

昆虫细胞制备 AAV-ITR 基因表达微载体

李泰明¹, 潘俊杰¹, 祁静², 张春²

1 中国药科大学 生命科学与技术学院, 江苏 南京 210009

2 中国科学院苏州生物医学工程技术研究所 苏州市分子诊断和治疗技术重点实验室, 江苏 苏州 215163

李泰明, 潘俊杰, 祁静, 等. 昆虫细胞制备 AAV-ITR 基因表达微载体. 生物工程学报, 2015, 31(8): 1230–1238.

Li TM, Pan JJ, Qi J, et al. Preparation of a novel AAV-ITR gene expression mini vector in Sf9 insect cells via baculovirus. Chin J Biotech, 2015, 31(8): 1230–1238.

摘要: AAV-ITR 基因表达微载体是只含有腺相关病毒 (Adeno-associated virus, AAV) 倒置末端重复序列 (Inverted terminal repeats, ITR)、基因表达顺式元件和目的基因, 而不含有其他外源 DNA 序列的双链或单链 DNA。本研究利用杆状病毒表达系统, 制备得到两种重组杆状病毒 Bac-ITR-EGFP 和 Bac-inrep, 并将二者的 P3 代病毒共同感染昆虫细胞 *Spodoptera frugiperda* (Sf9), 抽提小分子量 DNA, 获得 AAV-ITR-EGFP 基因表达微载体, 2×10^7 的 Sf9 细胞抽提可以得到 100 μg AAV-ITR-EGFP 基因表达微载体, 核酸电泳显示 AAV-ITR-EGFP 基因表达微载体主要以单体和二聚体的形式存在。将 AAV-ITR-EGFP 基因表达微载体通过 polyethylenimine (PEI) 转染 HEK 293T 细胞, 24 h 后荧光显微镜观察有 EGFP 表达, 48 h 后达到高峰, 转化效率达到 65%。

关键词: 基因治疗, 基因表达微载体, 杆状病毒表达系统, 非病毒载体

Received: September 16, 2014; **Accepted:** December 1, 2014

Supported by: National Natural Science Foundation of China (No. 81371670), Graduate Training Innovation Project of Jiangsu Province (No. SJLX_0285).

Corresponding author: Chun Zhang. Tel: +86-512-69588327, E-mail: chunzhangspring@gmail.com.

国家自然科学基金 (No. 81371670), 江苏省研究生培养创新工程 (No. SJLX_0285) 资助。

网络出版时间: 2015-01-14

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20150114.1355.001.html>

Preparation of a novel AAV-ITR gene expression mini vector in Sf9 insect cells via baculovirus

Taiming Li¹, Junjie Pan¹, Jing Qi², and Chun Zhang²

¹ School of Life Science and Technology, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, Jiangsu, China

² Suzhou Institute of Biomedical Engineering and Technology, Chinese Academy of Sciences, Suzhou 215163, Jiangsu, China

Abstract: AAV-ITR gene expression mini vector is a double-strand or single-strand DNA that only contains inverted terminal repeats of adeno-associated virus, cis-elements and gene of interest and does not contain any other foreign DNA sequences. We prepared Bac-ITR-EGFP and Bac-inrep. *Spodoptera frugiperda* cells were infected with Bac-ITR-EGFP (P3) and Bac-inrep (P3). Up to 100 μg of AAV-ITR-EGFP gene expression mini vectors were extracted from 2×10^7 cells of Sf9 72 h after infection. The gel electrophoresis analysis shows that most forms of AAV-ITR-EGFP gene expression mini vector were monomer and dimer. The mini vector expression efficacy was examined *in vitro* with HEK 293T cells. The EGFP expression was observed at 24 h after transfection, and the positive ratio reached 65% at 48 h after transfection.

