

HIV-1 缺损慢病毒载体的高滴度制备及其介导的高效基因转移

曾令兵^{1,2,3} 张 林¹ 孟 彦¹ Yuanan Lu² 叶林柏³

(¹ 中国水产科学研究院长江水产研究所 荆州 434000)

(² Retrovirology Research Laboratory, Pacific Biosciences Research Center, University of Hawaii at Manoa, Honolulu, Hawaii 96822, USA)

(³ 武汉大学生命科学学院病毒学国家重点实验室 武汉 430072)

摘 要 近来,慢病毒载体引起了极大关注,已成为转基因操作中重要的工具。用编码病毒组份的三质粒系统共转染 293T 包装细胞系,建立了大量制备 HIV-1 缺损慢病毒载体的方法,病毒载体的滴度可达到 1.1×10^7 IU/mL,离心浓缩可将载体滴度提高 100 倍以上。HIV-1 缺损慢病毒载体可以高效转导人淋巴瘤等多种来源的细胞,RT-PCR 检测显示外源基因 GFP 稳定表达达 18 个月以上,长期传代观测未检出 p24 抗原蛋白或可复制病毒。

关键词: HIV-1 慢病毒载体,制备,高滴度,基因转移,效率

中图分类号: Q786, Q934.2 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2007)06-1060-06

在人类疾病基因治疗和转基因动植物研究中,载体或基因转移系统有着十分重要的地位^[1]。来源于多种病毒的载体,如逆转录病毒、腺病毒、腺联病毒、杆状病毒以及疱疹病毒等,日益受到人们的重视^[2]。在这些病毒载体中,来源于人免疫缺陷病毒 1 型(HIV-1)的慢病毒载体因其具有转移基因容量大、转导效率高以及可将外源基因整合至靶细胞基因组实现外源基因持续稳定表达等特点,已被广泛应用于多种细胞的转基因研究,如肝细胞^[3]、造血细胞^[4]、人胚胎干细胞^[5]、淋巴细胞^[6]、单核细胞/巨噬细胞^[7]以及神经细胞^[8]等。

为了更进一步探索 HIV-1 缺损慢病毒载体作为基因治疗和转基因载体的潜力,有必要建立高效稳定地制备高滴度病毒载体的方法,以及对载体转导不同来源细胞的能力、可复制病毒的检测以及转导细胞中外源基因表达等进行研究。本文报道了这一研究的结果。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂和仪器:生物安全柜(SterilGARD Hood, Class II Type A/B3, Baker Co. Inc.);荧光倒置显微镜(Olympus IX70);PCR 扩增仪(GeneAmp 9700, ABI);二氧化碳培养箱(Forma Scientific);紫外分光光度计(Beckman DU640);凝胶成像系统(Bio-Rad,

Chemi DOC XRS);超速离心机(Beckman-Coulter Optima LE-80K);低速冷冻离心机(Centra GP8R, IEC)培养基 MEME(Minimum Essential Medium Eagle's), DMEM(Debecco's Minimum Essential Medium Eagle), RPMI-1640、两性霉素 B、青霉素/链霉素、Dulbecco's 磷酸盐缓冲液(DPBS), L-谷氨酰胺、胰蛋白酶-EDTA(Typsin-EDTA), HEPES、异丙醇、氯奎等均购自 Sigma 公司;质粒 DNA 提取和总 RNA 提取采用 Qiagen 试剂盒;p24 抗原蛋白酶免疫检测试剂盒为 Coulter Beckman 产品;精制胎牛血清(Defined Fetal Bovine Serum, DFBS)为 Hyclone 产品。

1.1.2 质粒:采用三质粒系统制备 HIV-1 缺损慢病毒载体,即包装质粒、转移质粒以及外膜质粒。质粒材料由 Rochester 大学 V. Planelles 教授惠赠^[7,9]。包装质粒 pCMV Δ R8.2 Δ vpr 去除了 HIV-1 所有顺式作用元件和 vpr 基因,反式提供载体所需要的病毒结构蛋白,启动子来源于巨细胞病毒(CMV)。转移质粒 DHIV-Rev-RRE + 去除了病毒的结构蛋白 gag、pol、env 基因以及附属基因 vif、vpr、nef 并失活了 Rev 的第二个外显子,保留有包装信号等顺式元件,插入了绿色荧光蛋白报告基因,启动子为 HIV-1 的长末端重复序列 LTR。外膜质粒 pCMV-VSV-G 为表达滤泡性口膜炎病毒 G 蛋白(VSV-G)的质粒,启动子来源于巨细胞病毒(CMV),使载体包装后形成假性病毒。所有质粒用 Qiagen 试剂盒制备,Beckman DU-

