HSV1-TK 基因重组腺相关病毒载体的构建及表达

丁芝祥[1], 谭浅[1], 刘双珍[1], 刘丹[1], 李忠庆[1], 彭建强[2]
(1. 中南大学湘雅医院眼科, 长沙 410008; 2. 湖南省人民医院心内科, 长沙 410005)

[摘要] 目的:构建含单纯疱疹病毒Ⅰ型胸苷激酶(*HSV1-TK*)基因的重组腺相关病毒载体质粒pSNAV2.0-TK,制备重组腺相关病毒rAAV2/HSV1-TK,并检测*HSV1-TK*基因在转染晶状体上皮细胞中的整合和表达,为后囊膜混浊的基因治疗奠定基础。方法:用基因重组技术构建含*HSV1-TK*基因的重组腺相关病毒载体质粒pSNAV2.0-TK,并通过PCR和酶切鉴定;将该质粒转染BHK-21细胞,经G418筛选出携带该质粒的载体细胞株BHK-21/TK,在辅助病毒的参与下包装成重组病毒rAAV2/HSV1-TK;用SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)法和高效液相色谱(HPLC)法检测重组病毒rAAV2/HSV1-TK的纯度,用斑点杂交法检测重组病毒的滴度;重组病毒rAAV2/HSV1-TK转染兔晶状体上皮细胞N/N1003A,用PCR和RT-PCR检测*HSV1-TK*基因的整合和表达。结果:经PCR和酶切鉴定重组质粒pSNAV2.0-TK构建成功;成功制备了重组病毒rAAV2/HSV1-TK,病毒滴度达1×10^{12} v.g./mL;重组病毒转染N/N1003A细胞后,PCR和RT-PCR检测显示*HSV1-TK*基因在细胞中整合并且有效表达。结论:成功构建了含*HSV1-TK*基因的重组腺相关病毒载体质粒,制备了高滴度重组病毒rAAV2/HSV1-TK,*HSV1-TK*基因在转染该病毒的晶状体上皮细胞中可有效表达。

[关键词] 腺相关病毒; 胸苷激酶; 晶状体上皮细胞; 基因治疗
[中图分类号] Q782 [文献标识码] A [文章编号] 1672-7347(2008)03-0210-06

Construction and expression of recombinant adeno-associated virus vector containing HSV1-TK gene

DING Zhi-xiang[1], TAN Qian[1], LIU Shuang-zhen[1], LIU Dan[1], LI Zhong-qing[1], PENG Jian-qiang[2]
(1. *Department of Ophthalmology, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha* 410008, *China*;
2. *Department of Cardiology, People's Hospital of Hunan Province, Changsha* 410005, *China*)

Abstract: Objective To construct the recombinant adeno-associated virus (rAAV) vector plasmid pSNAV2.0-TK containing *HSV1-TK* gene, to produce recombinant adeno-associated virus rAAV2/HSV1-TK, and to detect the integration and expression of *HSV1-TK* gene in lens epithelial cells transfected by rAAV2/HSV1-TK, and to provide foundation for gene therapy of posterior capsular opacification. **Methods** The recombinant vector plamid constructed by gene recombinant technology was analyzed by PCR and restriction enzyme digestion. The cell strain BHK-21/TK was screened by G418 after the plasmid was transfected into BHK-21 cells, with the helper virus HSV1-rc/UL2 to produce the recombinant virus rAAV2/HSV1-TK. The purity of rAAV2/HSV1-TK was detected by SDS-PAGE and HPLC, and the titre of rAAV2/HSV1-TK was observed by dot blot hybridization. The *HSV1-TK* gene in lens epithelial cells transfected by rAAV2/HSV-TK was investigated by

收稿日期(Date of reception) 2007-09-07
作者简介(Biography) 丁芝祥(1974-),男,湖南宁乡人,博士研究生,主要从事白内障研究,现在桂林医学院附属医院眼科工作。
通讯作者(Corresponding author) 谭浅,E-mail:tanqianxy99@yahoo.com.cn
基金项目(Foundation item) 湖南省自然科学基金(06jj2071) This work was supported by Natural Science Foundation of Hunan Province of P. R. China (06jj2071).

