

二硫键形成促进双载体转断裂 B 区缺失型 凝血因子VIII基因 *

朱甫祥** 杨树德 刘泽隆 缪 静 屈慧鸽 迟晓艳

(鲁东大学生命科学学院, 烟台 264025)

摘要 双载体共转 B 区缺失型凝血因子VIII(BDD-FVIII)重链和轻链基因是克服腺相关病毒载体(AAV)容量限制的一种策略, 但重链分泌的低效率产生链不平衡性, 影响转基因的功效. 假设重、轻链链间二硫键形成可提高双载体转 BDD-FVIII基因的功效, 本文将 BDD-FVIII的重链 A2 区的 Met662 和轻链 A3 区的 Asp1828 突变为 Cys. 双载体培养的 COS-7 细胞共转染突变重链和轻链基因, Western blot 显示细胞内二硫键交联的重、轻链蛋白形成, ELISA 和 Coatest 分析细胞培养上清的 BDD-FVIII重链分泌量和生物活性, 分别为 $(109 \pm 13) \mu\text{g/L}$ 和 $(0.65 \pm 0.12) \text{U/ml}$, 明显高于共转野生型重链和轻链基因细胞 $((71 \pm 11) \mu\text{g/L}$ 和 $(0.35 \pm 0.05) \text{U/ml}$). 结果表明, 链间二硫键形成可提高双载体转 BDD-FVIII基因的功效, 为进一步动物体内运用双 AAV 载体转 BDD-FVIII基因提供了实验依据.

关键词 B 区缺失型凝血因子VIII, 双载体, 转基因, 链间二硫键

学科分类号 Q5, Q78

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2011.00296

甲型血友病是由遗传性和获得性凝血因子VIII (coagulation factor VIII, FVIII)缺陷导致的出血性疾病^[1]. 和目前以血浆源性或重组 FVIII蛋白替代、补充疗法 (该方法治疗费用高, 且有血源性传染病播散风险) 相比, 基因治疗是该病的理想疗法^[2]. 在已开发的基因治疗载体中, 腺相关病毒 (adeno-associated virus, AAV)载体的非致病性、复制缺陷和可介导转基因稳定表达等特点使其在基因治疗中被广泛采用. 但 AAV 载体的容量限制(4.7 kb)使其难以运载较大的 FVIII基因(7 kb), 即使是大小为 4.5 kb 的缩减型的 B 区缺失型 FVIII (B-domain-deleted FVIII, BDD-FVIII)基因, 加上基因表达调控序列后仍超过 AAV 载体的容量上限^[3]. 运用双载体转 FVIII基因是克服 AAV 容量限制的一种策略, 但易于产生链不平衡性问题^[4-5].

为改善重链的分泌性, 本文在重链和轻链中引入证明可形成二硫键的 Cys 突变^[6], 即 Met662→Cys 和 Asp1828→Cys, 观察到双载体共转基因细胞重链分泌的明显改善和生物活性的提高, 为进一步双 AAV 载体动物体内转 FVIII基因提供了实验依据.

1 材料和方法

1.1 质粒和细胞

BDD-FVIII真核表达质粒载体 pCMV-F8 由本室构建并保存. 含有 BDD-FVIII重链、轻链与 split *Ssp* DnaB 蛋白内含子的融合基因表达质粒 pCMV-HCIntN、pCMV-IntCLC 为我们以前工作中构建^[7]. COS-7 细胞购自中国科学院细胞库.

1.2 工具酶和主要试剂

高保真 *Pfu* Turbo DNA 聚合酶购自 Stratagene 公司; DNA 连接酶试剂盒购自 New England Biolabs 公司; Gel Extraction Kit、PCR Purification Kit、

* 山东省自然科学基金(ZR2010CM061), 烟台市科技计划项目(2008152), 教育部留学回国人员科研启动基金项目(20071108)和鲁东大学科研基金项目(LZ20083305)资助项目.

