

重组腺相关病毒的小量制备与体内体外感染研究

卢剑清,马宏,孙飞一,邓玉林

北京理工大学生命学院,北京 100081

摘要 重组腺相关病毒(rAAV)是近年来发展的较为成熟的一种病毒基因载体,常用于过表达或者敲低等动物模型的建立与基因治疗等。本研究使用三质粒共转染的方法,在HEK293细胞中包装出含绿色荧光蛋白(EGFP)基因的rAAV,通过一系列实验,确定纯化方法为脱氧胆酸钠裂解,高浓度NaCl去除杂蛋白,最后通过肝素层析柱纯化,经超滤管浓缩后其滴度可达 10^{13} gene copy/mL以上。将纯化后的rAAV感染HEK293细胞,通过实验确定使用感染复数为 10^6 、感染3 d的细胞能够表达出高水平的EGFP。将rAAV注射入大鼠中脑黑质致密部,经过3周的感染发现,rAAV可以特异性地感染多巴胺能神经元,表达出EGFP。通过以上实验,建立了一个在实验室小量制备rAAV的方法,且此方法制备的rAAV完全满足体内与体外实验的要求。

关键词 重组腺相关病毒;病毒包装;病毒纯化

中图分类号 Q93-3

文献标志码 A

doi 10.3981/j.issn.1000-7857.2015.18.012

Investigation of mini-preparation of recombinant adeno-associated virus and its infection *in vitro* and *in vivo*

LU Jianqing, MA Hong, SUN Feiyi, DENG Yulin

School of Life Science, Beijing Institute of Technology, Beijing 100081, China

Abstract Recombinant adeno-associated virus (rAAV) is a developed vector. The rAAV is used to establish animal models of gene over-expression or knock down and as the tool of gene therapy. We use the three plasmids assay to package the rAAV which carries the EGFP gene in HEK293 cells. Through a series of experiments, we establish the method of rAAV purification. In this method, we lyse the cells using sodium deoxycholate, then remove the hybrid proteins by adding high concentration NaCl, and purify the rAAV through heparin affinity column. After concentration by ultrafiltration, the rAAV titer can reach to more than 10^{13} gene copy/mL. The results of different multiplicity of infection (MOI) and time using rAAV to infect HEK 293 cell show that the best condition of infection is MOI= 10^6 and 3 days. After 3 weeks of injecting rAAV to substantia nigra pars compacta of rat midbrain, there are EGFP expressed in the dopaminergic neurons. We have established a method to prepare small amount rAAV in the lab, which can be used *in vitro* and *in vivo*.

Keywords recombinant adeno-associated viral; viral packaging; viral purification

腺相关病毒(Adeno-Associated virus, AAV)是一种细小病毒,其复制需要腺病毒或者疱疹病毒等辅助才能进行,根据衣壳蛋白的差别可以分为AAV1~AAV9等血清型,各血清型对组织嗜亲性不同^[1]。AAV在正常人体中即可发现,对人没有致病原性且免疫原性小,因此重组腺相关病毒(rAAV)常

用作基因载体在体内或体外进行实验^[2]。目前常用的rAAV大多基于AAV2开发,它是最早在感染克隆中得到的血清型,其衣壳蛋白表面主要受体是硫酸乙酰肝素多糖,在体外及对体内神经细胞具有较好的感染能力^[3]。由于其表面受体与肝素类似,可以采用亲和层析的方式进行纯化。

收稿日期:2015-07-06;修回日期:2015-08-20

基金项目:国家自然科学基金项目(31200636)

作者简介:卢剑清,博士研究生,研究方向为神经退行性疾病,电子信箱:bitljq@163.com;邓玉林(通信作者),教授,研究方向为神经退行性疾病与神经生化,电子信箱:deng@bit.edu.cn

引用格式:卢剑清,马宏,孙飞一,等.重组腺相关病毒的小量制备与体内体外感染研究[J].科技导报,2015,33(18):72-77.

目前 rAAV 病毒的纯化方法较多,但是总体来说,其初始需求细胞量较大,方法较为繁琐^[4]。在本实验中,首先在 HEK293 细胞中包装出携带绿色荧光蛋白 (enhanced green fluorescent protein, EGFP) 基因的 II 型 rAAV 病毒,探索其裂解方法,在裂解后加入高浓度 NaCl 除去杂蛋白,通过肝素亲和层析进行纯化,最后使用超滤管浓缩。得到浓缩液后分别在细胞和动物水平对其感染能力进行鉴定。通过本方法可以在实验室实现 II 型 rAAV 病毒的小量、快速纯化,得到的病毒可用于体外和体内实验。