Keywords: gene therapy, gene expression mini vector, Bac-to-Bac baculovirus expression system, non-viral vector

基因治疗是人类治疗肿瘤、传染病、遗传病的发展方向。基因治疗要依靠转染性高、安全有效的基因载体，寻找安全有效的基因治疗载体是当今基因治疗领域的研究热点。目前，应用于基因治疗的载体分为病毒载体和非病毒载体两大类。病毒基因表达载体是用于基因治疗的主要基因表达载体，但是病毒载体由于其蛋白质组成成分以及 DNA 组成成分，体内实验表明易引发机体产生免疫反应、细胞炎症，而且存在插入突变、致癌等风险^[1-3]。非病毒载体通常使用细菌质粒 DNA (pDNA) 将外源基因导入到受体细胞中，除了导入目的基因外，还会包含筛选和扩增质粒所必需的 DNA 序列^[4-6]，比如抗生素抗性基因 (β -内酰胺类) 以及增殖复制的起始子 (*Escherichia coli origin*, *E. coli origin*)，造成机体免疫反应、细胞炎症、细胞毒性等不良副作用。目前，针对 pDNA 的改造有制备成微环 DNA (Mini-circle DNA) 和线性共

价闭合微环 DNA (Mini-linear covalently closed, mini-lcc)^[7-9]。二者都是尽可能删除潜在的会引发机体免疫反应以及干扰载体整合效率的序列。Chen^[11-12]课题组对基因表达微载体表达外源基因的机理进行的研究表明，外源基因序列以及 CpG 的存在会引起外源基因的表达沉默化，而基因表达微载体中的外源基因则能长久表达。

本实验制备得到的 AAV-ITR 基因表达微载体是一种基于腺相关病毒倒置末端重复序列的基因表达载体，仅含有 AAV 基因组的两端的 ITR 序列和中间的基因表达框序列。前期实验^[13]中采用热变性的方法制备了 AAV-ITR 单链微载体，在细胞内得到了有效表达。近期有研究者证实在一个阅读框架中同时表达 AAV 复制蛋白 Rep78 和 Rep52，能使 Rep 蛋白表达量提高，从而增加 AAV 基因组的复制^[14]。本研究在其基础上，合理改进杆状病毒载体，将 *rep* 基因中插入

一段人工合成的内含子序列, 该序列中含有杆状病毒晚期启动子 *ph*, 得到的杆状病毒 Bac-inrep 感染昆虫细胞后能在一个阅读框架中同时表达 Rep78 和 Rep52, 提高了 Rep78 和 Rep52 的表达, 增加了 AAV 基因组的复制。将含有 ITR 及 EGFP 表达框的序列构建到另外一个杆状病毒 Bac-ITR-EGFP 中, 共同感染 Sf9 细胞, 制备 AAV-ITR 基因表达微载体。

1 材料与方法

1.1 材料

AAV-MCS 质粒、pFastBacDual 质粒购自 Invitrogen 公司。Sure 2 感受态、pUC57-minivector、pAAV-in-RC 质粒、DH10 Bac 感受态、Sf9 细胞、HEK 293T 细胞均为中国科学院苏州生物医学工程技术研究所细胞分子生物学研究中心保存。限制性内切酶 *Ehe* I、*Pci* I 购自 Thermo Scientific。其余限制性内切酶以及 T4 DNA 连接酶均购自 NEB。*KOD-Plus* 购自 TOYOBO。小鼠抗人 AAV-rep 单克隆抗体购自 American Research Products。辣根过氧化物酶标记山羊抗小鼠 IgG (H+L) 购自海门碧云天。Cycle-pure kit 试剂盒购自 OMEGA。Sf-900 II SFM、Cellfectin II reagent、Fetal bovine serum、Antibiotic-Antimycotic (100×) 购自 Invitrogen 公司。其余试剂为国产分析纯以上。PCR 引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。

1.2 方法

1.2.1 构建 pFastBacDual-ITR-EGFP 质粒

腺相关病毒载体 pAAV-MCS 用 *Ehe* I 和 *Psc* I 双酶切得到目的片段, 杆状病毒载体 pFastBacDual 用 *Nco* I 和 *Stu* I 双酶切得到载体

片段, 分别用 1%琼脂糖电泳, 胶回收。目的片段和载体片段在 T4 DNA 连接酶的作用下, 16 °C 连接过夜, 转化 Sure 2 感受态, 挑取单克隆经 37 °C 过夜培养后抽提质粒, 通过 *Sma* I 单切鉴定该重组质粒并测序。

以质粒 pUC57-minivector 为模板, 通过 PCR 扩增 EGFP 序列 (约 720 bp)。引物分别为 P1 和 P2, PCR 扩增条件为: 94 °C 2 min; 98 °C 10 s, 64.3 °C 30 s, 68 °C 1 min, 35 个循环。用 *Bam*H I 和 *Xho* I 双酶切 PCR 产物和 pFastBacDual-ITR 载体, 用 Cycle-pure kit 试剂盒纯化后用 T4 DNA 连接酶, 16 °C 连接过夜, 转化 Sure 2 感受态, 挑取单克隆经 37 °C 过夜培养后抽提质粒, 用 *Bam*H I 和 *Xho* I 双酶切鉴定该重组质粒并测序。