** 通讯联系人.

Tel: 0535-6693825, E-mail: fuxiangmail@163.com

收稿日期: 2011-06-30, 接受日期: 2011-11-21

Spin Miniprep Kit 均为 Qiagen 公司产品; DMEM 和 Opti-MEM 培养基、Lipofectamine 2000 转染试剂盒购自 Invitrogen 公司; 胎牛血清购自 Hyclone 公司; 重组 FVIII 为 BioChain 公司产品; FVIII 的重链单克隆抗体 ESH-5 和 FVIII 轻链单克隆抗体 ESH8 购自 American Diagnostica 公司; HRP 标记的兔抗人 FVIII 多克隆抗体购自 Novus 公司; 羊抗兔 HRP-二抗和 ECL plus Western Blotting Detection 试剂盒购自 GE 公司; 人正常参比血浆为 George King Biomedical 公司产品; FVIII 活性检测的 COATEST SP FVIII 试剂盒购自 Chromogenix 公司. 其他试剂均为国产或进口分析纯.

1.3 真核重组表达质粒的构建

以 BDD-FVIII 重链和轻链与 split *Ssp* DnaB 蛋白内含子融合基因表达质粒 pCMV-HCIntN 和 pCMV-IntCLC 为模板^[7], 用引物对 5' CCGTTTAA-ACCCGCTGATCAG 3' (正向)、5' CTGAAGAGT-AGTACGAGTTATTTTC 3' (反向)和 5' TCAGATC-AAGAGGAAATTGACTATG 3' (正向)、5' ACTA-AAGCAGAATCGCAAAAGGC 3' (反向), 用 *Pfu* Turbo DNA 聚合酶反向 PCR 扩增得到线性化 DNA 片段, 自连接环化后分别为去掉蛋白质内含子编码序列的 BDD-FVIII 重链和轻链表达载体 pCMV-HC 和 pCMV-LC. 为了将重链的 Met662 和轻链的 Asp1828 突变为 Cys, 分别以 pCMV-HC 和 pCMV-LC 为模板, 用引物对 5' TGTGTCTATGA-AGACACACTCACC 3' (正向)、5' TTTGTGTTTG-AAGGTATATCCAG 3' (反向)和 5' TGTGAGTTT-GACTGCAAAGCCTG 3' (正向)、5' TTTAGTGG-GTGCCATATGATG 3' (反向), 用 *Pfu* Turbo DNA 聚合酶反向 PCR 扩增得到线性化的 DNA 片段, 自连接环化后为含 Cys662 突变的重链表达载体 pCMV-C662HC 和含 Cys1828 突变的轻链表达载体 pCMV-C1828LC.

1.4 细胞的培养及基因转染

COS-7 细胞于 5% CO₂、37℃ 细胞培养箱中用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液贴壁培养. 转染前一天用胰蛋白酶消化分散细胞, 按 5×10^5 个/孔用 2 ml DMEM 培养液将细胞转接于 6 孔培养板, 待细胞生长融合至 80% 以上时, 用脂质体 Lipofectamine2000 按试剂盒说明书进行基因转染, 将表达载体 pCMV-C662HC 和 pCMV-C1828LC 各

6 μ g 混合稀释于 250 μ l 的 Opti-MEM 培养液, 与室温放置 5 min 含 20 μ l 脂质体的 250 μ l Opti-MEM 培养液混合后继续室温放置 20 min, 共转染 COS-7 细胞. 用 pCMV-HC 和 pCMV-LC 共转染细胞作为对照. 并用空载体 pcDNA3.1 和 pCMV-F8 分别转染细胞作为阴性对照(Mock)和 BDD-FVIII 表达对照. 培养箱内温育 5 h 后换以 2 ml 新鲜 Opti-MEM 培养液, 继续培养 48 h, 收集培养上清, 加入 40 μ l 混合蛋白酶抑制剂.

1.5 Western blotting 观察转基因细胞的蛋白质表达

用冻融法裂解所收集的转基因细胞, 提取转基因细胞总蛋白, 用 Bradford 法进行蛋白质定量, 取 12 μ g 总蛋白上样, 分别用还原性(加 DTT)和非还原性(不加 DTT)SDS-PAGE 分离蛋白质, 半干电转系统将蛋白质转移至 PVDF 膜, 用 5% 脱脂奶粉溶液室温封闭 2 h, 用 1:1 000 稀释的兔抗人 FVIII 多克隆抗体 37℃ 轻摇孵育 1 h, 再用 HRP-抗兔血清 37℃ 轻摇孵育 1 h, ECL plus 法曝光 X 光胶片.