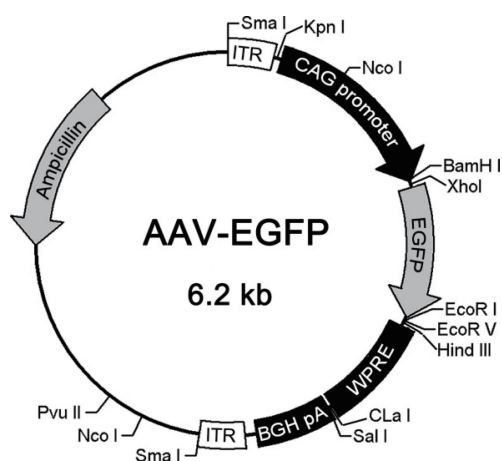
1 实验方法

1.1 材料与仪器

DMEM 培养基、胎牛血清 (美国 GIBCO 公司),超滤管 (美国 Millipore 公司, 100 kD), 脱氧胆酸钠、戊巴比妥钠、多聚甲醛 (美国 Sigma-Aldrich 公司), 肝素亲和柱 (美国 GE 公司, 型号: HiTrap Heparin 1mL), 酪氨酸羟化酶抗体 (美国 Millipore 公司, 兔多克隆), TRITC 标记山羊抗兔 IgG (北京中杉金桥生物技术有限公司), Wistar 大鼠 (北京维通利华实验动物技术有限公司, 雄性), 氯化钠、氯仿、蔗糖等分析纯试剂 (北京化学试剂公司)。高速冷冻离心机 (德国 Eppendorf 公司, 型号: 5424), 超声破碎仪 (美国 Sonic 公司, 型号: VCX-750), 实时荧光定量 PCR 仪 (美国 Bio-rad 公司, 型号: iQ5), 脑立体定位仪 (日本 Narshige 公司, 型号 SN-1N), 微量注射泵 (美国 WPI 公司, 型号: UMP3), 冷冻切片仪 (德国 Leica 公司, 型号: CM1900), 荧光显微镜 (日本 Olympus 公司, 型号: IX71)。

1.2 病毒包装

穿梭质粒上含有 CAG 启动子和 WPRE 增强子, 将 EGFP 基因构建在这两个元件之间, 得到 AAV-EGFP 质粒, 质粒图谱如图 1 所示。



ITR: 倒转末端重复序列; CAG promoter: CAG 启动子; EGFP: 绿色荧光蛋白; WPRE: 土拨鼠乙肝病毒转录后调控元件; BGH pA: 加尾信号; Ampicillin: 氨苄青霉素抗性基因

图 1 AAV-EGFP 质粒图谱

Fig.1 Plasmid profiles of AAV-EGFP

取 8 个 10 cm 培养皿传入 HEK293 细胞, 培养条件为 DEME 培养基, 10% 胎牛血清, 37°C 培养, 待细胞汇合度达到 50% 时即可进行病毒包装。病毒包装方法采用经典的磷酸钙转染法^[5], 将穿梭质粒 AAV-EGFP 与辅助质粒 pFd6 与 pH22 共转染至 HEK293 细胞中, 每皿质粒用量为 pFd6: pH22: AAV-EGFP=10 μg: 5 μg: 5 μg, 6 h 后换液, 第 2 天再次换液, 待转染后第 3 天病毒包装完成, 即可收集细胞, 收集的细胞可暂时存放于 -80°C。

1.3 细胞裂解方式研究

目前提取病毒的细胞裂解方式有多种, 例如反复冻融法、超声破碎法^[4]、氯仿破碎法^[6]、脱氧胆酸钠破碎法^[7]等。下面采取这些方法分别对 8 皿细胞进行裂解。

反复冻融法: 将细胞重悬于 15 mL PBS 中, 在 -20°C/37°C 反复冻融 3 次裂解。

超声破碎法: 将细胞重悬于 15 mL PBS 中, 使用超声破碎仪破碎, 功率 210 W, 超声 1 s, 停 2 s, 共超声 3 min。

氯仿破碎法: 将细胞重悬于 15 mL PBS 中, 加入 1/10 体积的氯仿, 37°C 震荡 1 h 后, 12000g 离心取上层水相即可。

脱氧胆酸钠破碎法: 将细胞重悬于 7.5 mL PBS 中, 加入含有 1% 脱氧胆酸钠 7.5 mL, 混匀后 37°C 震荡 1 h。

将初步裂解液中加入终浓度为 1 μg/mL 的 RNase 与 DNase, 37°C 孵育 30 min 去除未包装完成的病毒。

1.4 高浓度 NaCl 除杂蛋白

经过初步裂解的裂解液, 里面含有大量的杂蛋白, 为了除去这些杂蛋白, 根据文献[3], 可在裂解液中加入 NaCl 至 1 mol/L, 可沉淀大量的蛋白, 但是 rAAV 不受影响。加入 NaCl 后, 混匀, 12000g, 4°C, 离心 10 min 后取上清即为澄清的病毒裂解液, 此方法可除去约 90% 的杂蛋白。这时裂解液中含有 1 mol/L NaCl, 无法直接进行肝素亲和层析, 将裂解液进行透析操作, 透析液为 20 mmol/L Tris-HCl, 150 mmol/L NaCl, pH 8.0, 透析 2~3 h, 中间换液 1 次。