1.2.2 构建 pFastBacDual-inrep 质粒

以 pAAV-in-RC^[15] 为模板, P3 和 P4 为引物, PCR 扩增条件为: 94 °C 2 min; 98 °C 10 s, 68 °C 3 min, PCR 扩增得到 inrep。PCR 产物用 1%琼脂糖电泳胶回收。*Bst*Z17 I 和 *Sph* I 双酶切 PCR 回收产物。pFastBacDual 用 *Sma* I 和 *Sph* I 双切。PCR 片段酶切产物与载体片段用 Cycle-pure kit 试剂盒回收, T4 DNA 连接酶 16 °C 连接过夜, 转化 DH 5α 感受态, 挑取单克隆经 37 °C 过夜培养后抽提质粒, 通过 *Xma* I 酶切鉴定该重组质粒并测序。

1.2.3 质粒转化 DH10 Bac

将测序正确的 pFastBacDual-inrep、pFastBacDual-ITR-EGFP 质粒转化含有 Bacmid 和 helper 质粒的 DH10 Bac 感受态, 蓝白斑筛选出阳性克隆, 抽提重组 Bacmid。用 M13 通用引物 P5 和 P6, PCR 鉴定 Bacmid-inrep, PCR 扩增

条件为: 94 °C 2 min; 98 °C 10 s, 55 °C 30 s, 68 °C 5 min, 35 个循环。用 M13 上游引物 P5 和 EGFP 下游引物 P7, PCR 鉴定 Bacmid-ITR-EGFP, PCR 扩增条件为: 94 °C 2 min; 98 °C 10 s, 55 °C 30 s, 68 °C 2 min, 35 个循环。

表 1 PCR 引物序列

Table 1 Primer sequences

Primer name	Primer sequence (5'-3')	Size (bp)
P1	CGGAATTCATGGTGAGCAAGGGC GAGG	27
P2	GCTCTAGATTACTTGTACAGCTCG TCCAT	29
P3	GTGTGTATACCCGCCATGCCGGG GTTTACGAGAT	35
P4	GCGCGCATGCTCCTTCAGAGAGA GTGTCCTCGAGC	35
P5	CCCAGTCACGACGTTGTAACG	23
P6	AGCGGATAACAATTCACACAGG	23
P7	GCTCTAGATTACTTGTACAGCTCG TCCAT	29

1.2.4 重组杆状病毒的获取

将鉴定正确的 Bacmid-inrep、Bacmid-ITR-EGFP 用 Cellfectin II Reagent 转染六孔板中的 Sf9 细胞, 细胞密度为 50%–60%, 120 h 后收集培养上清 (1 450 r/min, 5 min) 得到的上清即为 P1。取 P1 按 MOI 值 0.1 连续感染 Sf9 细胞两次后获得高滴度的 P3 病毒, 噬菌斑法测病毒滴度。

1.2.5 杆状病毒表达 Bac-inrep 蛋白的鉴定

取重组杆状病毒 Bac-inrep P3 (MOI=5) 感染六孔板中的 Sf9 细胞, 72 h 后收集细胞, 离心 (1 450 r/min, 5 min), 用 PBS 洗两遍。细胞沉淀

裂解后, 上清用于 Western blotting 检测。浓缩胶浓度 5%, 分离胶浓度 10%。一抗为小鼠抗人 AAV-rep 单克隆抗体, 二抗为辣根过氧化物酶标记山羊抗小鼠 IgG (H+L)。

1.2.6 制备 AAV-ITR-EGFP 基因表达微载体

当 Sf9 细胞处于指数增长期至 2×10^6 cells/mL 时, 按 MOI=2 加入两种重组杆状病毒 Bac-inrep P3 和 Bac-ITR-EGFP P3。继续培养 72 h 后, 收取 Sf9 细胞。抽提 Sf9 中的小分子量的 DNA, 用 *Xho* I 酶切鉴定。

