

应用离心方法提高杆状病毒对哺乳动物细胞转导实验效率 Improving Baculovirus Transduction of Mammalian Cells by Spinoculation

程 通, 杨炳春, 许辰煜, 张 涛, 杜海莲, 王颖彬, 张 军*, 夏宁邵*

CHENG Tong, YANG Bing-Chun, XU Chen-Yu, ZHANG Tao, DU Hai-Lian, WANG Ying-Bin,
ZHANG Jun* and XIA Ning-Shao*

国家传染病诊断试剂与疫苗工程技术研究中心, 厦门大学生命科学学院, 厦门 361005

National Institute of Diagnostics and Vaccine Development in Infectious Diseases, School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005, China

摘 要 重组杆状病毒作为一种对哺乳动物细胞的新型基因转移载体已获得了日益广泛的应用。为进一步提高转导实验的效率,本研究利用已构建的带有 CMV 启动子-增强型绿色荧光蛋白 (eGFP) 表达盒的重组杆状病毒 BacV-CMV-EGFP,在 CV-1 细胞中探索了应用离心方法提高转导实验效率的可行性。结果显示离心方法可显著提高单位时间内重组杆状病毒对哺乳动物细胞的转导效率,同时不会对靶细胞造成损伤。通过对离心时间、离心后孵育时间、病毒上清的稀释缓冲液的进一步摸索优化,结果显示病毒上清以 PBS 为稀释缓冲环境室温 600g 水平离心 1h 即可获得高水平的转导效率,优于在 PBS 环境中 27[°] 孵育 8h 的效果。该方法可在获得高转导效率的同时显著缩短实验时间,具有快捷、高效、低损伤的特点,可作为一种常规操作方法用于日常实验。本研究进一步应用该方法对多种不同来源和类型的哺乳动物细胞株进行基因转导,结果显示该方法可适用于多数不同种属和组织来源的哺乳动物细胞,其中对贴壁细胞的效果最为显著。

关键词 杆状病毒, 哺乳动物细胞, 转导, 离心

中图分类号 Q813 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2007)03-0546-06

Abstract Recently many reports have described that recombinant baculovirus could serve as a new gene transfer vehicle for mammalian cells with many unique advantages. In this study, the constructed recombinant baculovirus BacV-CMV-EGFP containing the enhanced green fluorescent protein (eGFP) gene driven by CMV promoter was used to explore the feasibility of improving the efficiencies of transduction experiment in CV-1 cells by centrifugal method. Refer to the centrifugal transduction protocol of recombinant lentivirus, CV-1 cells were incubated with the culture supernatant of Sf-21 cells infected by BacV-CMV-EGFP ($moi = 30$) and then centrifuged at 600g for 1h at RT, reporter gene transfer and expression efficiencies were analyzed by flow cytometry (FCM) 48h post transduction. Results showed that centrifugal method can achieve higher gene delivery and expression efficiencies than transduction by simple virus-cell mixing for 4h at 27[°] with least impairment to cell viability. The centrifugal transduction protocol was further optimized by testing different centrifugal times, post-centrifugation incubation times and surrounding solutions. We found that centrifugation at 600g for 1h at RT is sufficient to achieve the highest transduction

Received: December 14, 2006; Accepted: January 8, 2007.

This work was supported by grants from Program for Key Project Breed in Chinese University (No. 705031), Science and Technology Projects of Fujian Province (No. 2004YZ01-1), Program for New Century Excellent Talents in University (NCET), Program for Innovative Research Team in Science and Technology in Fujian Province University.