640 紫外分光光度计测定质粒 DNA 浓度。

1.1.3 细胞:人 T4 淋巴瘤细胞瘤细胞系 CEM-ss、非洲绿猴肾细胞系 COS-7 及非霍京氏 T 淋巴瘤细胞系 Sup-T1 使用含 10% DFBS 的 RPMI-1640 培养基培养;人胚肾细胞系 293T、鼠胚胎细胞系 NIH3T3、人 T 细胞白血病细胞系 MT-2 以及鼠胚胎杂交瘤细胞系 PA-317 用含 10% DFBS 的 DMEM 培养基培养;猴肾细胞系 Vero、人子宫颈上皮腺瘤细胞系 Hela、人肺纤维母细胞 WI-38 以及人神经胶质瘤细胞系 HTB-14 用含 10% DFBS 的 MEME 培养基培养。所有细胞培养在 37℃ 5% CO₂ 的培养箱中培养。使用 Olympus IX70 倒置荧光显微镜观察细胞和照相记录结果。

1.2 HIV-1 缺损慢病毒载体制备和滴度测定

用 293T 包装细胞制备 HIV-1 缺损慢病毒载体。在质粒 DNA 共转染 293T 细胞前 24h,消化传代 293T 细胞,每个 T-75 的细胞培养瓶(75cm², Corning)接种 6×10^6 个细胞,于 37℃ 5% CO₂ 的培养箱中培养。质粒转染前 2~3h,更换细胞培养基,添加新鲜培养基。转染程序如下:根据质粒 DNA 的浓度以及转染细胞的数量计算出每种质粒的需要量,以一个 T-75 细胞培养瓶为单位计算,需用包装质粒 6.25μg、转移质粒 6.25μg 和外膜质粒 2.50μg。将 3 种质粒依次加入一定量的分子生物学级无菌蒸馏水中(总体积 480μL/T-75),混合均匀,然后再滴加 2mol/L 氯化钙溶液 66μL,混合均匀,冰浴 5min,再滴加 2xHBS 溶液 555μL,混合均匀,冰浴 20min。用移液管吸取 1100μL DNA 溶液滴加至 T-75 细胞培养瓶内,加入 1mol/L 的氯奎溶液,使其终浓度至 25μmol/mL。轻轻摇匀,然后置 37℃ 5% CO₂ 培养箱内培养。培养 8h 后,更换新鲜培养基,血清浓度为 2%。分别在转染后的第 1、第 2 和第 3 天采取完全更换新鲜培养液和不更换培养液两种方式收集制备的载体,在 CEM-ss 细胞上测定转染后每天以及累积的病毒载体滴度。同时,收集去除培养液后的细胞,加等量新鲜培养基,冻融一次释放细胞内载体(cell-associated vector),并测定载体滴度。

1.3 HIV-1 缺损慢病毒载体浓缩

收获不同批次制备的病毒载体于-80℃保存。离心浓缩前,室温融化后混合,然后于 4000r/min 4℃ 条件离心 30min,收集上清,0.45μm 滤器过滤,滤液转入离心管中(Beckman SW28 转子),每管 35.0mL,然后缓慢加入 50% 的蔗糖溶液 0.3mL 至离心管底部,于 4℃ 条件下 $113\,000 \times g$ 离心 2.5h。每管沉淀