1.2.7 AAV-ITR-EGFP 基因表达微载体在体外细胞中的表达

取对数生长期 HEK 293T 细胞接种于 24 孔板, 待细胞贴壁生长至较好状态时 (密度为 2.5×10^5 cells/mL)。基因表达微载体 DNA 用 PEI 转染细胞, N/P 比为 15, 将 PEI-DNA 混合液加入至用 PBS 溶液清洗过的 HEK 293T 细胞表面, 再加入适量培养基, 置于 37 °C、5% CO₂ 的饱和湿度培养箱中培养。24 h 后荧光显微镜下观察, 流式细胞仪测其转染效率。

2 结果

2.1 质粒构建与杆状病毒的制备

在质粒 pFastBacdual 上插入含有 AAV-ITR 基因表达框的序列, 得到重组质粒 pFastBacdual-ITR, *Sma* I 单切鉴定得到 4 997 bp、1 277 bp、666 bp, 电泳结果见图 1A, 与预期条带一致, 测序结果正确。以重组质粒 pFastBacdual-ITR 为载体, 插入报告基因 EGFP, 得到重组质粒 pFastBacdual-ITR-EGFP (图 1B), 用 *Bam*H I 和 *Xho* I 双酶切得到 6 905 bp、726 bp, 电泳结果见图 1C, 与预期条带一致, 测序结果正确。

参照 Chen^[15]的构建方法, 构建 rep 表达质粒, *p10* 为 *rep 78* 的启动子, *ph* 为 *rep 52* 的启动子 (图 2A)。在质粒 pFastBacdual 上插入 *inrep*

得到重组质粒 pFastBacdual-inrep, *Xma* I 单切鉴定得到 7 375 bp 条带, 电泳结果见图 2B, 与预期条带一致, 测序结果正确。

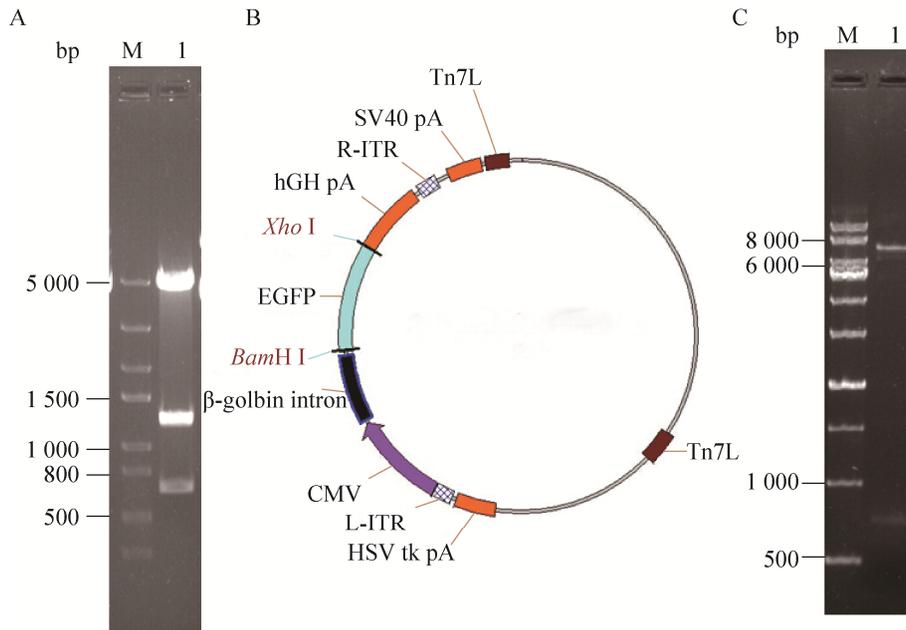


图 1 pFastBacdual-ITR-EGFP 质粒的构建与鉴定

Fig. 1 Construction and identification of pFastBacdual-ITR-EGFP. (A) The result of restriction-enzyme digestion. M: Trans 5 kb DNA marker; 1: the stripe of plasmid digested with *Sma* I. (B) Diagram of pFastBacdual-ITR-EGFP. (C) The result of restriction-enzyme digestion. M: DS 1 kb DNA marker; 1: the stripe of plasmid digested with *Bam*H I and *Xho* I.

