

DOI:10.3724/SP.J.1008.2011.00134

· 论 著 ·

## 应用杆状病毒系统制备 8 型腺相关病毒

范 丽<sup>1</sup>, 徐增辉<sup>2</sup>, 金华君<sup>2</sup>, 徐凤青<sup>1</sup>, 丁 娜<sup>1</sup>, 严 淋<sup>2</sup>, 钱其军<sup>1,2\*</sup>

1. 浙江理工大学生命科学院新元医学与生物技术研究所, 杭州 310018

2. 第二军医大学东方肝胆外科医院病毒基因治疗实验室, 上海 200438

**[摘要]** **目的** 建立应用杆状病毒系统制备 8 型腺相关病毒 (adeno-associated virus, AAV) 的技术体系, 并初步检测所制备病毒的感染活力。**方法** 采用杆状病毒生产系统包装 rAAV8-EGFP, 经高效液相色谱法提取并纯化病毒, 实时荧光定量 PCR 测定病毒滴度, 通过观察绿色荧光蛋白的表达强度来检测 rAAV8-EGFP 对 HEK-293 细胞的感染活力。**结果** 实时荧光定量 PCR 显示成功制备高滴度 rAAV8-EGFP, 滴度可达  $1.5 \times 10^{12}$  vg/ml, 100 ml 摇瓶共得到  $1.5 \times 10^{13}$  vg rAAV8-EGFP 病毒颗粒; 感染后的 HEK-293 细胞具有较强的绿色荧光蛋白表达。**结论** 应用杆状病毒系统成功制备高滴度、高活力的重组腺相关病毒, 为后续研究奠定了基础。

**[关键词]** 杆状病毒系统; 腺相关病毒; 昆虫细胞**[中图分类号]** Q 782 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2011)02-0134-05

### Preparation of adeno-associated virus serotype 8 using baculovirus system

FAN Li<sup>1</sup>, XU Zeng-hui<sup>2</sup>, JIN Hua-jun<sup>2</sup>, XU Feng-qing<sup>1</sup>, DING Na<sup>1</sup>, YAN Lin<sup>2</sup>, QIAN Qi-jun<sup>1,2\*</sup>

1. Xinyuan Institute of Medicine and Biotechnology, School of Life Sciences, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, Zhejiang, China

2. Laboratory of Virus and Gene Therapy, Eastern Hepatobiliary Surgical Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200438, China

**[Abstract]** **Objective** To set up a baculovirus system for preparing recombinant adeno-associated virus serotype 8 (rAAV8) and to preliminarily examine the infection viability of the prepared virus *in vitro*. **Methods** The rAAV8-EGFP was prepared using baculovirus system and was subsequently extracted and purified by high performance liquid chromatography. The viral titer was determined by real-time quantitative PCR and its infection viability for HEK-293 cells was examined by observing the EGFP reporter. **Results** Real-time quantitative PCR showed that high titer of rAAV8-EGFP was prepared ( $1.5 \times 10^{13}$  vg/bottle [100 ml medium]) and strong expression of EGFP was observed in HEK-293 cells infected with rAAV8-EGFP. **Conclusion** The baculovirus system is capable of producing rAAV8 with high titer and infection viability, paving a way for future research.

**[Key words]** baculovirus system; adeno-associated virus; insect cell

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2011, 32(2): 134-138]

重组腺相关病毒 (rAAV) 作为载体已在基因治疗的临床试验中获得初步成效<sup>[1-2]</sup>。但局限于 AAV 的复制特性, 高效、低成本的 rAAV 制备与扩增一直制约着 AAV 的基础与临床应用<sup>[3]</sup>。杆状病毒-昆虫细胞表达系统是一种常用的真核细胞表达系统<sup>[4]</sup>。作为一种昆虫病毒, 杆状病毒同样可以像腺病毒或单纯疱疹病毒一样为 AAV 的复制提供辅助, 但不具有腺病毒和单纯疱疹病毒对人体的毒性, 且病毒颗粒大, 与 AAV 病毒颗粒差异显著, 便于 rAAV 的分离纯化。

