

## 重组表达人 IDO 基因慢病毒载体的构建及鉴定

李 见<sup>1</sup>, 王 露<sup>1</sup>, 李玉云<sup>2</sup>

**[摘要]** **目的:**构建重组表达人吲哚胺 2,3-过氧化酶(IDO)基因的慢病毒载体。**方法:**设计相应引物,从含有人 IDO 基因的 cDNA 文库中,利用聚合酶链反应(PCR)方法钓取人 IDO 基因的全长编码区片段。将目的基因与经酶切线性化的慢病毒载体 pGC-FU 进行定向的连接,将产物转化细菌感受态细胞。对长出的克隆进行菌落 PCR 鉴定,并对阳性的克隆进行测序及比对分析。重组慢病毒及辅助包装质粒共转染 293T 细胞,荧光显微镜下观察绿色荧光蛋白(GFP)的表达情况;采用 Western blot 检测 IDO-GFP 融合蛋白的表达情况;实时荧光定量 PCR 检测慢病毒浓缩液的滴度。**结果:**成功获取人 IDO 基因编码区序列,人 IDO 基因慢病毒转染质粒连接正确;293T 细胞中产生慢病毒颗粒;IDO 基因在细胞内稳定表达;人 IDO 基因重组慢病毒载体的滴度为  $2 \times 10^8$  TU/ml。**结论:**成功构建并包装出高滴度的人 IDO 基因重组慢病毒表达载体,为下一步转染目的细胞奠定了实验基础。

**[关键词]** 基因表达;吲哚胺 2,3-过氧化酶;慢病毒载体;293T 细胞

**[中国图书资料分类法分类号]** Q 343.1;R 556.5 **[文献标志码]** A

## Construction and identification of the recombination Lentiviral vector with human IDO gene

LI Jian<sup>1</sup>, WANG Lu<sup>1</sup>, LI Yu-yun<sup>2</sup>

(1. Clinical Laboratory Science Centre, 2. Department of Clinical Laboratory Diagnostics, Bengbu Medical College, Bengbu Anhui 233030, China)

**[Abstract]** **Objective:** To construct the recombination lentiviral expressing vector with human IDO gene. **Methods:** The full-length coding region fragment of IDO was amplified by primer designed by the cDNA library including IDO gene using polymerase chain reaction(PCR). The target gene was directly inserted into the pGC-FU lentiviral vector, which were transformed into the Bacterium coli DH5 $\alpha$  cells. The positive clone was identified by PCR and sequencing. The recombinant lentiviral vector and packaging plasmids phelper 1.0 and pHelper 2.0 were cotransfected into 293T cells. The expression of green fluorescent protein(GFP) was observed to evaluate gene delivery efficiency by fluorescence microscope. The levels of fusion protein IDO-GFP expression were detected by Western Blot, and the titers of lentiviral were determined by Real-time PCR. **Results:** The encoding sequences of IDO were successfully obtained by the analysis of PCR, the recombination lentiviral vector with human IDO gene was successfully constructed, and transfected into 293T cells to express IDO. The titer of lentivirus was  $2 \times 10^8$  TU/ml. **Conclusions:** The recombinant lentiviral vector with high titer is successfully constructed, which can provide the basis of the future experiment.

**[Key words]** genetic expression; indoleamine 2,3-dioxygenase; lentiviral vector; 293T cell

吲哚胺 2,3-过氧化酶(indoleamine 2,3-dioxygenase, IDO)是催化色氨酸沿犬尿素途径分解代谢初始步骤的一个限速酶<sup>[1]</sup>。色氨酸是 T 细胞增殖过程中合成蛋白质所必需的氨基酸。细胞 IDO 表达强弱调控着 T 细胞的免疫应答水平。研究<sup>[2]</sup>证实,表达 IDO 的细胞在体内、外均能够抑制 T 细胞应答。我

