生命科学实验指南系列

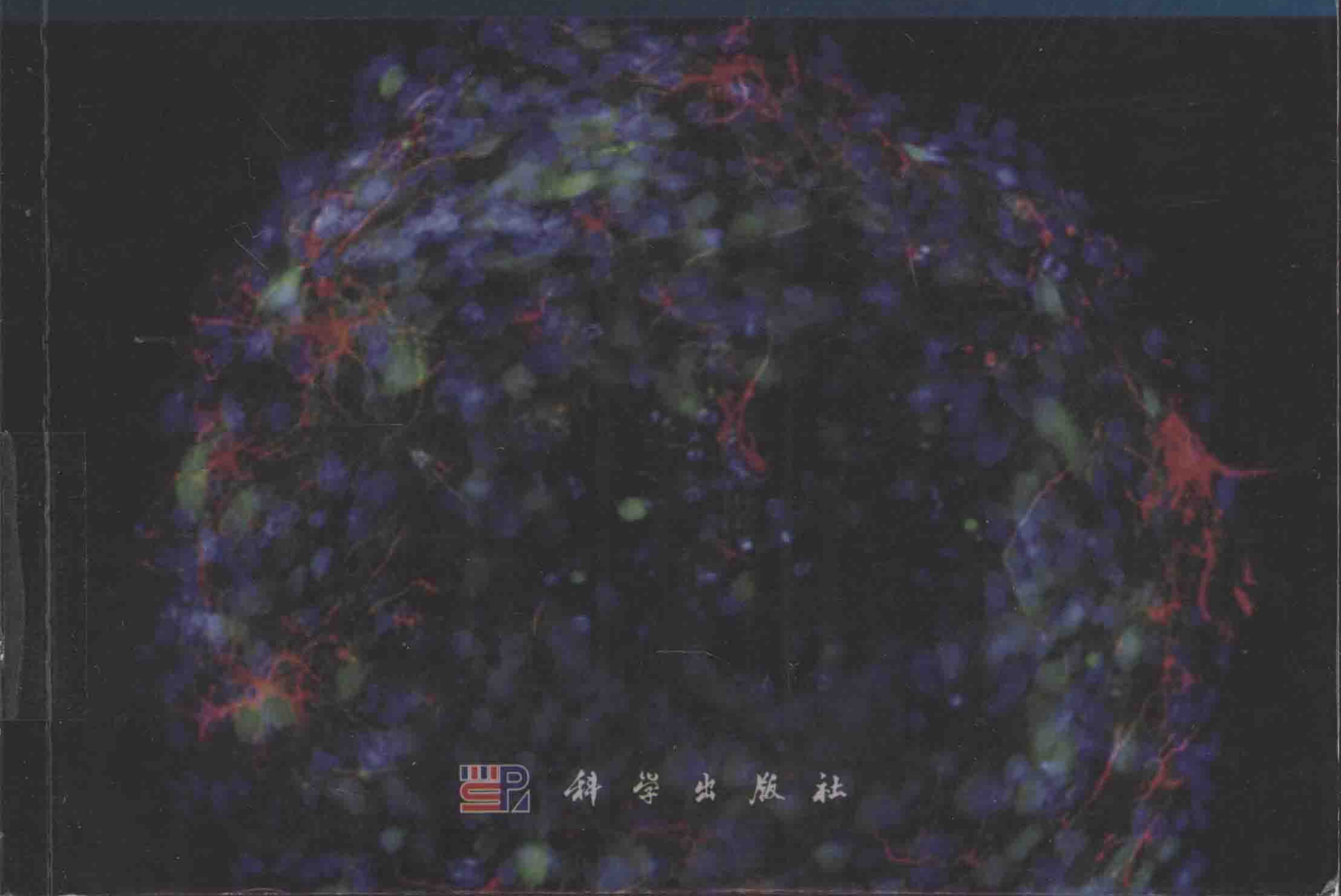
Gene Transfer

Delivery and Expression of DNA and RNA
a Laboratory Manual

基因转移

—— DNA 和RNA 的转运与表达

[美] T.畅弗里德曼　J.畅罗西　主编
殷勤伟　等　译



科学出版社

生命科学实验指南系列·典藏版

基因转移

——DNA和RNA的转运与表达

〔美〕T. 弗里德曼　J. 罗西　主编

殷勤伟 等　译

科学出版社

北京

图字：01-2007-4868 号

内 容 简 介

“生命科学实验指南系列”图书均出自名家，包括众多从 Cold Spring Harbor Laboratory Press 和 John Wiley & Sons 等国际知名出版社引进的实验室必备工具书，是生命科学领域最先进、实用、权威的实验手册类优秀图书。该系列图书简单明了，囊括了全世界最著名的生物类实验室操作方法，无论是初学者还是需要深入研究的科研工作者都能从中获益。该系列图书在读者群中有较高的知名度和美誉度，特别是以《分子克隆实验指南》和《精编分子生物学实验指南》为代表，堪称经典，分别被喻为生命科学领域的“蓝宝书”和“红宝书”。现挑选其中的精品集结成典藏版。

Gene Transfer: Delivery and Expression of DNA and RNA, by Theodore Friedmann and John Rossi.
Copyright © 2007. Translation rights arranged with the permission of Cold Spring Harbor Laboratory Press.

