

反转录病毒介导的稳定表达 HIV-1 Gag 蛋白和增强型绿色荧光蛋白细胞系的建立

王 婧¹, 李 昌², 李林溪¹, 胡 博¹, 丛艳昭³, 任大勇¹, 王卓越¹,
杜寿文¹, 金宁一^{1,2*}

(1. 吉林大学 畜牧兽医学院, 长春 130062; 2. 军事医学科学院 全军基因工程重点实验室, 长春 130062; 3. 延边大学 农学院, 龙井 133400)

摘 要: 本研究旨在建立中国流行株人免疫缺陷病毒(HIV-1)衣壳蛋白(Gag)哺乳动物稳定表达细胞系。将 HIV-1 核心蛋白基因 *gag* 和增强型绿色荧光蛋白基因 *EGFP* 依次串联插入反转录病毒载体 pFB-neo, 构建重组反转录病毒载体 pFB-*gag-EGFP*, 并与含有辅助病毒 *gag-pol* 和 *env* 基因的质粒 pVPack-GP、pVPack-10A1 共转染 HEK293T 细胞, 包装出的反转录病毒感染小鼠骨髓瘤细胞 SP2/0。荧光显微镜下观察绿色荧光蛋白 EGFP 表达, 验证 HIV-1 核心蛋白 Gag 表达, G418 抗性筛选阳性细胞。结果表明, HIV-1 核心蛋白 Gag 和增强型绿色荧光蛋白可在 SP2/0 细胞中稳定表达, HIV-1 核心蛋白 *gag* 基因稳定表达细胞系成功建立, 为抗 AIDS 治疗用基因工程制剂及靶向药物的活性检测提供了理想方法。

关键词: 反转录病毒载体; 人免疫缺陷病毒; 核心蛋白; 增强型绿色荧光蛋白; 小鼠骨髓瘤细胞 SP2/0

中图分类号: R512.91

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2011)02-0203-07

Continuously Expressing HIV-1 Gag and EGFP by Retroviral Vector Induced SP2/0 Cell Lines

WANG Jing¹, LI Chang², LI Lin-xi¹, HU Bo¹, CONG Yan-zhao³,
REN Da-yong¹, WANG Zhuo-yue¹, DU Shou-wen¹, JIN Ning-yi^{1,2*}

(1. College of Animal Science and Veterinary Medicine, Jilin University, Changchun 130062, China; 2. Genetic Engineering Laboratory of PLA, Academy of Military Medical Sciences of PLA, Changchun 130062, China; 3. College of Agriculture, Yanbian University, Longjing 133400, China)

Abstract: To construct a retroviral vector mediated mammalian cell expression cell line of the human immunodeficiency virus (HIV-1) core protein, the recombinant retroviral vector pFB-*gag-EGFP* was constructed by inserting core protein gene *gag* of HIV-1 and enhanced green fluorescent protein gene *EGFP* into pFB-neo by turns. The recombinant retroviral vector, the pVPack-GP plasmid containing the helper virus *gag-pol* gene and pVPack-10A1 plasmid containing *env* gene were cotransfected into packaging cell line HEK-293T with liposome-mediated transduction, and then the recombinant retrovirus was collected and infected SP2/0 cells. The green fluorescent protein was observed under fluorescence microscope, and the expression of core protein Gag of HIV-1 was verified. The resistance cells were screened by G418. The core protein Gag of HIV-1 and green fluorescent protein could express in SP2/0 cells, and the mammalian cell line of the

收稿日期: 2010-08-02

基金项目: 重大传染病专项(2008ZX10004-015); 军内十一五科技攻关项目(06G127); 吉林省高新技术产业发展项目(2010); 长春市科技特派员行动计划(09KT04)

作者简介: 王 婧(1984-), 女, 湖北襄樊人, 硕士研究生, 主要从事动物病毒学研究, E-mail: jennywang0710@163.com

* 通讯作者: 金宁一, E-mail: ningyij@yahoo.com

core protein gene *gag* of HIV-1 had been constructed successfully, which laid a mouse cell model of activity assay of anti-AIDS genetic engineering therapeutic agents and targeted drugs.

