

研究论文

双载体转重链Tyr664Cys和轻链Thr1286Cys突变体
*BDD-FVIII*基因

朱甫祥* 杨树德 刘泽隆 缪 静 屈慧鸽 迟晓艳

(鲁东大学生命科学学院, 烟台 264025)

摘要 用双载体转运凝血VIII因子基因在甲型血友病基因治疗研究中可克服AAV毒载体容量限制, 但存在重链分泌低效和链不均衡性问题。为探索重、轻链间二硫键形成对重链分泌的促进作用, 该文用双载体转B结构域大部缺失型FVIII(BDD-FVIII)的重链和轻链基因, 将重链的Tyr664和轻链Thr1286突变为Cys, 研究了HEK293细胞共转基因后的基因表达、分泌至培养上清的重链量和凝血生物活性。用Western blot检测细胞裂解液结果显示, 非还原条件下有明显的二硫键交联的重、轻链蛋白; 链特异性ELISA定量检测细胞分泌的重链为(125±29) ng/mL, 明显高于共转野生型重链和轻链基因细胞的(75±23) ng/mL; Coatest法显示细胞分泌的凝血活性为(0.78±0.29) U/mL, 也明显高于共转野生型重链和轻链基因细胞(0.34±0.12) U/mL。结果表明, 重、轻链间的二硫键形成可提高双载体转*FVIII*基因的功效率, 为进一步在动物体内转基因提供了实验依据。

关键词 凝血VIII因子; 双载体; 链间二硫键; 重链分泌

在血友病基因治疗研究中, 腺相关病毒(adeno-associated virus, AAV)载体因可介导转基因在肝脏或肌肉内持续稳定表达, 使其成为血友病治疗的理想载体^[1-2]。但相对于FIX缺陷所致的乙型血友病, FVIII缺陷引起的甲型血友病的基因治疗研究滞后, 主要因为AAV的容量限制^[3]。FVIII的编码序列为7 Kb, 其B结构域缺失型功能性分子(BDD-FVIII)为4.37 Kb, 加上基因表达调控序列, 超过AAV载体的容量上限(4.4 Kb)^[4]。双载体转*FVIII*基因技术, 克服了AAV载体容量限制, 但突出的问题是由重链分泌的低效性产生的链不均衡性^[5]。研究表明, 重链分泌的低效性是由于与内质网内具有ATP酶活性的分子伴侣蛋白BiP间的相互作用, 使得其释放有赖于细胞内高浓度的ATP^[6]。我们最近的研究表明, FVIII轻链的分泌显著较重链高, 在蛋白剪接作用下, 轻链可顺式促进重链分泌^[7-8]。为了提高双链转*FVIII*基因细胞的重链分泌, 本文在重链的A2区和轻链的A3区之间引入可形成二硫键的半胱氨酸突变Tyr664Cys和Thr1286Cys^[9], 双载体转BDD-FVIII基因表明重链分泌的明显改善和细胞分泌凝血生物活性的提高, 为双AAV载体动物体内转*FVIII*基因提供了实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

BDD-FVIII的真核表达质粒载体pCMV-F8由本实验室构建并保存。含有BDD-FVIII重链、轻链与split *Ssp* DnaB蛋白内含子的融合基因表达质粒pCMV-HCIntN、pCMV-IntCLC为我们以前工作中构建^[10]。HEK293细胞购自中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库; *Pfu* Turbo DNA聚合酶购自Stratagene公司; DNA连接酶试剂盒购自New England Biolabs公司; Gel Extraction Kit、PCR Purification Kit、Spin Miniprep Kit均为Qiagen公司产品; DMEM和Opti-MEM培养基、Lipofectamine 2000转染试剂盒购自Invitrogen公司; 胎牛血清购自Hyclone公司; 重组FVIII为BioChain公司产品; FVIII的重链单克隆抗体ESH-5和FVIII轻链单克隆抗体ESH8购自American Diagnostica公司; HRP标记的兔抗人FVIII多克隆抗体购自Novus公司; 羊抗兔HRP-二抗