此外, 其宿主昆虫细胞可以采取悬浮方式进行培养, 生产工艺较为成熟, 便于规模化生产。因此, 杆状病毒-昆虫细胞系统成为 rAAV 规模化生产相关研究的热点<sup>[5]</sup>。

8 型腺相关病毒 (AAV8) 是由 Gao 等<sup>[6]</sup>于 2002 年从罗猴的心脏中分离获得的, 在所有已知 AAV 血清型中感染肝脏能力最为强大。单次大剂量静脉注射 AAV8 能使病毒感染小鼠全身的肌肉、心脏及肝脏, 其对肝脏细胞的转染效率较高<sup>[7-8]</sup>, 且能实现外

**[收稿日期]** 2010-11-30 **[接受日期]** 2010-12-27**[基金项目]** 国家“十一五”新药创制重大专项 (2009ZX09103-687), 国家自然科学基金 (30772477)。Supported by the National “Eleventh Five-year Plan” Key Project for Development of New Drugs (2009ZX09103-687) and National Natural Science Foundation of China (30772477)。**[作者简介]** 范 丽, 硕士生。E-mail: fanli0109@sina.com

\* 通信作者 (Corresponding author)。Tel: 021-81875371, E-mail: qianqj@163.com

源基因的快速及稳定表达<sup>[9]</sup>,是一种非常有效的基因治疗载体。因此,本研究尝试建立 AAV8 的杆状病毒生产系统,并通过报告基因 EGFP 检测该系统生产制备的 rAAV8 的感染活力,为后续 AAV 载体产业化及临床应用奠定基础。

## 1 材料和方法

1.1 主要材料及试剂 质粒 pFBD-AAV2RepiCapi、p5E18-VD286 和杆状病毒 Bac-AAV2-EGFP 由本实验室保存; pFastBacDual 载体、DH10Bac<sup>TM</sup>大肠杆菌感受态、S. N. A. P. <sup>TM</sup> MidiPrep Kit 质粒提取试剂盒、Cellfectin<sup>®</sup>转染试剂、Sf-900 II SFM 无血清培养基、Sf9 昆虫细胞购自 Invitrogen 公司; HEK-293 细胞购自 ATCC 公司; Solution I 连接酶购自 TaKaRa 公司; KOD-Plus 聚合酶及 SYBR Green 荧光定量 PCR 试剂盒购自 Toyobo 公司; Nucleospin 胶回收试剂盒购自 Macherey-Nagel 公司; 蛋白酶 K 购自 Qiagen 公司; 各种限制性核酸内切酶及 DNA marker 购自 NEB 公司; FBS、DMEM 培养基及胰酶购自 Gibco 公司。

1.2 杆状病毒包装载体的构建 合成以下引物(划线部分为限制性核酸内切酶识别位点): 引物 1, 5'-GGA CTA GTG CCG CCA TGG CTG CCG ATG GTT ATC TTC CAG GTA AGT ACT CCC TAT C-3'; 引物 2, 5'-CCT CAG AGA GGT TGT CCT CGA GCC AAT CTG AAA CAA TAG GAA GGG AGT GGA TGT C-3'; 引物 3, 5'-CCC TTC CTA TTG TTT CAG ATT GGC TCG AGG ACA ACC-3'; 引物 4, 5'-GCT CTA GAT TAC AGA TTA CGG GTG AGG TAA CGG GTG-3'。应用 *Nhe* I 和 *Xho* I 对质粒 pFBD-AAV2RepiCapi 进行双酶切获得 Repi 基因片段,用 Solution I 连接到经相同内切酶处理后的 pFastBacDual 载体,得到 pFastBacDual-AAV2Repi; 以 pFBD-AAV2RepiCapi 为模板,用引物 1 和 2 扩增 AAV Cap 基因的上游及内含子序列,命名为 AAV8Cap-up-intron; 以 p5E18-VD286 为模板,引物 3 和 4 扩增 AAV8Cap 基因的下游序列,命名为 AAV8Cap-down; 以 AAV8Cap-up-intron 和 AAV8Cap-down 为模板,引物 1 和 4 扩增出 AAV8 Cap 基因,命名为 AAV2 Cap8i; AAV2Cap8i 经 *Xba* I 和 *Spe* I 双酶切,经 Solution I 连入经相同酶切的 pFastBacDual-AAV2Repi 载体,应用 *Nco* I & *Pvu* II、*Bgl* I、*Pvu* II & *Kpn* I、*Hind* III & *Xho* I 4 个酶切组合进行酶切验证筛选,阳性克隆送至 Invitrogen 公司测序正确后命名为 pFastBacDual-AAV2RepiCap8i。