Key words: retroviral vector; HIV-1; core protein; enhanced green fluorescent protein; SP2/0 cells

艾滋病 (Acquired Immunodeficiency Syndrome, AIDS) 是当前威胁人类生命健康与全球公共卫生安全的重大问题, 人免疫缺陷病毒 (Human Immunodeficiency Virus, HIV) 为其主要病原。开发安全而有效的 HIV-1 疫苗无疑是控制全球范围艾滋病流行的有效手段, 但迄今仍无有效的 HIV-1 疫苗问世。HIV-1 复杂的变异性, 使病毒获得规避适应性免疫反应的能力, 导致体液免疫应答水平下降, 早期建立潜伏的病毒储库, 以及缺乏明确的免疫保护相关性等都是对疫苗开发的重要阻碍^[1]。靶向药物导向治疗是当前针对肿瘤治疗发展起来的新兴领域, 由于其具有特异、高效, 可定向清除病毒感染细胞储存池等特点, 从而近年来也将该技术应用到诸如 AIDS 等慢性疾病的治疗, 并取得了一定的成绩^[2]。但由于缺少简便有效的测试模型来评价靶向药物的实际效果, 从而限制了其进一步发展。

核心蛋白 Gag 是构成 HIV-1 病毒粒子的内部骨架, 其氨基酸序列在同属的病毒间比较保守, 具有相似的抗原性, Gag 蛋白的编码基因为 *gag*^[3]。本研究以中国流行株 HIV-1 *gag* 基因为研究对象, 使用在莫罗尼小鼠白血病病毒 (Moloney Murine Leukemia Virus, MMLV) 基础上构建的反转录病毒载体系统。构建了含有 *gag* 基因和增强型绿色荧光蛋白基因 *EGFP* 串联的反转录病毒载体, 通过与含有辅助病毒的 *gag-pol* 和 *env* 基因的质粒 pVPack-GP、pVPack-10A1 共转染 HEK293T 细胞重组包装出反转录病毒^[4], 进一步感染小鼠骨髓瘤细胞 SP2/0, 通过观察串联表达的 EGFP 蛋白的绿色荧光指示 *gag* 基因在 SP2/0 小鼠骨髓瘤细胞的表达情况^[5], G418 抗性筛选出表达 Gag 蛋白的稳定细胞系。该研究将为抗 AIDS 治疗用基因工程制剂或靶向药物的活性检测提供良好方法^[6]。

1 材料与方 法

1.1 载体、菌株及试剂

质粒 pVAXI-EGFP、pKS-*gag*、大肠杆菌菌株 DH5 α 、HEK293T 细胞由本室保存, SP2/0 细胞为吉林大学畜牧兽医学院免疫与微生物实验室赠送。

反转录病毒表达系统包括质粒 pFB-*neo*、pVPack-GP 和 pVPack-10A1 购自德国默克公司。引物合成、各种核酸内切酶、连接酶购自大连 TaKaRa 公司。脂质体 LipofectamineTM 2000 购自 Invitrogen 公司, Polybrene 购自 Sigma 公司, 细胞培养相关试剂购自 GIBCO 公司。质粒提取、基因组提取、凝胶回收试剂盒购自 Axygen 公司, 其他试剂均为国产分析纯。

1.2 重组质粒 pFB-*gag*-EGFP 的构建

以 pVAX-EGFP 为模板, 通过 PCR 扩增 *EGFP* 基因片段。根据本实验室已有的 *EGFP* 序列设计引物, 上游引物 P1 (5'-GGGCGGCCGCATCGAT-AGAAGAAAGAGAGCCACCATGGTGAGCAA-3', 划线部分为 *Not* I 与 *Cla* I 酶切位点, 中部为弗林蛋白酶切割位点 RRKR: AGAAGAAAGAGA), 下游引物 P2 (5'-GGGCGGCCGCTTACTTGTA-CAGCTCGTCC-3', 划线部分为 *Not* I 酶切位点)。扩增片段大小为 762 bp, 扩增产物进行回收, 纯化。扩增后的 *EGFP* 编码基因片段连接到 pMD18-T 上得到 pMD-EGFP, 经 *Not* I 单酶切鉴定, 并送华大中天生物技术有限公司测序鉴定。同时, 用 *Not* I 酶切质粒 pFB-*neo*、pMD-EGFP, 回收线性化载体 pFB-*neo* 和 *EGFP* 片段。将回收的目的片段和线性化载体使用 T4 DNA 连接酶进行连接, 转化大肠杆菌 DH5 α 。提取质粒后用 *Not* I 进行单酶切鉴定, 得重组质粒 pFB-EGFP。用 *Cla* I 单酶切进行正反向鉴定, 正向连接酶切产物含有 1.3 kb 左右的目的片段, 为所需; 而反向连接酶切产物为 700 bp 左右的片段。