收稿日期: 2011-07-26 接受日期: 2011-10-28

山东省自然科学基金(No.ZR2010CM061)、烟台市科技计划项目(No.2008152)和教育部留学回国人员科研启动基金(No.20071108)资助项目

*通讯作者。Tel: 0535-6693825, E-mail: fuxiangmail@163.com

和ECL plus Western Blotting Detection试剂盒购自GE公司; 人正常参比血浆为George King Biomedical公司产品; FVIII活性检测的COATEST SP FVIII试剂盒购自Chromogenix公司; 其它试剂均为国产或进口分析纯。

1.2 真核重组表达质粒的构建

分别以质粒pCMV-HCIntN和pCMV-IntCLC为模板, 用引物对5'-CCG TTT AAA CCC GCT GAT CAG-3'(正向)、5'-CTG AAG AGT AGT ACG AGT TAT TTC-3'(反向)和5'-TCA GAT CAA GAG GAA ATT GAC TAT G-3'(正向)、5'-ACT AAA GCA GAA TCG CAA AAG GC-3'(反向)在*Pfu* Turbo DNA聚合酶的作用下反向进行PCR, 分别自身连接扩增产物、环化, 得到BDD-FVIII重链和轻链表达载体pCMV-HC和pCMV-LC。为了将重链A2区的Tyr664和轻链A3区的Thr1826突变为Cys, 分别以pCMV-HC和pCMV-LC为模板, 用引物对5'-GTG AAG ACA CAC TCA CCC TA-3'(正向)、5'-AGA CCA TTT TGT GTT TGA AG-3'(反向)和5'-CTA AAG ATG AGT TTG ACT GCA AAG-3'(正向)、5'-AGG GTG CCA TAT GAT GTT GCA-3'(反向)进行反向PCR, 将扩增产物分别自连接环化得到Tyr664Cys突变的重链表达载体pCMV-Y664CHC和含Thr1826Cys突变的轻链表达载体pCMV-T1826CLC。

1.3 HEK293细胞的培养及基因转染

HEK293细胞于5% CO₂、37 °C细胞培养箱中用含10%胎牛血清的DMEM培养液贴壁培养。转染前一天用胰蛋白酶消化分散细胞, 用2 mL DMEM培养液按每孔 5×10^5 个细胞接种于6孔培养板中, 待细胞生长融合至80%以上时, 用脂质体Lipofectamine 2000按试剂盒说明书进行基因转染, 将表达载体pCMV-Y664CHC和pCMV-T1826CLC各6 μ g混合稀释于250 μ L的Opti-MEM培养液中, 与室温放置5 min的含20 μ L脂质体的250 μ L Opti-MEM培养液混合后继续室温放置20 min, 共转染HEK293细胞。用pCMV-HC和pCMV-LC共转染细胞作为对照; 同时设置pCMV-HC和pCMV-T1826CLC、pCMV-Y664CHC和pCMV-LC共转染细胞, 以检测野生型HC与T1826CLC、Y664CHC与野生型LC间是否可以形成二硫键交联产物。并用空载体pcDNA3.1和pCMV-F8分别转染细胞作为阴性对照(Mock)和BDD-FVIII表达对照。培养箱内温育5 h后换以2 mL的新鲜Opti-

MEM培养液, 继续培养48 h, 收集培养上清, 加入40 μ L混合蛋白酶抑制剂。

1.4 Western blot观察转基因细胞的蛋白表达

用冻融法裂解所收集的转基因细胞, 提取转基因细胞总蛋白, 用Bradford法进行蛋白定量, 每个样品取12 μ g总蛋白上样, 分别用还原性(加DTT)和非还原性(不加DTT)SDS-PAGE分离蛋白, 半干电转系统将蛋白转移至PVDF膜, 用5%脱脂奶粉溶液室温封闭2 h, 用1:1 000稀释的兔抗人FVIII多克隆抗体37 °C轻摇孵育1 h, 再用HRP-抗兔血清37 °C轻摇孵育1 h, ECL plus法曝光X光胶片。

1.5 ELISA定量分析转基因细胞培养上清中的重链和轻链多肽

按照我们以前建立的链特异性ELISA分别检测培养上清中重链和轻链多肽的浓度^[8]。用FVIII重链单抗ESH5或轻链单抗ESH8包被酶标板, 洗板后加封闭液37 °C封闭2 h, 洗板后加细胞上清样品和标准品FVIII, 37 °C温育1 h, 洗板后加HRP标记FVIII多抗, 37 °C温育1 h后洗板, 加反应底物OPD溶液37 °C温育30 min进行显色, 用2 mol/L的H₂SO₄终止反应, 490 nm读板。建立标准曲线, 从标准曲线分别读取重链和轻链多肽的浓度。

