



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102154368 B

(45) 授权公告日 2015.01.21

(21) 申请号 201010110290.7

(22) 申请日 2010.02.11

(73) 专利权人 上海比昂生物医药科技有限公司
地址 201323 上海市南汇区祝桥祝潘路 65 号

(72) 发明人 杨光华 张文炜 王华

(74) 专利代理机构 上海三和万国知识产权代理
事务所(普通合伙) 31230
代理人 章鸣玉

(51) Int. Cl.

C12N 15/867(2006.01)

C12N 15/67(2006.01)

A61K 48/00(2006.01)

A61P 35/00(2006.01)

(56) 对比文件

谢丽等. 四环素调控基因表达系统的研究新
进展.《肿瘤》.2003,第23卷(第6期),

Maidier Zabala 等.Optimization of the
Tet-on System To Regulate Interleukin 12

Expression in the Liver for the Treatment
of Hepatic Tumors.《CANCER RESEARCH》.2004,
第64卷

Maidier Zabala 等.Optimization of the
Tet-on System To Regulate Interleukin 12
Expression in the Liver for the Treatment
of Hepatic Tumors.《CANCER RESEARCH》.2004,
第64卷

张小男等.基于四环素调控系统的病
毒载体在基因治疗中的应用.《生物技术通
讯》.2009,(第10期),

张小男等.基于四环素调控系统的病
毒载体在基因治疗中的应用.《生物技术通
讯》.2009,(第10期),

审查员 张艳青

权利要求书1页 说明书3页
序列表5页 附图1页

(54) 发明名称

一种组织特异性兼可调控性慢病毒基因表达
载体

(57) 摘要

本发明涉及一种慢病毒载体。具有组织特异
性兼备可调控性双基因表达。其特征在于具有沿
着5'至3'方向至少包括下列元件:polyA60尾巴、
逆式四环素反应激活因子(rtTA2s-M2)、血管内
皮钙启动子(VEcad),四环素调控性白蛋白融合
启动子(TRE/alb)、荧光素酶基因(luciferase)。本
发明构建的载体的双基因表达盒采用反式表达的
方式,最大限度减少了外源性核苷酸序列片段,
使其可插入有容量限制的慢病毒载体,并对插入
的荧光素酶基因不作限定,可以自由选择外源性
目的基因与可调控性启动子搭配,该载体表达盒
在不需要提高慢病毒量滴度转染细胞的同时既能
保持外源性目的基因可控性表达且显著提高外源
基因的表达效率。

1. 一种慢病毒基因表达载体,其特征在于,所述表达载体为序列表 SEQ IDNo. 1 所示的序列,从 5' -3' 方向至少包括以下元件:

- i. PolyA 尾巴序列;
- ii. 转录激活因子编码序列;
- iii. 对应于组织特异性启动子序列;
- iv. 对应于药物和转录激活因子的可调控性启动子;
- v. 包括编码至少一种目的外源基因序列;

元件 i 是 S60PolyA 尾巴;

元件 ii 是逆式四环素反应激活因子 rtTA2s-M2;

元件 iii 是血管内皮细胞特异性启动子 VEcad。

2. 权利要求 1 中所述的慢病毒基因表达载体在将遗传序列物质转入细胞的方法中的非治疗用途。

3. 权利要求 2 所述的用途,其中所述细胞为血管内皮细胞。

一种组织特异性兼可调控性慢病毒基因表达载体

技术领域

[0001] 本发明属于生物技术领域，具体涉及一种慢病毒双基因表达载体、其构建方法及应用。

背景技术

[0002] 慢病毒载体是以人类免疫缺陷 1 型病毒为基础发展起来的基因治疗载体。区别一般的逆转录病毒载体，它对分裂细胞和非分裂细胞均具有感染能力。该载体可以将外源基因有效地整合到宿主染色体上，从而达到持久性表达。在感染能力方面可有效地感染神经元细胞、肝细胞、心肌细胞、肿瘤细胞、内皮细胞、干细胞等多种类型的细胞，从而达到良好的基因治疗效果。

[0003] 一种有效的治疗基因载体需满足以下基本条件：基因表达效率高，能达到治疗效果；对靶细胞组织有特异性且基因表达水平可控性从而使其使用具有安全性。为了达到基因表达的可控性，目前常用四环素或其衍生物作用于与其相对应的启动子达到受其控制的外源目的基因水平的调控。为了提高基因治疗的安全性，在载体构建中通常使用组织特异性启动子以达到相应组织细胞内的目的基因的表达。由于基因治疗的效果很大部分取决于靶细胞内的基因表达水平。因此，为提高基因表达效率，目前在基因治疗领域中常用的方法是采用两个独立载体联合转染细胞。第一个载体通常含一启动子用于表达一种转录激活因子，第二个载体含一对应与第一载体所含的转录激活因子的启动子用来表达目的基因，第一载体的转录激活因子通过加强作用于第二载体的启动子从而增高目的基因的表达水平。用这种方法虽能提高基因表达治疗量却增加了用于转染细胞所需的总病毒量滴度。