用 0.2mL 不含血清和抗生素的 RPMI-1640 悬浮,混合均匀后分装于 0.5mL 小管,每管 0.1~0.2mL, -80℃ 保存备用。

1.4 不同感染复数 HIV-1 载体转导 CEM-ss 细胞的效率

以感染复数(Multiplicity of Infection, MOI)为 1、5、20 和 50 的 HIV-1 缺损慢病毒载体分别转导 CEM-ss 细胞,测定载体在 CEM-ss 细胞上的转导效率。程序如下:取 1.5mL 离心管 4 支,每管加入 1.0×10^5 个 CEM-ss 细胞,3000r/min 离心 4min 沉淀细胞至管底,弃去上清。用不含血清和抗生素的 RPMI-1640 培养基稀释病毒载体至不同的 MOI 值。用稀释好的病毒载体溶液分别将细胞均匀悬浮,添加 polybrene 至终浓度 8μg/mL,置离心管于 37℃ 5% CO₂ 培养箱中孵育 2h 进行转导,每隔 15min 轻轻颠倒离心管 1 次,混匀细胞。转导完毕后,用无血清和抗生素的 RPMI-1640 培养基洗涤细胞一次,再用含 5% DFBS 的 RPMI-1640 培养基 1mL 均匀悬浮细胞,接种至 24 孔培养板中(Corning),每孔 0.5mL,加盖塑料膜,37℃ 5% CO₂ 培养箱培养。72h 后于荧光显微镜下观察细胞转导效果,计数不同 MOI 条件下转导细胞表达荧光蛋白的细胞的百分率。

1.5 HIV-1 缺损慢病毒载体对不同细胞系的转导能力

11 种来源于人和动物的细胞系 CEM-ss, MT-2, Sup-T1, COS-7, PA-317, 293T, NIH3T3, Hela, Vero, WI-38 以及 HTB-14 用来测定 HIV-1 缺损慢病毒载体转导不同细胞的能力。在细胞的指数生长期收获细胞,将细胞浓度调整至 2.0×10^5 细胞/mL,分装于 1.5mL 离心管中,每管 1mL,3000r/min 离心 4min 沉淀细胞至管底,弃去上清。用 polybrene 终浓度为 8μg/mL 不含血清和抗生素的 RPMI-1640 培养基以 10 系列稀释载体($10^{-1} \sim 10^{-8}$)。每一个稀释度的病毒载体各取 1mL 均匀悬浮离心管中的细胞,置 37℃ 5% CO₂ 培养箱孵育 1h,每间隔 15min 轻摇离心管 1 次,混匀细胞。1h 后 3000r/min 离心 4min 沉淀细胞,再用不含血清和抗生素的 RPMI-1640 洗涤一次,最后用 1mL 含 2% DFBS 的 RPMI-1640 培养基悬浮细胞,接种于 96 孔微量培养板中,每孔 0.1mL(2.0×10^4 个细胞),每个稀释度接种 8 孔,加盖塑料膜,培养板置 37℃ 5% CO₂ 培养箱中培养。72h 后用荧光显微镜观察表达绿色荧光蛋白的细胞,记录载体最低稀释浓度有绿色荧光蛋白基因表达的培养板孔数,依

Reed-Muench 法计算载体在不同细胞中的滴度。

1.6 HIV-1 缺损慢载体转导 CEM-ss 细胞的克隆以及长时间培养

采用有限稀释法克隆 HIV-1 缺损慢病毒载体转导的 CEM-ss 细胞。程序如下:首先制备条件培养基,收集培养 HIV-1 缺损慢病毒载体转导的 CEM-ss 细胞上清液,离心除去细胞碎片,按 1:1 比例加入新鲜生长培养基即可。然后显微镜下计数细胞,确定细胞浓度,用条件培养基稀释转导的 CEM-ss 细胞至每 0.1mL 含 0.1 至 1 个细胞的浓度,最后接种稀释的细胞于 96 孔培养板中,每孔 0.1mL,加盖塑料膜,于 37℃ 5% CO₂ 培养箱培养。约 4~5d 后荧光显微镜观察表达绿色荧光蛋白的细胞,将单个细胞长成的克隆转移至 12 孔培养板中继续培养,7~10d 后再转移至 T-25 培养瓶中。克隆的细胞每 4~7d 传代一次,持续观察绿色荧光蛋白(GFP)基因的表达,并用 RT-PCR 方法检测细胞总 RNA 中绿色荧光蛋白基因的表达。