将构建好的重组载体 pFastBacDual-AAV2RepiCap8i 转化 DH10Bac<sup>TM</sup>感受态,涂布于含 Gen(7  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )、X-gal(100  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )、Kan(50  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )、IPTG(40  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )、Tet(10  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )的平板上,48 h 后挑取白色菌落重新划线,待重新长出白色菌落后接种于含 Tet、Gen、Kan 这 3 种抗生素的 LB 培养基中,用 Invitrogen 公司提供的 S. N. A. P. <sup>TM</sup> MidiPrep Kit 质粒纯化试剂盒提取重组杆状病毒质粒,用扩增 AAV2 Cap8i 基因的引物(引物 1 和引物 4)进行 PCR 鉴定正确后,得到重组杆状病毒质粒: Bacmid-AAV2RepiCap8i。

### 1.3 重组杆状病毒的包装、扩增及滴度测定

1.3.1 杆状病毒包装 杆状病毒的包装方法参照 Invitrogen 公司 Cellfectin<sup>®</sup>转染试剂盒说明进行。即: Sf9 细胞按  $9 \times 10^5$  cells/well 加入到 6 孔板中,于 27 $^{\circ}\text{C}$  培养箱中培养,贴壁后加入 2  $\mu\text{g}$  的重组 Bacmid-AAV2RepiCap8i 和 6  $\mu\text{l}$  的 Cellfectin<sup>®</sup>转染试剂的混合物,然后于 27 $^{\circ}\text{C}$  培养箱中孵育 5 h 后吸去培养基,加入 2 ml 的 SF-900 II SFM 无血清培养基,72 h 左右观察细胞状态,当细胞有感染迹象时,收集 6 孔板中含重组杆状病毒的培养液,500 $\times g$  离心 5 min,收集上清,即得到 P1 代重组杆状病毒 Bac-AAV2RepiCap8i。

1.3.2 杆状病毒扩增 P1 代重组杆状病毒的扩增,Sf9 细胞按  $2 \times 10^6$  cells/well 加入 6 孔板中,贴壁生长 1 h 后,按公式: 感染所需病毒贮液量(ml) = [MOI(pfu/cell)  $\times$  细胞数  $\div$  病毒贮液效价(pfu/ml)] 计算需加入病毒 P1 贮液的量(P1 贮液效价按照  $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$  计)。本试验按照 MOI=1、P1 代贮液效价为  $1 \times 10^7$  计算得出,每个 6 孔板中加入 200  $\mu\text{l}$  P1 代病毒贮液,27 $^{\circ}\text{C}$  孵育 48 h,根据细胞病变情况(约 48 h 后)收集病毒上清液,500 $\times g$  离心 5 min,取上清,即为 P2 代病毒贮液,分装冻存于 -80 $^{\circ}\text{C}$ 。同样按上述方法扩增病毒 P3 代贮液。

1.3.3 杆状病毒滴度测定 利用实时荧光定量 PCR 方法测定扩增的杆状病毒滴度,针对 AAV2Cap8i 基因序列设计特异性引物(正向 5'-CAA CAG GAG GCA CGG CAA ATA CGC AGA CT-3',反向: 5'-GTT GCT ATT GTT GTT TTG CCC G-3'),用含 AAV2Cap8i 基因的中抽质粒 pFastBacDual-AAV2RepiCap8i 作为杆状病毒 Bac-AAV2RepiCap8i 的标准品; 针对 EGFP 序列设计特异性引物(正向: 5'-GCA GAA GAA CGG CAT CAA GG-3',反向: 5'-CGG ACT GGG TGC TCA GGT AG-3'),用中抽质粒 pAAV2-neo-EGFP 作为杆状病毒 Bac-AAV2-EGFP 的标准品,标准品分别