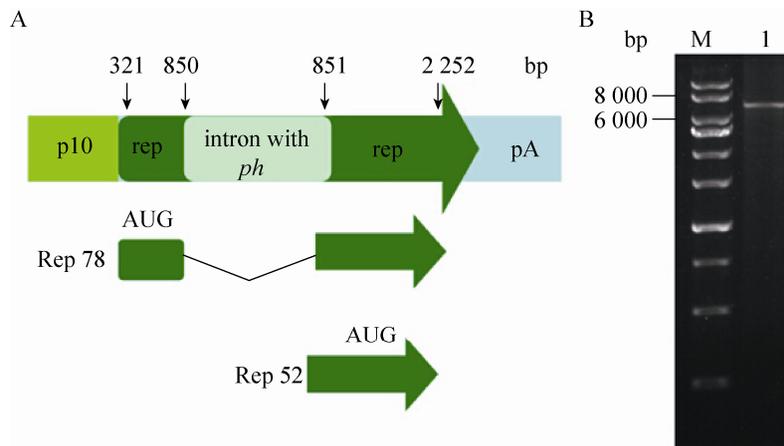


图 2 Bac-inrep 的基因转录示意图与 pFastBacdual-inrep 质粒的鉴定

Fig. 2 The map of Bac-inrep and identification of pFastBacdual-inrep. (A) Illustration of the genetic and transcriptional map of a representative recombinant baculovirus expressing the Rep 78 and Rep 52 of AAV-2 within a single expression cassette. (B) The result of restriction-enzyme digestion. M: DS 1 kb DNA marker; 1: the stripe of plasmid digested with *Xma* I.

将上述两种质粒分别转化 DH 10Bac 感受态, 蓝白筛选得到 Bacmid-inrep、Bacmid-ITR-EGFP。通过 PCR 进一步筛选正确杆粒。以 Bacmid-inrep 为模板, P5 和 P6 为引物做 PCR 扩增, 鉴定重组杆状病毒 DNA。结果显示, 重组 Bacmid-rep 在 5 000 bp 附近有目的条带 (图 3A), 与预计的结果 (4 760 bp) 一致。以 Bacmid-ITR-EGFP 为模板, 以 P5 和 P7 为引物做 PCR 扩增, 结果显示重组 Bacmid-ITR-EGFP 在 2 000–3 000 bp 附近有目的条带 (图 3B), 与预计的结果 (2 151 bp) 一致。重组 Bacmid 转染昆虫细胞得到病毒 Bac-ITR-EGFP 和 Bac-inrep。

2.2 Rep 蛋白在 Sf9 细胞中的表达

用小鼠抗人 AAV-rep 单克隆抗体的单克隆抗体检测 Bac-inrep 感染 Sf9 细胞表达的 Rep 蛋白, 同时用未感染的 Sf9 细胞和野生型杆状病毒

感染的 Sf9 细胞作对照。相比对照, Bac-inrep P3 感染的 Sf9 细胞可以表达 AAV 复制所必需的蛋白 Rep 78、Rep 52 以及 Rep 40 (图 4)。

2.3 制备 AAV-ITR-EGFP 基因表达微载体

两种重组杆状病毒 Bac-inrep P3 (MOI=2) 和 Bac-ITR-EGFP P3 (MOI=2) 同时感染 Sf9 细胞, 72 h 后抽提小分子量 DNA 得到基因表达微载体。2×10⁷ 的 Sf9 细胞抽提可以得到 100 μg AAV-ITR 基因表达微载体 DNA。琼脂糖凝胶电泳显示, 主要条带在 2.7 kb 和 5.4 kb, 分别对应基因表达微载体的单体和二聚体。推算得到其余的条带上显示的大小即为三聚体以及多聚体 (图 5A)。用 *Xho* I 单酶切做进一步鉴定, 得到 2 048 bp, 670 bp 的条带 (图 5B), 与预期相符。

2.4 AAV-ITR-EGFP 基因表达微载体在 293T 细胞中的表达

为了鉴定 AAV-ITR-EGFP 基因表达微载体在细胞中的基因表达能力, 将 AAV-ITR-EGFP 基因表达微载体 DNA 用 PEI 转染 HEK 293T 细胞。24 h、48 h 后在荧光显微镜下观察 EGFP 的表达情况。如图 6A 所示, 24 h 后即有荧光表达,