[0004] 此外，由于慢病毒载体的基因组 (genome) 约 8kb，只能容纳有限的外源性插入 DNA 序列，而且双基因表达载体多为顺式表达，对第二个基因的表达量具有一定的降低。因此，构建一种可控性与高效率的基因表达盒于一体的载体既能提高治疗效果又能增加安全性。同时这样一种载体不但具有联合转染的效果同时又降低为了能达到联合转染效果所需的两个载体的总病毒量滴度，从而保证了既具使用安全性又降低了成本。

发明内容

[0005] 为解决以上所述现有技术中存在的问题，本发明的构建了一种具有组织细胞特异性并兼备可调控目的基因高效表达的慢病毒双基因表达载体。此慢病毒载体具有两个各自独立的基因表达盒。两个基因表达盒呈反式方向设置并共享一个 PolyA 尾巴。一个基因表达盒沿 5' 至 3' 方向含有对药物呈可调控启动子，由其控制外源性目的基因的表达。另一个基因表达盒沿 3' 至 5' 方向含有组织细胞特异性启动子控制一转录激活因子。此转录激活因子在四环素衍生物 Doxycycline (Dox) 的存在并达到一定剂量下能激活并放大另一基因表达盒内的可调控启动子从而显著提高目的基因的表达量。在药物不存在或低于一定剂量时，此载体由于转录激活因子未有效作用于可调控性启动子而呈低基线基因表达水平。此外，在特异的组织细胞内，组织细胞特异性启动子由于该组织内源性转录激活因子对其的

作用而活性增强,使受控于该组织细胞特异性启动子的外源性转录激活因子表达提高。在非特异的组织细胞内,外源性转录激活因子呈基线表达水平。当此慢病毒载体感染对应与其组织特异细胞并在 Dox 存在一定剂量下,受控于可调控启动子的外源性目的基因因双重放大效应而达到最高表达水平。

[0006] 本发明的另一个目的在于提供上述载体的构建方法;

[0007] 本发明的再一个目的在于提供上述载体在基因治疗领域中的应用,特别是肿瘤治疗。

附图说明

[0008] 图 1 是载体 TRELuc, VEcadrtTA 和 SindLuc-A1。

[0009] 图 2 是荧光酶基因在四环素衍生药物 DOX (1/ml) 调控下分别在血管特异性内皮细胞和非特异性细胞中的表达水平。

[0010] 图 3 是 TRELuc, VEcadrtTA 双载体联合转染和 SindLuc-A1 载体单独转染人体宫颈癌 HeLa 细胞 72 小时后的慢病毒滴度量与插入基因表达盒大小的关系。

具体实施方式

[0011] 下面结合实施例对本发明作进一步说明,但不用来限制本发明的范围。

[0012] 本实施例将以 SEQ IDNO. 1 所示的慢病毒表达载体为例来具体描述其构建方法及应用。

[0013] 本发明的表达载体具有列表 SEQ ID No. 1 所示的序列,其至少包括 polyA60 尾巴、逆式四环素反应激活因子 (rtTA2s-M2)、血管内皮细胞特异性 (VEcad) 启动子,四环素调控性白蛋白融合 (TRE/alb) 启动子、荧光素酶基因 (luciferase)。

[0014] 本发明还提供了构建上述表达载体的方法,其包括如下步骤:

[0015] 1. 以 pRRL. cPPT. PGK. eGFP. WPRE (Adogen 购买) 为模版,用 BamH1-Sal1 酶切释放 eGFP 片段,然后把含有 BamH1-Xho1-Xma1-Sma1-Xba1-Mlu1-Nhe1-BglIII-Sal1 多酶切位点的 DNA 片段通过 BamH1-Sal1 位点联接到模版 DNA 载体,得到中间载体 pRRL. cPPT. PGK. linker. WPRE;

[0016] 2. 以 pRRL. cPPT. PGK. linker. WPRE 载体为模版,用 Xma1-Xba1 从 pG13-basic 载体 (Invitrogen 购买) 酶切释放荧光媒体基因片段后再通过 Xma1-Xba1 位点,联结到 pRRL. cPPT. PGK. linker. WPRE,得到中间载体 pRRL. cPPT. PGK. Luc. WPRE;

[0017] 3. 以 pRRL. cPPT. PGK. linker. WPRE 为模版,同过 Xho1 酶切释放出 PGKDNA 片段,得到中间载体 pRRL. cPPT. linker. WPRE;

[0018] 4. 通过 Nhe1-BamH1 酶切载体 pmVEcad-rtTA (Invitrogen 购买),释放出 mVEcad-rtTA 片段,然后通过 Nhe1-BglIII 位点,联结到 pRRL. cPPT. linker. WPRE 得到慢病毒载体 pRRLcPPT. mVEcad-rtTA. WIRE (VEcadrtTA) (图 1);

[0019] 5. 通过 Xho1-Xba1 酶切点,从载体 pTREalb-Luc (Invitrogen 购买) 释放 TREalb-Luc 片段;联接到 pRRL. cPPT. linker. WPRE,得到载体 pRRL. cPPT. TREalb-Luc (TRELuc) (图 1);