图书在版编目（CIP）数据

生命科学实验指南系列：典藏版/雷东锋等编著. —北京：科学出版社，2016
ISBN 978-7-03-047486-5

Ⅰ.①生… Ⅱ.①雷… Ⅲ. ①生命科学–实验–指南 Ⅳ.①Q1-0

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2016)第 043878 号

责任编辑：王 静 李 悦
责任印制：张 伟 / 封面设计：刘新新

科 学 出 版 社 出版
北京东黄城根北街 16 号
邮政编码：100717
http://www.sciencep.com

北京虎彩文化传播有限公司 印刷
科学出版社发行 各地新华书店经销
*
2016 年 7 月第 一 版 开本：787×1092 1/16
2016 年 7 月第 一次印刷 印张：1310 1/2
字数：31 074 000
定价：4500.00 元

(如有印装质量问题，我社负责调换)

译 者 序

早期的遗传学认为基因的转移只能是从亲代向子代的垂直传递，但近年来，研究者们越来越清楚地认识到水平方向的基因转移也是自然发生的。微生物可通过多种途径进行横向的基因转移，这种转移不仅发生在不同的微生物细胞之间，而且也发生在微生物与高等动植物之间。基因转移是外源性有功能的遗传信息进入细胞甚至整个生物体内的复杂过程。基因转移的技术可分为物理法、化学法和生物法三大类。物理法包括：微束激光打孔法、基因枪法、DNA 直接注射法、显微注射法、电穿孔法和 DNA 微粒子轰击法等。化学法包括：磷酸钙沉淀法、葡聚糖法、多聚体导入法、脂质体融合法和受体介导法等。生物法包括：反转录病毒载体系统、慢病毒载体系统、腺病毒载体系统、痘苗病毒载体系统和单纯疱疹病毒载体系统等。这些技术都为基因转移的研究和应用作出了重要的贡献。

瑞典皇家科学院 2007 年 10 月 15 日宣布，将 2007 年诺贝尔生理学或医学奖授予美国犹他大学 Eccles 人类遗传学研究所的科学家马里奥·卡佩奇（Mario R. Capecchi）、美国北卡罗来纳州大学教会山分校医学院的教授奥利弗·史密西斯（Oliver Smithies）与英国科学家卡迪夫大学卡迪夫生命科学学院的马丁·埃文斯（Martin J. Evans）。他们因基因敲除小鼠的开创性研究而获得此奖项。他们发现了胚胎干细胞中染色体能与导入 DNA 发生同源重组，通过同源重组，有缺陷的靶基因可被导入的 DNA 定点修正或改造，从而能产生由改造基因参与的生物模型。目前，国际上已有大约 5000 种基因敲除的小鼠，这些模型可进一步用于基因功能和遗传性疾病的系统而深入的研究。基因靶向技术也是基因转移技术的一种。可以预见基因转移技术一定还会给人们带来新的惊喜。

基因转移技术不但革新了生物学和医学中许多基本问题的研究，也推动了诊断和治疗方面的分子技术发展，并使基因治疗成为可能。基因治疗是一种以预防和治疗疾病为目的的人类基因转移技术，是以改变人的遗传物质为基础的生物医学疗法。虽然目前世界上肿瘤基因治疗是基因治疗研究的热点，但是基因治疗还不能作为一种成熟的治病方法用于临床。它的进一步发展还有待于基因转移技术，尤其是靶向载体的研制和完善。尽管如此，基因转移技术已广泛用于基因的结构和功能分析、基因表达与调控和转基因动物等的研究。另外，从 20 世纪 80 年代后期开始，在农业、畜牧业和水产养殖业中，也逐渐引进了基因转移技术，出现了高产、优质、抗虫和抗病的转基因植物和转基因动物品系，如全世界转基因作物已达 120 多种，在美国，转基因食品高达 4000 多种。这充分表明了基因转移技术在基础研究和实际应用方面的深远意义和社会价值。

可喜的是基因转移技术在我国也得到了很大程度的发展，但由于许多方法，尤其是大多数非病毒技术近年来发展很快，所以通过这本书系统而详尽地介绍这些新技术就显得非常重要。本书由 180 位此领域的专家和学者执笔，对 70 多种基因转移技术的基本原理和实施方案进行了深入浅出的描述，是目前最为全面的介绍基因转移技术和方法的