1.6 ELISA 定量分析转基因细胞培养上清中重链和轻链多肽

按照我们以前建立的链特异性 ELISA 分别检测培养上清中重链和轻链多肽的浓度^[8]. 用 FVIII 重链单抗 ESH5 或轻链单抗 ESH8 包被酶标板, 洗板后加封闭液 37℃ 封闭 2 h, 洗板后加细胞上清样品和标准品 FVIII, 37℃ 温育 1 h, 洗板后加 HRP 标记 FVIII 多抗, 37℃ 温育 1 h 后洗板, 加反应底物 OPD 溶液 37℃ 温育 30 min 进行显色, 用 2 mol/L H₂SO₄ 终止反应, 490 nm 读板. 建立标准曲线, 从标准曲线分别读取重链和轻链多肽的浓度.

1.7 转基因细胞培养上清中凝血生物活性的分析

用 Coatest 发色分析法, 参照文献[9]按试剂盒说明书操作分析细胞培养上清的 FVIII 生物活性. 用 Opti-MEM 培养液稀释正常人参比血浆(FVIII 活性为 1.0 U/ml)成系列浓度, 序列反应后 405 nm 处读取 A 值, 以稀释百分比为横坐标、A₄₀₅ 值为纵坐标分别绘制标准曲线, 由培养上清样品测得的 A₄₀₅ 值从标准曲线读出相应的百分比值, 换算为上清的 FVIII 生物活性.

1.8 实验结果的统计学处理

计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间计量资料比较采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义.

2 结 果

2.1 BDD-FⅧ突变体重链和轻链基因表达载体的构建

全长 FⅧ的分子结构为 A1-A2-B-A3-C1-C2, BDD-FⅧ为去掉其 B 区的大部分 (Ile761 to Asn1639)所得, 我们在以前的工作中, 于 Ser1657 前断裂 BDD-FⅧ为重链和轻链, 分别构建了与蛋

白质内含子融合基因表达质粒 pCMV-HCIntN 和 pCMV-IntCLC^[7]. 本文以 PCR 法去除 pCMV-HCIntN 和 pCMV-IntCLC 的蛋白质内含子序列, 得到重链和轻链表达载体 pCMV-HC 和 pCMV-LC. 用 PCR 方法将 pCMV-HC 中重链的 Met662 和 pCMV-LC 中轻链的 Asp1828 突变为 Cys, 得到 Cys 突变重链和轻链表达载体 pCMV-C662HC 和 pCMV-C1828LC, 通过测序验证突变点. 所构建基因表达载体结构见图 1.

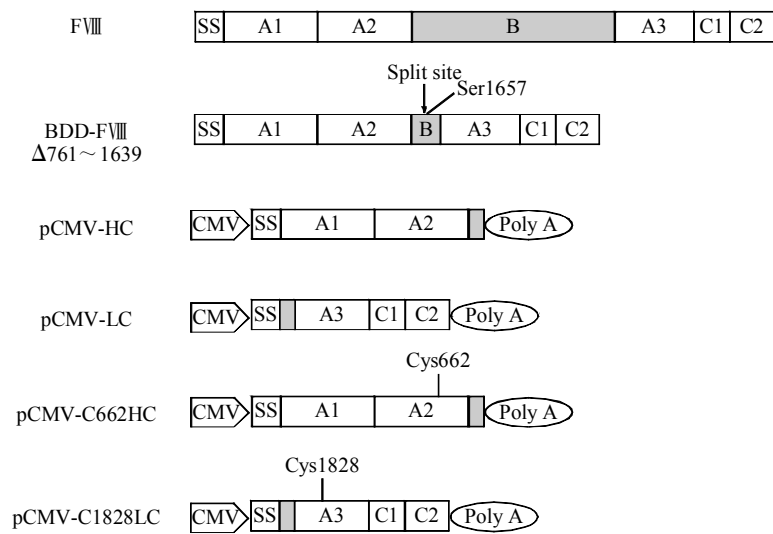


Fig. 1 Schematic illustration of BDD-FⅧ and its heavy and light chain eukaryotic expression vectors

