用于逆转录病毒载体的生产细胞和包装细胞及其制备方法

技术领域

本公开涉及病毒载体领域，具体地，涉及逆转录病毒尤其是慢病毒载体领域；更具体地，涉及逆转录病毒尤其是慢病毒载体的制备方法，用于逆转录病毒尤其是慢病毒载体制备的生产/包装细胞以及所述细胞的制备方法。

背景技术

逆转录病毒，又称反转录病毒，属于 RNA 病毒中的一类，是具有包膜的双链 RNA 病毒，其主要特征在于能够将其基因组由 RNA “逆转录”为 DNA。病毒粒的直径一般为 100nm 左右，并且包含与核衣壳(NC)蛋白形成复合体的二聚基因组（两条相同的单股正链 RNA）。其基因组被包封在蛋白衣壳(CA)中，该衣壳还包含具有酶活性的蛋白，即反转录蛋白酶(RT)，整合酶(IN)和蛋白酶(PR)，这些酶是病毒感染所必需的。基质蛋白(MA)在衣壳核外形成一个层，该层与包膜相互作用，包膜是来源于宿主细胞膜并且包围病毒核心颗粒的脂质双层。锚定在该包膜上的是病毒包膜糖蛋白(Env)，其负责识别宿主细胞上的特异性受体并且启动感染过程。包膜蛋白由两个亚基形成，其分别是将所述蛋白锚定在脂膜中的跨膜(TM)亚基以及与细胞受体结合的表面(SU)亚基。

γ-逆转录病毒载体，是最通常被使用的逆转录病毒载体，在 2017 年所有申报基因治疗临床实验所用的转染方法中占 17.3%。目前，人们对于来源于复杂的逆转录病毒如人免疫缺陷病毒(HIV-1)的慢病毒(Lentiviral vector)的兴趣与日俱增，从 2012 年的 2.9%基因治疗临床试验占比上升到 2017 年的 7.3%。这是因为慢病毒能够转导非分裂的细胞，该特性使其区别于其他病毒载体(包括 γ-逆转录病毒载体)。另外，慢病毒相对于逆转录病毒有更有利的基因插入位点谱系。逆转录病毒和慢病毒载体最为吸引人的特性在于：作为基因递送工具，其基因递送能力可达 9 kb；较小的患者免疫反应和较好的经临床证实的安全性；在体内和体外的高转导效率；以及能够永久性地将外源基因整合到靶细胞基因组，使递送的基因具有长效的表达。

原型慢病毒载体系统是基于 HIV-1 病毒开发的，HIV-1 是一种已被充分研究的人病原病毒。除了 HIV-1，其他慢病毒也已被开发用作基因递送载体(TV)，但大多未达到临床研究阶段，如 HIV-2，猿免疫缺陷病毒(Simian immunodeficiency virus, SIV)，或者非灵长类动物慢病毒，包括猫免疫缺陷病毒(Feline immunodeficiency virus, FIV)，牛免疫缺陷病毒(Bovine immunodeficiency virus, BIV)或山羊关节炎-脑炎病毒(Caprine arthritis-encephalitis virus，CAEV)。仅基于马传染性贫血病毒(Equine infectious anemia virus，EIAV)的载体已被开发至治疗帕金森的临床使用阶段(ProSavin)。

主要出于对 HIV-1 在人体中具有致病性所带来的安全性问题的考虑，目前开发有三代慢病毒载体系统。第一代慢病毒载体系统是以三质粒系统为代表，该系统由包装质粒、包膜质粒及载有携带目的核酸

片段的病毒基因组转录盒(transcriptional casstte)的转移载体(transfer vector)质粒 3 种质粒组成。包装质粒源自 HIV-1 前病毒基因组，其 5'端 LTR 由巨细胞病毒早期启动子取代，3'LTR 由猿猴病毒-40 聚腺苷酸(SV40 polyA)序列取代，并且删除了 HIV-1 的包膜基因 env。此包装质粒同时表达 rev、vif、vpr、vpu 和 nef 辅助基因。被删除的 HIV-1 包膜基因被替换为水疱性口炎病毒(Vesicular stomatitis virus)的包膜蛋白基因 VSV-G 并由包膜质粒表达。载有携带目的核酸片段的病毒基因组转录盒的转移载体质粒携带了 HIV-1 的 5'端 LTR，和全部 5'端非翻译区域，300bp 左右的 5'端 gag 基因，中心多嘌呤束(cppt)片段，另外还带有 rev 应答元件（RRE）片段。此转移载体质粒用于克隆目的核酸片段并在病毒组装时提供病毒基因组 RNA。第二代慢病毒载体系统是在第一代的基础上进行改进得到的，其在包装质粒中删除了 HIV-1 的所有辅助基因（vif、vpr、vpu 和 nef 基因），这些辅助基因的去除并不影响病毒的滴度和感染能力，同时增加了载体的安全性。第三代慢病毒载体系统由四质粒组成，其将 rev 基因从包装质粒上移除并单独放在另一个包装质粒上。此外，第三代慢病毒载体系统同时增加了两个安全特性：第一个安全特性是构建自身失活的慢病毒转移载体质粒，即删除了病毒基因组转录盒中 3'LTR 的 U3 区，使慢病毒载体在完成逆转录反应后永久性的失去 5'LTR 和 3'LTR 的 U3 区增强子及启动子片段，使得即使在此时存在所有的病毒蛋白也因为不能再转录出病毒的基因组 RNA 而不能成功包装病毒，因此第三代转移载体质粒也被称为自我失活(self-inactivating, SIN)转移载体质粒。同时删除了 U3 区也大大降低了载体基因插入宿主细胞的致癌性。第二个安全特性是去除了有转录反式激活功能的 tat 基因，用异源启动子序列代替 5'LTR 的 U3 区增强子及启动子序列转录病毒基因组 RNA，并且在转录慢病毒基因组 RNA 时，异源启动子自身不能转录，因此进一步保证慢病毒载体仅能包装转染一次。第三代慢病毒系统仅保留了原始的 HIV-1 基因组中的 gag、pol 和 rev 基因序列，因此第三代慢病毒载体系统更加安全。

逆转录病毒/慢病毒载体可以通过替换不同的异源包膜糖蛋白而具有不同的假型(pseudotype)，比如替换为慢病毒（Lentivirus，如人、猿、猫、牛免疫缺陷病毒（immunodeficiency virus）、山羊关节炎-脑炎病毒(caprine arthritis-encephalitis virus)、马传染性贫血病毒(Equine infectious anemia virus)等）包膜蛋白、逆转录病毒（*Retroviruse,* 如鼠白血病病毒(Murine leukemia virus, 10A1, 4070A)、长臂猿猿白血病病毒(Gibbon ape leukemia virus)、猫白血病病毒(Feline leukemia virus, RD114)、两性逆转录病毒(Amphotropic retrovirus)、嗜性逆转录病毒(Ecotropic retrovirus)、狒狒猿白血病病毒(Baboon ape leukemia virus)等）包膜蛋白、副粘病毒（*Paramyxoviruses,* 如麻疹病毒(Measles virus)、尼帕病毒(Nipah virus)等）包膜蛋白、弹状病毒（*Rhabdoviruses,* 如狂犬病病毒(Rabies virus)、莫科拉病毒(Mokola virus)等）包膜蛋白、丝状病毒（*Filoviruses,* 如埃博拉病毒扎伊尔病毒(Ebola Zaire virus)等）包膜蛋白、沙眼病毒（*Arenaviruses*，如淋巴细胞脉络膜脑膜炎病毒(Lymphocytic choriomeningitis virus)等）包膜蛋白、杆状病毒（Baculovirus）包膜蛋白、甲病毒（*Alphaviruses*，如基孔肯雅病毒(Chikungunya virus)、罗斯河病毒(Ross River virus)、塞姆利基森林病毒(Semliki Forest virus)、信德比斯病毒(Sindbis virus)、委内瑞拉马

脑炎病毒(Venezuelan equine encephalitis virus)、西部马脑炎病毒(Western equine encephalitis virus)等）包膜蛋白、正粘病毒（*Orthomyxoviruses*, 如流感病毒(Influenza virus)、禽瘟病毒(Fowl Plague Virus)等）包膜蛋白、疱疹病毒（*Vesiculoviruses*, 如水泡性口炎病毒(Vesicular stomatitis virus)、昌迪普拉病毒和皮里病毒(Chandipura virus and Piry virus)等）包膜蛋白，目前大多数的慢病毒载体制备使用的都是水疱性口炎病毒包膜糖蛋白(VSV-G)，这是由于此种糖蛋白使得慢病毒载体具有大范围的转导谱(transduction spectrum)以及在下游处理过程中的更好的稳定性。

目前大部分逆转录病毒/慢病毒载体优选使用哺乳动物细胞系做为宿主细胞制备，最广泛使用的是293T 或 HEK293 细胞系以及基于它们筛选或改造的衍生细胞系。HEK293 细胞是转染腺病毒 E1A 基因的人肾上皮细胞系，293T 细胞由 HEK293 细胞派生，同时表达 SV40 大 T 抗原，含有 SV40 复制起始点与启动子区的质粒可以在 293T 细胞内复制并在一段时间内维持高质粒拷贝数，提高质粒携带基因的蛋白表达量。此外，与 HEK293 细胞相比，293T 细胞具有更快的细胞生长速度和更高的转染效率。以上293T 细胞特点使得其具有更高的病毒载体制备效率。另外，根据文献报道，可用于病毒载体的生产/包装细胞还包括哺乳动物细胞 HepG2 细胞、CHO 细胞、BHK 细胞、COS 细胞、NIH/3T3 细胞、Vero 细胞、HT1080 细胞、Te671 细胞、CEM 细胞、NSO 细胞和 PerC6 细胞。

目前的逆转录病毒/慢病毒载体的制备方法一般为在哺乳动物宿主细胞内 ,通常是来源于鼠或人的细胞内，分别转入 gag 基因、pol 基因、rev 基因 (用于慢病毒载体)、包膜糖蛋白基因，以及携带目的核酸片段的病毒基因组转录盒（包含转录包装进逆转录病毒/慢病毒的 RNA 基因组的启动子;逆转录病毒/慢病毒基因组包装及转染所需的各种顺式作用序列，如 5'LTR、PBS、ψ 包装信号、cppt(用于慢病毒载体)、RRE(用于慢病毒载体)、ppt 和 3'LTR 序列等；待转导的目的核酸片段，3'端的聚腺苷酸信号等）。这可以通过将含上述基因的构建体比如质粒，瞬时转染到上述宿主细胞中并且继之以 24-72 小时的病毒载体生产和收获实现(瞬时生产)，也可以通过在上述宿主细胞基因组中稳定整合上述基因形成稳定生产细胞系(producer cell line)以进行持续生产来实现(稳定生产)。

瞬时生产利用转染质粒方法来引入病毒基因构建体，所述方法使用可以与带负电的 DNA 形成复合物的阳离子试剂，从而允许其经由内吞作用被细胞摄入。聚乙烯亚胺(PEI)是最被广为使用且效率最高的阳离子试剂之一，目前在临床以及工业上大都利用 PEI 转染法来引入上述构建体，但其在工艺放大后存在工艺不稳定、产毒滴度低等主要问题。也可以使用其他方法，如磷酸钙沉淀、阳离子脂质体络合和非脂质体转染试剂，比如 Lipofectamine 和 FuGENE®。然而，这些方法仅可用于小规模生产或仅用于研究目的，因为其要么难以放大规模要么太过昂贵。备选地，病毒感染也已被开发和验证用于逆转录病毒/慢病毒载体生产，其使用杆状病毒或腺病毒来引入慢病毒基因构建体。然而，此种方法需要在下游额外地对逆转录病毒/慢病毒载体和杆状病毒或腺病毒进行分离以符合临床级的病毒生产标准 ,并且相比于质粒 DNA 转染法 ,使用杆状病毒或腺病毒来制备逆转录病毒/慢病毒载体的工艺复杂而最终转染滴度不高。

备选地，连续流电穿孔技术也已经被开发用于大体积细胞转染，原理上也可以被用于逆转录病毒/慢病毒的瞬时转染生产，但此技术依然受限于工艺放大能力以及昂贵的设备和耗材。

构建逆转录病毒/慢病毒稳定生产细胞系依赖于将病毒基因构建体分别整合到细胞基因组中以允许其进行组成型表达或被调控表达。通常，首先将 gag、pol、rev(用于慢病毒载体)和 env 基因同时或顺序转入细胞并通过相应的抗性筛选和克隆选择，筛选上述基因都稳定插入基因组并能共同高表达的细胞，从而建立包装细胞系(packaging cell line)。之后，引入携带目的核酸片段的病毒基因组转录盒以构建携带目的核酸片段的病毒载体生产细胞系。如果使用逆转录后可以复制的非-SIN(self-inactivating)载体，这可以直接通过病毒感染来实现；否则，需要通过质粒化学转染并继之抗性筛选和克隆选择以获得在上述包装细胞基因组中稳定整合携带目的核酸片段的病毒基因组转录盒的生产细胞系。一种非常有效的方法是首先将含(可选择)标记基因的慢病毒基因组转录盒插入原始细胞中，并通过标记基因筛选稳定整合和高水平长效表达病毒载体的生产细胞系，之后再通过位点特异性重组酶(site-specific recombiase)，比如 FLP-FRT 或 Cre-lox 重组酶系统用目的核酸片段替换构建上述生产细胞系的标记基因来快速构建稳定生产携带目的核酸片段的病毒载体的生产细胞系。这种方法被证明允许建立高滴度的人源逆转录病毒载体生产细胞系(Schucht, R., et al. (2006). "A new generation of retroviral producer cells: predictable and stable virus production by Flp-mediated site-specific integration of retroviral vectors." Mol Ther **14**(2): 285-292.; Loew, R., et al. (2010). "A new PG13-based packaging cell line for stable production of clinical-grade self-inactivating gamma-retroviral vectors using targeted integration." Gene Ther **17**(2): 272-280.)。此外，利用类似原理可以开发目的核酸片段和/或外包膜蛋白快速替换的病毒载体包装细胞系或生产细胞系平台。稳定的逆转录病毒/慢病毒载体生产细胞系开发是一项耗时耗力的复杂系统工程，其需要一年或更长的时间来完全开发和表征细胞系平台，并且由于工作的复杂度，很多已经发表的工作因为产毒滴度、细胞系稳定性、培养适应等问题最终无法达到产业需求。但作为补偿，一旦研发成功获取稳定病毒生产细胞系，在临床和产业应用领域，稳定生产细胞系在工艺可靠性、工艺放大能力、生产成本和病毒产品安全性等方面，相较瞬时转染生产工艺具有不可替代的优势。首先，稳定生产细胞系生产工艺更加稳定，能提供完全表征的生产平台，以低的批次间差异生产更安全的病毒载体；其次，这种工艺更容易放大，不会像瞬时生产系统那样随着培养体积增大导致生产滴度快速下降；此外由于无需 DNA 质粒和转染试剂等原辅料，无需额外建立生产质粒的 GMP 生产线；最后，拥有更高的单位产量和更为简单的生产工艺质量控制。在扩大生产规模时，基于稳定生产细胞系的生产工艺在研发、生产、管理、运维和成本等方面会进一步凸显优势。这些优势对于促进基因治疗和细胞治疗领域的技术和药物产业化都是有益的。

利用稳定生产细胞系生产逆转录病毒载体在科研和临床实验领域已达十多年。然而稳定的慢病毒载体包装细胞系和生产细胞系的建立仍然是有挑战性的，原因在于多种 HIV-1 编码的蛋白质包括 rev、tat、nef、env、vpr 和 PR 蛋白酶具有细胞毒性能够导致细胞死亡，其中 rev 和 PR 蛋白酶在目前的包装系统

中仍然是必需的，而慢病毒系统常用的假型外包膜蛋白 VSV-G 也具有很强的细胞毒性。在实验室级别，通过质粒转染的瞬时生产是避免细胞毒性蛋白影响病毒制备的常用解决方法。但在开发慢病毒稳定生产细胞系时，上述有细胞毒性的蛋白的表达必须受到严格的控制比如使用诱导表达系统控制，否则所有高表达的细胞株都会死亡难以形成稳定生产细胞系。

目前能够在生产中获得的纯化前细胞原液中的逆转录病毒/慢病毒载体滴度为 10^6 至 10^7 感染颗粒/mL 培养基。然而，在临床试验中治疗一名患者所需的载体的平均用量在 10^{10} 感染颗粒每患者这个级别。此外，病毒制备通常表征为低的感染颗粒/物理颗粒比(小于 1:100)；同时这些病毒载体是非常敏感的，在 37℃细胞培养上清中会快速地失去其感染性，半衰期约 8-12 小时，这进一步增加了对病毒产能的需求。据估计基于现有瞬转平台，每位患者需要约 10-100 L 培养体积生产的病毒载体，而现有生产技术无论在滴度上还是在工艺放大上都难以再有本质的提高。因此，目前的逆转录病毒/慢病毒载体生产系统的表现是远低于治疗需求的，构建更高产的稳定生产细胞系并解决大规模生产工艺是解决产能问题的关键。

然而，构建逆转录病毒/慢病毒载体稳定生产细胞系具有相当大的技术难度。已有的稳定生产细胞系构建方法因为基因稳定插入效率低，通常需要引入大量的抗性基因进行同步或分步筛选，筛选过程很多在含血清贴壁培养条件下进行，筛选后细胞系不一定能适应无血清培养基悬浮培养条件，不符合国际上生物制药的技术发展趋势和安全性要求。并且在生产细胞系构建时，因为对各个逆转录/慢病毒包装基因的调控表达优化不足，使得最终稳定细胞系或者产毒滴度不高或者有高泄漏(leak)表达，而高泄露表达会导致生产细胞系不稳定且在细胞培养扩增时因包装基因泄露表达的细胞毒性影响细胞生长质量，难以达到工艺放大要求。

因此，本领域中目前迫切地需要一种高效的构建稳定的逆转录病毒和慢病毒载体生产细胞系的方法以及基于此方法构建的病毒包装/生产细胞系。

技术问题

本公开通过睡美人(Sleeping Beauty，SB)转座子系统结合 PiggyBac (PB)转座子系统将病毒包装所需的 gag、pol、rev(用于慢病毒载体)、env 基因和携带目的核酸片段的病毒基因组转录盒稳定插入到宿主细胞(例如 293T 细胞)的基因组中并结合诱导表达系统(例如，Tet-On 系统和/或 Cumate 系统)开发出可诱导调控的病毒生产系统，解决了上述问题。

技术解决方案

在使用逆转录病毒/慢病毒载体进行转导操作时，需要将目的核酸片段装载到包装进逆转录病毒/慢病毒的 RNA 基因组里。术语“目的核酸片段”一般根据应用目的可以是指基因，如编码蛋白的核酸序列；可以是有功能的核糖核酸(RNA)，如小分子干扰核糖核酸（small interfering RNA，简称 siRNA）、长链非编码核糖核酸（long non-doding RNAs，简称 LncRNA），CRISPR 基因编辑系统的导向 RNA（guide RNA，

gRNA）、转运核糖核酸（transfer RNA，简称 tRNA）、核糖体核糖核酸(Ribosomal RNA，简称 rRNA)或其他功能性核糖核酸的编码序列；可以是其它有功能核酸序列，如同源重组序列、能和蛋白结合的 DNA 或 RNA 序列、能和其它核酸片段(如引物或探针)结合的 DNA 或 RNA 序列；可以为任意一段来在自然界的核酸序列或人造核酸序列；也可以是以上一段或多段核酸序列的组合; 目的核酸片段还可以包含调控基因表达的核酸序列如启动子、增强子、隔离子、聚腺苷酸信号等序列。逆转录病毒/或慢病毒的 RNA 基因组指在构建逆转录病毒/慢病毒载体时，能包装进病毒内的核糖核酸片段，一般包含病毒包装和转导的必要序列如 ψ 包装信号、长末端重复序列(long terminal repeat，LTR)。在慢病毒 RNA 基因组中，一般还包含全部 5'端非翻译区域，300bp 左右的 5'端 gag 基因，中心多嘌呤束(cppt)片段，另外还带有 rev 应答元件（RRE）片段；缺少一段或多段以上片段可能会严重影响慢病毒的包装或转导效率。在制备逆转录病毒/慢病毒载体时，携带目的核酸片段的病毒基因组 RNA 片段一般通过构造携带目的核酸片段的病毒基因组转录盒（transcripiontal cassette）来实现，转录盒包含有启动子功能的核酸序列（可以是逆转录病毒/慢病毒自身 LTR 序列或其它异源启动子），病毒 RNA 基因组对应的 DNA 序列，通常还有调控转录终止的聚腺苷酸信号序列。在制备逆转录病毒/慢病毒载体时，载有携带目的核酸片段的病毒基因组转录盒的构建体（比如将转录盒构建到转移载体质粒中）在被递送到宿主细胞后，通过宿主细胞的转录分子机制，转录成对应的能包装进病毒载体的携带目的核酸片段的病毒基因组 RNA 片段。

在本公开中，逆转录病毒包括，但不限于慢病毒，例如鼠白血病病毒(MLV)、人免疫缺陷病毒(HIV)、马传染性贫血病毒(EIAV)、小鼠乳房肿瘤病毒(MMTV)、Rous 肉瘤病毒(RSV)、Fujinami 肉瘤病毒(FuSV)、Moloney 鼠白血病病毒(Mo-MLV)、FBR 鼠骨肉瘤病毒(FBR MSV)、Moloney 鼠肉瘤病毒(Mo-MSV)、Abelson 鼠白血病病毒(A-MLV)、禽髓细胞瘤病病毒-29 (MC29)、和禽脑脊髓炎病毒(AEV)、猿免疫缺陷病毒(Simian immunodeficiency virus, SIV)、猫免疫缺陷病毒(Feline immunodeficiency virus, FIV)、牛免疫缺陷病毒(Bovine immunodeficiency virus, BIV)、山羊关节炎-脑炎病毒(Caprine arthritis-encephalitis virus，CAEV)、长臂猿猿白血病病毒(Gibbon ape leukemia virus)、猫白血病病毒(Feline leukemia virus)、两性逆转录病毒(Amphotropic retrovirus)、嗜性逆转录病毒(Ecotropic retrovirus)、狒狒猿白血病病毒(Baboon ape leukemia virus)以及所有其他逆转录病毒科（*Retroviridae*）病毒。

转座子(transposon)是指可改变其在基因组内的位置的 DNA 序列。转座子可产生或逆转突变并改变细胞基因组的大小。DNA 转座子在表达的转座酶（transpotase）作用下，可以以简单的剪切-粘贴的方式从一个 DNA 位点易位到另一个位点。转座是一个精确的过程，其中将限定的 DNA 片段，通常是转座子两端的直接重复序列(direct repeat，简称 DR)和与它们相连的反向重复序列(invert repeat, 简称 IR)以及中间的插入序列(insert sequence, 简称 IS)，从一个 DNA 分子中切出并移动到相同或不同 DNA 分子或基因组中的另一个位点。

“睡美人(Sleeping Beauty，SB)转座子系统”由 SB 转座酶和转座子组成，其能够将特定的 DNA 插入序列插入脊椎动物的基因组中。SB 转座酶可将转座子插入受体 DNA 序列中的 TA 二核苷酸碱基对中。插入位点可位于同一个 DNA 分子(或染色体)的其它位置或者位于另一个 DNA 分子(或染色体)中。在哺乳动物(包括人)基因组中，大约有 2 亿个 TA 位点。TA 插入位点在转座子整合过程中复制。TA 序列的这种复制是转座的标志并被用于在一些实验中确定机制。SB 转座子由目的插入序列及位于其两端的用于被 SB 转座酶识别的 IR/DR 序列(本身含有短的直接重复(direct repeats，DR)的反向重复(inverted repeats，IR)，例如，如 SEQ ID NO: 23 或其互补序列所示)组成。转座酶可在转座子内进行编码，或者转座酶可由另一个来源提供。SB 转座子系统中的转座酶、IR/DR 序列和转座子的野生型和不同变体在本领域中是已知的。已经公开的含睡美人转座子的质粒包括：pT/HB (Addgene，#26555)，pT2/HB (Addgene，#26557)， pT3 (Yant, S. R., et al. (2004). "Mutational analysis of the N-terminal DNA-binding domain of sleeping beauty transposase: critical residues for DNA binding and hyperactivity in mammalian cells." Mol Cell Biol **24**(20): 9239-9247.)等。SB 转座酶的变体包括但不限于，SB10，SB11，SB100X(编码序列如 SEQ ID NO:30 所示)等(参见，例如，WO9840510A1、WO2003089618A2、WO2009003671A2、WO2017046259A1、WO2017158029A1 等，上述文献通过引用结合与此)。在本文中，术语“睡美人(SB)转座子系统”可以包括含有 SB 转座酶的野生型和不同变体以及 SB 转座子的野生型和不同变体的 SB 转座子系统。

来源于粉纹夜蛾(Trichoplusia ni)的“PiggyBac (PB)转座子系统”由 PB 转座酶和转座子组成，其能够通过剪切-粘贴机制在载体和染色体之间进行有效转座。在转座过程中，PB 转座酶识别位于转座子载体两端的转座子特异性反向末端反向重复序列(Inverted terminal repeart，简称 ITR，3’ITR 例如 SEQ ID NO: 24 或其互补序列所示序列，5’ITR 例如 SEQ ID NO: 25 或其互补序列所示序列)，并且有效地移动来自原始位点的，在 5’ITR 和 3’ITR 之间的插入序列并有效地将其整合至染色体 TTAA 位点中。PiggyBac 转座子系统的强大活性使得 PB 转座子载体中两个 ITR 之间的目的插入序列很容易地被移动到靶基因组中。PB 转座子系统中的转座酶和转座子的野生型和不同变体(如 ePiggyBac，编码序列如 SEQ ID NO:31 所示)在本领域中是已知的。关于 PiggyBac 转座子系统的信息可以参见，例如专利文献 US6218185B1、US6551825B1、US7105343B1、US2002173634A1、US2010240133A1、WO2006122442、WO2010085699、WO2010099296、WO2010099301、WO2012074758、US8592211 等，以及非专利文献 Lacoste, A., et al. (2009). "An efficient and reversible transposable system for gene delivery and lineage-specific differentiation in human embryonic stem cells." Cell Stem Cell **5**(3): 332-342；Yusa, K., et al. (2011). "A hyperactive piggyBac transposase for mammalian applications." Proc Natl Acad Sci U S A **108**(4): 1531-1536 (上述文献通过引用结合与此)。在文中，术语“PiggyBac (PB)转座子系统”可以包括含有 PB 转座酶的野生型和不同变体以及 PB 转座子的野生型和不同变体的 PB 转座子系统。