1.6 转基因细胞培养上清中凝血生物活性的分析

参照文献[11]报道的方法, 用Coatest发色分析法按试剂盒说明书操作分析细胞培养上清的FVIII生物活性。用Opti-MEM培养液稀释正常人参比血浆(FVIII活性为1.0 U/mL)成系列浓度, 序列反应后405 nm处读取吸光值, 以稀释百分比为横坐标、吸光值为纵坐标绘制标准曲线, 由培养上清样品测得的吸光值从标准曲线读出相应的百分比值, 换算为上清的FVIII生物活性。

1.7 实验结果的统计学处理

计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两样本均数比较采用*t*检验; 多样本均数比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用*q*检验, *P* < 0.05为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 FVIII突变体重链和轻链基因表达载体的构建

FVIII的分子结构域排列为A1-A2-B-A3-C1-C2, 去掉B区的Ile761~Asn1639为BDD-FVIII, 在BDD-FVIII的cDNA的Ser1657密码子前断裂为重链和轻链, 分别插入到真核表达质粒pcDNA3.1(+)中, 成为

一对重链和轻链表达载体pCMV-HC和pCMV-LC。用PCR介导的点突变法将pCMV-HC中重链A2区的Tyr664和pCMV-LC中轻链A3区的Thr1826突变

为Cys, 得到Cys突变重链和轻链表达载体pCMV-Y664CHC和pCMV-T1826CLC。以上各种FVIII的结构见图1。

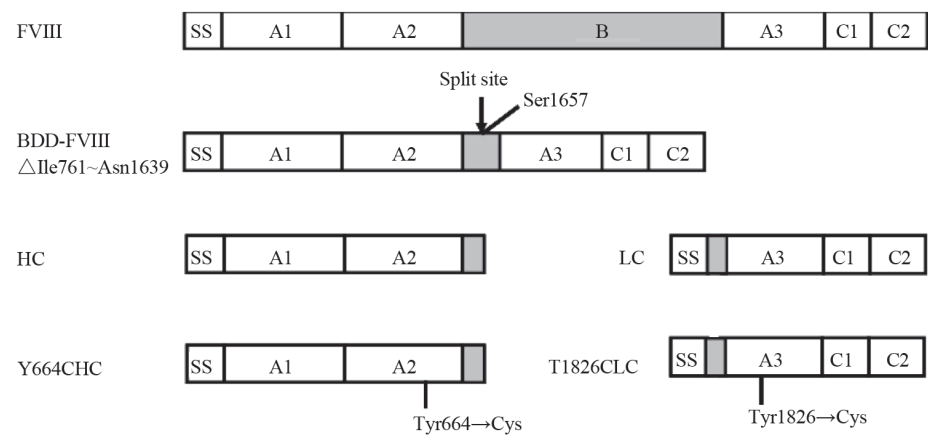
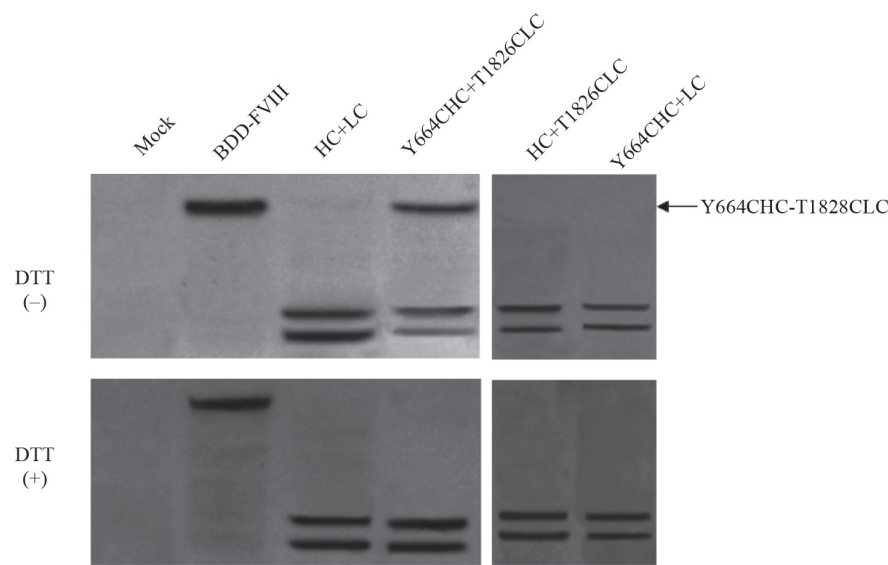