[0020] 6. mVEcad-rtTA-S60PA 基因表达盒从载体 pmVEcad-rtTA-S60PA (Invitrogen 购

买) 通过 Xho1-Acc1 酶切位点释放后再通过 Xho1-ClaI 联接到 TRELuc 载体, 得到 pRRL-cPPT-S60PA-rtTA-mVEcad-TREalb-Luc (SindLuc-A1) (图 1) 慢病毒可控性载体。

[0021] 慢病毒转染细胞与荧光酶基因表达水平测试:

[0022] 人体微血管内皮细胞 (Humvec), 人体脐带血管内皮细胞 (Humvec), 人体脐带血管内皮细胞 (Huvec), Hep3B 细胞和人体宫颈癌细胞 (HeLa) 分别置于 24 孔细胞培养板, 每孔用 300 微升 DMEM 含 10% 牛血清的培养液。当细胞在每孔中达到 50-60% 克隆率后, 用慢病毒载体 SindLuc-A1 和 TRELuc, VEcadrtTA 双载体分别转染人体微血管内皮细胞 (Humvec), 人体脐带血管内皮细胞 (Huvec), Hep3B 细胞和人体宫颈癌细胞 (HeLa), 感染复数 (MOI) 为 5 次。转染 16 小时后, 每孔内细胞用 PBS 清洗以去除病毒 RNA, 然后再加上述培养液继续扩增生长。至 72 小时, 每孔内转染细胞再次由 PBS 液清洗两次后加 Passive Lysis Buffer (Promega 购买) 溶碎, 各孔内细胞提取物被系列稀释后每 20 微升用 100 微升荧光酶基因表达测试剂 Luciferase Assay Reagent (Promega 购买) 混合, 荧光酶基因表达水平由光度计测试。

[0023] 慢病毒滴度量测试:

[0024] 慢病毒滴度的定量通过测试慢病毒感染颗粒量。分别被 SindLuc-A1 和 TRELuc, VEcadrtTA 双载体转染后的 HeLa 细胞被置于 24-孔培养板, 每孔培养液中每毫升含 8 微克的聚凝胺 (Sigma 购买)。72 小时后, 被各载体转染的 HeLa 细胞的全细胞基因组 DNA 用微小 DNA 血测试剂盒 DNA Blood Mini Kit 50 (Qiagen 购买) 提取。慢病毒颗粒滴度量用 (TU/mL) 表示并通过定量聚合酶链式反应 PCR 来作定量分析。探针的 5' 用波长为 518nm 的报告染色分子 FAM 标记, 3' 用波长为 582nm 的报告染色分子 TAMRA 标记, 在 PCR 过程中探针的 3' 又被磷酸化。用于 PCR 作慢病毒滴度测试的引物和探针分别为: 正向引物: 5' -CCGTTTCAGGCAACGTG-3'; 反向引物: 5' -AGCTGACAGGTGGTGGCAAT-3'; 探针: 5' FAM-CCAGC CATGTACGTTGCTATCCAGGC-TAMRA-3'。PCR 的测试用 PCR Master Mix (Promega 购买)。

[0025] 结果: 组织特异性可调性慢病毒载体 SindLuc-A1 在转染具血管内皮细胞特异性人体微血管内皮细胞 (Humvec), 人体脐带血管内皮细胞 (Huvec) 和非血管内皮细胞特异性 Hep3B 细胞和人体宫颈癌细胞 (HeLa) 72 小时后, 在无 Dox 存在下, 荧光酶基因在 Humvec, Huvec, Hep3B 和 HeLa 细胞中基因表达水平与用慢病毒载体 TRELuc, VEcadrtTA 双载体联合转染的同种细胞中的表达水平无显著差别并呈基线水平表达 (图 2)。在 Dox 以每毫升 1 微克存在的情况下同 Dox 不存在的条件下相比, 荧光酶基因在 SindLuc-A1 转染的 Humvec 细胞内的表达水平与用双载体转染的细胞内的表达水平都有显著提高 (图 2), 且呈现药物 Dox 的可调控性。其中, 在 SindLuc-A1 转染的 Humvec 细胞内的表达水平虽低于用双载体转染的细胞内的表达水平, 而在 SindLuc-A1 转染的 Huvec 细胞内的表达水平却显著高于用双载体转染的细胞内的表达水平 (图 2)。在非血管内皮细胞特异性 Hep3B 和 HeLa 细胞内, 用 SindLuc-A1 载体单独转染和 TRELuc, VEcadrtTA 双载体联合转染后, Dox 的存在与否对荧光酶基因表达水平几乎无影响 (图 2)。在用慢病毒载体 SindLuc-A1 和 TRELuc, VEcadrtTA 双载体联合转染的 HeLa 细胞中, 转染 72 小时后测试出的 SindLuc-A1 病毒滴度比 TRELuc 和 VEcadrtTA 的滴度要低。由此可见, 慢病毒载体 SindLuc-A1 不但呈现显著组织特异性和药物可调控性而且在不需增加病毒滴度的前提下能达到 TRELuc, VEcadrtTA 双载体联合转染的基因表达水平 (图 3)。