在本公开中，通过诱导表达系统(Inducible expression system)来控制转入宿主细胞中的核酸构建体中的相关基因的转录和表达。在本公开中，可用的诱导表达系统的实例包括，但不限于，四环素诱导系统中的 Tet-Off 诱导表达系统(参见，例如，Gossen, M. and H. Bujard (1992). "Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(12): 5547-5551；Yu, H., et al. (1996). "Inducible human immunodeficiency virus type 1 packaging cell lines." J Virol **70**(7): 4530-4537；Kaul, M., et al. (1998). "Regulated lentiviral packaging cell line devoid of most viral cis-acting sequences." Virology **249**(1): 167-174 (上述文献通过引用结合与此))、四环素诱导系统中的 Tet-On 诱导表达系统(参见，例如，WO0075347A2、WO2007058527A2 (上述文献通过引用结合与此))、Cumate 系统(参见，例如，WO02088346A2、WO2006037215A1 (上述文献通过引用结合与此))、Cumate 诱导表达系统（参照：Mullick, A., et al. (2006). "The cumate gene-switch: a system for regulated expression in mammalian cells." BMC Biotechnol **6**: 43；WO02088346A2、WO2006037215A1 (上述文献通过引用结合与此)）或其组合。在一个方面，用于可诱导表达的诱导表达系统是 Tet-On 诱导表达系统或 Cumate 诱导表达系统。在另一个方面，用于可诱导表达的诱导表达系统是 Tet-On 诱导表达系统与 Cumate 诱导表达系统的组合。在 Tet-On 诱导表达系统中，四环素依赖的反式激活物(reverse tetracycline controlled transactivator，rtTA)仅在存在四环素或多西环素(Dox)等四环素衍生物的情况下才能够结合 Tet-On 诱导表达系统 TRE 响应元件(含有多拷贝连续 TetO 操作子序列和最小启动子序列的核酸序列，Tet Response Element，下文称为 TRE)以启动下游连接的被调控核酸片段的转录。目前常用的 Tet-On 诱导表达系统包括第二代 Tet-On 诱导表达系统(Tet-On Advanced，Clontech，其中的反式激活物 rtTA 和响应元件 TRE 在下文中分别称为 $rtTA_{adv}$（编码核酸序列：SEQ ID NO: 29）和 TRE_{adv}（SEQ ID NO: 21）和第三代 Tet-On 诱导表达系统(Tet-On 3G，Clontech，其中的反式激活物 rtTA 和响应元件 TRE 在下文中分别称为 $rtTA_{3G}$（编码核酸序列：SEQ ID NO: 28）和 TRE_{3G}（SEQ ID NO: 19）。第二代和第三代 Tet-On 诱导表达系统中的反式激活物 rtTA 和 TRE 可以组合使用，例如 $rtTA_{adv}$ 可以组合 TRE_{3G} 使用，$rtTA_{3G}$ 也可以组合 TRE_{adv} 使用。Cumate 诱导表达系统（Cumate Inducible System）开发自 Pseudomonas putida 的 p-cym 操纵子，由在启动子 TATA 盒下游连接的 CuO 操作子和 Cumate 及其衍生物依赖的能和 CuO 操作子结合的阻遏物 CymR 蛋白组成。在无 Cumate 的条件下，CymR 蛋白和 CuO 操作子结合，抑制下游连接的目的核酸序列的转录表达；当 CymR 蛋白和 Cumate 结合后，其和 CuO 操作子的亲和力下降并分离不再抑制下游连接的目的核酸序列的转录表达。在本公开中，在将 Tet-On 诱导表达系统与 Cumate 诱导表达系统组合使用的情况下，构建了包含多拷贝连续 TetO 操作子序列、含有 TATA 盒的最小启动子序列以及 CuO 操作子序列的复合响应元件序列。其中，基于第二代 Tet-On 诱导表达系统中 TRE_{adv} 序列中多拷贝连续 TetO 操作子序列设计了 $TRE_{adv}CuO$（SEQ ID NO: 22）复合响应元件；基于第三代 Tet-On 诱导表达系统中 TRE_{3G} 序列中多拷贝连续 TetO 操作子序列设计了 $TRE_{3G}CuO$ 复合响应元件（SEQ ID NO: 20）。在将 Tet-On 诱导表达系统与

Cumate 诱导表达系统组合使用的情况下，需要同时表达 Tet-On 诱导系统的反式激活物 rtTA 蛋白和 Cumate 诱导系统的阻遏物 CymR 蛋白，其中使用的 Tet-On 反式激活物可以是 $rtTA_{adv}$，也可以是 $rtTA_{3G}$。优选地，使用基于人编码密码子优化的 $rtTA_{3G}$（SEQ ID NO: 28）和 CymR（SEQ ID NO: 27）序列。在一个方面，可用于本公开目的的诱导表达系统还可以包括金属离子诱导型、激素诱导型和温度诱导型诱导表达系统。

在本公开的一个方面中，gag 和 pol 基因(实施例中以 gag/pol 表示 gag 基因和 pol 基因位于同一构建体，且通过移码（frameshift）方式翻译表达)、rev 基因、病毒包膜蛋白(例如 VSV-G)的编码序列和携带目的核酸片段的病毒基因组转录盒中的一种或多种的转录是受控的，所述受控的转录是通过将所述基因或序列置于诱导表达系统的控制下实现的，优选地，所述受控的转录是通过将所述基因或序列置于 Tet-On 和/或 Cumate 诱导表达系统的控制下实现的，更优选是在 Tet-On 和 Cumate 诱导表达的双重控制下或是在第三代 Tet-On 诱导表达系统的单独调控下。在本公开的一个方面中，gag 和 pol 基因、rev 基因、病毒包膜蛋白的编码序列和携带目的核酸片段的病毒基因组转录盒的转录全部都是受控的，所述受控的转录是通过将所述基因或序列置于诱导表达系统的控制下实现的，优选地，所述受控的转录是通过将所述基因或序列置于 Tet-On 和/或 Cumate 诱导表达系统的控制下实现的，更优选是在 Tet-On 和 Cumate 诱导表达系统的双重控制下或是在第三代 Tet-On 诱导表达系统的单独调控下。在本公开的一个方面中，gag 和 pol 基因、rev 基因、病毒包膜蛋白(VSV-G)的编码序列和携带目的核酸片段的病毒基因组转录盒中的 rev 基因和病毒包膜蛋白(VSV-G)的编码序列的转录是受控的，所述受控的转录是通过将所述基因或序列置于诱导表达系统的控制下实现的，优选地，所述受控的转录是通过将所述基因或序列置于 Tet-On 和/或 Cumate 诱导表达系统的控制下实现的，更优选是在 Tet-On 和 Cumate 诱导表达的双重控制下或是在第三代 Tet-On 诱导表达系统的单独调控下。

被调控核酸片段在诱导条件下的表达量和非诱导条件下的泄露表达量是评价诱导表达系统优劣的两个重要指标，好的诱导表达系统需要具有更高的诱导表达量和更低的泄露表达量。本发明人发现，单独的 Tet-On 诱导表达系统或 Tet-On 和 Cumate 复合诱导表达系统的诱导表达量和泄露表达量受(1)TRE 响应元件中最小启动子序列；(2)rtTA 反式激活物的突变体的选择；(3)诱导系统响应元件 3'端和被调控的目的核酸序列 5'端之间是否连接可剪切的内含子序列影响。本公开共设计和使用 TRE_{adv}、TRE_{3G}、$TRE_{adv}CuO$ 和 $TRE_{3G}CuO$ 四种响应元件，以及 $rtTA_{adv}$ 和 $rtTA_{3G}$ 两种反式激活物。第三代 TRE_{3G} 响应元件比第二代 TRE_{adv} 响应元件控制更严格，被调控核酸片段有更低的泄露表达量，但诱导表达量低于 TRE_{adv}。本公开设计的 Tet-On 和 Cumate 复合诱导表达系统响应元件 $TRE_{adv}CuO$（SEQ ID NO: 22）和 $TRE_{3G}CuO$（SEQ ID NO: 20）比任意单 Tet-On 诱导系统响应元件控制更严格，显著降低了被调控核酸片段的泄露表达量，但同时也会显著降低被调控核酸片段的诱导表达量。反式激活物 $rtTA_{3G}$ 和 $rtTA_{adv}$ 相比，在诱导条件下，有相似的转录激活活性；在无诱导条件下，$rtTA_{3G}$ 的基础泄露转录激活活性更低。

在表达质粒中启动子 3’端连接的内含子一般可以提高转录信使 RNA（mRNA）的稳定性并提高 mRNA 的转运出细胞核的效率（参照 Akef, A., et al. (2015). "Splicing promotes the nuclear export of beta-globin mRNA by overcoming nuclear retention elements." RNA **21**(11): 1908-1920）并提高被调控核酸片段的表达量。本发明人发现，在单一诱导表达系统中的响应元件 3’端和被调控核酸片段 5’端之间连接可剪切的内含子能提高被调控核酸片段的诱导表达量，但同时也会显著增加被调控核酸片段的泄露表达量。在本公开的 Tet-On 和 Cumate 复合诱导系统中，在响应元件 3’端和被调控核酸片段 5’端之间插入可剪切的内含子序列可以在不显著增加无诱导条件下泄露表达量的同时显著提高在诱导条件下的诱导表达量。

在构建慢病毒生产细胞系时，需要平衡 rev 基因、VSV-G 基因、gag 和 pol 基因以及携带目的核酸片段的病毒基因组转录盒的表达量、表达量的相对比例、表达的蛋白或转录的核酸的细胞毒性以及表达或转录的先后顺序，因此需要对每一个基因和携带目的核酸片段的病毒基因组转录盒的启动子或诱导表达系统响应元件进行优化。在需要表达的慢病毒 rev 基因、VSV-G 基因、gag 和 pol 基因以及携带目的核酸片段的病毒基因组转录盒中，rev 和膜蛋白 VSV-G 有明显细胞毒性，并且 rev 还调控通常含有 RRE 序列的 gag 和 pol 基因的表达，所以需要用诱导表达系统严格控制。Gag 和 pol 基因的表达在 rev 受控的条件下并非必须严格调控，但用诱导表达系统控制 gag 和 pol 基因的表达可能进一步降低无诱导条件下泄露表达的病毒滴度，尤其是在单 Tet-On 诱导表达系统控制 rev 和 VSV-G 的表达情况下。基于此，本公开基于 4 种响应元件以及响应元件 3’端和被调控核酸片段 5’端之间是否连接有可剪接的内含子序列设计并测试了 8 种慢病毒基因表达的调控序列 :TRE_{adv} (诱导系统响应元件为 TRE_{adv} 序列(SEQ ID NO: 21)，并且响应元件 3’端和被调控核酸片段 5’端之间不存在内含子)、TRE_{adv}CuO (诱导系统响应元件为 TRE_{adv}CuO 序列(SEQ ID NO: 22)，并且响应元件 3’端和被调控核酸片段 5’端之间不存在内含子)、TRE_{3G} (诱导系统响应元件为 TRE_{3G} 序列(SEQ ID NO: 19)，并且响应元件 3’端和被调控核酸片段 5’端之间不存在内含子)、TRE_{3G}CuO (诱导系统响应元件为 TRE_{3G}CuO 序列(SEQ ID NO: 20)，并且响应元件 3’端和被调控核酸片段 5’端之间不存在内含子)、TRE_{adv}-内含子(诱导系统响应元件为 TRE_{adv} 序列，并且响应元件 3’端和被调控核酸片段 5’端之间连接可剪切的内含子)、TRE_{adv}CuO-内含子(诱导系统响应元件为 TRE_{adv}CuO 序列，并且响应元件 3’端和被调控核酸片段 5’端之间连接可剪切的内含子)、TRE_{3G}-内含子(诱导系统响应元件为 TRE_{3G} 序列，并且响应元件 3’端和被调控核酸片段 5’端之间连接可剪切的内含子)和 TRE_{3G}CuO-内含子(诱导系统响应元件为 TRE_{3G}CuO 序列，并且响应元件 3’端和被调控核酸片段 5’端之间连接可剪切的内含子)，并以此优化了调控慢病毒各个基因表达的最优组合。在本公开中，在响应元件 3’端和受响应元件控制的被调控核酸片段 5’端之间的内含子可以与所述响应元件和所述受响应元件控制的被调控核酸片段直接相连，也可以不直接相连，这是可以由本领域技术人员根据本公开的内容并且根据需要调整的，并且在不直接相连的情况下，本领域技术人员可以理解，响应元件和受响应元件控制的被调控核酸片段之间的距离不应影响响应元件对被调控核酸片段的转录的控制。在本公开的一个方

面，在单 Tet-On 诱导调控系统的情况下，rev 的调控序列优选为 TRE_{3G}；VSV-G 的调控序列优选为 TRE_{3G}-内含子；gag 和 pol 的调控序列优选为 CMV 启动子(或其他本领域中常用的真核启动子)-内含子或 TRE_{3G}-内含子，并且更优选为 TRE_{3G}-内含子；rtTA 反式激活物优选 $rtTA_{3G}$。在此条件下，瞬时转染上述相关质粒可以达到 6.94E+05 RLU 和 176 倍诱导/泄露产毒滴度比值，相较第二代 Tet-On 系统（4.64E+05 RLU，7 倍诱导/泄露产毒滴度比值）在产毒滴度上提高了 49.6%，在控制病毒泄露表达上提高了 25 倍。在本公开的一个方面，在 Tet-On 和 Cumate 复合诱导调控系统的情况下，rev 的调控序列优选为 $TRE_{adv}CuO$、$TRE_{adv}CuO$-内含子、TRE_{3G}、$TRE_{3G}CuO$、和 $TRE_{3G}CuO$-内含子，更优选 TRE_{3G}、$TRE_{3G}CuO$ 和 $TRE_{3G}CuO$-内含子，再进一步优选 TRE_{3G}；VSV-G 的调控序列优选 $TRE_{adv}CuO$、$TRE_{adv}CuO$-内含子、TRE_{3G}-内含子和 $TRE_{3G}CuO$-内含子，更优选 $TRE_{adv}CuO$-内含子、TRE_{3G}-内含子和 $TRE_{3G}CuO$-内含子，再进一步优选 $TRE_{3G}CuO$-内含子；gag 和 pol 的调控序列优选带有内含子的调控序列，包括 CMV 启动子(或其他本领域中常用的真核启动子)-内含子、TRE_{adv}-内含子、$TRE_{adv}CuO$-内含子、TRE_{3G}-内含子和 $TRE_{3G}CuO$-内含子，更优选 $TRE_{3G}CuO$-内含子；rtTA 反式激活物优选 $rtTA_{3G}$。在此条件下，瞬时转染上述相关质粒可以达到 1.46E+06 RLU 和 12032 倍诱导/泄露产毒滴度比值；相较第二代 Tet-On 系统（4.64E+05 RLU，7 倍诱导/泄露产毒滴度比值）在产毒滴度上提高了 214.7%，在控制病毒泄露表达上提高了 1719 倍。

上述在响应元件 3'端和被调控核酸片段 5'端之间连接的可剪接的内含子序列的选择并无特定限制，本领域技术人员可以理解，凡是在哺乳动物细胞中能进行 RNA 剪接（Splicing）的序列都能实现上述功能。可以选择的内含子序列包括但不限于常用的克隆载体上的内含子如：兔 β-球蛋白内含子、源自人 β-球蛋白和免疫球蛋白重链内含子的杂合内含子、EF-1α 内含子 A、SV40 内含子、源自腺病毒和免疫球蛋白重链内含子的杂合内含子、修饰的人巨细胞病毒内含子、源自鸡 β-肌动蛋白(CBA)和小鼠微小病毒(MMV)内含子的杂合内含子、源自鸡 β-肌动蛋白和兔 β-球蛋白内含子的嵌合物和 mP1 内含子；也可以是任意真核生物任意基因的任意内含子；或者是基于内含子剪接规则设计的人造内含子序列。本公开实施例使用的内含子序列可以例如是如 SEQ ID NO: 26 所示的人β -球蛋白内含子序列(BGI 序列)。

在本公开中，利用转座子系统将 gag 和 pol 基因、rev 基因、病毒包膜蛋白(VSV-G)的编码序列和携带目的核酸片段的病毒基因组转录盒稳定整合进宿主细胞基因组中。在本公开的一个方面，当将 gag 和 pol 基因、rev 基因、病毒包膜蛋白(VSV-G)的编码序列和/或携带目的核酸片段的病毒基因组转录盒的一种或多种置于 Tet-On 和/或 Cumate 诱导表达系统的控制下时，利用转座子系统将 gag 和 pol 基因、rev 基因、病毒包膜蛋白(VSV-G)的编码序列和携带目的核酸片段的病毒基因组转录盒以及 Tet-On 反式激活物 rtTA 蛋白的编码序列和/或 Cumate 操纵子的阻遏物 CymR 蛋白的编码序列整合进宿主细胞基因组中。在本公开的一个方面，利用 SB 转座子系统或 PB 转座子系统将 gag 和 pol 基因、rev 基因、病毒包膜蛋白(VSV-G)的编码序列、携带目的核酸片段的病毒基因组转录盒以及诱导表达系统激活物或阻遏物蛋白编码序列(例如，Tet-On 反式激活物蛋白的编码序列和/或 Cumate 操纵子的阻遏物蛋白 CymR 的编码序

列)一次性整合进宿主细胞基因组中，直接构建制备慢病毒的生产细胞系。在本公开的一个方面，利用SB 转座子系统和 PB 转座子系统分别将上述基因和序列转入宿主细胞中。在本公开的一个优选方面，将gag 和 pol 基因、rev 基因、病毒包膜蛋白(VSV-G)的编码序列和携带目的核酸片段的病毒基因组转录盒(以及，在使用 Tet-On 和/或 Cumate 诱导表达系统的情况下，Tet-On 反式激活物蛋白的编码序列和/或 Cumate 操纵子的阻遏物 CymR 蛋白的编码序列)分两次整合进宿主细胞基因组中。第一次使用 SB 转座子系统或 PB 转座子系统中的任一种转座子系统将 gag 和 pol 基因、rev 基因、病毒包膜蛋白(VSV-G)的编码序列和携带目的核酸片段的病毒基因组转录盒(以及，在使用 Tet-On 和/或 Cumate 诱导表达系统的情况下，Tet-On 反式激活物蛋白的编码序列和/或 Cumate 操纵子的阻遏物 CymR 蛋白的编码序列)中的一种或多种整合进宿主细胞基因组中构建包装细胞系，第二次使用 SB 转座子系统或 PB 转座子系统中的另一种未使用的转座子系统将 gag 和 pol 基因、rev 基因、病毒包膜蛋白(VSV-G)的编码序列和携带目的核酸片段的病毒基因组转录盒(以及，在使用 Tet-On 和/或 Cumate 诱导表达系统的情况下，Tet-On 反式激活物蛋白的编码序列和/或 Cumate 操纵子的阻遏物 CymR 蛋白的编码序列)中剩余的一种或多种整合进上述包装细胞系基因组中进而构建生产细胞系。在本公开一个优选的方面，首先使用 SB 转座子系统或 PB 转座子系统中的任一种转座子系统将 gag 和 pol 基因、rev 基因和病毒包膜蛋白(VSV-G)的编码序列(优选地，以及诱导表达系统激活物和/或阻遏物蛋白编码序列，例如，在使用 Tet-On 和/或 Cumate 诱导表达系统的情况下，Tet-On 反式激活物蛋白的编码序列和/或 Cumate 操纵子的阻遏物 CymR 蛋白的编码序列)整合进宿主细胞基因组中构建包装细胞系，然后使用 SB 转座子系统或 PB 转座子系统中的另一种未使用的转座子系统再将携带目的核酸片段的病毒基因组转录盒整合进已经在基因组中整合了 gag 和 pol 基因、rev 基因和病毒包膜蛋白(VSV-G)的编码序列(优选地，以及诱导表达系统激活物和/或阻遏物蛋白编码序列，例如，在使用 Tet-On 和/或 Cumate 诱导表达系统的情况下，Tet-On 反式激活物蛋白的编码序列和/或 Cumate 操纵子的阻遏物 CymR 蛋白的编码序列)的包装细胞系基因组中进而构建生产细胞系。在此种情况下，可以仅通过向已经构建好的基因组整合有 gag 和 pol 基因、rev 基因和病毒包膜蛋白(VSV-G)的编码序列(优选地，以及诱导表达系统激活物和/或阻遏物蛋白编码序列)的稳定的包装细胞转入单一的携带目的核酸片段的病毒基因组转录盒的构建体并进行简单的筛选在基因组中稳定整合上述构建体的细胞克隆就可以构建得到可以用于制备携带目的核酸片段的慢病毒载体的慢病毒载体生产细胞系。本发明人发现，如果仅使用同一种转座子系统(仅使用 SB 系统或仅使用 PB 系统)将全部上述基因和序列依次整合进宿主细胞基因组中，则在转入后一种或多种基因或序列时，转座酶可能对已转入宿主细胞中并整合在宿主基因组中的前一种或多种基因或序列起作用，从而导致所述前一种或多种基因或序列被从宿主基因组上剪切下来，从而降低制备包含全部基因和序列的包装/生产细胞系的生产效率。本发明的发明人发现在两次将一种或多种基因或序列整合进宿主细胞基因组时使用不同的转座子系统可以有效地避免上述不利作用的发生。因此，在本公开中，所述两次将一种或多种基因或序列整合进宿主细胞基因组过

程中使用不同的转座子系统，即例如，首先使用 SB 系统将上述一种或多种基因或序列整合进宿主细胞基因组中，然后使用 PB 系统将剩余的一种或多种基因或序列整合进宿主细胞基因组中，或首先使用 PB 系统将上述一种或多种基因或序列整合进宿主细胞基因组中，然后使用 SB 系统将剩余的一种或多种基因或序列整合进宿主细胞基因组中。在本公开一个优选的方面，首先使用 SB 系统将 gag 和 pol 基因、rev 基因和病毒包膜蛋白(VSV-G)的编码序列(优选地，以及诱导表达系统激活物和/或阻遏物蛋白编码序列，例如，在使用 Tet-On 和/或 Cumate 诱导表达系统的情况下，Tet-On 反式激活物蛋白的编码序列和/或 Cumate 操纵子的阻遏物 CymR 蛋白的编码序列)整合进宿主细胞基因组中构建包装细胞，然后再使用 PB 系统将携带目的核酸片段的病毒基因组转录盒整合进已经在基因组中稳定整合有 gag 和 pol 基因、rev 基因和病毒包膜蛋白(VSV-G)的编码序列(优选地，以及诱导表达系统激活物和/或阻遏物蛋白编码序列，例如，在使用 Tet-On 和/或 Cumate 诱导表达系统的情况下，Tet-On 反式激活物蛋白的编码序列和/或 Cumate 操纵子的阻遏物 CymR 蛋白的编码序列)的包装细胞的基因组中进而构建生产细胞。

区别于传统的转染筛选法构建稳定转染细胞系，PB 和 SB 转座子系统均具有主动将插入序列片段整合到宿主细胞基因组中的功能。通过优化，单次瞬时转染在无抗性筛选条件下细胞群中平均成功稳定整合效率可达 40%以上，可以在一次转染操作中获得在细胞基因组中稳定整合 20 个拷贝以上插入序列片段的细胞克隆，并且在一次操作中便可将多种不同大小、序列不同的插入序列片段多拷贝的整合进细胞的基因组中。在另一方面，使用 PB 和 SB 转座子系统将插入序列片段整合进宿主细胞基因组的效率和在细胞内引入各转座子构建体时的总转座子构建体和转座酶构建体的摩尔比例，转座子构建体的引入量和转座子中插入序列片段的长短有关。一般情况下转座子的构建体可以是 DNA 质粒、微环 DNA (minicircle DNA)、线性 DNA 片段或病毒载体；转座酶的构建体可以是 DNA 质粒、微环 DNA (minicircle DNA)、线性 DNA 片段、病毒载体、RNA 或蛋白。在转座子和转座酶使用 DNA 质粒做为构建体时，提高转座子/转座酶质粒在瞬时转染时的摩尔比例至 5:1 或以上可以显著提高插入序列片段在细胞基因组中的稳定整合效率。另外转座子在细胞基因组中的整合效率随着插入序列片段增长而降低，两者存在较为稳定的线性关系，在细胞基因组中同时整合多种插入序列片段的操作中可以根据转座子插入序列片段的长短调整各转座子构建体的加入量和相对摩尔比例来控制最后各插入序列片段整合进细胞基因组中的拷贝数和摩尔比例。在本公开的一个方面，优选地首先使用 SB 转座子系统将 gag 和 pol 基因、rev 基因和病毒包膜蛋白(VSV-G)的编码序列(优选地，以及诱导表达系统激活物和/或阻遏物蛋白编码序列，例如，在使用 Tet-On 和/或 Cumate 诱导表达系统的情况下，Tet-On 反式激活物蛋白的编码序列和/或 Cumate 操纵子的阻遏物 CymR 蛋白的编码序列)整合进宿主细胞基因组中。在构建过程中，通过瞬时转染含有上述基因和蛋白编码序列的转座子质粒和 SB 转座酶质粒，在总转座子质粒和 SB 转座酶质粒摩尔比 5:1 以上，更优选的在 10:1 至 40:1 的条件下构建上述包装细胞系。所构建的包装细胞系基因组中稳定整合至少一个拷贝的 gag 和 pol 基因、rev 基因和病毒包膜蛋白(VSV-G)的编码序列(优选地，以及至少一个拷