PCR and RT-PCR. **Results** The recombinant plasmid proved successful by PCR and restriction enzyme digestion. The recombinant virus rAAV2/HSV1-TK was produced successfully and its titre was 1×10^{12} v. g./mL by dot blot hybridization. The *HSV1-TK* gene was integrated and expressed in lens epithelial cells. **Conclusion** The recombinant adeno-associated virus vector plasmid containing *HSV1-TK* gene is successfully constructed, and high titre recombinant adeno-associated virus (rAAV2/HSV1-TK) is obtained. The *HSV1-TK* gene in lens epithelial cells is expressed after being transfected by rAAV2/HSV1-TK.

Key words: adeno-associated virus; thymidine kinase; lens epithelium; gene therapy

[*J Cent South Univ* (*Med Sci*), 2008,33(3):0210-06]

近年来,随着白内障超声乳化吸出术的应用和人工晶体的发展,与切口有关的并发症大大减少,后囊膜混浊(posterior capsular opacification, PCO)已成为目前白内障摘除术后影响视力恢复的主要并发症。文献报道,成人 PCO 的发生率为 20.4%[1],小于 4 岁的儿童白内障术后 PCO 的发生率高达 100%[2]。近年研究表明,应用自杀基因疗法对术中残留晶状体上皮细胞增殖的抑制作用来防治 PCO 是一种可能有效的方法,关键问题是缺乏一种既安全又高效的基因转移途径。腺相关病毒(adeno-associated virus, AAV)作为基因转移载体,是近几年来基因治疗研究的热点,但尚未见其介导自杀基因在防治 PCO 方面的实验研究。本课题组前期研究表明,AAV 载体可介导报告基因转染晶状体上皮细胞,转染效率高达 71.12%[3]。本研究中首先构建含单纯疱疹病毒 I 型胸苷激酶(*HSV1-TK*)基因的 2 型重组腺相关病毒(recombinant adeno-associated virus 2, rAAV2)载体,制备重组腺相关病毒,然后转染晶状体上皮细胞,观察 *HSV1-TK* 基因在细胞中的表达,为 PCO 的基因治疗提供实验依据。

1　材料与方法

1.1　材料

1.1.1　*质粒、宿主菌、病毒及细胞*　含 *HSV1-TK* 基因全长 cDNA 的腺病毒真核表达载体质粒 pDC316-TK,腺相关病毒通用载体质粒 pSNAV2.0 及包装重组 AAV2 用辅助病毒 HSV1-rc/UL2 由病毒基因工程国家重点实验室提供,宿主菌为大肠杆菌 DH5α 株,产自 TaKaRa 大连宝生物公司(彭建强博士保存并提供),金黄地鼠胚胎肾细胞 BHK-21 购自美国 ATCC 公司,兔晶状体上皮细胞系 N/N1003A 由中国医学科学院基础医学细胞中心提供。

1.1.2　*主要试剂*　真核细胞转染试剂 Lipofectamine、胰蛋白酶为美国 Gibco-BRL 公司产品,十二烷基硫酸钠(SDS)、Tris 碱、X-gal、噻唑蓝(MTT)、二甲亚砜(DMSO)为美国 Sigma 公司产品、酵母提取物 0.5%、胰蛋白胨 1% 为英国 OXOID公司产品,Taq DNA 聚合酶、M-mulv 逆转录酶为立陶宛 Fermentas 公司产品,RT-PCR 试剂盒为美国 Invitrogen 公司,T_4 DNA 连接酶、RNAas、各种 DNA 限制性内切酶、DNA 分子量 marker 为 TaKaRa 大连宝生物公司,RNApure 超纯总 RNA 快速提取试剂盒为湖南远泰生物技术有限公司产品,PCR 引物由上海英骏生物技术有限公司合成。*TK* 基因上游引物:5′-GCCAGAATTCATGGCTTCGTACCCCGGC-3′,下游引物:5′-CTGCGTCGACTCAGTTAGCCTCCCCCAT-3′,片段大小为 1 151 bp。

1.1.3　*主要仪器*　台式高速冷冻离心机为美国 Berkman 公司产品,紫外分光光度计(Helios Gamma)为美国 Thermo Spectronic 公司产品,酶标仪(Spectra MAX 250)为美国 Molecular Devices 公司产品,高效液相色谱仪(Agilent1100)为美国 Agilent 公司产品,低温超速离心机为美国 Beckman 公司产品,480 型 PCR 热循环仪为美国 Perkin Elmer 公司产品,DYY 稳压稳流微型凝胶电泳仪为北京六一仪器厂产品。