1.7 可复制病毒的检验

采取两种方法检验是否在转导的细胞中 HIV-1 缺损慢病毒载体通过同源重组产生了可复制的活病毒。一种是 ELISA 法检测转导细胞中病毒抗原蛋白 p24。收集载体转导细胞不同传代次数(第 8~10 代和第 40 代以后)的细胞培养基上清,4000r/min 离心 20min 后收集上清,ELISA 法检测 p24 抗原蛋白,判定是否有可复制病毒产生。第二种方法是检测转导细胞上清液中是否有具感染性的病毒颗粒。具体步骤是:收集转导细胞培养基,4000r/min 离心 20min 后收集上清,0.22μm 滤器过滤,滤液与含 5% DFBS 的新鲜培养基 RPMI-1640 或 DMEM 按 1:1 比例混合,分别培养正常的 CEM-ss,Sup-T1 细胞和 MT-2 细胞,持续一个月,荧光显微镜下观察细胞,检验是否出现表达绿色荧光蛋白的细胞。

2 结果

2.1 HIV-1 缺损慢病毒载体制备与浓缩

采用磷酸钙共沉淀转染法在 293T 包装细胞上制备 VSV-G 外膜包装的 HIV-1 缺损慢病毒载体。293T 细胞转染前,细胞形态均一,单层稳定,细胞单层约 70% 左右(图 1-A)。细胞转染后 24h,大约有 70% 的细胞表达绿色荧光蛋白,转染后 48~72h,高于 90% 的细胞能表达绿色荧光蛋白报告基因(图 1-B)。所制备载体在 CEM-ss 细胞上的滴度第 1 天达

到了 7.8×10^6 IU/mL 左右,转导后第 2 天载体滴度上升显著,此时表达荧光蛋白基因的细胞上升至 90% 以上,病毒载体滴度达到了 1.0×10^7 IU/mL 以上。细胞转导后的第 3 天病毒载体的滴度下降明显,只有 6.2×10^6 IU/mL 左右。在不更换培养基的条件下,第 3 天载体的累计滴度最高,达到了 1.2×10^7 IU/mL,但与第 2 天的载体滴度相差不显著,说明绝大多数载体是在转染后 24~48h 内产生的(图 2)。分别测定了转染细胞释放到培养基悬液中和细胞内载体的滴度,结果表明绝大多数载体已经被释放在培养基中,以游离形式存在(cell-free vector),而细胞结合载体(cell-associated vector)只有很少一部分(图 3)。HIV-1 缺损慢病毒载体经离心浓缩后,载体滴度提高了 100 倍以上,而载体在浓缩时的回收效率保持 80% 以上(表 1)。

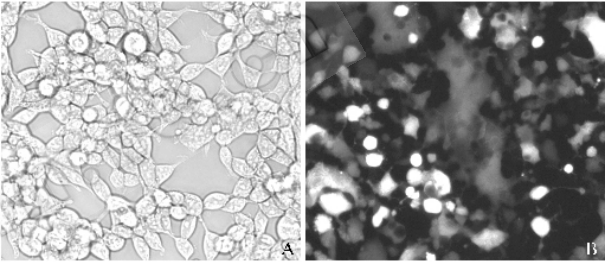


图 1 (A) 正常 293T 细胞(200×)(B) 转染 293T 细胞中 GFP 基因表达(200×)

Fig.1 (A) Normal 293T cell (200×)(B) GFP gene expression in transfected 293T cell (200×).

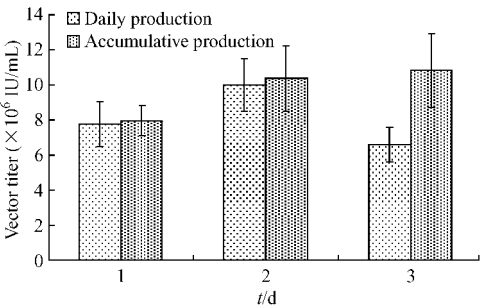


图 2 转染后载体滴度的测定

Fig.2 Vector titer after transfection.