们构建增强型绿色荧光蛋白(enhanced green fluorescent protein, EGFP)融合了 IDO 基因的慢病毒表达载体,理论上在活细胞内此载体可以通过降解局部微环境中的色氨酸从而达到抑制 T 细胞增殖的目的。本研究通过该重组慢病毒表达转染原代培养的脐带间充质干细胞,并验证其在细胞中的表达情况。

## 1 材料与方法

1.1 材料 慢病毒 pGC-FU 表达载体及病毒包装质粒(pHelper 1.0 和 pHelper 2.0)购自上海吉凯基因化学技术有限公司。人 IDO cDNA 由吉凯基因提供的克隆模板;大肠埃希菌 DH5 $\alpha$ 、293T 细胞由本实验室保存;Taq DNA 聚合酶(SinoBio 公司);限制性内切酶 Age I (NEB 公司);In-Fusion 试剂盒

[收稿日期] 2012-12-05

[基金项目] 安徽省教育厅自然科学研究资助重点项目(KJ2012A198);安徽省教育厅自然科学研究资助项目(KJ2010B118);安徽省蚌埠市科技计划项目(蚌埠[2011]33)

[作者单位] 蚌埠医学院 1. 临床检验诊断学实验中心, 2. 临床检验诊断学教研室, 安徽 蚌埠 233030

[作者简介] 李 见(1986-), 女, 硕士研究生, 检验技师。

[通信作者] 李玉云, 硕士研究生导师, 副教授. E-mail: bbmeliyuyun@163.com

(clontech 公司); Plasmid 抽提试剂盒 (Promega 公司); 阳离子脂质体 Lipofectamine 2000 (Invitrogen 公司); 一抗鼠抗-GFP、二抗羊抗鼠 (Santa Cruz 公司)。

1.2 慢病毒载体的酶切 使用 Age I 对慢病毒载体进行酶切消化, 反应体系为 50  $\mu$ l, 含 ddH<sub>2</sub>O 42  $\mu$ l, 10  $\times$  buffer 5  $\mu$ l, 纯化的 DNA 质粒 (1  $\mu$ g/ $\mu$ l) 2  $\mu$ l, Age I (5 U/ $\mu$ l) 1  $\mu$ l, 将混合反应物置 37  $^{\circ}$ C 2 h。

1.3 目的基因 IDO 的获取 为构建携带目的基因 IDO 的慢病毒表达载体, 我们首先从含有目的基因的 cDNA 中以特异性引物利用聚合酶链反应 (PCR) 方法扩增出 IDO 基因全长序列来钓取目的基因。(1) 引物设计与合成: 按照 PCR 引物设计原则设计引物。检索 NCBI GenBank 数据库, 查询人 IDO 基因序列, 应用 Primer 5.0 软件设计用于扩增目的基因 IDO 的 PCR 引物, (1) 引物由上海捷瑞生物工程技术有限公司合成, 其序列如下: IDO 上游引物, GAG GAT CCC CGG GTA CCG GTC GCC ACC ATG GCA CAC GCT ATG G-AAA AC; IDO 下游引物, TCA CCA TGG TGG CGA CCG GAC CTT C-CTT CAA AAG GGA TTT C (引物说明: 含交换配对碱基、酶切位点, 并含有目的基因 5' 端部分序列用于 PCR 钓取目的基因)。(2) PCR 扩增目的基因: 以含有 IDO 基因的 cDNA 库为模板, 扩增 IDO 基因序列。PCR 反应体系为 20  $\mu$ l, 模板 1  $\mu$ l, dNTP 1.6  $\mu$ l, 5Taqbuffer 4  $\mu$ l, 引物各 0.4  $\mu$ l, Taq 酶 0.2  $\mu$ l, ddH<sub>2</sub>O 12.4  $\mu$ l。PCR 反应条件: 94  $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94  $^{\circ}$ C 变性 30 s, 55  $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72  $^{\circ}$ C 延伸 2 min, 30 个循环; 72  $^{\circ}$ C 保温 10 min。PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳鉴定并分离产物, DNA 凝胶回收试剂盒回收并纯化 IDO 基因片段。

