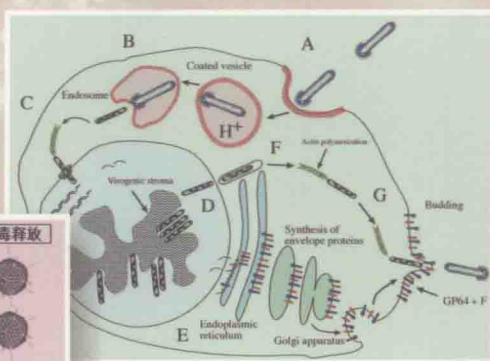
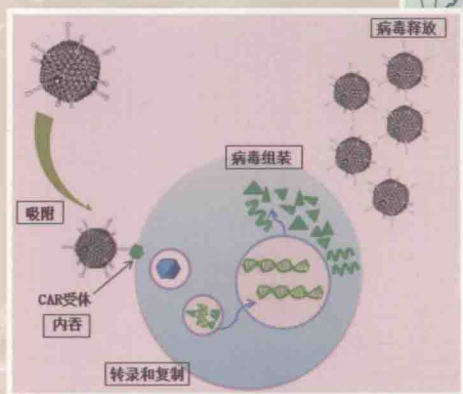




BINGDU
ZHUANJIYIN JISHU
YUANLI

病毒转基因技术原理

◎范雄林 主编



科学出版社

病毒转基因技术原理

范雄林 主编



科学出版社

北京

内 容 简 介

本教材由来自全国 8 所高等院校和科研院所的专家学者合作编写完成。重点介绍了常用病毒的转基因技术原理、纯化制备技术和医学应用现状。力图结合对病毒基本生物学特性和新进展的介绍,讲透病毒转基因技术的基本问题,突出各种不同系统的优点,探讨了存在的问题和发展趋势。

本教材不仅可供医学研究生使用,还可作为相关专业的教师、科研和制药等行业工作者的参考书。

图书在版编目(CIP)数据

病毒转基因技术原理/范雄林主编. —北京:科学出版社, 2015.1

ISBN 978-7-03-043064-9

I. ①病… II. ①范… III. ①病毒-转基因技术-研究生-教材
IV. ①Q939.4

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2015)第 013805 号

责任编辑:高 嵘/责任校对:朱光兰

责任印制:高 嵘/封面设计:苏 波

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>

武汉市科利德印务有限公司 印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2015 年 1 月第 一 版 开本:787×1092 1/16

2015 年 1 月第一次印刷 印张:11

字数:243 000

定价:28.00 元

(如有印装质量问题,我社负责调换)

《病毒转基因技术原理》编委会

主 编 范雄林

编 委 (以姓氏笔画为序)

王晓春 (安徽理工大学)

石春薇 (华中科技大学同济医学院)

叶嗣颖 (华中科技大学同济医学院)

杨红枚 (华中科技大学同济医学院)

张芳琳 (第四军医大学)

范小勇 (复旦大学附属上海市公共卫生临床中心)

范雄林 (华中科技大学同济医学院)

周东明 (中国科学院上海巴斯德研究所)

郑春福 (苏州大学)

胡志东 (复旦大学附属上海市公共卫生临床中心)

侯 炜 (武汉大学)

徐 颢 (华中科技大学同济医学院)

梁锦屏 (宁夏医科大学)

程林峰 (第四军医大学)

熊海蓉 (武汉大学)

前 言

目前,随着科学研究的深入,社会和经济的高速发展,人类对生命的认识也在不断深入,对健康的需求也越来越高。以生物技术为基础的生命科学和医药卫生领域的研究,受到全社会的普遍关注。转基因技术,尤其是以病毒为基础的转基因技术,是目前生命科学和医学领域最核心和支柱性的基础技术,为推动相应领域基础研究的发展,甚至为人类疾病的防治,提供了全新的思路和技术手段。转基因技术正受到研究机构、产业界等的广泛重视。但由于潜在的生物安全问题,转基因技术在基因治疗和疾病预防领域带来的新问题,也受到各国政府、一些非政府组织、甚至普通百姓的关注和重视。