1.2　方法

1.2.1　*细胞培养*　BHK-21 细胞在 37 ℃,5% CO_2 的条件下,于含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养液中培养。N/N1003A 细胞在 37 ℃,5% CO_2 的条件下,于含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液中培养。

1.2.2 质粒 pSNAV2.0-TK 的构建及鉴定 按文献方法[4],质粒 pDC316-TK 经 *Sal*I 和 *Eco*RI 双酶切后回收 *TK* 基因片段,定向插入 pSNAV2.0 载体质粒的多克隆位点中,得到重组质粒 pSNAV2.0-TK。构建后的质粒经限制性内切酶 *Sal*I 和 *Eco*RI 双酶切和 PCR 鉴定。PCR 程序为:首先预变性 94 ℃ 5 min,然后变性 94 ℃ 1 min,退火 56 ℃ 1 min,延伸 72 ℃ 2 min,共 30 个循环,最后 72 ℃总延伸 7 min。

1.2.3 rAAV2/HSV1-TK 病毒载体细胞株的建立 按 GIBCO BRL 产品说明书提供的方法,用 Lipofectamine 将 pSNAV2.0-TK 质粒转染 BHK-21 细胞。24 h 后,用 800 g/L G418 选择培养。7 d 后抗性细胞克隆形成,用胰酶消化混合,继续用 G418 选择培养至第 14 d,换用不含 G418 的培养液培养及传代,将此细胞株命名为 BHK-21/TK。

1.2.4 rAAV2/HSV1-TK 重组病毒的制备及纯化 按照伍志坚等[5]的方法进行重组病毒 rAAV2/HSV1-TK 的包装。主要步骤是:大量扩增 BHK-21/TK 细胞及辅助病毒 rHSV1rc/ΔUL2,用 rHSV1rc/ΔUL2(感染复数为 1.0)感染 BHK2-1/TK 细胞,待细胞变圆、变大、大部分脱壁后收集细胞及上清。然后按吴小兵等[6]的方法初步纯化,获得 rAAV2/HSV1-TK,再用亲和层析、离子交换层析和分子筛层析进一步精纯化。

1.2.5 rAAV2/HSV1-TK 病毒的纯度检测

1.2.5.1 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)法检测病毒纯度 按文献方法[7]灌制 SDS-PAGE 分离胶和积层胶,分离胶浓度为 12%。分别取样品 20 μL,加 2×加样缓冲液 20 μL,沸水浴 3 min。每个加样孔加样 10 μL。电泳完毕后用考马斯亮蓝染色,用相应的脱色液脱色直至显出低背景、清晰的条带。

1.2.5.2 高效液相色谱(HPLC)法检测病毒纯度 按文献[7]方法进行,所用离子交换柱为 TSKgel-NPR(Tosohass)。

1.2.6 斑点杂交法检测 rAAV2/HSV1-TK 病毒的滴度 由于 rAAV2/HSV1-TK 中含有 CMV 立早启动子,因此采用地高辛标记(Boehinger Mannhein 试剂盒)的 CMV 立早启动子序列作为探针(简称 CMV 探针),用准确定量的系列稀释质粒 pSNAV2.0-TK 为判定标准。将纯化的 rAAV2/HSV1-TK 样品用 DNase Ⅰ 和 RNase(终浓度均为 1 g/L)于 37 ℃消化 1 h。参照文献[5]提取 rAAV2 DNA,进行系列稀释,使之浓度分别为 10.4 mg/L,7.8 mg/L,5.2 mg/L,2.6 mg/L,1.3 mg/L,0.65 mg/L。沸水浴 5 min 变性后置于冰浴中,然后各取 1 μL 点样于尼龙膜上。120 ℃烤膜 30 min,68 ℃预杂交、杂交、洗膜、显色,按 Boehringer Mannheim 公司试剂盒说明书进行。通过计算 pSNAV2.0-TK 的分子数,再乘以与其杂交信号强度一致的病毒液样品的稀释倍数,得出 rAAV2/HSV1-TK 病毒的滴度。