The structural domains of the full-length FⅧ are arranged as A1-A2-B-A3-C1-C2 and the BDD-FⅧ is derived from FⅧ by deleting most of the B-domain from Ile761 to Asn1639. A pair of eukaryotic expression vectors expressing heavy and light chain termed pCMV-HC and pCMV-LC was constructed by splitting BDD-FⅧ before Ser1657 to heavy and light chains and inserting them into eukaryotic expression vector pcDNA3.1(+). The Met662 of heavy chain in pCMV-HCIntN and Asp1828 of light chain in pCMV-IntCLC were mutated to Cys by PCR-directed mutagenesis to produce another pair of expression vector pCMV-C662HC and pCMV-C1828LC. SS: Signal sequence of FⅧ.

2.2 转基因细胞内 BDD-FⅧ重、轻链多肽的表达和二硫键的形成

细胞总蛋白 Western blot 结果显示(图 2), 转 BDD-FⅧ基因阳性对照细胞可见表达的单链 BDD-FⅧ

蛋白质条带, HC 与 LC 基因共转细胞和 C662HC 与 C1828LC 基因共转细胞在还原条件下(加 DTT)可见明显表达的重链和轻链多肽, 从重链多肽的条带呈现出较轻链多肽的条带为强, 提示重链的分泌

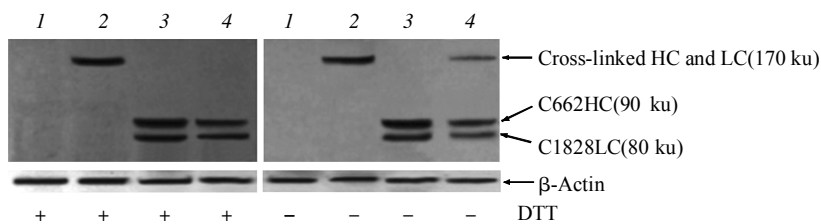


Fig. 2 Western blot of disulfide cross-linked heavy and light chains

Total cellular proteins in cell lysate were resolved by reduced or non-reduced SDS-PAGE (with or without DTT) and probed by FⅧ polyclone antibody. 1: Mock; 2: BDD-FⅧ; 3: HC+LC; 4: C662HC+C1828LC.

性不如轻链, 以 *HC* 与 *LC* 基因共转细胞表现更明显. 在非还原条件下(不加 DTT), 可见 C662HC 与 C1828LC 基因共转细胞呈现二硫键交联的重、轻链二聚体蛋白质条带(cross-linked HC and LC), 大小同转 *BDD-FVIII* 基因对照细胞, 同时也可见未交联的重、轻链多肽(C662HC, C1828LC), 为非共转染细胞表达后分泌和共转细胞的不完全二硫键交联所致, 而共转 *HC* 与 *LC* 基因细胞未见二硫键交联的重、轻链多肽.

2.3 Cys 突变重链分泌性的提高和重、轻链分泌比率不均衡性的改善

Cys 突变重链和轻链共转基因细胞培养上清, 重链特异性 ELISA 结果显示(图 3), 分泌至培养上清的重链浓度为 $(109 \pm 13) \mu\text{g/L}$, 明显高于野生型 *BDD-FVIII* 重链和轻链共转基因细胞的重链分泌量 $((71 \pm 11) \mu\text{g/L})$, $P < 0.05$; 单独转 Cys 突变重链或野生型重链基因细胞的重链分泌量均较低, 分别为 $(23 \pm 9) \mu\text{g/L}$ 和 $(18 \pm 5) \mu\text{g/L}$, 二者之间无明显区别; 转 *BDD-FVIII* 基因细胞的重链分泌为 $(114 \pm 18) \mu\text{g/L}$. 结果表明, 轻链可明显促进重链的分泌(反式促进), 并且对与之有二硫键交联的重链促分泌作用更为显著, 与我们最近应用蛋白质内含子介导的重、轻链间肽键共价连接时轻链对重链分泌的促进作用类似(顺式)^[7].