贝的诱导表达系统激活物和/或阻遏物蛋白编码序列，例如，在使用 Tet-On 和/或 Cumate 诱导表达系统的情况下，至少一个拷贝的 Tet-On 反式激活物蛋白的编码序列和/或至少一个拷贝的 Cumate 操纵子的阻遏物 CymR 蛋白的编码序列)，优选地调整 gag 和 pol 基因整合进宿主细胞基因组的拷贝数在 2 个拷贝数每细胞以上；gag 和 pol 基因序列和 VSV-G 蛋白编码序列整合进宿主细胞基因组的拷贝比例在 1:1 至 3:1 之间；更优选地调整 gag 和 pol 基因整合进宿主细胞基因组的拷贝数在 4 至 6 个拷贝数每细胞；gag 和 pol 基因序列和 VSV-G 蛋白编码序列整合进宿主细胞基因组的拷贝比例在 2:1 至 3:1 之间。在通过 SB 转座子系统构建上述包装细胞系后，再使用 PB 转座子系统将携带目的核酸片段的病毒基因组转录盒整合进上述包装细胞系的基因组中。在构建过程中，通过瞬时转染含有携带目的核酸片段的病毒基因组转录盒的转座子质粒和 PB 转座酶质粒，在转座子质粒和 PB 转座酶质粒摩尔比 5:1 以上，更优选的在 10:1 至 40:1 的条件下构建稳定慢病毒生产细胞系。所构建的生产细胞系基因组中稳定整合至少一个拷贝的携带目的核酸片段的病毒基因组转录盒。这种使用 PB 和 SB 双转座子系统构建生产细胞系的方式具有提高插入基因拷贝数，准确调整整合进宿主细胞基因组中各插入序列片段的摩尔比例，提高构建筛选最优高产生产细胞系成功率，减少细胞筛选步骤和筛选时间，减少抗性基因的使用数目等明显优势。

在本公开的一个方面中，gag 基因、pol 基因、rev 基因、病毒包膜蛋白(VSV-G)的编码序列、携带目的核酸片段的病毒基因组转录盒以及诱导表达系统激活物和/或阻遏物蛋白编码序列(例如，Tet-On 反式激活物 rtTA 蛋白的编码序列和/或 Cumate 操纵子的阻遏物 CymR 蛋白的编码序列)分别被构建在不同的转座子构建体上；在本公开的一个方面中，以上基因或序列片段的任意两种被构建在一个转座子构建体上；在本公开的一个方面中，以上基因或序列片段的任意三种被构建在一个转座子构建体上；在本公开的一个方面中，以上基因或序列片段的任意四种被构建在一个转座子构建体上；在本公开的一个方面中，以上基因或序列片段的任意 5 种被构建在一个转座子构建体上；在本公开的一个方面中，以上基因或序列片段的任意六种被构建在一个转座子构建体上；在本公开的一个方面中，以上基因或序列片段全部被构建在一个转座子构建体上。为降低生产细胞系产生具有复制能力的慢病毒(replication-competent lentivirus，简称 RCL)的可能性，并且为方便优化各病毒包装基因和序列片段整合在宿主细胞基因组中的拷贝数比例，优选地，将 gag 基因和 pol 基因构建在同一个转座子构建体上；将 rev 基因、病毒包膜蛋白(VSV-G)的编码序列和携带目的核酸片段的病毒基因组转录盒分别构建在三个独立转座子构建体上；在单独使用 Tet-On 诱导表达系统的情况下，将 Tet-On 反式激活物 rtTA 蛋白的编码序列构建在一个独立转座子构建体上；在使用 Tet-On 和 Cumate 复合诱导表达系统的情况下，Tet-On 反式激活物 rtTA 蛋白的编码序列和 Cumate 操纵子的阻遏物 CymR 蛋白的编码序列优选构建在同一个转座子构建体上。

在本公开中，分别携带 gag 和 pol 基因、rev 基因、病毒包膜蛋白(VSV-G)的编码序列和携带目的核酸片段的病毒基因组转录盒以及诱导表达系统激活物和/或阻遏物蛋白编码序列(例如，Tet-On 反式激活物 rtTA 蛋白的编码序列和/或 Cumate 操纵子的阻遏物 CymR 蛋白的编码序列)的构建体中的一种或多种

还携带有筛选基因序列。在本公开中，所述筛选基因序列是用于真核细胞的筛选基因序列。在本公开的一个方面，所述筛选基因可以例如选自选自：潮霉素抗性基因、嘌呤霉素抗性基因、新霉素抗性基因、杀稻瘟素抗性基因、博莱霉素抗性基因；或所述筛选基因是代谢通路筛选基因，例如选自编码二氢叶酸还原酶(Dihydrofolate reductase)、谷氨酰胺合成酶(Glutamine synthetase)、胸苷激酶(Thymidine kinase) 的核酸序列。在本公开的一个方面，所述筛选基因的表达可以通过启动子、内部核糖体进入位点(internal ribosome entry site，简称 IRES)或 P2A 自剪切多肽序列调控表达，优选地通过 SV40 启动子调控表达。在本公开的一个方面，在首先使用 SB 转座子系统将 gag 和 pol 基因、rev 基因和病毒包膜蛋白(例如 VSV-G)的编码序列(优选地，以及诱导表达系统激活物和/或阻遏物蛋白编码序列，例如，在使用 Tet-On 和/或 Cumate 诱导表达系统的情况下，Tet-On 反式激活物 rtTA 蛋白的编码序列和/或 Cumate 操纵子的阻遏物 CymR 蛋白的编码序列)整合进宿主细胞基因组构建包装细胞系的操作步骤中，所述构建体中的一种或多种可以携带不同的筛选基因序列，优选地，仅使用一种筛选基因序列，其可以位于以上任一种构建体上，例如其可以位于携带诱导表达系统激活物和/或阻遏物蛋白编码序列的构建体上(例如，在单独使用 Tet-On 诱导表达系统的情况下，Tet-On 反式激活物 rtTA 蛋白的编码序列的构建体中携带一种筛选基因序列(例如，潮霉素抗性基因(HygroR))；或在使用 Tet-On 和 Cumate 复合诱导表达系统的情况下，Tet-On 反式激活物 rtTA 蛋白的编码序列和 Cumate 操纵子的阻遏物 CymR 蛋白的编码序列所在的同一构建体中携带一种筛选基因序列(例如，潮霉素抗性基因(HygroR))。之后在使用 PB 转座子系统将携带目的核酸片段的病毒基因组转录盒稳定整合进上述包装细胞系基因组中构建生产细胞系的操作步骤中，所述携带目的核酸片段的病毒基因组转录盒的构建体优选地携带与之前不同的另一种抗性基因序列(例如，嘌呤霉素抗性基因 (PuroR))。在本公开的一个方面，病毒包膜蛋白(VSV-G)的编码序列的构建体上携带与上述两种不同的第三种抗性基因序列(例如，杀稻瘟菌素抗性基因(BSD))。在本公开的一个方面，在足够高通量单克隆细胞筛选的条件下，本公开所述各构建体中可以不含有任何筛选基因，仅通过单克隆细胞产毒能力筛选稳定高产包装/生产细胞系。

在本公开中，携带目的核酸片段的慢病毒基因组转录盒可以来自第二代慢病毒载体的转移载体质粒例如 pLVPRT-tTR-KRAB(Addgene，#11648)、pLenti CMVtight eGFP Puro (w771-1) (Addgene，#26431)或第三代慢病毒载体的转移载体质粒例如 pSLIK-Hygro (Addgene，#25737)、pHIV-EGFP (Addgene，#21373)、pSico(Addgene，#11578)、pRRLSIN.cPPT.PGK-GFP.WPRE(Addgene，#12252)、Tet-pLKO-puro (Addgene，#21915)、pLenti-puro (Addgene，#39481)、pLVUT-tTR-KRAB (Addgene，#11651)等。第三代慢病毒载体和第二代慢病毒载体的病毒基因组转录盒大多都共有 LTR、5'端非编码片段、HIV-1 Ψ包装信号、RRE、cPPT 和 gag 部分序列等在病毒包装和转导过程中起关键作用的核酸序列，第三代相比第二代慢病毒基因组转录盒主要区别是用组成型活性启动子如 CMV 或 RSV 替代 5'LTR 序列中起启动子功能的 U3 序列，并删除了 3'-LTR 序列的中 U3 序列，使慢病毒转移载体成为了 SIN (self-inactivating)

载体。在第三代慢病毒基因组转录盒中，pSLIK-Hygro、pHIV-EGFP 、pSico 载体使用 CMV 启动子转录慢病毒基因组 RNA，而 pRRLSIN.cPPT.PGK-GFP.WPRE、Tet-pLKO-puro、pLenti-puro 使用 RSV 启动子转录慢病毒基因组 RNA。Tet-pLKO-puro 和 pLenti-puro 与其它第三代慢病毒转移载体质粒相比，在慢病毒基因组转录盒中不含有 WPRE 序列。上述慢病毒转移载体质粒中的慢病毒基因组转录盒在原理上都适用本公开所描述的构建稳定慢病毒生产的细胞系方法。在本公开的一个方面，基于 pRRLSIN.cPPT.PGK-GFP.WPRE（Addgene，#12252）转移载体质粒中的核酸序列设计本公开所用慢病毒基因组转录盒的序列以及构建了含有此序列的质粒构建体。

本公开所述的逆转录病毒/慢病毒生产细胞系构建方法同样可以构建用于快速替换目的核酸序列和/或外包膜蛋白的病毒生产细胞系，包括但不限于使用位点特异性重组（site-specific recombination）策略构建的快速替换病毒生产细胞系。位点特异性重组也叫做保守的位点特异性重组（conservative site-specific recombination），是一种 DNA 链交换发生在至少一定程度的同源序列片段之间的基因重组。许多不同的基因组修饰策略，比如重组酶介导的表达盒交换（recombinase-mediated cassette exchange,简称 RMCE），都依赖于位点特意性重组，这是一种将转录盒或目的核酸片段靶向导入预定基因组特定位点的先进方法。位点特异性重组一般由位点特异性重组酶(site-specific recombiase,简称 SSR)和被其识别的，并发生同源性重组的特定位点序列组成。基于氨基酸序列同源性和重组酶催化机制的相关性，多数位点特异性重组酶可以分类为酪氨酸（Tyr）重组酶或丝氨酸（Ser）重组酶。常见的酪氨酸重组酶有 Cre 或 FLP ;常见的丝氨酸重组酶有 gamma-delta 和 Tn3 分解酶等经典成员以及新发现的 φC31-, Bxb1-, and R4 整合酶（integrase）。结合位点特异性重组酶并发生同源性重组的特定位点序列长度一般为 30 至 200 个碱基，由和位点特异性重组酶结合的两段部分反向重复对称序列以及被其包围的发生同源重组的中间序列组成。一般位点特异性重组发生在两段相同的特定位点序列，但也有例外（如在 λ 噬菌体整合酶系统的 attP 和 attB 位点）。Cre-lox 和 FLP-FRT 位点特异性重组系统是用于重组酶介导的表达盒交换的常用成熟系统。Cre-lox 系统由 Cre 重组酶和 Cre 识别的 loxp 序列组成 ;FLP-FRT 系统由 flippase 重组酶（FLP）和 FLP 识别的短反转酶识别位点序列（short flippase recognition target，简称 FRT）组成。这两种位点特异性重组系统基于其位点特异性重组酶识别位点序列的数目、方向、在同一或不同 DNA 分子以及识别位点的核酸突变设计策略，可以实现目标核酸序列片段的切除，插入、易位和反转。在设计重组酶介导的表达盒交换策略时，通常在要被替换的核酸序列(本身可以含有标记基因或连接标记基因(第一标记基因))的两端设有位点特异性重组酶识别序列(第一标记基因与被替换目的核酸序列都位于两段特异性重组酶识别位点序列之间)，并基于第一标记基因的特性筛选细胞系。待替换目的核酸序列(优选地连接有不同于第一标记基因的第二标记基因)一般被设置在载体上（比如质粒或病毒载体），其两端同样具有位点特异性重组酶识别序列(第二标记基因与待替换目的核酸序列都位于两段特异性重组酶识别位点序列之间)。当携带待替换目的核酸片段的载体和相对应的位点特异性重组酶表达载体（如携带编码位点特

异性重组酶的质粒、病毒载体、RNA 或位点重组酶蛋白）同时被递送到基于第一标记基因筛选的细胞系时，在位点特异性重组酶的催化下，原有的要被替换的核酸片段被带有第二标记基因的待替换目的核酸片段替换。在经过基于第二标记基因特性的筛选后，可以获取成功完成重组酶介导的表达盒交换的目的细胞系。使用类似策略可以构建用于快速替换目的核酸片段和/或外包膜蛋白的快速替换病毒生产细胞系。例如，先基于原有核酸片段（本身可以含有标记基因或连接标记基因（第一标记基因 A））和/或连接有标记基因（第一标记基因 B）的原有外包膜蛋白的编码序列根据本公开的方法构建快速替换病毒生产细胞系，所述原有核酸片段（本身可以含有标记基因或连接有标记基因）的两端设有位点特异性重组酶识别位点序列 ,和/或连接有标记基因的原有外包膜蛋白的编码序列的两端设有位点特异性重组酶识别位点序列。在快速替换目的核酸片段和/或外包膜蛋白的编码序列时，将包含两端具有特异性重组酶识别位点序列并且与标记基因（第二标记基因）相连的待替换的目的核酸片段和/或待替换的外包膜蛋白的编码序列(标记基因（第二标记基因 A）与待替换的目的核酸片段都位于两段特异性重组酶识别位点序列之间，和/或标记基因（第二标记基因 B）和待替换的外包膜蛋白的编码序列都位于两段特异性重组酶识别位点序列之间，与待替换序列连接的第二标记基因(A 和/或 B)和已经构建生产细胞系使用的第一标记基因(A 和/或 B)不同)的载体和相对应的位点特异性重组酶表达载体同时递送到上述快速替换病毒生产细胞系中，并基于与待替换的目的核酸片段和/或待替换的外包膜蛋白的编码序列连接的第二标记基因(A 和/或 B)筛选成功完成重组酶介导的表达盒交换的能生产含有新的目的核酸片段和/或新的外包膜蛋白的病毒生产细胞系。以上所述的标记基因例如是用于真核细胞的抗性基因序列，所述抗性基因序列例如选自：潮霉素抗性基因、嘌呤霉素抗性基因、新霉素抗性基因、杀稻瘟素抗性基因、博莱霉素抗性基因；或所述标记基因例如是代谢通路筛选基因，所述代谢通路筛选基因例如选自编码二氢叶酸还原酶(Dihydrofolate reductase)、谷氨酰胺合成酶(Glutamine synthetase)、胸苷激酶(Thymidine kinase) 的基因；或所述标记基因例如是荧光蛋白标记基因，所述荧光蛋白标记基因例如选自编码绿色荧光蛋白(EGFP)、红色荧光蛋白(dsRed)、樱桃色荧光蛋白(mcherry)、青色荧光蛋白(ECFP)、黄色荧光蛋白(EYFP)、以及荧光蛋白的其它突变衍生蛋白的基因序列；或所述标记基因例如是能够用于报告基因检测蛋白酶基因，所述能够用于报告基因检测蛋白酶基因例如选自编码萤光素酶(luciferase)、β-半乳糖苷酶(β-galactosidase)、氯霉素乙酰转移酶(chloramphenical acetyltransferase)的基因序列；或所述标记基因例如是以上各种标记基因的任意组合。

在本公开中，可用于构建逆转录病毒/慢病毒包装细胞系和生产细胞系的宿主细胞是哺乳动物细胞。适合在本公开中使用的宿主细胞的实例有 293T 细胞、HepG2 细胞、CHO 细胞、BHK 细胞、HEK293 细胞、COS 细胞、NIH/3T3 细胞、Vero 细胞、HT1080 细胞、Te671 细胞、CEM 细胞、NSO 细胞或 PerC6 细胞，以及以上细胞来源的衍生细胞。在一个方面，所述宿主细胞是 HEK293 细胞或来源于 HEK293 细

胞的细胞。在一个方面，所述宿主细胞是 293T 细胞。在一个方面，生产/包装细胞可以被贴壁培养或悬浮培养。在一个方面，生产/包装细胞可以在有血清或无血清添加的条件下培养。

在本公开中，可用于 Tet-On 诱导表达系统的四环素及其衍生物包括在结构上与四环素相似的化合物，其能够与本公开所述四环素依赖的反式激活物 rtTA 相结合，其结合常数 Ka 至少达到 10^{-6}M；优选地，其结合常数 Ka 达到或强于 10^{-9}M。四环素衍生物例如可以选自：多西环素(Dox)、脱水四环素(Atc)、氯四环素、土霉素和脱氧四环素。

在本公开中，可用于 Cumate 诱导表达系统的，与阻遏物 CymR 相结合的 Cumate 功能类似物例如可以选自：对乙基苯甲酸、对丙基苯甲酸、对异丙基苯甲酸、对异丁基苯甲酸、对叔丁基苯甲酸, 对正二甲基氨基苯甲酸, 对正乙基氨基苯甲酸。以及例如在美国专利号 7,745,592 中描述的其他 Cumate 功能类似物。

在本公开的一个方面，提供以下各项：

第 1 项：一种用于制备用于生产携带目的核酸片段的逆转录病毒载体的生产细胞的方法，所述方法包括：

利用睡美人(Sleeping Beauty，SB)转座子系统将逆转录病毒的 gag 和 pol 基因的序列、病毒包膜蛋白的编码序列、以及携带目的核酸片段的病毒基因组转录盒序列中的一种或多种但非全部整合在宿主细胞的基因组中，然后利用 PiggyBac (PB)转座子系统将所述逆转录病毒的 gag 和 pol 基因的序列、病毒包膜蛋白的编码序列、以及携带目的核酸片段的病毒基因组转录盒序列中的剩余的一种或多种进一步整合在所述宿主细胞的基因组中，或者利用 PB 转座子系统将逆转录病毒的 gag 和 pol 基因的序列、病毒包膜蛋白的编码序列、以及携带目的核酸片段的病毒基因组转录盒序列中的一种或多种但非全部整合在宿主细胞的基因组中，然后利用 SB 转座子系统将所述逆转录病毒的 gag 和 pol 基因的序列、病毒包膜蛋白的编码序列、以及携带目的核酸片段的病毒基因组转录盒序列中的剩余的一种或多种进一步整合在所述宿主细胞的基因组中。

第 2 项：一种用于制备用于生产携带目的核酸片段的慢病毒载体的生产细胞的方法，所述方法包括：

利用 SB 转座子系统将慢病毒的 gag、pol 和 rev 基因的序列、病毒包膜蛋白的编码序列、以及携带目的核酸片段的病毒基因组转录盒序列中的一种或多种但非全部整合在宿主细胞的基因组中，然后利用 PB 转座子系统将所述慢病毒的 gag、pol 和 rev 基因的序列、病毒包膜蛋白的编码序列、以及携带目的核酸片段的病毒基因组转录盒序列中的剩余的一种或多种进一步整合在所述宿主细胞的基因组中，或者利用 PB 转座子系统将慢病毒的 gag、pol 和 rev 基因的序列、病毒包膜蛋白的编码序列、以及携带目的核酸片段的病毒基因组转录盒序列中的一种或多种但非全部整合在宿主细胞的基因组中，然后利用 SB 转座子系统将所述慢病毒的 gag、pol 和 rev 基因的序列、病毒包膜蛋白的编码序列、以及携带目的核酸片段的病毒基因组转录盒序列中的剩余的一种或多种进一步整合在所述宿主细胞的基因组中。

第 3 项：根据第 2 项所述的方法，其中利用 SB 转座子系统将慢病毒的 gag、pol 和 rev 基因的序列以及病毒包膜蛋白的编码序列整合在所述宿主细胞的基因组中，然后利用 PB 转座子系统将携带目的核酸片段的病毒基因组转录盒序列进一步整合在所述宿主细胞的基因组中，或者利用 PB 转座子系统将慢病毒的 gag、pol 和 rev 基因的序列以及病毒包膜蛋白的编码序列整合在所述宿主细胞的基因组中，然后利用 SB 转座子系统将携带目的核酸片段的病毒基因组转录盒序列进一步整合在所述宿主细胞的基因组中。

第 4 项：根据第 2 项所述的方法，其中所述慢病毒的 gag、pol 和 rev 基因的序列、病毒包膜蛋白的编码序列、以及携带目的核酸片段的病毒基因组转录盒序列位于两个以上的构建体上。

第 5 项：根据第 4 项所述的方法，其中 gag、pol 基因的序列位于一个构建体上，rev 基因的序列位于另一个构建体上，病毒包膜蛋白的编码序列位于第三个构建体上，并且携带目的核酸片段的病毒基因组转录盒序列位于第四个构建体上。

第 6 项：根据第 2 项所述的方法，其中所述慢病毒的 gag、pol 和 rev 基因是 HIV-1 病毒的 gag、pol 和 rev 基因。

第 7 项：根据第 2 项所述的方法，其中所述病毒包膜蛋白选自猫白血病病毒(RD114)包膜蛋白、两性逆转录病毒包膜蛋白、嗜性逆转录病毒包膜蛋白、狒狒猿白血病病毒包膜蛋白、尼帕病毒包膜蛋白、莫科拉病毒包膜蛋白、淋巴细胞脉络膜脑膜炎病毒包膜蛋白、基孔肯雅病毒包膜蛋白、罗斯河病毒包膜蛋白、塞姆利基森林病毒包膜蛋白、信德比斯病毒包膜蛋白、委内瑞拉马脑炎病毒包膜蛋白、西部马脑炎病毒包膜蛋白、流感病毒包膜蛋白、禽瘟病毒包膜蛋白、昌迪普拉病毒和皮里病毒包膜蛋白、猿免疫缺陷病毒包膜蛋白、猫免疫缺陷病毒包膜蛋白、马传染性贫血病毒包膜蛋白、埃博拉病毒包膜蛋白、狂犬病病毒包膜蛋白、杆状病毒包膜蛋白、丙型肝炎病毒包膜蛋白、猫内源反转录病毒包膜蛋白、麻疹病毒包膜蛋白、鼠白血病病毒的兼嗜性 4070A 和 10A1、长臂猿白血病病毒的包膜蛋白、人免疫缺陷病毒的 gp120 和水疱性口炎病毒的糖蛋白(VSV-G)。

第 8 项：根据第 2 项所述的方法，其中所述病毒包膜蛋白是水疱性口炎病毒的糖蛋白(VSV-G)。

第 9 项：根据第 2 项所述的方法，其中所述 SB 系统中使用的转座酶是 SB100X，和/或所述 PB 系统中使用的转座酶是 ePiggyBac。

第 10 项：根据第 2 项所述的方法，其中所述 gag、pol 和 rev 基因、病毒包膜蛋白的编码序列和携带目的核酸片段的病毒基因组转录盒中的一种或多种的转录是受控的。

第 11 项：根据第 10 项所述的方法，其中所述病毒包膜蛋白是 VSV-G 并且 rev 基因和 VSV-G 的编码序列的转录是受控的。

第 12 项：根据第 10 项所述的方法，其中所述病毒包膜蛋白是 VSV-G 并且 gag、pol 和 rev 基因以及 VSV-G 的编码序列的转录是受控的。

第 13 项：根据第 10 项所述的方法，其中所述受控的转录是通过将所述基因或序列置于诱导表达系统的控制下实现的。

第 14 项：根据第 13 项所述的方法，其中所述诱导表达系统选自四环素诱导表达系统和 Cumate 诱导表达系统。

第 15 项：根据第 14 项所述的方法，其中所述基因或序列被置于 Tet-On 诱导表达系统的单独控制下或 Tet-On 和 Cumate 诱导表达系统的双重控制下。

第 16 项：根据第 15 项所述的方法，其中，在 Tet-On 诱导表达系统单独控制的情况下，rev 的转录在 TRE_{3G} 序列的控制下，和/或 VSV-G 的编码序列的转录在 TRE_{3G} 序列-内含子的控制下，和/或 gag、pol 的转录在真核启动子-内含子或 TRE_{3G} 序列-内含子的控制下；在 Tet-On 和 Cumate 诱导表达系统双重控制的情况下，rev 的转录在 $TRE_{adv}CuO$ 序列、$TRE_{adv}CuO$ 序列-内含子、TRE_{3G} 序列、$TRE_{3G}CuO$ 序列或 $TRE_{3G}CuO$ 序列-内含子的控制下，和/或 VSV-G 的转录在 $TRE_{adv}CuO$ 序列、$TRE_{adv}CuO$ 序列-内含子、TRE_{3G} 序列-内含子或 $TRE_{3G}CuO$ 序列-内含子的控制下，和/或 gag、pol 的转录在真核启动子-内含子、TRE_{adv} 序列-内含子、$TRE_{adv}CuO$ 序列-内含子、TRE_{3G} 序列-内含子或 $TRE_{3G}CuO$ 序列-内含子的控制下。

第 17 项：根据第 16 项所述的方法，其中，在 Tet-On 诱导表达系统单独控制的情况下，rev 的转录在 TRE_{3G} 序列的控制下，VSV-G 的编码序列的转录在 TRE_{3G} 序列-内含子的控制下，并且 gag、pol 的转录在真核启动子-内含子或 TRE_{3G} 序列-内含子的控制下；在 Tet-On 和 Cumate 诱导表达系统双重控制的情况下，rev 的转录在 TRE_{3G} 序列或 $TRE_{3G}CuO$ 序列的控制下，VSV-G 的转录在 $TRE_{3G}CuO$ 序列-内含子的控制下，并且 gag、pol 的转录在真核启动子-内含子或 $TRE_{3G}CuO$ 序列-内含子的控制下。

第 18 项：根据第 17 项所述的方法，其中在 Tet-On 和 Cumate 诱导表达系统双重控制的情况下，rev 的转录在 TRE_{3G} 序列的控制下，VSV-G 的转录在 $TRE_{3G}CuO$ 序列-内含子的控制下，并且 gag、pol 的转录在 $TRE_{3G}CuO$ 序列-内含子的控制下，并且 gag/pol 基因在所述宿主细胞的基因组中的插入拷贝数为 2-8 个拷贝/细胞，并且插入在所述宿主细胞的基因组中的 gag/pol 与 VSV-G 的拷贝数之比为 1:1 至 4:1。

第 19 项：根据第 18 项所述的方法，其中 gag/pol 基因在所述宿主细胞的基因组中的插入拷贝数为 4-6 个拷贝/细胞，并且插入在所述宿主细胞的基因组中的 gag/pol 与 VSV-G 的拷贝数之比为 2:1 至 3:1。

