感染 293T 细胞、HepG2 细胞以及 Vero 细胞后 GFP 表达情况检测. 在六孔板中分别接种 293T 细胞、HepG2 细胞和 Vero 细胞, 每孔约

1×10⁵ 个细胞, 第 2 天每孔细胞分别用 200 μl 滤过的培养上清感染细胞, 并加入 polybrene (终浓度为 8 g/L) 于 37℃ 吸附 30 min, 换新鲜培养基继续培养 24 h 后, 在倒置荧光显微镜下观察 GFP 的表达.

1.2.5 Real-time PCR 方法测定细胞培养上清中病毒载体的拷贝数. 采用 Taqman 方法测定上清中的病毒载体拷贝数, 其中, 上游引物 5' CCGTTGTC-AGGCAACGTG 3', 下游引物 5' AGCTGACAG-GTGGTGGCAAT 3', 探针 5' FAM-TGCTGACGC-AACCCCCACTGGT-TAMRA 3'. 按 1.2.2 方法得到病毒载体 cDNA, 采用 Universal PCR Master Mix 试剂盒在 PE5700 型全自动荧光定量 PCR 分析仪上进行, 反应条件为: 94℃ 2 min, 94℃ 5 s, 56℃ 1 min 扩增 40 个循环, 在每个循环结束时进行荧光检测. 阴性对照为只感染辅助痘苗病毒的细胞培养上清. 标准品为含有 WPRE (Woodchuck hepatitis virus post-transcriptional regulatory element, 土拨鼠肝炎病毒转录后调控元件) 的质粒 pVECRNA (图 1), WPRE 会一直伴随慢病毒 RNA 的生成, 包装, 最后随机整合入宿主的染色体上, 作为参照比较可信^[9]. 通过紫外分光光度法测定质粒 DNA 浓度, 根据质粒 pVECRNA 的分子质量换算成 DNA 分子拷贝数浓度, 并倍比稀释, 建立标准曲线, 利用 PE5700 分析样品中病毒载体拷贝数.

1.2.6 病毒载体的滴度检测. GFP 表达量法^[9]测定滴度, 即在六孔板中分别接种 293T 细胞, 每孔为 5×10⁵ 个细胞, 用含 10% 小牛血清的 DMEM 在 37℃, 5% CO₂ 培养箱中培养过夜, 第 2 天培养孔底达 90% 左右, 将过滤处理过的培养上清按 2⁻¹、2⁻²、2⁻⁴、2⁻⁸、2⁻¹⁶、2⁻³² 梯度稀释, 不同滴度的培养上清液缓慢加入孔中, 轻轻混匀, 37℃, 5% CO₂ 培养箱中培养过夜, 并加入 polybrene (终浓度为 8 g/L) 于 37℃ 吸附 30 min, 换含 2% 小牛血清的 DMEM 继续培养 24 h 后将细胞处理成单细胞悬液, 流式细胞仪计数 GFP 阳性细胞数, 计算病毒滴度, 所用公式: 病毒滴度 / (tu·ml⁻¹) = GFP 阳性细胞百分数 × 感染的细胞总数 × 细胞的稀释倍数, 细胞的稀释倍数取曲线线性范围内的数值, 以确保单个拷贝的病毒载体感染单个细胞.

1.2.7 制备优化设计方案. 采用析因方差设计, 分析细胞株类型, 病毒与制备细胞数比例 (MOI) 以及质粒用量的最佳优化方案, 进而得到体系最佳产量, 其中每个因素分为 3 个水平, 本实验中主要采

用 BHK21、Vero、HepG2 3 种细胞株, MOI 分为 0.1、1、5 三个水平, 质粒用量分为 11 μg 、22 μg 、33 μg 3 个水平(系统中质粒的用量比例为 pVECRNA : pGAGPOL : pVSVG=5 : 5 : 1)。

1.2.8 统计分析方法. 所有测定结果在 SPSS13.0 软件中整理, 按照 3 $\times$ 3 $\times$ 3 析因方差分析方法分析实验结果, 计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, $P \leq 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 慢病毒载体 RNA 的 RT-PCR

培养上清经 0.22 μm 膜过滤是为了尽量去除复制缺陷性辅助痘苗病毒, 随后用 RNA 酶和 DNA 酶处理, 再用蛋白酶 K 去除核酸酶, 目的是为了除去从破碎细胞中释放的未被 VSVG 包装的慢病毒载体 RNA 以及质粒 DNA. RT-PCR 结果表明, 96 bp 的扩增片段符合预期要求(阴性对照样品为只感染辅助痘苗病毒的细胞培养上清, 图 3), 经测序证明序列正确。