1.5 亲和层析纯化蛋白

将透析后裂解液使用 0.45 μm 滤膜过滤后, 使用肝素亲和柱进行纯化, 按照说明书操作, 结合缓冲液使用 20 mmol/L Tris-HCl, 150 mmol/L NaCl, pH 8.0, 洗脱缓冲液使用 20 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0, 梯度 NaCl, 浓度梯度为 300 mmol/L、400 mmol/L、500 mmol/L-1、500 mmol/L-2、600 mmol/L、800 mmol/L、1000 mmol/L, 其中 500 mmol/L 为 rAAV 流出的浓度。

这时获得的病毒液中含有高浓度的 NaCl, 采用 100 kD 超滤管对其进行脱盐浓缩, 具体操作为, 首先将病毒液用 0.22 μm 滤头过滤除菌, 然后加入超滤管中, 14000g, 4°C 离心 10 min, 然后加入约 50 μL 无菌 PBS 冲洗超滤膜, 倒转超滤管, 1000g, 4°C 离心 2 min, 即可得到病毒浓缩液。

1.6 rAAV 滴度的测定

由于每个病毒基因组均含有一段 WPRE 元件, 因此通过测定 WPRE 元件的拷贝数来确定病毒的滴度, 采用实时荧光定量 PCR 的方法对浓缩的病毒液进行滴度测定。引物如下:

Forward: TGGCGTGGTGTGCACTGT, Reverse: AAAGGAGCT-GACAGGTGCTG. 使用穿核质粒 AAV-EGFP 为标准品, 通过浓度计算出其每 mL 拷贝数, 梯度稀释, 同时将病毒液用去离子水稀释, 分别标准品和样品进行实时定量 PCR, 引物浓度为 0.5 $\mu\text{mol/L}$, 采用三步法, 预变性 95 $^{\circ}\text{C}$ 、3 min, 变性 95 $^{\circ}\text{C}$ 、10 s; 退火 64.5 $^{\circ}\text{C}$ 、10 s; 延伸 72 $^{\circ}\text{C}$ 、10 s, 扩增 40 轮循环, 滴度以 gene copys/mL 表示。

1.7 rAAV 感染 HEK293 细胞

将 HEK293 细胞种植在六孔板中, 每孔 105 个细胞, 感染前将培养基更换为无血清培养基。按照感染复数 (multiplicity of infection, MOI), 分别在无血清 DMEM 中稀释病毒液, 选择 10^3 、 10^4 、 10^5 、 10^6 的 MOI。吸去孔中培养基, 加入含病毒的 DMEM, 放入培养箱中培养 1 h 后, 更换为完全培养基。在感染后不同时间点分别使用荧光显微镜观察细胞, 并拍摄照片。

1.8 rAAV 感染鼠脑神经元

大鼠饲养于北京理工大学 SPF 级动物房中, 给予充足的饲料和饮水, 12 h 光照/黑暗循环。待大鼠体重达到 280~320 g 时即可进行立体定位手术注射病毒, 注射的脑区为小鼠中脑黑质致密部, 病毒滴度为 10^{13} gene copys/mL, 注射体积为 4 μL 。

按 50 mg/kg 的剂量对大鼠腹腔注射戊巴比妥钠, 待大鼠完全麻醉后, 将头部固定在脑立体定位仪上, 保持颅骨水平位, 通过黑质致密部的坐标: 前囟, -5.3 mm; 中线+2.2 mm; 颅平面: -7.7 mm, 以前囟为原点得到颅骨上相应的位置, 使用颅钻钻透颅骨, 将吸取病毒液的微量注射器深入孔内, 向下移动 7.7 mm, 即为黑质致密部的区域。使用微量注射泵以 1 $\mu\text{L}/\text{min}$ 的速度将病毒液注入鼠脑, 注射完成后留针 3 min 待病毒液扩散, 然后缓慢起针, 缝合创口, 将大鼠继续饲养。

1.9 鼠脑切片与免疫荧光染色

3 周后, 将大鼠用戊巴比妥钠麻醉, 打开胸腔, 使用生理盐水进行心脏灌流, 待全身血液完全被置换后, 断头取脑, 放入 4% 多聚甲醛中固定 24 h, 然后使用 25% 蔗糖脱水。然后使用 OCT 包埋液包埋后进行冷冻切片, 切片厚度为 30 μm 。