以质粒 pKS-*gag* 为模板, 通过 PCR 扩增 *gag* 片段。依据本室扩增的 HIV-1 *gag* 基因序列设计 PCR 扩增引物, 上游引物 P3 (5'-GGGAATTCGC-CACCATGGGTGCGAGAGCGTCA-3', 划线部分为 *Eco*R I 酶切位点并遵守 Kozak 规则), 下游引物 P4 (5'-GGGATCC TTGTGACGAGGGGTCGTTG-3', 划线部分为 *Bam*H I 酶切位点并去除终止密码子)。扩增片段大小为 1 533 bp, 扩增产物进行回收, 纯化。*gag* 片段连接到 pMD18-T 克隆载体上

获得 pMD-*gag*, *EcoR* I 和 *Bam*H I 双酶切初步鉴定后,送华大中天生物技术有限公司进行测序。同时,*EcoR* I 和 *Bam*H I 双酶切质粒 pFB-EGFP、pMD-*gag*, 分别回收线性化载体 pFB-EGFP 和目的

片段 *gag*。将回收的目的片段和线性化载体使用 T4 DNA 连接酶进行连接,转化大肠杆菌 DH5 α , 提取质粒后,*EcoR* I 和 *Bam*H I 双酶切鉴定重组质粒 pFB-*gag*-EGFP。图 1 是各载体的模式图。

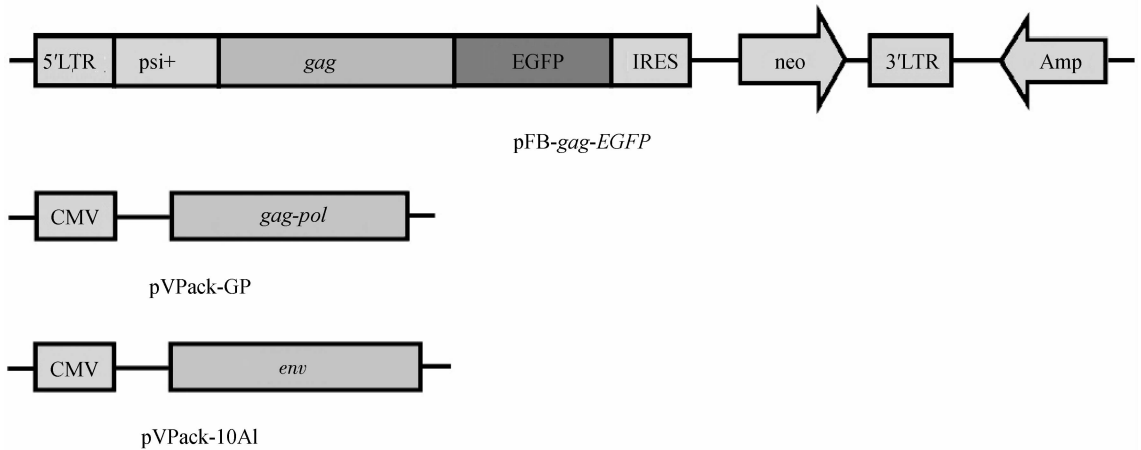


图 1 pFB-*gag*-EGFP 载体和辅助载体 pVPack-GP、pVPack-10A1 示意图
Fig. 1 pFB-*gag*-EGFP, pVPack-GP and pVPack-10A1 vector diagram