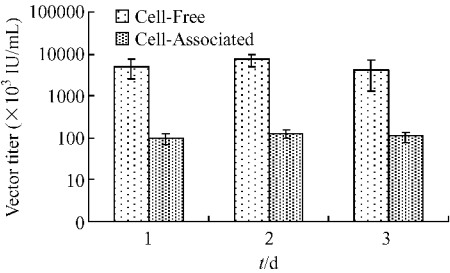


图 3 培养基悬液中与细胞内载体滴度比较

Fig.3 Comparison of titer of cell-free vector and cell-associated vector.
© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

表 1 HIV-1 缺损慢病毒载体超离心浓缩前后滴度的比较

Table 1 Comparison of HIV-1 defective lentivector before and after concentration

DHIV-Rev-RRE +	Titer(IU/mL)	Volume/mL	Titer(IU/mL)	Volume/mL	Increase in titer , (x times)	Decrease in volume (x times)	Recovery rate %
Test 1	7.5×10^6	415	1.0×10^9	2.7	133.3	153.7	86.7
Test 2	1.1×10^7	430	1.3×10^9	3.0	108.3	143.3	82.5

2.2 HIV-1 载体转导 CEM-ss 细胞的效率

HIV-1 缺损慢病毒载体 DHIV-Rev-能高效转导 CEM-ss 细胞。当病毒载体的感染复数(MOI)为 1 时 ,约 30%的 CEM-ss 被有效转导 ;当 MOI 值增加到 5 时 ,约有 59%的细胞被转导 ;当 MOI 值达到 20 时 ,约 82%的细胞被转导 ;MOI 值达到 50 时 ,HIV-1 缺损慢病毒载体对 CEM-ss 细胞的转导效率达到了 90%以上(图 4)。

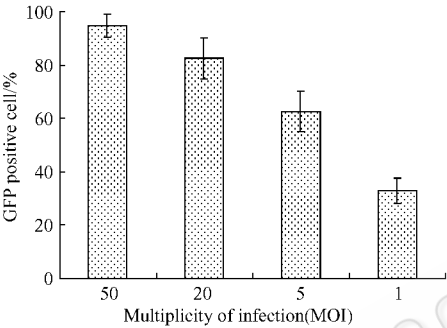


图 4 HIV-1 缺损慢病毒载体在 CEM-ss 细胞上的转导效率

Fig. 4 Transduction efficiency of HIV-1 defective lentivector in CEM-ss cell.

2.3 HIV-1 载体对不同来源细胞的转导能力

在相同的条件下使用同样浓度的 HIV-1 缺损慢病毒载体转导不同来源的细胞 ,结果表明 ,所有使用的细胞都对 HIV-1 缺损慢病毒载体敏感 ,但其转导效率有显著差异。人淋巴瘤细胞 CEM-ss ,MT-2 ,Sup-

T1 和胶质瘤细胞 HTB-14 对 HIV-1 缺损慢病毒载体的转导最为敏感 ,Hela、293T、COS-7、WI-38 和 Vero 细胞次之 ,相比之下 ,NIH3T3 和 PA-317 细胞对 HIV-1 缺损慢病毒载体的转导能力最低(图 5)。

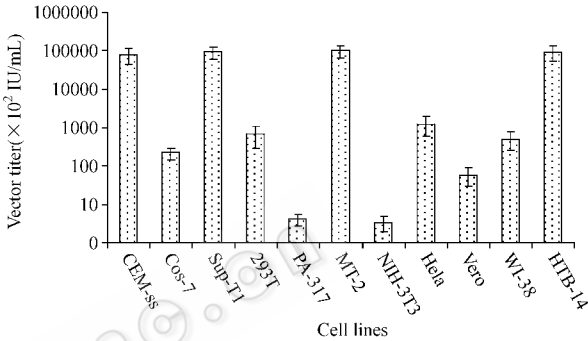


图 5 HIV-1 缺损慢病毒载体对不同来源细胞的转导能力

Fig. 5 Capacity of transduction of HIV-1 defective lentivector in different cells.

2.4 HIV-1 缺损慢病毒载体转导 CEM-ss 细胞的克隆及长时间培养

采用有限稀释法在 96 孔培养板上进行 HIV-1 缺损慢病毒载体转导的 CEM-ss 细胞的克隆培养获得成功 ,克隆的载体转导细胞 CEM-ss 连续传代超过 60 多代 ,达 18 个月以上 ,细胞形态和生长特性等没有明显的变化 ,可稳定地表达绿色荧光蛋白报告基因(图 6-A ,B)。RT-PCR 法检测结果表明 ,转导细胞中绿色荧光蛋白基因可持续稳定地表达(图 6-C)。