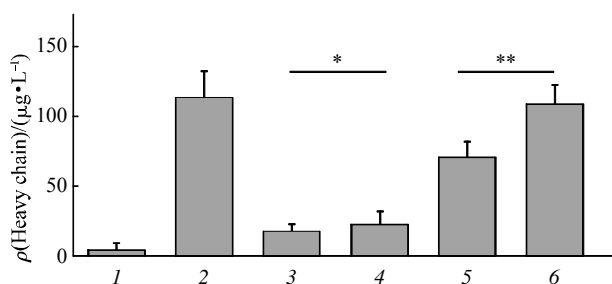


Fig. 3 Heavy chain in culture supernatants secreted by gene transfected cells

The data are represented as $\bar{x} \pm s$, $n = 6$ for each group. * $P > 0.05$, ** $P < 0.05$. 1: Mock; 2: *BDD-FVIII*; 3: *HC*; 4: C662HC; 5: *HC+LC*; 6: C662HC + C1828LC.

以轻链特异性 ELISA 检测共转基因细胞的轻链多肽分泌量, 结果显示见图 4, 单独转 Cys 突变

轻链和野生型轻链基因细胞的轻链分泌量分别为 $(239 \pm 34) \mu\text{g/L}$ 和 $(254 \pm 23) \mu\text{g/L}$, 二者间无明显差别, 但均明显高于相应的重链分泌, 说明相对于低效的重链分泌性, 轻链的分泌十分高效; 与重链共转基因后轻链的分泌量分别为 $(252 \pm 32) \mu\text{g/L}$ 和 $(261 \pm 39) \mu\text{g/L}$, 与单独转轻链基因无明显差别. 共转基因后重、轻链分泌量的比率, Cys 突变重、轻链为 1:2.3, 而野生型重、轻链为 1:3.7, 表明重、轻链间的二硫键形成有利于改善重、轻链分泌的不均衡性.

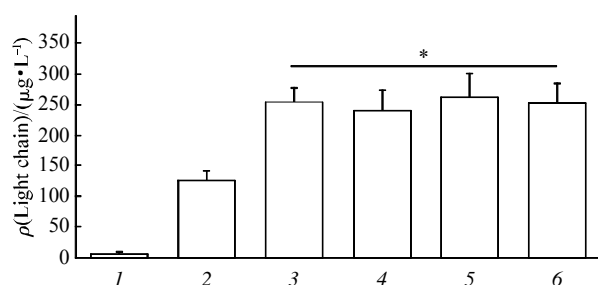


Fig. 4 Light chain in culture supernatants secreted by gene transfected cells

The data are represented as $\bar{x} \pm s$, $n = 6$ for each group. * $P > 0.05$. 1: Mock; 2: *BDD-FVIII*; 3: *LC*; 4: C1828LC; 5: *HC+LC*; 6: C662HC + C1828LC.

2.4 双载体转基因细胞培养上清的凝血生物活性

用 Coatest 生色法测得的双载体共转 Cys 突变重链和轻链基因细胞培养上清的凝血生物活性为 $(0.65 \pm 0.12) \text{ U/ml}$, 明显高于共转野生型重链和轻链基因细胞 $(0.35 \pm 0.05) \text{ U/ml}$, $P < 0.05$, 与转 *BDD-FVIII* 基因对照细胞培养上清的凝血生物活性 $(0.81 \pm 0.13) \text{ U/ml}$ 相近. 上述结果表明, 重、轻链间二硫键的形成, 可提高双载体转基因细胞分泌的凝血生物活性, 改善双载体转 *BDD-FVIII* 基因的功效. 转 *BDD-FVIII* 基因对照细胞分泌的重链和轻链比率相同, 重链或轻链的分泌量均能反映 *BDD-FVIII* 的分泌量, 其中的重链全部(100%)贡献于凝血活性, 按此计算, 共转 Cys 突变的重链和轻链基因细胞分泌重链的 83% 产生凝血活性, 而共转野生型重链和轻链基因的细胞分泌重链的 69% 参与产生凝血活性, 前者产生的无功能性分子的比率较后者低.