1.4 重组质粒 pGC-FU-IDO 的制备 采用 In-Fusion 技术, 将 Age I 酶切回收纯化的目的基因 PCR 产物交换连接入 Age I 酶切线性化的 pGC-FU 慢病毒表达载体, 反应体系见表 1 (阳性对照和自连对照加入的载体和连接组一致, 但阳性对照加入的纯化 PCR 产物为 GAPDH 基因), 于 25  $^{\circ}$ C 反应 30 min, 42  $^{\circ}$ C 反应 15 min, 制备克隆交换液, 转化 E. coli DH5 $\alpha$  感受态细胞, 将已转化的感受态细胞转移到 AMP 抗性 (100  $\mu$ g/ml) 的 LB 琼脂培养基上, 长出的克隆进行后续 PCR 鉴定。

1.5 阳性克隆的 PCR 鉴定 分别挑取前述平板上长出的转化子重悬于 10  $\mu$ l LB 培养液中, 从中取 1  $\mu$ l 做模板进行菌落 PCR 鉴定。PCR 鉴定引物由

上海捷瑞生物有限公司合成, 引物序列如下: Ubi 上游引物, CAC CAA ATC CAC GAT CAT G (该引物位于慢病毒载体 pGC-FU 的 Ubiquitin 启动子中, 用于菌落 PCR 鉴定转化子), EGFP-N; 下游引物, CTG GTC GAG CTG GAC GGC GAC G (该引物位于 EGFP 的 N 端, 用于菌落 PCR 鉴定转化子), 产物长度 646 bp。PCR 反应体系为 20  $\mu$ l, PCR 反应条件: 94  $^{\circ}$ C 预变性 3 min; 94  $^{\circ}$ C 变性 30 s, 60  $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72  $^{\circ}$ C 延伸 2 min, 30 个循环; 72  $^{\circ}$ C 保温 5 min。并设阴性对照、自连对照、阳性对照。然后接种阳性转化子, 37  $^{\circ}$ C 培养 16 h 后保存为甘油菌, 分装 200  $\mu$ l 测序, 测序结果与 GenBank 数据库进行 Blast 比对。

表 1 PCR 产物反应体系 ( $\mu$ l)

反应体系	阳性对照	自连对照	交换组
dd H <sub>2</sub> O	11.5	14.5	11.5
10 $\times$ In-Fusion 交换酶缓冲液	2.0	2.0	2.0
线性化载体 DNA	3.0	3.0	3.0
纯化的 IDO PCR 产物	0.0	0.0	3.0
纯化的 GAPDH PCR 产物	3.0	0.0	0.0
In-Fusion 交换酶	0.5	0.5	0.5
Total	20	20	20

1.6 重组质粒 pGC-FU-IDO 表达检测 将处于生长对数期的 293T 细胞进行胰酶消化, 制成细胞悬液接种于 24 孔板中, 37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱培养至细胞融合度达到约 80% 进行转染, 根据 Lipofectamine<sup>2000</sup> 转染试剂使用说明书进行转染操作, 24 h 后观察荧光表达情况。转染 36 h 后收集转染成功的细胞进行 Western blot 检测, 加入细胞裂解液抽提蛋白, 裂解后取 20  $\mu$ g 左右处理后的蛋白样品进行 SDS-PAGE 电泳, 并转移至 PVDF 膜上进行转膜, 5% 脱脂奶粉室温封闭 2 h, 加入一抗 Mouse Anti-GFP 4  $^{\circ}$ C 孵育过夜, PBS 洗膜 3 次, 每次 10 ~ 15 min, 然后与稀释后的辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的 IgG 二抗 37  $^{\circ}$ C 孵育 2 h, PBS 洗膜 3 次, 每次 15 min, 采用 HRP-ECL 法进行曝光, 检测目的蛋白表达情况。

