

基因治疗微链载体的构建及表达分析

王红胜, 李小青, 何玉文, 谢白露, 唐雯莹, 杜军

中山大学药学院 微生物与生化药学实验室, 广州 510080

摘要: 基因载体的转染、表达效率低和存在安全问题是基因治疗的难点。由于传统病毒及质粒载体含有大量外源基因, 其表达有可能引发较严重免疫副反应。本课题旨在新的设计思路上开发高效安全基因治疗载体。微链载体利用设计好的 Cap 序列封闭基因表达框两端, 起到防止细胞内核酸外切酶降解的作用。从 pEGFP-N3 质粒中分离纯化得到 GFP 基因作为微链载体的报告基因。将微链载体与原质粒载体(pEGFP-N3 质粒)分别转染入真核细胞, 利用荧光显微镜和流式细胞仪检测并比较其转染效率。结果显示微链载体在 293、CNE2、3T3、B95-8 等真核细胞中的转染、表达效率较高, 并具有较小的细胞毒性。初步证实了微链载体在真核细胞中转染、表达效率及安全性等方面具有一定的优越性。

关键词: 微链载体, GFP, 基因治疗

Construction and Expression Analysis of Micro-linear Vector as a New General Gene Therapy Vector

Hongsheng Wang, Xiaoqing Li, Yuwen He, Bailu Xie, Wenying Tang, and Jun Du

Center of Microbiology, Biochemistry and Pharmacology, School of Pharmaceutical Sciences, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China

Abstract: The most difficult field in gene therapy is that vector system should offer both a means of successful transfection and a maximum of safety for the patient. Viral vectors and plasmid vectors are traditional vectors; they may cause unwanted immunological side effects resulting from the expression of nontherapeutic genes. Our aim is to develop a new general gene therapy vector which is suggested to be called as Micro-Linear Vector. The gene expression cassette is capped by our designed cap, including promoter, enhancer, objective gene, and RNA-stabilizing sequence, so it can defend the exonuclease in the eukaryotic cell, at the same time, DNA not encoding the objective gene is reduced to a minimum. The GFP gene is separated from the pEGFP-N3 plasmid, and acts as a reporter gene to construct the Micro-Linear Vector, then both the new vector and the plasmid are transfected to cells, the results are tested by fluorescence microscope and flow cytometry. The results show that the Micro-Linear Vector has a high effective of transfection and safety in 293, 3T3, CNE2 and B95-8 cell lines, at the same time it is less toxicity than the plasmid. We can get the rudiments of conclusion that Micro-Linear Vector has high effect of the transfection and more safety than tradition plasmid in eukaryotic cell.

Keywords: Micro-Linear vector, GFP, gene therapy

Received: October 25, 2007; **Accepted:** January 21, 2008

Supported by: the National Natural Science Foundation in China (Nos. NSFC-30471978, NSFC-30672510) and Natural Scientific Foundation of Guangdong Province (No. 5001771).

Corresponding author: Jun Du. Tel: +86-20-87333066; Fax: +86-20-87333066; E-mail: dujun@mail.sysu.edu.cn

国家自然科学基金 (No. 30471978; 30672510), 广东省自然科学基金(No. 5001771) 资助。

目前,基因治疗的难点是载体的转染、表达效率低和存在安全隐患。安全有效的基因治疗载体是现今基因治疗研究领域的重点。病毒载体目前仍然是用于基因治疗的主要载体。病毒成分在宿主细胞内复制极易引发机体产生不同程度的免疫反应,而且存在插入突变等致癌、致毒风险。非病毒载体虽然不会整合入宿主细胞染色体中,其安全性可能优于病毒载体,同时具有无传染性、不限制载体容量、可大量制备等优点。但目前非病毒载体仍面临两大难题:首先,非病毒型载体是通过内吞方式将目的基因导入细胞,进入胞质的内吞小泡很快被溶酶体融合并被其释放的各种酶系所降解。由此产生的后果将是严重影响目的基因的表达及其在基因治疗中的实际用价值。其次,源于载体的非宿主 DNA 表达产物特别是 CpG 序列的大量存在可能引发宿主免疫反应。所以研发具有稳定性、安全性和靶向性的非病毒载体的研究日益受到重视。