使用漂片法进行免疫荧光染色, 将切片使用 5% 山羊血清封闭, 一抗 TH 抗体 1:1000 在 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, 使用 PBS-T (含 0.3% Triton X-100 的 PBS) 清洗 3 次, 每次 5 min, 然后孵育二抗: TRITC 标记山羊抗兔 IgG 1:50, 室温孵育 2 h, PBS-T 清洗 3 次, 每次 5 min。将切片贴在载玻片上并封片, 使用荧光显微镜观察, 拍摄照片。

1.10 数据统计

所有数据均由 Excel 2010 进行统计学分析, 数据以均值 \pm 标准差呈现。

2 结果与分析

2.1 不同裂解方式的比较

图 2 展示了各种裂解方法得到的病毒滴度结果, 从图 2 中可以看出, 反复冻融法得到的 rAAV 滴度最低, 超声破碎法

和氯仿破碎法得到的 rAAV 滴度稍高, 脱氧胆酸钠破碎法得到的 rAAV 滴度最高, 约为 5×10^{12} gene copys/mL 左右, 相对其他方法高出很多。

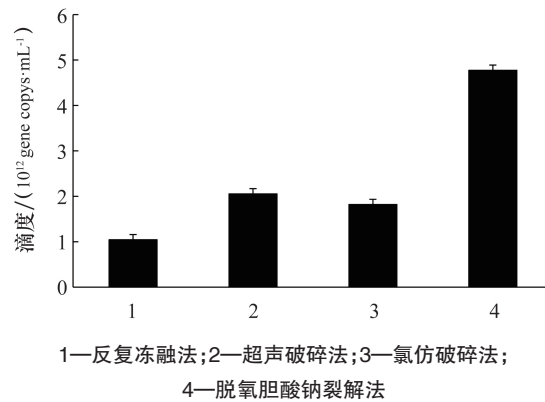


图 2 4 种细胞裂解方式滴度对比

Fig. 2 Comparison of the rAAV titers using four methods in cell lysis

将以上各病毒液以 MOI 为 10^5 感染 HEK293 细胞 48 h 后的结果如图 3 所示, 从图 3 可以看出, 反复冻融法和超声破碎法中发出绿色荧光的细胞数量较少 (图 3(b) 和 3(c)), 氯仿破碎法中绿色荧光细胞稍多 (图 3(d)), 而使用脱氧胆酸钠法中, 发出绿色荧光的细胞较多, 而且荧光强度也较高 (图 3(e))。说明脱氧胆酸钠裂解细胞后提取的 rAAV 效果最好。

因此, 后续实验均采用脱氧胆酸钠破碎法裂解细胞, 纯化并使用超滤管浓缩后, 可以得到 80~120 μL 病毒浓缩液, 通过实时荧光定量 PCR 测定滴度, 其滴度可达 $1\sim 2 \times 10^{13}$ gene copys/mL。

2.2 MOI 对 rAAV 感染细胞效果的影响

图 4 展示的是使用不同 MOI 的 rAAV 感染 HEK293 细胞 3d 后绿色荧光蛋白表达的情况。从图 4 可以看出, 使用 MOI 为 10^2 感染细胞后, 图中几乎没有绿色亮点, 这说明此时没有细胞被感染成功 (图 4(a)), 当 MOI 提高到 10^3 和 10^4 时, 有零星的细胞发出绿色荧光 (图 4(b) 和 4(c)), 再次提高 MOI 至 10^5 时, 可以看到几乎所有的细胞均发出绿色荧光, 这说明 rAAV 可以感染所有的细胞 (图 4(d)), 当 MOI 提高至 10^6 时, 可以看到, 不但所有的细胞均被感染, 而且发出的绿色荧光十分明亮, 这说明细胞中表达出很高的绿色荧光蛋白 (图 4(e))。从以上结果可以看出, 使用 10^6 的 MOI 感染细胞效果较好。

2.3 rAAV 感染细胞的时间进程

图 5 展示的是使用 MOI= 10^6 时, 不同时间点 rAAV 感染 HEK293 细胞的图片。从图 5 可以看出, 在感染后 12 h 时, 已经有细胞出现绿色荧光, 但是数量较少, 荧光亮度也不高 (图 5(a))。感染后 24 h 时, 所有的细胞均出现绿色荧光, 说明此时所有的细胞都被感染, 并表达出绿色荧光蛋白, 但此时表达出的绿色荧光蛋白量仍然不大 (图 5(b))。