SEQUENCE LISTING

<110> 上海比昂生物医药科技有限公司

<120> 一种组织特异性兼可调控性慢病毒基因表达载体

<130>CN101040

<160>1

<170>PatentIn version 3.3

<210>1

<211>10359

<212>DNA

<213> 人工合成

<400>1

ctcgagacta gtaggcgac	gcatacgtac gaagatatct	tacgcgtcct taattaacgc	60
ctgcaggaga cggaccgtga	tttaaatcag ggcgcgccctc	gagtttacca ctccctatca	120
gtgatagaga aaagtgaaag	tcgagtttac cactccctat	cagtgataga gaaaagtga	180
agtcgagttt accactccct	atcagtgata gagaaaagtg	aaagtcgagt ttaccactcc	240
ctatcagtga tagagaaaag	tgaaagtcca gtttaccact	ccctatcagt gatagagaaa	300
agtgaaagtc gagtttacca	ctccctatca gtgatagaga	aaagtgaaag tcgagtttac	360
cactccctat cagtgataga	gaaaagtga agtcgagtc	ggtacccggg accgcggaca	420
gctccagatg gcaaacatac	gcaagggatt tagtcaaaca	actttttggc aaagatggta	480
tgattttgta atggggtagg	aaccaatgaa atgcgaggta	agtatggta atgatctaca	540
gttattggtt aaagaagtat	attagagcga gtctttctgc	acacacgac acctttecta	600
tcaacccac taagctttta	catatgtttc tgcagggtt	cgaagcttgg cattccggta	660
ctgttggtaa agccaccatg	gaagacgcca aaaacataaa	gaaaggcccg gcgccattct	720
atccgctgga agatggaacc	gctggagagc aactgcataa	ggctatgaag agatacgecc	780
tggttctctg aacaattgct	tttacagatg cacatatcga	ggtggacatc acttacgetg	840
agtacttcga aatgtccgtt	cggttggcag aagctatgaa	acgatatggg ctgaatacaa	900
atcacagaat cgtcgtatgc	agtgaaaact ctcttcaatt	ctttatgccg gtgttgggcg	960
cgttatttat cggagttgca	gttgcgcccg cgaacgacat	ttataatgaa cgtgaattgc	1020
tcaacagtat gggcatttcg	cagcctaccg tgggttctgt	ttccaaaaag gggttgcaaa	1080
aaattttgaa cgtgcaaaaa	aagctcccaa tcatcaaaaa	aattattatc atggatteta	1140
aaacggatta ccagggattt	cagtcgatgt acacgttcgt	cacatctcat ctacctccc	1200
gttttaata ga atacgatttt	gtgccagagt ccttcgatag	ggacaagaca attgcaactga	1260
tcatgaactc ctctggatct	actggctctgc ctaaaggtgt	cgctctgcct catagaactg	1320
cctgcgtgag attctcgc	atgccagatc ctatcttttg	caatcaaate attccggata	1380
ctgcgatttt aagtgttggt	ccattccatc acggtttttg	aatgtttaet acaactcggat	1440
atgtgatatg tggatttcga	gtcgtcttaa tgtatagatt	tgaagaagag ctgtttctga	1500
ggagccttca ggattacaag	attcaaagtg cgctgctggt	gccaacceta ttctccttct	1560
tcgcaaaaag cactctgatt	gacaaatacg atttatctaa	tttacacgaa attgcttctg	1620