我们拟构建新型微链载体,在目的基因的线性表达框(含有目的基因启动子及增强子、目的基因、polyA 稳定序列)两端加上 Cap 保护序列,该 Cap 序列模拟真核细胞中 tRNA 中较稳定的 c 环设计,封闭线性 DNA 两端的线性缺口,可有效地防止体内核酸外切酶的降解,增强微链载体在细胞内的稳定性。其分子量仅为一般质粒载体的 1/3 甚至更小,仅含很少量的外源序列,且基本不含有被认为是引发基因治疗免疫毒性反应主要原因的 CpG 序列^[1,2]。同时,可利用 PCR 方法扩增微链载体防止质粒载体提取过程当中摄入细菌内毒素的问题。

我们选用 pEGFP-N3 质粒中的 GFP 基因作为报告基因构建微链载体。GFP 基因能在真核细胞种表达绿色荧光蛋白(GFP),将微链载体与 pEGFP-N3 质粒分别转染进入 293、CNE2、3T3、B95-8 等真核细胞株,可用荧光显微镜和流式细胞仪等较为简单的方法检测其表达效率。

1 实验材料和方法

1.1 主要质粒、试剂及仪器

pEGFP-N3 质粒,大肠杆菌菌株 DH5 α ,细胞株 CNE2、3T3、B95-8、293 细胞由本实验室保种。Cap 序列、PCR 引物由上海生工生物工程技术服务有限公司合成,限制性内切酶 *Ase* I、*Afl* II 购自晶美公司, *Exo* III 外切酶、T4 连接酶购自 TaKaRa 公司, Ligation High 连接酶购自日本 TOYOBO 公司,琼脂糖粉来自 Shanghai Yito Enterprise Company,小牛血清购自北京鼎国生物技术有限公司,细胞转染试剂购自锐博生物科技有限公司,其余试剂为国产分析纯以上。核酸分子量标准(1 kb Plus Ladder, DL2000 Marker)购自 Invitrogen 公司,质粒提取试剂盒, DNA 凝胶回收试剂盒,PCR 产物清洁试剂盒购自 Omega 公司。荧光显微镜购自 Olympus 公司,PCR 仪为 Gene Amp PCR System 9700 和 Bio-Rad。

1.2 微链载体 Cap 序列的设计

模拟真核生物细胞内 tRNA 相对稳定的 c 环结构,构建微链两端稳定的 Cap 序列,分别在其两端加上相应的酶切位点,其序列结构见表 1:

1.3 EGFP 基因表达框的获得

利用 *Ase* I、*Afl* II 双酶切 pEGFP-N3 质粒,酶切条件为 37 $^{\circ}$ C 水浴下 4 h,在 1%的琼脂糖凝胶电泳中加入 1 kb 的 DNA marker,胶回收 1.6 kb 左右的片段,即为含启动子、EGFP 基因、polyA 尾的目的基因表达框。

1.4 微链载体的构建、检测及扩增

加入 EGFP 表达框及适量的两端 Cap 保护序列,在 Ligation High 连接酶的作用下,16 $^{\circ}$ C 30 min 反应,进行连接。未连接上的片段可用 *Exo* III 外切酶进行消化除去。利用 3.5%聚丙烯酰胺(PAGE)胶经溴化乙啶(EB)染色后紫外灯下可观测到连接上的微链载体和未连接上的单独基因片段的差别约在 50 bp 左右,设计引物通过 PCR 反应可量化扩增微链载体。

表 1 Cap 的核苷酸序列及其二维结构
Table 1 The nucleotide sequence and protective structure of Cap

No.	Nucleotide base sequence (5'-3')	Protective structure
Cap 1	TA CGCTC AGTTGGGA GAGCGC TAAT	<pre> T G A T C T C G C G A T-5' G A G C G C T A T-3' G G A </pre>
Cap 2	TTAAG GCGCTC AGTTGGGA GAGCGC C	<pre> T G A T C T C G C G G A A T T-5' G A G C G C C-3' G G A </pre>