1.3 重组反转录病毒的包装

取对数生长期的 HEK293T 细胞接种于 6 孔板内,待细胞 60%~70% 融合,用脂质体转染法将 pFB-*gag*-EGFP、pVPack-GP 和 pVPack-10A1 三质粒共转染至 HEK293T 细胞。共转染方法:将 pFB-*gag*-EGFP、pVPack-GP 和 pVPack-10A1 质粒各 2 μ g 分别加入 50 μ L 无血清、无抗菌素的 opti-MEM 培养液中,轻轻混匀,室温静置 5 min;将 3 份 3 μ L LipofectamineTM 2000 脂质体分别加入 50 μ L 无血清、无抗菌素的 opti-MEM 培养液中,轻轻混匀,室温静置 5 min;将含有 3 种质粒的培养液与含有脂质体的培养液分别混合,轻轻混匀,室温静置 20 min,即形成 DNA-LipofectamineTM 2000 复合物。将 3 种 DNA-LipofectamineTM 2000 复合物混合,补加 opti-MEM 培养液至 800 μ L,缓缓加入细胞孔中即转染开始。转染 4 h 后培养体系更换含 10% 胎牛血清的 DMEM 完全培养液。转染 72 h 后,收集细胞培养上清,0.45 μ m 滤膜过滤,-80 $^{\circ}$ C 冻存备用。

1.4 重组反转录病毒对 SP2/0 细胞的感染

将单层铺满细胞瓶的 SP2/0 细胞含 10% 胎牛血清的 RPMI1640 悬浮细胞,以 $1 \times 10^6 \cdot \text{mL}^{-1}$ 浓度接种于 6 孔板,培养于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱,待细胞密度达到 50%~60% 时,弃去培养基,加入重组病毒液 2 mL 和终质量浓度为 8 mg \cdot L⁻¹ 的 Poly-

brene 促进感染,8 h 后更换 RPMI1640 完全培养液恢复细胞状态^[7]。

1.5 表达 *gag* 基因的 SP2/0 细胞模型的筛选

重组反转录病毒感染 SP2/0 细胞 2 d 后,显微镜下观察 SP2/0 细胞贴壁生长布满细胞底部板,在荧光显微镜上观察 EGFP 的表达情况,以绿色荧光为标志评价 *gag* 基因是否表达。取在被重组反转录病毒感染 48 h 后显示绿色荧光的 SP2/0 细胞,加入 G418(终浓度 600 μ g \cdot mL⁻¹) 进行抗性筛选,每 24 h 换液 1 次,连续筛选 10~14 d。

1.6 表达 *gag* 基因的 SP2/0 细胞模型的 PCR 和 RT-PCR 鉴定

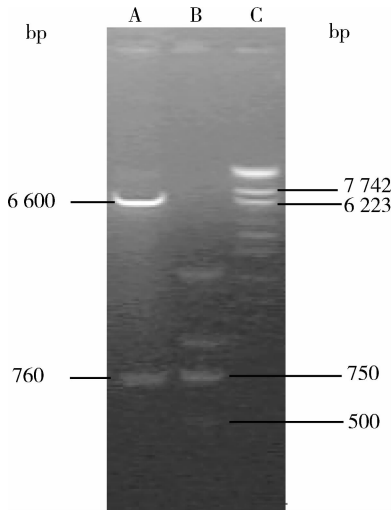
以阳性 SP2/0 细胞基因组 DNA 为模板,P3、P4 为引物进行 PCR 扩增 *gag* 片段,琼脂糖凝胶电泳检测,以证明外源基因整合进细胞基因组。使用预冷 PBS 清洗病毒感染后的 SP2/0 细胞 2 次,加入 1 mL Trizol,按照 Trizol 试剂说明书操作提取细胞总 RNA,立即依照反转录试剂盒说明,反转录 RNA 为 cDNA。以 cDNA 为模板,P3、P4 为引物对 *gag* 片段进行 PCR 扩增,琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物,以在转录水平上检测 *gag* 基因的表达。

2 结果

2.1 重组质粒酶切鉴定

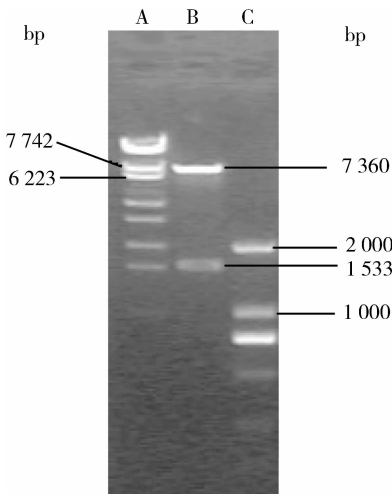
EGFP 与 *gag* 基因测序,序列核苷酸同源性达

98%以上,氨基酸同源性达 100%,表明扩增成功。重组质粒 pFB-EGFP 经限制性内切酶 *Not* I 酶切后,应产生 6.6 kb 和 760 bp 左右的片段,结果(图 2)显示重组质粒酶切片段大小和理论值一致,表明重组质粒构建正确。重组质粒 pFB-gag-EGFP 经限制性内切酶 *Eco*RI 和 *Bam*HI 酶切后应产生 7.3 kb 和 1 533 bp 左右片段(图 3),结果显示重组质粒酶切片段大小和理论值一致,表明构建正确。