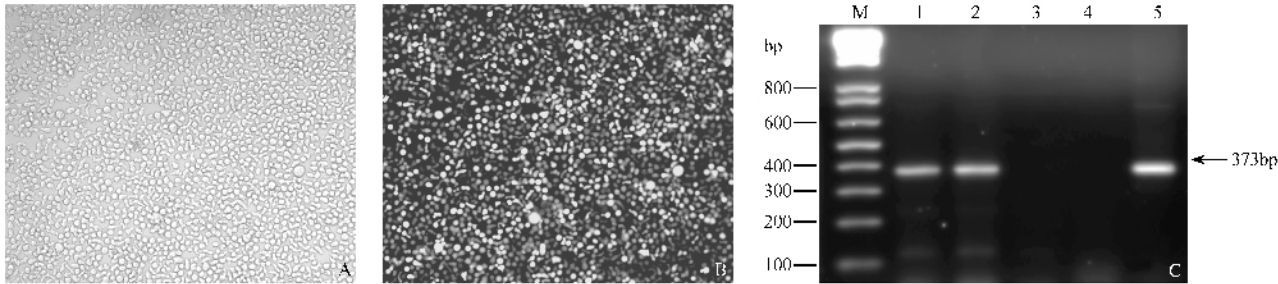


图 6 HIV-1 缺损慢病毒载体转导的 CEM-ss 细胞的克隆培养与 GFP 基因的稳定表达

Fig.6 Cloning culture and GFP gene expression in HIV-1 defective lentivector transduced CEM-ss cells. A : HIV-1 defective lentivector transduced CEM-ss cells cloning culture , passage 60 , normal light ; B : Passage 60 , fluorescent light ; C : RT-PCR detection of GFP gene stable expression in transduced CEM-ss cells. Lane 1 : 1kb DNA ladder ; Lane 2 : 9th passage transduced CEM-ss cell RNA ; Lane 3 : 48th passage transduced CEM-ss RNA ; Lane 4 : Normal CEM-ss cell RNA control ; Lane 5 : ddH₂O control ; Lane 6 : Positive control.

2.5 可复制病毒的检测

采用 ELISA 法检测转导细胞培养液中 p24 抗原蛋白以及用过滤处理的转导细胞培养液上清液直接培养正常 CEM-ss、MT-2 和 Sup-T1 细胞的方法,检测 HIV-1 缺损慢病毒载体转导细胞是否产生了可复制的病毒,试验样品包括早期传代培养(8~10代)的转导细胞和传代培养 40 代以后的转导细胞,用于检测的细胞至少观察 1 个月时间,并通过部分更换培养基的方式保持细胞的生长活性。结果均没有检测到 p24 抗原蛋白或可复制的病毒。

3 讨论

作为基因转移系统,病毒载体在人类疾病基因治疗技术研究以及转基因动物制备中具有十分重要的作用。来源于人免疫缺陷病毒 I 型的 HIV-1 缺损慢病毒载体是向靶细胞导入外源基因的重要工具之一。HIV-1 缺损慢病毒载体可以高效转导众多不同来源的细胞,并将其基因组整合在宿主染色体上,实现持续稳定的外源基因表达。影响 HIV-1 载体转导效率的一个重要因素是载体的滴度,而制备高滴度的载体与包装细胞的状态密切相关。293T 细胞作为包装细胞已被广泛用来制备 HIV-1 慢病毒载体^[10,11]。在转染细胞时,处于指数期生长的细胞以及适当的密度对于提高病毒载体的滴度十分重要。我们的结果表明,转染前 24h 进行 293T 细胞传代,于 T-75 培养瓶中接种 6.0×10^6 个细胞,24h 后细胞可以生长成 70% 的单层。比较 3 种不同细胞单层的包装细胞所制备的病毒载体的滴度,70% 单层细胞明显高于 50% 和 90% 单层细胞所生产的载体滴度,并且转染后细胞的稳定性较好(数据未列出)。