1.7 重组慢病毒的包装及滴度测定

1.7.1 重组慢病毒的包装 将慢病毒包装系统中的三种质粒 DNA (pGC-FU-IDO 载体, pHelper1.0 载体, pHelper2.0 载体) 与相应体积的 Opti-MEM 混合均匀, 与稀释后的 Lipofectamine<sup>2000</sup> 进行混合, 形成 DNA 与 Lipofectamine<sup>2000</sup> 稀释液的转染复合物。将转染复合物转移至 293T 细胞的培养液中, 混匀, 于 37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 细胞培养箱中培养。培养 8 h 后, 加

入 PBS 液,轻轻左右晃动一下培养瓶以洗涤残余的转染复合物后倒去。更换为含 10% FBS 的 H-DMEM 培养基,于 37℃、5% CO<sub>2</sub> 培养箱内继续培养 48 h。收集转染 48 h 的 293T 细胞上清液,于 4℃、4 000 g 离心 10 min,除去细胞碎片;以 0.45 μm 的滤器过滤上清液于过滤杯中,将过滤杯插到收集滤过液收集管中;4 000 g 离心 10~15 min,将过滤杯倒扣在样品收集杯上,1 000 g 离心 2 min,样品收集杯中收集到的即为病毒浓缩液。将病毒浓缩液进行分装保存在病毒管中,-80℃ 中长期保存。取其中一支进行病毒生物学滴度测定。

1.7.2 实时荧光定量 (RT-q)PCR 法测定慢病毒滴度 (1)样品的制备:检测前 1 天,对 293T 细胞进行胰酶消化,以 1 × 10<sup>5</sup> 个/孔的密度接种 24 孔板,次日,准备 7~10 个无菌的 E<sub>p</sub> 管,在每个管中加入 90 μl 培养基 (DMEM + 10% FBS)。取待测病毒原液 10 μl 加入到第 1 管中,混匀后,取 10 μl 加入到第 2 管中。继续相同的操作直到最后 1 管。第 1 个 E<sub>p</sub> 管中加入 10 μl 病毒原液,记为 1E+1 μl;第 2 个 E<sub>p</sub> 管中进行了第 1 次 10 倍稀释,所得病毒原液为第 1 个 E<sub>p</sub> 中的 1/10,记为 1E+0 μl;依次类推,第 7 个 E<sub>p</sub> 管中进行了第 6 次 10 倍稀释,所得病毒原液为第 6 个 E<sub>p</sub> 管中的 1/10,记为 1E-5 μl。选取所需的细胞孔,吸去 90 μl 培养基。加入稀释好的病毒溶液。放入 37℃、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养;24 h 后,加入新鲜培养基 500 μl,小心操作,不要吹起细胞,维持细胞正常生长;4 d 后,抽提 RNA 准备做 RT-qPCR。(2)总 RNA 的抽提及逆转录:培养 4 d 后,根据 Invitrogen 公司的 TRIZOL 操作说明书对各孔进行总 RNA 的抽提,均为 RNase-free 操作。紫外分析测定所抽提 RNA 的浓度。将抽提的总 RNA

进行逆转录,RT 反应体系 11 μl,得到的 RT 反应产物 cDNA 立即用于 PCR,部分保存在 -80℃ 冰箱中备用。(3)实时荧光定量 PCR 检测:Real-time PCR 在 TAKARA 的 TP800 上完成。引物序列见表 2。总反应体系为 20 μl,设定程序为两步法 Real-Time 定量:预变性 95℃、15 s,之后每一步变性 95℃、5 s,退火延伸 60℃、30 s,共进行 40 个循环。每次在延伸阶段读取吸光度值。制作熔解曲线:PCR 结束后,在 95℃ 变性 1 min,然后冷却至 55℃,使 DNA 双链充分结合,从 55℃ 开始到 95℃,每一步增加 0.5℃,保持 30 s,同时读取吸光度值。