*Corresponding author. Tel: +86-592-2184113; Fax: +86-592-2181258; E-mail: zhangj@xmu.edu.cn

高等学校科技创新工程重大项目培育资金 (No. 705031), 福建省科技重大专项 (No. 2004YZ01-1), 教育部跨世纪优秀人才培养计划, 福建省高校创新团队培育计划资助。

efficiencies in target cells and PBS is more suitable than other surrounding solutions. Compared with previous protocol in which transduction occurs for 4 ~ 8h at 27 °C, centrifugal method developed in this study could achieve more higher transduction efficiencies in more shorter time. Nine different mammalian cell lines (CV-1, 293FT, HepG2, 293T, CHO, C127, MT4, H9, Molt-4) were used to investigate the feasibility of delivering exogenous genes into different mammalian cells with the BacV-CMV-EGFP supernatant ($moi = 30$) at 600g for 1h in PBS surrounding solution at RT. Results showed that most mammalian cell lines used in this study could be effectively transduced with recombinant baculoviruses by centrifugal method, and more higher and satisfactory transduction efficiencies could be achieved in primate adherent culture cells than in suspended culture cells. These results show that the baculovirus centrifugal transduction protocol have notable advantages: more rapid, efficient and nontoxic, and could be easily used in daily common experiments.

Key words baculovirus, mammalian cells, transduction, spinoculation

杆状病毒是宿主特异性的昆虫病毒,长期以来被广泛应用于昆虫细胞基因工程^[1]。近年来研究发现,杆状病毒可作为一种对哺乳动物细胞的新型基因转移载体,目前已在体外和体内基因转移研究中获得了成功应用,显示出很好的应用潜力^[2-4]。如何进一步提高杆状病毒对哺乳动物细胞的基因转移效率是当前一项十分重要的研究内容。目前已报道的方法有加入组蛋白脱乙酰基酶抑制剂^[5,6]、改变或修饰病毒外膜蛋白^[7,8]等,但这些方法同时也会导致较为明显的细胞毒性效应或显著影响杆状病毒在昆虫细胞中的生产效率等问题。对转导实验方法进行改进也是提高杆状病毒对哺乳动物细胞基因转移效率的重要途径。我们已成功建立了一种直接使用重组杆状病毒上清对哺乳动物细胞进行高效基因转移的方法^[9],Hsu等进一步证明了该类型方法的优越性^[10,11],但应用此方法要获得高效转导仍至少需要4h以上的转导时间。

研究已显示,数小时的离心不会对哺乳动物细胞的生长性状产生负面影响^[12],应用离心方法可有效提高多种病毒对宿主细胞的感染效率^[13-15],但该方法能否用于杆状病毒对哺乳动物细胞的转导实验尚未见到有关报道。本研究即探索了应用离心方法进一步提高杆状病毒转导实验效率的可行性,对比显示通过离心转导可显著提高单位时间内重组杆状病毒对哺乳动物细胞的转导效率,同时不会对靶细胞造成损伤。通过摸索优化离心转导条件,本研究建立了重组杆状病毒上清离心转导方法,该方法可在获得高效转导的同时显著缩短转导实验时间,具有快捷、高效、低损伤的特点。

1 材料和方法

1.1 细胞、重组杆状病毒和试剂

Sf-21 昆虫细胞和 293FT 细胞购自 Invitrogen 公

司,HepG2、CV-1、H9、Molt-4 细胞株购自 ATCC,293、CHO、C127、MT4 细胞株由本实验室保存。携带 CMV 启动子可在哺乳动物细胞中表达增强型绿色荧光蛋白(eGFP)的重组杆状病毒 BacV-CMV-EGFP 为本实验室构建^[9]。DMEM、RPMI1640、MEM 培养基购自 Invitrogen 公司。CCM3 培养基、Grace 培养基、细胞培养用胎牛血清(FBS)购自 HyClone 公司。其它试剂为进口或国产分析纯试剂。