经 10 倍梯度稀释后与样品一起进行荧光定量 PCR 测定,根据标准品获得的标准曲线计算出相应杆状病毒的滴度(vg/ml)。

1.4 rAAV8-EGFP 的包装与纯化 将 Sf9 细胞以  $2 \times 10^5$  cells/ml 加入到 100 ml 的锥形瓶中扩增,待细胞长到  $2 \times 10^6$  cells/ml 时,按  $MOI=0.1^{[10]}$  的量加入杆状病毒 Bac-AAV2RepiCap8i 和 Bac-AAV2-EGFP,于 27℃,100 r/min 摇床中培养,3 d 后,将 Sf9 细胞及培养液  $2500 \times g$  离心 5 min,去除上清,细胞沉淀用 10 ml 无血清 DMEM 重悬,于 -80℃ 冰箱及 37℃ 水浴反复冻融 3 次, $10000 \times g$  离心 10 min,收集上清即得到 rAAV8-EGFP 病毒,60℃ 加热 30 min 以灭活杆状病毒,利用高效液相色谱法纯化病毒,并于 -80℃ 保存。

同样利用实时荧光定量 PCR 法测定 rAAV8-EGFP 病毒滴度,针对杆状病毒庆大霉素抗性基因设计特异性引物(正向:5'-GCA AGT TCC CGA GGT AAT CG-3';反向:5'-GGC AGT CGC CCT AAA ACA AA-3'),pFastBacDual-AAV2RepiCap8i 作为标准品,测定 rAAV8-EGFP 中含有的杆状病毒 Bac-AAV2RepiCap8i 和 Bac-AAV2-EGFP 的滴度之和,记为 A;同样以 pFastBacDual-AAV2RepiCap8i 作为标准品,利用 AAV2Cap8i 基因序列特异性引物测定杆状病毒 Bac-AAV2RepiCap8i 的滴度,记为 B;以中抽质粒

pAAV2-neo-EGFP 作为标准品,利用 EGFP 序列特异性引物,测定 rAAV8-EGFP 和 Bac-AAV2-EGFP 的滴度之和,记为 C,最终根据公式:  $B+C-A$  计算出 rAAV8-EGFP 滴度。

1.5 rAAV8-EGFP 病毒感染效率检测 HEK-293 细胞用 DMEM+10%FBS 培养,37℃、5%CO<sub>2</sub> 培养箱中培养,当细胞生长至 80% 汇合度时,用 0.25% 胰酶消化后计数,按照  $8 \times 10^4$  cell/孔铺于 24 孔板中,贴壁后按照  $MOI=10^5$  加入 rAAV8-EGFP 病毒,每隔 24 h 置于荧光显微镜下观察绿色荧光蛋白的表达情况。

2 结果

2.1 AAV2Cap8i 基因片段的 PCR 扩增 以 pF-BD-AAV2RepiCapi 为模板,用引物 1 和 2 扩增 AAV Cap 的上游和内含子,命名为 AAV8Cap-up-intron,结果显示扩增出大小为 285 bp 的 AAV8Cap-up-intron 目的片段(图 1);以 p5E18-VD286 为模板,引物 3 和 4 扩增 AAV8Cap 的下游序列,命名为 AAV8Cap-down,结果显示扩增出大小为 2218 bp 的 AAV8Cap-down 目的片段(图 1);以 AAV8Cap-up-intron 和 AAV8Cap-down 为模板,引物 1 和 4 扩增出 AAV8Cap 基因,命名为 AAV2Cap8i,结果同样显示扩增出了大小为 2469 bp 的 AAV2Cap8i 目的条带(图 1)。