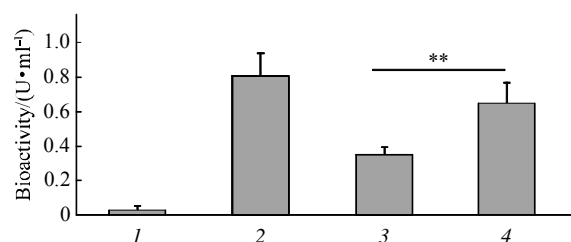


Fig. 5 FVIII bioactivity in culture supernatants of gene transfected cells

The data are represented as $\bar{x} \pm s$, $n = 6$ for each group. $**P < 0.05$. 1: Mock; 2: BDD-FVIII; 3: HC+LC; 4: C662HC+C1828LC.

3 讨 论

研究表明, 在血友病基因治疗研究中, AAV载体可产生肝脏或骨骼肌特异性凝血因子的持续、稳定表达, 显示其独特优势^[10-13]。基于对生理性 FVIII 胞内异源二聚体形成的双载体转 FVIII 重链和轻链基因技术, 为克服 AAV 容量限制提供了依据。甲型血友病大型动物狗在分子水平和表型上与重型甲型血友病患者类似, 被认为是临床前研究甲型血友病治疗的理想动物模型^[14]。最近有人在血友病狗体内用双 AAV 转 FVIII 基因表明, 该方法可诱导机体对治疗前体内已存在的抑制性抗体的耐受^[15]。但双载体技术的突出问题是重链分泌的低效性所致的链不平衡性, 在小鼠体内尤为显著, 轻链分泌量是重链的 10~100 倍^[4-5], 而在狗体内的链不平衡性相对较小, 轻链是重链的 4~8 倍^[6]。由于重、轻链的细胞内表达水平相近, 因此难于分泌的重链淤积胞内, 可能使细胞变得不稳定, 甚或诱导凋亡^[17]; 另一方面, 分泌出胞的多余轻链由于无相应的重链相匹配成为无效分泌。

本文通过 Cys 点突变在重链和轻链间引入二硫键, 通过高效分泌的轻链, 促进与其共价连接重链的分泌, 结果表明, 重链的分泌明显改善, 相应地, 分泌至细胞上清的凝血生物活性显著提高, 与单个载体转 BDD-FVIII 基因细胞相近; 轻链与重链分泌的比率从 3.7:1 变为 2.3:1, 链不平衡性也得到较大缓解, 从重链对凝血活性的贡献看, 有二

硫键为 83%, 而无二硫键为 69%。鉴于双载体转基因中功能性二聚体形成依赖细胞机制, 即二聚体只能在细胞内形成, 转基因的功效率取决于双链基因共转染的效率, 假设两组共转染的效率相同, 重、轻链间二硫键不仅促进重链的分泌, 而且使更多的重链与轻链形成功能性异源二聚体, 表现为更多的重链参与凝血生物活性的形成。另外, 单独转染 Cys 突变的重链和轻链基因细胞混合培养, 培养上清中分泌的重链量或凝血生物活性均无提高, 表明二硫键形成有赖于细胞机制。为提高双载体转全长 FVIII 基因细胞重链的分泌性, 最近我们运用蛋白质内含子介导的蛋白质反式剪接技术, 在重链的 A1 区引入 L303E/F309S 突变, 对重链的分泌性和剪接的全长功能性 FVIII 蛋白具有明显的促进作用^[18]。研究发现, 轻链的酸性区可促进重链分泌^[19], 我们在基于蛋白质剪接的双载体转 FVIII 基因中在重链中附加此酸性区, 证明可剪接 FVIII 蛋白和活性的分泌^[20]。

