

EIAV 基因转移载体转录后调控元件的优化

李亚明^{1,2}, 韩凌霞², 曲连东², 司昌德², 秦海斌^{1,2}, 杨增岐¹, 于海波², 徐佳²

(1 西北农林科技大学 动物医学院, 陕西 杨凌 712100;
2 中国农业科学院 哈尔滨兽医研究所实验动物中心 农业部实验动物质量监督检验测试中心, 黑龙江 哈尔滨 150001)

【摘要】【目的】为了提高马传染性贫血病毒(EIAV)基因转移载体质粒 pcPPTPRE(+)的外源蛋白表达能力,对其转录后调控元件进行优化。**【方法】**将 PCR 扩增土拨鼠肝炎病毒(Woodchuck Hepatitis Virus, WHV)转录后调控元件(WPRE),克隆于 pGM-T 载体获得重组质粒 pGM-WPRE,利用 *Not* I 酶将 WPRE 亚克隆入 pcPPTPRE(+) ,筛选 WPRE 正向连接的重组质粒 pcPPTWPRE,采用磷酸钙法分别将 pcPPTWPRE 和 pcPPTPRE(+) 转染 HEK293 细胞和 DF-1 细胞,利用荧光显微镜观察 EGFP 蛋白的表达,利用流式细胞仪检测转染细胞中 EGFP 阳性细胞的表达率。**【结果】**在 HEK293 细胞中,pcPPTWPRE 表达外源基因的能力极显著优于 pcPPTPRE(+);在 DF-1 细胞中,pcPPTWPRE 与 pcPPTPRE(+)表达外源基因的能力均不强,但前者略优于后者。**【结论】**土拨鼠肝炎病毒转录后,调控元件(WPRE)可以明显增强 EIAV 载体质粒的外源蛋白表达能力,为高表达能力伪型 EIAV 重组病毒的获得奠定了基础,同时也为其他病毒载体的构建提供了借鉴。

【关键词】 马传染性贫血病毒; 土拨鼠肝炎病毒; 转录后调控元件; 基因转移载体; 增强绿色荧光蛋白
【中图分类号】 Q939.47 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-9387(2008)02-0001-06

Optimization of the posttranscriptional regulatory element of gene transfer vector derived from Equine Infectious Anemia Virus

LI Ya-ming^{1,2}, HAN Ling-xia², QU Lian-dong², SI Chang-de², QIN Hai-bin^{1,2},
YANG Zeng-qi¹, YU Hai-bo², XU Jia²

(1 College of College of Veterinarg Medicine, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China;
2 Laboratory Animal Center of Harbin Veterinary Research Institute, CAAS, The Supervision, Inspection & Testing Center of Laboratory animals Quality, Ministry of Agriculture, Haerbin, Heilongjiang 150001, China)

Abstract: 【Objective】 In order to improve the EGFP expression level of EIAV gene transfer vector pcPPTPRE(+), its posttranscriptional regulatory element was optimized. **【Method】** The woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element (WPRE) was amplified by polymerase chain reaction (PCR) from the plasmid containing WPRE. The PCR product was subcloned into pGM-T to construct recombinant plasmid pGM-WPRE and sequenced. Then the WPRE was subcloned from pGM-WPRE into pcPPTPRE(+) using *Not* I to construct recombinant plasmid pcPPTWPRE. Finally the EIAV gene transfer vectors pcPPTPRE(+) and pcPPTWPRE were transfected into HEK293 cells and DF-1 cells using Calcium and Phosphate Transfection Kit respectively. The cells were investigated under fluorescence microscope at 12, 24, 36 and 48 h after transfection. Flow-cytometric analysis was carried out after 48 h. **【Result】** Results showed that the pcPPTWPRE could express the EGFP much more efficiently than pcPPTPRE(+) in HEK293 cells, but the pcPPTWPRE could express the EGFP a little efficiently than pcPPTPRE(+) in

* [收稿日期] 2007-02-02
[基金项目] 国家科技基础条件平台工作重点项目(2004DKA30670)
[作者简介] 李亚明(1982—),男,河南济源人,在读硕士,主要从事细胞工程及动物病毒学研究。E-mail:jylym1982@yahoo.com.cn
[通讯作者] 杨增岐(1963—),男,陕西岐山人,教授,博士生导师,主要从事预防兽医学研究。E-mail:yzq8162@163.com

DF-1 cells.【Conclusion】The WPRE could enhance the EGFP expression level of EIAV vector. It was successful to improve the PRE of pcPPTPRE(+) and to obtain a more efficient EIAV vector pcPPTWPRES.