1.2 昆虫细胞的培养及感染

昆虫细胞 Sf-21 培养于含有 2% 胎牛血清的 CCM3 培养基。重组杆状病毒在 Sf-21 细胞中进行活化扩增,收集病毒上清 4 闭光保存备用。

1.3 重组杆状病毒效价测定

采用空斑测定方法检测重组病毒效价^[9]。本实验所使用的重组杆状病毒 BacV-CMV-EGFP 的滴度约为 1.5×10^7 PFU/nL。

1.4 重组杆状病毒对哺乳动物细胞的基因转移

哺乳动物细胞用胰酶消化吹散后铺 24 孔细胞培养板,每孔细胞数量约为 5×10^4 。37 °C 培养 8h 后弃去原培养基,加入 600 μ L 已收集的重组杆状病毒 BacV-CMV-EGFP 上清的稀释液。离心转导置于离心机(Eppendorf 5810)中用水平离心转子(A-4-81-MTP/Flex)进行离心,最大离心半径为 163mm;静置转导置于 27 °C 恒温箱中进行。转导结束后更换为对应的完全培养基,在 CO₂ 培养箱中 37 °C 培养 48h 后进行观察和检测。

1.5 绿色荧光的观察

表达绿色荧光蛋白的细胞置于 Nikon TE2000 倒置荧光显微镜下采用蓝光激发观察,用 Nikon DXM1200F CCD 采集荧光图像。

1.6 流式细胞仪检测基因转移效率及阳性细胞平均荧光强度

测定方法见文献[9]。

2 结果和分析

2.1 离心方法在杆状病毒对哺乳动物细胞转导实验中的初步应用

在逆转录病毒和慢病毒感染实验中,研究发现采用离心感染方法可显著提高其对靶细胞的基因转移效率^[15,16]。我们尝试将慢病毒系统的离心感染方法用于杆状病毒对哺乳动物细胞的基因转移实验。将重组杆状病毒 BacV-CMV-EGFP 感染后的 SF-21 细胞培养上清用 PBS 以 1:4 体积比例稀释后 (500 μ L) 孵育 24 孔细胞培养板中的 CV-1 细胞 (moi = 30), 在室温以 600g 水平离心 1h, 离心后更换为

MEM 完全培养基, 培养 48h 后用倒置荧光显微镜观察报告基因的表达情况, 同时用流式细胞仪检测报告基因的转移及表达效率。同时也用同样稀释的病毒上清对相同数量的 CV-1 细胞在 27 $^{\circ}$ C 下孵育 4h 进行转导效率的比较。结果如图 1 所示, 相比在 27 $^{\circ}$ C 下静置孵育 4h 进行转导, 离心方法在更短的时间里获得更好的转导效果, 这说明通过离心可显著提高单位时间内重组杆状病毒对哺乳动物细胞的转导效率。同时我们也观察到, 离心转导后细胞的形态和生长状况与正常没有差别, 这说明了该方法对细胞的安全性。因此将离心技术应用于改进当前的转导实验方法以提高实验效率是十分有效的。