图 1 FVIII及其衍生物结构示意图
Fig.1 Schematic representation of factor VIII and its derivatives

2.2 细胞内重、轻链多肽的表达和二硫键的形成
用FVIII多克隆抗体进行细胞总蛋白Western blot检测, 结果显示(图2), 在非还原条件下(不加还原剂DTT), 共转Y664CHC和T1826CLC基因的HEK293细胞中可见与转BDD-FVIII基因对照细胞中表达的BDD-FVIII相对分子质量大小一致的蛋白条带,

提示为二硫键相连的重、轻链二聚体(Y664CHC-T1826CLC), 同时也可见未完全形成二硫键交联的以游离形式存在的Y664CHC和T1826CLC。共转HC与LC基因在非还原条件下只可见游离存在的重链(HC)和轻链(LC)。在还原条件下(样品中加还原剂DTT), 共转Y664CHC和T1826CLC基因细胞中未见



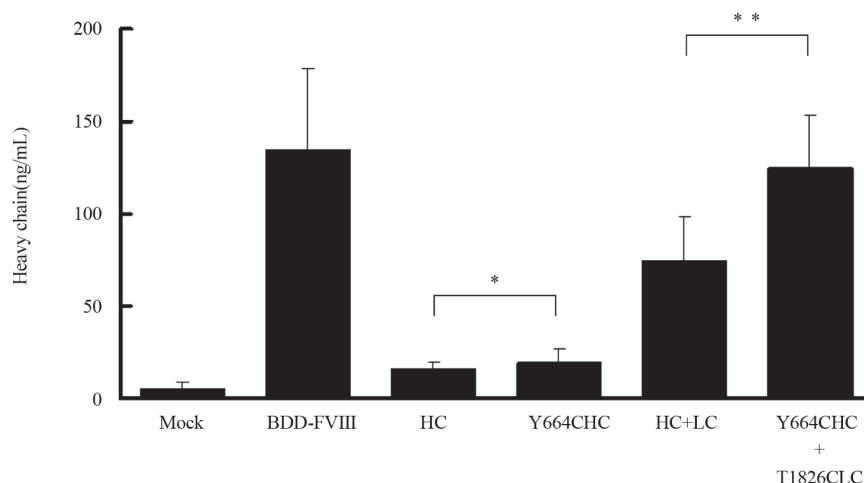
转基因细胞裂解物加还原剂(DTT+)和不加还原剂(DTT-)经SDS-PAGE后用FVIII多克隆抗体检测。
Transduced cell lysates were resolved by reduced (DTT+) or non-reduced SDS-PAGE (DTT-) and probed by FVIII polyclone antibody.

图2 Western blot检测二硫键交联的重、轻链二聚体形成
Fig.2 Observation of inter-chain disulfide cross-linked heavy and light chain dimer by Western blot

二聚体形式的蛋白条带,说明在DTT作用下,链间二硫键被还原,使二聚体解聚。*HC*与*T1826CLC*基因、*Y664CHC*与*LC*基因共转染细胞在非还原条件下未见二硫键交联产物。

2.3 链间二硫键形成促进重链分泌、缓解重链和轻链分泌量比率的不均衡性

链特异性ELISA定量分析转基因细胞上清的重链分泌量结果显示(图3),与共转野生型BDD-FVIII



结果以means±SD表示, $n=6$ 。* $P>0.05$, 与HC相比, ** $P<0.05$, 与HC+LC相比。

Data are represented as means±SD, $n=6$ 。* $P>0.05$, vs HC, ** $P<0.05$, vs HC+LC.