表 2 Real-time PCR 引物序列

基因	引物	序列
GFP	GFP-F	TGC TTC AGC CGC TAC CC
	GFP-R	AGT TCA CCT TGA TGC CGT TC
ACTIN	ACTIN-F	GTG GAC ATC CGC AAA GAC
	ACTIN-R	AAA GGG TGT AAC GCA ACT A

## 2 结果

慢病毒载体 pGC-FU Vector 酶切后琼脂糖凝胶电泳图谱见图 1。利用针对 IDO 编码区的特异性引物进行 PCR 扩增,琼脂糖凝胶电泳分析其扩增的目的基因片段为 1 255 bp,与预期大小一致(见图 2)。IDO 基因阳性转化子的 PCR 产物长度为 646 bp,第 6 组 IDO 重组克隆质粒为阳性克隆,其它组为阴性克隆(见图 3)。

挑选阳性克隆的 PCR 产物进行测序,比对分析证实,测序结果与 GenBank 数据库中人 IDO 基因的目的序列完全一致,提示人 IDO 重组克隆质粒构建成功。

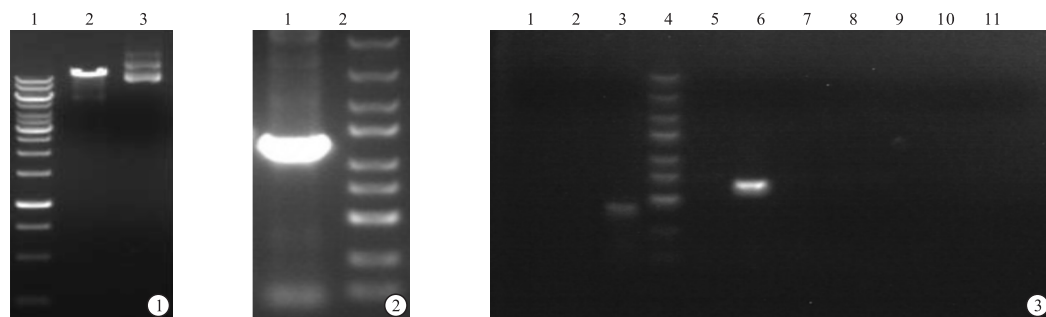


图 1 慢病毒载体 pGC-FU Vector 酶切后琼脂糖凝胶电泳图谱(1:Marker 条带自上而下依次为 10 000、8 000、6 000、5 000、4 000、3 500、3 000、2 500、2 000、1 500、1 000、750、500、250 bp;2:慢病毒载体酶切产物;3:未酶切慢病毒载体)

图 2 目的基因 IDO PCR 产物琼脂糖凝胶电泳图谱(1:IDO PCR 产物:1 255 bp;2:Marker 自上而下依次为 5 000、3 000、2 000、1 500、1 000、750、500、250、100 bp)

图 3 PCR 阳性克隆鉴定电泳图(1:ddH<sub>2</sub>O;2:空载自连对照;3:GAPDH;4:Marker 自上而下依次为 5 000、3 000、2 000、1 500、1 000、750、500、250、100 bp;5~12:IDO 重组克隆质粒)



荧光显微镜观察重组质粒转染 293T 细胞 24 h 后, >80% 细胞内可观察到荧光的表达(见图 4), 说明目的基因与 EGFP 融合表达正常。

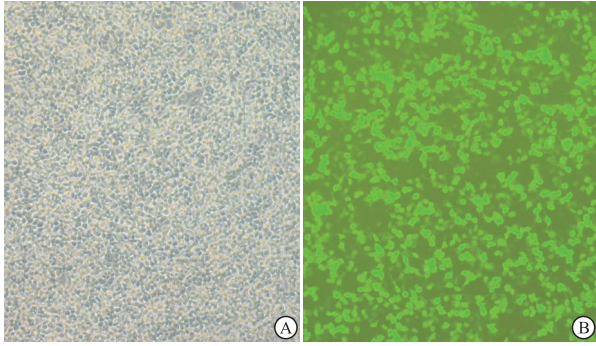


图4 转染293T 细胞24 h荧光表达情况(A:明视野;B:荧光视野)