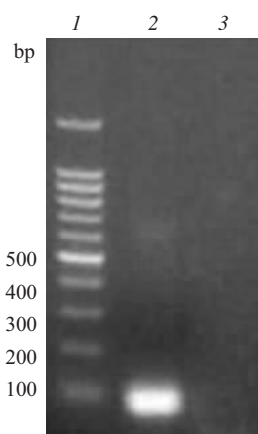


Fig. 3 The vector tested by RT-PCR

1: Takara 100 bp marker; 2: The fragment interested (96 bp);
3: The negative control.

2.2 蛋白质印迹检测 p24 蛋白

将生产系统 BHK21 以及培养收集的病毒培养上清进行蛋白质印迹鉴定, 由图 4 可观察到, 收集的病毒培养上清的 p24 蛋白质印迹结果呈阳性(重组 p24 蛋白作为阳性对照, 只感染辅助痘苗病毒的 BHK21 细胞培养上清为阴性对照), 表明在收集的

培养上清中存在 p24 蛋白。

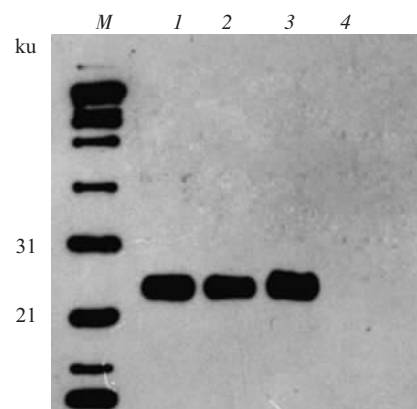


Fig. 4 The Western blotting results of p24

M: Protein marker; 1: The recombinant p24; 2,3: The supernatant ;
4: The negative control.

2.3 荧光显微镜下感染组 293T 细胞、HepG2 细胞、Vero 细胞的 GFP 表达结果

将培养上清分别感染 293T 细胞、HepG2 细胞、Vero 细胞, 24 h 后换液, 倒置荧光显微镜下观察 GFP 的表达(图 5), 阴性对照分别为只加转染试剂 Lipofectamin2000TM 和相应量辅助痘苗病毒感染的 293T 细胞、HepG2 细胞、Vero 细胞. 由图 5 可以观察到感染组的细胞均有 GFP 的表达, 说明由本系统制备的慢病毒载体具有感染性。

2.4 Real-time PCR 方法测定细胞培养上清中病毒载体的拷贝数

Real-time PCR 样品图及标准曲线图见图 6, 其中表 1 为不同组合测得的培养上清中病毒载体的拷贝数, 表 2 为析因方差分析结果。

由表 1、表 2 可以看到: 细胞的种类, 质粒的用量以及痘苗病毒的感染比例对系统的产量均有统计学意义, 并且在以 BHK21 为生产细胞, MOI 为 1, 质粒用量为 22 μg 时, 病毒载体拷贝数最高, 达到 $(11\,707.67 \pm 802.26) \times 10^8/\text{ml}$ 。

2.5 病毒载体的滴度测定

按照 GFP 法测量原理(图 7), 测得病毒拷贝数最多时的上清滴度达到 $(1.3 \pm 0.18) \times 10^8 \text{ tu/ml}$, 而 Trono 系统的病毒载体滴度约为 $(6.3 \pm 0.23) \times 10^6 \text{ tu/ml}$ 。