Key words: equine infectious anemia virus (EIAV); woodchuck hepatitis virus; posttranscriptional regulatory element; gene transfer vector; EGFP

基因转移载体是供插入外源基因并将其导入宿主细胞内复制和表达的运载工具,为基因治疗和转基因动物的制备提供了有效手段。慢病毒载体是一类逆转录载体,与通常使用的逆转录病毒载体和腺病毒载体相比,具有感染非分裂期细胞及容纳大外源基因片段等优点^[1],是基因转移的理想载体。目前,以 HIV-1 为基础的基因转移载体,是研究最为透彻的慢病毒载体^[2],人们已经在 HIV-1 载体的生物安全性方面进行了很多改进,但应用于人类临床试验还存在着安全隐患^[3]。因此,开发非灵长类慢病毒载体,已成为当前研究的热点。

马传染性贫血病毒(Equine Infectious Anemia-virus, EIAV)是一种非灵长类慢病毒,并且是基因组结构最简单的慢病毒。国外已经大量报道了 EIAV 基因转移载体在人类基因治疗^[4]和转基因动物^[5]制备方面的应用,而国内 EIAV 载体的开发则刚刚起步。孙成群^[3]利用反向遗传学操作技术,以中国 EIAV 驴白细胞弱毒疫苗株(EIAV-DLA)的感染性分子克隆 pOK8266 为基础,构建了复制缺陷型 EIAV 载体质粒 pcPPTPRE(+),并且用乙肝病毒转录后调控元件(HPRE)对其进行了修饰。

转基因在靶细胞中的表达效率,限制了病毒载体应用潜力,虽然 pcPPTPRE(+)转染 293T 细胞后报告基因 *EGFP* 得到了表达,但表达量不高^[3],难以进一步应用。作为慢病毒载体构建的一个重要方面,载体成分的优化目前主要集中于中央聚嘌呤序列(cPPT)、中央终止序列(CTS)、启动子及转录后调控元件(PRE)方面。研究表明,PRE 可以提高慢病毒载体的转导效率和转基因的表达^[1,6]。目前研究的 PRE 主要有乙肝病毒转录后调控元件(HPRE)^[7]和土拨鼠肝炎病毒转录后调控元件(WPRE)^[8],但由于 WPRE 比 HPRE 多一个 cis-作用序列,其转录活性明显高于 HPRE^[9]。

本试验用 WPRE 替换 HPRE,对 EIAV 载体质粒 pcPPTPRE(+)的转录后调控元件进行优化,为进一步提高 EIAV 载体质粒的外源蛋白表达能力,将 EIAV 基因转移载体应用于转基因鸡的制备中,初步探讨了 EIAV 载体质粒在鸡体外培养细胞 DF-1 中表达报告基因 *EGFP* 的能力,旨在为 EIAV 基

因转移载体系统的构建及应用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种、质粒和细胞 感受态大肠杆菌 DH5 α 由哈尔滨兽医研究所实验动物中心实验室保存; pGM-T 载体购自北京天为公司;含有 WPRE 的质粒 DNA 由华中科技大学附属同济医院临床免疫研究室杨东亮教授惠赠,其 WPRE 序列出自 WHV8 株(GenBank 登录号为 J04514);EIAV 基因转移载体 pcPPTPRE(+)由兽医生物技术国家重点实验室提供;HEK293 细胞购自中国协和医科大学基础医学院;DF-1 细胞由哈尔滨兽医研究所王笑梅研究员惠赠。