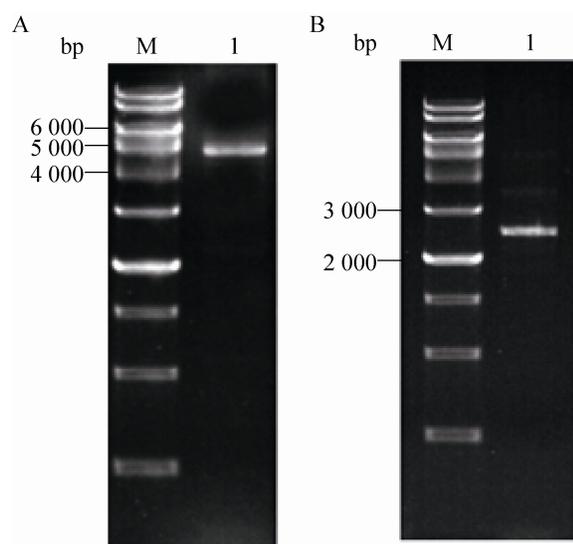


图 3 PCR 鉴定重组 Bacmid

Fig. 3 Identification of recombinant Bacmid by PCR. (A) M: DS 1 kb DNA marker; 1: the PCR results of Bacmid-inrep. (B) M: DS 1 kb DNA marker; 1: the PCR results of Bacmid-ITR-EGFP.

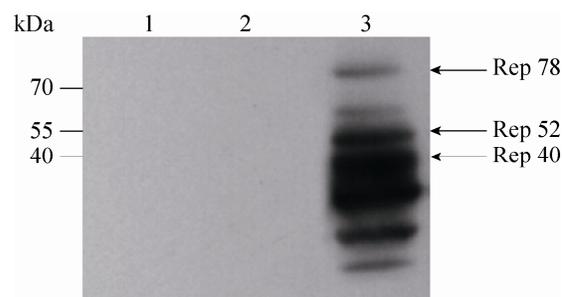


图 4 Western blotting 检测 Rep 蛋白

Fig. 4 Identification of Rep proteins by Western blotting. 1: normal Sf9 cells; 2: Sf9 cells infected with wild virus DH 10Bac; 3: Sf9 cells infected with Bac-inrep P3.

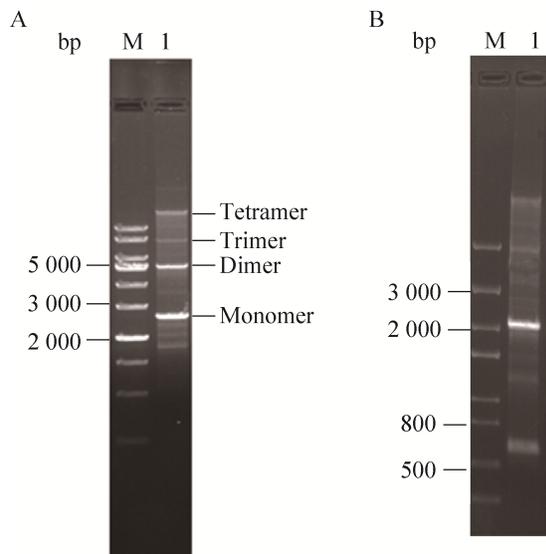


图5 AAV-ITR-EGFP 基因表达微载体鉴定

Fig. 5 Preparation and identification of AAV-ITR-EGFP mini vector. (A) The determination of single-stranded mini vector by 1% gel electrophoresis. M: DS 1 kb DNA marker; 1: the stripe of AAV-ITR mini vector. (B) The result of restriction-enzyme digestion. M: Trans 5 kb DNA marker; 1: the stripe of plasmid digested with *Xho* I.

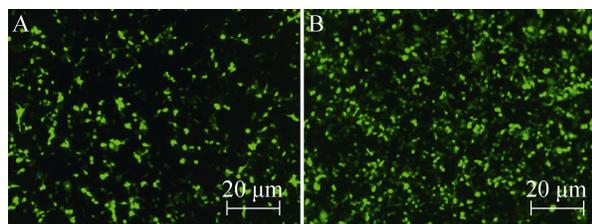


图6 AAV-ITR-EGFP 基因表达微载体转染 HEK 293T 细胞

Fig. 6 Fluorescent microscope photograph of HEK 293T cells transfected by AAV-ITR-EGFP mini vector. (A) Fluorescent microscope photograph of HEK 293T transfected by AAV-ITR-EGFP DNA 24 h after transfection, magnified 100 times, which is pictured by fluorescent microscope. (B) Fluorescent microscope photograph of HEK 293T transfected by AAV-ITR-EGFP DNA 48 h after transfection, magnified 100 times, which is pictured by fluorescent microscope.