专业书籍。本书由中国科学院生物物理研究所殷勤伟研究员、清华大学深圳研究生院生命科学部张雅欧教授、中国医学科学院生物医药技术研究所邵荣光研究员和中国科学技术大学化学院王均教授主持翻译，一些博士和硕士研究生也参与了部分工作。最后，由殷勤伟研究员进行了统一审校。希望此书能为我国的基因转移技术的研究和应用发挥一定的作用。

由于时间紧迫和水平有限，在翻译中难免有欠缺，敬请读者批评指正。

殷勤伟

于中国科学院生物物理研究所

2007 年 10 月

此为试读，需要完整PDF请访问：www.ertongbook.com

前　言

1890年德国的细菌学家和生理学家罗伯特·科赫（Robert Koch）确立了4大准则，即著名的Koch定律。此定律常被用来判断一种疾病的感染原因是否正确无误。尽管这些准则仍持续被用作鉴定一种微生物和一种人类疾病之间必然联系的基本要素，但我们现在已认识到存在着某些例外。科赫认为引起一种疾病的可疑微生物应该能够在此疾病的每一种情况下，从所有被感染的患者中以单纯的形式被培养和鉴定。当这种纯化的微生物被引入一个非感染的有机体中时，相应的疾病应能再次产生。最后，应该可以从被感染的有机体中再次获得这种微生物。一直到20世纪中叶，遗传学大体上只是一种描述性科学。科赫的方法使对人类疾病的研究从简单的描述转变成更为严谨的实验科学。

随着20世纪医学遗传学和分子遗传学的快速发展，一套相似的标准被用来确认一种遗传机制和一种人类生理或病理特征之间的关系。阿奇博尔德·伽罗德（Archibald Garrod）于1908年在对英格兰皇家学会的克鲁尼安（Croonian）的著名演讲中引入了化学病理学的概念，他指出遗传信息的错误是导致人类遗传性疾病（叫做先天性新陈代谢紊乱）的根本原因。

20世纪初，托马斯·亨特·摩尔根（Thomas Hunt Morgan）和他的助手在著名的哥伦比亚大学的果蝇实验室里创立了基因连锁的概念，发现了果蝇的遗传因子和表型特征之间的关系，指出遗传信息能够支配活的有机体的发育特征和特定性状。然而，直到1940年，人们才有可能鉴定正常和病理性状的遗传特征的特定的分子基础。在1941年，乔治·比德尔（George Beadle）和爱德华·塔特姆（Edward Tatum）的研究揭示了放射诱导的粗糙脉孢霉营养缺陷型是一种特异的代谢紊乱，他们认为正常的或突变的基因决定或编码一个正常的或异常的酶。这一发现亦为伽罗德的先天性新陈代谢紊乱的概念提供了证据。到1944年，奥斯瓦德·艾弗里（Oswald Avery）、马克林·麦卡第（Maclyn McCarty）、柯林·麦克劳德（Colin McLeod）通过一系列的精确实验指出能从肺炎球菌的遗传物质就是DNA分子，它可将受体株的特性转化成供体株的特性。这一发现也证明了DNA确实决定着一个微生物所有的遗传特征。继而在1952年，阿弗雷德·赫尔希（Alfred Hershey）和马莎·蔡斯（Martha Chase）开展了一系列有关噬菌体介导的基因转移实验，揭示了噬菌体的遗传决定因子也是DNA，从而进一步论证了DNA是遗传信息载体的假说。

1953年詹姆斯·沃森（James Watson）和弗朗西斯·克里克（Francis Crick）对DNA分子三维结构的发现清楚地阐明了DNA是怎样编码和储存遗传信息的，并揭示了DNA是怎样复制的分子机制。继而其他的发现接踵而来。在接下来的二十年中，弗雷德里克·桑格（Frederick Sanger）证实了蛋白质由特定的氨基酸序列组成。弗农·英格拉姆（Vernon Ingram）和他的同事确定了遗传错误是人类先天性疾病的原因，揭示了这些改变是怎样通过产生异常氨基酸序列的蛋白质而发生的。随后进入了分子生物

学的“黄金时期”，从20世纪50年代到70年代掀起了一股对遗传信息流的研究热潮。紧接着的是数十年的令人惊讶并且非常成功的“基因组计划”。这些发现共同阐明了决定所有生命系统的正常和异常功能的遗传机制。

在科赫原则的精神中，关于当代分子遗传学的概念应是正常和疾病相关基因表达的假设机制需要得到生物功能的证实。在最后的分析中，要确证一种不确定的遗传机制需要有能联系基因型和表型的重复性实验的可靠支持。在很多情况下，通过在生物体内引入特定的遗传改变或阻碍遗传信息功能的表达，以及对所产生的表型进行分析能提供明确的证据。这些研究依赖于引导外源遗传信息到细胞，甚至到整个生物体内的技术方法的发展。暂时地或永久地修改一个生物体的基因型的方法为我们增进对非常复杂的遗传学机制的了解提供了更多的新机遇。从更现实的意义上说，这些方法甚至可被设想为一种“基因疗法”，将被用来纠正疾病治疗范畴中的各种遗传紊乱。