1.5 细胞培养

293、3T3 细胞在含 10% 小牛血清的 DMEM 培养基中生长至培养瓶底面积 80% 左右时, 用 PBS 溶液清洗 2 次, 0.25% 胰酶进行消化, 800 r/min, 5 min 离心收集细胞, 用适量培养基进行重悬后分至 3~4 瓶内进行继续培养, 每隔 1~2 d 进行换液。CNE2、B95-8 细胞用同样方法 1640 培养基加小牛血清进行培养。

1.6 细胞转染 pEGFP-N3 与微链载体转染进入真核细胞

待 35 mm 培养皿中细胞数量至 5×10^5 时, 分别将等摩尔量与等质量的 pEGFP-N3 和微链载体用阳离子脂质体转染试剂按试剂说明书转染进入 293、3T3、CNE2、B95-8 细胞, 用 35 mm 细胞培养皿培养, 每隔 24 h 进行观察。

1.7 GFP 表达的荧光显微镜观察及流式细胞仪检测表达效率

转染 48 h 后, 利用荧光显微镜初步观察 GFP 的表达情况, 选择相同视野下的细胞进行比较。待皿内细胞数量为 $1 \times 10^5 \sim 10 \times 10^5$ 左右时, 将细胞用 0.25% 胰酶消化后, 用 1 mL PBS 重悬, 流式细胞仪观察 GFP 的表达情况。

1.8 转染后对细胞毒性作用和对细胞增值的影响观察

分别取同等摩尔量的 pEGFP-N3 与微链载体转染后细胞在 35 mm 培养皿中培养, 加入细胞增值抑制剂, 设空白对照, 48 h 后用细胞计数法统计皿内细胞数量, 记录细胞死亡情况。

2 实验结果

2.1 Cap 序列的筛选及构建

在目的基因表达框两端加 Cap 保护序列封闭 DNA 外端缺口, 可有效防止真核细胞内的核酸外切酶将目的基因进行非特异性的降解, 阻断核酸外切酶的作用, 使目的基因顺利进入核内表达。我们模拟真核细胞内 tRNA 的稳定 c 环结构, 使得保护 Cap 具有良好的抗外切酶作用。Cap 的核苷酸序列见表 1, 首尾两端 Cap 分别具有 *Ase* I、*Afl* II 酶切位点。

2.2 pEGFP-N3 质粒的提取及 EGFP 基因的获得

用碱裂解法大量提取质粒, 纯化后经紫外分光

光度计检测得到 pEGFP-N3 质粒约 2 mg, 质粒图谱如图 1。pEGFP-N3 质粒经 *Ase* I、*Afl* II 双酶切后得到的含 pCMV-EGFP-polyA 的基因表达框片段, 长度大约在 1.63 kb, 凝胶回收可得到该片段, 如图 2 所示。