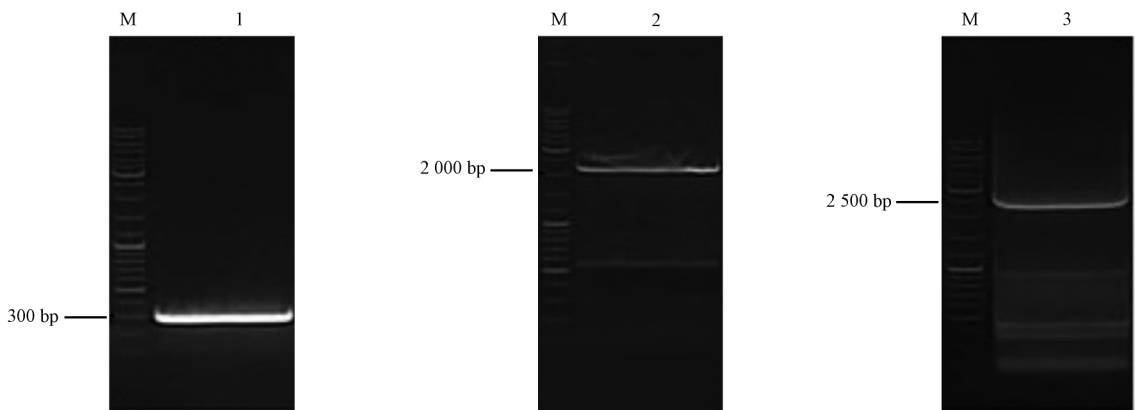


图 1 AAV2Cap8i 基因片段 PCR 扩增图

Fig 1 Identification of AAV2Cap8i

M: DNA ladder mix; 1: AAV8Cap-up-intron (285 bp); 2: AAV8Cap-down (2218 bp); 3: AAV2Cap8i (2469 bp)

2.2 重组 pFastBacDual-AAV2RepiCap8i 载体的酶切鉴定 酶切结果显示酶切图谱与预期相符(图 2),证明该质粒构建正确,可用于下一步细菌内转染重组构建重组 Bacmid-AAV2RepiCap8i。

2.3 重组 Bacmid-AAV2RepiCap8i 的 PCR 鉴定 Bacmid-AAV2RepiCap8i 用引物 1 和 4 进行 PCR 鉴定,扩增出 2469 bp 的 AAV2Cap8i 基因片段(图 3)。

2.4 重组杆状病毒 Bac-AAV2-EGFP/Bac-AAV2RepiCap8i 的滴度测定 以含 EGFP 基因的质粒 pAAV2-neo-EGFP 制备 10 倍梯度稀释的标准品进行荧光定量 PCR 测定 Bac-AAV2-EGFP 的病毒滴度。图 4 为实时荧光定量 PCR 的标准曲线图,其相关系数  $R^2$  达到 0.998,扩增效率为 97.71%,梯度稀释的标准品 Ct 值 11.32~24.02,Bac-AAV2-EGFP 的两个重

复 Ct 值分别为 16.89、16.92。经计算,得到重组杆状病毒 Bac-AAV2-EGFP 的滴度为  $6 \times 10^9$  vg/ml。

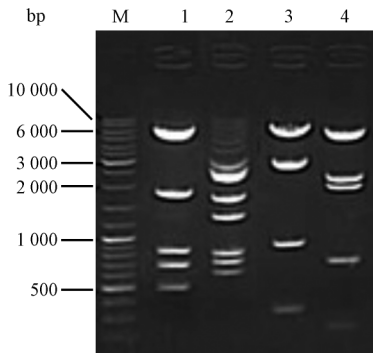


图 2 重组载体 pFastBacDual-AAV2RepiCap8i 酶切电泳图

Fig 2 Identification of pFastBacDual-AAV2RepiCap8i

M: DNA ladder mix; 1: Digested by *Nco* I and *Pvu* II (6 017, 1 794, 810, 665, and 476 bp); 2: Digested by *Bgl* I (2 508, 2 312, 1 654, 1 268, 760, 682, and 578 bp); 3: Digested by *Pvu* II and *Kpn* I (6 000, 2 647, 810, 288, and 17 bp); 4: Digested by *Hind* III and *Xho* I (5 142, 2 022, 1 796, 616, and 186 bp)