1.2.7 *HSV1-TK* 基因在 N/N1003A 细胞中的整合及表达检测

1.2.7.1 rAAV2/HSV1-TK 病毒转染 N/N1003A 细胞 取生长至 90% 融合的 N/N1003A 细胞,以 0.25% 胰蛋白酶 + 0.02% EDTA 消化,将细胞分种于 50 mL 培养瓶,接种密度为 5×10^5/瓶,常规细胞培养 24 h 后,取两瓶计数细胞。根据本课题组的前期研究[3],按感染复数(multiplicity of infection, MOI)为 2×10^5 计算 rAAV2/HSV1-TK 病毒体积,加入无血清、无抗生素 DMEM 培养基稀释,总体积均为 500 μL。将上述病毒与培养基混合液分别加入每瓶细胞中转染,置 37 ℃、5% CO_2 培养箱,每 20 min 轻轻摇动培养瓶一次,使病毒颗粒与细胞充分接触;1 h 后,吸去每瓶内液体,加入含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基继续培养。同一批细胞,按照上述方法操作,但不进行病毒转染(MOI = 0)作为对照。转染后每天于相差显微镜下观察细胞的形态和生长情况。

1.2.7.2 PCR 和 RT-PCR 分析 rAAV2/HSV1-TK 病毒转染 N/N1003A 细胞后第 2 天和第 7 天,分别消化实验组和对照组细胞,用酚、氯仿法抽提细胞基因组 DNA,按 RNApure 超纯总 RNA 快速提取试剂盒说明提取总 RNA。分别以基因组 DNA 及总 RNA 反转录获取的 cDNA 第 1 链为模板,以 *HSV1-TK* 基因两端的 5′和 3′引物扩增各目的基因,分析外源基因在 DNA 及 mRNA 水平的整合及表达。PCR 程序:首先预变性 95 ℃ 5 min,然后变性 94 ℃ 30 s,退火 50 ℃ 30 s,延伸 72 ℃ 30 s,共 30 个循环,最后 72 ℃总延伸 5 min。取 10 μL PCR 产物于 1% 琼脂糖凝胶上电泳,用紫外透射仪观察。

1.2.8　MTT 法检测 rAAV2/HSV1-TK 病毒转染对细胞增殖活性的影响　以 0.25% 胰蛋白酶+0.02% EDTA 液消化生长至 90% 融合 N/N1003A 细胞,按每孔 5×10^3 细胞/孔接种于 96 孔板,常规细胞培养 1 d 后,按 MOI = 10^4, 10^5, 10^6 分别加入 rAAV2/HSV1-TK(转染方法同上),未转染组作对照。每组设 5 个平行孔,再培养 4 d后,每孔加入 0.5% 噻唑蓝溶液 20 μL,继续培养 4 h 后终止培养,弃上清,然后每孔加入 150 μL DMSO,震荡 10 min,置于酶标仪测定 570 nm波长处各孔吸光值(OD 值)。

1.3　统计学处理　采用 SPSS11.0 统计软件行正态性分析及方差齐性检验,方差齐者用 *t* 检验,方差不齐者进行数据转换后采用 *t* 检验。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2　结　　果

2.1　质粒 pSNAV2.0-TK 的构建及鉴定　通过基因重组技术,得到表达 HSV1-TK 的 AAV 载体质粒 pSNAV2.0-TK,具有 AAV 的两个倒转末端重复序列(ITR),*TK* 基因位于 CMV 立早启动子控制之下,同时质粒上含新霉素抗性基因。质粒经 *Sal*I 和 *Eco*RI 双酶切及 PCR 分析,均得到约 1 151 bp的条带,证实构建正确(图 1)。

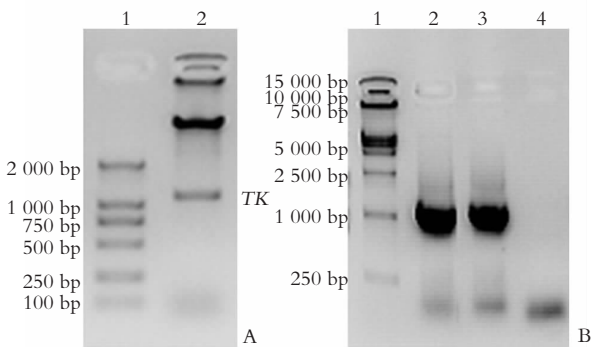

图 1　重组质粒 pSNAV2.0-TK 的酶切和 PCR 分析。 A:酶切分析; B:凝胶电脉结果。

Fig.1 Digestion with the restriction enzyme and gel electrophoresis of PCR production for the recombinant plasmid pSNAV2.0-TK. A: Restriction enzyme analysis of the recombinant plasmid pSNAV2.0-TK. 1: DNA marker DL-2000; 2: *Eco*RI + *Sal*I. B: Gel electrophoresis of PCR production. 1: DNA marker DL-15000; 2: Plasmid pDC316-TK; 3: Plasmid pSNAV2.0-TK; 4: Negative control.