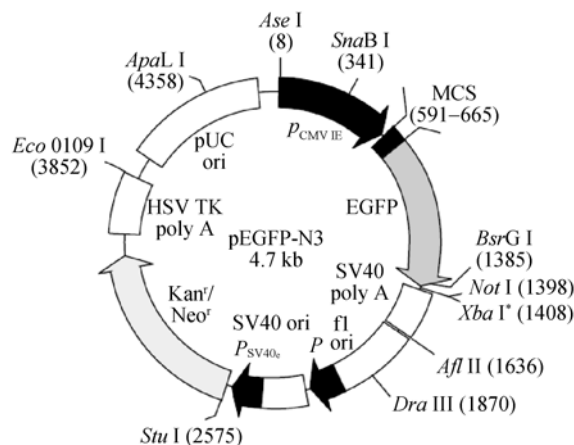


图 1 pEGFP-N3 质粒图谱

Fig. 1 Restriction map and multiple cloning site of pEGFP-N3

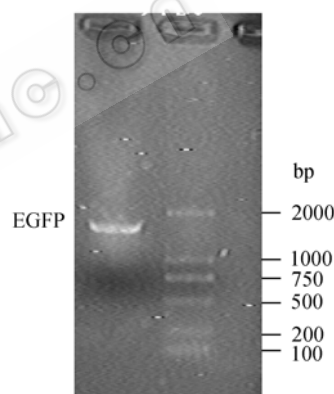


图 2 EGFP 基因电泳检测

Fig. 2 The determination of EGFP by gel electrophoresis

2.3 微链载体的构建

用 Ligation High 连接酶连接后将 Cap 序列同目的基因表达框进行连接, 连接之后利用核苷酸外切酶 *Exo* III 对有线性缺口的 DNA 片段具有外切活性的特点将未连接产物在 37°C 条件下作用 2 h, 使得未连接产物在 *Exo* III 的作用下降解为单个核苷酸, 用 PCR 产物清洁试剂盒对 *Exo* III 外切的体系进行清洁纯化, 得到微链载体的纯化产物。构建好的微链载体示意图如图 3

2.4 微链载体的扩增

设计 PCR 引物 5' ACAAGTTCAGCGTGTCCG3', 加入适量的 *Taq* 聚合酶, dNTP 及反应缓冲液, 50 uL 体系进行 PCR 扩增, 得到微链载体的扩增产物, PCR

产物电泳检测如图 4。利用 3.5% PAGE 胶进行电泳检测, 检测结果如图 5。PCR Clean 回收微链载体。



图 3 微链载体结构示意图

Fig. 3 The conceptual diagram of Micro-Linear Vector

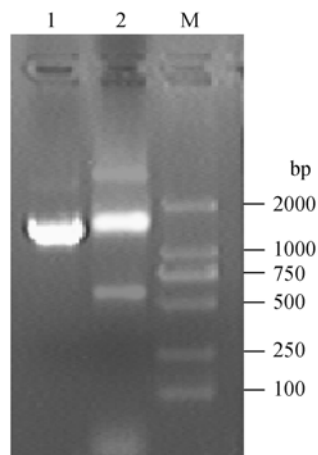


图 4 PCR 扩增微链载体

Fig. 4 The amplification of Micro-Linear Vector by PCR

1: EGFP gene; 2: product of PCR; M: DNA marker

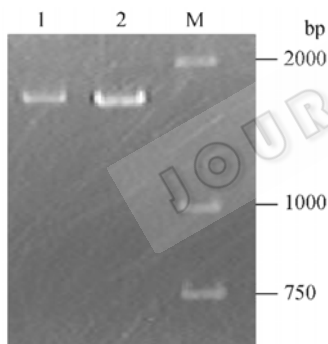


图 5 3.5% DNA-PAGE 胶区分微链载体和 GFP 基因

Fig. 5 The difference between Micro-Linear Vector and GFP gene expression cassette in 3.5% DNA-PAGE

1: Micro-linear vector; 2: GFP gene; M: DNA marker

2.5 pEGFP-N3 质粒与微链载体转染 293 细胞

将等摩尔量的微链载体与 pEGFP-N3 同时转染进入细胞, 其表达的 GFP 在荧光的激发能显出绿色荧光, 根据荧光的表达情况可以初步推测其转染效率。48 h 后荧光显微镜观察表达效率如图 6 所示。

将 4 $\mu\text{mol/L}$ 微链载体和等质量的 pEGFP-N3 质粒转染进入 293 细胞中, 48h 后荧光显微镜观察表达

效率如图 7 所示。

2.6 pEGFP-N3 质粒与微链载体转染 3T3 细胞

将等质量的微链载体和 pEGFP-N3 质粒转染进入 293 细胞中, 48 h 后荧光显微镜观察表达效率如图 8 所示。

2.7 pEGFP-N3 质粒与微链载体转染 CNE2 细胞

将等质量的微链载体和 pEGFP-N3 质粒转染进入 CNE2 细胞中, 48 h 后荧光显微镜观察表达效率如图 9 所示。

2.8 pEGFP-N3 质粒与微链载体转染 B95-8 细胞

将等质量的微链载体和 pEGFP-N3 质粒转染进入 B95-8 细胞中, 48h 后荧光显微镜观察表达效率如图 10 所示。

2.9 流式细胞仪测定 GFP 基因经两种载体转染后在 293、3T3、CNE2 细胞中的表达效率

(1) 为能更准确地比较其转染表达效率, 我们对质量的微链载体与 pEGFP-N3 质粒转染的 293 细胞进行流式细胞仪观察, 检测 GFP 表达细胞数占总细胞的百分数, 得到其转染效率。每批次细胞依次经过 24 h、48 h、72 h 进行观察, 取 3 个批次细胞在相同时刻转染百分率的平均数对时间作图, 见图 11。每批次细胞数据见表 2。