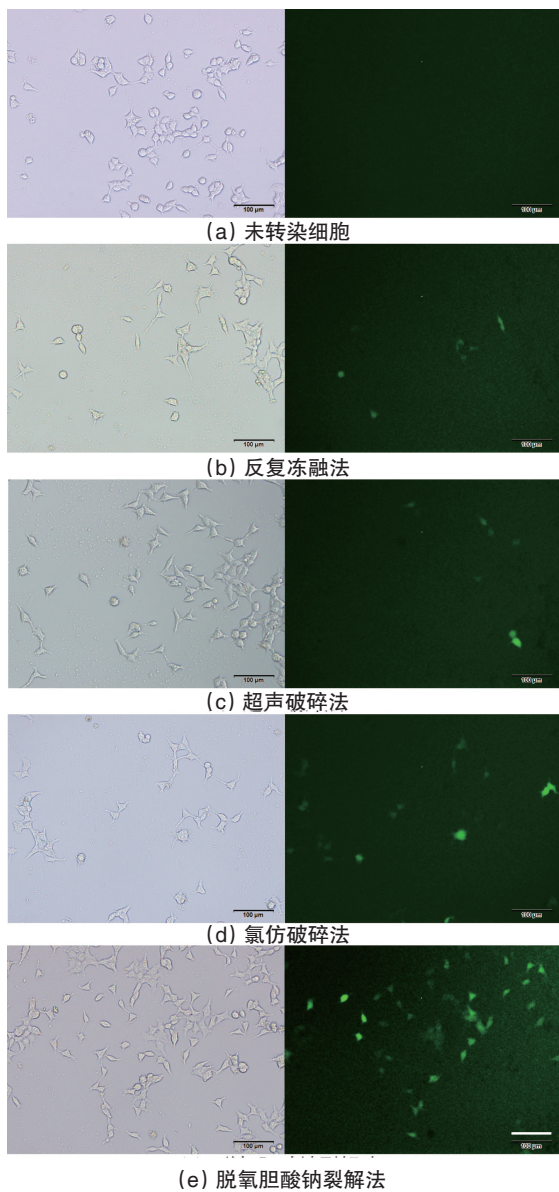


图3 4种细胞裂解方式纯化病毒后感染HEK293细胞结果(标尺=100 μm)

Fig. 3 Comparison of the efficiencies of rAAV transfect HEK293 (scale bar =100 μm)

感染2天之后,细胞内表达绿色荧光蛋白的水平大大增加,细胞表现出十分明亮的绿色荧光(图5(c))。感染3天后细胞绿色荧光蛋白的表达水平继续增加,到第4天时已趋于稳定,这两个时间点细胞均能表达大量的绿色荧光蛋白(图5(d)和5(e))。此结果说明,在体外进行rAAV感染实验,3天是对表达水平进行检测的较好时间点,此时表达水平较高,且表达较为稳定。

2.4 rAAV感染鼠脑结果

中脑黑质致密部是多巴胺能神经元富集的部位,而酪氨酸羟化酶(tyrosine hydroxylase, TH)是多巴胺能神经元的标志物质,在本实验中,对鼠脑中脑区的切片进行TH的免疫组化染色,结果如图6所示。从图6可以看出,在中脑切片

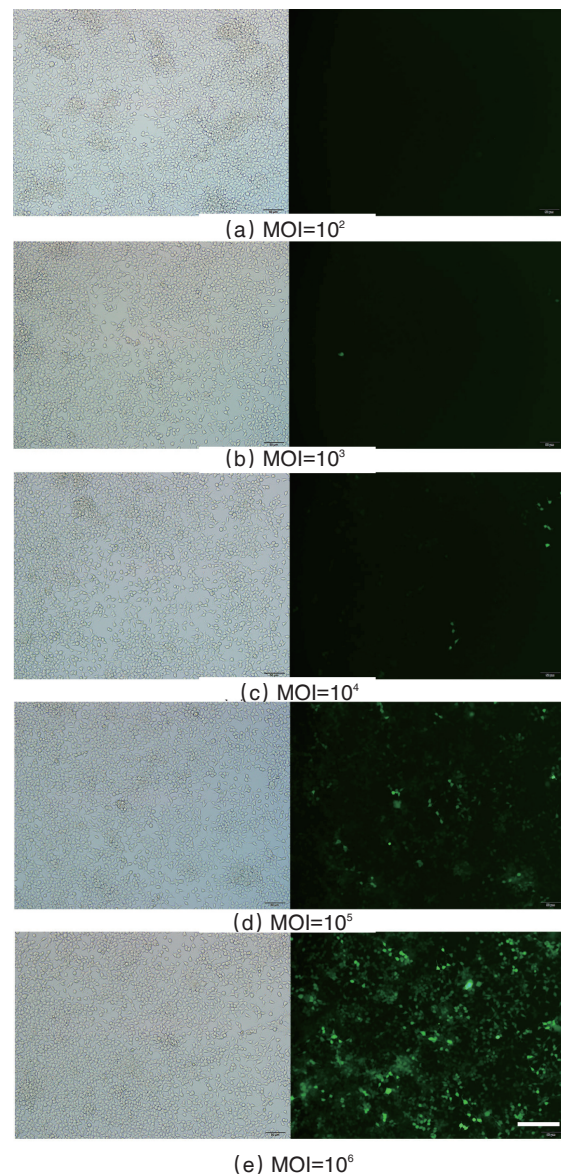


图4 不同MOI的rAAV感染HEK293细胞(标尺=200 μm)