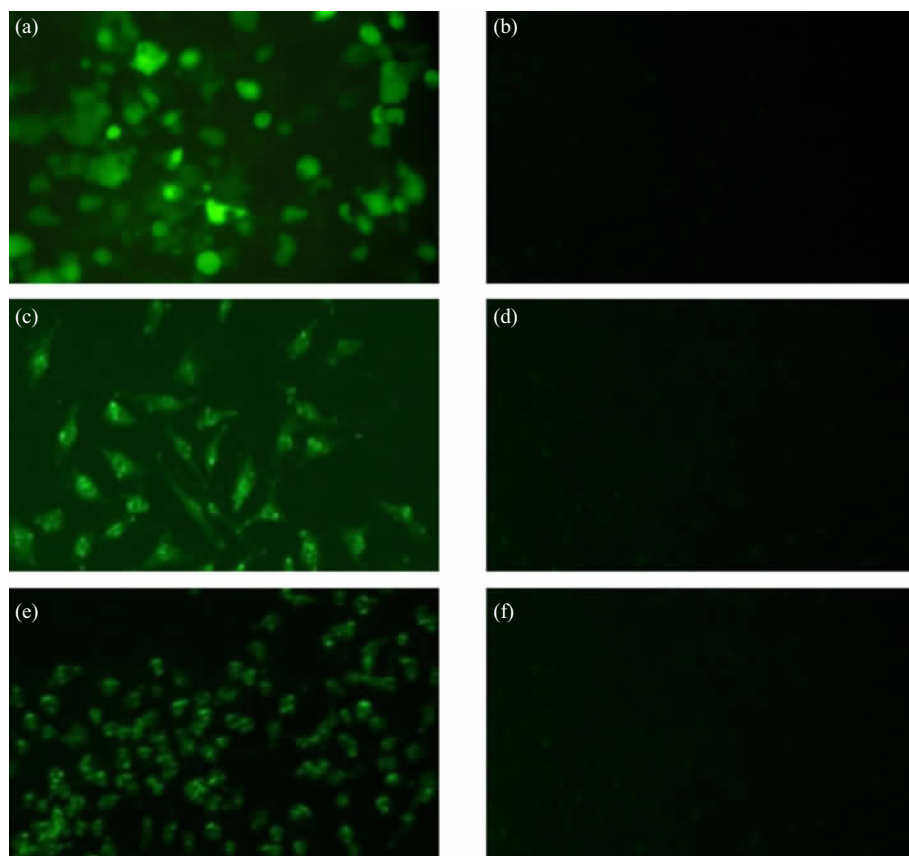


Fig. 5 Fluorescence microscope images of GFP-expressing 293T cells, HepG2 cells, Vero cells transduced with green fluorescent protein gene by the lentiviral vectors ($\times 400$)

(a) 293T cells transfected with the lentiviral vector. (b) The negative control of (a). (c) HepG2 cells transfected with the lentiviral vector. (d) The negative control of (c). (e) Vero cells transfected with the lentiviral vector. (f) The negative control of (e).

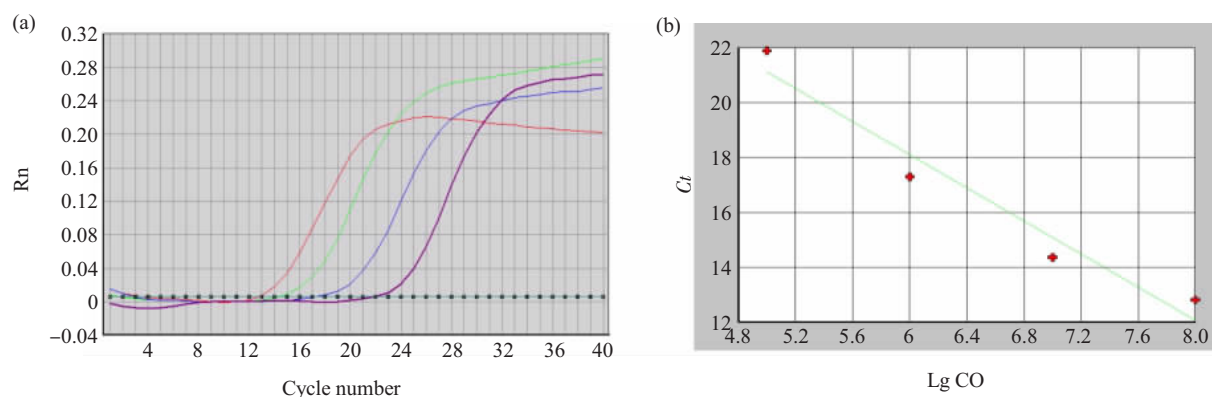


Fig. 6 WPRE-based qPCR

(a) Real-Time PCR amplification plots showing amplification of the pVECRNA, using WPRE-specific primers and probe. Plasmid concentration was determined by spectrophotometer and standards we generated by using 10-fold serial dilutions. A Standard curve (b) was generated ($r^2=0.991$) by plotting cycle threshold (C_t) against the number of plasmid DNA molecules. Average C_t values obtained from experimental unknowns were compared with a standard curve amplified simultaneously in order to quantitate the WPRE copy number present in each sample.