需要指出的是, 与我们运用蛋白质剪接技术进行的双载体共转 BDD-FVIII 基因中引入了外源多肽蛋白质内含子相比^[7], 本文只是在重、轻链中引入单一点突变, 无外源肽的潜在不利影响, 此为一直显优势。另外, 从转基因效果看, 双载体共转与单独转 BDD-FVIII 基因细胞分泌至培养上清的凝血生物活性相近, 说明链间二硫键形成的双载体转基因功效类似于单独转 BDD-FVIII 基因。二硫键形成是否会影响半胱氨酸突变的二聚体分子的活性, 以及影响的分子机制, 尚需进一步研究, 但本文中参照单独转 BDD-FVIII 基因细胞中重链分泌量与活性关系看, 双载体转基因细胞分泌的凝血活性换算的重链量低于实际重链分泌量, 且并非所有重链均与轻链形成二硫键连接, 存在游离的重链, 而这部分重链并不产生生物活性。本文为进一步在动物体内实验, 运用双 AAV 载体转 Cys 突变 BDD-FVIII 基因、提高基因治疗功效提供了实验依据。

参 考 文 献

- [1] Lenting P J, van Mourik J A, Mertens K. The life cycle of coagulation factor VIII in view of its structure and function. *Blood*, 1998, **92**(11): 3983-3996
- [2] Dooriss K L, Denning G, Gangadharan B, et al. Comparison of factor VIII transgenes bioengineered for improved expression in gene therapy of hemophilia A. *Hum Gene Ther*, 2009, **20**(5): 465-478

- [3] Jiang H, Lillicrap D, Patarroyo-White S, *et al.* Multiyear therapeutic benefit of AAV serotypes 2, 6, and 8 delivering factor VIII to hemophilia A mice and dogs. *Blood*, 2006, **108**(1): 107–115
- [4] Burton M, Nakai H, Colosi P, *et al.* Coexpression of factor VIII heavy and light chain adeno-associated viral vectors produces biologically active protein. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, **96**(22): 12725–12730
- [5] Scallan C D, Liu T, Parker A E, *et al.* Phenotypic correction of a mouse model of hemophilia A using AAV2 vectors encoding the heavy and light chains of FVIII. *Blood*, 2003, **102**(12): 3919–3926
- [6] Gale A J, Radtke K P, Cunningham M A, *et al.* Intrinsic stability and functional properties of disulfide bond-stabilized coagulation factor VIIIa variants. *J Thromb Haemost*, 2006, **4**(6): 1315–1322
- [7] Zhu F X, Liu Z L, Chi X Y, *et al.* Protein trans-splicing based dual-vector delivery of the coagulation factor VIII gene. *Sci China Life Sci*, 2010, **53**(6): 683–689
- [8] Chen L X, Zhu F X, Li J, *et al.* The enhancing effects of the light chain on heavy chain secretion in split delivery of factor VIII gene. *Mol Ther*, 2007, **15**(10): 1856–1862
- [9] Sarkar R, Tetreault R, Gao G, *et al.* Total correction of hemophilia A mice with canine FVIII using an AAV 8 serotype. *Blood*, 2004, **103**(4): 1253–1260
- [10] Niemeyer G P, Herzog R W, Mount J, *et al.* Long-term correction of inhibitor-prone hemophilia B dogs treated with liver directed AAV2-mediated factor IX gene therapy. *Blood*, 2009, **113**(4): 797–806
- [11] Sarkar R, Mucci M, Addya S, *et al.* Long-term efficacy of adeno-associated virus serotypes 8 and 9 in hemophilia a dogs and mice. *Hum Gene Ther*, 2006, **17**(4): 427–439
- [12] Jiang H, Lillicrap D, Patarroyo-White S, *et al.* Multiyear therapeutic benefit of AAV serotypes 2, 6, and 8 delivering factor VIII to hemophilia A mice and dogs. *Blood*, 2006, **108**(1): 107–115
- [13] Arruda V R, Stedman H H, Haurigot V, *et al.* Peripheral transvenular delivery of adeno-associated viral vectors to skeletal muscle as a novel therapy for hemophilia B. *Blood*, 2010, **115**(23): 4678–4688
- [14] Brinkhous K M, Davis P D, Graham J B, *et al.* Expression and linkage of genes for X-linked hemophilias A and B in the dog. *Blood*, 1973, **41**(4): 577–585
- [15] Finn J D, Ozelo M C, Sabatino D E, *et al.* Eradication of neutralizing antibodies to factor VIII in canine hemophilia A following liver gene therapy. *Blood*, 2010, **116**(26): 5842–5848
- [16] Sabatino D S, Lange A M, Altynova E S, *et al.* Efficacy and safety of long-term prophylaxis in severe hemophilia A dogs following liver gene therapy using AAV vectors. *Mol Ther*, 2011, **19**(3): 442–449
- [17] Zhang K, Shen X, Wu J, *et al.* Endoplasmic reticulum stress activates cleavage of CREBH to induce a systemic inflammatory response. *Cell*, 2006, **124**(3): 587–599
- [18] Zhu F X, Yang S d, Liu Z L, *et al.* The effect of a secretion-enhanced heavy chain on improving intein-based dual-vector co-delivery of a full-length factor VIII gene. *Chin Sci Bull*, 2011, **56**(2): 158–163
- [19] Chen L X, Lu H, Wang J H, *et al.* Enhanced factor VIII heavy chain for gene therapy of hemophilia A. *Mol Ther*, 2009, **17**(3): 417–424
- [20] 朱甫祥, 杨树德, 刘泽隆, 等. 酸性区 3 融合重链促进基于蛋白质内含子的双载体 B 域缺失型凝血 VIII 转基因表达. *生物化学与生物物理进展*, 2010, **37**(11): 1225–1231
- Zhu F X, Yang S D, Liu Z L, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2010, **37**(11): 1225–1231