A. *Not* I 酶切产物(6.6 kb 和 760 bp); B. DL2000 DNA 相对分子质量标准; C. λ -*Eco*T14 I 相对分子质量标准

图 2 重组质粒 pFB-EGFP 双酶切鉴定琼脂糖凝胶电泳结果
Fig. 2 The identification of pFB-EGFP recombinant vector by enzyme digestion



A. λ -*Eco*T14 I 相对分子质量标准; B. *Eco*RI、*Bam*HI 酶切产物(7.3、1.5 kb); C. DL2000 DNA 相对分子质量标准

图 3 重组质粒 pFB-gag-EGFP 双酶切鉴定琼脂糖凝胶电泳结果
Fig. 3 The identification of pFB-gag-EGFP recombinant vector by enzyme digestion

2.2 重组质粒共转染 HEK293-T 细胞

重组质粒 pFB-gag-EGFP、pVPack-GP 和 pVPack-10A1 共转染 HEK293T 细胞,72 h 后在荧光显微镜下观察。pFB-gag-EGFP 在 Gag 蛋白编码基因后连有 EGFP,在细胞内表达的蛋白末端会带上绿色荧光蛋白,结果在荧光显微镜下出现绿色荧光,表明重组反转录病毒载体 pFB-gag-EGFP 中的 gag 和 EGFP 能够在 HEK293T 细胞中表达。结果如图 4 所示。

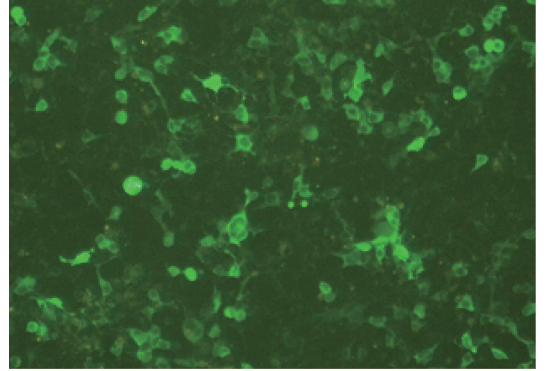


图 4 HEK293T 细胞转染 72 h 后荧光显微镜下观察结果(84 \times)

Fig. 4 Florescence microscope picture of HEK293 cells 72 h after retrovirus transfection(84 \times)

2.3 重组反转录病毒感染 SP2/0 细胞

重组病毒液感染 SP2/0 宿主细胞,72 h 后在荧光显微镜下观察。结果在荧光显微镜下看到绿色荧光,表明重组病毒对 SP2/0 细胞具有感染性,gag 和 EGFP 能够在宿主细胞中表达。结果如图 5 所示。

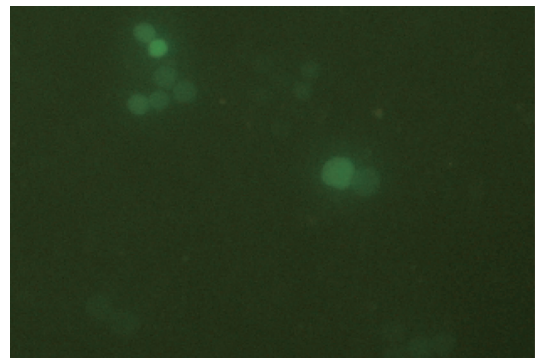


图 5 重组病毒感染 SP2/0 细胞 72 h 荧光显微镜下观察结果(166 \times)