图3 细胞培养上清的重链含量

Fig.3 Amount of heavy chain in culture supernatant of cells

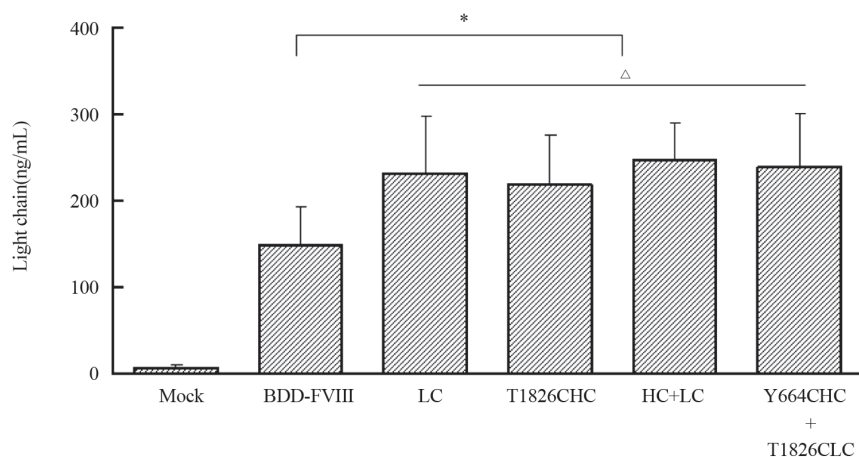
重链和轻链基因细胞的重链分泌量(75 ± 23) ng/mL相比, 共转*Y664CHC*和*T1826CLC*基因细胞培养上清的重链浓度为(125 ± 29) ng/mL, 明显高于前者; 单独转*Y664CHC*或*HC*基因细胞的重链分泌量分别为(20 ± 7) ng/mL和(16 ± 4) ng/mL, 二者之间无明显区别, 均明显较共转基因低, 说明共转基因后, 轻链多肽具有促进重链分泌的作用, 以与重链以链间二硫键结合时的促分泌作用更为显著; 转*BDD-FVIII*基因细胞的重链分泌为(135 ± 44) ng/mL。

链特异性ELISA检测细胞上清的轻链分泌量, 结果显示(图4), 单独转*T1826CLC*和*LC*基因细胞的轻链分泌量分别为(218 ± 58) ng/mL和(231 ± 67) ng/mL, 与它们相应的重链共转基因细胞的轻链的分泌量分别为(238 ± 62) ng/mL和(247 ± 42) ng/mL, 无论是单独转基因还是共转基因, 轻链的分泌量之间均无显著差异, 但明显高于转*BDD-FVIII*基因细胞的轻链分泌(148 ± 45) ng/mL, 表明轻链的分泌性远较重链为高, 且不受共转基因的影响; 由于转*BDD-FVIII*基因细胞的重链与轻链在细胞内加工成异源二聚体后以等比率计量关系分泌, 轻链分泌相对双载体共转基因或

单独转轻链基因细胞的轻链分泌量低, 提示与重链具依存关系的轻链受重链低分泌性的拖累, 不利于其分泌。比较共转基因细胞轻链和重链分泌量比率显示, 有链间二硫键形成时为1.9:1, 而无链间二硫键形成时为3.3:1, 表明链间二硫键形成具有通过重链分泌的增加缓解链分泌不均衡性的效应。

2.4 链间二硫键形成提高转基因细胞分泌凝血生物活性

用Coatest生色法检测细胞培养上清的凝血生物活性结果显示(图5), 链间二硫键形成的共转基因细胞分泌的活性为(0.78 ± 0.29) U/mL, 明显较无二硫键形成的共转基因细胞(0.34 ± 0.12) U/mL为高, 与转*BDD-FVIII*基因对照细胞分泌的生物活性相近, 为(0.91 ± 0.23) U/mL。表明链间二硫键形成通过促进重链分泌可明显增加双载体转基因细胞分泌的凝血生物活性, 提高转基因的功效。若按转*BDD-FVIII*基因细胞分泌的重链全部(100%)参与贡献凝血活性计算, 链间二硫键形成的共转基因细胞分泌重链的93%产生凝血活性, 而无链间二硫键形成为67%, 表明链间二硫键形成不仅提高重链分泌量, 且通过增