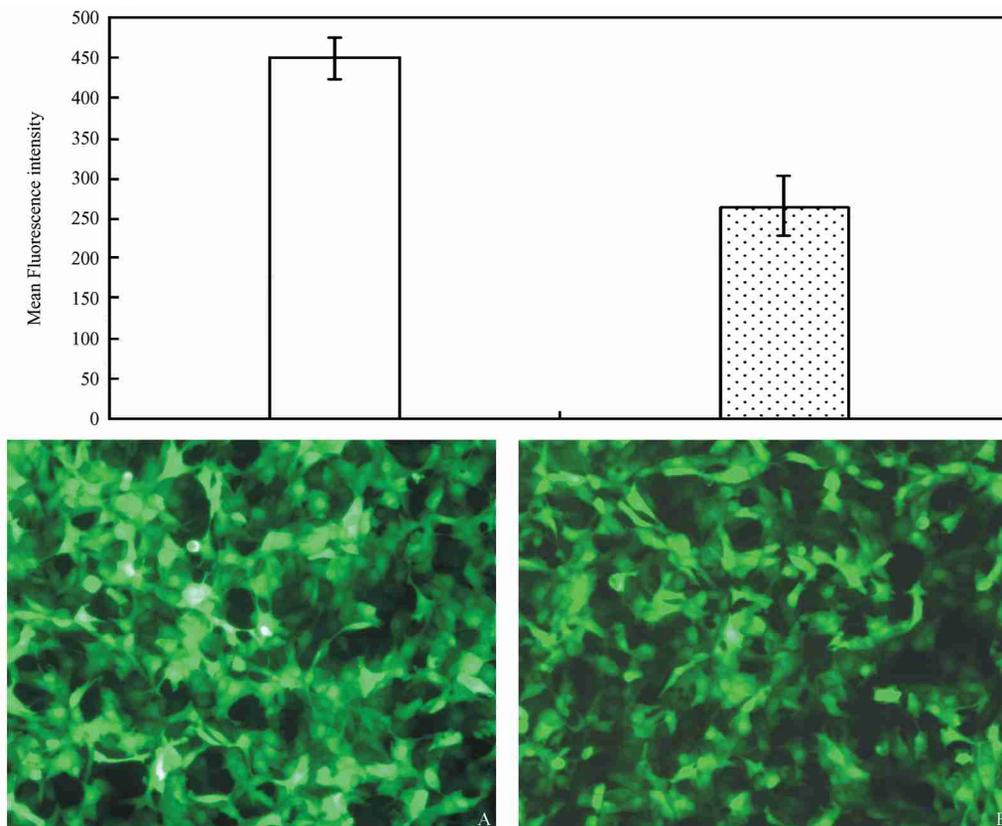


图1 重组杆状病毒通过离心方法对哺乳动物细胞进行基因转移的效果

Fig. 1 EGFP expression in CV-1 cells transduced with BacV-CMV-EGFP by centrifugal method

A: CV-1 cells transduced with BacV-CMV-EGFP at 600g for 60min at RT; B: CV-1 cells transduced with BacV-CMV-EGFP at 27 $^{\circ}$ C for 4h.

2.2 离心时间与转导效率的关系

本研究进一步对杆状病毒离心转导方法进行了优化, 离心力和离心时间是两个重要的条件。在慢病毒的离心感染实验中 600g 被认为是较优的条件^[16]。杆状病毒的沉降系数 (1870S) 高于慢病毒 (600S), 因此认为 600g 对于杆状病毒应是足够的。我们探索了不同的离心时间对转导效率的影响。将重组杆状病毒 BacV-CMV-EGFP 感染后的 SF-21 细胞培养上清用 PBS 以 1:4 体积比稀释后孵育 24 孔

板中的 CV-1 细胞 (moi = 30), 在室温分别以不同离心时间在 600g 进行水平离心, 离心结束后更换为 MEM 完全培养基, 37 $^{\circ}$ C 培养 48h 后用流式细胞仪检测报告基因的转移及表达效率。结果如图 2 所示, 离心 1h 的转导效果比离心 30min 的效果略优, 而离心 2h 和 1h 差别不明显, 因此认为 1h 是较为合适的时间。

2.3 不同的稀释液对转导效率的影响

研究已显示, 不同的杆状病毒上清稀释液会对

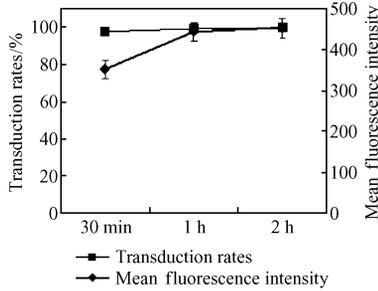


图 2 不同的离心时间对基因转移及表达效率的影响
Fig. 2 Effect of different centrifugal times on the gene-transfer and expression efficiencies in CV-1 cells transduced with BacV-CMV-EGFPa