中国的科学研究也同其经济一样,正处在快速的发展阶段。对新型技术的全面介绍,有利于人们学习、消化、吸收和创新,甚至形成“后发优势”。随着分子克隆技术的发展,20世纪80年代出现的基因转移技术,正成为分子医学的一种革命性的技术手段,并已成为治疗许多遗传性和获得性疾病的潜在希望。2003年,我国国家食品药品监督管理局(SFDA)批准了全球第一种复制缺陷型 AdHu5 载体表达抑癌蛋白 p53 治疗头颈部恶性肿瘤的基因治疗药物“今又生”上市。2005年,以复制型 AdHu5 溶瘤载体表达 p53 制成的 H101 用于治疗头颈部肿瘤,再获得 SFDA 批准上市。这些产品的上市,奠定了我国在以病毒载体为基础的基因治疗领域的领先地位。迄今,全球进行的基因治疗临床试验方案多达 1900 种。2009 年 12 月 18 日出版的 *Science* 杂志将“Return of Gene Therapy”作为年度重大的科学突破之一。2012 年年底,欧盟批准以 rAAV-1 介导的脂蛋白脂肪酶(lipoprotein lipase, LPL)基因药物 Glybera 正式上市,能修复患者脂蛋白脂肪酶缺陷并降低体内的甘油三酯,成为发达国家第一种基因治疗药物。结合上述背景,2012 年,华中科技大学启动了研究生高水平国际化课程的建设项目,提出了《病毒转基因技术原理》的教材建设和教学计划,并有幸邀请到来自国内相关高校和科研院所的长期在科研一线从事相关病毒研究的中、青年学者,在我国的研究生中开设病毒转基因技术课程。本书由参与教学的各位学者依据各自的讲稿撰写而成。共分为十二章。包括转基因技术概述,以 DNA 病毒载体、RNA 病毒载体和杂合病毒载体为基础的转基因技术原理,纯化制备技术和医学应用,以及涉及的生物安全和医学伦理问题。最后附加了相对重要的网址便于进一步学习参考。本书较为全面翔实地介绍了不同种类病毒载体的转基因技术原理、医学应用的现状及未来的发展趋势,可供大专院校相关专业的师生作为教学和科研的参考用书,也对从事相关研究、生产和管理的有关人员具有较大的参考价值。希望本书的出版,有益于进一步推动我国病毒转基因技术制药和疫苗的研究开发及产业化进展。

特别感谢参与编写的编委会成员,他们绝大多数在海外留学工作过,并在学术上取得了显著的成绩,是各单位的骨干,承担着繁重的教学科研任务,为本书的反复修改和完成付出了大量的心血和精力。华中科技大学同济医学院病原生物学系研究生马记磊、张京燕、谭昆、滕新栋、袁雪峰和田茂鹏等对本书所有的图、表和参考文献等进行了格式修订和编排。华中科技大学基础医学院施静副院长、研究生办吴文珊主任和华中科技

大学研究生院廖启靖主任等领导为本书的出版提供了大力的支持和帮助。特别感谢华中科技大学研究生院和卫生部“十二五”传染病防治重大专项为本书的出版提供的资助。

限于篇幅，很多医学应用的内容未能写入，由于编者水平有限，各位作者专长不同，所编写的各章节的语言风格和结构难以统一，书中难免存在不足之处，恳请批评指正（作者邮箱：xlfan@hust.edu.cn）。

范雄林

2014年1月于武汉

目 录

前言

第一章 转基因技术概述	1
一、常见的基因转移方式	1
二、基因转移入真核细胞的方法	2
复习思考题	10
参考文献	10
第二章 腺病毒	11
第一节 腺病毒简介	11
一、生物学特性	11
二、致病性与免疫性	14
三、微生物学检测方法	14
第二节 腺病毒载体转基因技术原理	15
一、腺病毒载体的发展	15
二、腺病毒载体的构建策略	17
第三节 腺病毒载体的医学应用	19
一、腺病毒载体介导的基因治疗	19
二、基于腺病毒载体的新型候选疫苗	21
三、展望	24
复习思考题	25
参考文献	25
第三章 腺相关病毒	27
第一节 腺相关病毒简介	27
一、生物学特性	27
二、致病性与免疫性	33
第二节 腺相关病毒载体转基因技术原理	33
一、蛋白质表达型腺相关病毒载体	33
二、基因打靶型腺相关病毒载体	38
三、rAAV 的纯化和定量	38
第三节 腺相关病毒载体的医学应用	39
一、血友病 B	40
二、囊性纤维化	40
三、视网膜疾病	40
四、帕金森病和阿尔茨海默病	40