本书提供了许多有特色的将外源性有功能的遗传信息引入哺乳动物细胞甚至整个生物体内的方法和技术。许多章节提供了背景知识和描述许多病毒的或非病毒的基因转移载体和技术的详细方案。方案是逐步、以“食谱”似的方式来展现的。因此，每一个研究者都能切实可行的利用基因转移/表达系统。除了基因转移外，本书还有一些研究遗传信息的调控基因表达的方案。任何一个给定的实验模型或基因治疗方案在这都能找到许多实现遗传物质导入和表达的方法。为了引导读者选择合适的系统，我们在每一章节中描述了该方法的优点和缺点。显然，在一个如此快速发展的领域中，将会持续出现新方法去补充甚至取代一些旧方法。尽管如此，这本书里的技术包含了许多当前用于哺乳动物细胞和组织基因转移的常用方法。

我们感谢那些在冷泉港实验室出版社中为本书出版作出贡献的人——出版社执行理事约翰·英格里斯（John Inglis）；组稿编辑大卫·柯罗帝（David Crotty）；编辑开发部经理简·阿根廷（Jan Argentine）。我们也感激出版社编辑员工的辛勤努力，如始发和监督此项目的卡任·詹森（Kaaren Janssen）、伊内兹·萨里诺（Inez Sialiano）和谢尔·麦特斯（Cher Mattes），还有开发编辑伊润·皮驰（Irene Pech）、马丁·温尼（Martin Winer）和特雷西·库曼（Tracy Kuthlman）。我们还要感谢丹尼斯·韦斯（Denise Weiss）、丽纳·司提优（Rena Steuer）、道提·布朗（Dotty Brown）和劳伦·海勒（Lauren Heller）的技术工作。

我们希望这本书能够成为任何想利用基因转移作为研究或治疗工具的科研人员手中有用而方便的标准的实验室手册。

T. 弗里德曼

J. 罗西

目　录

译者序
前言
第一篇　病毒载体…… 1
第一章　导言…… 3
第二章　反转录病毒载体…… 5
第三章　研发表达 siRNA 的慢病毒载体…… 22
第四章　用于人基因治疗的 HIV-2 载体：设计、构建和治疗前景 …… 32
第五章　作为 DNA 递送媒介的 SIV 载体 …… 44
第六章　基于猫免疫缺陷病毒的慢病毒载体的生产和使用 …… 54
第七章　造血细胞的慢病毒转导 …… 69
第八章　基于脾坏死病毒的载体 …… 75
第九章　泡沫病毒载体的生成和对造血干细胞的转导 …… 83
第十章　猿空泡病毒 1 型载体 …… 89
第十一章　VSV-G-假型反转录病毒载体的产生…… 96
第十二章　用表面修饰的慢病毒载体转运靶基因…… 106
第十三章　制备抗补体灭活的假型慢病毒载体…… 116
第十四章　构建由 2A 多肽连接的多顺反子载体 …… 121
第十五章　第一代腺病毒载体的构建…… 131
第十六章　辅助病毒依赖的腺病毒载体的生产和鉴定…… 146
第十七章　细胞和组织靶向…… 160
第十八章　用于 AAV 组装的能稳定制造病毒的细胞系 …… 172
第十九章　腺相关杂合病毒载体的设计方法…… 177
第二十章　重组的单纯疱疹病毒载体…… 188
第二十一章　单纯疱疹病毒 I 型来源的扩增子载体 …… 198
第二十二章　基于 γ-2 松猴疱疹病毒（HVS）的载体 …… 221
第二十三章　用 HSV/AAV 杂合扩增子载体递送基因 …… 230
第二十四章　多瘤病毒：SV40 …… 236
第二十五章　SV40 的体外包装：一种假病毒体基因递送系统 …… 249
第二十六章　基于杆状病毒的展示和基因传递系统…… 257
第二十七章　通过重组杆状病毒安全、简单、高容量地把基因转运进昆虫和脊椎动物细胞…… 272
第二十八章　α-病毒：作为基因转移载体的西门里克森林病毒和辛德毕斯病毒 … 284
第二十九章　使用靶向的丝状噬菌体将基因转移进哺乳动物细胞内…… 304
第三十章　筛选、分离和鉴定用于配体指导基因传递的靶向肽…… 312