Table 1 Descriptive statistics			
Cell lines	Plasmid dosage	MOI	Copies of LV ($\bar{x}\pm s$) Unit: 10 ⁶ copies /ml
BHK21	11	0.1	5 260.00 ± 1 076.85
		1	5 473.67 ± 347.03
		5	5 260.00 ± 84.01
	22	0.1	10 526.00 ± 1 579.16
		1	11 707.67 ± 802.26
		5	3 696.67 ± 491.66
	33	0.1	9 191.00 ± 177.29
		1	11 098.00 ± 380.10
		5	4 123.33 ± 41.53
HepG2	11	0.1	258.67 ± 27.57
		1	365.00 ± 32.45
		5	214.33 ± 18.88
	22	0.1	549.33 ± 13.01
		1	517.00 ± 29.82
		5	237.33 ± 22.05
	33	0.1	731.33 ± 37.45
		1	623.33 ± 38.55
		5	251.33 ± 42.15
Vero	11	0.1	1 375.33 ± 52.84
		1	1 643.33 ± 195.02
		5	429.00 ± 113.44
	22	0.1	2 712.67 ± 140.40
		1	2 555.67 ± 221.37
		5	503.00 ± 67.62
	33	0.1	2 626.00 ± 122.11
		1	2 650.33 ± 205.16
		5	542.67 ± 25.54

Table 2 Tests of between-subjects effects		
Source	<i>F</i>	<i>P</i>
Cell lines	1789.77	< 0.001
Plasmid dosage	137.27	< 0.001
MOI	311.54	< 0.001
Cell lines×plasmid dosage	70.84	< 0.001
Cell lines×MOI	122.12	< 0.001
Plasmid dosage×MOI	15.62	< 0.001
Cell lines×plasmid dosage×MOI	7.73	< 0.001

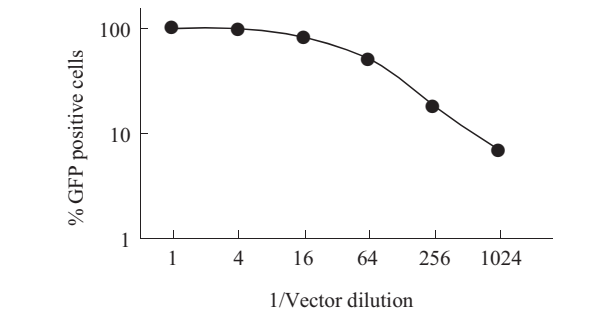


Fig. 7 Determination of GFP expression in vector-transduced cells
LV can be calculated accurately only from the most dilute samples (linear portion of the curve).

3 讨 论

慢病毒载体能够有效感染低分裂潜能细胞，并能稳定长期表达目的蛋白而被广泛应用. 但目前慢病毒载体生产体系产量偏低，难以满足大规模应用. 当前慢病毒载体生产多采用多质粒共感染 293T 细胞收集培养上清获得. 这种系统一般反应 48～96 h，产毒量有限，产量徘徊在 10⁶ tu/ml 数量级^[6~9]，尽管有学者对此类生产系统进行了优化^[10]，但是慢病毒载体的应用仍然需要超速离心富集后使用，因此寻找一种瞬时高效表达系统成为迫切需要.

为了适应规模化应用的需求，本研究小组利用并改造 Moss^[2]发明的 VV/T7 瞬时表达系统，以期获得高拷贝数的慢病毒载体. 本系统蛋白质表达迅速，产量高，原因在于 T7RNA 聚合酶由痘苗病毒指导合成，慢病毒载体的 RNA 由 T7RNA 聚合酶指导合成，使得慢病毒载体的生产不依赖慢病毒天然复制途径，充分发挥痘苗病毒表达系统瞬时高效特点，避开细胞障碍的限制，提高慢病毒载体滴度. 此外，痘苗病毒表达不依赖宿主细胞，不涉及 RNA 从胞核到胞质的转运，这样可以完全去除 rev 蛋白编码序列和 RRE 元件，只保留 HIV-1 来源的 gag-pol 蛋白编码序列，最大限度减少了病毒源性序列，使系统表达效率提高，利于产量提高，本生产系统在经典 VV/T7 的基础上又增加了 2 个在痘苗启动子控制下的真核表达质粒，将慢病毒顺式作用元件与反式作用蛋白分离，避免了在生产过程中 RCV(replication competent virus)的产生，使得生产系统的生物安全性提高，并且本生产系统融合了质粒瞬时表达生产系统中生产周期短，构建省时，灵活度高等优点. 慢病毒载体与辅助痘苗病毒物理特性相差很大，通过简易的过滤装置能够去除绝大部分辅助痘苗病毒，如果随后能够构建成功复制缺陷性辅助痘苗病毒，则此系统生产的慢病毒载体有望能够直接应用于基础研究及临床应用.