第 20 项：根据第 15 项所述的方法，其中利用 SB 转座子系统或 PB 转座子系统将 Tet-On 反式激活物蛋白的编码序列或 Tet-On 反式激活物蛋白的编码序列和 Cumate 操纵子的阻遏物 CymR 蛋白的编码序列整合在所述宿主细胞的基因组中。

第 21 项：根据第 20 项所述的方法，其中所述 Tet-On 反式激活物蛋白是 $rtTA_{3G}$。

第 22 项：根据第 15 项所述的方法，其中利用 SB 转座子系统将慢病毒的 gag、pol 和 rev 基因的序列、病毒包膜蛋白的编码序列以及 Tet-On 反式激活物蛋白的编码序列或 Tet-On 反式激活物蛋白的编码序列和 Cumate 操纵子的阻遏物 CymR 蛋白的编码序列整合在所述宿主细胞的基因组中，然后利用 PB

转座子系统将携带目的核酸片段的病毒基因组转录盒序列进一步整合在所述宿主细胞的基因组中，或者利用 PB 转座子系统将慢病毒的 gag、pol 和 rev 基因的序列、病毒包膜蛋白的编码序列以及 Tet-On 反式激活物蛋白的编码序列或 Tet-On 反式激活物蛋白的编码序列和 Cumate 操纵子的阻遏物 CymR 蛋白的编码序列整合在所述宿主细胞的基因组中，然后利用 SB 转座子系统将携带目的核酸片段的病毒基因组转录盒序列进一步整合在所述宿主细胞的基因组中。

第 23 项：通过根据第 1-22 项中任一项所述的方法制备的生产细胞。

第 24 项：根据第 23 项所述的生产细胞，其中所述生产细胞于 2020 年 4 月 13 日以保藏编号 CGMCC No. 19675 保藏于中国普通微生物菌种保藏管理中心。

第 25 项：一种用于生产携带目的核酸片段的逆转录病毒载体的生产细胞，所述生产细胞在其基因组中整合有逆转录病毒的 gag 和 pol 基因的序列、病毒包膜蛋白的编码序列、以及携带目的核酸片段的病毒基因组转录盒序列，所述 gag 和 pol 基因的序列、病毒包膜蛋白的编码序列、以及携带目的核酸片段的病毒基因组转录盒序列的两端分别具有用于被 SB 转座酶识别的 IR/DR 序列或用于被 PB 转座酶识别的 ITR 序列，并且所述 IR/DR 序列和所述 ITR 序列在所述生产细胞中同时存在。

第 26 项：根据第 25 项所述的生产细胞，其中所述 gag 和 pol 基因的序列以及病毒包膜蛋白的编码序列的两端分别具有用于被 SB 转座酶识别的 IR/DR 序列，而所述携带目的核酸片段的病毒基因组转录盒序列的两端具有用于被 PB 转座酶识别的 ITR 序列，或者所述 gag 和 pol 基因的序列以及病毒包膜蛋白的编码序列的两端分别具有用于被 PB 转座酶识别的 ITR 序列，而所述携带目的核酸片段的病毒基因组转录盒序列的两端具有用于被 SB 转座酶识别的 IR/DR 序列。

第 27 项：根据第 25 项所述的生产细胞，其中所述逆转录病毒是慢病毒，所述生产细胞在其基因组中还整合有慢病毒的 rev 基因的序列，并且所述 rev 基因的序列的两端具有用于被 SB 转座酶识别的 IR/DR 序列或用于被 PB 转座酶识别的 ITR 序列。

第 28 项：根据第 27 项所述的生产细胞，其中所述逆转录病毒是 HIV-1 病毒。

第 29 项：根据第 27 项所述的生产细胞，其中所述 gag、pol 和 rev 基因的序列以及病毒包膜蛋白的编码序列的两端分别具有用于被 SB 转座酶识别的 IR/DR 序列，而所述携带目的核酸片段的病毒基因组转录盒序列的两端具有用于被 PB 转座酶识别的 ITR 序列，或者所述 gag、pol 和 rev 基因的序列以及病毒包膜蛋白的编码序列的两端分别具有用于被 PB 转座酶识别的 ITR 序列，而所述携带目的核酸片段的病毒基因组转录盒序列的两端具有用于被 SB 转座酶识别的 IR/DR 序列。

第 30 项：根据第 25 项所述的生产细胞，其中所述病毒包膜蛋白是水疱性口炎病毒的糖蛋白(VSV-G)。

第 31 项：根据第 23 项所述的生产细胞或根据第 25 项所述的生产细胞，其中所述目的核酸片段序列两端具有用于位点特异性重组酶系统的识别序列，和/或所述外包膜蛋白的编码序列两端具有用于位点特异性重组酶系统的识别序列。

第 32 项：用于逆转录病毒载体的目的核酸片段和/或外包膜蛋白替换系统，所述系统包括：根据第 31 项所述的生产细胞，位点特异性重组酶系统，以及待替换的目的核酸片段和/或外包膜蛋白的编码序列。

第 33 项：根据第 32 项所述的系统，其中所述位点特异性重组酶系统是 FLP-FRT 或 Cre-lox 重组酶系统。

第 34 项：根据第 32 项所述的系统，其中所述生产细胞中原有的目的核酸片段包含标记基因或与标记基因相连和/或所述生产细胞中原有的外包膜蛋白的编码序列与标记基因相连，并且与待替换的目的核酸片段和/或外包膜蛋白的编码序列相连的标记基因与所述生产细胞中原有的标记基因不同。

第 35 项：根据第 34 项所述的系统，其中所述标记基因是用于真核细胞的抗性基因序列，代谢通路筛选基因，荧光蛋白标记基因，能够用于报告基因检测蛋白酶基因，或其任意组合。

第 36 项：根据第 35 项所述的系统，其中所述抗性基因序列选自：潮霉素抗性基因、嘌呤霉素抗性基因、新霉素抗性基因、杀稻瘟素抗性基因、博莱霉素抗性基因。

第 37 项：根据第 35 项所述的系统，其中所述代谢通路筛选基因选自编码二氢叶酸还原酶(Dihydrofolate reductase)、谷氨酰胺合成酶(Glutamine synthetase)、胸苷激酶(Thymidine kinase) 的基因。

第 38 项：根据第 35 项所述的系统，其中所述荧光蛋白标记基因选自编码绿色荧光蛋白(EGFP)、红色荧光蛋白(dsRed)、樱桃色荧光蛋白(mcherry)、青色荧光蛋白(ECFP)、黄色荧光蛋白(EYFP)、以及荧光蛋白的其它突变衍生蛋白的基因序列。

第 39 项：根据第 35 项所述的系统，其中所述能够用于报告基因检测蛋白酶基因选自编码萤光素酶(luciferase)、β-半乳糖苷酶(β-galactosidase)、氯霉素乙酰转移酶(chloramphenical acetyltransferase)的基因序列。

第 40 项：用于替换逆转录病毒的生产细胞中的目的核酸片段和/或外包膜蛋白的方法，所述方法包括：提供根据第 31 项所述的生产细胞，以及利用位点特异性重组酶系统将生产细胞中原有的目的核酸片段和/或外包膜蛋白的编码序列替换为待替换的目的核酸片段和/或外包膜蛋白的编码序列。

第 41 项：根据第 40 项所述的方法，其中所述位点特异性重组酶系统是 FLP-FRT 或 Cre-lox 重组酶系统。

第 42 项：根据第 40 项所述的方法，其中所述生产细胞中原有的目的核酸片段包含标记基因或与标记基因相连和/或所述生产细胞中原有的外包膜蛋白的编码序列与标记基因相连，并且与待替换的目的核酸片段和/或外包膜蛋白的编码序列相连的标记基因与所述生产细胞中原有的标记基因不同。

第 43 项：根据第 42 项所述的方法，其中所述标记基因是用于真核细胞的抗性基因序列，代谢通路筛选基因，荧光蛋白标记基因，能够用于报告基因检测蛋白酶基因，或其任意组合。

第 44 项：根据第 43 项所述的方法，其中所述抗性基因序列选自：潮霉素抗性基因、嘌呤霉素抗性

基因、新霉素抗性基因、杀稻瘟素抗性基因、博莱霉素抗性基因。

第 45 项：根据第 43 项所述的方法，其中所述代谢通路筛选基因选自编码二氢叶酸还原酶(Dihydrofolate reductase)、谷氨酰胺合成酶(Glutamine synthetase)、胸苷激酶(Thymidine kinase) 的基因。

第 46 项：根据第 43 项所述的方法，其中所述荧光蛋白标记基因选自编码绿色荧光蛋白(EGFP)、红色荧光蛋白(dsRed)、樱桃色荧光蛋白(mcherry)、青色荧光蛋白(ECFP)、黄色荧光蛋白(EYFP)、以及荧光蛋白的其它突变衍生蛋白的基因序列。

第 47 项：根据第 43 项所述的方法，其中所述能够用于报告基因检测蛋白酶基因选自编码萤光素酶(luciferase)、β-半乳糖苷酶(β-galactosidase)、氯霉素乙酰转移酶(chloramphenical acetyltransferase)的基因序列。

第 48 项 通过根据第 40 项所述的用于替换逆转录病毒的生产细胞中的目的核酸片段和/或外包膜蛋白的方法获得的逆转录病毒的生产细胞。

第 49 项：一种用于生产携带目的核酸片段的逆转录病毒载体的方法，所述方法包括以下步骤：

向根据第 23-31 项中任一项所述的生产细胞或根据第 48 项所述的生产细胞加入诱导表达系统的诱导物，和

收集和纯化所得的携带目的核酸片段的逆转录病毒载体。

第 50 项：根据第 49 项所述的方法，其中所述诱导物是四环素或四环素衍生物和/或 Cumate 及其功能类似物。

第 51 项：根据第 50 项所述的方法，其中所述四环素衍生物是多西环素。

第 52 项：通过根据第 49 项所述的方法制备的携带目的核酸片段的逆转录病毒载体。

第 53 项：根据第 23-31 项中任一项所述的生产细胞、根据第 48 项所述的生产细胞或根据第 52 项所述的携带目的核酸片段的逆转录病毒载体在制备用于向细胞递送目的核酸片段的试剂中的用途。

第 54 项：一种用于制备用于生产慢病毒载体的包装/生产细胞的方法，所述方法包括将慢病毒的 gag、pol 和 rev 基因的序列以及水疱性口炎病毒的糖蛋白(VSV-G)的编码序列转入宿主细胞中，所述 gag、pol 和 rev 基因以及 VSV-G 的编码序列中的一种或多种的转录在 Tet-On 诱导表达系统的单独控制下或 Tet-On 和 Cumate 诱导表达系统的双重控制下，在 Tet-On 诱导表达系统单独控制的情况下，rev 的转录在 TRE_{3G} 序列的控制下，和/或 VSV-G 的编码序列的转录在 TRE_{3G} 序列-内含子的控制下，和/或 gag、pol 的转录在真核启动子-内含子或 TRE_{3G} 序列-内含子的控制下；在 Tet-On 和 Cumate 诱导表达系统双重控制的情况下，rev 的转录在 $TRE_{adv}CuO$ 序列、$TRE_{adv}CuO$ 序列-内含子、TRE_{3G} 序列、$TRE_{3G}CuO$ 序列或 $TRE_{3G}CuO$ 序列-内含子的控制下，和/或 VSV-G 的转录在 $TRE_{adv}CuO$ 序列、$TRE_{adv}CuO$ 序列-内含子、TRE_{3G} 序列-内含子或 $TRE_{3G}CuO$ 序列-内含子的控制下，和/或 gag、pol 的转录在真核启动子-内含子、TRE_{adv} 序列-内含子、$TRE_{adv}CuO$ 序列-内含子、TRE_{3G} 序列-内含子或 $TRE_{3G}CuO$ 序列-内含子的控制下。

第 55 项：根据第 54 项所述的方法，其中，在 Tet-On 诱导表达系统单独控制的情况下，rev 的转录在 TRE_{3G} 序列的控制下，VSV-G 的编码序列的转录在 TRE_{3G} 序列-内含子的控制下，并且 gag、pol 的转录在真核启动子-内含子或 TRE_{3G} 序列-内含子的控制下；在 Tet-On 和 Cumate 诱导表达系统双重控制的情况下，rev 的转录在 TRE_{3G} 序列或 $TRE_{3G}CuO$ 序列的控制下，VSV-G 的转录在 $TRE_{3G}CuO$ 序列-内含子的控制下，并且 gag、pol 的转录在真核启动子-内含子或 $TRE_{3G}CuO$ 序列-内含子的控制下。

第 56 项：根据第 54 项所述的方法，其中所述慢病毒的 gag、pol 和 rev 基因的序列以及 VSV-G 的编码序列被整合在宿主细胞的基因组中。

第 57 项：根据第 56 项所述的方法，其中通过 SB 转座子系统或 PB 转座子系统将慢病毒的 gag、pol 和 rev 基因的序列以及 VSV-G 的编码序列整合在宿主细胞的基因组中。

第 58 项：根据第 56 项所述的方法，其中在 Tet-On 和 Cumate 诱导表达系统双重控制的情况下，rev 的转录在 TRE_{3G} 序列的控制下，VSV-G 的转录在 $TRE_{3G}CuO$ 序列-内含子的控制下，并且 gag、pol 的转录在 $TRE_{3G}CuO$ 序列-内含子的控制下，并且 gag/pol 基因在所述宿主细胞的基因组中的插入拷贝数为 2-8 个拷贝/细胞，并且插入在所述宿主细胞的基因组中的 gag/pol 与 VSV-G 的拷贝数之比为 1:1 至 4:1。

第 59 项：根据第 58 项所述的方法，其中 gag/pol 基因在所述宿主细胞的基因组中的插入拷贝数为 4-6 个拷贝/细胞，并且插入在所述宿主细胞的基因组中的 gag/pol 与 VSV-G 的拷贝数之比为 2:1 至 3:1。

第 60 项：根据第 56 项所述的方法，其中在通过 SB 转座子系统或 PB 转座子系统将慢病毒的 gag、pol 和 rev 基因的序列以及 VSV-G 的编码序列整合在宿主细胞的基因组中后，通过相同的转座子系统将携带目的核酸片段的病毒基因组转录盒序列进一步整合在所述宿主细胞的基因组中，或通过瞬时转染的方法将携带目的核酸片段的病毒基因组转录盒序列进一步转入所述宿主细胞中。

第 61 项：一种用于生产慢病毒载体的包装/生产细胞，所述包装/生产细胞包含慢病毒的 gag、pol 和 rev 基因的序列以及水疱性口炎病毒的糖蛋白(VSV-G)的编码序列，所述 gag、pol 和 rev 基因以及 VSV-G 的编码序列中的一种或多种的转录在 Tet-On 诱导表达系统的单独控制下或 Tet-On 和 Cumate 诱导表达系统的双重控制下，在 Tet-On 诱导表达系统单独控制的情况下，rev 的转录在 TRE_{3G} 序列的控制下，和/或 VSV-G 的编码序列的转录在 TRE_{3G} 序列-内含子的控制下，和/或 gag、pol 的转录在真核启动子-内含子或 TRE_{3G} 序列-内含子的控制下；在 Tet-On 和 Cumate 诱导表达系统双重控制的情况下，rev 的转录在 $TRE_{adv}CuO$ 序列、$TRE_{adv}CuO$ 序列-内含子、TRE_{3G} 序列、$TRE_{3G}CuO$ 序列或 $TRE_{3G}CuO$ 序列-内含子的控制下，和/或 VSV-G 的转录在 $TRE_{adv}CuO$ 序列、$TRE_{adv}CuO$ 序列-内含子、TRE_{3G} 序列-内含子或 $TRE_{3G}CuO$ 序列-内含子的控制下，和/或 gag、pol 的转录在真核启动子-内含子、TRE_{adv} 序列-内含子、$TRE_{adv}CuO$ 序列-内含子、TRE_{3G} 序列-内含子或 $TRE_{3G}CuO$ 序列-内含子的控制下。

第 62 项：根据第 61 项所述的用于生产慢病毒载体的包装/生产细胞，其中所述慢病毒的 gag 基因的序列及/或 pol 基因的序列及/或 rev 基因的序列及/或水疱性口炎病毒的糖蛋白(VSV-G)的编码序列被整合

在所述包装/生产细胞的基因组中。

第 63 项：根据第 61 项所述的用于生产慢病毒载体的包装/生产细胞，其中，在 Tet-On 诱导表达系统单独控制的情况下，rev 的转录在 TRE_{3G} 序列的控制下，VSV-G 的编码序列的转录在 TRE_{3G} 序列-内含子的控制下，并且 gag、pol 的转录在真核启动子-内含子或 TRE_{3G} 序列-内含子的控制下；在 Tet-On 和 Cumate 诱导表达系统双重控制的情况下，rev 的转录在 TRE_{3G} 序列或 $TRE_{3G}CuO$ 序列的控制下，VSV-G 的转录在 $TRE_{3G}CuO$ 序列-内含子的控制下，并且 gag、pol 的转录在真核启动子-内含子或 $TRE_{3G}CuO$ 序列-内含子的控制下。

第 64 项：根据第 61 项所述的用于生产慢病毒载体的包装/生产细胞，其中在 Tet-On 和 Cumate 诱导表达系统双重控制的情况下，rev 的转录在 TRE_{3G} 序列的控制下，VSV-G 的转录在 $TRE_{3G}CuO$ 序列-内含子的控制下，并且 gag、pol 的转录在 $TRE_{3G}CuO$ 序列-内含子的控制下，并且 gag/pol 基因在所述包装/生产细胞的基因组中的插入拷贝数为 2-8 个拷贝/细胞，并且插入在所述包装/生产细胞的基因组中的 gag/pol 与 VSV-G 的拷贝数之比为 1:1 至 4:1。

第 65 项：根据第 64 项所述的用于生产慢病毒载体的包装/生产细胞，其中 gag/pol 基因在所述包装/生产细胞的基因组中的插入拷贝数为 4-6 个拷贝/细胞，并且插入在所述包装/生产细胞的基因组中的 gag/pol 与 VSV-G 的拷贝数之比为 2:1 至 3:1。

第 66 项：根据第 61 项所述的用于生产慢病毒载体的包装/生产细胞，其于 2020 年 4 月 13 日以保藏编号 CGMCC No. 19674 保藏于中国普通微生物菌种保藏管理中心。

第 67 项：一种生产慢病毒载体的方法，其包括在适于生产慢病毒载体的条件下培养根据第 61 至 66 任一项项所述的包装/生产细胞。

附图说明

图 1 示实施例所用部分质粒的图谱。

图 2 示实施例 2 中验证 SB 和 PB 转座子系统的转座专一性。横坐标为细胞传代代次，纵坐标为各共转染组合细胞 EGFP 阳性比例(图 2A)和 EGFP 荧光强度中位值(MFI) (图 2B)。

图 3 示实施例 2 中构建稳定生产慢病毒载体的生产细胞的实验流程图。

图 4 示实施例 2 中通过 SB 和 PB 转座子系统按照不同组合方式构建的慢病毒稳定生产细胞的产毒能力检测结果，其中横坐标为构建的生产细胞编号，纵坐标为检测病毒转染滴度的 Luciferase 实验的 RLU 值。

图 5 示实施例 3 中对比不同调控序列调控单一慢病毒包装基因对产毒能力的影响。图示为病毒滴度检测结果，横坐标为待测的不同调控序列名称，纵坐标为检测病毒转染滴度的 Luciferase 实验的 RLU 值。rev（图 5A）、VSV-G（图 5B）和 gag/pol（图 5C）在不同调控序列调控下的诱导产毒滴度和无诱导泄露滴度的检测结果。

图 6 示实施例 3 中使用优化后的不同调控序列组合调控 rev、VSV-G 和 gag/pol 的表达并对比诱导产毒滴度和无诱导泄露滴度。图示为病毒滴度检测结果。横坐标为具有不同调控序列的质粒组合，纵坐标为检测病毒转染滴度的 Luciferase 实验的 RLU 值。

图 7 示实施例 4 中单基因在宿主细胞基因组整合的拷贝数对细胞产毒能力的影响。横坐标表示转染细胞时不同质粒的摩尔比例，左侧纵坐标为检测病毒转染滴度的 Luciferase 实验的 RLU 值，右侧纵坐标为待测基因在细胞基因组的平均整合拷贝数。图 7A 示 $rtTA_{3G}$-CymR 片段基因组整合拷贝数对产毒能力的影响，图 7B 示 rev 片段基因组整合拷贝数对产毒能力的影响，图 7C 示 VSV-G 片段基因组整合拷贝数对产毒能力的影响，图 7D 示 gag/pol 片段基因组整合拷贝数对产毒能力的影响。

图 8 示实施例 4 中 gag/pol 和 VSV-G 片段在宿主细胞基因组中不同的整合拷贝数比例对细胞产毒能力的影响。横坐标表示转染细胞时不同质粒的摩尔比例，左侧纵坐标为检测病毒转染滴度的 Luciferase 实验的 RLU 值，右侧纵坐标为 gag/pol 和 VSV-G 片段在细胞基因组中整合拷贝数的比值。

图 9 示实施例 5 中 EuLV293T3rd 慢病毒稳定包装细胞系构建、筛选及悬浮适应流程图。

图 10 示实施例 5 中 SB16 单克隆（图 10A）和 SB28 单克隆（图 10B）筛选过程及 96 孔板、24 孔板和 6 孔板筛选结果。横坐标为单克隆细胞制备病毒与 Luciferase 标准品 RLU 检测结果的比值（表示为以 2 为底的指数），纵坐标为在各个数据区间内单克隆细胞数目。图中••••虚线为所有单克隆样品 RLU 比值的平均值，方框为根据检测结果筛选保留的单克隆细胞株。

图 11 示实施例 5 中使用 HT1080 细胞 Luciferase 病毒滴度检测方法检测适应悬浮培养的单克隆包装细胞株产毒能力的检测结果。其中横坐标为检测的细胞编号，纵坐标为与病毒转染滴度相应的 Luciferase 检测实验的 RLU 值。

图 12 示实施例 6 中瞬时转染不同慢病毒包装基因质粒组合对贴壁培养的高产单克隆包装细胞株的产毒滴度影响。横坐标图例表示瞬时转染的慢病毒包装基因组合，其中“-”号代表无诱导条件，“+”代表诱导条件；纵坐标为病毒转染滴度对应的 Luciferase 检测实验的 RLU 值；实线代表通过瞬时转染 293T 细胞阳性对照的产毒滴度；虚线代表各细胞诱导产毒阳性对照的产毒滴度。

图 13 示实施例 6 中瞬时转染不同慢病毒包装基因质粒组合对悬浮培养的高产单克隆包装细胞株的产毒滴度影响。横坐标图例表示瞬时转染的慢病毒包装基因组合，其中“-”号代表无诱导条件，“+”代表诱导条件；纵坐标为病毒转染滴度对应的 Luciferase 检测实验的 RLU 值；实线代表通过瞬时转染 293T 细胞阳性对照的产毒滴度；虚线代表各细胞诱导产毒阳性对照的产毒滴度。

图 14 示实施例 7 中构建的携带不同目的核酸片段的慢病毒稳定生产细胞系的产毒能力和瞬时转染方法产毒能力对比。横坐标图例表示检测的转移载体质粒编号；纵坐标为病毒转染滴度对应的 Luciferase 检测实验的 RLU 值

图 15 示实施例 7 中构建的慢病毒稳定生产细胞在无血清悬浮培养条件下的诱导及泄露产毒滴度。

横坐标图例“-”号代表无诱导条件，“+”代表诱导条件；纵坐标为病毒转染滴度对应的 Luciferase 检测实验的 RLU 值。

本发明的实施方式

提供以下实施例用以对本发明的技术方案进行说明，以下实施例不应被认为是对本发明的范围和精神的限制。

实施例 1：质粒构建方法

以下实施例所使用的分子克隆技术，例如，DNA 片段的 PCR 扩增、DNA 片段的限制性内切酶酶切、DNA 片段的凝胶回收、两段或多段 DNA 片段的 T4 DNA 连接酶连接、连接产物感受态细胞的转化、质粒小量制备及鉴定等方法均为本领域熟知技术。以下实施例中涉及以下试剂：PCR 酶(Thermo，F-530S)；限制性内切酶(NEB)；T4 DNA 连接酶(Invitrogen，15224041)；DNA 片段凝胶回收试剂盒(Omega，D2500-02)；质粒小提试剂盒(TIANGEN，DP105-03)；感受态细胞(XL-10 Gold，湖南丰晖生物科技有限公司，JZ011)；SEQ ID NO:1 至 SEQ ID NO:18 所示的核酸序列由金斯瑞合成并用于本公开所述质粒构建，质粒测序鉴定由 Invitrogen 公司完成。以下实施例所用部分质粒的图谱简图如图 1 所示；表 1 为构建质粒的引物信息；表 2 为序列 SEQ ID NO:1 至 SEQ ID NO：31 的元件组成说明；表 3 为质粒中各功能元件说明；表 4 为本公开构建的质粒编号及对应名称。以下实施例中所涉及的各质粒所采用的功能元件序列信息为实现本公开的示例，本领域技术人员可以预期将以下实施例中所用质粒上各功能元件序列替换成其它生物学功能类似的元件序列也能达到本公开所述效果，包括但不限于质粒的骨架序列（如复制原点(replication origin)、抗性基因等）、酶切位点序列、转座子重复序列、诱导系统响应元件序列、隔离子(Insulator)序列、启动子序列、内含子序列、聚腺苷酸信号(PolyA)序列、不同密码子优化的基因序列、以上各功能元件序列和基因序列的突变体、以及各功能元件序列和基因序列的克隆位置、克隆顺序和克隆方向。具体的质粒构建方法如下所示：

1. 构建质粒 18BF007 和 18BF004：将合成序列 SEQ ID NO:2 (2900bp)和序列 SEQ ID NO:3 (1386bp)用 NotI 和 AsiSI 酶切并分别连接在质粒 18BF003 (序列 SEQ ID NO:1，1893bp)的 NotI 和 AsiSI 酶切位点，从而分别构建得到质粒 18BF007 和 18BF004。