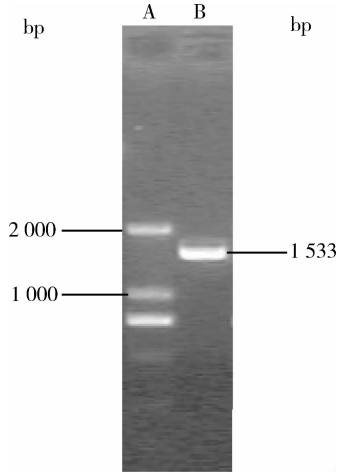
Fig. 5 Florescence microscope picture of SP2/0 cells 72 h after virion infection (166 \times)

2.4 gag 基因整合 SP2/0 细胞基因组检测结果

提取筛选的阳性细胞的基因组 DNA,用引物

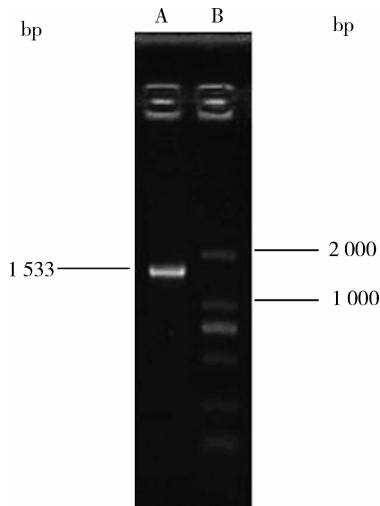
P3、P4 对 *gag* 基因进行 PCR 扩增, *gag* 基因的片段全长 1 533 bp, 从琼脂糖凝胶电泳(图 6)中可以看出, 细胞的基因组 DNA 中可扩增出 *gag* 片段, 说明目的基因已经整合到 SP2/0 细胞的基因组中。

为了进一步证实 Gag 蛋白的稳定表达体系建立成功, 抽提阳性细胞的总 RNA, 使用 RT-PCR 方法检测细胞中 *gag* 基因整合后的转录水平。RT-PCR 产物琼脂糖凝胶电泳结果如图 7 显示, SP2/0 细胞中可以检测到 *gag* 基因的转录。



A. DL2000 DNA 相对分子质量标准; B. *gag* PCR 产物
A. DL2000 DNA Marker; B. PCR product of *gag*

图 6 *gag* 基因整合 SP2/0 细胞基因组 PCR 鉴定
Fig. 6 The identification of *gag* gene integrated into the genomes of SP2/0 by PCR



A. *gag* RT-PCR 产物; B. DL2000 DNA 相对分子质量标准
A. RT-PCR product of *gag*; B. DL2000 DNA Marker

图 7 *gag* 基因总 RNA RT-PCR 鉴定
Fig. 7 The identification of *gag* gene of the whole RNA by RT-PCR

3 讨论

近年来全球 HIV 感染者已增至 3 320 多万, 而且该数字仍在快速攀升, 专家预测, 若不加以有效控制, 2020 年 HIV 感染人数将有可能突破 2 亿^[1]。如此庞大的感染人群加之 HIV 特殊的传播方式, 使得寻找治疗 HIV 感染的有效方法日益迫切。本课题组借鉴肿瘤治疗和艾滋病治疗领域的最新成果, 以 HIV 建立感染及致病机制为基础, 开展了系列抗 HIV 免疫毒素与导向药物的构建和研究工作^[8-9], 为 AIDS 治疗提供新理念、开辟新领域。但由于缺少理想的导向制剂评价和测试模型, 抗 AIDS 导向治疗的作用机制尚不明晰, 限制了该工作进一步推向深入。