1.1.2 工具酶和生化试剂 *LA Taq* 酶、限制性内切酶 *Not* I 和 *Sac* II、氨苄青霉素、dNTP(各 2.5 mmol/L)、DL2000 和 DL15000 均购自 TaKaRa 公司;DNA Marker VI 购于北京天为公司;T4 DNA Ligase 购自 Fermentas 公司;胶回收试剂盒购自上海华舜公司;磷酸钙转染试剂盒购于 Invitrogen 公司;DMEM 培养基购自 GIBCO 公司;优级胎牛血清(FBS)购自 TBD 公司;质粒小量提取试剂盒购于美国 OMEGA 生物公司。

1.1.3 引物 根据 WHV8 株全基因组序列(GenBank 登录号 J04514)设计 1 对引物,上游引物为 WPRE-F: 5'-CTG GCG GCC GCA ATC AAC CTC TGG ATT ACA-3';下游引物为 WPRE-R: 5'-CGC GCG GCC GCA CAG GTG AAG ACC AAG CAA-3',上、下游引物均引入 *Not* I 酶切位点(下划线所示),引物由 Invitrogen 公司合成,其使用浓度均为 10 pmol/ μ L。

1.2 方法

1.2.1 WPRE 的 PCR 扩增 在 PCR 反应管中依次加入 10 $\times$ LA PCR 缓冲液 5 μ L,上、下游引物 WPRE-F 和 WPRE-R 各 2 μ L, dNTP 3 μ L, *LA Taq* 酶 0.5 μ L,含有 WPRE 的质粒 DNA 模板 0.1 μ L,超纯水加至总体积 50 μ L,短时高速混匀反应液。采用两温度 PCR 法扩增 WPRE 片段,反应条件为:94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min;94 $^{\circ}$ C 变性 1 min,70 $^{\circ}$ C 退火(同时延

伸) 1 min, 35 个循环; 72 °C 10 min, 4 °C 保存。PCR 产物经 8 g/L 琼脂糖凝胶电泳分析产物大小, 并纯化回收剩余的 PCR 产物。

1.2.2 重组质粒 pGM-WPRE 的构建 用 T4 DNA Ligase 将纯化回收的 PCR 产物与 pGM-T 载体相连接, 连接产物转化感受态大肠杆菌 DH5 α , 于 37 °C 条件下过夜培养, 蓝白斑法筛选重组子, 随机挑取白色单菌落, 接种于 3 mL 含氨苄抗生素(100 μ g/mL)的 LB 培养液中, 37 °C、270 r/min 振荡培养 12~16 h, 提取质粒 DNA。利用 *Not* I 酶进行酶切鉴定, 阳性质粒命名为 pGM-WPRE, 送 Invitrogen 公司和兽医生物技术国家重点实验室, 分别用 T7 和 SP6 通用测序引物测序, 并利用 DNAstar 生物学软件分析其与 WHV8 株的序列同源性。

1.2.3 转移载体 pcPPTWPRE 的构建 用 *Not* I 酶分别酶切 pGM-WPRE 和 pcPPTPRE(+), 胶回收 WPRE 片段和 pcPPTPRE(+)载体片段, 利用 T4 DNA Ligase 进行连接反应, 连接产物转化感受态大肠杆菌 DH5 α , 于 37 °C 条件下过夜培养, 随机挑取白色单菌落, 接种于 3 mL 含氨苄抗生素(100 μ g/ mL)的 LB 培养液中, 37 °C、270 r/min 振荡培养 12~16 h, 提取质粒 DNA。利用 *Not* I 酶进行酶切鉴定, 利用 *Sac* II 酶对 WPRE 在 pcPPTPRE(+)载体中的连接方向进行鉴定, 保留正向连接的是阳性质粒, 将其命名为 pcPPTWPRE。