2. 构建质粒 18BF011 和 18BF063：将 18BF007 质粒用 MluI 和 SphI 酶切，凝胶回收 1730bp 片段并将其连接在 18BF003 质粒的 MluI 和 SphI 酶切位点从而构建得到质粒 18BF011。将合成序列 SEQ ID NO:4 (915bp)用 MluI 和 ClaI 酶切并连接在 18BF007 的 MluI 和 ClaI 酶切位点，替换 CMV 启动子构建质粒 18BF063。

3. 构建质粒 18BF072、18BF071、19BF249、19BF248、19BF247、19BF246、18BF070 和 18BF069：以 pRSV-Rev (Addgene，#12253)为模板、C-rev-F(SEQ ID NO:34)和 C-rev-R(SEQ ID NO:35)为引物 PCR

扩增 rev 基因片段(380bp)，之后用 ClaI 和 XhoI 酶切并连接在 18BF063 质粒的 ClaI 和 XhoI 酶切位点构建 18BF072 质粒。将合成序列 SEQ ID NO:5 (887bp)、序列 SEQ ID NO:6 (897bp)和序列 SEQ ID NO:7 (852bp)用 MluI 和 ClaI 酶切并连接在 18BF072 质粒的 MluI 和 ClaI 酶切位点，替换 TRE_{3G}CuO-BGI 片段从而分别构建得到质粒 18BF071、19BF249 和 19BF248。将质粒 18BF072、18BF071、19BF249 和 19BF248 用 BstBI 酶切，分别凝胶回收 4147bp (18BF072)，4119bp (18BF071)，4129bp (19BF249)和 4084bp (19BF248)片段并用 T4 连接酶连接以分别构建质粒 19BF247、19BF246、18BF070 和 18BF069。

4. 构建质粒 18BF068、18BF067、19BF245、19BF244、19BF243、19BF242、18BF066、18BF065 和 19BF254：以 pMD2.G (Addgene，#12259)为模板，C-VSVG-F(SEQ ID NO:32)和 C-VSVG-R(SEQ ID NO:33)为引物 PCR 扩增 VSV-G 基因片段(1565bp)，之后用 ClaI 和 XhoI 酶切并连接在 18BF063 质粒的 ClaI 和 XhoI 酶切位点以构建得到质粒 18BF068。将合成序列 SEQ ID NO:5 (887bp)、序列 SEQ ID NO:6 (897bp)和序列 SEQ ID NO:7 (852bp)分别用 MluI 和 ClaI 酶切并连接在 18BF068 质粒的 MluI 和 ClaI 酶切位点，替换 TRE_{3G}CuO-BGI 片段从而构建得到质粒 18BF067、19BF245 和 19BF244。将质粒 18BF068 用 ClaI 和 XhoI 酶切，凝胶回收 1550bp 片段并分别将其连接在质粒 19BF247、19BF246、18BF070 和 18BF069 的 ClaI 和 XhoI 酶切位点，替换其中 rev 基因从而分别构建得到质粒 19BF243、19BF242、18BF066 和 18BF065。将合成序列 SEQ ID NO:8 (887bp)用 SpeI 和 PvuII 酶切并连接在 18BF068 质粒的 AvrII 和 PmeI 酶切位点从而构建得到质粒 19BF254。

5. 构建质粒 18BF074、19BF131、19BF130、19BF251、19BF250、19BF126、19BF129，19BF128 和 18BF076：以 pMDLg/pRRE (Addgene，#12251)为模板、C-RRE-F(SEQ ID NO:36)和 C-RRE-R(SEQ ID NO:37)为引物 PCR 扩增 RRE 片段(400bp)；C-GagPol-F(SEQ ID NO:38)和 C-GagPol-R(SEQ ID NO:39)为引物 PCR 扩增 gag/pol 基因片段(4336bp)，之后用 XbaI 和 XhoI 以及 EcoRI 和 XbaI 分别酶切处理两个 DNA 片段并连接在 18BF007 质粒的 EcoRI 和 XhoI 酶切位点从而构建得到 18BF074 质粒。将合成序列 SEQ ID NO:4 (915bp)、序列 SEQ ID NO:5 (887bp)、序列 SEQ ID NO:6 (897bp)和序列 SEQ ID NO:7 (852bp)分别用 MluI 和 EcoRI 酶切并连接在 18BF074 质粒的 MluI 和 EcoRI 酶切位点，替换 CMV-BGI 片段从而构建得到 19BF131、19BF130、19BF251 和 19BF250 质粒。将 18BF074、19BF131、19BF130 和 19BF250 质粒分别用 BstBI 酶切，分别凝胶回收 8758bp (18BF074)，8494bp (18BF131)，8466bp (19BF130)和 8421bp (19BF250)片段并用 T4 连接酶连接从而分别构建得到质粒 19BF126、19BF129、19BF128 和 18BF076。

6. 构建质粒 19BF257、19BF256、19BF075 和 19BF074：将合成序列 SEQ ID NO:9 (633bp)和序列 SEQ ID NO:10 (1496bp)分别用 ClaI 和 XhoI 以及 SpeI 和 AgeI 酶切处理并依次连接在 18BF007 质粒的 ClaI 和 XhoI 酶切位点以及 AvrII 和 AgeI 酶切位点从而构建得到 19BF073 质粒。将合成序列 SEQ ID NO:11 (1979bp)用 MluI 和 AgeI 酶切并连接在 18BF007 质粒的 MluI 和 AgeI 酶切位点，替换 CMV-BGI-MCS-pA 片段，从而构建得到 18BF008 质粒。将合成序列 SEQ ID NO:12 (768bp)和序列 SEQ ID NO:13 (765bp)分

别用 ClaI 和 XhoI 酶切并分别连接在 18BF008 质粒的 ClaI 和 XhoI 酶切位点从而分别构建得到 18BF085 和 18BF084 质粒。将合成序列 SEQ ID NO:10 (1496bp)用 SpeI 和 AgeI 酶切并分别连接在 18BF085 和 18BF084 质粒的 AvrII 和 AgeI 酶切位点从而分别构建得到 19BF257 和 19BF256 质粒。将质粒 19BF073 用 SpeI 和 AgeI 酶切，凝胶回收 3821bp 片段并将其分别连接在 18BF085 和 18BF084 质粒的 AvrII 和 AgeI 酶切位点从而分别构建得到 19BF075 和 19BF074 质粒。

7. 构建质粒 18BF019 和 18BF031：将合成序列 SEQ ID NO:15 (1044bp)和序列 SEQ ID NO:14 (1320bp)分别用 BamHI 和 XhoI 以及 XhoI 和 BglII 酶切并连接在 18BF011 质粒的 BamHI 和 BglII 酶切位点从而构建得到 18BF019 质粒。将合成序列 SEQ ID NO:16 (1806bp)和序列 SEQ ID NO:14 (1320bp)分别用 BamHI 和 XhoI 以及 XhoI 和 BglII 酶切并连接在 18BF011 质粒的 BamHI 和 BglII 酶切位点从而构建得到 18BF031 质粒。

8. 构建质粒 18BF094、19BF255、18BF091、18BF096 和 19BF252：将质粒 18BF071 和 19BF254 分别用 PacI 和 AvrII 酶切，分别凝胶回收 DNA 片段 1762bp 和 3838bp，并将回收的两种片段分别连接在 18BF004 质粒的 PacI 和 AvrII 酶切位点从而分别构建得到 18BF094 和 19BF255 质粒。将质粒 18BF068 用 PacI、AvrII 和 PvuI 酶切，凝胶回收 DNA 片段 2975bp，并将回收的 DNA 片段连接在 18BF004 质粒的 PacI 和 AvrII 酶切位点从而构建得到 18BF091 质粒。将质粒 18BF074 用 PacI 和 PmeI 酶切，凝胶回收 DNA 片段 6428bp，并将其连接在 18BF004 质粒的 PacI 和 PmeI 酶切位点从而构建得到 18BF096 质粒。将质粒 19BF074 用 SpeI 和 PmeI 酶切，凝胶回收 DNA 片段 6513bp，并将其连接在 18BF004 质粒的 SpeI 和 PmeI 酶切位点从而构建得到 19BF252 质粒。

9. 构建质粒 19BF081、19BF217 和 19BF218：以 pRRLSIN.cPPT.PGK-GFP.WPRE (Addgene，#12252)为模板，hPGK-F(SEQ ID NO:40)和 hPGK-R(SEQ ID NO:41)为引物 PCR 扩增 PGK 基因片段(706bp)；以 pGL3-Basic (Promega，E1751)为模板，Luc-F(SEQ ID NO:42)和 Luc-R(SEQ ID NO:43)为引物 PCR 扩增 luciferase 基因片段(1728bp)，之后用 MluI 和 BamHI（凝胶回收 538bp 片段）以及 BamHI 和 XhoI 分别酶切处理两个 DNA 片段并连接在 19BF126 质粒的 MluI 和 XhoI 酶切位点，替换原质粒 DNA 片段从而构建得到 18YYH26 质粒。用 TRIzol (ThermoFisher 15596026)试剂抽提纯化 HepG2 (ATCC HB-8065)细胞和健康人外周血单核细胞(PBMC)的总 RNA；依照 SuperScript IV (ThermoFisher 18090010)说明并以 HepG2 和 PBMC 混合总 RNA 做为模板制作 cDNA 库；并以此 cDNA 库为模板，F8V1-F(SEQ ID NO:44)和 F8V1HA-R(SEQ ID NO:45)为引物 PCR 扩增 F8cHA 基因片段(PCR 产物长度 7116bp，经 DNA 测序 PCR 产物 18bp 至 7070bp 序列和 NM_000132.3 序列中 172bp 至 7224bp 序列一致)；之后用 ClaI 和 XhoI 酶切处理并连接在 19BF126 质粒的 ClaI 和 XhoI 酶切位点，替换原质粒 DNA 片段从而构建得到 19BF215 质粒。以 19BF215 质粒为模板，分别以 F8V1F(SEQ ID NO:44)和 FP-BDDF8-R(SEQ ID NO:47)以及 FP-BDDF8-F(SEQ ID NO:46)和 F8V1HA-R(SEQ ID NO:45)为引物 PCR 扩增两段 DNA 片段 2317bp 和

2154bp；用融合 PCR 方法将这两段 DNA 连接并以 F8V1F(SEQ ID NO:44)和 F8V1HA-R(SEQ ID NO:45)为引物 PCR 扩增得到 BDDF8cHA(4434bp)基因片段；之后用 ClaI 和 XhoI 酶切处理并连接在 19BF126 质粒的 ClaI 和 XhoI 酶切位点，替换原质粒 DNA 片段从而构建得到 19BF216 质粒。将合成序列 SEQ ID NO:18 (3610bp)用 SpeI 和 AgeI 酶切并连接在 18BF004 质粒的 SpeI 和 AgeI 酶切位点从而构建得到 19BF080 质粒。将合成序列 SEQ ID NO:17 (1320bp)用 XhoI 和 BglII 酶切并连接在 19BF080 质粒的 Xho I 和 BamH I 酶切位点从而构建得到 19BF214 质粒。将质粒 18YYH26、19BF215 和 19BF216 分别用 Pac I 和 Xho I 酶切并分别凝胶回收 DNA 片段 2272bp、7792bp 和 5110bp ,并将回收的片段分别连接在 19BF214 质粒的 Pac I 和 Xho I 酶切位点从而分别构建得到 19BF081、19BF217 和 19BF218 质粒。

10. 构建质粒 18BF022、18BF033 和 19BF078 :将合成序列 SEQ ID NO:17 (1320bp)用 Xho I 和 Bgl II 酶切并连接在 18BF007 质粒的 Xho I 和 Bgl II 酶切位点从而构建得到 18BF022 质粒。将质粒 18BF022 用 Mlu I、Age I 和 Pvu I 酶切，凝胶回收 DNA 片段 3052bp，并将其连接在 18BF004 质粒的 Mlu I 和 Age I 酶切位点从而构建得到 18BF033 质粒。将合成序列 SEQ ID NO:18 (3610bp)用 Spe I 和 Age I 酶切并连接在 18BF007 质粒的 Spe I 和 Age I 酶切位点，替换原质粒 DNA 片段从而构建得到 19BF077 质粒。将质粒 19BF081 用 Pac I 和 Nde I 酶切，凝胶回收 DNA 片段 3598bp，并将其连接在 19BF077 质粒的 Pac I 和 Nde I 酶切位点从而构建得到 19BF078 质粒。

表 1. 引物信息列表

SEQ ID NO:	引物名称	引物序列(5'-3')
32	C-VSVG-F	GCTCATCGATGCCACCATGAAGTGCCTTTTGTACTTAG
33	C-VSVG-R	CAGGCTCGAGCTATTACTTTCCAAGTCGGTTCATC
34	C-rev-F	CGATATCGATGCCACCATGGCAGGAAGAAGCGGA
35	C-rev-R	CATGCTCGAGTTACTATTCTTTAGCTCCTGACTC
36	C-RRE-F	CATGGATCTAGAAGGAGCTTTGTTCCTTG
37	C-RRE-R	CAGGCTCGAGAAGCTTGTGTAATTGTTAATTTC
38	C-GagPol-F	GCACGAATTCGCCACCATGGGTGCGAGAGCGTC
39	C-GagPol-R	GCAGTCTAGACTATTAATCCTCATCCTGTCTACTTG
40	hPGK-F	CATACGCGTGCTTGATATCGAATTCCACG
41	hPGK-R	CAGATGAACTTCAGGGTCAGCTTG
42	Luc-F	TCAGGATCCATCTGCGATCTAAGTAAGCTTG
43	Luc-R	TCAACTCGAGCTAGAATTACACGGCGATC
44	F8V1-F	GTCAGATCGATGCCACCATGCAAATAGAG
45	F8V1HA-R	CCTGCTCGAGTCATGCATAATCAGGCACGTCATAGGGGTAGCTGCCGTAG AGGTCCTGTG
46	FP-BDDF8-F	CCATTGAACCAAGAAGCTTCTCTCAAAACCCACCAGT
47	FP-BDDF8-R	ACTGGTGGGTTTTGAGAGAAGCTTCTTGGTTCAATGG

表 2. 序列元件组成说明

SEQ ID NO:	序列元件组成描述
1	18BF003_pma-MCS 质粒序列（1893bp）
2	NotI-IR/DR-HS4I-CMV-BGI-MCS- hGHpA-HS4I-IR/DR-AsiSI（2900bp）
3	NotI- PB3'ITR-HS4I-MCS-HS4I-PB5'ITR-AsiSI（1386bp）
4	MluI-TRE$_{3G}$CuO-BGI-ClaI-EcoRI（915bp）

5	MluI-TRE_{3G}-BGI-ClaI-EcoRI（887bp）
6	MluI-TRE_{adv}CuO-BGI-ClaI-EcoRI（897bp）
7	MluI-TRE_{adv}-BGI-ClaI-EcoRI（852bp）
8	SpeI-SV40p-optiBSD-SV40pA-PvuII-AgeI（887bp）
9	ClaI-optiCymR-XhoI（633bp）
10	SpeI-SV40p-optiHygroR-SV40pA-AgeI（1496bp）
11	MluI-CAGGS-BGI(C&R)-MCS-SV40pA-AgeI（1979bp）
12	ClaI-optirtTA_{3G}-XhoI（768bp）
13	ClaI-rtTA_{adv}-XhoI（765bp）
14	XhoI-IRES-ECFP-BglII(1320bp)
15	BamHI-optiSB-XhoI（1044bp）
16	BamHI-optiPB-XhoI（1806bp）
17	XhoI-IRES-EGFP-BglII（1320bp）
18	SpeI-RSV-LTR-phi-Gag (334)-RRE-cppt-MCS-WPRE-ppt-LTR-SV40pA-SV40p-optiPuorR-SV40pA-AgeI (3610bp)
19	本公开所用 TRE_{3G} 响应元件序列
20	本公开设计 TRE_{3G}CuO 复合响应元件序列
21	本公开所用 TRE_{adv} 响应元件序列
22	本公开设计 TRE_{adv}CuO 复合响应元件序列
23	SB 转座子 IR/DR 序列
24	PB 转座子 PB3'ITR 序列
25	PB 转座子 PB5'ITR 序列
26	人 β-球蛋白内含子(BGI)序列
27	编码 CymR 的核酸序列
28	编码 rtTA_{3G}的核酸序列
29	编码 rtTA_{adv}的核酸序列
30	编码 SB 转座酶的核酸序列
31	编码 PB 转座酶的核酸序列

表 3. 质粒功能元件说明

原件名称	功能描述
IR/DR(L/R)	SB 转座子系统反向重复序列(IR)和同向重复序列(DR)，**SEQ ID NO:23** 或其互补序列
PB3'ITR/PB5'ITR	PB 转座子系统反向末端重复序列(3 端/5 端)，**SEQ ID NO:24/ SEQ ID NO:25** 或其互补序列
HS4I	鸡 β-球蛋白高敏感位置 4 核心隔离子序列
BGI	人 β-球蛋白内含子序列，**SEQ ID NO:26**
CMV	人类巨细胞病毒的强表达启动子序列
RSV	呼吸道合胞病毒启动子序列
MCS	限制性内切酶多克隆位点序列
CAGGS	巨细胞病毒启动子增强子部分与鸡 β-肌动蛋白启动子嵌合启动子序列
BGI (C&R)	鸡 β-肌动蛋白和兔 β-球蛋白的嵌合内含子序列
TRE_{3G}CuO	本公开设计的 Tet-On(基于 TRE_{3G})和 Cumate 复合诱导表达系统响应元件序列，**SEQ ID NO:20**
TRE_{adv}CuO	本公开设计的 Tet-On(基于 TRE_{adv})和 Cumate 复合诱导表达系统响应元件序列，**SEQ ID NO:22**
TRE_{3G}/TRE_{adv}	Tet-On 诱导表达系统响应元件序列，$TRE_{3G:}$ **SEQ ID NO:19/** $TRE_{adv:}$ **SEQ ID NO:21**
SV40p	猿空泡病毒 40 启动子序列
hPGK	人磷酸甘油酸酯激酶基因来源的启动子序列
IRES	核糖体进入位点序列
gag/ pol	编码 I 型 HIV 病毒 gag 和 pol 的基因序列(同 Addgene#12251 序列一致)
phi	慢病毒 RNA 基因组包装信号序列
RRE	rev 蛋白应答元件序列

LTR	慢病毒长末端重复序列、含有逆转录复制所需顺式作用元件序列，本公开所用 3'LTR 序列删除了其中 U3 序列。
gag (334)	HIV-1 gag 蛋白编码序列的 5'端 1-334bp 序列，内含点突变设计的 10 个终止密码子。
cppt	中心多嘌呤束序列
ppt	多嘌呤束序列
VSV-G	编码水泡口炎病毒 G 糖蛋白基因序列(同 Addgene，#12259 序列一致)
rev	编码 rev 蛋白基因序列(同 Addgene，#12253 序列一致)
WPRE	土拨鼠肝炎病毒转录后调控序列
optiPB	经密码子优化的编码 PiggyBac (PB)转座酶的基因序列，**SEQ ID NO:31**
optiSB	经密码子优化的编码 Sleeping Beauty (SB)转座酶的基因序列，**SEQ ID NO:30**
EGFP	编码绿色荧光蛋白的基因序列
ECFP	编码青色荧光蛋白的基因序列
Luciferase (Luc)	编码荧光素酶的基因序列
polyA (hGHpA/SV40pA)	转录终止子聚腺苷酸序列(hGHpA 人生长因子终止子序列/SV40pA 猿空泡病毒 40 终止子)
optiCymR	经密码子优化的编码 Cumate 诱导表达系统阻遏物 CymR 蛋白的编码序列，**SEQ ID NO:27**
optirtTA$_{3G}$	经密码子优化的 Tet-On 诱导表达系统 rtTA$_{3G}$ 反式激活物的编码序列，**SEQ ID NO:28**
rtTA$_{adv}$	Tet-On 诱导表达系统 rtTA$_{adv}$ 反式激活物的编码序列，**SEQ ID NO:29**
optiBSD	经密码子优化的编码杀稻瘟菌素抗性基因序列
optiHygroR	经密码子优化的编码潮霉素抗性基因序列
optiPuroR	经密码子优化的编码嘌呤霉素抗性基因序列
F8cHA	编码人凝血因子 8 基因序列(带 C 端 HA 标签，同 NM_000132.3 序列一致)
BDDF8cHA	编码 B 蛋白结构域缺失的人凝血因子 8 基因序列(带 C 端 HA 标签))

表 4. 质粒编号及名称

质粒编号	质粒名称
18BF003	pma-MCS
18BF007	pmaSBT3-2xHS4I-CMV-BGI-MCS
18BF004	pmaHPBT-2xHS4I-MCS
18BF011	pmaCMV-BGI-MCS
18BF063	pmaSBT3-2xHS4I-TRE$_{3G}$CuO-BGI-MCS
18BF072	pmaSBT3-2xHS4I-TRE$_{3G}$CuO-BGI-rev
18BF071	pmaSBT3-2xHS4I-TRE$_{3G}$-BGI-rev
19BF249	pmaSBT3-2xHS4I-TRE$_{adv}$CuO-BGI-rev
19BF248	pmaSBT3-2xHS4I-TRE$_{adv}$-BGI-rev
19BF247	pmaSBT3-2xHS4I-TRE$_{3G}$CuO-rev
19BF246	pmaSBT3-2xHS4I-TRE$_{3G}$-rev
18BF070	pmaSBT3-2xHS4I-TRE$_{adv}$CuO-rev
18BF069	pmaSBT3-2xHS4I-TRE$_{adv}$-rev
18BF068	pmaSBT3-2xHS4I-TRE$_{3G}$CuO-BGI-VSVG
18BF067	pmaSBT3-2xHS4I-TRE$_{3G}$-BGI-VSVG
19BF245	pmaSBT3-2xHS4I-TRE$_{adv}$CuO-BGI-VSVG
19BF244	pmaSBT3-2xHS4I-TRE$_{adv}$-BGI-VSVG
19BF243	pmaSBT3-2xHS4I-TRE$_{3G}$CuO-VSVG
19BF242	pmaSBT3-2xHS4I-TRE$_{3G}$-VSVG
18BF066	pmaSBT3-2xHS4I-TRE$_{adv}$CuO-VSVG
18BF065	pmaSBT3-2xHS4I-TRE$_{adv}$-VSVG
19BF254	pmaSBT3-2xHS4I-TRE$_{3G}$CuO-BGI-VSVG-optiBSD
18BF074	pmaSBT3-2xHS4I-CMV-BGI-gag/pol-RRE
19BF131	pmaSBT3-2xHS4I-TRE$_{3G}$CuO-BGI-gag/pol-RRE
19BF130	pmaSBT3-2xHS4I-TRE$_{3G}$-BGI-gag/pol-RRE
19BF251	pmaSBT3-2xHS4I-TRE$_{adv}$CuO-BGI-gag/pol-RRE
19BF250	pmaSBT3-2xHS4I-TRE$_{adv}$-BGI-gag/pol-RRE
19BF126	pmaSBT3-2xHS4I-CMV-gag/pol-RRE

19BF129	pmaSBT3-2xHS4I-TRE$_{3G}$CuO-gag/pol-RRE
19BF128	pmaSBT3-2xHS4I-TRE$_{3G}$-gag/pol-RRE
18BF076	pmaSBT3-2xHS4I-TRE$_{adv}$-gag/pol-RRE
19BF073	pmaSBT3-2xHS4I-CMV-BGI-optiCymR-optiHygroR
18BF008	pmaSBT3-2xHS4I-CAGGS-BGI (C&R)-MCS
18BF085	pmaSBT3-2xHS4I-CAGGS-BGI (C&R)-optirtTA$_{3G}$
18BF084	pmaSBT3-2xHS4I-CAGGS-BGI (C&R)-rtTA$_{adv}$
19BF257	pmaSBT3-2xHS4I-CAGGS-BGI (C&R)-optirtTA$_{3G}$-optiHygroR
19BF256	pmaSBT3-2xHS4I-CAGGS-BGI (C&R)-rtTA$_{adv}$-optiHygroR
19BF075	pmaSBT3-2xHS4I-CAGGS-BGI (C&R)-optirtTA$_{3G}$-CMV-BGI-optiCymR-optiHygroR
19BF074	pmaSBT3-2xHS4I-CAGGS-BGI (C&R)-rtTA$_{adv}$-CMV-BGI-optiCymR-optiHygroR
18BF019	pmaCMV-BGI-optiSB-IRES-ECFP
18BF031	pmaCMV-BGI-optiPB-IRES-ECFP
18BF094	pmaHPBT-2xHS4I-TRE$_{3G}$-BGI-rev
19BF255	pmaHPBT-2xHS4I-TRE$_{3G}$CuO-BGI-VSVG-optiBSD
18BF091	pmaHPBT-2xHS4I-TRE$_{3G}$CuO-BGI-VSVG
18BF096	pmaHPBT-2xHS4I-CMV-BGI-gag/pol-RRE
19BF252	pmaHPBT-2xHS4I-CAGGS-BGI(C&R)-rtTA$_{adv}$-CMV-BGI-optiCymR-optiHygroR
18YYH26	pmaSBT3-2xHS4I-hPGK-Luc
19BF215	pmaSBT3-2xHS4I-CMV-F8cHA
19BF216	pmaSBT3-2xHS4I-CMV-BDDF8cHA
19BF080	pmaHPBT-2xHS4I-LVRSV-MCS-optiPuroR
19BF214	pmaHPBT-2xHS4I-LVRSV-MCS-IRES-EGFP-optiPuroR
19BF081	pmaHPBT-2xHS4I-LVRSV-hPGK-Luc-IRES-EGFP-optiPuroR
19BF217	pmaHPBT-2xHS4I-LVRSV-CMV-F8cHA-IRES-EGFP-PuroR
19BF218	pmaHPBT-2xHS4I-LVRSV-CMV-BDDF8cHA-IRES-EGFP-optiPuroR
18BF022	pmaSBT3-2xHS4I-CMV-BGI-MCS-IRES-EGFP
18BF033	pmaHPBT-2xHS4I-CMV-BGI-MCS-IRES-EGFP
19BF077	pmaSBT3-2xHS4I-LVRSV-MCS-optiPuroR
19BF078	pmaSTB3-2xHS4I-LVRSV-hPGK-Luc-IRES-EGFP-optiPuroR