Fig. 4 Transfection of HEK293 using different MOI's (scale bar =200 μm)

rAAV的注射区域上有绿色荧光蛋白表达,说明rAAV可以感染鼠脑中的细胞并表达出绿色荧光蛋白(图6(a))。图6(b)中的红色荧光显示的是在中脑切片上所染出的多巴胺能神经元。将这两张荧光照片合并之后,可以看出,绿色荧光与红色荧光几乎完全吻合,这说明绿色荧光蛋白基本都是在多巴胺能神经元中表达(图6(c))。

3 讨论

rAAV的包装最初是需要辅助病毒如腺病毒的存在之下进行,通过这种方式包装的rAAV在后续的纯化时难免有腺病毒的污染,由于腺病毒感染细胞的能力更强,所以即使污染的腺病毒量很小都会对后续的实验结果造成影响^[8],因

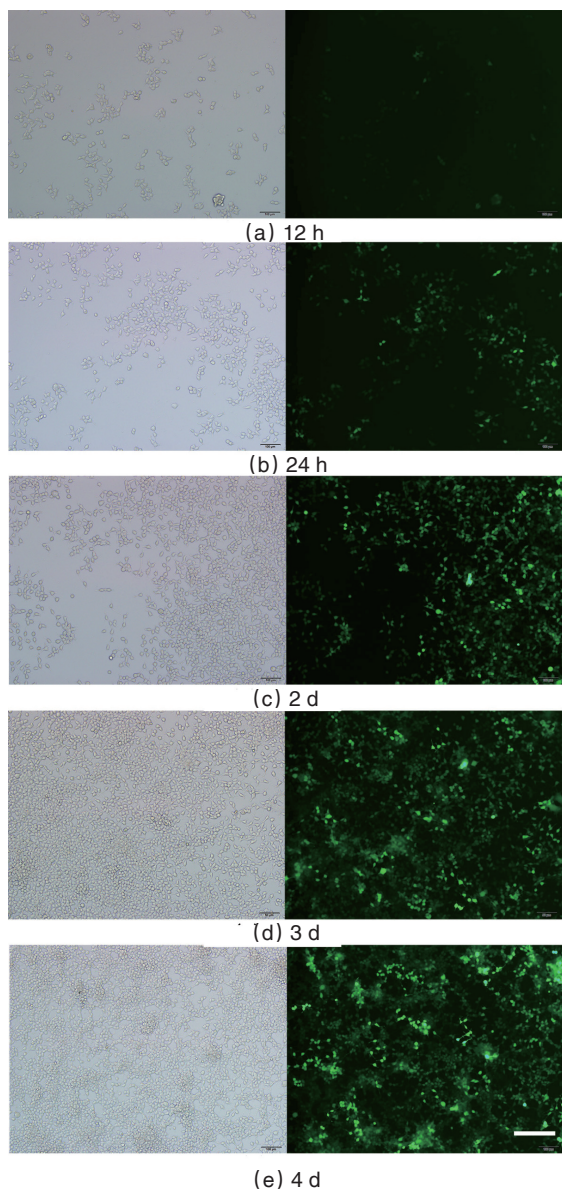


图5 rAAV 感染 HEK293 细胞的时间进程
(标尺=200 μm)

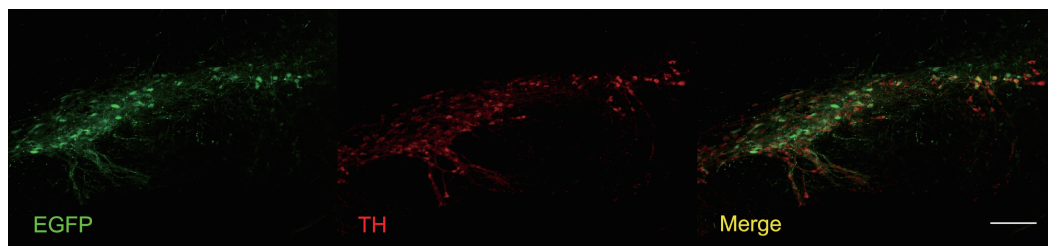
Fig. 5 Different time nodes using rAAV transfect HEK293 (scale bar=200 μm)

此在研究了 rAAV 包装过程中所需的酶等成分后,将这些基因从腺病毒构建到质粒载体上,这样就产生了无辅助病毒的 rAAV 包装方法^[9]。本实验中使用的即为其方法的改进型,通过将含有病毒衣壳蛋白基因的 pFd6、含有包装所需酶的 pH22 与携带 EGFP 基因的穿梭质粒 AAV-EGFP 共转染至 HEK293 细胞中,利用 HEK293 细胞本身所表达的 E1 基因的共同作用之下,包装出携带 EGFP 基因的 rAAV。