本实验室已初步构建此慢病毒载体生产系统，并从 DNA 层面进行了初步的鉴定^[3]，即将培养上清经 RNA 酶和 DNA 酶处理后，去除破碎细胞中释放的载体 RNA、未被 VSVG 包装的慢病毒载体 RNA 以及质粒 DNA 后能够检测出病毒载体的特异性目的条带，这说明，在培养上清中存在慢病毒载体 RNA，而此 RNA 只有被包装蛋白所包裹免于 RNA 酶的降解才能被检测到，提示在培养上清中

存在慢病毒载体颗粒。

慢病毒(以 HIV 为例)感染通常以结构蛋白检测为主, 结构蛋白主要由 env、gag 和 pol 基因编码. gag 编码核心蛋白 p17、p24 和 p15 等, env 编码包膜蛋白 gp120、gp41, pol 编码病毒复制所必需的逆转录酶, 内切核苷酸酶和蛋白整合酶. p24 构成 HIV 颗粒的内壳, p24 抗体在 HIV 感染早期出现, 因此 p24 蛋白在慢病毒感染早期即有显著的检测意义, 并且作为慢病毒载体重要检测指标已得到同行的认可^[1]. 生产细胞培养上清中检测出 p24 蛋白, 提示细胞培养上清中存在慢病毒载体颗粒。

将生产出的慢病毒载体培养上清感染正常的 293T 细胞、HepG2 细胞、Vero 细胞均可以观察到绿色荧光蛋白的表达. 由慢病毒载体本身的特性所决定^[11], 只有在慢病毒载体 RNA 逆转录成 cDNA 并随机整合到宿主 DNA 时, 慢病毒载体才能够表达所编码的外源基因, 因此由实验结果可以得知, 利用本系统制备出的慢病毒载体具有感染性。

痘苗表达系统对于制备细胞系具有一定的选择性, 病毒与制备细胞数比例(MOI)以及质粒用量对于制备细胞系能否达到最佳的生产效率具有重要的影响, 故采用析因方差设计, 分析细胞株类型, 病毒与制备细胞数比例(MOI)以及质粒用量的最佳优化方案, 进而得到体系最佳产量. 目前, 各种生产慢病毒载体系统的产量在未浓缩前基本维持在 $10^6 \sim 10^7$ 数量级之间^[4, 6~8], 而本系统的产量在未浓缩前已经达到 10^8 数量级, 超过同类系统 (Trono 系统) 产量 1 个数量级^[4]。

总之, 我们对此全新的生产制备体系进行了鉴定, 并对本系统产量进行了初步优化, 这为以后该系统的大规模应用提供客观的科学依据. 此外, 该系统已成功应用于重组丙型肝炎病毒颗粒的制备^[12], 作为一个技术平台, 该系统还可以应用于生产其他 RNA 病毒如流感病毒, 鼻病毒等, 在抗病毒药物筛选或疫苗研制方面具有一定的应用前景。