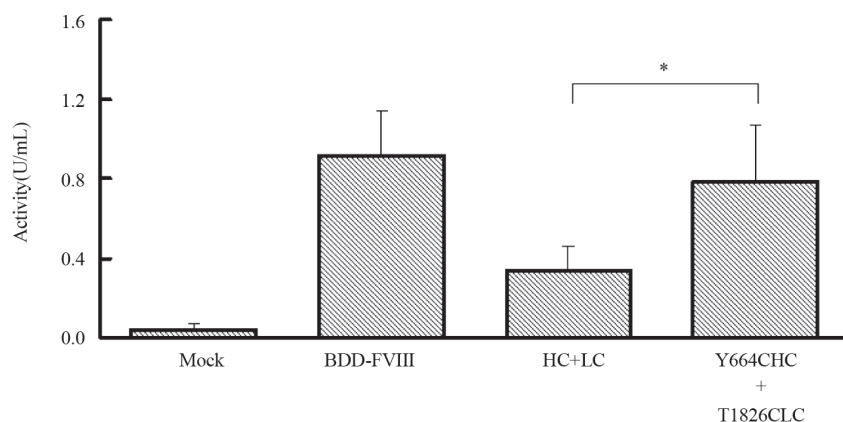


结果以means±SD表示, $n=6$ 。△ $P>0.05$, * $P<0.05$ 。

Data are represented as means±SD, $n=6$ 。△ $P>0.05$, * $P<0.05$ 。

图4 细胞培养上清的轻链含量

Fig.4 Amount of light chain in cultured supernatant of cells



结果以means±SD表示, $n=6$ 。* $P<0.05$, 与HC+LC相比。

Data are represented as means±SD, $n=6$ 。* $P<0.05$, vs HC+LC。

图5 细胞培养上清的FVIII生物活性

Fig.5 FVIII bioactivity in cultured supernatant of cells

强的链间相互作用, 使更多的重链与轻链形成功能性异源二聚体, 发挥生物活性。

3 讨论

AAV载体因可介导转基因持续稳定表达在基因治疗中受到青睐, 但在甲型血友病基因治疗中较大的FVIII基因超过了AAV的容量限制。基于对功能性FVIII异源二聚体形成的认识, 运用双载体转FVIII重

链和轻链基因为克服AAV容量限制提供了可能^[12-13]。但FVIII的重链存在与内质网分子伴侣BiP结合位点, 其释放有赖于高浓度的细胞ATP水平^[14], 以及重链B区的糖基化修饰影响FVIII的内质网-高尔基体间转移^[15], 使得FVIII的分泌过程十分复杂, 分泌效率受重链的拖累。因此双载体转FVIII基因时, 重链和轻链分泌性差异导致分泌量的不均衡, 在小鼠体内尤为显著, 轻链分泌量是重链的10~100倍^[5,12], 而在狗

体内实验显示为4~8倍^[13]。我们以前的工作表明, 双载体转BDD-FVIII基因细胞的重、轻链表达水平相近^[8], 因此过多的重链淤积胞内, 影响细胞的稳定性, 还会诱导细胞凋亡^[16], 而且细胞分泌无功能的轻链有可能引起机体的免疫反应。