由于早期多采用超高速离心的方法对 rAAV 进行纯化^[10],因此对初始细胞量要求较大,一般都使用 15 cm 培养皿甚至滚瓶培养细胞,收取细胞量达到了 8.5×10^8 才能进行一次纯化,而且纯化后的 rAAV 总量也仅有 $(1 \sim 5) \times 10^{12}$ gene copys^[4]。在本实验中,利用 II 型 rAAV 表面受体的特性,使用肝素亲和纯化的方式对 rAAV 进行纯化。本实验总共只使用了 8 个 10 cm 培养皿,细胞总量约为 8×10^7 ,仅为传统方法的 1/10,而且最终得到了 rAAV 总量可达 $(0.8 \sim 2.4) \times 10^{12}$ gene copys,不逊色于超高速离心法,而且无需超高速离心机,方法简便快捷。

由于 rAAV 不像其他多种病毒可自动裂解细胞释放至培养基中,它需要通过破碎细胞才可以释放出来,因此在本实验中也对现有的多种细胞裂解方式进行对比。通过实验证明,使用脱氧胆酸钠破碎法,可以最大程度收取病毒颗粒,在后续对细胞的感染实验也可以证明,在同样的 MOI 下,使用脱氧胆酸钠破碎法能够达到最好的感染效率。这说明反复冻融法和超声破碎法可能对病毒衣壳蛋白造成一定损害,使其感染效率低下。氯仿法的感染效率也较好,但是考虑到氯仿作为有机试剂对操作者可能有伤害,而且残留的氯仿也对后续实验不利,故脱氧胆酸钠破碎法是最合适的破碎细胞的方法。

在体外实验方面,使用 rAAV 感染 HEK293 细胞对感染复数和感染的时间进程进行了研究。在 MOI 的使用方面,一般来说选择 10^5 左右均为常用的 MOI^[11,12],通过本实验的研究发现在 MOI=10⁵ 时,所有细胞均能被 rAAV 感染并表达出 EGFP,但是提高 MOI 至 10^6 可以继续提高表达水平。从时间进程上来看,rAAV 作为一种单链 DNA 病毒^[13],在其感染细胞之后,首先要复制成为双链 DNA,才能达到较好的表达水平,所以在前 12 h 表达水平较低,随着时程的增长,其表达水平越来越



(a) 表达绿色荧光蛋白的细胞 (b) 表达 TH 的多巴胺能神经元 (c) 两种荧光合并图

图6 rAAV 感染大鼠中脑黑质区多巴胺能神经元(标尺=200 μm)

Fig. 6 rAAV transfect the neurons of substantia nigra of rat mid-brain (scale bar =200 μm)

越高,到第3天时已达峰值。通过这些结果,可以对体外感染rAAV病毒起到很好的指导左右。

在体内实验方面,选择了大鼠的中脑黑质区作为研究对象。中脑黑质区是多巴胺能神经元富集的区域,而帕金森病即为黑质区多巴胺能神经元丧失所致,现在有很多利用rAAV在大鼠脑内建模的报道^[14-16]。本实验也使用rAAV注射鼠脑黑质区,结果显示本实验中所制备的rAAV可以特异性地感染中脑黑质致密部的多巴胺能神经元,在其中表达EGFP,其感染效果与文献报道类似。所以使用本实验的方法制备的rAAV完全满足体内实验的要求,可以用于大鼠帕金森病模型的建立等实验。

4 结论

通过对rAAV制备方法进行优化,发现脱氧胆酸钠破碎法可以高效的提取rAAV病毒并且最大程度地保持其活性,然后通过加入高浓度NaCl除去杂蛋白,最后使用肝素柱进行纯化,可以从8个10 cm培养皿培养的HEK293细胞中纯化出总量超过 10^{12} gene copys的rAAV病毒。此rAAV可成功地在体内和外感染细胞表达出其携带的EGFP蛋白,其中体外方面,发现 $MOI=10^6$,在感染3天可以达到最大程度的表达效果;在体内方面,将其注射入大鼠中脑黑质区,可以感染多巴胺能神经元表达蛋白。本研究建立了一套小量,低成本的rAAV病毒纯化方法,其纯化得到的rAAV病毒具有良好的应用价值。通过本实验建立的方法,可以在动物体内进行基因过表达实验,在所研究的组织部位导入基因进行局部的过表达,研究此基因发挥的效应,或者导入含有siRNA的基因,对基因进行敲低实验。

参考文献(References)