1.2.4 pcPPTWPRE 和 pcPPTPRE(+) 分别转染 HEK293 细胞和 DF-1 细胞 用含体积分数 10% FBS 和青、链霉素(100 IU)的 DMEM 培养液分别培养 HEK293 和 DF-1 细胞, 接种于 24 孔细胞培养板, 每孔 1 $\times$ 10⁵ 个细胞, 于体积分数 5% CO₂、37 °C 培养箱中培养, 待细胞单层长满至培养板 60 % 时转染, 具体操作参照磷酸钙转染试剂盒说明书进行, 转染前 3 h 更换新鲜培养液。转染溶液的配制: 取 2

个无菌的 EP 管, 做好标记, 各加入 10 μ g 载体质粒 pcPPTPRE(+) 和 pcPPTWPRE, 再分别加入 18 μ L 2 mol/L CaCl₂, 加灭菌去离子水至总体积 150 μ L, 分别缓慢滴加到轻旋的 150 μ L 2 $\times$ HBS 缓冲盐溶液中, 室温静置 30 min 后, 缓慢均量加入细胞孔, 每孔 50 μ L, 每个载体转染同一细胞设 3 个平行重复。同时每种细胞设 3 个正常对照孔。将培养板置于体积分数 5% CO₂、37 °C 培养箱中培养 10 h 后, 用无菌 PBS(0.01 mol/L, pH 7.4)洗涤细胞 2 次, 更换新鲜培养液, 每孔 1 mL, 继续培养。

1.2.5 增强绿色荧光蛋白(EGFP)阳性细胞表达率的比较 分别于转染后 12, 24, 36 和 48 h, 利用倒置荧光显微镜观察 EGFP 的表达, 比较阳性细胞的数量和表达亮度。转染后 48 h 时用胰酶消化细胞, 制备单细胞悬液, 每个载体的 3 个平行重复孔细胞收集于一个流式细胞管中, 利用 BECKMAN Coulter cytomics FC500 型流式细胞仪, 计数 2 $\times$ 10⁴ 个细胞, 统计表达特异性绿色荧光的阳性细胞, 计算 EGFP 阳性细胞表达率。以未转染的 HEK293 或 DF-1 细胞为空白对照, 采用 SPSS12.0 软件对数据进行统计学分析。

2 结果与分析

2.1 WPRE 的 PCR 扩增结果

PCR 扩增产物经琼脂糖凝胶电泳, 出现 1 条约 600 bp 的特异性条带(图 1), 与预期结果相符。

2.2 重组质粒 pGM-WPRE 的检测

选择白色菌落提取质粒 DNA, 利用 *Not* I 酶进行酶切鉴定, 结果得到大小约为 3 000 bp pGM-T 载体片段及 600 bp WPRE 片段(图 2), 与预期结果相符。双向测序结果表明, 扩增 WPRE 片段长度为 658 bp, 与 WHV8 株(GenBank 登录号为 J04514)比较, 序列同源性为 99.4%。

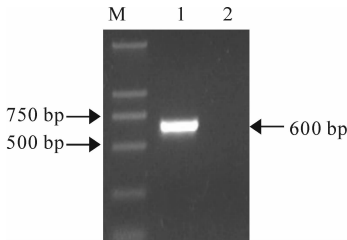


图 1 WPRE 的 PCR 扩增结果
M. DL2000 DNA 分子质量标准; 1. WPRE 扩增产物; 2. 水模板阴性对照

Fig. 1 PCR amplification results of WPRE from the plasmid containing WPRE

M. DL2000 DNA Marker; 1. PCR products of WPRE; 2. Negative control

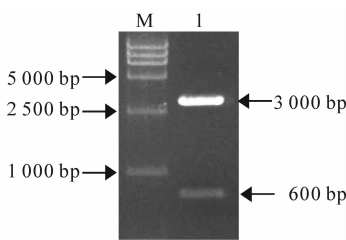


图 2 重组质粒 pGM-WPRE 的 *Not* I 酶切鉴定结果
M. DL2000 DNA 分子质量标准; 1. 重组质粒 pGM-WPRE 的 *Not* I 酶切产物

Fig. 2 *Not* I digestion of recombinant plasmid pGM-WPRE
M. DL2000 DNA Marker; 1. *Not* I digestion products of pGM-WPRE