五、肿瘤	41
六、其他疾病	41
七、基因打靶	41
八、展望	41
复习思考题	42
参考文献	42
第四章 I 型单纯疱疹病毒	44
第一节 I 型单纯疱疹病毒简介	45
一、生物学特性	45
二、致病性与免疫性	47
三、微生物学检测方法	47
四、防治原则	48
第二节 HSV-1 载体转基因技术原理	48
一、扩增子载体	49
二、复制缺陷型载体	50
三、复制减毒型载体	51
四、重组 HSV-1 病毒粒子的纯化和定量	51
第三节 HSV-1 载体的医学应用	52
一、溶瘤性治疗	52
二、疫苗开发的应用	54
三、治疗慢性疼痛	55
四、展望	56
复习思考题	57
参考文献	57
第五章 莫洛尼氏鼠白血病病毒	60
第一节 莫洛尼氏鼠白血病病毒简介	60
一、生物学特性	60
二、致病性与免疫性	63
三、临床体征	65
四、诊断与防治	65
第二节 莫洛尼氏鼠白血病病毒载体转基因技术原理	66
一、构建原理	66
二、逆转录病毒载体结构	68
三、包装	69
四、重组病毒制备	70
第三节 莫洛尼氏鼠白血病病毒载体的医学应用	71
一、制备转基因动物	71

二、RNA 干扰	71
三、肿瘤治疗	72
四、基因治疗	72
复习思考题	72
参考文献	72
第六章 慢病毒	75
第一节 HIV-1 病毒简介	75
一、生物学特性	75
二、致病性与免疫性	78
三、微生物学检测方法	78
第二节 慢病毒载体转基因技术原理	79
一、以 HIV-1 为基础的慢病毒载体组成	79
二、慢病毒载体创新设计的安全性考虑	83
三、重组慢病毒的产生	84
四、慢病毒载体制备的浓缩方法	85
第三节 慢病毒载体的医学应用	87
一、功能基因组学	87
二、转基因动物	87
三、细胞工程	88
四、基因治疗	88
复习思考题	89
参考文献	89
第七章 痘病毒	92
第一节 痘病毒简介	92
一、生物学特性	92
二、致病性与免疫性	94
三、微生物学检测方法	97
四、治疗与预防	97
第二节 痘病毒载体转基因技术原理	98
一、常用的痘病毒载体	98
二、构建原理	98
三、重组痘病毒鉴定、纯化和定量	100
四、重组痘病毒的安全操作	101
第三节 痘病毒载体的医学应用	102
一、新一代抗天花疫苗/疫苗载体	102
二、预防传染病	104
三、肿瘤基因治疗	105

四、展望	106
复习思考题	107
参考文献	107
第八章 杆状病毒	109
第一节 杆状病毒简介	109
一、分类	109
二、病毒结构	110
三、病毒复制	113
第二节 杆状病毒载体转基因技术原理	114
一、杆状病毒表达系统的基本特征	114
二、杆状病毒表达系统基本原理及构建原则	115
三、杆状病毒表达系统重要技术要点	116
四、杆状病毒表达系统的改进	120
第三节 杆状病毒载体的医学应用	122
一、表达外源蛋白	122
二、杆状病毒表面展示	122
三、基因治疗	122
四、抗体与疫苗	123
五、基因工程病毒杀虫剂	124
六、展望	125
复习思考题	125
参考文献	125
第九章 甲病毒	127
第一节 甲病毒简介	127
一、生物学特性	127
二、致病性	128
第二节 甲病毒载体转基因技术原理	129
一、甲病毒表达载体的构建	129
二、甲病毒表达载体的转染	130
第三节 甲病毒载体的医学应用	131
一、蛋白质表达	131
二、肿瘤疫苗与肿瘤治疗	132
三、靶向性基因治疗	134
四、展望	135
复习思考题	135
参考文献	135