经 Western blot 检测, 可以观察到相对分子量为 70 000 附近处有特征条带(见图 5), 其大小和目的基因融合蛋白相吻合, 表示 IDO-EGFP 融合蛋白在 293T 细胞中获得表达。

RT-q PCR 曲线图见图 6。加入不同重组 IDO 慢病毒量的细胞样品随着 PCR 循环的增加, 荧光值开始上升, 经过 40 个循环后均达到峰值。不同浓度病毒感染后样品组的 Ct 值及表达量分析见表 3。加入不同病毒量的细胞样品, 通过提取总 RNA 后逆转录为 cDNA, 然后进行 RT-q PCR 检测, 通过比较对照组和试验组的 Ct 值差异判断滴度值。通常情况下, 认为 Ct 值差异 2 以上存在显著差异。逆转录反应所获得的 20  $\mu$ l cDNA 中只取了 1  $\mu$ l 用于实时定量检测, 所以该结果仅表示 1/20 样品的情况, 所以在滴度计算时应该乘以系数 20。

在本次滴度检测中, 1E-4 $\mu$ l 组和 Con 组样品的 Ct 值存在 2 个左右差异, 即  $\Delta$ Ct Con -  $\Delta$ Ct 样品组 = 2.090 > 2, 则认为在 1E-4 $\mu$ l 组样品中存在病毒颗粒。假定该组样品含有至少 1 个病毒颗粒, 则病毒的滴度为:  $1/(1.00E-04) \times 20 = 2.00E + 5$  TU/ $\mu$ l =  $2.00E + 8$  TU/ml。

目的基因及 Actin 基因的熔解曲线见图 7。熔解曲线是扩增反应的质控途径, 图中 Actin 基因和目的基因的熔解曲线中未出现杂峰, 也未出现主峰的异常增宽, 表明实验中未出现污染、引物二聚体和非特异性扩增。

### 3 讨论

慢病毒属逆转录病毒的子类, 是在人类免疫缺陷病毒-1 (HIV-1) 基础上改造而成的基因治疗载

表 3 病毒感染后样品组的 Ct 值及表达量

样品组/ $\mu$ l	Ct <sub>Actin</sub>	Ct 目的基因	Ct 均值	$\Delta$ Ct = C t 均值 - Ct <sub>Actin</sub>	$\Delta$ Ct <sub>Con</sub> - $\Delta$ Ct 样品组
CON	14.12	31.53 35.24	34.885	20.765	0.000
1	14.68	20.52 20.53	20.525	5.845	14.920
10 <sup>-1</sup>	14.58	23.94 23.95	23.945	9.365	11.400
10 <sup>-2</sup>	14.45	27.11 27.15	27.13	12.680	8.085
10 <sup>-3</sup>	14.52	30.32 30.71	30.515	15.995	4.770
10 <sup>-4</sup>	14.27	32.65 33.24	32.945	18.675	2.090
10 <sup>-5</sup>	14.62	— 34.44	34.44	19.820	0.945