2.3 转移载体 pcPPTWPRE 的检测

将转移载体 pcPPTPRE 用 *Not* I 酶切,得到长度分别为 658 和 6 501 bp 两条片段(图 3),与预期的 WPRE 片段和 pcPPTPRE(+)载体片段相符。

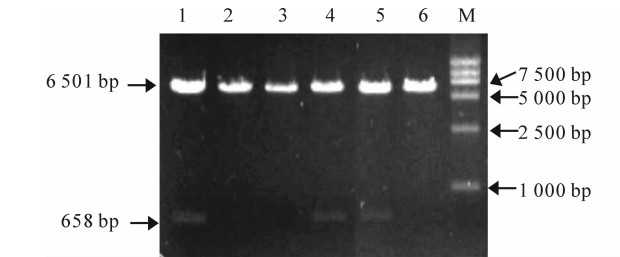


图 3 转移载体 pcPPTWPRE 的 *Not* I 酶切鉴定结果
M, DL15000 DNA 分子质量标准;1,4,5. 阳性质粒 pcPPTWPRE 的酶切产物;2,3,6. 载体自连质粒 pcPPT 的酶切产物
Fig. 3 *Not* I digestion of recombinant plasmid pcPPTWPRE

M, DL15000 DNA Marker;1,4,5. Positive recombinant pcPPTWPRE;2,3,6. Plasmids which were self-ligated

2.4 EGFP 蛋白的观察结果及 EGFP 阳性细胞表达率的比较

图 5 显示,转染后 12 h 即可观察到细胞胞浆内的特异性绿色荧光,而正常细胞在试验期间始终未出现荧光,表明构建的 pcPPTWPRE 转移载体分别可以在 HEK293 细胞和 DF-1 细胞中表达外源基因;转染后 12,24,36 和 48 h,随时间延续,表达绿色荧光的阳性细胞数逐渐增多,荧光强度也逐渐增强。在 HEK293 细胞中,pcPPTWPRE 的外源基因表达能力明显高于 pcPPTPRE(+);在 DF-1 细胞中,pcPPTWPRE 的外源基因表达能力仅略高于 pcPPTPRE(+),且两者表达量均不高。

转染后 48 h,收获细胞,利用流式细胞仪对表达 EGFP 的阳性细胞率进行统计分析,结果见表 1。

表 1 EIAV 基因转移载体转染 HEK293 和 DF-1 细胞的 EGFP 阳性细胞率

Table 1 Statistic results of EGFP ⁺ -HEK293 and DF-1 cells transfected with EIAV gene transter vectors %		
EIAV 载体 EIAV gene transtetr vector	HEK293 细胞 HEK293 cell	DF-1 细胞 DF-1 cell
pcPPTWPRE	38.0 aA	4.2 aB
pcPPTPRE(+)	23.8 bA	2.3 aB

注:同列数据后标不同小写字母者表示差异极显著($P<0.01$),标相同小写字母者表示差异不显著($P>0.05$);同行数据后标不同大写字母者表示差异极显著($P<0.01$)。

Note:Different small letters in the same column indicate very significant difference($P<0.01$),while the same small letter indicates no significant difference($P>0.05$);Different capitals letters in the same line indicate very significant difference ($P<0.01$).

采用 *Sac* II 酶对 WPRE 的连接方向进行鉴定,结果显示,WPRE 正向连接时酶切片段分别为 5 900 和 1 259 bp,反向连接时分别为 6 350 和 809 bp(图 4),表明转移载体 pcPPTWPRE 构建成功。

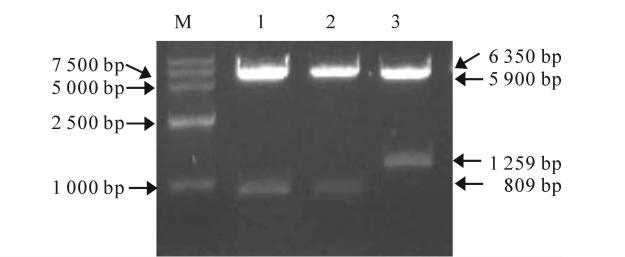


图 4 WPRE 在 pcPPTPRE(+)中连接方向的鉴定结果
M, DNA Marker VI 分子质量标准;1,2. WPRE 反向连接;3. WPRE 正向连接