- [1] 唐彬秩,秦豪杰,傅强,等.重组腺相关病毒:很有潜力的基因治疗载体[J].生物化学与生物物理进展,2006,33(8):711-718.
Tang Binzhi, Qing Haojie, Fu Qiang, et al. rAAV: a promising vehicle for gene therapy[J]. Progress in Biochemistry and Biophysics, 2006, 33(8): 711-718.
- [2] Merten O-W, Al-Rubeai M. Viral vectors for gene therapy: Methods and protocols[M]. New York: Humana Press, 2011.
- [3] 高凯,王军志.不同血清型腺相关病毒载体组织表达差异的研究进展[J].中国肿瘤生物治疗杂志,2007,14(4):388-392.
Gao Kai, Wang Junzhi. Expression of different serotypes of adeno-associated virus vectors: an update[J]. Chinese Journal of Cancer Biotherapy, 2007, 14(4): 388-392.
- [4] Liu Y L, Wagner K, Robinson N, et al. Optimized production of high-titer recombinant adeno-associated virus in roller bottles[J]. BioTechniques, 2003, 34(1): 184-189.
- [5] Green M R, Sambrook J. Molecular cloning: a laboratory manual[M]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2012.
- [6] 吴小兵,董小岩,伍志坚,等.一种快速高效分离和纯化重组腺病毒伴随病毒载体的方法[J].科学通报,2000,45(19):2071-2075.
Wu Xiaobing, Dong Xiaoyan, Wu Zhijian, et al. A rapid and effective method of separation and purification for recombinant adeno-associated virus[J]. Chinese Science Bulletin, 2000, 45(19): 2071-2075.
- [7] 刁勇,马健,李欣燕,等.表达血管抑制因子的腺相关病毒载体的构建及其体内外活性[J].生物工程学报,2008,24(11):1949-1954.
Diao Yong, Ma Jian, Li Xinyan, et al. Construction and activity of recombinant adeno-associated virus Expressing Vasostatin[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2008, 24(11): 1949-1954.
- [8] Grimm D, Kern A, Rittner K, et al. Novel tools for production and purification of recombinant adenoassociated virus vectors[J]. Human Gene Therapy, 1998, 9(18): 2745-2760.
- [9] Xiao X, Li J, Samulski R J. Production of high-titer recombinant adeno-associated virus vectors in the absence of helper adenovirus[J]. Journal of Virology, 1998, 72(3): 2224-2232.
- [10] Grieger J C, Choi V W, Samulski R J. Production and characterization of adeno-associated viral vectors[J]. Nature Protocols, 2006, 1(3): 1412-1428.
- [11] 马宏,刘彦信,刘士廉,等.腺相关病毒介导的肿瘤坏死因子相关细胞凋亡诱导配体的表达及其体外抗肿瘤活性的研究[J].中华医学杂志,2004,84(19):1635-1641.
Ma Hong, Liu Yanxin, Liu Shilian, et al. Expression of TRAIL114-281 mediated by adeno-associated virus and its tumoricidal activity [J]. National Medical Journal of China, 2004, 84(19): 1635-1641.
- [12] Zhang T, Hu J, Ding W, et al. Doxorubicin augments rAAV-2 transduction in rat neuronal cells[J]. Neurochemistry International, 2009, 55(7): 521-528.
- [13] 赵丽琴,席斌,彭华松.腺相关病毒(AAV)载体研究进展[J].生物技术进展,2012,2(2):110-115.
Zhao Liqin, Xi Bin, Peng Huasong. Advances on Research of Adeno-associated Virus Vectors[J]. Current Biotechnology, 2012, 2(2): 110-115.
- [14] Decressac M, Mattsson B, Lundblad M, et al. Progressive neurodegenerative and behavioural changes induced by AAV-mediated overexpression of alpha-synuclein in midbrain dopamine neurons[J]. Neurobiology of Disease, 2012, 45(3): 939-953.
- [15] Mulcahy P, O'doherty A, Paucard A, et al. The behavioural and neuropathological impact of intranigral AAV- alpha-synuclein is exacerbated by systemic infusion of the Parkinson's disease-associated pesticide, rotenone, in rats[J]. Behavioural Brain Research, 2013, 243: 6-15.
- [16] Oliveras-Salva M, Macchi F, Coessens V, et al. Alpha-synuclein-induced neurodegeneration is exacerbated in PINK1 knockout mice[J]. Neurobiology of Aging, 2014, 35(11): 2625-2636.

(编辑 田恬)

《科技导报》征集“封面文章”

为快速反映中国最新科技研究成果,《科技导报》拟利用刊物最显著位置——封面将最新科研成果第一时间予以突出报道。来稿要求:研究成果具创新性或新颖性;反映该领域中国乃至世界前沿研究水平;可以图片形式予以反映,图片美观、清晰、分辨率超过300dpi;文章篇幅不限,要说明研究的背景、方法、取得的结果,以及结论。在线投稿:www.kjdb.org。