第十章 仙台病毒	137
第一节 仙台病毒简介	137
一、生物学特性	137
二、致病性与免疫性	139
三、微生物学检测方法	139
第二节 仙台病毒载体转基因技术原理	139
一、构建原理	140
二、发展方向	141
第三节 仙台病毒载体的医学应用	142
一、减毒活疫苗	142
二、治疗肢端缺血	142
三、治疗肿瘤	143
四、细胞核重编程诱导多能干细胞	143
五、其他应用	144
复习思考题	144
参考文献	144
第十一章 生物安全	146
第一节 生物安全实验室与转基因生物安全	146
一、生物安全实验室	146
二、病原微生物分类	147
三、实验室转基因技术生物安全	150
第二节 基因治疗生物安全	151
一、载体安全性	152
二、表达产物安全性	154
三、关于基因治疗和病毒载体活疫苗生物安全的要求	155
复习思考题	155
参考文献	155
第十二章 临床试验伦理	157
一、基因治疗的伦理学问题	157
二、病毒载体疫苗的伦理学问题	159
复习思考题	161
参考文献	161
附录 常用的网址	163

第一章 转基因技术概述

在自然界，生命的种类繁多且复杂。尽管生命的遗传性状在不同种类或同种不同个体间是有差异的，但相对稳定。在特定的条件下，遗传性状可因突变、基因转移（gene transfer）等而发生不同程度的改变。基因转移现象在自然界的生物体中非常常见。在原核细胞型微生物，基因的转移常采用转化、接合、转导、溶源性转换和原生质体融合等方式进行，可赋予受体生物新的生物学性状，如形态结构、耐药性、毒力和抗原性等的改变。而在非细胞型微生物，如病毒，可发生病毒基因组之间的重组和重配，或基因产物的互补和表型混合等；此外，部分肿瘤相关病毒的基因组可以整合到病毒感染的宿主细胞染色体中，造成宿主细胞基因组发生变异，甚至恶性转化。转基因技术，就是基于自然界中常见的基因转移现象，人为地加以利用，用于不同生命体之间基因转移，尤其是将外源基因转移入真核细胞，用以研究生命科学的基本现象和机制、基因工程产品制备、基因治疗、疾病预防和动物模型制备等，为人类的健康事业做出贡献。

一、常见的基因转移方式

（一）转化

早在 1928 年，Frederick 在研究肺炎链球菌时，最先报道了细菌的转化（transformation）现象。将有荚膜的、菌落呈光滑（S）型的Ⅲ型肺炎链球菌注射至小鼠体内，小鼠死亡，从死鼠血中可分离到Ⅲ型肺炎链球菌。将无荚膜的、菌落呈粗糙（R）型的Ⅱ型肺炎链球菌，或将ⅢS 型菌加热杀死后再注射小鼠，则小鼠存活。但如将热杀死的ⅢS 型菌与活的ⅡR 型菌混合在一起注射小鼠，则小鼠死亡，并从死鼠血中分离出活的ⅢS 型菌。这表明活的ⅡR 型菌从死的ⅢS 型菌中获得了产生ⅢS 型菌荚膜的遗传物质，使活的ⅡR 型菌转化为ⅢS 型菌。1944 年，Avery 等用提取的ⅢS 型菌的 DNA 片段代替热杀死的ⅢS 型菌，与活的ⅡR 型菌一起注射小鼠，仍导致小鼠死亡，且从死鼠血中分离到ⅢS 型菌。终于证实引起ⅡR 型菌转化的物质是ⅢS 型菌的 DNA。这就是著名的小鼠体内肺炎链球菌的转化实验。