体<sup>[3]</sup>, 它能高效地将目的基因导入动物和人的原代细胞或细胞系中, 有效感染多种类型的细胞, 如间充质干细胞、造血干细胞、胚胎干细胞以及神经细胞和肝细胞等<sup>[4-5]</sup>, 是目前用于基因治疗最有效的载体之一。本实验室采用的慢病毒为“自杀”性病毒, 即病毒感染目的细胞后不会再感染其他的细胞, 也不会利用宿主细胞产生新的病毒颗粒<sup>[6]</sup>。本研究的慢病毒载体系统主要由 pGC-FUB 表达载体、pHelper 1.0 载体和 pHelper 2.0 载体三质粒组成, pGC-FUB 表达载体中含有 HIV 的基本元件, pHelper 1.0 载体中含有 HIV 的 gag 基因(编码病毒主要的结构蛋白)、pol 基因(编码病毒特异性酶)、rev 基因(编码调节 gag 和 pol 基因表达的调节因子), pHelper 2.0 载体中含有单纯疱疹病毒来源的 VSV-G 基因, 提供病毒包装所需要的包膜蛋白。将三质粒系统共转染 293T 细胞便可包装出携带目的基因且具有高效转染效率的慢病毒颗粒<sup>[7-8]</sup>。通过感染细胞或活体组织, 实现外源基因在细胞或活体组织中表达<sup>[9]</sup>。慢病毒载体感染能力强, 能够感染处于分裂期和非分裂期的各种细胞<sup>[10]</sup>; 且慢病毒载体介导的基因表达持续、稳定, 原因是它可将目的基因整合到宿主细胞基因组中, 并随细胞基因组的分裂而分裂<sup>[11]</sup>; 还具有操作简便、免疫反应小、易合成、稳定性好、便于浓缩和纯化等优点, 使其成为体内、外基因转移的一种有效工具。

IDO 为一种细胞内 FLFL 含亚铁血红素的酶, 是肝外所有组织色氨酸代谢的限速酶, 沿犬尿酸途

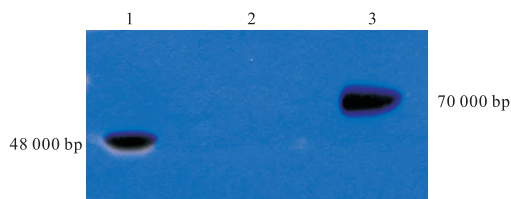


图5 Western blot 检测EGFP-IDO融合蛋白的表达  
(1:阳性对照;2:阴性对照;3:转染组)

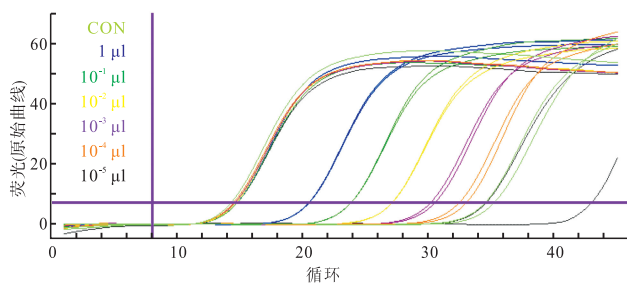


图6 实时定量PCR曲线

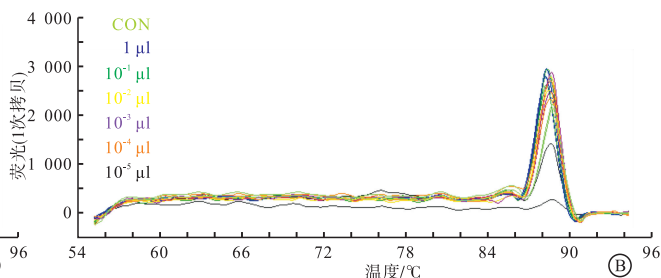
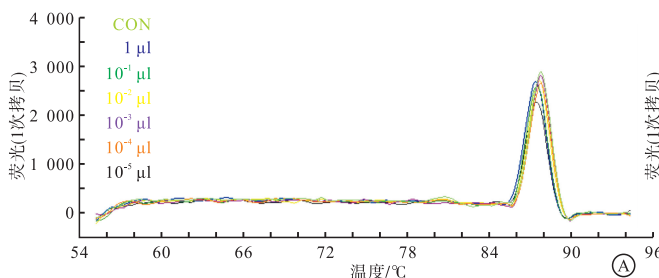