(2) 对 3T3、CNE2 细胞进行同样的实验。转染后细胞的分别经过 24 h、48 h、72 h 后检测, 其流式结果相对时间作图, 见图 12 和图 13。

2.10 微链载体在不同细胞株中表达持续时间的观察

为观察微链载体在不同细胞株内表达 GFP 的持续时间, 并和 pEGFP-N3 质粒进行对照, 转染后每隔 24 h 进行荧光显微镜观察 GFP 的表达, 记录荧光完全猝灭的时间。结果如图 14。

从图上我们可以看出在不同的细胞株内, GFP 表达的持续时间相差较大。总体来说, GFP 在由微链载体转染进入细胞后 GFP 的表达持续时间基本与质粒转染后相同, 显示了微链载体在装载基因转染后在不同细胞株内均能稳定持续表达。

2.11 微链载体和 pEGFP-N3 质粒转染后对细胞的毒性实验

用细胞计数法观察微链载体和 pEGFP-N3 质粒转染进入细胞后对 293 细胞的毒性损伤作用, 3 批细胞经转染后加入细胞增值抑制剂, 48 h 后观察其细

胞死亡百分数, 取其平均数作图 15, 发现微链载体对细胞的损伤稍比 pEGFP-N3 质粒稍小, 但是效果

不是很明显。用细胞计数的方法观察 pEGFP-N3 质粒与微链载体对细胞的增值无明显影响。

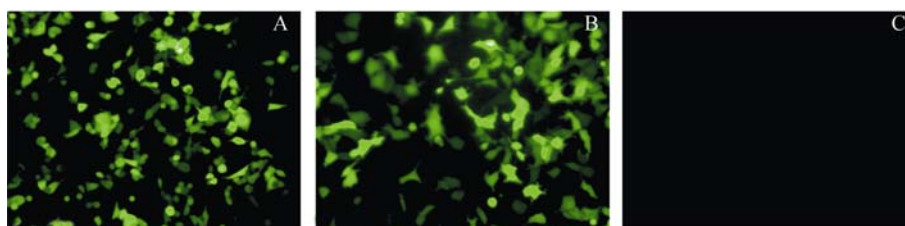


图 6 等摩尔的微链载体与 pEGFP-N3 同时转染进入 293 细胞

Fig. 6 Equimolar of pEGFP-N3 plasmid and Micro-linear vector transfect 293 cell line