现在，转化因此而被定义为：受体菌直接摄取供体菌游离的 DNA 片段，并将其整合到自己菌体基因中去，从而使受体菌获得供体菌新的遗传性状的过程。转化可以分为自然转化和人工转化两种。自然转化强调的是细菌只要处于感受态（competence）这一特殊的生理状态，即可摄取外源的线性染色体 DNA 分子和质粒。感受态的出现时间和持续时间因菌种而异。除肺炎链球菌外，其他细菌如流感嗜血杆菌、葡萄球菌和芽孢杆菌等均具有自然转化的能力。人工转化则是通过人为的方法，如低温 CaCl_2 法诱导细菌处于感受态，使细菌具有摄取 DNA 的能力，或电穿孔法人为地将 DNA 导入菌体内，为不具有自然转化能力的很多细菌提供了一条获取外源 DNA 的途径，并且也是目前基因工程的基础技术之一。

（二）转导

1951年,Joshua和Norton发现了噬菌体介导的基因转移方式——转导(transduction)。用两株具不同的多重营养缺陷型的鼠伤寒沙门氏菌混合培养后,基本培养基上长出原养型菌落,证实了该菌中存在重组现象。继续用Davis的“U”形管实验证实这一过程是否需要细胞间的直接接触。“U”形管中间隔有滤板,只允许培养基通过而细菌不能通过。其两臂装入完全培养基,将两株营养缺陷型菌株分别接种到“U”形管两臂进行培养后,在供体和受体细菌不接触的情况下,同样出现原养型细菌。表明这一重组过程并不需要细菌的直接接触。仔细检查后发现所用的沙门氏菌LT22A是携带P22噬菌体的溶源性细菌,另一株是非溶源性细菌,因此可透过“U”形管滤板的应该是P22噬菌体并进行着基因的传递。

现在,转导被定义为以温和噬菌体为媒介,将供体菌的DNA片段转移到受体菌内,使受体菌获得新的遗传性状的过程。转导在革兰氏阳性和革兰氏阴性细菌均可发生。依据噬菌体和宿主菌关系,可把噬菌体分为毒性噬菌体和温和噬菌体。只有温和噬菌体能介导细菌的转导。根据DNA片段涉及的范围,转导可分为普遍性转导和局限性转导两种。普遍性转导是指噬菌体可以转导供体菌染色体的任何部分到受体菌中;而局限性转导是指噬菌体只能携带前噬菌体整合在染色体两侧的基因片段到受体菌中。

（三）转染

通常,感染(infection)被定义为病原体通过自然的途径进入动物或人体,突破宿主的防御机制并引起不同程度的病理过程。在感染涉及的病原体中,病毒是非常具有特征性的一类病原体,属于非细胞型微生物,在自然界的分布非常广泛,可在人、动物、植物、昆虫、真菌和原核细胞型微生物中寄居并引起感染。病毒体积微小,结构非常简单,仅含一种类型的核酸,因此必须在活细胞内寄生以完成其复制周期。利用病毒专一性活细胞寄生及部分病毒整合感染的特点,对病毒的基因组进行分子遗传学改造,设计出基因工程病毒载体。这种利用病毒载体将外源基因转移入真核细胞的过程称转染(transfection),以便与病毒的自然感染过程相区别(图1-1)。近年来,转染的广义概念是指外源基因通过非病毒载体转基因技术(物理、化学方法)或病毒载体转基因技术的方法进入真核细胞的过程。

二、基因转移入真核细胞的方法

（一）基因转移入真核细胞的影响因素

原核生物如细菌,为了防止外源DNA的入侵,其体内的限制性内切核酸酶会将外源DNA水解成不同的片段,而同时对自己的核酸相应的酶切位点进行甲基化修饰,保护自己的基因不受自己酶的破坏,这就是细菌的限制-修饰系统(restriction-modification system)。如果是质粒参与的基因转移,依据质粒复制时对宿主的依赖程度,可分为窄宿主谱质粒和宽宿主谱质粒;两种以上的质粒在同一宿主中还存在相容性和不相容性的