转导效率产生影响^[10]。本研究探讨了在离心转导中使用不同的稀释液是否也会对转导效率产生影响。将重组杆状病毒 BacV-CMV-EGFPa 上清分别用不同 FBS 浓度的培养基或缓冲液以 1:4 体积比稀释,分别孵育 24 孔板中的 CV-1 细胞 (moi = 30),在室温以 600g 水平离心 1h,离心后更换为 MEM 完全培养基,37℃ 培养 48h 后用流式细胞仪检测报告基因的转移及表达效率。结果如图 3 所示,在离心转导方法中,不同的稀释液依然会对转导实验的效率造成影响,PBS 和 2%CCM3 可显示出较好的转导效果,这表明在 MEM 培养基或 FBS 中可能存在不利于重组杆状病毒进入靶细胞的因素。

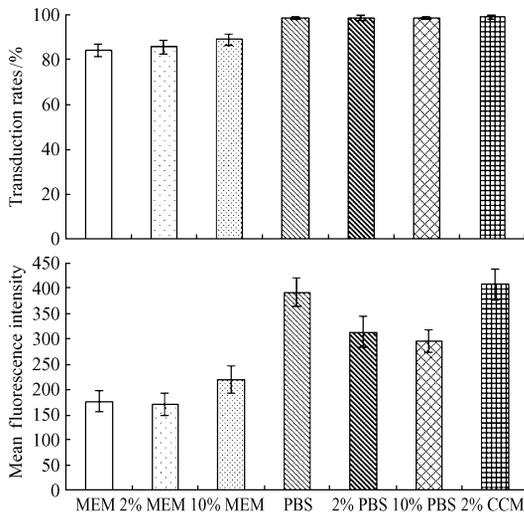


图 3 不同的稀释缓冲液对基因转移及表达效率的影响
Fig. 3 Effect of different surrounding solutions on gene-transfer and expression efficiencies in CV-1 cells transduced with BacV-CMV-EGFPa by centrifugal method

2.4 离心后的继续孵育时间对转导效率的影响

研究已显示杆状病毒对哺乳动物细胞的转导效率与孵育时间呈正相关^[9,10]。我们对离心后继续保持转导体系一段时间是否也有助于提高转导效率进

行了研究。CV-1 细胞培养于 24 孔细胞培养板,重组杆状病毒 BacV-CMV-EGFPa 上清用 PBS 以 1:4 体积比稀释后在室温下以 600g 离心转导 1h (moi = 30),离心结束后立即更换为 MEM 完全培养基或置于 27℃ 中继续孵育一定时间后再更换为完全培养基,37℃ 培养 48h 后用流式细胞仪检测报告基因的转移及表达效率(图 4)。结果显示在离心转导后继续进行孵育对于进一步提高基因转移和表达效率的作用并不十分明显,因此在离心转导后可立即更换为完全培养基。

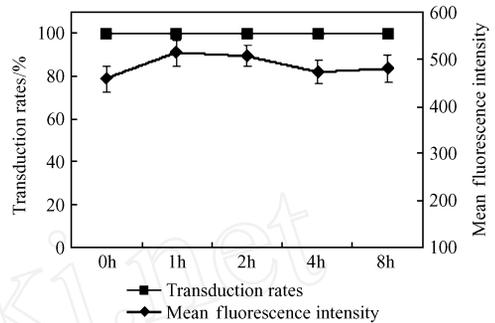


图 4 离心后继续孵育时间对基因转移及表达效率的影响
Fig. 4 Effect of different incubation times post centrifugal transduction on gene-transfer and expression efficiencies in CV-1 cells