图7 Actin 基因(A)和目的基因(B)的溶解曲线

径代谢色氨酸为犬尿氨酸<sup>[1]</sup>。色氨酸是 T 细胞、尤其是抗原活化的 T 细胞增殖过程中合成蛋白质所必需的氨基酸。研究<sup>[12-13]</sup>发现,无论是抗原递呈细胞还是组织固有细胞表达的 IDO 均可消耗局部的色氨酸,产生低色氨酸及高犬尿氨酸的微环境,使 T 细胞处于一种“色氨酸饥渴”状态而抑制 T 淋巴细胞增殖并促进其凋亡。

因此我们构建了表达 IDO 基因的重组慢病毒载体,经 PCR 鉴定和测序,结果显示重组质粒构建成功。将重组质粒转染 293T 细胞后可成功表达 IDO 与 EGFP 的融合蛋白,进一步表面重组质粒构建成功,可用于下一步基因转染的实验。我们用重组慢病毒颗粒转染脐带间充质干细胞后,发现对其生长无明显影响,为后续细胞及动物体内转染实验的安全性提供了保障。

#### [ 参 考 文 献 ]

- [1] Mellor AL, Munn DH. Tryptophan catabolism and T-cell tolerance; immunosuppressed by starvation [J]. *Immunol Today*, 1999,20(10):469-473.
- [2] Munn DH, Shafiqzadeh E, Attwood JT, et al. Inhibition of T cell proliferation by macrophage tryptophan catabolism [J]. *J Exp Med*, 1999,189(9):1363-1372.
- [3] Geisse S, Henke M. Large-scale transient transfection of mammalian cells; a newly emerging attractive option for recombinant protein production [J]. *J Struct Funct Genomics*, 2005,6(2/3):165-170.
- [4] Lois C, Hong EJ, Pease S, et al. Germline transmission and tissue-specific expression of transgenes delivered by lentiviral vectors

[J]. *Science*, 2002, 295(5556):868-872.

- [5] Kubo S, Kataoka M, Tateno C, et al. In vivo stable transduction of humanized liver tissue in chimeric mice via high-capacity adenovirus-lentivirus hybrid vector [J]. *Hum Gene Ther*, 2010, 21(1):40-50.
- [6] Park JY, Lim BP, Lee K, et al. Scalable production of adeno-associated virus type 2 vectors via suspension transfection [J]. *Biotechnol Bioeng*, 2006,94(3):416-430.
- [7] Toledo JR, Prieto Y, Oramas N, et al. Polyethylenimine-based transfection method as a simple and effective way to produce recombinant lentiviral vectors [J]. *Appl Biochem*, 2009, 157(3):538-544.
- [8] Follenzi A, Naldini L. Generation of HIV-1 derived lentiviral vectors [J]. *Methods Enzymol*, 2002,346:454-465.
- [9] Mosna F, Senebe L, Krampera M. Human bone marrow and adipose tissue mesenchymal stem cells; a user's guide [J]. *Stem Cells Dev*, 2010,19(10):1449-1470.
- [10] Cockrell AS, Kafri T. Gene delivery by lentivirus vectors [J]. *Mol Biotechnol*, 2007,36(3):184-204.
- [11] Wang X, McManus M. Lentivirus production [J]. *J Vis Exp*, 2009,10(32):1499-1450.
- [12] Bauer TM, Jiga LP, Chuang JJ, et al. Studying the immunosuppressive role of indoleamine 2,3-dioxygenase; tryptophan metabolites suppress rat allogeneic T-cell responses *in vitro* and *in vivo* [J]. *Transpl Int*, 2005,18(1):95-100.
- [13] Terness P, Chuang JJ, Bauer T, et al. Regulation of human auto- and alloreactive T cells by indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO)-producing dendritic cells; too much ado about IDO [J]. *Blood*, 2005,105(6):2480-2486.