测定不同时间载体滴度的主要目的是为了确定收获载体的最佳时间。293T 细胞转染后 24h,大约有 70% 的细胞表达绿色荧光蛋白,第 1 天载体滴度达到了 7.8×10^6 IU/mL 左右,而转导后第 2 天载体滴度上升显著,病毒载体滴度达到了 1.0×10^7 IU/mL 以上,此时表达荧光蛋白基因的细胞上升至 90% 以上。细胞转导后的第 3 天病毒载体的滴度下降明显,此时细胞单层开始收缩,有些已经开始脱落或裂解。在不更换培养基的条件下,第 3 天载体的累计滴度虽然最高,但与第 2 天的载体滴度相差不显著,说明绝大多数载体是在转染后 24~48h 内产生的。通过测定细胞培养液中载体和细胞结合载体的滴度,发现绝大部分载体是以游离形式存在。由于转染细胞在晚期(72h 以后)会出现脱落、裂解而产

生细胞碎片,这些碎片在载体浓缩时会给载体的纯度带来影响,收集载体时应在载体滴度最高且尽量避免细胞已经发生脱落或裂解。因此,我们认为,收集 HIV-1 缺损慢病毒载体的最佳时间应是细胞转染后 48~72h,并且直接收集培养基上清即可。此时,载体的滴度达到最高,并且细胞单层比较稳定。

HIV-1 本身的外膜蛋白非常脆弱,并且 HIV-1 本身的外膜蛋白感染嗜性宿主范围非常有限^[12],只能转导有限的细胞类型。由于 VSV-G 的受体是磷酸脂质转运体,有广泛的嗜性,而质粒表达的 VSV-G 蛋白可以包装的 HIV-1 缺损慢病毒载体成为假型病毒^[11,13],使得 HIV-1 来源的缺损慢病毒载体可以转导众多类型的细胞,包括非分裂细胞和终末分化细胞,提高了载体作为基因转运工具的潜力。我们的结果表明,对 11 种来源于人和动物的细胞,HIV-1 缺损慢病毒载体都能成功进行转导,而且在多种细胞中转导效率达到了很高的水平,并且因载体能整合到基因组的特性而实现持续稳定地表达外源基因。不仅如此,由于 VSV-G 外膜蛋白的稳定性,使得 VSV-G 包装的 HIV-1 缺损慢病毒载体也非常稳定,这对于探索高效基因转移有重要意义^[11,13]。本项研究中,我们建立的浓缩 HIV-1 缺损慢病毒载体的方法,包括先低速离心,然后 $0.45 \mu\text{m}$ 滤膜过滤去除细胞碎片,再高速离心沉淀载体颗粒,其滴度可达到 10^9 IU/mL,较之浓缩前提高 100 多倍,并且载体的回收率达到 80% 以上。高滴度的载体有利于提高基因转达的效率,载体滴度高意味着它可以在一次转导试验中比较容易地转导更多的靶细胞,达到较高的效率,而不需通过长时间的药物筛选阳性克隆,减少了对转导细胞不必要的操作或损伤。利用高滴度的载体在人体细胞上实现高效率的转导也有很大的意义,比如,如果需要对人体来源的细胞在体外转导,然后回输机体(ex vivo),而使用 HIV-1 缺损慢病毒载体就可在尽可能短的时间内高效转导细胞然后再迅速输回体内,可以大大减少体外操作对靶细胞带来的生物学和功能上的影响。

在制备 HIV-1 缺损慢病毒载体以及在使用 HIV-1 缺损慢病毒载体进行基因转移时,人们普遍会担心可能因载体结构的同源重组而产生可复制病毒的问题。我们对实验中多批次的 HIV-1 缺损慢病毒载体进行了可复制病毒的检测,并且对克隆培养的载体转导细胞 CEM-ss 进行了长期传代观察,没有检测到可复制病毒。这一结果在某种程度上说明 HIV-1 缺损慢病毒载体是安全可靠的。