2.2　重组病毒 rAAV2/HSV1-TK 的纯度检测　rAAV2 的外壳由 VP1, VP2, VP3 三种蛋白组成,相对分子质量分别为 87,72,62 kD。用 SDS-PAGE 法分析 rAAV2/HSV1-TK 的纯度,结果如图 2,可见 3 条特征性蛋白条带,无其他杂带。HPLC 法分析 rAAV2/HSV1-TK 病毒纯度,如图 3 所示,用 0.58 mL TSKgel SP-NPR(Tosohaas)离子交换柱,上样 100 μL,用波长 280 nm 检测,在保留时间约 9 min 时有 rAAV2/HSV1-TK 单一吸收峰,其百分面积积分纯度 >98%,未见其他杂峰。

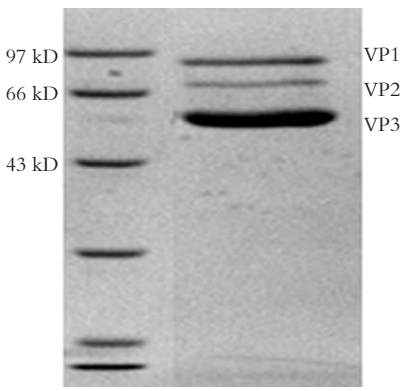

图 2　SDS-PAGE 分析 rAAV2/HSV1-TK 的纯度。

Fig.2 SDS-PAGE analysis of rAAV2/HSV1-TK purity. 1: Protein MW marker; 2: rAAV2/HSV1-TK.

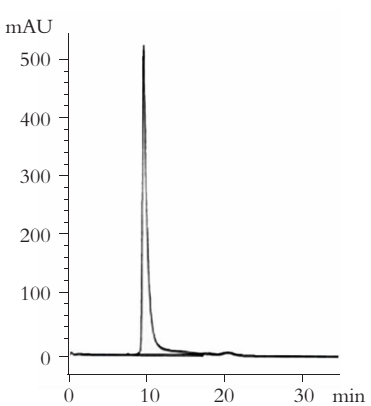

图 3　HPLC 法分析 rAAV2/HSV1-TK 的纯度。

Fig.3 HPLC analysis of rAAV2/HSV1-TK purity.

2.3　重组病毒 rAAV2/HSV1-TK 的滴度测定　以地高辛标记的 CMV 探针,通过斑点杂交法检测纯化后病毒液中 rAAV2/HSV1-TK 病毒颗粒的基因组数,rAAV2/HSV1-TK 的滴度为 1×10^{12} v.g./mL。

2.4　转染细胞整合基因的检测　PCR 和 RT-PCR 分别从重组病毒 rAAV2/HSV1-TK 转染后的

细胞基因组 DNA 和 cDNA 中扩增出 1 151 bp 的特异性 *TK* 基因片段(图 4,5)。

2.5 rAAV2/HSV1-TK 转染对细胞增殖活性的影响 用相差显微镜观察,对照组 N/N1003A 细胞贴壁良好,呈多角形上皮样细胞;实验组细胞转染 *HSV1-TK* 基因后细胞形态与对照组细胞相比无明显变化,呈多角形贴壁生长(结果未显示)。按 MOI = 10^4,10^5,10^6 转染 rAAV2/HSV1-TK 各组的 OD 值分别为 0.563 ± 0.004,0.562 ± 0.008,0.567 ± 0.007,对照组 OD 值为 0.561 ± 0.004,各实验组与对照组比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。

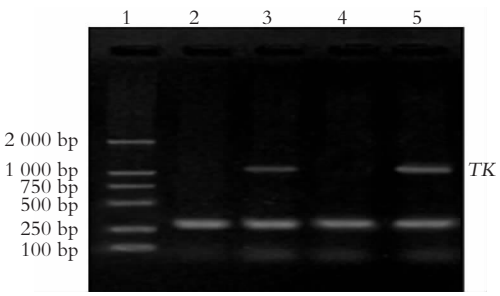

图 4 PCR 检测 *HSV1-TK* 基因在 N/N1003A 细胞中的整合。

Fig. 4 Gel electrophoresis of PCR production for the HSV1-TK gene integrating into N/N1003A. 1: DNA marker DL-2000; 2: Untransfected group for 2 d; 3: Transfected group for 2 d; 4: Untransfected group for 7 d; 5: Transfected group for 7 d.