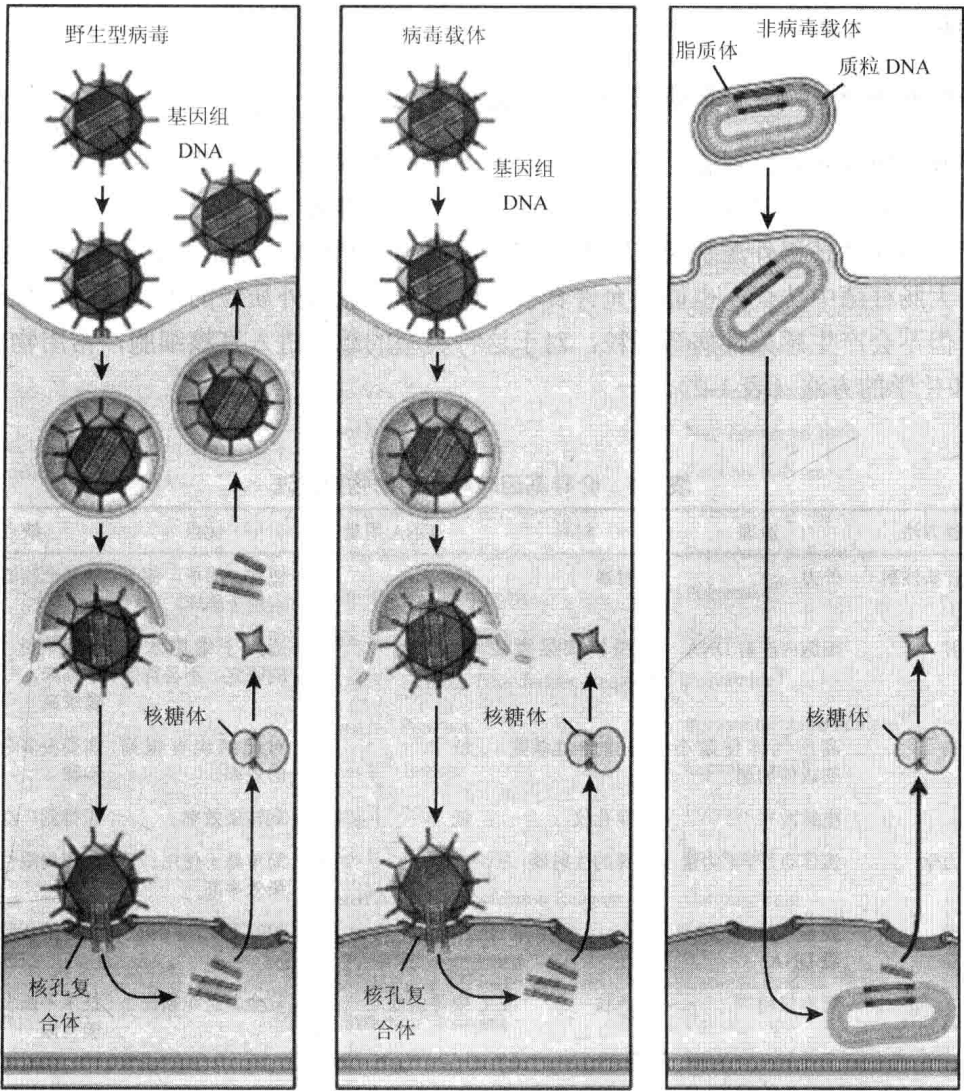


图 1-1 野生型病毒的自然感染、病毒载体转染和质粒经化学法介导的转染

问题，这些因素会影响质粒在宿主菌中的稳定性。外源基因进入受体菌，必须依赖 **RecA** 蛋白与受体细菌同源序列之间发生同源重组；或不依赖 **RecA** 蛋白和同源序列发生非同源重组，从而让受体菌获得新的遗传性状。

外源基因进入真核细胞的影响因素与上述原核生物有显著差别。真核细胞具有不同的膜样结构，如细胞膜将细胞与外环境隔离开来，只允许特定的物质进行膜内外的交换；细胞核膜将细胞核和细胞内环境隔离开来；细胞器膜将细胞内环境的不同功能空间隔离开来。因为外源基因的化学性质是 **DNA**，为大分子质量的物质，并且对核酸酶非常敏感。外源基因进入真核细胞，要突破三大障碍因素。首先是必须到达细胞膜的表面，其次是如何突破细胞膜进入细胞质，最后是如何进入细胞核并启动外源基因的表达。理想的转基因技术方法必然包括以下几个方面：能够保护外源基因不被核酸酶降解、能输送外源基因到达细胞膜表面、有利于外源基因跨过细胞膜并促进其进