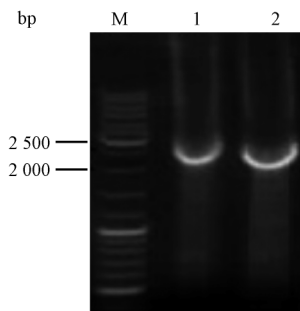


图 3 重组 Bacmid-AAV2RepiCap8i 的 PCR 鉴定电泳结果

Fig 3 Identification of Bacmid-AAV2RepiCap8i

M: DNA ladder mix; 1: pFastBacDual-AAV2RepiCap8i (positive control, 2 469 bp); 2: Bacmid-AAV2RepiCap8i (2 469 bp)

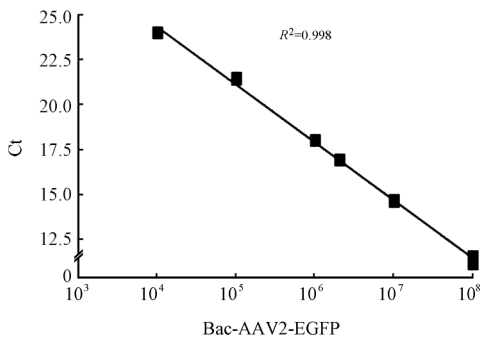


图 4 杆状病毒 Bac-AAV2-EGFP 滴度测定标准曲线

Fig 4 Standard curve of Bac-AAV2-EGFP titer

以含 AAV2Cap8i 基因的质粒 pFastBacDual-AAV2RepiCap8i 制备 10 倍梯度稀释的标准品进行荧光定量 PCR 测定 Bac-AAV2RepiCap8i 的病毒滴度。实时荧光定量 PCR 的标准曲线图相关系数  $R^2$

达到 0.993, 梯度稀释的标准品 Ct 值为 10.45~22.56, Bac-AAV2RepiCap8i 两个重复的 Ct 值分别为 14.64、14.69, Bac-AAV2RepiCap8i 实际滴度为  $4.3 \times 10^9$  vg/ml。

2.5 rAAV8-EGFP 滴度测定结果 采用实时荧光定量 PCR 法测定病毒滴度, 结果得出制备的 rAAV8-EGFP 病毒滴度可达  $1.5 \times 10^{12}$  vg/ml, 100 ml 摇瓶共得到  $1.5 \times 10^{13}$  vg 病毒颗粒。

2.6 rAAV8-EGFP 病毒活力检测 将 HEK-293 细胞按  $8 \times 10^4$  cells/孔铺于 24 孔板中, 待细胞完全贴壁后, 将包装成功并测定滴度的 rAAV8-EGFP 病毒按照  $MOI=10^5$  加入至细胞中, 每隔 24 h 置于荧光显微镜下观察病毒感染情况。结果显示, 随时间延长, 绿色荧光的表达逐步增多并增强(图 5), 可见杆状病毒包装得到的 rAAV8-EGFP 病毒活性较好, 能有效转导外源基因。