FVIII分泌时没有活性, 在凝血反应中, 凝血酶通过催化水解FVIII的Arg373、Arg740和Arg1689产生由A1、A2区和轻链组成的异源三聚体, 成为活化的FVIIIa, 由于A2亚单位易于自动脱落使得活化的异源三聚体分子极不稳定, 半衰期只有大约2分钟^[17]。Gale等^[9,18]在A2区和轻链的A3区引入Cys点突变, 证明可形成二硫键, 明显提高FVIIIa的稳定性。本文用双载体转A2区和A3区引入Cys点突变的BDD-FVIII基因, 在细胞表达的重、轻链间观察到链间二硫键的形成。分泌至细胞培养上清的重链浓度在有链间二硫键形成时得到明显提升, 表明重链分泌性的改善, 但单独转重链基因时, 显示重链分泌水平的显著低下, 表明共转基因时轻链对重链分泌的促进作用, 而且这种促进作用在有链间二硫键形成时, 表现的尤为显著。我们以前的工作曾表明轻链对重链分泌具有反式促进作用^[8], Chen等^[19]证明这种反式作用的元件源自轻链N端的酸性结构区。当链间二硫键形成时, 轻链对重链的促分泌作用可理解为高效分泌的轻链驱动了与之共价连接的重链的分泌, 是一种顺式促进作用, 与我们运用蛋白内含子介导的重、轻链剪接工作观察到的轻链促进与之肽键连接的重链的分泌类似^[8]。由此可以看出, 轻链对重链分泌的顺式作用比反式作用更为明显, 从转BDD-FVIII基因对照细胞重链的分泌量高于双载体转基因细胞高, 也说明轻链对重链分泌的顺式促进作用强于反式作用。转基因细胞分泌的轻链浓度均具有较高水平, 不受链间二硫键的影响, 也不受共转基因的影响, 显示其分泌的高效性。链间二硫键形成对重链分泌的促进作用, 使共转基因细胞分泌的重链和轻链的比率不均衡性得到一定的缓解。链间二硫键形成不仅促进了重链的分泌, 而且使更多的重链与轻链以异源二聚体形式分泌, 这可从细胞分泌的凝血生物活性的提高得到证明; 细胞分泌的重链中参与凝血活性形成的比率也明显提升, 由此, 分泌的双链中无功能的比率减少, 提高了双载体转BDD-FVIII基因的功效。本工作为进一步在动物体内双载体转BDD-FVIII基因实验提供了依据。

参考文献 (References)

- 1 Arruda VR, Stedman HH, Haurigot V, Buchlis G, Baila S, Favaro P, *et al.* Peripheral transvenular delivery of adeno-associated viral vectors to skeletal muscle as a novel therapy for hemophilia B. *Blood* 2010; 115(23): 4678-88.
- 2 Niemeyer GP, Herzog RW, Mount J, Arruda VR, Tillson DM, Hathcock J, *et al.* Long-term correction of inhibitor-prone hemophilia B dogs treated with liver-directed AAV2-mediated factor IX gene therapy. *Blood* 2009; 113(4): 797-806.
- 3 Dooriss KL, Denning G, Gangadharan B, Javazon EH, McCarty DA, Spencer HT, *et al.* Comparison of factor VIII Transgenes bioengineered for improved expression in gene therapy of hemophilia A. *Hum Gene Ther* 2009; 20(5): 465-78.
- 4 Jiang H, Lillicrap D, Patarroyo-White SL, Liu T, Qian X, Scallan CD, *et al.* Multiyear therapeutic benefit of AAV serotypes 2, 6, and 8 delivering factor VIII to hemophilia A mice and dogs. *Blood* 2006; 108(1): 107-15.
- 5 Scallan CD, Liu T, Parker AE, Patarroyo-White S, Chen H, Jiang H, *et al.* Phenotypic correction of a mouse model of hemophilia A using AAV2 vectors encoding the heavy and light chains of FVIII. *Blood* 2003; 102(12): 3919-26.
- 6 Morris JA, Dörner AJ, Edwards CA, Hendershot LM, Kaufman RJ. Immunoglobulin binding protein (BiP) function is required to protect cells from endoplasmic reticulum stress but is not required for the secretion of selective proteins. *J Biol Chem* 1997; 272(7): 4327-34.
- 7 Zhu FX, Yang SD, Liu ZL, Miao J, Qu HG, Chi XY. The effect of a secretion-enhanced heavy chain on improving intein-based dual-vector co-delivery of a full-length factor VIII gene. *Chin Sci Bull* 2011; 56(2): 158-63.
- 8 Chen LX, Zhu FX, Li J, Lu H, Jiang HY, Sarkar R, *et al.* The enhancing effects of the light chain on heavy chain secretion in split delivery of factor VIII gene. *Mol Ther* 2007; 15(10): 1856-62.
- 9 Gale AJ, Pellequer JL. An engineered inter-domain disulfide bond stabilizes human blood coagulation factor VIIIa. *J Thromb Haemost* 2003; 1(9): 1966-71.
- 10 Zhu FX, Liu ZL, Chi XY, Qu HG. Protein trans-splicing based dual-vector delivery of the coagulation factor VIII gene. *Sci China Life Sci* 2010; 53(6): 683-9.
- 11 Sarkar R, Tetreault R, Gao G, Wang L, Bell P, Chandler R, *et al.* Total correction of hemophilia A mice with canine FVIII using anAAV 8 serotype. *Blood* 2004; 103(4): 1253-60.
- 12 Burton M, Nakai H, Colosi P, Cunningham J, Mitchell R, Couto L. Coexpression of factor VIII heavy and light chain adeno-associated viral vectors produces biologically active protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96(22): 12725-30.
- 13 Sabatino DE, Lange AM, Altynova ES, Sarkar R, Zhou S, Merriks EP, *et al.* Efficacy and safety of long-term prophylaxis in severe hemophilia A dogs following liver gene therapy using AAV vectors. *Mol Ther* 2011; 19(3): 442-9.
- 14 Swaroop M, Moussalli M, Pipe SW, Kaufman RJ. Mutagenesis