2.5 离心转导方法与目前方法的对比

将重组杆状病毒 BacV-CMV-EGFPa 上清用 PBS

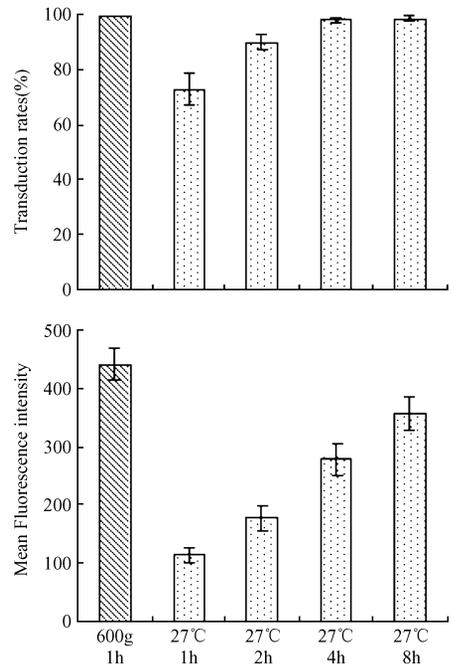


图 5 重组杆状病毒通过离心方法对哺乳动物细胞进行基因转移的效果
Fig. 5 Gene-transfer and expression efficiencies in CV-1 cells transduced with BacV-CMV-EGFPa by centrifugal method

以 1:4 稀释后孵育 24 孔板中的 CV-1 细胞 ($moi = 30$), 分别采用在室温以 600g 水平离心转导 1h, 和采用在 27℃ 分别孵育不同的时间进行转导, 在转导结束后更换为 MEM 完全培养基置 37℃ 培养, 48h 后用流式细胞仪检测报告基因的转移及表达效率。结果如图 5 所示, 采用优化后的离心转导方法可获得高水平的报告基因转移和表达效率, 其效果优于在 27℃ 下静置孵育 8h 的转导方法, 同时转导后细胞状态和生长性状正常。该方法具有显著的快速、高效和低损伤的优点。

2.6 离心转导方法在不同哺乳动物细胞中的应用

我们探讨了将离心转导方法应用于对几种不同来源的哺乳动物细胞进行基因转移的效果。将重组杆状病毒 BacV-CMV-EGFP_A 上清用 PBS 以 1:4 稀释后分别孵育 24 孔板中的 CV-1、293FT、Hep G2、293T、CHO、C127、MT4、H9、Molt-4 细胞 ($moi = 30$), 600g 水平离心 1h, 离心后更换为对应的完全培养基, 37℃ 培养 48h 后用流式细胞仪检测报告基因的转移及表达效率。结果如表 1 所示, 离心转导方法具有较好的适用性, 对其中的灵长类贴壁培养细胞可获得理

表 1 杆状病毒上清离心转导法在不同哺乳动物细胞中的应用效果
Table 1 Gene transfer and expression efficiencies in different mammalian cells transduced with Bac V-CMV-EGFP_A by centrifugal method

Organism	Tissue	Growth Properties	Transfection efficiency	Mean fluorescence intensity
Human				
Hep G2	hepatocellular carcinoma	adherent	94.8 %	243.7
293FT	kidney	adherent	98.6 %	311.5
293T	kidney	adherent	98.9 %	286.4
MT4	T lymphocyte	suspension	3.5 %	8.1
Molt-4	T lymphocyte	suspension	1.2 %	4.7
H9	T lymphocyte	suspension	0.8 %	2.9
Rodent				
C127	fibroblast	adherent	16.9 %	41.8
CHO	ovary	adherent	52.5 %	50.4
Monkey				
CV-1	normal kidney	adherent	99.2 %	369.3

想的转导效率, 而对其中的悬浮培养细胞和啮齿类来源细胞的转导效率依然相对较低。

3 讨论

本研究探讨了应用离心方法提高杆状病毒对哺乳动物细胞的转导实验效率。通过对 CV-1 细胞的转导实验显示, 离心方法可显著提高单位时间内重组杆状病毒对哺乳动物细胞的转导效率, 将重组杆状病毒培养上清以 PBS 为稀释缓冲环境室温 600g 水平离心 1h 是较适的离心转导条件, 可获得高效的基因转移和表达效率, 同时不会对细胞造成损伤。该方法可在获得高转导效率的同时显著缩短实验时间, 具有快捷、高效和低损伤的特点。