第三十一章　定向改良的麻疹病毒的保存和扩增…… 321
第三十二章　基于小 RNA 病毒的表达载体 …… 329
第三十三章　流感病毒的反向遗传学…… 337
第二篇　非病毒技术和载体…… 343
第三十四章　关于基因传送的压缩和非压缩多聚体系统的概述…… 345
第三十五章　磷酸钙共沉淀质粒 DNA 转染海马神经元细胞 …… 353
第三十六章　传递基因进皮肤的基因枪技术…… 358
第三十七章　优化体外哺乳动物细胞的电转染…… 364
第三十八章　用于小鼠胚胎内高效基因转递的子宫内微电穿孔技术…… 371
第三十九章　体内传输基因的 lipoplex 和 LPD 纳米颗粒 …… 375
第四十章　用于系统传递基因的靶向电中性脂质囊泡…… 381
第四十一章　HVJ 脂质体和 HVJ 包装载体 …… 389
第四十二章　用于基因传递的聚赖氨酸共聚物…… 398
第四十三章　用于靶向基因传递的 PEI 纳米颗粒 …… 410
第四十四章　用于核酸传递的含环糊精的聚阳离子…… 415
第四十五章　用 B 型肝炎病毒外壳 L 蛋白制作的生物纳米胶囊 …… 421
第四十六章　用于体外哺乳动物细胞转染的固体脂质纳米颗粒…… 424
第四十七章　PEG 化的聚左旋赖氨酸和 DNA 的纳米颗粒…… 428
第四十八章　用于核酸传递的水溶性脂聚体及脂肽…… 432
第四十九章　用于 DNA 传递的阳离子多糖 …… 438
第五十章　用于持续释放编码血小板源生长因子和透明质酸合成酶 2 质粒 DNA 的交联透明质酸基质和薄膜 …… 445
第五十一章　线性聚乙烯亚胺：合成及体外和体内转染操作…… 450
第五十二章　用于基因传递的蛋白质纳米球：明胶纳米颗粒的制备和体外转染 … 455
第五十三章　水泡性口炎病毒 G 蛋白结合物 …… 467
第五十四章　筛选聚合物转染试剂的高通量方法…… 471
第五十五章　基于聚乳酸和聚乙二醇的纳米基因载体…… 478
第五十六章　生物可降解的纳米颗粒…… 483
第五十七章　转座子介导的小干扰 RNA 传递："睡美人"转座子 …… 488
第五十八章　用展示 TAT 转导域的 λ 噬菌体来高效输送 DNA 进哺乳动物细胞…… 492
第五十九章　细胞穿透肽介导的肽核酸寡聚体传送…… 500
第三篇　转基因表达的调控…… 505
第六十章　利用位点特异的 DNA 重组方法诱发基因组的条件突变 …… 507
第六十一章　在哺乳动物细胞中表达和鉴定核酶及短发夹 RNA …… 521
第六十二章　米非司酮诱导的基因调节系统…… 531
第六十三章　二聚体介导的基因表达调控…… 544
第六十四章　RheoSwitch 系统：基于蜕皮激素受体的可被合成小分子配体诱导的高灵敏基因调节系统…… 554

第六十五章　嗜菌体 ϕC31 整合酶介导的位点特异性整合 …… 562
第六十六章　利用模块装配方法构建锌指核酸酶以位点特异的方式操作基因组 … 569
第四篇　基因和载体转运的专门技术 …… 581
第六十七章　基于细菌人工染色体的人类人工染色体的重新装配 …… 583
第六十八章　利用高压注射技术转运裸 DNA …… 596
第六十九章　用特洛伊木马脂质体进行可穿过血脑屏障的非病毒基因转移 …… 603
第七十章　声穿孔：一种将基因导入鸡胚的有效技术 …… 612
第七十一章　通过微注射操作哺乳动物细胞的基因 …… 618
第七十二章　磁力转染 …… 623
第七十三章　用于光指导的基因传递的光化学内化技术 …… 629
第七十四章　原核显微注射技术 …… 635
第七十五章　由沉默慢病毒载体产生的基因下调小鼠 …… 649
附录　注意 …… 653
索引 …… 663

第一篇　病毒载体

此为试读，需要完整PDF请访问：www.ertongbook.com

第一章　导　　言

Theodore Friedmann* 和 John Rossi†

* University of California, San Diego; †Beckman Research Institute of the City of Hope, Duarte, California 92093-0634

殷勤伟　译

将外源遗传物质引入哺乳动物细胞的技术可方便地分为病毒的和非病毒的两类方法，这也是本书大体的分类方法。每一种方法都有其优缺点，而且都能在实验室和现今的临床中找到其重要的应用。没有一种单独的载体适合于所有的基因转移用途，尽管最受宠爱的载体系统不断地得宠又失宠，但大多数的系统或多或少亦起着有用而重要的作用。当然，自然界在科学家之前设计、进化了一些中介，如病毒，可将外源遗传信息转移到原核和真核生物细胞中去。这些病毒的工作目的就是以最可能有效的方式把自身的基因组转移到宿主细胞中，主要以为了达到繁殖自己的自私进化为目的，但同时也常引起宿主损伤的负效应。