A: pEGFP-N3 plasmid; B: Micro-linear vector; C: control

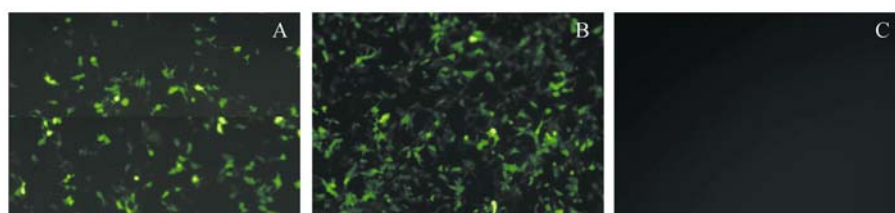


图 7 等质量的微链载体和 pEGFP-N3 质粒转染进入 293 细胞

Fig. 7 Equiquality of pEGFP-N3 and Micro-linear vector transfect 293 cell line

A: pEGFP-N3 plasmid; B: Micro-linear vector; C: control



图 8 等质量的微链载体和 pEGFP-N3 质粒转染进入 3T3 细胞

Fig. 8 Equiquality pEGFP-N3 and Micro-linear vector transfect 3T3 cell line

A: pEGFP-N3 plasmid; B: Micro-linear vector; C: control

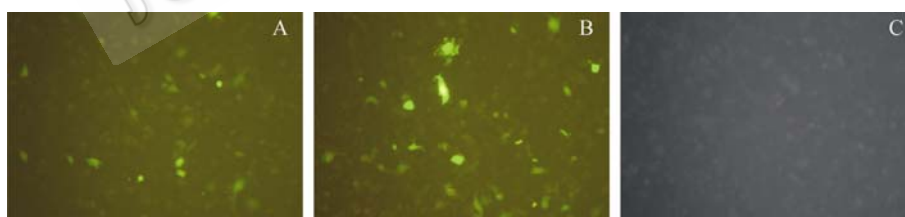


图 9 等质量的微链载体和 pEGFP-N3 质粒转染进入 CNE2 细胞

Fig. 9 Equiquality pEGFP-N3 and Micro-linear vector transfect CNE2 cell line

A: pEGFP-N3 plasmid; B: Micro-linear vector; C: control



图 10 等质量的微链载体和 pEGFP-N3 质粒转染进入 B95-8 细胞

Fig. 10 Equiquality pEGFP-N3 and Micro-linear vector transfect B95-8 cell line

A: pEGFP-N3 plasmid; B: Micro-linear vector; C: control

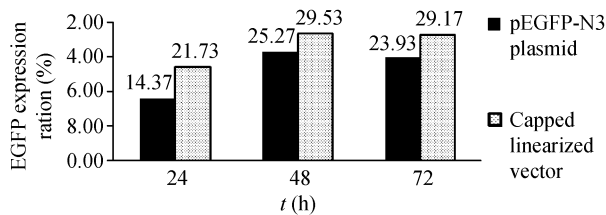


图 11 pEGFP-N3 质粒与微链载体对 293 细胞转染效率观察表

Fig. 11 Efficiency of EGFP transfection in 293 cell line

表 2 pEGFP-N3 与微链载体对 293 细胞的转染率(%)

Table 2 The ratio of EGFP expression in 293 trasfected by pEGFP-N3 plasmid and Micro-linear vector (%)

Time (h)	pEGFP-N3 plasmid				Micro-linear vector			
	1	2	3	Ave. age	1	2	3	Ave. age
24	12.8	15.6	14.7	14.37	20.9	19.6	24.7	21.73
48	9.7	8.5	7.6	25.7	1.7	5.7	1.2	29.3
72	18.9	27.1	25.8	23.93	30.3	27.1	30.1	29.17