为了对 HIV-1 疫苗或药物进行评价, 获得高效、稳定表达 HIV-1 蛋白的基因工程细胞系是其中至关重要的环节。本课题组曾利用 pDisplay 真核表达载体系统, 构建了能够表达 HIV-1 膜蛋白 Gp120 的细胞模型, 在细胞长期传代培养中, 整合至宿主细胞基因组中的目的基因会出现部分或全部缺失的现象, 具体表现为随着传代次数增加, 表达目的蛋白的阳性细胞的比例逐渐减少。本研究选用反转录病毒载体系统, 反转录病毒表达系统是近几年发展起来的一种高效表达系统, 为获得高效、稳定表达外源蛋白的基因工程细胞系提供了新的有效技术途径^[10]。与其它构建高效表达外源蛋白的细胞系的技术方法相比, 反转录病毒表达系统可通过长末端重复序列(long terminal repeat, LTR)准确整合到细胞中, 遗传稳定性高, 避免了质粒转染或显微注射产生的串联序列造成的缺失和重组^[11]。而且病毒感染宿主细胞范围广, 并可根据宿主选择不同的系统^[12], 有利于构建稳定传代的细胞系。对于构建一个重组反转录病毒来说, 形成的重组病毒必须具有感染性, 否则所构建的系统便失去了意义, 并不是所有的 Gag 和 Env 蛋白相互作用都能形成有效的重组病毒颗粒, 作者选择使用在莫罗尼小鼠白血病病毒(MMLV)基础上构建的反转录病毒载体系统, 由 MMLV 的顺式(cis)作用元件(包括 LTR、包装信号等)载体 pFB-neo, 插入目的基因 *gag*、EGFP 和抗性基因构成重组反转录病毒载体, 表达结构蛋白的 *gag-pol* 和 *env* 基因分别克隆到表达载体 pVPack 中, 构成结构蛋白(*gag-pol*)表达载体 pVPack-GP 和囊膜(*env*)表达载体 pVPack-10A1,

这 2 个表达质粒都不含 LTR 和包装信号。这 3 个质粒在共转染包装细胞后,能表达病毒结构蛋白和包装信号,使反转录病毒顺利包装,从而组成反转录病毒包装系统。通过此法能高效稳定地产生能感染靶细胞的复制缺陷型病毒颗粒,与反转录病毒载体同源重组形成野生型病毒(RCR)的风险更小,大大提高了生物安全性问题。在这样一套反转录病毒载体系统中,通过质粒的共转染将外源基因传递到包装细胞中,收获重组病毒,用重组病毒感染靶细胞,外源基因就随着病毒 DNA 整合到细胞染色体中。重组病毒感染 SP2/0 细胞后,在 SP2/0 细胞中能够检测到目的蛋白的表达,表明病毒能够进入宿主细胞,并能整合到细胞基因组中。

增强型绿色荧光蛋白受到紫外或蓝光激发时能发射出绿色荧光,便于荧光显微镜观察和流式细胞仪分选^[13]。普通的反转录病毒载体抗性基因筛选需要 10~14 d,而加入绿荧光蛋白基因后,可大大缩短筛选周期^[5]。本试验在反转录病毒载体 pFB-gag-EGFP 的构建中,将中国流行株 HIV-1 Gag 蛋白编码基因与 EGFP 编码基因串联,通过观察绿色荧光的强弱来筛选 Gag 蛋白表达量高的细胞,通过观察绿色荧光和抗性基因筛选相结合的方法,就能有针对性地快速筛选到目的蛋白高表达的细胞。

弗林蛋白酶(Furin)是真核生物细胞中一种重要的内切蛋白酶。Furin 能识别特定的氨基酸序列,在内质网-高尔基体中经 2 次自剪切活化后,对分泌途径中许多重要的多肽和蛋白的前体进行剪切加工,使之具有生物活性^[14]。刘珊等在构建稳定表达乙脑病毒结构蛋白的细胞系时,病毒 ME 蛋白在翻译后得不到正确加工,不能正常释放出细胞外,故病毒蛋白在细胞中积累,对宿主细胞造成一定的细胞毒性^[15],类似的试验结果也出现在其他研究报告中,Kojima 等^[16]在 PrM 蛋白 Furin 切割位点处进行了 1 个氨基酸的位点的改变,转染 CHO-K1 细胞,建立了持续产生 JEV 病毒颗粒的 F 细胞系。本项研究中,作者在 gag 基因和 EGFP 之间设计弗林蛋白酶切割位点(RRKR:AGAAGAAAGAGA),Furin 在分泌途径中识别并切割前体 Gag 蛋白,防止 Gag 蛋白与 EGFP 形成融合蛋白,并对 Gag 蛋白进行剪切加工,使之具有生物学活性。同时,在设计 gag PCR 扩增引物时,上游遵守 Kozak 规则中起始密码子的 3'位的 A 对翻译效率非常重要,添加序列 GCCACC^[17],改造后的重组质粒 pFB-gag-EGFP

转染 HEK293T 细胞后,通过荧光图片可以看到病毒的包装效果较好。

4 结 论

本研究通过反转录病毒载体系统,构建了可稳定表达 HIV-1 Gag 蛋白和 EGFP 的 SP2/0 细胞系。这一细胞模型具有用于评价抗 HIV 导向制剂可行性和有效性的潜力,为导向制剂的有效评价和进一步推向临床提供了方便的实用验证手段,同时也为其他抗 HIV 药物或治疗性疫苗的研制提供了可借鉴的研究思路和技术平台。