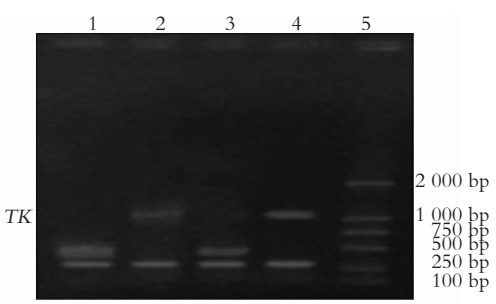

图 5 *HSV1-TK* mRNA 在 N/N1003A 细胞中的表达。

Fig. 5 Expression of *HSV1-TK* mRNA in N/N1003A cells. 1: Untransfected group for 2 days; 2: Transfected group for 2 days; 3: Untransfected group for 7 days; 4: Transfected group for 7 days; 5: DNA marker DL-2000.

3 讨 论

后囊膜混浊的基因治疗是近年来眼科研究领域的热点,所应用的基因转移载体只有腺病毒、逆转录病毒、慢病毒[8]等,尚未找到一条安全高效的基因转移途径。腺相关病毒具有安全性好、免疫原性低、可介导外源基因长期表达等特点,可能是后囊膜混浊基因治疗的理想病毒载体。本实验应用基因重组技术,构建重组质粒 pSNAV2.0-TK,经 PCR 和酶切鉴定,表明成功构建了携带 *HSV1-TK* 基因的重组腺相关病毒载体质粒。

rAAV 能否规模化生产已成为它能否应用于临床的"瓶颈"。传统的 rAAV 生产系统在载体 DNA,AAV 的复制蛋白(Rep)和外壳蛋白(Cap),宿主细胞及辅助病毒 4 种成分的参与下,采用共转染的方式产生病毒颗粒,每个细胞可产生含外源基因的 rAAV 病毒颗粒一般仅能达到 10^2,并且伴有野生型 AAV2 的污染,因此不能满足基因治疗临床应用的需要[9]。本实验先建立携带重组载体质粒 pSNAV2.0-TK 的载体细胞株 BHK-21/TK,然后以表达 Rep 和 Cap 的重组 HSV-1 作为辅助病毒[10],用它感染携带载体成分的细胞株,变 rAAV 生产需要的 4 因素为 2 因素,可实现 rAAV 的大规模生产。此 rAAV 生产系统中,*Rep* 和 *Cap* 基因可随重组 HSV-1 病毒的复制达到高拷贝、获得高表达,而表达出的 Rep 又可将整合于载体细胞株的 rAAV 病毒基因组拯救并复制,因此可生产出高滴度的 rAAV。常规的 rAAV 纯化方式采用若干轮氯化铯密度梯度离心,该方法费时费力、回收率低,得到的 rAAV 质量常不稳定,并可能使 rAAV 的感染性降低[11]。同时,氯化铯对人体具有潜在毒性,不适合临床应用,因此目前已不提倡使用氯化铯的纯化方法。本实验采用"氯仿处理-PEG/NaCl 沉淀-氯仿抽提"的三步浓缩、纯化方法,成功制备了高纯度、高滴度的 rAAV2/HSV1-TK 病毒。

研究表明[12],白内障术后数小时内即启动了晶状体上皮细胞的增殖过程,因此用于后囊膜混浊基因治疗的目的基因需要较早地表达并产生效应。本文首次应用 rAAV2 介导 *HSV1-TK* 基因转染体外培养晶状体上皮细胞,PCR 扩增法检测 *HSV1-TK* 基因在转染细胞中的整合,结果表明,

病毒转染后第 2 天细胞中即有 *HSV1-TK* 基因特异性片段产生,说明 *HSV1-TK* 基因已整合入细胞基因组中。同时,实验还检测到细胞在病毒转染后第 2 天及第 7 天均有 *HSV1-TK* 基因的 mRNA 表达,证明 rAAV2 可介导 *HSV1-TK* 基因整合到晶状体上皮细胞基因组中并得到了早期的有效转录。