gtggcgctcc	cctctctaag	gaagtcgggg	aagcggttgc	caagaggttc	catctgccag	1680
gtatcaggca	aggatatggg	ctcactgaga	ctacatcagc	tattctgatt	acacccgagg	1740
gggatgataa	accgggcgcg	gtcggtaaag	ttgttccatt	ttttgaagcg	aaggttgtgg	1800
atctggatac	cgggaaaacg	ctgggcgtta	atcaaagagg	cgaactgtgt	gtgagaggtc	1860
ctatgattat	gtccggttat	gtaacaate	cggaaagcagc	caacgccttg	attgacaagg	1920
atggatggct	acattctgga	gacatagctt	actgggacga	agacgaacac	ttcttcatcg	1980
ttgaccgcct	gaagtctctg	attaagtaca	aaggetatca	ggtggctccc	gctgaattgg	2040
aatccatctt	gctccaacac	cccaacatct	tcgacgcagg	tgtcgcagg	cttcccagc	2100
atgacgccgg	tgaacttccc	gccgccgttg	ttgttttggg	gcacggaaag	acgatgacgg	2160
aaaaagagat	cgtggattac	gtcggcagtc	aagtaacaac	cgcgaaaaag	ttgcgcggag	2220
gagttgtgtt	tgtggacgaa	gtaccgaaag	gtcttaccgg	aaaactcgac	gcaagaaaa	2280
tcagagagat	cctcataaag	gccaaagaag	gcggaagat	cgccgtgtaa	ttctagagat	2340
ccagagcagg	aacagcggaa	acgagcagc	cgccgggac	caccggctgc	caccatggtg	2400
agcggcctgc	tgaaggagag	tatgcgcate	aagatgtaca	tggagggcac	cgtgaacggc	2460
cactacttca	agtgcgaggg	cgagggcgac	ggcaaccct	tcgccggcac	ccagagcatg	2520
agaatccacg	tgaccgaggg	cgccccctg	cccttcgct	tcgacatcct	ggccccctgc	2580
tgcgagtacg	gcagcaggac	cttcgtgcac	cacaccgccc	agatccccga	cttcttcaag	2640
cagagcttcc	ccgagggctt	cacctgggag	agaaccacca	cctacgagga	cggcggcatc	2700
ctgaccgccc	accaggacac	cagcctggag	ggcaactgcc	tgatctacaa	ggtgaagggtg	2760
cacggcacca	acttccccgc	cgacggcccc	gtgatgaaga	acaagagcgg	cggctgggag	2820
cccagcaccg	aggtggtgta	ccccgagaac	ggcgtgctgt	gcgccgggaa	cgtgatggcc	2880
ctgaagggtg	gagaccggca	cctgatctgc	caccactaca	ccagctaccg	gagcaagaag	2940
gccgtgcgcg	ccctgaccat	gcccggcttc	cacttcaccg	acatccggct	ccagatgctg	3000
cggaagaaga	aggacgagta	cttcgagctg	tacgaggcca	gctggccccg	gtacagcgac	3060
ctgcccgaga	aggccaactg	aagcggcccc	cgtatcgcta	gcttttagatc	tcccgtcgac	3120
aatcaacctc	tggattacaa	aatttgtgaa	agattgactg	gtattcttaa	ctatgttget	3180
ctttttacgc	tatgtggata	cgctgcttta	atgcctttgt	atcatgctat	tgcttcccgt	3240
atggctttca	ttttctctc	cttgataaaa	tcctggttgc	tgtctcttta	tgaggagtgg	3300
tggcccgttg	tcaggcaacg	tgccgtgggtg	tgactgtgt	ttgctgacgc	aacccccact	3360
ggttggggca	ttgccaccac	ctgtcagctc	ctttccggga	ctttcgcttt	ccccctcct	3420
attgccacgg	cggaactcat	cgccgcctgc	cttgcccgt	gctggacagg	ggctcggtg	3480
ttgggcaactg	acaattccgt	ggtgttgtcg	gggaagctga	cgctccttcc	atggctgctc	3540
gcctgtgttg	ccacctggat	tctgcgcggg	acgtccttct	gctacgtccc	ttcggccctc	3600
aatccagecg	accttcctc	ccgcggcctg	ctgccggctc	tgcggcctct	tccgcgtctt	3660
cgcttcgcc	ctcagacgag	tcggatctcc	ctttgggccc	cctccccgcc	tggaattcga	3720
gctcgggtacc	tttaagacca	atgacttaca	aggcagctgt	agatcttagc	cactttttaa	3780
aagaaaagg	gggactggaa	gggctaataca	ctcccaacga	agacaagatc	tgttttttgc	3840
ttgtactggg	tctctctggt	tagaccagat	ctgagcctgg	gagctctctg	gctaactagg	3900
gaaccactg	cttaagcctc	aataaagctt	gccttgagtg	cttcaagtag	tgtgtgccc	3960