参考文献:

- [1] BAROUCH D H. Challenges in the development of an HIV-1 vaccine[J]. *Nature*, 2008, 455(7213): 613-619.
- [2] 李 昌, 金宁一, 胡宁宁, 等. 表达中国流行株 HIV-1 gp120 外膜蛋白靶细胞模型的建立[J]. *中国生物工程杂志*, 2008, 28(4): 12-16.
- [3] SANDRIN V, MURIAUX D, DARLIX J L, et al. Intracellular trafficking of Gag and Env proteins and their interactions modulate pseudotyping of retroviruses[J]. *J Virol*, 2004, 78(13): 7153-7164.
- [4] MCINTYRE C, DERRICK ROBERTS A L, RANIERI E, et al. Lentiviral-mediated gene therapy for murine mucopolysaccharidosis type IIIA[J]. *Mol Genet Metab*, 2008, 93(4): 411-418.
- [5] 李 炯, 刘艳红, 安芳兰, 等. 逆转录病毒载体介导的蹄疫病毒衣壳前体基因和绿色荧光蛋白基因在 BHK-21 细胞中的表达[J]. *畜牧兽医学报*, 2009, 40(3): 376-382.
- [6] LEMIALE F, KOROKHOV N. Lentiviral vectors for HIV disease prevention and treatment[J]. *Vaccine*, 2009, 27(25-26): 3443-3449.
- [7] 刘朝辉, 杨 宇, 庄鹏辉, 等. 反转录病毒载体介导的 EGFP 基因在 SK2N2SH 神经母细胞瘤细胞中的表达[J]. *西安交通大学学报(医学版)*, 2007, 28(1): 10-12.
- [8] 李 昌, 王 宏, 金宁一, 等. 新型抗 HIV-1 重组导向制剂 SL41 在毕赤酵母中的表达及活性实验[J]. *高等学校化学学报*, 2007, 28(2): 1493-1496.
- [9] WANG H W, COLE D, JIANG W Z, et al. Engineering and functional evaluation of a single-chain antibody against HIV-1 external glycoprotein gp120 [J]. *Clin Exp Immunol*, 2005, 141(1): 72-80.
- [10] PARVEEN Z, MUKHTAR M, GOODRICH A, et

- al. Cross-packaging of human immunodeficiency virus type 1 vector RNA by spleen necrosis virus proteins; construction of a new generation of spleen necrosis virus-derived retroviral vectors[J]. *J Virol*, 2004,78(12):6480-6488.
- [11] LEWINSKI M K, YAMASHITA M, EMERMAN M, et al. Retroviral DNA integration; viral and cellular determinants of target-site selection[J]. *PLoS Pathog*, 2006,2(6):e60.
- [12] VIJAYA S, STEFFEN D L, ROBINSON H L. Acceptor sites for retroviral integrations map near DNase I-hypersensitive sites in chromatin[J]. *J Virol*, 1986,60(2):683-692.
- [13] TOMIOKA R. Expression of EGFP by adenovirus-mediated gene transfer in the central nervous system [J]. *Methods Mol Biol*, 2009,515:97-106.
- [14] DIEDERICH S, DIETZEL E, MAISNER A. Nipah virus fusion protein: influence of cleavage site mutations on the cleavability by cathepsin L, trypsin and furin[J]. *Virus Res*, 2009,145(2):300-306.
- [15] 刘 珊,黄 莺,杨 鹏,等. 稳定表达乙脑病毒结构蛋白的细胞系的建立[J]. *病毒学报*, 2009,25(4):279-285.
- [16] KOJIMA A, YASUDA A, ASANUMA H, et al. Stable high-producer cell clone expressing virus-like particles of the Japanese encephalitis virus e protein for a second-generation subunit vaccine[J]. *J Virol*, 2003, 77 (16):8745-8755.
- [17] DU M, YE L, LIU J, et al. Enhancement of GFP expression by Kozak sequence +4G in HEK293 cells [J]. *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao*, 2008, 24 (3):491-494.

(编辑 白永平)