48 h (图 6B) 达到 65% 的阳性率。该结果表明 AAV-ITR-EGFP 基因表达微载体已经成功转染 HEK 293T 细胞并得到有效表达。

3 讨论

rAAV 病毒载体对人体无明显致病性，能够有效转导分裂细胞以及为分裂细胞，能够定点整合到人的 19 号染色体上，转导效率高，能够在动物模型体内长期表达。同时，该载体也存在安全性、免疫原性以及生产成本高的缺点。在 *E. coli* 中制备得到的 pDNA 通常都会含有很多原核生物扩增的必需序列，会引起 DNA 结构发生修饰比如 N6-甲基腺嘌呤和 N5-甲基胞嘧啶^[4]，甚至会引起转染细胞的细胞毒性^[2]。基因表达微载体是指，不含有或很少含有细菌复制子序列、抗生素抗性基因序列等 pDNA 序列，仅保留基因表达所需要的顺式元件，如基因表达启动子、目的基因和加尾序列 (poly A)，其外源基因能有效表达的环状的 DNA 分子^[16-17]。因此，我们制备得到的基因表达微载体免疫原性低，制备简单快速，避免了病毒载体和非病毒载体的缺陷。

Urabe 等^[18]利用杆状病毒表达系统得到 3 种杆状病毒：重组杆状病毒 Bac-Rep、重组杆状病毒 Bac-VP 和含有被 AAV-ITR 阅读框架包裹的目的基因的重组杆状病毒，共感染昆虫细胞 Sf9，制备 rAAV 载体。其中，重组杆状病毒 Bac-Rep 中表达的 Rep 78 和 Rep 52 为 AAV 复制关键蛋白，用于 DNA 的自我修复、复制和包装^[19]。但是，由于 *rep* 78 和 *rep* 52 序列重复可导致 *rep* 表达不稳定，表达量降低，从而影响大规模生产的产量^[20-21]。我们总结前人经验，在

两个启动子之间插入人工内含子, 保证 Rep 蛋白的稳定表达, 有利于微载体的合成。Western blotting 鉴定 Rep 蛋白结果中除了目的蛋白 Rep 78 和 Rep 52 外还有很多小蛋白, 其中 Rep 40 为 Rep 52 的剪切体, 推测其他蛋白是 Rep 蛋白剪切过程中的中间体。

AAV-ITR 基因表达微载体仅保留了制备微载体所必需的 ITR 顺式作用元件, 在昆虫细胞中制备得到的基因表达微载体主要由单体和二聚体形式存在, 无 pDNA 中 CpG 序列、抗菌素的抗性基因序列, 因此可以减少基因治疗过程中所引起的机体免疫反应、细胞毒性等不良副作用以及抗生素基因产生的抗药性, 且由于分子量小, 可以提高转染效率^[22]。

AAV-ITR 基因表达微载体相对于 AAV 病毒载体具有如下优点: 首先, 不含有 AAV 病毒包膜蛋白 Cap, 安全性高, 免疫原性低; 其次, AAV 基因载体最大插入基因仅 4.5 kb, AAV-ITR 基因表达微载体插入外源基因大小不受 AAV 包装容量的限制; 此外利用杆状病毒表达系统制备基因表达微载体具有产量高、易于纯化的优点。

制备得到的 AAV-ITR 基因表达微载体能够成功转染 HEK 293T 细胞。后续将进一步探讨 AAV-ITR 基因表达微载体在体内表达的效果以及在其他细胞中的毒性验证。