tctgttgtgt	gactctggta	actagagate	cctcagacce	ttttagtcag	tgtggaaaat	4020
ctctagcagt	agtagttcat	gcatctttat	tattcagtat	ttataacttg	caaagaaaatg	4080
aatatcagag	agtgagagga	acttgtttat	tgcagcttat	aatggttaca	aataaagcaa	4140
tagcatcaca	aatttcacaa	ataaagcatt	tttttactg	cattctagtt	gtggtttgc	4200
caaactcate	aatgtatctt	atcatgtctg	gctctageta	tcccgccct	aactccgcc	4260
agttccgcc	attctccgcc	ccatggctga	ctaattttt	ttatttatgc	agaggccgag	4320
gccgcctcgg	cctctgagct	attccagaag	tagtgaggag	gcttttttg	aggcctaggc	4380
ttttgcgtcg	agacgtacce	aattegccct	atagtgagtc	gtattacgcg	cgctcactgg	4440
ccgtcgtttt	acaacgtcgt	gactgggaaa	accctggcgt	tacccaactt	aatcgccttg	4500
cagcacatcc	cccttccgcc	agctggcgta	atagcgaaga	ggccccacc	gatcgcctt	4560
cccaacagtt	gcgcagcctg	aatggcgaat	ggcgcgacgc	gccctgtagc	ggcgcattaa	4620
gcgcgcgagg	tgtggtggtt	acgcgcagcg	tgaccgctac	acttgccagc	gccctagcgc	4680
ccgctccttt	cgctttcttc	ccttccttcc	tcgccacggt	cgccggcttt	ccccgtcaag	4740
ctctaaatcg	ggggctccct	ttagggttcc	gatttagtgc	tttacggcac	ctcgacccca	4800
aaaaacttga	ttagggtgat	ggttcacgta	tgggccatcg	ccctgataga	cggtttttcg	4860
ccctttgacg	ttggagtcca	cgttctttta	tagtggactc	ttgttccaaa	ctggaacaac	4920
actcaacctt	atctcggctt	attcttttga	ttataaggg	attttgccga	tttcggccta	4980
ttggttaaaa	aatgagctga	tttaacaaaa	atttaacgcg	aattttaaca	aaatattaac	5040
gtttacaatt	tcccaggtgg	cacttttcgg	ggaaatgtgc	gcggaacccc	tatttgttta	5100
tttttctaaa	tacattcaaa	tatgtatccg	ctcatgagac	aataaccctg	ataaatgctt	5160
caataatatt	gaaaaaggaa	gagtatgagt	attcaacatt	tccgtgtcgc	ccttattccc	5220
ttttttgcgg	cattttgcct	tctgttttt	gctcaccag	aaacgctggt	gaaagttaaa	5280
gatgctgaag	atcagttggg	tgcacgagtg	ggttacatcg	aactggatct	caacagcgg	5340
aagatccttg	agagttttcg	ccccgaagaa	cgttttccaa	tgatgagcac	ttttaaagtt	5400
ctgctatgtg	gcgcggtatt	atcccgtatt	gacgccgggc	aagagcaact	cggtcggccg	5460
atacactatt	ctcagaatga	cttggttgag	tactcaccag	tcacagaaaa	gcatcttacg	5520
gatggcatga	cagtaagaga	attatgcagt	gctgccataa	ccatgagtga	taacactgcg	5580
gccaaacttac	ttctgacaac	gateggagga	ccgaaggagc	taaccgcttt	tttgacaac	5640
atgggggatac	atgtaactcg	ccttgatcgt	tgggaaccgg	agctgaaatga	agccatacca	5700
aacgacgagc	gtgacaccac	gatgcctgta	gcaatggcaa	caacgttgcg	caaactatta	5760
actggcgaac	tacttactct	agcttcccgg	caacaattaa	tagactggat	ggagcggat	5820
aaagttgcag	gaccacttct	gcgctcggcc	cttccggctg	gctggtttat	tgctgataaa	5880
tctggagccg	gtgagcgtgg	gtctcgcggt	atcattgcag	cactggggcc	agatggtaag	5940
ccctcccgtta	tcgtagttat	ctacacgacg	gggagtcagg	caactatgga	tgaacgaaat	6000
agacagatcg	ctgagatagg	tgccctactg	attaagcatt	ggtaactgtc	agaccaagtt	6060
tactcatata	tacttagatt	gatttaaaac	ttcattttta	atttaaaagg	atctaggtga	6120
agatcctttt	tgataatctc	atgaccaaaa	tcccttaacg	tgagttttcg	ttccactgag	6180
cgtcagacce	cgtagaaaag	atcaaaggat	cttcttgaga	tccctttttt	ctgcgcgtaa	6240
tctgctgctt	gcaaacaaaa	aaaccaccgc	taccagcgg	ggtttgtttg	ccggatcaag	6300

agctaccaac	tctttttccg	aaggtaactg	gcttcagcag	agcgcagata	ccaaatactg	6360
tcctttctagt	gtagccgtag	ttaggccacc	acttcaagaa	ctctgtagca	ccgcctacat	6420
acctcgctct	gctaatectg	ttaccagtgg	ctgctgccag	tggcgataag	tcgtgtctta	6480
ccgggttggg	ctcaagacga	tagttaccgg	ataaggcgca	gcggtcgggc	tgaacggggg	6540
gttcgtgcac	acagcccagc	ttggagcgaa	cgacctacac	cgaactgaga	tacctacagc	6600
gtgagctatg	agaaagegcc	acgcttcccg	aaggggagaaa	ggcggacagg	tatccggtaa	6660
gcggcagggt	cggaacagga	gagcgcacga	gggagcttcc	agggggaaac	gcctggatc	6720
tttatagtc	tgtcgggttt	cgccacctct	gacttgagcg	tcgatttttg	tgatgctcgt	6780
caggggggcg	gagcctatgg	aaaaacgcca	gcaacgcggc	ctttttacgg	ttcctggcct	6840
tttgctggcc	ttttgctcac	atgttctttc	ctgcgttate	ccctgattct	gtggataacc	6900
gtattaccgc	ctttgagtga	gctgataccg	ctcgccgcag	ccgaacgacc	gagcgcagcg	6960
agtcagtgag	cgaggaagcg	gaagagcgcc	caatacgcaa	accgcctctc	cccgcgcgtt	7020
ggccgattca	ttaatgcagc	tggcacgaca	ggtttcccga	ctggaaagcg	ggcagtgagc	7080
gcaacgcaat	taatgtgggt	agctcactca	ttaggcaccc	caggctttac	actttatgct	7140
tccggctcgt	atgttgtgtg	gaattgtgag	cggataacaa	tttcacacag	gaaacagcta	7200
tgaccatgat	tacgccaagc	gcgcaattaa	ccctcactaa	agggaaacaaa	agctggagct	7260
gcaagcttaa	tgtagtctta	tgcaatactc	ttgtagcttt	gcaacatggt	aacgatgagt	7320
tagcaacatg	ccttacaagg	agagaaaaag	caccgtgcat	gccgattggt	ggaagtaagg	7380
tggtagatc	gtgccttatt	aggaaggcaa	cagacgggtc	tgacatggat	tggacgaacc	7440
actgaattgc	cgcattgcag	agatattgta	tttaagtgcc	tagctcgata	caataaacgg	7500
gtctctctgg	ttagaccaga	tctgagcctg	ggagctctct	ggctaactag	ggaaccact	7560
gcttaagcct	caataaagct	tgccttgagt	gcttcaagta	gtgtgtgccc	gtctgttgtg	7620
tgactctggt	aactagagat	ccctcagacc	cttttagtca	gtgtggaaaa	tctctagcag	7680
tggcgcccga	acagggacct	gaaagcgaaa	gggaaaccag	agctctctcg	acgcaggact	7740
cggcttgctg	aagcgcgcac	ggcaagaggc	gagggcgggc	gactggtgag	tacgcaaaaa	7800
attttgacta	gcggaggcta	gaaggagaga	gatgggtgcg	agagcgtcag	tattaagcgg	7860
gggagaatta	gatcgcgatg	ggaaaaaatt	cggttaaggc	cagggggaaa	gaaaaaatat	7920
aaattaaaac	atatagtatg	ggcaagcagg	gagctagaac	gattcgcagt	taatcctggc	7980
ctgttagaaa	catcagaagg	ctgtagacaa	atactgggac	agctacaacc	atcccttcag	8040
acaggatcag	aagaacttag	atcattatat	aatacagtag	caaccctcta	ttgtgtgcat	8100
caaaggatag	agataaaagc	accaaggaag	ctttagacaa	gatagaggaa	gagcaaaaaca	8160
aaagtaagac	caccgcacag	caagcggccg	ctgatcttca	gacctggagg	aggagatatg	8220
agggacaatt	ggagaagtga	attatataaa	tataaagtag	taaaaattga	accattagga	8280
gtagcaccca	ccaaggcaaa	gagaagagtg	gtgcagagag	aaaaaagagc	agtgggaata	8340
ggagctttgt	tccttgggtt	cttgggagca	gcaggaagca	ctatgggctc	agcctcaatg	8400
acgctgacgg	tacaggccag	acaattattg	tctggtatag	tgcagcagca	gaacaatttg	8460
ctgagggcta	ttgaggcgca	acagcatctg	ttgcaactca	cagtctgggg	catcaagcag	8520
ctccaggcaa	gaatcctggc	tgtggaaaga	tacctaaagg	atcaacagct	cctggggatt	8580
tggggttgct	ctggaaaact	catttgcacc	actgctgtgc	cttggaatgc	tagttggagt	8640