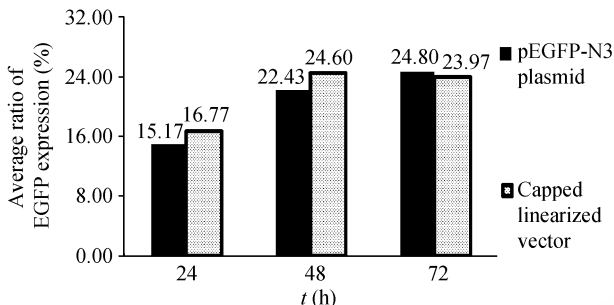


图 12 pEGFP-N3 质粒与微链载体对 3T3 细胞转染效率观察

Fig. 12 Efficiency of EGFP transfection in 3T3 Cell line

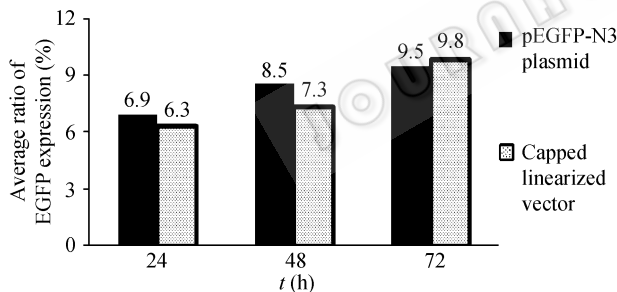
图 13 pEGFP-N3 质粒与微链载体对 CNE₂ 细胞转染效率观察

Fig. 13 Efficiency of EGFP transfection in CNE2 cell line

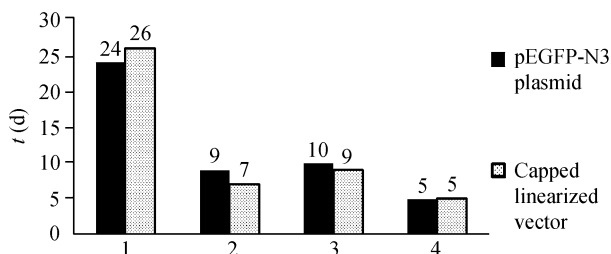


图 14 不同细胞株内微链载体和质粒表达 GFP 的持续时间

Fig. 14 The last time of GFP in different cell lines transfected by Micro-linear vector and plasmid and Micro-linear vector

1: 293 cell line; 2: 3T3 cell line; 3: CNE2 cell line; 4: B95-8 cell line

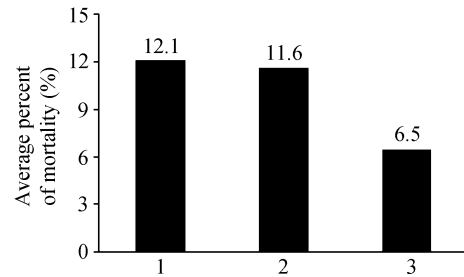


图 15 微链载体和 pEGFP-N3 质粒对细胞增值的影响

Fig. 15 The average mortality of cells transfected by plasmid

1: pEGFP-N3 plasmid (12.1%); 2: Micro-linear vector (11.6%); 3: cationic lipids (6.5%)

3 讨论

基因治疗载体的安全性问题使得开发出安全可靠、转染效率高的载体成为现今基因治疗研究领域的重点。做为基因治疗主要载体的病毒载体其局限性则是显而易见：因为病毒型载体利用其自身感染程序将外源目的基因导入宿主细胞，故为维持该感染过程则需要完整病毒的参与。这些病毒成分在宿主细胞内复制极易引发机体产生不同程度的免疫反应，而且存在插入突变等致癌、致毒风险。非病毒载体虽然在安全性方面优于病毒载体，但同样能导致免疫反应，而且转染效率不高。美国 Stanford University 的 Kay MA 等开发出几乎不含非宿主 DNA 成分的微环 DNA 质粒(Minicircle DNA vectors)^[3]，但此种微环载体在转染效率上尚显不足。

为此，本实验合成了一种新型的用于基因治疗的微链载体(Micro-Linear Vector)，该载体由基因表达框和 2 个对称排列的 Cap 保护序列组成。这种由 2 个帽子状的 Cap 构成保护序列的微链载体外形有如哑铃状，其仅含启动子及增强子、目的基因和 polyA 稳定序列，从而几乎不含外源基因，使得免疫反应降到最低状态。同时，线性核酸结构中含有目的基因表达框和特异性启动子，保证了目的基因仅在特异性细胞中特异性表达，能起到增强安全性的作用。并且，由于微链载体分子量小，易穿过细胞核膜，进入到细胞核内进行表达，能提高表达效率。我们模拟真核细胞内 tRNA 稳定 c 环结构构建 Cap 序列，封闭了线性核酸结构的开放性末端，能使得其具有较好的抗真核细胞内核酸外切酶作用，更好地保护基因表达框。EGFP 基因表达的 GFP 蛋白，能通过荧光显微镜和流式细胞仪等较为简单的手段观