虽然我们知道病毒性疾病已经很长时间了，但在 20 世纪的下半个世纪分子遗传学出现之前，我们不可能在分子机制水平上去了解它们。然而，即使我们不知道如此详细的知识，也有可能凭借直觉去了解人类疾病的祸首并利用这种原始的理解去寻找控制病毒疾病的方法。在 1796 年，英国医师爱德华·詹纳虽然不知道病毒和自然免疫之间的关系，但是他根据对感染牛痘的牛奶女工很少患天花现象的观察，经过尽心地思考，采用牛痘物质来感染一个男孩以帮助他预防天花。即使如此，我们现在才明白这是基因由病毒转移到了牛奶女工细胞中的结果。

对基于病毒的基因转移机制和效应的进一步分子本质的了解开始于 20 世纪 60 年代中期的罗纳托·杜尔贝科（Renato Dulbecco）和他的同事的研究（Sambrook et al. 1968），他们发现乳头多瘤病毒 SV40 和多瘤病毒能通过整合自身基因拷贝到所感染的宿主细胞中去诱导被感染的细胞发生持久的甚至瘤性的改变。如果天然的病毒有能力作为转移自身基因的载体，那么在不引起细胞毒性的前提下，不也能设计出转移其他基因到哺乳动物细胞中去的工程病毒吗？1973 年重组 DNA 技术出现以后，在 20 世纪 80 年代早期，随着第一个反转录病毒载体的构建成功（Shimotohno and Temin 1981；Wei et al. 1981；Tabin et al. 1982），这种可能性变成了现实。

病毒载体确实是有效的，但是它们常常具有细胞毒性、免疫原性和生物危险性，这些严重而潜在的缺点会给一些基因转移实验带来问题。这就产生了对研发化学或合成载体的需求。希望这些非病毒载体既有类似病毒载体的转移效率，而又无病毒载体的缺陷。几十年来，研究者不断地改进转染外源基因的低效率方法，并利用阳离子或多胺来改善负电荷的核酸穿过负电荷的细胞膜的能力。在 1973 年，弗兰克·格雷厄姆（Frank Graham）和亚历山大·范德艾布（Alexander van der Eb）发现腺病毒 DNA 与磷酸钙

共沉淀能显著提高细胞吸收和转染效率。此后，非病毒的基因转移方法得到了快速的发展。

尽管本书中讨论的许多其他的非病毒方法有更新的发展，但磷酸钙法仍然是哺乳动物细胞转染的基础方法之一。总体来说，与病毒方法比较，即使更好的非病毒方法也遭受着低转染效率和转染基因表达稳定性低的困扰。这至少要部分归结于一个事实，即病毒能将引入的基因包装进一个能识别并吸附到靶细胞表面特定位点的小包裹里面，包裹能以免遭细胞降解的途径将载体和负载基因转移到合适的细胞位点里去。

书中描述的许多方法，尤其是大多数非病毒技术，都处于发展的早期阶段，就长远来说，其中许多可能只能有限而特定的应用。为了变得确实实用，未来的基因转移方法应该提供比现今方法更多的重要优点。这些优点，尤其对体内基因转移来说，应该包括能够选择用于基因转移的特定靶细胞或靶组织的能力，这是一个目前大多数基因转移方法仍然缺乏的能力。更进一步讲，在整合载体的情况下，通过发展特化基因组整合位点的方法来清除体内基因转移常遇到的安全性和高效性的重要障碍，并因此避免插入突变引起的不可避免的细胞破坏。除此之外，用一种在靶序列中制造特异序列改变的方法代替混杂添加遗传信息的方法能使一种打了就跑的方法不留载体痕迹地修改所要改变的基因。这种技术在最近已经出现了。它通过研发含有锌指结构元件的载体，从而能定义一个转基因和特定靶基因组的相互作用位点（Porteus and Carroll 2005）。最后，产生哺乳动物细胞遗传改变的方法对天然状态来说不是充分可靠的，除非它们包含了一整套能限定靶位点天然表达的调控元件。这就常常要求插入一长段包含调控信息的遗传物质。由于载体在运载遗传信息量上有很大的差异，所以这种独特的要求就指定了那些最适合这些遗传信息转移的载体系统。

本书收集的方案为向哺乳动物细胞进行基因转移提供了至今最为广泛的技术和方法的选择。除了基因转移方法之外，还有一些有关调控基因表达的方案。我们的目标是为科技界提供一本实用的有关基因转移和表达的好指导，它包括实证过的老方法，又含有许多令人振奋的新技术。我们相信这些方案在使用中会经受得起时间的考验。

参考文献

Graham F.L. and van der Eb A. 1973. A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. *Virology* **52:** 456–467.

Porteus M.H. and Carroll D. 2005. Gene targeting using zinc finger nucleases. *Nat. Biotechnol.* **23:** 967–973.

Sambrook J., Westphal H., Srinivasan P.R., and Dulbecco R. 1968. The integrated state of viral DNA in SV40-transformed cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **60:** 1288–1295.

Shimotohno K. and Temin H.M. 1981. Formation of infectious progeny virus after insertion of he herpes simplex thymidine kinase gene into DNA of an avian retrovirus. *Cell* **26:** 67–77.