aataaatctc	tggaacagat	ttggaatcac	acgacctgga	tggagtggga	cagagaaatt	8700
aacaattaca	caagcttaat	acactcetta	attgaagaat	cgcaaaacca	gcaagaaaag	8760
aatgaacaag	aattattgga	attagataaa	tgggcaagtt	tgtggaattg	gtttaacata	8820
acaattggc	tgtggtatat	aaaattatc	ataatgatag	taggaggctt	gtaggttta	8880
agaatagttt	ttgctgtact	ttctatagtg	aatagagtta	ggcagggata	ttcaccatta	8940
tcgtttcaga	cccacctccc	aaccccagg	ggacccgaca	ggccccgaagg	aatagaagaa	9000
gaaggtggag	agagagacag	agacagatcc	attcgattag	tgaacggatc	tcgacggtat	9060
cgtttaactt	ttaaaagaaa	aggggggatt	gggggtaca	gtgcagggga	aagaatagta	9120
gacataatag	caacagacat	aaaactaaag	aattacaaaa	acaattaca	aaaattcaaa	9180
atthttatcga	tcacgagact	agcctcgacg	gatccacaca	aaaaaccaac	acacagatct	9240
aatgaaactt	aagatctttt	atthttatcga	gatccttact	tagttacccg	gggagcatgt	9300
caaggtcaaa	atcgtaaga	gcgtcagcag	gcagcatatc	aaggtcaaaag	tcgtcaaggg	9360
catcggttg	gagcatgtct	aagtcaaaat	cgtaagggc	gtcggccggc	ccgccgttt	9420
cgcactttag	ctgtttctcc	aggccacata	tgattagtcc	caggccgaaa	aggaaggcag	9480
gttcggctcc	ctgccggtcg	aacagctcaa	ttgcttgtct	cagaagtggg	ggcatagaat	9540
cgttggttagg	tgtctctctt	tctctttttg	ctacttgatg	ctcctgttcc	tccaatacgc	9600
agcccagtg	aaagtggccc	acggcggaca	gagcgtacag	tgcgttctcc	agggagaagc	9660
cttgctgaca	caggaacgcg	agctgatttt	ccagggtttc	gtactgtttc	tctgttgggc	9720
gggtgccgag	atgcacttta	gccccgtcgc	gatgtgagag	gagagcacag	cggaatgact	9780
tggcgttggt	ccgcagaaag	tcttgccatg	actcgccttc	cagggggcag	aagtgggtat	9840
gatgcctgtc	cagcatctcg	attggcaggg	catcgagcag	ggccccgttg	ttcttcacgt	9900
gccagtacag	ggtaggctgc	tcaactccca	gcttttgagc	gagtttcctt	gtcgtcaggc	9960
cttcgatacc	gactccattg	agtaattcca	gagcgcctgt	tatgactttg	ctcttgtcca	10020
gtctagacat	ggtgaattag	cttagtctgt	ccagggccga	gctttgtgga	gagcacagtt	10080
gattgcctca	ggaggggaga	ggggagccac	accaggtctg	ggagggaggc	aggttttcca	10140
acttgccctg	gcccacttcc	cctcgggatg	gtttcctgtt	attgttcctt	tgtgagctgc	10200
ctcgagatag	gcaagcccta	cggtgggcgg	cctcagcttg	gtcagcctgg	gcccgtggaa	10260
gccttgacc	tgcctgggg	attcaactca	tacctcaatt	ctaggtctca	tcggaggagc	10320
tgtgagccta	ggggtagctg	tggggctct	aagctagat			10359