参 考 文 献

- [1] Verma IM , Somia N. Gene therapy—promises , problems and prospects. *Nature* , 1997 , **389** : 239 – 242.
- [2] Kootstra NA , Verma IM. Gene Therapy with viral vectors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* , 2003 , **43** : 413 – 439.
- [3] Follenzi A , Battaglia M , Lombardo A , *et al.* Targeting lentiviral vector expression to hepatocytes limits transgene-specific immune response and establishes long-term expression of human antihemophilic factor IX in mice. *Blood* , 2004 , **103** : 3700 – 3709.
- [4] Deola S , Scaramuzza S , Birolo RS , *et al.* Mobilized blood CD34⁺ cells transduced and selected with a clinically applicable protocol reconstitute lymphopoiesis in SCID-hu mice. *Hum Gene Ther* , 2004 , **15** : 305 – 311.
- [5] Ma Y , Ramizane A , Lewis R , *et al.* High-level sustained transgene expression in human embryonic stem cells using lentiviral vectors. *Stem Cells* , 2003 , **21** : 111 – 117.
- [6] Costello E , Munoz M , Buetti E , *et al.* Gene transfer into stimulated and unstimulated T lymphocytes by HIV-1-derived lentiviral vectors. *Gene Ther* , 2002 , **7** : 596 – 604.
- [7] Zeng LB , Planelles V , Sui ZY , *et al.* HIV-1-based lentiviral vectors efficiently transduce human monocyte-derived macrophages and suppress replication of wild-type HIV-1. *J Gene Med* . 2006. **8** : 18 – 28.
- [8] Wong LF , Azzouz M , Walmsley LE , *et al.* Transduction patterns of pseudotyped lentiviral vectors in the nervous system. *Mol Ther* , 2004 , **9** : 101 – 111.
- [9] Klimatcheva E , Planelles V , Day SL , *et al.* Defective lentiviral vectors are effectively trafficked by HIV-1 and inhibit its replication. *Mol Ther* , 2001 , **3** (6) : 928 – 939.
- [10] Escarpe P , Zayek N , Chin P , *et al.* Development of a sensitive assay for detection of replication-competent recombinant lentivirus in large-scale HIV-based vector preparation. *Mol Ther* , 2003 , **8** : 332 – 341.
- [11] Coleman JE , Huentelman MJ , Kasparov S , *et al.* Efficient large-scale production and concentration of HIV-1-based lentiviral vectors for use *in vivo*. *Physiol Genomics* , 2003 , **12** : 221 – 228.
- [12] Akkina RK , Walton RM , Chen ML , *et al.* High-efficiency gene transfer into CD34⁺ cells with a human immunodeficiency virus type 1-based retroviral vector pseudotyped with vesicular stomatitis virus envelope glycoprotein G. *J Virol* , 1996 , **70** : 2581 – 2585.
- [13] Yee JK , Friedmann T , Burns JC. Generation of high-titer pseudotyped retroviral vector with very broad host range. *Methods Cell Biol* , 1994 , **43** : 99 – 112.

High-titer preparation of HIV-1-based defective lentivector and it mediated efficient gene transfer

ZENG Ling-bing^{1 2 3 *} , ZHANG Lin¹ , MENG Yan¹ , Yuanan Lu² , YE Lin-bai³

(¹ Yangtze River Fisheries Research Institute , Chinese Academy of Fishery Sciences , Jingzhou 434000 , China)

(² Retrovirology Research Laboratory , Pacific Biosciences Research Center , University of Hawaii at Manoa , Honolulu , Hawaii 96822 , USA)

(³ State Key Laboratory of Virology , College of Life Sciences , Wuhan University , Wuhan 430072 , China)

Abstract :Lentivectors have drawn considerable attention recently and become important delivery vehicles for gene transfer manipulation. By Transiently co-transfecting 293T packaging cells with three DNA plasmids system encoding lentivector constituents , a protocol for bulky preparation of human immunodeficiency virus type-1 (HIV-1)-based defective lentivector with high titer has been established. Transient co-transfection of 293T packaging cells resulted in production of high-titer vector (1.1×10^7 IU/ml) , which can be further concentrated over 100-fold through a single step centrifugation. The vector was capable of efficiently transducing a variety of cells from both primate and non-primate sources , including of human T-lymphoblastoid cell line. Long-term culture of vector transduced cells showed a stable expression of foreign gene over 18 months detected by RT-PCR. Assessment of potential generation of replication-competent virus revealed no detection of p24 antigen protein or infectious particles in vector-transduced cells.

Keywords : HIV-1-based Lentivector ; preparation ; high titer ; gene transfer ; efficiency

* Corresponding author. Tel : 86-716-8115716 ; E-mail : zenglingbing@gmail.com

Received : 6 March 2007 / Accepted : 30 April 2007 / Revised : 14 July 2007