Tabin C.J., Hoffmann J.W., Goff S.P., and Weinberg R.A. 1982. Adaptation of a retrovirus as a eukaryotic vector transmitting the herpes simplex thymidine kinase gene. *Mol. Cell. Biol.* **2:** 426–436.

Wei C., Gibson M., Spear P.G., and Scolnick E.M. 1981. Construction and isolation of a transmissible retrovirus containing the src gene from Harvey murine sarcoma virus and the thymidine kinase gene from herpes simplex virus type 1. *J. Virol.* **39:** 935–944.

第二章　反转录病毒载体

Kenneth Cornetta*，Karen E. Pollok† 和 A. Dusty Miller‡

* Department of Medical and Molecular Genetics，Indiana University School of Medicine，Indianapolis，Indiana 46202；† Department of Pediatrics，Section of Pediatric Hematology/Oncology，Indiana University School of Medicine，Indianapolis，Indiana 46202；‡ Divisions of Human Biology and Basic Sciences，Fred Hutchinson Cancer Research Center，Seattle，Washington 98109

赵建明　译

引言，6
方案 1，9
　瞬时转染产生载体，9
　材料，9
　试剂，9
　设备，10
　方法，10
方案 2，10
　生成稳定的载体产生细胞，10
　材料，11
　试剂，12
　设备，12
　方法，12
　病毒的收集和分析，14
　辅助病毒的标志物分析，14
方案 3，15
　细胞株的转导，15
　材料，15
　试剂，15
　设备，16
　方法，16
　疑难解答，17
方案 4，17
　原始造血细胞的转导，17
　材料，17
　试剂，17
　设备，18
　方法，18
　疑难解答，19
参考文献，20

摘要

本章主要讲述那些最初被发现的源自 γ-retroviral 种属的反转录病毒载体，由于它们都来自致癌反转录病毒家族并且都具有简单的 *gag-pol-env* 基因组的结构，因此也被称为癌反转录病毒载体或简单反转录病毒载体。除了这种反转录病毒载体家族外，还有更为复杂的反转录病毒载体，如慢病毒和泡沫病毒载体。这些病毒除了含有标准的 *gag-pol-env* 基因外还包含多种附属基因。

反转录病毒在实验室研究和临床应用上亦有很大的优势，和其他病毒比起来反转录病毒能够高效地整合到被感染细胞的基因组中。同样，由反转录病毒携带的转基因也能整合进靶细胞，并通过基因的复制传给靶细胞的所有子细胞，使这些载体成为改造干细胞、祖细胞或那些被期望能在体内大量扩增的细胞（如免疫应答刺激的 T 细胞）的理想工具。此外，反转录病毒转移基因的效率要比非病毒载体转移基因的效率高得多。更重要的是，这种载体在大多数实验室都能很容易地被构建并被大规模地生产，因此它也

适合应用于临床。

反转录病毒载体在基因治疗应用上也有一些不利因素。首先，它们还不能用于全身给药，因为它们常被用于体外的细胞转导而易于被人血液中的蛋白质和细胞组分所灭活。第二，它们需要细胞的分裂才能进行整合。第三，当计算用这种基因导入方法的风险和利率时，我们还要考虑到基因有可能在整合进入造血细胞的同时又引起癌基因的激活，虽然这是一个很少发生且复杂的过程。尽管有这些限制，反转录病毒载体系统仍然是一个定义完善的系统，并且在过去 20 年里通过广泛的使用，已造就了许多新型的试剂与其配套，它们乃是将转基因序列整合进入靶细胞的一个具有很大魅力的系统。

引言

反转录病毒作为基因导入的工具

反转录病毒能非常好地被用来作为基因导入的工具是因为它们有特定的生命周期和能有效整合进入靶细胞 DNA 的能力。反转录病毒的基因组两侧连接着两个调控区，也被称作长末端重复序列（LTR），具有启动子和增强子的功能并且也是整合进入宿主基因所必需的。它还有一个包装序列（ψ）有利于病毒 RNA 进入病毒的包装子。另外三个病毒基因组区域是：编码病毒结构蛋白的基因 *gag*；编码酶包括反转录酶和整合酶的 *pol*；编码病毒囊膜糖蛋白的 *env*，这种糖蛋白能和靶细胞上特异受体相结合来帮助病毒的感染。病毒衣壳内有两套病毒的基因组 RNA、反转录酶和整合酶。携带的酶基因能让病毒感染细胞，以病毒的 RNA 为模板反转录 DNA 并且不用表达任何病毒基因就能整合进入细胞基因组。反转录病毒的这种特性，让我们有可能将病毒编码蛋白的基因（*gag*、*pol*、*env*）删除替换成我们感兴趣的外源基因（图 1）。这导致载体复制缺陷和引起将载体 RNA 包装成病毒体的一个技术问题。这个问题能通过瞬时转染表达病毒基因的质粒和表达载体基因组的质粒来解决（图 2），或者更简单地，用一个反转录病毒包装细胞系来克服，这些我们下面将详细讨论。