Fig. 4 Identification of the direction of WPRE ligased in pcPPTPRE(+)

M, DNA Marker VI;1,2. Plasmids containing WPRE ligased by anti-sense;3. Plasmid containing WPRE ligased by sense

表 1 显示,在 HEK293 细胞中,pcPPTWPRE 和 pcPPTPRE(+)表达的阳性细胞率分别为 38.0%和 23.8%,*F* 检验差异极显著;在 DF-1 细胞中,pcPPTWPRE 和 pcPPTPRE(+)表达的阳性细胞率分别为 4.2%和 2.3%,差异不显著。同一 EIAV 基因转移载体转染的 HEK293 细胞中表达 EGFP 的阳性细胞率均明显高于 DF-1 细胞,差异极显著。

3 讨 论

土拨鼠肝炎病毒转录后调控元件(WPRE)可以促进转基因的表达^[6],其作用机理可能是通过对多聚腺苷酸化、RNA 的核质运输^[10]以及翻译过程的修饰促进异源 cDNA 的表达^[1,8-9]。WPRE 可促进腺病毒载体^[11]、慢病毒载体^[12-13]以及鼠白血病病毒载体^[14]中转基因的表达。Moreau-Gaudry 等^[12]发现,加入 WPRE 可以使 β -球蛋白 cDNA 在慢病毒载体中的表达量提高 2 倍。转录后调控元件有方向性,只有处于正义方向时才能发挥功能,处于反义方向时会大大抑制转绿色荧光蛋白(GFP)和荧光素酶的表达^[1]。孙成群^[3]将 HPRE 反向插入 EIAV 载体转染 293T 细胞,发现 EGFP 的表达能力明显低于正向插入 HPRE 的 pcPPTPRE(+)载体。因此,本试验利用 WPRE 正向插入与反向插入 EIAV 载体质粒中 *Sac* II 酶酶切片段的不同,筛选获得了 WPRE 正向插入 pcPPTPRE(+)的载体质粒 pcPPTWPRE。

HEK293 细胞为人胚肾细胞系,摄取外源基因

的能力较强,国外已经以此建立了稳定表达鼠白血病病毒 gag/pol 蛋白的 GP293 包装细胞系^[15],本试验选择该细胞系作为 EIAV 基因转移载体的宿主细胞,可以更客观地比较 WPRE 与 HPRE 对 EIAV 载体质粒外源基因表达能力的影响,为今后在 HEK293 细胞中获得有复制能力的 VSV-G 伪型 EIAV 病毒提供了技术支持,同时也为以 HEK293 细胞系为基础建立稳定表达马传染性贫血病毒 gag/pol 蛋白的包装细胞系奠定了基础。DF-1 细胞为鸡胚成纤维细胞系,衍生自进化水平较低的禽类,

转染效率相对较低,为了将 EIAV 基因转移载体应用于转基因鸡的制备,本试验将 DF-1 细胞作为 EIAV 载体质粒的宿主细胞,初步探讨了其在鸡体外培养细胞中表达外源基因的能力。本研究结果表明,转录后调控元件优化的 EIAV 载体质粒 pcPPT-WPRE,在 HEK293 细胞中获得了较 pcPPTPRE(+)载体更强的外源基因表达能力;但在 DF-1 细胞中,pcPPTWPRE 与 pcPPTPRE(+)表达外源基因能力差异不显著,可能主要是由细胞自身的转染效率较低所致。