综上所述, 制备得到的 AAV-ITR 基因表达微载体有望成为一种更有前景的基因治疗载体。

REFERENCES

- [1] Seow Y, Wood MJ. Biological gene delivery vehicles: beyond viral vectors. *Mol Ther*, 2009, 17(5): 767–777.
- [2] Wang D, Zhong L, Nahid MA, et al. The potential of adeno-associated viral vectors for gene delivery to muscle tissue. *Expert Opin Drug Deliv*, 2014, 11(3): 345–364.
- [3] Dismuke DJ, Tenenbaum L and Samulski RJ. Biosafety of recombinant adeno-associated virus vectors. *Curr Gene Ther*, 2013, 13(6): 434–452.
- [4] Ratel D, Ravanat JL, Berger F, et al. N6-methyladenine: the other methylated base of DNA. *Bioessays*, 2006, 28(3): 309–315.
- [5] Bigger BW, Tolmachov O, Collombet JM, et al. An araC-controlled bacterial cre expression system to produce DNA minicircle vectors for nuclear and mitochondrial gene therapy. *J Biol Chem*, 2001, 276(25): 23018–23027.
- [6] Wicks IP, Howell ML, Hancock T, et al. Bacterial lipopolysaccharide copurifies with plasmid DNA: implications for animal models and human gene therapy. *Hum Gene Ther*, 1995, 6(3): 317–323.
- [7] Mayrhofer T, Schlee M and Jechlinger W. Use of minicircle plasmids for gene therapy. *Methods Mol Biol*, 2009, 542: 87–104.
- [8] Rybchin VN and Svarchevsky AN. The plasmid prophage N15: a linear DNA with covalently closed ends. *Mol Microbiol*, 1999, 33(5): 895–903.
- [9] Dalpke A, Frank J, Peter M, et al. Activation of toll-like receptor 9 by DNA from different bacterial species. *Infect Immun*, 2006, 74(2): 940–946.
- [10] Kay MA, He CY, Chen ZY. A robust system for production of minicircle DNA vectors. *Nat Biotechnol*, 2010, 28(12): 1287–1289.
- [11] Chen ZY, He CY, Meuse L, et al. Silencing of episomal transgene expression by plasmid bacterial DNA elements *in vivo*. *Gene Ther*, 2004, 11(10): 856–864.
- [12] Chen ZY, Riu E, He CY, et al. Silencing of episomal transgene expression in liver by plasmid bacterial backbone DNA is independent of CpG methylation. *Mol Ther*, 2008, 16(3): 548–556.
- [13] Li TM, Ping H, Zhang C. Construction of a new

- gene delivering mini vector based on AAV-ITR. *Pharmac Biotechnol*, 2013, 20(4): 318–321 (in Chinese).
李泰明, 平茵, 张春. 基于 AAV-ITR 的基因表达微载体. *药物生物技术*, 2013, 20(4): 318–324.
- [14] Li L, Dimitriadis EK, Yang Y, et al. Production and characterization of novel recombinant adeno-associated virus replicative-form genomes: a eukaryotic source of DNA for gene transfer. *PLoS ONE*, 2013, 8(8): e69879.
- [15] Chen H. Intron splicing-mediated expression of AAV Rep and Cap genes and production of AAV vectors in insect cells. *Mol Ther*, 2008, 16(5): 924–930.
- [16] Chen ZY, He CY, Ehrhardt A, et al. Minicircle DNA vectors devoid of bacterial DNA result in persistent and high-level transgene expression *in vivo*. *Mol Ther*, 2003, 8(3): 495–500.
- [17] Chen ZY, He CY and Kay MA. Improved production and purification of minicircle DNA vector free of plasmid bacterial sequences and capable of persistent transgene expression *in vivo*. *Hum Gene Ther*, 2005, 16(1): 126–131.
- [18] Urabe M, Ding C and Kotin RM. Insect cells as a factory to produce adeno-associated virus type 2 vectors. *Hum Gene Ther*, 2002, 13(16): 1935–1943.
- [19] Pereira DJ, McCarty DM and Muzyczka N. The adeno-associated virus (AAV) Rep protein acts as both a repressor and an activator to regulate AAV transcription during a productive infection. *J Virol*, 1997, 71(2): 1079–1088.
- [20] Negrete A, Yang LC, Mendez AF, et al. Economized large-scale production of high yield of rAAV for gene therapy applications exploiting baculovirus expression system. *J Gene Med*, 2007, 9(11): 938–948.
- [21] Kohlbrenner E, Aslanidi G, Nash K, et al. Successful production of pseudotyped rAAV vectors using a modified baculovirus expression system. *Mol Ther*, 2005, 12(6): 1217–1225.
- [22] Kreiss P, Cameron B, Rangara R, et al. Plasmid DNA size does not affect the physicochemical properties of lipoplexes but modulates gene transfer efficiency. *Nucleic Acids Res*, 1999, 27(19): 3792–3798.

(本文责编 陈宏宇)