实施例 2：使用 SB 和 PB 双转座子系统构建慢病毒生产细胞系

1. 验证 SB 和 PB 转座子系统专一性

使用 SB 和 PB 双转座子系统构建慢病毒生产细胞系前需证明 SB 和 PB 转座子系统的专一性，即 SB 和 PB 转座酶是否仅能识别各自的转座子结合序列。专一性验证实验通过在 293T 细胞中分别转染携带 EGFP 的 SB/PB 转座子质粒(18BF022/18BF033)和 SB/PB 转座酶质粒(18BF019/18BF031)，然后检测在连续传代中 293T 细胞中 EGFP 信号丢失率来评定两套转座子系统是否能交叉工作，具体步骤如下：

将 293T 细胞(ATCC，CRL3216)培养在 37℃、5% CO_2 环境下，培养基为 DMEM 完全培养基(DMEM (Sigam，D6429)添加 10% FBS (ExCell，11H116)。将 293T 细胞按 8E5 个细胞每孔接种于 6 孔板(Corning，3516)中。培养 24 小时后，按照《MolecμLar Cloning: A Laboratory Manual (Fourth edition) Chapter15，Michael R. Green，Cold Spring Harbor Laboratory Press，2012》中磷酸钙转染方式配制转染试剂，每孔加入 200μL 转染试剂，其中含有 0.12mol/L 氯化钙，1xHEPES 缓冲液，5.5μg 总质粒量。其中 SB 和 PB 的转座子质粒分别为 18BF022 和 18BF033，报告基因都为 EGFP。SB 和 PB 转座酶质粒分别为 18BF019 和 18BF031。转座子质粒和转座酶质粒按照摩尔质量 10:1 进行磷酸钙共转染。实验共设置 6 个共转染组合，分别为(1)SB 转座子和 SB 转座酶（18BF022+18BF019）；(2)PB 转座子和 PB 转座酶

（18BF033+18BF031）；(3)SB 转座子和 PB 转座酶（18BF022+18BF031）；(4)PB 转座子和 SB 转座酶（18BF033+18BF019）；(5)SB 转座子和空质粒（18BF022+18BF003）；(6)PB 转座子和空质粒（18BF033+18BF003）。转染 6 小时后，更换培养基为新的 DMEM 完全培养基。转染 24 小时后，用胰酶(Sigam，T4799)消化细胞并使用流式细胞仪(ACEA，NovoCyte3130)检测细胞 EGFP 阳性比例和荧光强度中位值(MFI)，此数据记为 P1 代数据。之后在无筛选压力下培养细胞并维持每三天一次传代操作，每次传代用流式法检测 EGFP 的阳性比例和 MFI 值，一共连续记录 5 个代次。

图 2 为 SB 和 PB 专一性验证实验结果，横坐标为细胞传代代次，纵坐标为各共转染组合细胞 EGFP 阳性比例(图 2A)和荧光强度中位值(MFI) (图 2B)。如图所示：6 组样品在转染后 P1 代的 EGFP 阳性比例在 61.1%-79.1%之间，MFI 在 32685-44827 之间。之后在持续无筛选压力培养过程中，EGFP 阳性比例快速下降，但 SB 实验组 18BF022+18BF019 和 PB 实验组 18BF033+18BF031 在 P2 代之后 EGFP 下降明显减缓并在 P5 代时 EGFP 阳性比例稳定在 31.3%(SB 实验组)和 25.8%(PB 实验组)，MFI 稳定在 18007(SB)和 9085(PB)。而 SB 转座子和 PB 转座酶交叉组、PB 转座子和 SB 转座酶交叉组、SB 和 PB 转座子无转座酶对照组这 4 个实验组细胞 EGFP 阳性比例和 MFI 值持续下降，在 P5 代时，细胞 EGFP 阳性比例降低至 0.5%左右，MFI 降低至 3000 以下，四组结果见无显著性差异。此结果证实 SB 和 PB 转座子系统能高效稳定的转染哺乳动物细胞，且两系统具有专一性。

2. 使用 SB 和 PB 双转座子系统按不同质粒组合构建慢病毒生产细胞系

本实施例利用 SB 和 PB 转座子系统能高效整合基因片段在细胞基因组中，且相互不干扰的特性，将慢病毒包装所用基因 rev、VSV-G、gag/pol 和携带目的核酸片段的病毒基因组转录盒以及诱导表达系统激活物 rtTA 和/或阻遏物 CymR 蛋白编码序列通过不同组合，使用 SB 和/或 PB 转座子系统分一次或两次转染并进行细胞筛选的方式构建稳定生产慢病毒载体的生产细胞系,实验流程参照图 3。本实施例所述组合仅为举例，本行业专业人士可以通过本实施所示方法轻易实现其它组合。本实施例使用 hPGK-Luciferase-IRES-EGFP 序列为目的核酸片段开发及验证本公开所述构建慢病毒稳定生产细胞系的方法，此方法在原理上不受特定目的核酸片段影响可以为任意目的核酸片段。

细胞系第一轮转染筛选实验：将 293T 细胞按照 1.5E6 个细胞每培养皿接种于 60mm 培养皿中培养 24 小时，培养基为 3ml DMEM 完全培养基，培养条件为 37℃、5% CO_2。按照 PEI 方法转染细胞，操作方法如下：转染时每 60mm 培养皿加入 500μL 转染试剂，其中含有 9.5μg 的总质粒量，各实验组质粒加入量参照表 5， 总质粒量与 PEI MAX (Polysciences，24765-1)的质量比为 1:4，质粒与 PEI MAX 混合均匀，静置 15 分钟后加入培养皿中，转染 3 小时后，更换培养基为 DMEM 完全培养基，转染操作完成。转染 24 小时后，用胰酶消化细胞并将细胞全部接种于 100mm 培养皿(Corning，430167)中。按照表 5 所示筛选抗性进行细胞药物筛选，并连续在此药物压力下至少筛选 3 代直至细胞系稳定，其中潮霉素

(Hygromycin，生工 A600230-0001)筛选浓度为 200μg/ml。细胞稳定生长后移除药物并转入 DMEM 完全培养基中培养。

细胞系第二轮转染筛选实验：表 5 为细胞系第一轮转染筛选实验构建的细胞系，其中的基因改造后的人胚肾细胞系 EuLV-F2 于 2020 年 4 月 13 日以保藏编号 CGMCC No. 19674 保藏于中国普通微生物菌种保藏管理中心(CGMCC，地址：北京市朝阳区北辰西路 1 号院 3 号)。将 EuLV-F2、EuLV-F3、EuLV-F4、EuLV-F5、EuLV-F7、EuLV-F8、EuLV-F9 和 EuLV-F10 这 8 条细胞系按 1.5E6 个细胞分别接种于 8 个 60mm 培养皿中，培养 24 小时。按照 PEI 方法转染细胞，各实验组质粒加入量参照表 6。转染 24 小时后，用胰酶消化细胞并全部接种于 100mm 培养皿中。按照表 6 所示筛选抗性进行细胞药物筛选，并连续在此药物压力下至少筛选 3 代直至细胞系稳定，其中嘌呤霉素 (Puromycin，阿拉丁 P113126)筛选浓度为 2.5μg/ml、灭瘟素(别名杀稻瘟菌素 S，英文名 Blasticidin-S HCl，阿拉丁 B139600) 筛选浓度为 10μg/ml。细胞稳定生长后移除药物并转入 DMEM 完全培养基中培养。第二轮转染筛选实验构建了 EuLV-F2-S2、EuLV-F3-S3、EuLV-F4-S4、EuLV-F5-S5、EuLV-F7-S7、EuLV-F8-S8、EuLV-F9-S9 和 EuLV-F10-S10 共 8 种细胞系。其中对基因改造后的人胚肾细胞系 EuLV-F2-S2 细胞株进行了保藏，其于 2020 年 4 月 13 日以保藏编号 CGMCC No. 19675 保藏于中国普通微生物菌种保藏管理中心(CGMCC，地址：北京市朝阳区北辰西路 1 号院 3 号)。

使用 HT1080 细胞 Luciferase 病毒滴度检测方法检测上述慢病毒稳定生产细胞系的慢病毒产毒能力。将筛选稳定后所获得的 12 种细胞系 EuLV-NC-SB、EuLV-NC-PB、EuLV-F1、EuLV-F2-S2、EuLV-F3-S3、EuLV-F4-S4、EuLV-F5-S5、EuLV-F6、EuLV-F7-S7、EuLV-F8-S8、EuLV-F9-S9、EuLV-F10-S10 按照 8E+05 个细胞每孔接种于 6 孔板(Corning 3516)中并培养在 37℃、5% CO_2 环境下，培养基为 DMEM 完全培养基。培养 24 小时后，更换培养基为含有诱导剂 1μg/ml DOX (盐酸多西环素(DOX)，生工生物工程(上海)股份有限公司，A600889)、200μg/ml Cumate (Aladdin，I107765)和 5mmol/L 丁酸钠(Sigma，303410)的 DMEM 完全培养基诱导产毒。设置在 293T 细胞通过瞬时转染质粒方法所生产的慢病毒为阳性对照，具体方法如下：将 293T 细胞按 8E+05 个细胞每孔接种于 6 孔板中，培养 24 小时后加入转染试剂(总 DNA 量为 5μg，其中摩尔比 19BF081:pMD2.G (Addgene 12259):pMDLg/PRRE (Addgene 12251):pRSV-Rev (Addgene 12253)=1:1:1:1，总 DNA 与 PEI MAX 的质量比为 1:4)。转染 2 小时后，同上加入诱导剂(终浓度为 5mmol/L 丁酸钠，1μg/ml DOX，200μg/ml Cumate) 。HT1080 细胞 Luciferase 病毒滴度检测方法操作如下：在上述实验组和对照组细胞加入诱导剂 24 小时后，将 HT1080 细胞按照 1E4 个细胞每孔接种于 96 孔板(Corning 3916)中，培养基为 DMEM 完全培养基。诱导产毒 48 小时后，收集含有慢病毒的培养基并使用离心机在 14000rpm 离心 10 分钟收集病毒液上清。在加入病毒样品 1 小时前，将 HT1080 细胞的培养基更换为含有 8μg/ml polybrene (Sigam，H9268)的 DMEM 完全培养基。之后在 96 孔板中每孔加入 50 μL 的待测病毒液，阴性对照孔加入 50μL DMEM 完全培养基，且每个样品及对照均设置两个复

孔。培养 48 小时后用 Steady-Glo® Luciferase Assay System (Promega，E2610)试剂盒，按照其操作说明(Promega，FB037)检测各孔相对光单位 RLU (relative light unit)，检测仪器为荧光酶标仪(Perkin Elmer Victor V)。

图 4 为按照不同 SB、PB 转座子系统及慢病毒包装基因组合构建的慢病毒稳定生产细胞在诱导产毒后通过 HT1080 细胞 Luciferase 病毒滴度检测方法测得的病毒转染滴度 RLU 值的检测结果。横坐标为不同质粒组合所构建细胞系，纵坐标为所产慢病毒在感染 HT1080 细胞后 Luciferase 的相对表达量值 RLU。结果显示使用不同 SB 和/或 PB 转座子及不同慢病毒包装基因组合都能快速构建慢病毒稳定生产细胞系，各种组合所构建的稳定细胞系在诱导后都能明显检测到病毒滴度；而在转染中无转座酶对照 NC-SB 和 NC-PB 细胞在筛选后无法检测到病毒滴度，其 RLU 值和背景对照 NC 无显著区别。在构建慢病毒稳定生产细胞系时，一般会先构建含有诱导表达系统激活物和/或阻遏物以及慢病毒包装基因 rev、VSV-G、gag/pol 的包装细胞，然后再基于此包装细胞构建含有携带目的核酸片段的慢病毒基因组转录盒的最终慢病毒稳定生产细胞。由于 EuLV-F2-S2 细胞显示出最优的慢病毒载体包装能力(4.68E+05 RLU)，本公开优选先以 SB 转座子系统构建含有 Tet-ON 诱导系统反式激活物 rtTA 编码序列和/或 Cumate 诱导系统阻遏物 CymR 编码序列以及慢病毒包装基因 rev、VSV-G、gag-pol 基因的慢病毒载体包装细胞系(EuLV 细胞)，再以 PB 转座子系统在以上慢病毒载体包装细胞系基因组中稳定插入携带目的核酸片段的慢病毒基因组转录盒的方法构建慢病毒稳定生产细胞系。

表 5. 细胞系构建第一轮细胞转染实验质粒信息表

细胞系名称 EuLV	原始细胞系	调控元件 (μg) 19BF074	gag/pol (μg) 18BF074	VSV-G (μg) 18BF068	rev (μg) 18BF071	转移载体 (μg) 19BF078	转座酶 (μg) 18BF019	空质粒 (μg) 18BF003	总质粒 (μg)	筛选抗性
F1	293T	0.68	3.37	0.49	0.34	3.63	0.55	0.45	9.50	潮霉素
F2	293T	0.68	3.37	0.49	0.34	0.00	0.34	4.29	9.50	潮霉素
F3	293T	0.68	3.37	0.00	0.34	3.63	0.51	0.98	9.50	潮霉素
F4	293T	0.68	3.37	0.00	0.34	0.00	0.30	4.81	9.50	潮霉素
F5	293T	0.68	0.00	0.49	0.34	0.00	0.13	7.87	9.50	潮霉素
NC-SB	293T	0.68	3.37	0.49	0.34	3.63	0.00	1.00	9.50	潮霉素
细胞系名称 EuLV	**原始细胞系**	**调控元件 (μg) 19BF252**	**gag/pol (μg) 18BF096**	**VSV-G (μg) 18BF091**	**rev (μg) 18BF094**	**转移载体 (μg) 19BF081**	**转座酶 (μg) 18BF031**	**空质粒 (μg) 18BF003**	**总质粒 (μg)**	**筛选抗性**
F6	293T	1.34	2.66	0.96	0.67	2.87	0.66	0.34	9.50	潮霉素
F7	293T	1.34	2.66	0.96	0.67	0.00	0.47	3.39	9.50	潮霉素
F8	293T	1.34	2.66	0.00	0.67	2.87	0.57	1.39	9.50	潮霉素
F9	293T	1.34	2.66	0.00	0.67	0.00	0.38	4.45	9.50	潮霉素
F10	293T	1.34	0.00	0.96	0.67	0.00	0.28	6.25	9.50	潮霉素
NC-PB	293T	1.34	2.66	0.96	0.67	2.87	0.00	1.00	9.50	潮霉素

表 6. 细胞系构建第二轮细胞转染质粒信息表

细胞系名称 EuLV	原始细胞系 EuLV	调控元件 (μg) 19BF252	gag/pol (μg) 18BF096	VSV-G (μg) 19BF255	rev (μg) 18BF094	转移载体 (μg) 19BF081	转座酶 (μg) 18BF031	空质粒 (μg) 18BF003	总质粒 (μg)	筛选抗性
F2-S2	F2	0.00	0.00	0.00	0.00	3.63	0.24	5.63	9.50	嘌呤霉素
F3-S3	F3	0.00	0.00	0.49	0.00	0.00	0.05	8.97	9.50	灭瘟素
F4-S4	F4	0.00	0.00	1.03	0.00	3.08	0.31	5.08	9.50	嘌呤霉素
F5-S5	F5	0.00	3.37	0.00	0.00	3.63	0.48	2.02	9.50	嘌呤霉素
细胞系	**原始**	**调控元件**	**gag/pol**	**VSV-G**	**rev**	**转移载体**	**转座酶**	**空质粒**	**总质粒**	**筛选抗性**

名称 EuLV	细胞系	(μg) 19BF074	(μg) 18BF074	(μg) 19BF254	(μg) 18BF071	(μg) 19BF078	(μg) 18BF019	(μg) 18BF003	(μg)	
F7-S7	F7	0.00	0.00	0.00	0.00	2.87	0.17	6.47	9.50	嘌呤霉素
F8-S8	F8	0.00	0.00	0.96	0.00	0.00	0.08	8.46	9.50	灭瘟素
F9-S9	F9	0.00	0.00	0.45	0.00	3.37	0.24	5.44	9.50	嘌呤霉素
F10-S10	F10	0.00	2.66	0.00	0.00	2.87	0.34	3.63	9.50	嘌呤霉素

实施例 3：慢病毒基因 rev、VSV-G 和 gag/pol 的诱导表达优化

本实施例针对表达 rev、VSV-G 和 gag/pol 基因的诱导表达进行优化。主要优化条件包括三个主要方面 （1）Tet-On 诱导系统反式激活物 rtTA 的选择；（2）诱导表达系统优化包括基于 Tet-On 诱导系统的 TRE_{adv}、TRE_{3G} 响应元件的单调控优化和基于 Tet-On 和 Cumate 复合诱导表达系统的 TRE_{adv}CuO、TRE_{3G}CuO 响应元件的复合调控优化；（3）以及启动子或诱导表达系统响应元件 3’ 端和被调控核酸序列 5’端之间是否连接可剪切的内含子。基于以上 3 个方面，本实施设计测试了 8 种诱导响应元件和内含子的组合以及两种 Tet-On 反式激活物 $rtTA_{adv}$ 和 $rtTA_{3G}$ 来调控慢病毒包装基因 gag/pol、VSV-G 和 rev 的表达，并基于各种条件在慢病毒产毒滴度和泄露滴度这两个方面进行优化。详细质粒构建信息参照实施例 1 说明，具体实施步骤如下：

1. 构建 293T-$rtTA_{adv}$-CymR 和 293T-$rtTA_{3G}$-CymR 细胞

293T 细胞培养、PEI 转染以及潮霉素筛选等实验流程参照实施例 2。将 293T 细胞按照 1.5E+06 个细胞每 60mm 培养皿接种，在 37℃、5% CO_2 的环境下，培养在添加 10%FBS (ExCell，11H116) 的 DMEM(Sigam，D6429) 完全培养基中。培养 24 小时后按照 PEI 方法进行转染，总质粒量为 5.5μg，其中按照质粒 19BF074:18BF019 摩尔比 10:1 进行转染以获得 293T-$rtTA_{adv}$-CymR 细胞；按照质粒 19BF075:18BF019 摩尔比 10:1 进行转染以获得 293T-$rtTA_{3G}$-CymR 细胞。转染后用 200μg/ml 潮霉素药物筛选至少三代后，细胞在药物压力下生长和原始 293T 细胞一致后，进行以下实验。

2. 单质粒替换方法筛选优化 rev、VSV-G 和 gag/pol 的基因表达调控方式

在 293T-$rtTA_{adv}$-CymR 和 293T-$rtTA_{3G}$-CymR 细胞内，以实施例 1 中构建的 8 种 rev 质粒、8 种 VSV-G 质粒和 9 种 gag/pol 质粒分别替换表达 rev 的 pRSV-Rev(Addgene，#12253)、表达 VSV-G 的 pMD2.G (Addgene，#12259)和表达 gag/pol 的 pMDLg/pRRE(Addgene，#12251)质粒，以 19BF081 质粒为携带目的核酸片段的病毒基因组转录盒转移载体质粒，通过 PEI 瞬时转染的方式分别在有无 DOX 和 Cumate 诱导剂的情况下制备病毒，并且通过 HT1080 细胞 Luciferase 病毒滴度检测方法评估产毒滴度和泄露滴度。每个实验条件仅替换一个可诱导表达的测试质粒，其它共转的质粒为非诱导表达质粒。其中 8 种 rev 测试质粒为 18BF072、18BF071、19BF249、19BF248、19BF247、19BF246、18BF070 和 18BF069；8 种 VSV-G 测试质粒为 18BF068、18BF067、19BF245、19BF244、19BF243、19BF242、18BF066 和 18BF065；9 种 gag/pol 测试质粒为 18BF074、19BF131、19BF130、19BF251、19BF250、19BF129、19BF128、18BF076 和 19BF126；阳性对照为质粒为 pMD2.G 、pRSV-Rev 和 pMDLg/pRRE。实验流程如下：

将筛选稳定的 293T-$rtTA_{adv}$-CymR 和 293T-$rtTA_{3G}$-CymR 细胞分别按 1.5E+05 个细胞每孔接种于 24 孔板中，培养体积为 500μl。培养 24h 后，按照 PEI 方法进行转染，每孔加入 50 μl 转染混合物，其中含有 0.8μg 的总质粒量和 3.2 μg 的 PEI。在 0.8 μg 的总质粒量中，相应的 rev、VSV-G、gag/pol 和 19BF081

质粒的混合摩尔比是 1:1:1:1。在 rev 优化实验组中仅用本公开设计载体替换 pRSV-Rev 质粒；在 VSV-G 实验组中仅替换 pMD2.G 质粒；在 gag/pol 实验组中仅替换 pMDLg/pRRE 质粒；阳性对照组使用 pMD2.G 、pRSV-Rev 和 pMDLg/pRRE 质粒转染制备慢病毒。将质粒和 PEI 混合均匀，静置 15 分钟后加入 24 孔板中，每个样品设置两个孔。转染 3h 后，更换培养基为含有 5mmol/L 丁酸钠的完全培养基，并在每个样品的其中一个孔中加入终浓度为 1μg/ml DOX 和 200μg/ml Cumate 诱导剂作为诱导组，另一孔加入等量培养基作为非诱导组。继续培养 48h 后，收集每孔病毒上清液，按照实施例 2 中基于 HT1080 细胞的 Luciferase 病毒滴度检测方法检测每个样品在诱导和非诱导条件下的 RLU 值，结果如图 5 所示。

图 5 为 rev（图 5A）、VSV-G（图 5B）和 gag/pol（图 5C）各慢病毒包装基因在 293T-rtTA$_{adv}$-CymR 或 293T-rtTA$_{3G}$-CymR 细胞中、被不同诱导表达系统响应元件调控以及响应元件 3'端和被调控核酸序列 5'端之间是否连接可剪切的内含子的条件下的诱导产毒滴度和无诱导泄露滴度的 Luciferase 滴度检测结果。

基于诱导产毒滴度和无诱导泄露滴度结果，rev 的优选调控元件为 TRE$_{adv}$CuO（18BF070），TRE$_{adv}$CuO-BGI（19BF249），TRE$_{3G}$（19BF246），TRE$_{3G}$CuO（19BF247）和 TRE$_{3G}$CuO-BGI（18BF072），其中 TRE$_{3G}$，TRE$_{3G}$CuO 和 TRE$_{3G}$CuO-BGI 为优选，所对应的诱导 RLU 平均值和诱导/泄露产毒滴度比值在 293T-rtTA$_{adv}$-CymR 和 293T-rtTA$_{3G}$-CymR 细胞内分别为（1）TRE$_{3G}$（19BF246）：6.80E+05 RLU, 135 倍和 9.24E+05 RLU，322 倍；（2）TRE$_{3G}$CuO（19BF247）：6.34E+05 RLU，275 倍和 7.79E+05 RLU, 279 倍；（3）TRE$_{3G}$CuO-BGI（18BF072）：7.46E+05 RLU，105 倍和 4.96E+05 RLU，68 倍。其中 Tet-On 单诱导系统进一步优选反式激活物为 rtTA$_{3G}$，优选响应元件为 TRE$_{3G}$；Tet-On 和 Cumate 复合诱导进一步优选响应元件为 TRE$_{3G}$、TRE$_{3G}$CuO 和 TRE$_{3G}$CuO-BGI。

基于诱导产毒滴度和无诱导泄露滴度结果，VSV-G 的优选调控元件为 TRE$_{adv}$CuO（18BF066），TRE$_{adv}$CuO-BGI（19BF245），TRE$_{3G}$-BGI（18BF067）和 TRE$_{3G}$CuO-BGI（18BF068）所对应的诱导 RLU 平均值和诱导/泄露产毒滴度比值在 293T- rtTA$_{adv}$-CymR 和 293T-rtTA$_{3G}$-CymR 细胞内分别为（1）TRE$_{adv}$CuO（18BF066）：3.34E+05 RLU，1323 倍和 3.35E+05 RLU, 974 倍；（2）TRE$_{adv}$CuO-BGI（19BF245）：5.96E+05 RLU，506 倍和 4.62E+05 RLU, 886 倍；（3）TRE$_{3G}$-BGI（18BF067）：4.22E+05 RLU，110 倍和 4.27E+05 RLU, 629 倍；和（4）TRE$_{3G}$CuO-BGI（18BF068）：8.09E+05 RLU，1539 倍和 5.76E5 RLU, 1260 倍。其中 Tet-On 单诱导系统进一步优选反式激活物为 rtTA$_{3G}$，优选响应元件为 TRE$_{3G}$-BGI；Tet-On 和 Cumate 复合诱导进一步优选响应元件为 TRE$_{adv}$CuO-BGI、TRE$_{3G}$-BGI、TRE$_{3G}$CuO-BGI，再进一步优选 TRE$_{3G}$CuO-BGI。

基于诱导产毒滴度和无诱导泄露滴度结果，在响应元件 3'端和 gag/pol 编码序列 5'端之间没有连接内含子（BGI）序列的条件下，无论是诱导组还是非诱导组，检测滴度都在 1000 RLU 以下，接近背景值；CMV 启动子在下游没有内含子的情况下（19BF126），检测滴度也下降到有内含子（18BF074）的 19.4%，说明启动子和 gag/pol 编码序列之间连接的可剪接的内含子序列是 gag/pol 编码序列高表达的重要条件。转染设计含有内含子的 gag/pol 质粒所对应的诱导 RLU 平均值和诱导/泄露产毒滴度比值在 293T-rtTA$_{adv}$-CymR 和 293T-rtTA$_{3G}$-CymR 细胞内分别为（1）TRE$_{adv}$-BGI（19BF250）：8.60E+05 RLU，87 倍