研究已显示, 离心方法可用于有效增强多种病毒对组织培养细胞的感染作用, 如 HIV-1^[14]、HSV^[17]、逆转录病毒^[15]等。本研究证明了应用离心方法也能够显著提高杆状病毒对哺乳动物细胞的转导效率。目前对于离心方法增强感染或转导作用的机制还未定论, 有研究认为离心能够增强细胞对病

毒的易感性^[18]或促进病毒与靶细胞的融合^[19], 而 O'Doherty 等的研究则显示离心增强作用的主要因素是对病毒粒子的沉降作用从而促进病毒对细胞的附着^[14]。杆状病毒的沉降系数约为 1870S, 在 24 孔板中加入 500μL 病毒液的液层最大厚度约为 3mm, 结合所使用的转头数据计算出最大和最小离心半径应分别为 163mm 和 160mm。通过公式计算, 杆状病毒颗粒在 600g 离心力下的沉降时间应为 46min。这与我们通过实验获得的较优条件 600g 离心 1h 接近, 因此推测离心方法增强杆状病毒转导作用可能与促进病毒粒子沉降有关, 使杆状病毒能更快地附着于靶细胞上, 从而提高了基因转移效率。对于确切的机制还有待进一步研究阐明。

本研究的结果表明, 离心转导方法对灵长类来源贴壁培养细胞的转导效率最为理想, 而对悬浮培养细胞的转导效率依然相对较低, 与我们前面应用病毒上清静态转导方法获得的结果相似^[21]。本研究也显示, 病毒上清的稀释缓冲液环境对于转导效率有较明显的影响, 以 PBS 和 2% CCM3 为稀释缓冲

液可获得相对较好的转导效果,而 MEM 培养基及高血清环境中的效果相对较差。Hu 等最近提出哺乳动物细胞培养基中含有的 NaHCO_3 可能会影响杆状病毒的转导效率^[22]。因此,我们认为尽管离心方法能增加病毒与细胞接触的机会,但某些可能限制病毒进入细胞或细胞内部存在的阻碍机制仍然存在。目前杆状病毒与哺乳动物细胞具体的相互作用机制尚未明确阐明,本研究对于进一步研究其作用机制提供了一定启示。

本研究建立的重组杆状病毒上清对哺乳动物细胞离心转导方法与目前已提出的提高转导效率的策略相比具有快捷、高效和低损伤的综合优势。相比在转导体系中加入组蛋白脱乙酰基酶抑制剂如丁酸钠、TCA^[5]或改变病毒外膜蛋白 gp64^[7]等方法,离心转导方法在获得高效转导的同时,不会对靶细胞和杆状病毒的生产造成损伤和影响。研究显示,与目前认为较优的 27 下孵育 4~8h 的转导方法相比,在使用相同的病毒上清进行转导的情况下离心方法可获得更优的转导效果,而所需要的时间仅为 1h,从而显著提高了实验效率。该方法可作为一种常规操作方法应用于日常实验,对于进一步开发和拓展重组杆状病毒作为哺乳动物细胞基因转移载体的应用潜力和范围具有积极意义。

REFERENCES(参考文献)