测到转染效率, 同时能较好的说明和比较微链载体和原质粒的转染效率, 使得实验能说明问题的同时更易于操作和重复。

结果说明了微链载体的转染效率相对较高。这种现象可以用微链载体有利于基因进入到细胞核进行解释。核被膜被认为是非病毒类载体进入到细胞核最主要的屏障, 能较大地影响非病毒类载体地转染和表达效率^[4-6]。DNA 进入到细胞核与载体大小有关, 载体分子量越大, 能进入到细胞核内的机会就越少^[7,8]。载体分子量越小, 转染效率越高已经被 Darquet 及其同事得到证实^[9]。由于微链载体分子量只是普通质粒载体的 1/3 甚至更少, 而且其呈线状结构, 更加有利于进入到细胞核内表达。因此能有效提高转染效率。微链载体另外一个较为显著的优点在于它只含有很少量的未甲基化的 CpG 序列, 除去了普通质粒载体的大量的无治疗作用基因中包含的 CpG 序列。CpG 序列被认为是导致免疫反应的重要原因^[1,2]。研究显示, 患有纤维囊泡症的患者被导入阳离子脂质体和 pDNA 后将导致发热、肌肉疼痛、肺功能下降和精神紧张的概率远大于仅被导入阳离子脂质体的患者^[10]。克隆仅含原质粒约一半 CpG 序列的质粒载体能有效减少炎症发生概率, 但由于其费用较高, 临床应用价值较低^[1]。而微链载体所含有的 CpG 序列非常少, 可减少免疫反应发生的概率, 具有较大的临床意义。同时, 由于微链载体的获得可通过 PCR 扩增, 排除了质粒载体在扩增和提取过程当中摄入细菌内毒素的问题。

通过对 Cap 序列的修饰, 可以使得其具有靶向效应, 从而进一步提高其作为基因治疗载体的应用价值。选用肿瘤细胞特异性标志高亲和多肽序列作为 Cap 保护序列的骨架, 能使该微链载体具有较高的稳定性和高特异靶向性。

总之, 本实验初步证实了微链载体做为基因治疗载体具有较高高的表达效率。其较小的分子量和

线性结构使该载体易于通过细胞膜系统中的核酸通道进入细胞, 提高了转染效率。其较少含有非宿主性基因成分, 并可游离于宿主染色体之外稳定自主表达。因而又具有较高的生物安全性和较低的免疫原性。同时, 其能通过 PCR 进行大量扩增, 可以避免传统质粒载体在提取过程中携带细菌中的内毒素。微链载体具有较好的安全性, 同时又能保持较高的转染效率, 并且有望开发出具有靶向特异性的载体。随着技术的成熟和研究的深入, 其有可能成为基因治疗的一种通用载体, 促进基因治疗的发展。

REFERENCES

- [1] Yew NS, Zhao H, Wu IH, *et al.* Reduced inflammatory response to plasmid DNA vectors by elimination and inhibition of immunostimulatory CpG motifs. *Mol Ther*, 2000, **1**: 255-262.
- [2] Li S, Wu SP, Whitmore M, *et al.* Effect of immune response on gene transfer to the lung via systemic administration of cationic lipidic vectors. *Am J Physiol*, 1999, **276**(5): L796-L804.
- [3] Chen ZY, He CY, Ehrhardt A, *et al.* Minicircle DNA vectors devoid of bacterial DNA result in persistent and high-level transgene expression *in vivo*. *Mol Ther*, 2003, **8**(3): 495-500.
- [4] Li S, Huang L. Nonviral gene therapy: Promises and challenges. *Gene Ther*, 2000, **7**(1): 31-34.
- [5] Zabner J, Fasbender AJ, Moninger T, *et al.* Cellular and molecular barriers to gene transfer by a cationic lipid. *J Biol Chem*, 1995, **270**: 18997-19007.
- [6] Hagstrom JE, Ludtke JJ, Bassik MC, *et al.* Nuclear import of DNA in digitonin-permeabilized cells. *J Cell Sci*, 1997, **110**: 2323-2331.
- [7] Ohno M, Fornerod M, Mattaj IW. Nucleocytoplasmic transport: The last 200 nanometers. *Cell*, 1998, **92**: 327-336.
- [8] Gorlich D, Mattaj IW. Nucleocytoplasmic transport. *Science*, 1996, **271**: 1513-1518.
- [9] Darquet AM, Rangara R, Kreiss P, *et al.* Minicircle: An improved DNA molecule for *in vitro* and *in vivo* gene transfer. *Gene Ther*, 1999, **6**: 209-218.
- [10] Alton EW, Stern M, Farley R, *et al.* Cationic lipid-mediated CFTR gene transfer to the lungs and nose of patients with cystic fibrosis: A double-blind placebo-controlled trial. *Lancet*, 1999, **353**: 947-957.