和 6.43E+05 RLU，135 倍；(2) TRE_{adv}CuO-BGI (19BF251)：9.01E+05 RLU，413 倍和 6.21E+05 RLU，326 倍；(3) TRE_{3G}-BGI (19BF130)：7.53E+05 RLU，257 倍和 7.16E+05 RLU，333 倍；和(4) TRE_{3G}CuO-BGI (19BF131)：8.22E+05 RLU，641 倍和 8.47E+0.5 RLU，692 倍；(5) CMV-BGI (18BF074)：1.28E+06 RUL 和 1.10E+06 RLU。因为 gag/pol 编码序列的表达同时受 rev 蛋白调控，所以 gag/pol 编码序列的调控非必须。基于以上结果，gag/pol 编码序列的调控元件优选为 CMV-BGI、TRE_{adv}-BGI、TRE_{adv}CuO-BGI、TRE_{3G}-BGI 和 TRE_{3G}CuO-BGI。其中 Tet-On 单诱导优选调控元件为 TRE_{3G}-BGI 和 CMV-BGI；Tet-On 和 Cumate 复合诱导优选响应元件为 CMV-BGI、TRE_{adv}-BGI、TRE_{adv}CuO-BGI、TRE_{3G}-BGI 和 TRE_{3G}CuO-BGI，进一步优选 CMV-BGI、TRE_{adv}CuO-BGI、TRE_{3G}CuO-BGI，再进一步优选 CMV-BGI 和 TRE_{3G}CuO-BGI。对于以上关于 gag/pol 编码序列的启动子的选择的结果，本领域技术人员可以合理的预期，当使用除了 CMV 启动子以外的本领域中常用的其他真核启动子(例如，PGK、CAGGS、EF1a、RSV、SV40 等)和除了 BGI 以外的本领域中常用的其他内含子的组合来调控 gag/pol 的转录时，可以取得与 CMV-BGI 的设计方案相似的结果。

3. 基于以上优选调控元件综合优化 rev、VSV-G 和 gag/pol 表达质粒组合

根据以上单质粒替换方法筛选优化 rev、VSV-G 和 gag/pol 基因表达的实验结果，选取(1) rev：18BF072、19BF247 和 19BF246；(2) VSV-G：18BF068 和 18BF067；(3) gag/pol：18BF074、19BF131 和 19BF130 质粒按照表 7 所示组合在 293T-$rtTA_{adv}$-CymR 和 293T-$rtTA_{3G}$-CymR 细胞内，按照上述 24 孔板瞬时转染制备慢病毒方法，分别在有无 DOX 和 Cumate 诱导剂的情况下制备病毒，并且通过 HT1080 细胞 Luciferase 病毒滴度检测方法评估产毒滴度和泄露滴度。细胞接种、质粒加入量及各质粒摩尔比例、PEI 转染、转染换液、诱导产毒和 HT1080 细胞 Luciferase 滴度检测等实验条件同本实施例单质粒替换筛选实验一致，结果如图 6 所示。

如图 6 结果所示：基于诱导产毒滴度和无诱导泄露滴度结果，Tet-On 单诱导优选质粒组合为 rev：19BF246、VSV-G：18BF067 和 gag/pol：18BF074 或 19BF130。在使用 18BF074 质粒时，所对应的诱导 RLU 平均值和诱导/泄露产毒滴度比值在 293T-$rtTA_{adv}$-CymR 和 293T-$rtTA_{3G}$-CymR 细胞内分别为 6.83E+05 RLU，45 倍和 7.28E+05 RLU，167 倍；在使用 19BF130 质粒时，所对应的诱导 RLU 平均值和诱导/泄露产毒滴度比值在 293T-$rtTA_{adv}$-CymR 和 293T-$rtTA_{3G}$-CymR 细胞内分别为 5.20E+05 RLU，24 倍和 6.94E+05 RLU，176 倍。实验结果所示，18BF074 和 19BF130 质粒在诱导 RLU 平均值和诱导/泄露产毒滴度比值上无显著差距，而 $rtTA_{3G}$ 相比 $rtTA_{adv}$ 反式激活物可以显著降低非诱导泄露。

如图 6 结果所示，Tet-On 和 Cumate 复合诱导优选质粒组合最优三个诱导后产毒滴度 RLU 平均值来自样品编号 19BF246+18BF068+19BF131、19BF246+18BF068+18BF074 和 19BF247+18BF068+18BF074 质粒组合。在使用 19BF246+18BF068+19BF131 质粒组合时，所对应的诱导 RLU 平均值和诱导/泄露产毒滴度比值在 293T-$rtTA_{adv}$-CymR 和 293T-$rtTA_{3G}$-CymR 细胞内分别为 1.28E+06 RLU，1935 倍和 1.46E+06 RLU，12032 倍；在使用 19BF246+18BF068+18BF074 质粒组合时，所对应的诱导 RLU 平均值和诱导/泄露产毒滴度比值在 293T-$rtTA_{adv}$-CymR 和 293T-$rtTA_{3G}$-CymR 细胞内分别为 8.75E+05 RLU，262 倍和 1.07E+06 RLU，975 倍；在使用 19BF247+18BF068+18BF074 质粒组合时，所对应的诱导 RLU 平均值和

诱导/泄露产毒滴度比值在 293T-rtTA$_{adv}$-CymR 和 293T-rtTA$_{3G}$-CymR 细胞内分别为 1.05E+06 RLU，563 倍和 1.09E+06 RLU ,839 倍。基于以上三组数据和图 2 数据所示 ,rev 优选质粒为 19BF246 或 19BF247，进一步优选为 19BF246；VSV-G 优选质粒为 18BF068；gag/pol 优选质粒为 19BF131 和 18BF074，进一步优选为 19BF131；反式激活物优选为 rtTA$_{3G}$。

表 7. rev、VSV-G 和 gag/pol 表达质粒转染组合

细胞	样品编号	rev	VSV-G	gag/pol	GOI	总质粒量 (μg)	摩尔比例
293T-rtTAadv-CymR	19BF246+18BF067+18BF074	19BF246	18BF067	18BF074	19BF081	0.8	1:1:1:1
	19BF246+18BF067+19BF130	19BF246	18BF067	19BF130	19BF081	0.8	1:1:1:1
	19BF246+18BF067+19BF131	19BF246	18BF067	19BF131	19BF081	0.8	1:1:1:1
	19BF246+18BF068+18BF074	19BF246	18BF068	18BF074	19BF081	0.8	1:1:1:1
	19BF246+18BF068+19BF130	19BF246	18BF068	19BF130	19BF081	0.8	1:1:1:1
	19BF246+18BF068+19BF131	19BF246	18BF068	19BF131	19BF081	0.8	1:1:1:1
	19BF247+18BF067+18BF074	19BF247	18BF067	18BF074	19BF081	0.8	1:1:1:1
	19BF247+18BF067+19BF130	19BF247	18BF067	19BF130	19BF081	0.8	1:1:1:1
	19BF247+18BF067+19BF131	19BF247	18BF067	19BF131	19BF081	0.8	1:1:1:1
	19BF247+18BF068+18BF074	19BF247	18BF068	18BF074	19BF081	0.8	1:1:1:1
	19BF247+18BF068+19BF130	19BF247	18BF068	19BF130	19BF081	0.8	1:1:1:1
	19BF247+18BF068+19BF131	19BF247	18BF068	19BF131	19BF081	0.8	1:1:1:1
	18BF072+18BF067+18BF074	18BF072	18BF067	18BF074	19BF081	0.8	1:1:1:1
	18BF072+18BF067+19BF130	18BF072	18BF067	19BF130	19BF081	0.8	1:1:1:1
	18BF072+18BF067+19BF131	18BF072	18BF067	19BF131	19BF081	0.8	1:1:1:1
	18BF072+18BF068+18BF074	18BF072	18BF068	18BF074	19BF081	0.8	1:1:1:1
	18BF072+18BF068+19BF130	18BF072	18BF068	19BF130	19BF081	0.8	1:1:1:1
	18BF072+18BF068+19BF131	18BF072	18BF068	19BF131	19BF081	0.8	1:1:1:1
	PC	pRSV-Rev	pMD2.G	pMDLg/pRRE	19BF081	0.8	1:1:1:1
293T-rtTA3G-CymR	19BF246+18BF067+18BF074	19BF246	18BF067	18BF074	19BF081	0.8	1:1:1:1
	19BF246+18BF067+19BF130	19BF246	18BF067	19BF130	19BF081	0.8	1:1:1:1
	19BF246+18BF067+19BF131	19BF246	18BF067	19BF131	19BF081	0.8	1:1:1:1
	19BF246+18BF068+18BF074	19BF246	18BF068	18BF074	19BF081	0.8	1:1:1:1
	19BF246+18BF068+19BF130	19BF246	18BF068	19BF130	19BF081	0.8	1:1:1:1
	19BF246+18BF068+19BF131	19BF246	18BF068	19BF131	19BF081	0.8	1:1:1:1
	19BF247+18BF067+18BF074	19BF247	18BF067	18BF074	19BF081	0.8	1:1:1:1
	19BF247+18BF067+19BF130	19BF247	18BF067	19BF130	19BF081	0.8	1:1:1:1
	19BF247+18BF067+19BF131	19BF247	18BF067	19BF131	19BF081	0.8	1:1:1:1
	19BF247+18BF068+18BF074	19BF247	18BF068	18BF074	19BF081	0.8	1:1:1:1
	19BF247+18BF068+19BF130	19BF247	18BF068	19BF130	19BF081	0.8	1:1:1:1
	19BF247+18BF068+19BF131	19BF247	18BF068	19BF131	19BF081	0.8	1:1:1:1
	18BF072+18BF067+18BF074	18BF072	18BF067	18BF074	19BF081	0.8	1:1:1:1
	18BF072+18BF067+19BF130	18BF072	18BF067	19BF130	19BF081	0.8	1:1:1:1
	18BF072+18BF067+19BF131	18BF072	18BF067	19BF131	19BF081	0.8	1:1:1:1
	18BF072+18BF068+18BF074	18BF072	18BF068	18BF074	19BF081	0.8	1:1:1:1
	18BF072+18BF068+19BF130	18BF072	18BF068	19BF130	19BF081	0.8	1:1:1:1
	18BF072+18BF068+19BF131	18BF072	18BF068	19BF131	19BF081	0.8	1:1:1:1
	PC	pRSV-Rev	pMD2.G	pMDLg/pRRE	19BF081	0.8	1:1:1:1

实施例 4：优化 rtTA-CymR、rev、VSV-G 和 gag/pol 片段在细胞基因组中稳定整合的比例

慢病毒的高效生产同时需要诱导后的高病毒基因表达量和恰当的各病毒基因的的相对表达比例。各基因的表达量主要受启动子或诱导响应元件的效率和在细胞基因组整合的拷贝数影响。转座子系统在细胞基因组中稳定整合目的核酸片段的效率受基因片段长度影响，越长的目的核酸片段整合效率越低，因此可以根据目的核酸片段长度调整构建稳定细胞系时各转座子质粒在瞬时转染时比例来优化各片段的整合比例。本实施例以实施例 3 优化的其中一组优选质粒组合 19BF075、19BF246、18BF068 和 19BF131 质粒为例，先通过调整 rev、VSV-G 和 gag/pol 单个包装基因质粒在细胞系构建瞬时转染的摩尔比例来确认转染质粒加入量和在宿主细胞基因组整合的拷贝数的关系以及对应构建细胞的产毒能力；再通过组合优化单个或多个关键基因在细胞系构建瞬时转染的摩尔比例确认最佳基因组整合拷贝数和摩尔比例。基

于本实施例所选质粒确认的最优基因组整合比例可以根据实施例 3 所示各启动子/响应元件在诱导后的产毒效率或以其它本公开未囊括的启动子/响应元件的对比表达效率推导出其它质粒设计和组合的优化插入拷贝数和摩尔比例，因此也在本实施例佐证的权利要求保护范围。

1. 调整单基因插入比例对包装细胞系的产毒影响

细胞培养、PEI 转染以及潮霉素药物筛选等实验流程参照实施例 2。将 293T 细胞按照 1.5E+06 个细胞每 60mm 培养皿接种，在 37℃、5% CO2 的环境下，培养在添加 10%FBS (ExCell，11H116) 的 DMEM (Sigma，D6429) 完全培养基中。培养 24 小时后以 PEI 方法并且按照表 8 所示各质粒含量进行转染（PEI 和 DNA 质量比 4：1）。转染后用 200μg/ml 潮霉素药物至少筛选细胞三代至细胞系稳定生长，构建 EuLV-R1 至 R17 共 17 种慢病毒包装细胞系。在各细胞系稳定后，参照实施例 3 中，24 孔板制备病毒方法，将 EuLV-R1 至 R17 细胞系以 1.5E+05 个细胞每孔接种于 24 孔板中，以 19BF081 质粒为转移载体质粒，通过 PEI 瞬时转染的方式转染上述 EuLV-R1 至 R17 细胞（19BF081 质粒：0.28μg、空质粒 18BF003：0.52μg，总质粒 0.80μg。PEI 和 DNA 质量比 4：1）。转染 6 小时后更换培养基并加入诱导剂（终浓度为 1μg/ml DOX，200μg/ml Cumate 和 5mmol/L 丁酸钠）诱导产毒 。48 小时后收集培养基上清液通过 HT1080 细胞 Luciferase 病毒滴度检测方法检测 EuLV-R1 至 R17 各细胞产毒滴度。

将 EuLV-R1 至 R17 按 1.5E+05 个细胞每孔接种于 24 孔板中，培养 48 小时后收集细胞抽提基因组 DNA 并用 qPCR 方法绝对定量 EuLV-R1 至 R5 细胞系基因组中整合 rtTA 和 CymR 基因的拷贝数，EuLV-R1 和 EuLV-R6 至 R9 细胞系基因组中整合 rev 基因的拷贝数；EuLV-R1 和 EuLV-R10 至 R13 细胞系基因组中整合 VSV-G 基因的拷贝数，EuLV-R1 和 EuLV-R14 至 R17 细胞系基因组中整合 gag/pol 基因的拷贝数，具体方法如下。收集上述细胞系各 1.0E+06 个细胞，并依照基因组 DNA 纯化试剂盒(TIANGEN，DP304-03) 说明提取基因组 gDNA，将纯化后 gDNA 用试剂盒洗脱缓冲液调整到 50ng/μl。将质粒 19BF074、18BF072 、18BF068 和 18BF074 分别做为 HygroR(检测 rtTA 和 CymR 拷贝数)、rev、VSV-G 和 gag/pol 基因的标准样品，分别用去离子水稀释到 47.9 ng/μl、23.8 ng/μl、30.0 ng/μl 和 47.6 ng/μl，此浓度下的各质粒对应 5.0E+09 拷贝数每微升样品。将 4 个标准样品进一步稀释到 8.0E+06 拷贝数每微升，并以此样品按两倍梯度稀释直到 1.56E+04 拷贝数每微升，将 4 个标准品的此 10 个稀释样品做为各个待检基因的 qPCR 标准曲线。将上述细胞 gDNA 样品和各基因 qPCR 标准曲线样品各 2 μl 加入 qCPR 反应试剂，包含 10 μl NovoStart Probe qPCR SuperMix 和 ROX I 染料 0.4 μl（Novoprotein Scientific Inc. E091-01A），浓度为 10 μM 正向、反向引物和 Taqman 探针各 0.4 μl （合成自通用生物系统（安徽）有限公司，具体引物探针序列信息见表 10，其中 HygroR 的正向、反向引物和探针分别为：SEQ ID NO:51、SEQ ID NO:52、SEQ ID NO:53；rev 的正向、反向引物和探针分别为：SEQ ID NO:54、SEQ ID NO:55、SEQ ID NO:56；VSV-G 的正向、反向引物和探针分别为：SEQ ID NO:57、SEQ ID NO:58、SEQ ID NO:59；gag/pol 的正向、反向引物和探针分别为：SEQ ID NO:48、SEQ ID NO:49、SEQ ID NO:50），并补水至 20 μl。在 ABI 7900 实时 PCR 检测仪上，选择 AQ 程序并依照 95℃ 5 分钟起始，95℃ 30 秒-60℃ 30 秒-72℃ 30 秒 40 个循环然后 60℃ 30 秒的条件进行 PCR 反应并基于标准曲线和样品 CT 值计算各样品中待测基因的拷贝数，所得数据再按照每细胞 6pg 基因组 DNA 计算每细胞基因拷贝数。

实验结果如图 7 所示，横坐标表示构建细胞时转染 4 质粒的摩尔比例；柱状图对应左侧纵坐标显示各细胞诱导产毒滴度 RLU 值，线图对应右侧纵坐标显示各细胞基因组中整合 HygroR（检测 rtTA 和 CymR 拷贝数）、rev、VSV-G 或 gag/pol 片段的拷贝数结果。结果显示（1）增高 $rtTA_{3G}$-CymR（HygroR 探针实验结果）和 rev 片段在细胞基因组的整合拷贝数对 EuLV 包装细胞系的病毒制备能力没有明显影响（图 7 A 和 7B）。（2）将 VSV-G 的基因组整合拷贝数从 1 拷贝每细胞提高至 2 拷贝每细胞时，产毒滴度从 6.5E+05 RLU 显著上升至 1.1E+06 RLU。但随着 VSV-G 基因组整合拷贝数达到 4 拷贝每细胞或以上时，产毒滴度逐渐下降，并且在基因组整合拷贝数达到 6 拷贝每细胞时降到 3.9E+05 RLU（图 7C）。说明诱导表达后 VSV-G 的细胞毒性可能随着基因组整合拷贝数的提高而提高，从而影响 EuLV 包装细胞系的产毒能力。（3）gag/pol 片段的整合拷贝数正向影响 EuLV 包装细胞系的产毒能力，产毒滴度随着 gag/pol 基因组插入拷贝数提高而提高，在达到 4.7 拷贝每细胞以上时达到最高的产毒滴度 1.6E+06 RLU，继续提高插入拷贝数至 6 以上无法进一步提高产毒能力（图 7D）。

2. 进一步调整 VSV-G 和 gag/pol 的基因组整合拷贝数和相对比例优化 EuLV 包装细胞系产毒能力

基于以上结果，VSV-G 和 gag/pol 片段在细胞基因组的整合拷贝数和摩尔比例是优化 EuLV 包装细胞系产毒能力的关键，需要进一步优化 VSV-G 和 gag/pol 片段的转染总量和摩尔比例。同上述使用 SB 转座子系统构建 EuLV 包装细胞系方法一致，基于表 9 所示各质粒含量进一步构建 EuLV-VG1 至 VG5 包装细胞系。在各细胞系经潮霉素筛选至稳定生长后，同上述 24 孔板慢病毒制备方法一致，以 19BF081 质粒为目的基因质粒制备病毒并通过 HT1080 细胞检测 luciferase 病毒滴度，同时如上述 qPCR 定量方法，检测各细胞系基因组 DNA 中每细胞 VSV-G 和 gag/pol 片段的整合拷贝数，实验结果如图 8 所示。

实验结果如图 8 所示，横坐标表示构建细胞时转染 4 质粒的摩尔比例；柱状图对应左侧纵坐标显示各细胞诱导产毒滴度 RLU 值；线图对应右侧纵坐标显示 gag/pol 和 VSV-G 片段在细胞基因组中整合拷贝数的比值，结果如下。在 EuLV-VG1 至 VG5 细胞中，当 gag/pol 片段在细胞基因组中整合拷贝数达到 5.2 个拷贝每细胞，gag/pol 和 VSV-G 片段在细胞基因组中整合拷贝数比值在 2.73 时(EuLV-VG2)，达到最大产毒滴度 2.8E+06 RLU。继续提高 gag/pol 和 VSV-G 片段整合拷贝数比值将降低包装细胞的产毒能力。基于此结果，gag/pol 片段在细胞基因组中整合拷贝数 2 至 8 个拷贝数每细胞， gag/pol 和 VSV-G 片段在细胞基因组中整合拷贝数比例在 1:1 至 4:1 之间，$rtTA_{3G}$-CymR 和 rev 片段至少在细胞基因组中整合一个拷贝数的情况下可以得到高产毒滴度的包装细胞系；进一步优选，gag/pol 片段在细胞基因组中整合拷贝数在 4 至 6 个拷贝数每细胞， gag/pol 和 VSV-G 片段整合比例在 2:1 至 3:1 之间，$rtTA_{3G}$-CymR 和 rev 片段至少在细胞基因组中整合一个拷贝数的情况下可以得到高产毒滴度的包装细胞系。

表 8. 构建 EuLV-R1 至 R17 包装细胞系瞬时转染各质粒含量

EuLV 细胞编号	摩尔比例	转染各质粒用量（μg）						
		19BF075	19BF246	18BF068	19BF131	19BF019	18BF003	总质粒量
R1	1:1:1:1	0.7	0.3	0.4	0.7	0.2	2.7	5.0
R2	2:1:1:1	1.3	0.3	0.4	0.7	0.2	2.1	5.0
R3	3:1:1:1	2.0	0.3	0.4	0.7	0.3	1.3	5.0
R4	4:1:1:1	2.6	0.3	0.4	0.7	0.3	0.7	5.0
R5	5:1:1:1	3.3	0.3	0.4	0.7	0.4	0	5.0
R6	1:2:1:1	0.7	0.6	0.4	0.7	0.2	2.4	5.0
R7	1:3:1:1	0.7	0.9	0.4	0.7	0.3	2	5.0

R8	1:4:1:1	0.7	1.2	0.4	0.7	0.3	1.7	5.0
R9	1:5:1:1	0.7	1.5	0.4	0.7	0.4	1.3	5.0
R10	1:1:2:1	0.7	0.3	0.8	0.7	0.2	2.3	5.0
R11	1:1:3:1	0.7	0.3	1.2	0.7	0.3	1.8	5.0
R12	1:1:4:1	0.7	0.3	1.7	0.7	0.3	1.3	5.0
R13	1:1:5:1	0.7	0.3	2.1	0.7	0.4	0.8	5.0
R14	1:1:1:2	0.7	0.3	0.4	1.3	0.2	2.1	5.0
R15	1:1:1:3	0.7	0.3	0.4	2.0	0.3	1.3	5.0
R16	1:1:1:4	0.7	0.3	0.4	2.6	0.3	0.7	5.0
R17	1:1:1:5	0.7	0.3	0.4	3.3	0.4	0	5.0

表 9. 构建 VG1 至 VG9 细胞系瞬时转染各质粒含量

EuLV 细胞编号	摩尔比例	转染各质粒用量（μg）						
		19BF075	19BF246	18BF068	19BF131	19BF019	18BF003	总质粒量
VG1	3:3:1:12	0.8	0.4	0.2	3.2	0.3	0.1	5.0
VG2	3:3:2:12	0.8	0.4	0.3	3.1	0.3	0.1	5.0
VG3	3:3:3:12	0.8	0.4	0.5	3.0	0.4	0	5.0
VG4	3:3:4:12	0.7	0.3	0.6	2.9	0.4	0.1	5.0
VG5	3:3:5:12	0.7	0.3	0.8	2.8	0.4	0	5.0

表 10. 引物和 Taqman 探针序列的信息表

SEQ ID NO:	名称	序列(5'to3')	纯化方式	5'修饰	3'修饰
48	Gag-taqman-F01	GGAGCTAGAACGATTCGCAGTTA	PAGE		
49	Gag-taqman-R01	TGATCCTGTCTGAAGGGATGGT	PAGE		
50	Gag-Probe-01	TCCTGGCCTGTTAGAAA	HPLC	FAM	MGB
51	Hygro-taqman-F01	TGCTCCGCATTGGTCTTGA	PAGE		
52	Hygro-taqman-R01	CTTCGGACGATTGCATCACA	PAGE		
53	Hygro-Probe-01	ATGCTGCTTGGGCGC	HPLC	FAM	MGB
54	REV-taqman-F01	AGGAATAGAAGAAGAAGGTGGAGAGA	PAGE		
55	REV-taqman-R01	GCACAGGCTCCGCAGATC	PAGE		
56	REV-Probe-01	ATTCGATTAGTGAACGGATC	HPLC	FAM	MGB
57	VSVG-taqman-F01	ATTGCCCGTCAAGCTCAGAT	PAGE		
58	VSVG-taqman-R01	CCGTCTGCTTGAATAGCCTTGT	PAGE		
59	VSVG-Probe-01	TACAAGTCAAAATGCCCAAGAG	HPLC	FAM	MGB

实施例 5：EuLV293T3rd 慢病毒包装细胞系构建及高通量单克隆筛选

EuLV293T3rd 慢病毒包装细胞系构建流程如图 9 所示，包括质粒转染及细胞筛选，单克隆筛选和悬浮适应 3 个步骤。实验细节及结果如下详细描述。

1.通过质粒转染及细胞系筛选构建初始 EuLV293T3rd 慢病毒包装细胞系

具体实验方法如下。细胞培养、PEI 转染以及潮霉素筛选等实验流程参照实施例 2、3 和 4。将 293T(ATCC ,CRL3216)细胞按 1.5E+06 个细胞每培养皿接种于 60mm 培养皿中 ,培养基为 3ml 添加 10% FBS (ExCell，11H116)的 DMEM(Sigma，D6429)完全培养基，在 37℃ 5%CO_2 条件下培养 24 小时。以 PEI 转染法进行质粒转染，总质粒量为 5μg，PEI 和总质粒质量比为 4:1,其中按照质粒 19BF257:19BF246:18BF067:19BF130:18BF019 摩尔比例为 3:3:2:12:2 进行转染构建 EuLV293T3rd-SB16 细胞；按照质粒 19BF075:19BF246:18BF068:19BF131:18BF019 摩尔比例为 3:3:2:12:2 进行转染构建

EuLV293T3rd-SB28。转染 24 小时后，将细胞全部接种至 100mm 培养皿中继续培养，并加入 200μg/ml 潮霉素 (生工 A600230-0001)进行筛选。维持此筛选压力至少传代培养 3 代至细胞系稳定，判断依据为：(1)细胞生长速度与原始 293T 细胞一致；(2)SB 转座酶表达质粒 18BF019 在构建细胞中基本消失，表现为 ECFP 阳性细胞比例跌至 1%以下；(3)细胞活率在 95%以上。基于以上标准筛选得到 Tet-On 单诱导表达系统调控的 EuLV293T3rd-SB16 (简称 SB16 细胞)和 Tet-On 和 Cumate 复合诱导表达系统调控的 EuLV293T3rd-SB28 (简称 SB28 细胞)初始细胞系。