- [1] Kost TA, Condeary JP. Recombinant baculoviruses as expression vectors for insect and mammalian cells. *Curr Opin Biotechnol*, 1999, **10**(5):428 - 433.
- [2] Kaneko H, Suzuki H, Abe T, et al. Inhibition of HIV-1 replication by vesicular stomatitis virus envelope glycoprotein pseudotyped baculovirus vector-transduced ribozyme in mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, **349**(4):1220 - 1227.
- [3] Gilbert L, Valilehto O, Kirjavainen S et al. Expression and subcellular targeting of canine parvovirus capsid proteins in baculovirus-transduced NLFK cells. *FEBS Lett*, 2005, **579**(2):385 - 392.
- [4] Köhlbrenner 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.
- [5] Condeary JP, Witherspoon SM, Clay WC, et al. Transient and stable gene expression in mammalian cells transduced with a recombinant baculovirus vector. *Proc Natl Acad Sci*, 1999, **96**(1):127 - 132.
- [6] Hu YC, Tsai CT, Chang Y, et al. Enhancement and prolongation of baculovirus-mediated expression in mammalian cells: Focuses on strategic infection and feeding. *Biotechnol Prog*, 2003, **19**:373 - 379.
- [7] Mangor JT, Monsma SA, Johnson MC, et al. A GP64-null baculovirus pseudotyped with vesicular stomatitis virus G protein. *J Virol*, 2001, **75**(6):2544 - 2556.
- [8] Kitagawa Y, Tani H, Limn CK, et al. Ligand-directed gene targeting to mammalian cells by pseudotype baculoviruses. *J Virol*, 2005, **79**(6):3639 - 3652.
- [9] Cheng T(程通), Xu C Y(许辰煜), Wang YB(王颖彬), et al. Rapid and efficient expression of foreign genes in mammalian cells by baculovirus vectors. *Chinese Journal of Biotechnology* (生物工程学报), 2003, **19**(5):581 - 587.
- [10] Hsu CS, Ho YC, Wang KC, et al. Investigation of optimal transduction conditions for baculovirus-mediated gene delivery into mammalian cells. *Biotechnol Bioeng*, 2004, **88**:42 - 51.
- [11] Ho YC, Chung YC, Hwang SM, et al. Transgene expression and differentiation of baculovirus-transduced human mesenchymal stem cells. *J Gene Med*, 2005, **7**:860 - 868.
- [12] Hughes JH. Physical and chemical methods for enhancing rapid detection of viruses and other agents. *Clin Microbiol Rev*, 1993, **6**(2):150 - 175.
- [13] Seno M, Kanamoto Y, Takao S, et al. Enhancing effect of centrifugation on isolation of influenza virus from clinical specimens. *J Clin Microbiol*, 1990, **28**(7):1669 - 1670.
- [14] O'Doherty U, Swiggard WJ, Malim MH. Human immunodeficiency virus type 1 spinoculation enhances infection through virus binding. *J Virol*, 2000, **74**(21):10074 - 10080.
- [15] Bahnsen AB, Dunigan JT, Baysal BE, et al. Centrifugal enhancement of retroviral mediated gene transfer. *J Virol Methods*, 1995, **54**(2-3):131 - 143.
- [16] Zielske SP, Gerson SL. Lentiviral transduction of P140K MGMT into human CD34(+) hematopoietic progenitors at low multiplicity of infection confers significant resistance to BG/BCNU and allows selection *in vitro*. *Mol Ther*, 2002, **5**(4):381 - 387.
- [17] Seal LA, Toyama PS, Fleet KM, et al. Comparison of standard culture methods, a shell vial assay, and a DNA probe for the detection of herpes simplex virus. *J Clin Microbiol*, 1991, **29**(3):650 - 652.
- [18] Hudson JB. Further studies on the mechanism of centrifugal enhancement of cytomegalovirus infectivity. *J Virol Methods*, 1988, **19**:97 - 108.
- [19] Tenser RB, Dunstan ME. Mechanisms of herpes simplex virus infectivity enhanced by ultracentrifugal inoculation. *Infect Immun*, 1980, **30**:193 - 197.
- [20] Hodgkin PD, Scalzo AA, Swaminathan N, et al. Murine cytomegalovirus binds reversibly to mouse embryo fibroblasts: implications for quantitation and explanation of centrifugal enhancement. *J Virol Methods*, 1988, **22**:215 - 223.
- [21] Xu CY(许辰煜), Cheng T(程通), Lu WX(卢五迅), et al. Research on the gene-transfer and expression efficiencies in different mammalian cells by baculovirus. *Chinese Journal of Biotechnology* (生物工程学报), 2004, **20**(1):73 - 77.
- [22] Hu YC. Baculovirus vectors for gene therapy. *Adv Virus Res*, 2006, **68**:287 - 320.