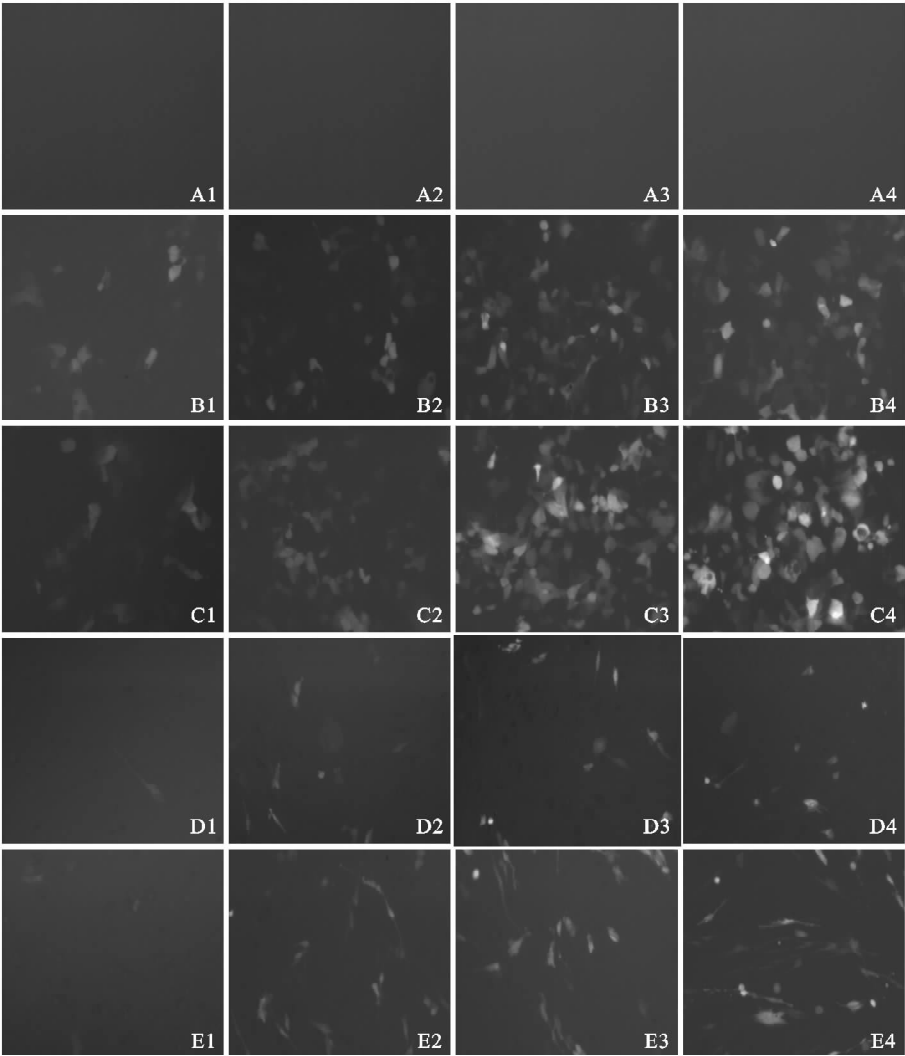


图 5 EIAV 基因转移载体转染 HEK293 细胞和 DF-1 细胞后增强绿色荧光蛋白(EGFP)的表达(200×)
A1~A4. 12,24,36 和 48 h 时的正常细胞(对照);B1~B4. 转染 pcPPTPRE(+)12,24,36 和 48 h 的 HEK293 细胞;C1~C4.
转染 pcPPTWPRE 12,24,36 和 48 h 的 HEK293 细胞;D1~D4. 转染 pcPPTPRE(+)12,24,36 和 48 h 的 DF-1 细胞;
E1~E4. 转染 pcPPTWPRE 12,24,36 和 48 h 时的 DF-1 细胞

Fig. 5 Expression of the EGFP in the HEK293 and DF-1 cells after transfection with EIAV gene transfer vectors(200×)
A1~A4. Normal cell at 12,24,36 and 48 h;B1~B4. HEK293 cells after transfection with pcPPTPRE(+)at 12,24,36 and 48 h
respectively;C1~C4. HEK293 cells after transfection with pcPPTWPRE at 12,24,36 and 48 h respectively;D1~D4. DF-1 cells after
transfection with pcPPTPRE(+)at 12,24,36 and 48 h respectively;E1~E4. DF-1 cells after transfection with pcPPTWPRE at
12,24,36 and 48 h respectively