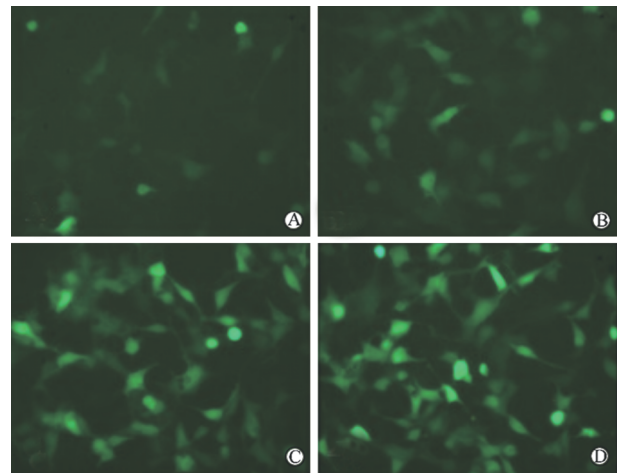


图 5 rAAV8-EGFP 病毒活力检测

Fig 5 Detection of virus activity of rAAV8-EGFP

A: 24 h; B: 48 h; C: 72 h; D: 96 h. Original magnification:  $\times 200$

### 3 讨论

腺相关病毒(AAV)仅由 3 个核外壳蛋白和 1 条 DNA 单链构成, 属于细小病毒(parvovirus)家族中的依赖病毒属(dependovirus), 其复制性感染需要腺病毒或单纯疱疹病毒的辅助<sup>[11]</sup>。迄今为止, 已有 100 多种不同血清型的 AAV 从人类或灵长类动物的体内被分离与鉴定。不同 AAV 血清型具有不同的组织及细胞亲嗜性, 如 AAV8 相对于 AAV2 感染肝脏细胞的效率更高<sup>[7]</sup>。

腺相关病毒载体具有安全性好、体内感染细胞范围广、长期稳定表达外源基因等优势, 现已广泛应用于基因治疗研究<sup>[12]</sup>。然而, 临床实验级别所需 rAAV 的数量级是  $10^{14} \sim 10^{15}$ , 应用目前最常采用的

质粒转染贴壁生长的方法来制备 rAAV,很难达到临床对产量的需求。为了找到一种高效扩增 rAAV 的方法,研究人员开展了多种探索研究,如通过构建稳定细胞系<sup>[13]</sup>、PEI 转染悬浮哺乳动物细胞<sup>[14-15]</sup>、利用单纯疱疹病毒作为携带 AAV 包装元件<sup>[16]</sup>等方法进行 rAAV 包装。但这些方法分别具有构建细胞系难度大、操作复杂、成本高、病毒后期纯化困难等缺陷,限制了其在临床上的应用。杆状病毒是一种昆虫病毒,可以为 AAV 的复制提供辅助,对人体无毒性,且病毒颗粒大,易于分离纯化,同时其宿主昆虫细胞可采用悬浮方式培养,培养工艺较为成熟,因而非常有益于 AAV 的规模化生产。

近年来,利用昆虫细胞-杆状病毒系统生产 rAAV 逐渐受到关注<sup>[17-19]</sup>。同时,我们实验室已经利用 3 杆状病毒系统成功包装 rAAV2-EGFP<sup>[20]</sup>,然而,rAAV8 相对于 rAAV2 肝脏细胞感染效率更高,并能够实现外源基因的快速及稳定表达。因此,其是一种非常有效的基因治疗载体。在本研究中,我们摒弃了常规的 3 杆状病毒包装 rAAV 的方法,利用双杆状病毒来包装生产 rAAV8,避免了多个杆状病毒包装的麻烦,增强了 rAAV8 包装制备过程的可控性。通过 2 个携带 rAAV8 包装所需的顺式和反式组分的杆状病毒共感染 Sf9 细胞,本研究成功包装出 rAAV8-EGFP 病毒,获得的 rAAV8-EGFP 经荧光实时定量 PCR 法测得病毒滴度较高( $1.5 \times 10^{12}$  vg/ml),100 ml 摇瓶共得到  $1.5 \times 10^{13}$  vg 病毒颗粒,且能有效感染人 HEK-293 细胞,表明应用双杆状病毒包装系统能获得高滴度、高感染活力的重组腺相关病毒颗粒。按此效率,如果将培养体系放大到 10 L 包装规模,可以产生  $10^{15}$  数量级 rAAV,可满足临床试验的需要。目前其后续放大培养扩增、纯化等工艺正在进一步摸索与优化中。