致谢 衷心感谢瑞士日内瓦大学 Trono 实验室惠赠的慢病毒载体相关质粒。

参 考 文 献

- 1 Naldini L, Blomer U, Gallay P, *et al.* *In vivo* gene delivery and stable transduction of non dividing cells by a lentiviral vector. *Science*, 1996, **272** (5259): 263~267
- 2 Moss B. Genetically engineered poxviruses for recombinant gene expression vaccination and safety. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, **93** (21): 11341~11348
- 3 马强, 李明, 吴英松. 以痘苗病毒为辅助病毒生产慢病毒载体的探究. *热带医学杂志*, 2006, **6** (5): 503~506
Ma Q, Li M, Wu Y S. *Journal of Tropical Medicine*, 2006, **6** (5): 503~506
- 4 Zufferey R, Dull T, Mandel R J, *et al.* Self-inactivating lentiviral vector for safe and efficient *in vivo* gene delivery. *J Virol*, 1998, **72** (12): 9873~9880
- 5 Lizee G, Aerts J L, Gonzales M I, *et al.* Real-time quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction as a method for determining lentiviral vector titers and measuring transgene expression. *Hum Gene Ther*, 2003, **14** (6): 497~507
- 6 Ni Y, Sun S, Oparaocha I, *et al.* Generation of a packaging cell line for prolonged large-scale production of high-titer HIV-1-based lentiviral vector. *J Gene Med*, 2005, **7** (6): 818~834
- 7 Farson D, Witt R, McGuinness R, *et al.* A new-generation stable inducible packaging cell line for lentiviral vectors. *Hum Gene Ther*, 2001, **12** (8): 981~997
- 8 Xu K, Ma H, McCown T J, *et al.* Generation of a stable cell line producing high-titer self-inactivating lentiviral vectors. *Mol Ther*, 2001, **3** (1): 97~104
- 9 Logan A C, Nightingale S J, Haas D L, *et al.* Factors influencing the titer and infectivity of lentiviral vectors. *Hum Gene Ther*, 2004, **15** (10): 976~988
- 10 Sena-Estevés M, Tebbets J C, Steffens S, *et al.* Optimized large-scale production of high titer lentivirus vector pseudotypes. *J Virol Methods*, 2004, **122** (2): 131~139
- 11 Hu W S, Temin H. Retroviral Recombination and Reverse transcription. *Science*, 1990, **250** (4985): 1227~1233
- 12 Wu Y S, Feng Y, Dong W Q, *et al.* A vaccinia replication system for producing recombinant hepatitis C virus. *World J Gastroenterol*, 2004, **10** (18): 2670~2674

The Initial Establishment of a New Poxviral/Lentiviral Hybrid System for Efficient Lentiviral Vector Production*

MA Qiang, LI Ming, DONG Wen-Qi, WU Ying-Song**

(College of Biotechnology, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China)

Abstract Efficient gene delivery and sustained gene expression are required for successful human gene therapy. Although viral vectors are considered the most efficient vehicles for gene transfer, currently available viral vectors have not fully achieved these two requirements. Lentiviral vectors (LVs) can integrate into host chromosomes, allowing long-term gene expression, in addition, these vectors are non-toxic and minimally immunogenic since no viral genes are encoded in the vector genome, but are still limited to *in vitro* or *ex vivo* gene delivery because of their relatively low titers using transient transfection experiments. In order to develop an efficient transient transfection method for large-scale production of high titer lentiviral vector stocks, a minimal lentiviral vector producing system based on vaccinia virus that synthesizes T7 RNA polymerase was developed. BHK21 was co-transfected by three main plasmids containing the transducing plasmid pVECRNA, the packaging plasmid pGAGPOL and the envelope plasmid pVSVG, and thereafter infected with the vaccinia vTF-3 containing bacteriophage T7 RNA polymerase gene using Lipofectamin2000™. After 4 days, the culture supernatant of lentiviral vectors was collected, the RNA from the supernatant was examined by the RT-PCR, the protein from the supernatant was examined by Western blot, and the supernatant was used to transfect normal 293T, HepG2 and Vero, which were observed by the immunofluorescence microscopy. The type of cell lines, plasmids dosage and the MOI (the proportion between cell numbers and virus copies) were considered so critical to the output of this system that 3×3×3 factorial design was used to explore the yield optimization of this system. As judged by the results of RT-PCR and the Western blot, lentiviral vectors were found in the culture supernatant; as judged by immunofluorescence with microscopy, 293T, HepG2 and Vero which were transfected by the supernatant expressed the report protein - green fluorescent protein (GFP), the results confirmed the valid infectivity of the lentiviral vector produced by the system. Eventually, the best titers of lentiviral vector stocks was up to 1.3×10^8 tu/ml, which is one order of magnitude higher than the output of classical manufacture system. The new poxviral/lentiviral hybrid system for efficient lentiviral vector production was initially established. It provides the basis for the future development of industrial application.

Key words lentiviral vector, vaccinia virus, gene therapy

*This work was supported by a grant from The National Natural Science Foundation of China (30300316).

**Corresponding author. Tel: 86-20-33354072, 61648321, E-mail: wg@fimmu.com

Received: January 8, 2007 Accepted: January 31, 2007