入细胞核。

(二) 外源基因转移入真核细胞的类型和方法

外源基因进入真核细胞的类型包括质粒型载体和病毒颗粒型载体两类，后者即病毒介导的转基因技术，可分为假型病毒载体和重组型病毒载体两种。

质粒型载体是将外源基因克隆入含有真核细胞（病毒）复制子的真核细胞表达质粒，既可在大肠杆菌中传代，也能在允许真核细胞中以染色体外质粒的形式复制和表达外源基因，但不会产生感染性病毒颗粒。对于这种类型的载体进入真核细胞，常用物理（表 1-1）和化学的方法（表 1-2）。

表 1-1 介导基因转移常用的物理方法

物理方法	原理	材料	DNA 用量	优点	缺点
传统的针头注射	外力	注射器	高	便宜、简单，便于应用于临床	效率比较低
显微注射	细胞内注射 DNA	显微镜和显微注射针	低	适用于细胞水平的研究，不易降解	步骤烦琐，不适用于临床，专业技术要求高
粒子轰击	高压气体使微小的载体加速	不同的加速装置	低	对靶组织有很高的效率	需要很多的设备和步骤
电穿孔	电脉冲	电穿孔仪	低	高转染效率	未得到广泛认可
流体动力学	流体动力学的力量	特殊的注射器	中等	简单易于使用、转染效率高	组织局限性
包裹微球	胶囊化的微球包裹 DNA		中等	控制下投递和释放	制备的质量控制
超声	超声仪超声	超声仪	中等偏低	安全、组织损伤小	技术不断发展、经验有限

表 1-2 介导基因转移常用的化学方法

公司	产品	组成
Amersham-Biosciences	CellPhect transfection Kit	CaPO ₄ or DEAE-Dextran
Bio-Rad Labs	CytoFectene Transfection Reagent	Cationic lipid
BD Biosciences-CLOMTECH	CLONfectin TM	Cationic lipid
	CalPhos TM	Calcium phosphate
CPG Inc.	GeneLimo TM Transfection Reagent Plus	Polycationic lipids+lipid compound
	GeneLimo TM Transfection Reagent Super	Polycationic lipids+lipid compound
Gene Therapy Systems	GenePORTER TM	DOPE+Proprietary compounds
	GenePORTER TM 2	Proprietary material
	BoosterExpress TM Reagent Kit	Proprietary material
	PGene Grip TM Vector/Transfection Systems	GenePORTER+plasmid vector
Glen Research	Cytofectin GS	Cationic lipid

续表

公司	产 品	组成
Invitrogen	LipofectAMINE 2000 TM Reagent	Polycationic lipid
	LipofectAMINE PLUS TM Reagent	Polycationic lipid (DOSPA: DOPE)
	LipofECTIN [®] Reagent	Cationic lipid (DOSPA: DOPE)
	Transfection Reagent Optimization System	LipofectA MINE PLUS TM +Lipofectin [®] +CellFectin [®] +DMRIE
	CellFectin [®] Reagent	Cationic lipopolyamine
	OligofectA MINE TM Reagent	Proprietary
InvivoGen	Lipo Vec TM	Cationic phosphonolipids
	LipoGen TM	Non-liposomal lipid
MBI Fermentas	ExGen 500	Cationic polymer
	ExGen 500 <i>in vivo</i> delivery agent	Cationic polymer
Novagen	GeneJuice TM Transfection Reagent	Proprietary polyamine
PanVera Corporation	Trans II [®] -TKO Reagents	Polyamine [®]
	Trans II [®] -LT-1 and LT-2	Polyamine [®]
	Trans II [®] Express Transfection Reagent	Polyamine [®]
	Trans II [®] PanPack	Polyamine+cationic lipid [®]
	Trans II [®] -Insecta	Cationic lipid [®]
	Trans II [®] -293	Polyamine [®]
	Trans II [®] -Keratinocyte	Polyamine
	TransFAST TM Transfection Reagent	Cationic lipid
Promega	Tfx TM -10, -20, and -50 Reagents	Cationic lipid
	Tfx TM Reagents Transfection Trio	Cationic lipid
	Transfectam [®] Reagent	Cationic lipid
	ProFection [®] Mammalian Transfection System	DEAE-Dextran or calcium phosphate
	GeneSHUTTLE TM -20 and-40 Reagents	Polycationic lipids
Qbiogene	<i>In vivo</i> GeneSHUTTLE TM Reagent	Liposome-mediated DOTAP: Chol.
	DuoFect TM Reagent System	Receptor-mediated endocytosis
	Calcium Phosphate transfection kit	Calcium phosphate
	TransMessenger TM Transfection Reagent	Proprietary lipid
Qiagen	SuperFect [®] Transfection Reagent	Activated dendrimer
	Effectene TM Transfection Reagent	Nonliposomal lipid
	Transfection Reagent Selector Kit	Dendrimer+nonliposomal lipid
	PolyFect [®] Transfection Reagent	Activated dendrimer
	FuGENE 6 Transfection Reagent	Nonliposomal proprietary lipid
Roche Applied Science	X-tremeGENE Ro-1539 Transfection Reagent	Proprietary lipid
	X-tremeGENE Q2 Transfection Reagent	Proprietary lipid
	DOSPAP	Polycationic lipid