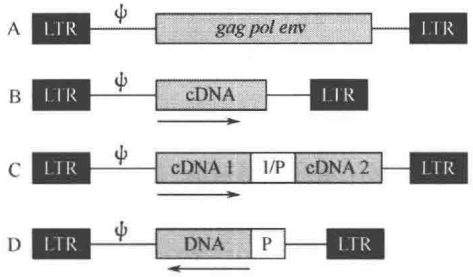


图 1. 反转录病毒载体设计。A. Moloney 鼠白血病代表性概图。LTR 位于三个病毒基因区域：*gag*、*pol* 和 *env* 的两侧，LTR 包含着启动子和增强子的功能，有效包装病毒 RNA 成病毒体需要 Psi（ψ）序列。B. 一个载体结构保留 LTR 和 ψ 序列，缺失主要的病毒基因区域。在5′LTR的启动子被用来表达所要的 cDNA。C. 通过使用一个内在的核糖体进入位点（IRES）序列（I）或者引入一个次级的启动子（P）来表达多个基因或者序列。D. 当要表达序列包含内含子或者其他干预一个完全长载体的转录序列时，可反向地将其插入。这允许完全长度的转录子被包装进入病毒体，所要的基因在整合进靶细胞后被表达。箭头表示基因的方向。

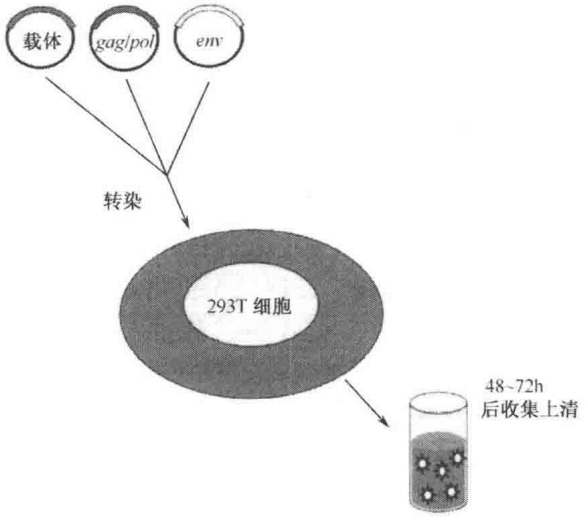


图 2. 通过瞬时转染产生载体。利用磷酸钙、脂质体或电击的方法将表达载体、病毒 *gag* 与 *pol* 基因和病毒包膜的质粒转入能够高效转染的细胞（如 HEK 293T 细胞），48～72h 后收获载体溶液，它们可被立即使用或冷藏在－70℃，供日后使用。

反转录病毒载体设计时需注意的问题

在构建反转录病毒载体时有一些重要问题是我们必须要考虑的。载体有两个主要组成部分：载体的骨架和转基因盒。如图 1 中，载体骨架序列来源于反转录病毒。早期大多数研究主要是应用那些来源于 Moloney 鼠白血病病毒（Mo-MLV）的载体。在大多数细胞系和不同的原代细胞中，Mo-MLV LTR 的启动子和增强子都能够启动表达。但是 Mo-MLV LTR 在植入像前胚胎细胞、胚胎干细胞和原始造血干细胞等一些原代细胞中却不能很好地表达（Jahner et al. 1982；Challita and Kohn 1994）。后来的研究表明 Mo-MLV LTR 和引物结合位点至少有 4 个沉默子元件，这种沉默机制是复杂的，不能完全解释清楚，但却促使很多科研人员开始用其他的病毒或对沉默元件序列进行突变来构建新型的载体（Pannell and Ellis 2001）。在过去的 15 年里，已经出现了很多新的载体，其上的 LTR 能够在一些特定的细胞类型中表达（如骨髓造血细胞），而且也很少在体内被甲基化或其他细胞机制所沉默（Hawley 2001）。研究人员现在也找到了很多种在原始细胞内能表达的新型载体，但也只是减少而不能完全消除反转录病毒载体的沉默效应。

选择好载体的主要骨架后转基因盒就可以插入了，最简单的设计是利用 LTR 启动子来表达转基因。一般来说，转基因的序列是没有内含子的以防止在 RNA 加工过程中被剪切。在一些情况下，如转基因中内含子序列对于转基因的表达是重要的或者需用组织特异性启动子来进行与病毒 LTR 相关的非特异表达时，转基因盒能够以相反的方向插入（图 1）。

最近，很多文献都报道了由于反转录病毒插入引起的突变会导致恶性肿瘤的发生，因此现在很多的载体设计都在考虑这方面的问题。这种突变通常是因为载体的调控序列

此为试读，需要完整PDF请访问：www.ertongbook.com