本实验通过基因重组技术,成功构建了携带 *HSV1-TK* 基因的重组腺相关病毒载体质粒 pSNAV2.0-TK,制备出高纯度、高滴度的重组病毒 rAAV2/HSV1-TK,并已证实重组病毒可介导 *HSV1-TK* 基因转入晶状体上皮细胞,为进一步探讨腺相关病毒介导 HSV1-TK/GCV 自杀系统进行后囊膜混浊的基因治疗奠定了基础。

参考文献:

[1] Thompson A M, Sachdev N, Wong T, et al. The Auckland Cataract Study: 2 year postoperative assessment of aspects of clinical, visual, corneal topographic and sfactionoutcomes [J]. Br J Ophthalmol, 2004, 88(8): 1042-1048.

[2] Stager D R Jr, Weakley D R Jr, Hunte J S. Long-term rates of PCO following small incision foldable acrylic intraocular lens implantation in children [J]. J Pediatr Ophthalmol Strabismus, 2002, 39(2): 73-76.

[3] 丁芝祥,谭浅,刘双珍,等. 重组增强型绿色荧光蛋白腺相关病素转染兔晶状体上皮细胞的研究[J]. 眼科新进展, 2006, 26(12): 889-892.
DING Zhi-xiang, TAN Qian, LIU Shuang-zhen, et al. Transfection of rabbit lens epithelial cells with recombinant enhanced green fluorescent protein by adeno-associated virus [J]. Rec Adv Ophthalmol, 2006, 26(12): 889-892.

[4] 萨姆布鲁克. J,弗里奇. EF,曼尼阿蒂斯. T. 分子克隆实验指南[M]. 金冬雁, 黎孟枫,译. 2 版. 北京:科学出版社, 1999.
Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual [M]. Translated by JIN Dong-yan, LI Meng-feng. 2nd ed. Beijing: Science Press, 1999.

[5] 伍志坚,吴小兵,曹晖,等. 一种高效的重组腺伴随病毒载体生产系统[J]. 中国科学(C 辑), 2001, 31(5): 423-430.
WU Zhi-jian, WU Xiao-bin, CAO Hui, et al. A novel and highly efficient production system for recombinant adeno-associated virus vector [J]. Science in China (Series C), 2001, 31(5): 423-430.

[6] 吴小兵,董小岩,伍志坚,等. 一种快速高效分离腺病毒伴随病毒的方法[J]. 科学通报, 2000, 45(19): 2071-2075.
WU Xiao-bin, DONG Xiao-yan, WU Zhi-jian, et al. A novel technique for adeno-associated virus purification [J]. Chin Sci Bull, 2000, 45(19): 2071-2075.

[7] Debelak D, Fisher J, Iuliano S, et al. Cation-exchange high performance liquid chromatography of recombinant adeno-associated virus type 2 B [J]. J Chromatogr B Biomed Sci Appl, 2000, 740(2): 195-202.

[8] 杨晋,卢奕,郭礼和,等. 慢病毒介导的单纯疱疹病毒胸苷激酶基因/丙氧鸟苷体系抑制人晶状体上皮细胞的研究[J]. 中华眼科杂志, 2007, 43(9): 810-816.
YANG Jin, LU Yi, GUO Li-he, et al. The effect of lentivirus-mediated suicide gene therapy on lens epithelial cells [J]. Chin J Ophthalmol, 2007, 43(9): 810-816.

[9] Samulski R J, Chang L S, Shenk T. Helper free stocks of recombinant adeno-associated viruses: normal integration does not require viral gene expression [J]. J Virol, 1989, 63(6): 3822-3828.

[10] Wu Z J, Wu X B, Hou Y D. Generation of a recombinant herpes simplex virus which can provide packaging function for recombinant adeno-associated virus [J]. Chin Sci Bull, 1999, 44(8): 715-719.

[11] Synder R O, Xiao X, Samulski R J. Production of recombinant adeno-associated viral vectors [M]. Dracopoli NC. Current Protocols in Human Genetics. New York: John Wiley, 1996.

[12] Noemi L, Rosemary D, Alastair D M, et al. A new model of posterior capsule opacification in rodents [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2003, 44(8): 3450-3457.

(本文编辑　陈丽文)