续表

公司	产 品	组成
Sigma-Aldrich Corporation	DOTAP	Cationic lipid
	DEAE-Dextran Transfection Reagent	DEAE-Dextran
	Calcium Phosphate Transfection Kit	Calcium phosphate
	Escort™, -II, -III and -V	Cationic lipid
	In vivo Liposome Transfection Reagents	Cationic lipid
Cell & Molecular Technologies	Mammalian Cell Transfection Kit	Calcium phosphate
	Transient Expression Kit	DEAE-Dextran
Stratagene	Lipo Taxi®	Cationic lipid
	Mammalian Transfection Kit	Calcium phosphate+DEAE-Dextran
	MBS Mammalian Transfection Kit	Modified calcium phosphate
	Primary Enhancer™ Reagent	Lipid+calcium phosphate
	GeneJammer™	Proprietary polyamine
Wako USA	Genetransfer®	Cationic liposomes

假型病毒载体是指经过克隆在载体上的病毒基因组，仅保留了病毒复制和包装所必需的所有顺式作用基因，其余基因为外源基因的表达读框代替。在这些含有外源基因的重组病毒质粒转染表达病毒结构蛋白的包装细胞系或有辅助病毒存在的情况下，可以包装出假型病毒。这种假型病毒在未改变组织细胞嗜性的情况下，具有与野生型病毒相同的组织细胞感染性，但其一般不具备野生型病毒的复制能力，是复制缺陷型病毒，其复制扩增需要辅助病毒的参与或感染表达病毒结构蛋白的包装细胞系。

重组型病毒载体是通过将外源基因的表达读框克隆入一个转移载体，在该转移载体外源基因表达读框的两端已经克隆了部分病毒的非必需编码基因。构建的携带外源基因的转移质粒转染野生型病毒感染的细胞，可在细胞内发生基因重组和置换，导致野生型病毒的某一基因被外源基因表达读框插入失活，并通过外源基因的表达提供表型筛选标记，从而获得具有新性状的感染性病毒颗粒。

建立上述两种病毒颗粒型载体的过程中，均需要用携带外源基因表达读框的质粒转染细胞，仍采用物理或化学的方法进行。而一旦构建好携带外源基因表达读框的病毒颗粒型载体，它们均具有感染性，能利用本身与细胞表面特异的受体结合而将外源基因的表达读框带入细胞内，整合到细胞染色体中，或在染色体外以附加子形式存在，建立稳定的或瞬时的外源基因的表达。这种方式与物理、化学方法的优缺点比较见表 1-3。

表 1-3 不同类型转基因技术方法的优缺点比较

转基因技术方法	优点	缺点
生物学方法（病毒载体介导法）	转染效率高	复杂的生产程序
	适合全身应用	产品的高质量控制
	具有靶向组织细胞能力	高成本
		机体预存在的免疫力可以干扰载体