Disulfide Cross-linking Enhances Dual-vector Based Delivery of Split B-Domain-deleted Coagulation FactorVIII Gene*

ZHU Fu-Xiang**, YANG Shu-De, LIU Ze-Long, MIAO Jing, QU Hui-Ge, CHI Xiao-Yan

(Life Science College, Ludong University, Yantai 264025, China)

Abstract Co-delivery of B-domain-deleted FVIII(BDD-FVIII) heavy and light chain genes by dual-vector system is one of strategies to overcome packaging constraint of adeno-associated virus vectors (AAV), but leading to chain imbalance because of inefficient secretion of heavy chain. We hypothesize that a disulfide linking between the heavy and light chains can improve the efficacy of dual-vector co-delivery of *BDD-FVIII* gene. Here, we plan to achieve this by making Cys mutations at the Met662 in A2-domain of heavy chain and Asp1828 in A3-domain of light chain. By co-transfecting cultured COS-7 cells transiently with mutant heavy and light chain genes, a disulfide cross-linked heavy and light chain was observed by Western blotting. The secretion of heavy chain and coagulation activity were up to $(109 \pm 13) \mu\text{g/L}$ and $(0.65 \pm 0.12) \text{ U/ml}$ respectively analyzed by ELISA and Coatest method greater than that of two chains of wild-type *BDD-FVIII* gene co-transfected cells($(71 \pm 11) \mu\text{g/L}$ and $(0.35 \pm 0.05) \text{ U/ml}$). It suggests that inter-chain disulfide linking could efficiently improve efficacy of dual-vector delivery of the *BDD-FVIII* gene. It provided evidence for ongoing *in vivo* *BDD-FVIII* gene delivery by dual-AAV vector.

Key words BDD-FVIII, dual-vector, gene delivery, inter-chain disulfide

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2011.00296

*This work was supported by grants from The Natural Science Foundation of Shandong Province (ZR2010CM061), Science and Technology Program of Yantai City (2008152), The Scientific Research Foundation from Education Ministry for the Returned Overseas Chinese Scholars (20071108) and The Scientific Research Foundation of Ludong University(LZ20083305).

**Corresponding author.

Tel: 86-535-6693825, E-mail: fuxiangmail@163.com

Received: June 30, 2011 Accepted: November 21, 2011