2.筛选 EuLV293T3rd-SB16 和 EuLV293T3rd-SB28 高产单克隆包装细胞株

具体实验方法如下。SB16 和 SB28 高产单克隆细胞株筛选流程如图 9 所示，首先将 SB16 和 SB28 细胞以极限稀释法按照 1 个细胞每孔接种至共 10 块 384 孔板进行首轮筛选，筛选依据为：(1)有且只有一个单克隆细胞；(2)细胞形态正常；(3)细胞生长速度与原始 293T 细胞相同。然后以 HT1080 细胞 Luciferase 病毒滴度检测法分别在细胞扩增至 96 孔板、24 孔板、和 6 孔板培养体系时检测各单克隆细胞诱导产毒滴度。

图 10 为各筛选阶段单克隆细胞产毒滴度与标准品比值的分布情况。按照 HT1080 细胞 Luciferase 病毒检测方法检测单克隆细胞产毒滴度 RLU 值并按照 500 为间隔在 0 至 100000 之间统计每个区间范围内单克隆数，横坐标为每个区间的上限值与标准品检测 RLU 值的比值（以 2 为底的对数表示），纵坐标为各统计范围内单克隆细胞数。图 10A 为 SB16 细胞系筛选结果，分别在 96 孔板、24 孔板和 6 孔板筛选步骤中选出 94、30 和 9 株单克隆细胞，图 10B 为 SB28 细胞系筛选结果，分别在 96 孔板、24 孔板和 6 孔板筛选步骤中选出 87、30 和 9 株单克隆细胞。细胞筛选具体操作方法如下所述。

384 孔板单克隆筛选，具体实验步骤如下。以 DMEM 完全培养基在 37℃，5% CO_2 条件下分别培养上述构建的 SB16 与 SB28 初始细胞细胞至单层 70%汇合度。使用有限稀释法，按照每孔一个细胞的密度将细胞接种于 384 孔板中，SB16 和 SB28 两种细胞各接种 5 块 384 孔板。接种 2 小时待细胞贴壁后，利用倒置显微镜 (Olympus IX71) 观察并标记有且只有一个细胞的样品孔，舍弃其他样品孔。接种后第 5 天和第 9 天更换新鲜的 DMEM 完全培养基，第 10 天将汇合度大于 50%的单克隆细胞按每孔 2E+04 个细胞接种至 96 孔板中，共获得 SB16 单克隆细胞 271 株和 SB28 细胞单克隆 313 株。

96 孔板单克隆筛选，具体实验步骤如下。将 384 孔板单克隆筛选步骤所得细胞培养 24 小时后，按照每孔 5E+03 和 2.5E+04 个细胞接种于两块新的 96 孔板中，分别用于传代培养和慢病毒诱导产毒检测。在单克隆细胞诱导产毒步骤中，设置通过瞬时转染 293T 细胞方法制备慢病毒阳性对照，方法如下：将 293T 细胞按 2.5E+04 个细胞每孔接种于 96 孔板中，培养 24 小时后通过 PEI 方法瞬时转染质粒制备病毒(总 DNA 量为 0.3μg，其中质粒 19BF081:pMD2.G:pMDLg/PRRE:pRSV-Rev 的摩尔比例为 1:1:1:1，总 DNA 与 PEI MAX 的质量比为 1:4)。转染 2 小时后，加入诱导剂(终浓度为 2mmol/L 丁酸钠，1μg/ml DOX，200μg/ml Cumate)，并继续培养 48 小时后，通过 4500rpm 离心 15 分钟方法收集上清病毒。96 孔板单克隆细胞诱导产毒方法如下：将上述按 2.5E+04 个细胞每孔接种于 96 孔板的待测单克隆细胞继续培养 24 小时后，加入转染试剂(总 DNA 量为 0.3μg，其中 19BF081 加入量和上述阳性对照一致，剩余质粒量用 18BF003 补至 0.3μg，总 DNA 与 PEI MAX 的质量比为 1:4)。之后诱导产毒及回收病毒上清液的方法和上述阳性对照制备方法一致。按照实施例 2 所述 HT1080 细胞 Luciferase 病毒滴度检测方法检测阳性对照和各单克隆细胞诱导产毒样品的 RLU 值。之后根据 Luciferase 病毒滴度结果，从高到低依次挑选出 RLU 值高于阳性对照的单克隆细胞，获得 SB16 单克隆细胞 87 株和 SB28 细胞单克隆 94 株。

24 孔板和 6 孔板单克隆筛选，具体实验步骤如下。24 孔板与 6 孔板高产单克隆细胞筛选流程同上述 96 孔板单克隆筛选基本一致。其中传代时，24 孔板接种密度为每孔 2E+04 个细胞，6 孔板为 2E+05 个细胞。在单克隆细胞诱导产毒步骤中，24 孔板接种密度为每孔 1E+05 个细胞，6 孔板接种密度为 8E+05 个细胞。用 PEI 方法转染质粒时，24 孔板每孔总 DNA 量为 1.2μg，6 孔板为 5μg，其它转染条件如各质粒比例及 DNA 与 PEI 的比例与上述实验方法一致。根据 HT1080 细胞 Luciferase 病毒滴度检测方法结果，在 24 孔板单克隆筛选阶段，进一步从 87 株 SB16 和 94 株 SB28 单克隆细胞中各筛选 30 株高产包装细胞株。在 6 孔板单克隆筛选阶段，又从各自 30 株细胞中进一步筛选出 SB16 和 SB28 单克隆高产包装细胞各 9 株，最终筛选单克隆细胞编号如表 11 所示。

表 11. 高产包装细胞克隆编号列表

EuLV293T^{3rd}-SB16 高产克隆编号	**EuLV293T^{3rd}-SB28 高产克隆编号**
EuLV293T^{3rd}-SB16-3A5	EuLV293T^{3rd}-SB28-1A3
EuLV293T^{3rd}-SB16-3C1	EuLV293T^{3rd}-SB28-1C2
EuLV293T^{3rd}-SB16-3C3	EuLV293T^{3rd}-SB28-1C3
EuLV293T^{3rd}-SB16-3C4	EuLV293T^{3rd}-SB28-1C4
EuLV293T^{3rd}-SB16-3D3	EuLV293T^{3rd}-SB28-1C6
EuLV293T^{3rd}-SB16-4A1	EuLV293T^{3rd}-SB28-2B5
EuLV293T^{3rd}-SB16-4A5	EuLV293T^{3rd}-SB28-2C3
EuLV293T^{3rd}-SB16-4B1	EuLV293T^{3rd}-SB28-2C6
EuLV293T^{3rd}-SB16-4C4	EuLV293T^{3rd}-SB28-2D1

3.高产 EuLV293T3rd 单克隆包装细胞悬浮适应及病毒包装能力检测

具体实验方法如下。将表 11 中得到的 18 株单克隆细胞按 5E+05 细胞/ml，每瓶 20ml 接种至 125ml 摇瓶(Corning 431143)中进行悬浮适应，培养基为 Freestyle293 (Gibco®FreeStyle™ 293Expression Medium 12338018)，培养条件为 37℃，5% CO_2，1.9cm 摇距摇床，转速 140rpm。细胞生长至 2.5E+06 细胞/ml 时进行传代，连续培养至无明显细胞结团并且倍增时间小于 24 小时后，得到上述 18 株细胞的悬浮培养细胞系。悬浮培养的 SB16 和 SB28 细胞系的病毒制备方法如下。将上述细胞悬浮培养至 2.5E+06 细胞/ml 密度后，以 1000rpm 离心 3 分钟收获细胞，并用新鲜的 Freestyle293 培养基重悬并调整细胞密度至 4E+06 细胞/ml。将细胞悬液按每孔 0.5ml 转移至 96 深孔板中，加入以 DMEM 培养基配制的 50μL PEI 转染试剂，其中包含 7.5μg PEI MAX 和 2.5μg 总 DNA（其中含有 1μg 18BF081 和 1.5μg 18BF003）。混匀后在培养摇床上继续培养，培养条件为 37℃，5% CO2，1.0cm 摇距摇床，转速 1000rpm。两小时后，加入诱导剂(终浓度为 2mmol/L 丁酸钠，1μg/ml DOX，200μg/ml Cumate)，继续培养 48 小时后，通过 1500rpm 离心 15 分钟并收集上清病毒。之后依照实施例 2 所述 HT1080 细胞 Luciferase 病毒滴度检测方法检测病毒滴度。检测结果如图 11 所示，横坐标为单克隆编号，纵坐标为滴度检测结果，以 RLU 表示。结果显示所有单克隆细胞都能适应无血清悬浮培养条件，不同单克隆细胞在悬浮培养条件下瞬时转染 19BF081 质粒的产毒滴度在 9.96E+04 至 4.68E+06 RLU 之间，平均滴度为 8.56E+05 RLU，中位值为 5.7E+05 RLU。

实施例 6：EuLV293T3rd 最优产毒包装细胞株优化程度检测

将实施例 5 中筛选出的最优产毒单克隆包装细胞株，在通过瞬时转染转移载体质粒包装慢病毒的同时，共转其它由组成型活性启动子调控的 rev、gag/pol、VSV-G 慢病毒包装基因表达质粒，检测继续增加病毒包装基因的表达能否进一步增加包装细胞的产毒滴度，从而判断细胞株中各包装基因片段是否已达到饱和以及各病毒包装基因片段相对比例是否达到最优化。从实施例 5 中选取 6 株高产贴壁细胞株和 5 株高产悬浮细胞株进行上述实验。细胞株名称编号如表 12 所示。

表 12. EuLV293T3rd 优选高产贴壁培养细胞株和悬浮培养细胞株编号

序号	贴壁培养高产细胞株编号	悬浮培养高产细胞株编号
1	EuLV293T3rd-SB16-3A5	Sus-EuLV293T3rd-SB16-3C3
2	EuLV293T3rd-SB16-3C3	Sus-EuLV293T3rd-SB16-3D3
3	EuLV293T3rd-SB16-4A5	Sus-EuLV293T3rd-SB16-4A5
4	EuLV293T3rd-SB28-1A3	Sus-EuLV293T3rd-SB28-1A3
5	EuLV293T3rd-SB28-1C2	Sus-EuLV293T3rd-SB28-1C2
6	EuLV293T3rd-SB28-2C6	

贴壁培养高产细胞株慢病毒包装基因补充实验：将表 12 所示贴壁高产细胞株培养在 37℃、5% CO_2 环境下，培养基为 DMEM 完全培养基。之后将每种细胞分别按照 8E+05 个细胞每孔接种于 6 孔板的不同孔中，依照实施例 2 中磷酸钙转染方法进行转染实验。转染时每孔加入 200μL 转染试剂，含有 0.12mol/L 的氯化钙，1xHEPES 缓冲液 和 6.8μg 的总质粒量。各实验组质粒加入组合及含量参照表 13，其中 18BF084 质粒表达 $rtTA_{adv}$ 反式激活物；19BF081 为转移质粒转录携带 hPGK-Luciferase-IRES-EGFP 目的核酸片段的慢病毒基因组；pMD2.G (Addgene，12259)表达 VSV-G 蛋白；pMDLg/pRRE 表达 gag 和 pol 蛋白；pRSV-Rev 表达 rev 蛋白。转染 6 小时后，更换培养基为含有 5mM 丁酸钠的 DMEM 完全培养基并按照表 13 中需要加入诱导剂的样品中加入 1μg/ml DOX 和 200μg/ml Cumate 诱导剂。继续培养 48 小时后，按照实施例 2 所述 HT1080 细胞 Luciferase 病毒滴度检测方法检测各贴壁细胞株慢病毒产毒能力，结果如图 12 所示。横坐标为各实验组质粒转染组合，纵坐标为对应实验组感染 HT1080 细胞表达 Luciferase 的 RLU 值。图中虚线标注为该贴壁细胞株在此条件下仅瞬转 19BF081 转移质粒诱导产毒的滴度结果 RLU 值，图中实线为 293T 的阳性对照结果。结果表明：6 株包装细胞在未补充慢病毒包装基因时，转染滴度在 9.9E+05 RLU 至 5.8E+06 RLU 之间。在补充 rev、VSV-G、gag/pol 等慢病毒包装基因后，多数高产细胞株（如 EuLV293T3rd-SB28-1A3 和 EuLV293T3rd-SB28-1C2）的产毒滴度没有进一步显著增长。而产毒能力提升较大的细胞都是初始产毒滴度较低的细胞。多数细胞株在进一步补充 rtTA、rev、VSV-G、gag/pol 单一基因或多个基因后产毒滴度都有不同程度下降，仅有部分细胞株受益于进一步补充 gag/pol 基因，说明多数筛选所得细胞株的包装基因比例已达到充分优化，再进一步补充病毒包装基因反而会降低细胞株产毒滴度，另外也再次证明 gag/pol 的插入拷贝数以及表达量对细胞株产毒滴度的重要性。

悬浮培养高产细胞株包装基因补充实验：将表 12 所示悬浮细胞株培养在 37℃、8% CO_2，摇床摇距为 1.9cm，转数为 140 rpm 的环境中，培养基为 FreeStyle (Gibco® FreeStyle™ 293 Expression Medium，12338018)。在转染前 2 小时，将各悬浮细胞株按照 4E+06 个细胞每孔接种于 96 孔深孔板中，培养体积为 1ml。按照实施例 5 中 PEI 方法转染细胞，转染时每孔加入 100μL 转染样品，含有 2.5μg 的总质粒量，7.5μg 的 PEI。各实验组质粒加入量参照表 14。转染后将深孔板培养在摇距为 1mm，转数为 1000rpm/min 的环境中。转染 3 小时后，加入终浓度为 2mM 的丁酸钠，并按表 14 中需要加入诱导剂的样品中加入 1μg/ml DOX 和 200μg/ml Cumate 诱导剂。继续培养 48 小时后，按照实施例 2 所述 HT1080 细胞 Luciferase 慢病毒滴度检测方法检测各悬浮细胞的产毒能力。结果如图 13 所示。横坐标为各实验组质粒转染组合，纵坐标为对应实验组感染 HT1080 细胞表达 Luciferase 的 RLU 值。图中虚线标注为该悬浮细胞株在此条件下仅瞬转 19BF081 转移质粒诱导产毒的滴度结果 RLU 值，图中实线为 293T 的阳性对照结果。结果

表明：5 株悬浮细胞在未补充慢病毒包装基因时，RLU 结果在 8.9E+05 RLU 至 4.0E+06 RLU 之间。在补充 rev、VSV-G、gag/pol 等慢病毒包装基因后，多数高产细胞的产毒滴度没有进一步显著增长。而产毒能力提升较大的细胞都是初始产毒滴度较低的细胞。多数细胞株在进一步补充 rtTA、rev、VSV-G、gag/pol 单一基因或多个基因后产毒滴度都有不同程度下降，仅有部分细胞受益于进一步补充 gag/pol 基因，说明多数筛选所得细胞株的包装基因比例已达到充分优化，再进一步补充病毒包装基因反而会降低细胞株产毒滴度。

表 13. 贴壁培养高产细胞株慢病毒包装基因补充实验中各实验组质粒名称及用量

编号	实验组	诱导剂	转染质粒量(μg)						
		DOX & Cumate	18BF084 (μg)	pMD2.G (μg)	pRSV-Rev (μg)	pMDLg/pRRE (μg)	18BF081 (μg)	18BF003 (μg)	总质粒量 (μg)
1	阴性对照	-	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
2	无诱导	-	0.00	0.00	0.00	0.00	2.26	4.54	6.80
3	诱导	+	0.00	0.00	0.00	0.00	2.26	4.54	6.80
4	$rtTA_{adv}$	+	2.26	0.00	0.00	0.00	2.26	2.28	6.80
5	VSV-G	+	0.00	0.76	0.00	0.00	2.26	3.78	6.80
6	rev	+	0.00	0.00	0.49	0.00	2.26	4.05	6.80
7	gag/pol	+	0.00	0.00	0.00	1.03	2.26	3.51	6.80
8	VSV-G+rev	+	0.00	0.76	0.49	0.00	2.26	3.29	6.80
9	VSV-G+gag/pol	+	0.00	0.76	0.00	1.03	2.26	2.75	6.80
10	rev+ gag/pol	+	0.00	0.00	0.49	1.03	2.26	3.02	6.80
11	VSV-G+rev +gag/pol	+	0.00	0.76	0.49	1.03	2.26	2.26	6.80
12	VSV-G+rev +gag/pol	-	0.00	0.76	0.49	1.03	2.26	2.26	6.80
293T-PC	贴壁 293T 瞬时转染阳性对照	-	0.00	1.51	0.97	2.06	2.26	0.00	6.80

表 14. 悬浮培养高产细胞株慢病毒包装基因补充实验中各实验组质粒名称及用量

编号	实验组	诱导剂	转染质粒量(μg)						
		DOX & Cumate	18BF084 (μg)	pMD2.G (μg)	pRSV-Rev (μg)	pMDLg/pRRE (μg)	18BF081 (μg)	18BF003 (μg)	总质粒量 (μg)
1	阴性对照	-	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
2	无诱导	-	0.00	0.00	0.00	0.00	1.00	1.50	2.50
3	诱导	+	0.00	0.00	0.00	0.00	1.00	1.50	2.50
4	$rtTA_{adv}$	+	1.00	0.00	0.00	0.00	1.00	0.50	2.50
5	VSV-G	+	0.00	0.25	0.00	0.00	1.00	1.25	2.50
6	rev	+	0.00	0.00	0.15	0.00	1.00	1.35	2.50
7	gag/pol	+	0.00	0.00	0.00	0.34	1.00	1.16	2.50
8	VSV-G+rev	+	0.00	0.25	0.15	0.00	1.00	1.10	2.50
9	VSV-G+gag/pol	+	0.00	0.25	0.00	0.34	1.00	0.91	2.50
10	rev+ gag/pol	+	0.00	0.00	0.15	0.34	1.00	1.01	2.50
11	VSV-G+rev +gag/pol	+	0.00	0.25	0.15	0.34	1.00	0.76	2.50
12	VSV-G+rev +gag/pol	-	0.00	0.25	0.15	0.34	1.00	0.76	2.50
293T-PC	贴壁 293T 瞬时转染阳性对照	-	0.00	0.50	0.30	0.70	1.00	0.00	2.50

实施例 7：基于高产包装细胞株 EuLV293T3rd-SB16-3D3 和 EuLV293T3rd-SB28-1C2 构建多种慢病毒生产细胞系

本实施例将含有 3 种不同目的核酸片段的转移载体质粒分别通过 PB 转座子系统稳定整合在 EuLV293T3rd-SB16-3D3（以下简称 3D3）和 EuLV293T3rd-SB28-1C2（以下简称 1C2）包装细胞的基因组中，并分别筛选得到稳定生产 3 种不同慢病毒的 6 种慢病毒生产细胞系。上述 3 种携带目的核酸片段

的病毒基因组转录盒的转移载体质粒分别为：(1) 19BF081 (hPGK-Luciferase-IRES-EGFP，慢病毒基因组长度 5.7kbp)；(2) 19BF218 (缺失 B 蛋白结构域的凝血因子 8 序列，CMV-BDDF8cHA-IRES-EGFP，慢病毒基因组长度 8.5kbp)；(3) 19BF217 (凝血因子 8 全长序列，CMV-F8cHA-IRES-EGFP，慢病毒基因组长度 11.2kbp)。为了方便检测以上生产细胞系的慢病毒产毒滴度，上述目的核酸片段都连接了 IRES-EGFP 序列，详细质粒构建方法参照实施例 1。之后这些稳定慢病毒生产细胞系的产毒能力在贴壁培养条件下和相同转移质粒通过瞬时转染 293T 生产慢病毒方法做对比。之后选取基于 3D3 和 1C2 构建的携带 19BF081 转移载体的两种细胞在无血清培养基条件下进行悬浮培养适应，并在此条件下检测诱导后产毒滴度和无诱导条件下泄露产毒滴度。本公开所述构建稳定慢病毒生产细胞系的方法可用于构建任何目的核酸片段的慢病毒稳定生产细胞系。

基于 3D3 和 1C2 细胞构建稳定生产 3 种不同慢病毒的生产细胞系，具体实验方法如下。将 3D3 和 1C2 细胞按 1.5E+06 细胞每孔接种于 6 孔板中，培养基为 3ml DMEM 完全培养基，在 37℃ 5% CO_2 条件下培养 24 小时后，按照 PEI 方法进行转染，总质粒量为 5.5μg，其中按照转移质粒和 PB 转座酶质粒（18BF031）摩尔比 10:1 进行转染，PEI 总量为 22μg。其中转移质粒分别为 19BF081，19BF218 和 19BF217。转染后 24 小时加入 2.5μg/ml 嘌呤霉素(Puromycin，阿拉丁 P113126)筛选至少 3 代至细胞稳定，共得到 6 株稳定慢病毒生产细胞系，分别为 3D3-19BF081、3D3-19BF218、3D3-19BF217、1C2-19BF081、1C2-19BF218 和 1C2-19BF217。

稳定慢病毒生产细胞系产毒方法和瞬时转染产毒方法的产毒能力对比，具体实验方法如下。将上述筛选得到的 6 种细胞按 8E+05 细胞每孔接种于 6 孔板中，培养基为 DMEM 完全培养基，在 37℃ 5% CO_2 条件下培养 24 小时后更换新的 DMEM 完全培养基并加入诱导剂(终浓度为 2mmol/L 丁酸钠，1μg/ml DOX 和 200μg/ml Cumate)。继续培养 48 小时后用 4500rpm 离心 15 分钟方法收集病毒上清液。通过瞬时转染 293T 细胞制备病毒方法和实施例五所述阳性对照慢病毒制备方法一致，其中转移载体质粒:pMD2.G:pMDLg/PRRE:pRSV-Rev 的摩尔比例为 1:1:1:1，转移载体质粒分别为 19BF081，19BF218 和 19BF217。

基于 HT1080 细胞 EGFP 阳性率方法检测以上病毒样品转染滴度，具体实验方法如下。将 HT1080 细胞(ATCC CCL-121)，按照 5E+04 个细胞每孔接种于 24 孔板(Corning 3524)中，培养条件与 293T 相同。24 小时后取至少 3 孔用胰蛋白酶消化并计数，其他孔更换为 500μL 含有 8μg/mL polybrene (Sigma H9268) 的 DMEM 完全培养基。将病毒液用 DMEM 完全培养基稀释至多个检测浓度，然后在培养 HT1080 细胞的 24 孔板中加入 100μL 稀释病毒液，每种病毒样品检测多个稀释浓度，阴性对照加入 100μL DMEM 完全培养基，混匀后培养 48 小时。之后使用流式细胞仪(艾森 NovoCyte Flow Cytometer)检测各孔 EGFP 阳性率。选择 EGFP 阳性率在 15%~30%的稀释度按照以下公式计算慢病毒滴度。慢病毒滴度(TU/ml)=稀释倍数×(24 孔板细胞计数结果×阳性率)/0.1ml。实验结果如图 14 所示。结果显示稳定慢病毒生产细胞

系产毒方法的产毒滴度显著高于瞬时转染 293T 细胞方法的产毒滴度。基于两种不同诱导表达策略构建的 3D3 和 1C2 细胞所构建的 6 种最终生产细胞的产毒滴度都显著高于对应的瞬时转染 293T 阳性对照。携带 19BF081(5.7kb)、19BF217（11.2kb）和 19BF218(8.5kb)转移载体的三种 3D3 慢病毒稳定生产细胞系的产毒滴度分别为 1.11E6 TU(EGFP)/ml、2.33E5 TU(EGFP)/ml 和 1.05E6 TU(EGFP)/ml，分别是瞬时转染阳性对照的 6.14、8.27 和 5.01 倍；携带以上 3 种转移载体的三种 1C2 慢病毒稳定生产细胞系的产毒滴度分别为 1.59E6 TU(EGFP)/ml、3.55E5 TU(EGFP)/ml 和 1.81E6 TU(EGFP)/ml，分别是瞬时转染阳性对照的 8.81、12.6 和 8.62 倍。此外稳定慢病毒生产细胞系在表达长目的核酸片段时产毒滴度对比瞬时方法对照能高 1 个数量级以上，有更大的行业应用范围，比如在使用基因治疗方法治疗血友病时构建表达全长凝血因子 8 的慢病毒载体（以 19BF217 为例）。

在悬浮培养条件下检测 3D3-19BF081 和 1C2-19BF081 细胞的产毒滴度和泄露病毒滴度，具体实验方法如下。按照实施例 5 中所述细胞悬浮适应方法将 3D3-19BF081 和 1C2-19BF081 细胞适应悬浮培养。当悬浮细胞生长至 2.5E+06 细胞/ml 时，用 1000rp/min 离心 3 分钟方法收获细胞，并用新鲜的 Freestyle293 培养基将细胞密度调整至 4E+06 细胞/ml。将细胞悬液按照每管 5ml 转移至 50ml 离心管中，设置加入诱导剂(终浓度为 2mmol/L 丁酸钠，1μg/ml DOX，200μg/ml Cumate) 的诱导组和加入 DMEM 培养基的无诱导组，之后置于细胞培养摇床上继续培养 48 小时后，用 4500rpm 离心 15 分钟方法收集上清病毒。阳性对照为瞬时转染在同样悬浮培养条件培养的 293T 细胞的方法制备的病毒，具体方法如下。以 PEI 转染法进行质粒转染，总质粒量为 12.5μg，PEI 和总质粒质量比为 4:1，其中质粒 19BF081:pMD2.G:pMDLg/PRRE 1:pRSV-Rev 的摩尔比例为 1:1:1:1。转染 6 小时后，加入终浓度 2mmol/L 丁酸钠，并继续培养直至离心回收病毒样品。之后按照实施例 2 所述 HT1080 细胞 Luciferase 病毒滴度检测方法检测各样品 RLU 值，结果如图 15 所示。结果显示 3D3-19BF081 和 1C2-19BF081 细胞都能较好的适应悬浮培养条件，在诱导后分别到达 7.08E6 RLU 和 1.08E7 RLU 的病毒滴度，是瞬时转染悬浮 293T 细胞方法制备病毒的 3.72 倍和 5.8 倍。在无诱导条件下，两种细胞的泄露产毒滴度的 RLU 荧光值和不含有 19BF081 载体的原始细胞和 293T 细胞的背景 RLU 值基本一致，基于本实验结果测得 3D3-19BF081 和 1C2-19BF081 细胞的诱导/泄露产毒滴度比例分别为 5853 和 41646 倍。