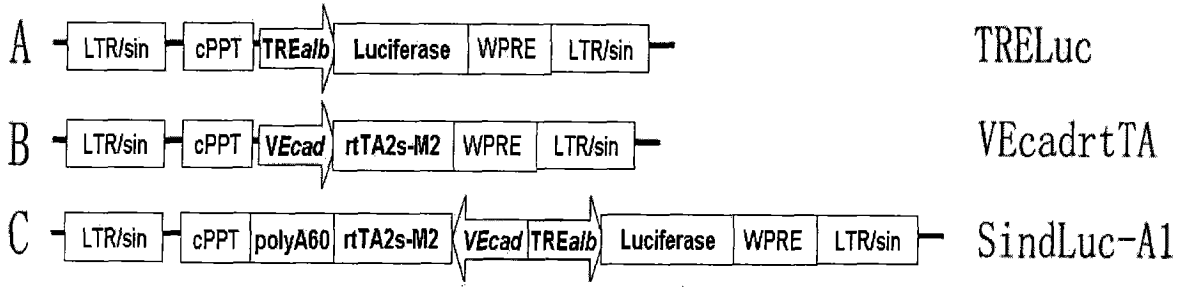


图 1

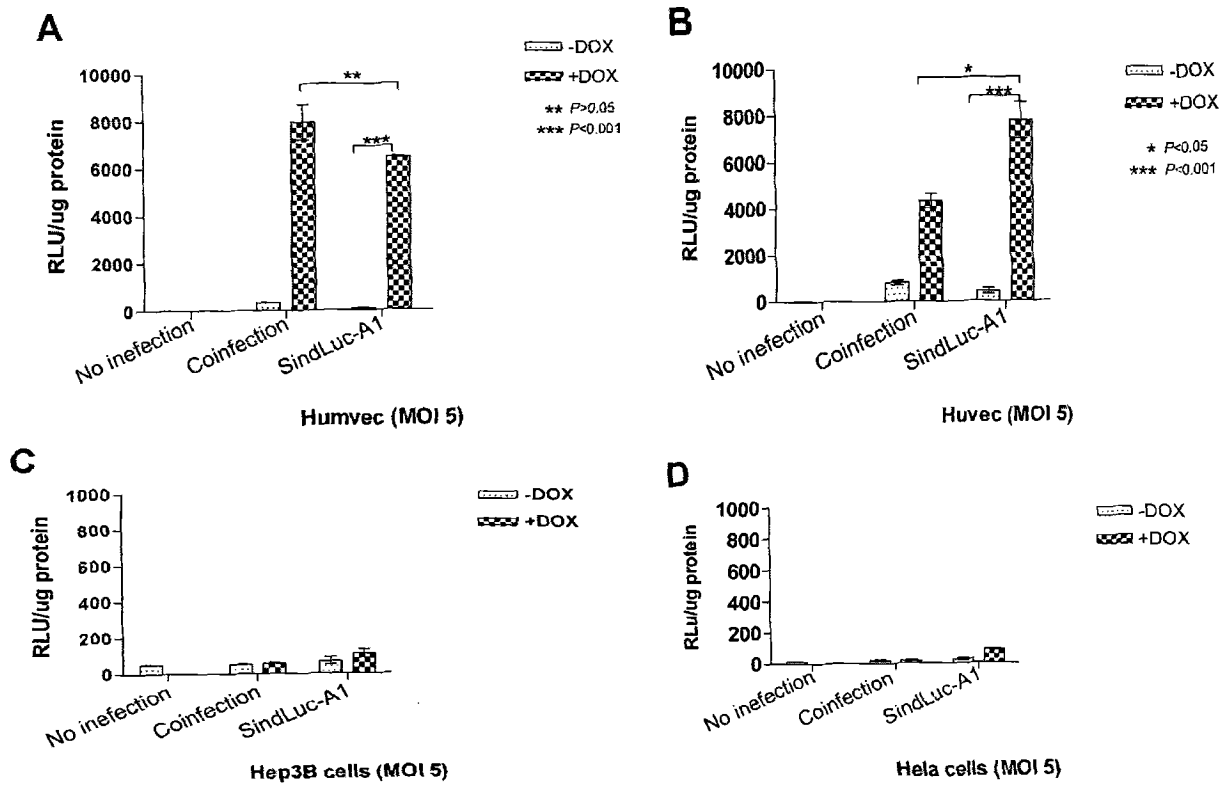


图 2

慢病毒载体	病毒滴度量 (TU/ml)	插入基因表达盒序列 长度(bps)
TRELuc	7.3×10^8	1900
VEcadrtTA	8.1×10^8	1075
SindLuc-A1	4.0×10^8	3428

图 3