## [参考文献]

- [1] Kaplitt M G, Feigin A, Tang C, Fitzsimons H L, Mattis P, Lawlor P A, et al. Safety and tolerability of gene therapy with an adeno-associated virus (AAV) borne GAD gene for Parkinson's disease: an open label, phase I trial[J]. *Lancet*, 2007, 369:2097-2105.
- [2] Maguire A M, Simonelli F, Pierce E A, Pugh E N Jr, Mingozzi F, Bennicelli J, et al. Safety and efficacy of gene transfer for Leber's congenital amaurosis[J]. *N Engl J Med*, 2008, 358: 2240-2248.
- [3] Virag T, Cecchini S, Kotin R M. Producing recombinant adeno-associated virus in foster cells: overcoming production limitations using a baculovirus-insect cell expression strategy[J]. *Hum Gene Ther*, 2009, 20:807-817.
- [4] Tang W J, Gilman A G. Type-specific regulation of adenyllyl cy-  
clase by G protein beta gamma subunits[J]. *Science*, 1991, 254:1500-1503.
- [5] Urabe M, Ding C, Kotin R M. Insect cells as a factory to produce adeno-associated virus type 2 vectors[J]. *Hum Gene Ther*, 2002, 13:1935-1943.
- [6] Wang Z, Zhu T, Qiao C, Zhou L, Wang B, Zhang J, et al. Adeno-associated virus serotype 8 efficiently delivers genes to muscle and heart[J]. *Nat Biotechnol*, 2005, 23:321-328.
- [7] Gao G P, Alvira M R, Wang L, Calcedo R, Johnston J, Wilson J M. Novel adeno-associated viruses from rhesus monkeys as vectors for human gene therapy[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99:11854-11859.
- [8] Mingozzi F, Schüttrumpf J, Arruda V R, Liu Y, Liu Y L, High K A, et al. Improved hepatic gene transfer by using an adeno-associated virus serotype 5 vector[J]. *J Virol*, 2002, 76:10497-10502.
- [9] Thomas C E, Storm T A, Huang Z, Kay M A. Rapid uncoating of vector genomes is the key to efficient liver transduction with pseudotyped adeno-associated virus vectors[J]. *J Virol*, 2004, 78:3110-3122.
- [10] Negrete A, Yang L C, Mendez A F, Levy J R, Kotin R M. Economized large-scale production of high yield of rAAV for gene therapy applications exploiting baculovirus expression system [J]. *J Gene Med*, 2007, 9:938-948.
- [11] Atchison R W, Casto B C, Hammon W M. Adenovirus-associated defective virus particles[J]. *Science*, 1965, 149:754-756.
- [12] Li C, Bowles D E, van Dyke T, Samulski R J. Adeno-associated virus vectors: potential applications for cancer gene therapy [J]. *Cancer Gene Ther*, 2005, 12:913-925.
- [13] Farson D, Harding T C, Tao L, Liu J, Powell S, Vimal V, et al. Development and characterization of a cell line for large-scale, serum-free production of recombinant adeno-associated viral vectors[J]. *J Gene Med*, 2004, 6:1369-1381.
- [14] Durocher Y, Pham P L, St-Laurent G, Jacob D, Cass B, Chahal P, et al. Scalable serum-free production of recombinant adeno-associated virus type 2 by transfection of 293 suspension cells [J]. *J Virol Methods*, 2007, 144(1-2):32-40.
- [15] Lock M, Alvira M, Vandenberghe L H, Samanta A, Toelen J, Debyser Z, et al. Rapid, simple, and versatile manufacturing of recombinant adeno-associated viral vectors at scale[J]. *Hum Gene Ther*, 2010, 21:1259-1271.
- [16] Booth M J, Mistry A, Li X, Thrasher A, Coffin R S. Transfection-free and scalable recombinant AAV vector production using HSV/AAV hybrids[J]. *Gene Ther*, 2004, 11:829-837.
- [17] Wang C. Hybrid baculovirus-adeno-associated virus vectors for prolonged transgene expression in human neural cells[J]. *J Neurovirol*, 2008, 14:563-568.
- [18] Smith R H, Levy J R, Kotin R M. A simplified baculovirus-AAV expression vector system coupled with one-step affinity purification yields high-titer rAAV stocks from insect cells[J]. *Mol Ther*, 2009, 17:1888-1896.
- [19] Liu Y K, Yang C J, Liu C L, Shen C R, Shiao L D. Using a fed-batch culture strategy to enhance rAAV production in the baculovirus/insect cell system[J]. *J Biosci Bioeng*, 2010, 110:187-193.
- [20] 雷求刚,徐增辉,钱其军.腺相关病毒载体的杆状病毒生产系统的构建[J]. *浙江理工大学学报*, 2010, 27:774-778.