4 结 论

本试验结果表明,土拨鼠肝炎病毒转录后调控元件(WPRE)明显提高了 EIAV 基因转移载体质粒的外源蛋白表达能力,这将有利于 EIAV 载体病毒的获得和高效力的 EIAV 基因转移载体系统的构建及应用,也为其他病毒载体的构建提供了借鉴。

[参考文献]

[1] Zufferey R, Donello J E, Trono D, et al. Woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element enhances expression of transgenes delivered by retroviral vectors [J]. J Virology, 1999, 73(4): 2886-2892.

[2] Mitta B, Rimann M, Ehrenguber M U, et al. Advanced modular self-inactivating lentiviral expression vectors for multigene interventions in mammalian cells and *in vivo* transduction [J]. Nucleic Acids Res, 2002, 30(21): e113.

[3] 孙成群. 马传染性贫血病毒基因转移载体系统的构建及分析 [D]. 哈尔滨: 中国农业科学院哈尔滨兽医研究所, 2004.

Sun C Q, Constuction and evaluation of gene transfer systems derived from equine infectious anemia virus donkey leuleoctte attenuated strain [D]. Haerbin: Veterinery Research Znstitute, CAAS, 2004. (in Chinese)

[4] Azzouz M, Mazarakis N. Non-primate EIAV-based lentiviral vectors as gene delivery system for motor neuron diseases [J]. Current Gene Therapy, 2004, 4(3): 277-286.

[5] Whitelaw C B, Radcliffe P A, Ritchie W A, et al. Efficient generation of transgenic pigs using equine infectious anaemia virus (EIAV) derived vector [J]. FEBS Lett, 2004, 571: 233-236.

[6] Barry S, Harder B, Brzezinski M, et al. Lentivirus vectors encoding both central polypurine tract and posttranscriptional regulatory element provide enhanced transduction and transgene

expression [J]. Hum Gene Ther, 2001, 12(9): 1103-1108.

[7] Huang Z M, Yen T S. Hepatitis B virus RNA element that facilitates accumulation of surface gene transcripts in the cytoplasm [J]. J Virology, 1994, 68(5): 3193-3199.

[8] Donello J E, Loeb J E, Hope T J. Woodchuck hepatitis virus contains a tripartite posttranscriptional regulatory element [J]. J Virology, 1998, 72(6): 5085-5092.

[9] Loeb J E, Cordier W S, Harris M E, et al. Enhanced expression of transgenes from adeno-associated virus vectors with the woodchuck hepatitis virus post-transcriptional regulatory element : Implications for gene therapy [J]. Hum Gene Ther, 1999, 10(14): 2295-2305.

[10] Popa I, Harris M E, Donello J E, et al. CRM1-Dependent function of a cis-acting RNA export element [J]. Molecular and Cellular Biology, 2002, 22(7): 2057-2067.

[11] Xu Z L, Mizuguchia H, Mayumi T, et al. Woodchuck hepatitis virus post-transcriptional regulation element enhances transgene expression from adenovirus vectors [J]. Biochimica and Biophysica Acta, 2003, 1621: 266-271.

[12] Moreau-Gaudry F, Xia P, Jiang G, et al. High-level erythroid-specific gene expression in primary human and murine hematopoietic cells with self-inactivating lentiviral vectors [J]. Blood, 2001, 98(9): 2664-2672.

[13] Ramezani A, Hawley T S, Hawley R G. Lentiviral vectors for enhanced gene expression in human hematopoietic cells [J]. Mol Ther, 2000, 2: 458-469.

[14] Hlavaty J, Schittmayer M, Stracke A, et al. Effect of posttranscriptional regulatory elements on transgene expression and virus production in the context of retrovirus vectors [J]. Virology, 2005, 341: 1-11.

[15] Keni O, Kamihira M, Kuga Y, et al. Production of anti-prion scFv-Fc fusion proteins by recombinant animal cells [J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2003, 95(3): 231-238.