- of a potential immunoglobulin-binding protein-binding site enhances secretion of coagulation factor VIII. *J Biol Chem* 1997; 272(39): 24121-4.
- 15 Dorner AJ, Wasley LC, Kaufman RJ. Increased synthesis of secreted proteins induces expression of glucose-regulated proteins in butyrate-treated Chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem* 1989; 264(34): 20602-7.
- 16 Zhang K, Shen X, Wu J, Sakaki K, Saunders T, Rutkowski DT, *et al.* Endoplasmic reticulum stress activates cleavage of CREBH to induce a systemic inflammatory response. *Cell* 2006; 124(3): 587-99.
- 17 Fay PJ, Haidaris PJ, Smudzin TM. Human factor VIIIa subunit structure. Reconstruction of factor VIIIa from the isolated A1/A3-C1-C2 dimer and A2 subunit. *J Biol Chem* 1991; 266(14): 8957-62.
- 18 Gale AJ, Radtke KP, Cunningham MA, Chamberlain D, Pellequer JL, Griffin JH. Intrinsic stability and functional properties of disulfide bond-stabilized coagulation factor VIIIa variants. *J Thromb Haemost* 2006; 4(6): 1315-22.
- 19 Chen LX, Lu H, Wang JH, Sarkar R, Yang X, Wang HL, *et al.* Enhanced factor VIII heavy chain for gene therapy of hemophilia A. *Mol Ther* 2009; 17(3): 417-24.

Dual-vector Delivery of Thr664Cys and Thr1826Cys Mutated *BDD-FVIII* Gene

Zhu Fuxiang*, Yang Shude, Liu Zelong, Miao Jing, Qu Huige, Chi Xiaoyan

(Life Science College of Ludong University, Yantai 264025, China)

Abstract Dual-vector co-transfer of coagulation factor VIII(FVIII) has been used as an alternative strategy to overcome packaging limitation of adeno-associated virus (AAV) vectors in hemophilia A gene therapy, but leading to a chain imbalance problem for an inefficient heavy chain secretion. To improve heavy chain secretion, here we aimed to develop a strategy to enhance the interaction of heavy and light chains by introducing a disulfide linking between both chains. A pair of vectors was expressing Tyr664 to Cys mutated heavy chain and Thr1826 to Cys mutated light chain and co-transfected into cultured HEK293 cells to investigate the gene expression, heavy chain and bioactivity secreted in the culture medium. A disulfide-crosslinked heavy and light chains dimer was observed from total cellular protein by Western blot under non-reduced condition. An ELISA for the heavy chain demonstrated high levels of heavy chain (125 ± 29) ng/mL in the medium, greater than that secreted by wild-type heavy and light chains co-transfected cells (75 ± 23) ng/mL. The bioactivity in the medium was determined by Coatest chromogenic assay showing as (0.78 ± 0.29) U/mL higher than (0.34 ± 0.12) U/mL in medium of wild-type heavy and light chains co-transfected cells. Thus, it suggests that inter-chain disulfide linking could improve efficacy of dual-vector delivery of FVIII gene providing a feasible approach for an *in vivo* study using dual-AAV vectors to transfer FVIII gene.

Key words BDD-FVIII; dual-vector; inter-chain disulfide bonding; heavy chain secretion

Received: July 26, 2011 Accepted: October 28, 2011

This work was supported by the Natural Science Foundation of Shandong Province (No.ZR2010CM061), Science and Technology Program of Yantai City (No.2008152) and the Scientific Research Foundation from Education Ministry for the Returned Overseas Chinese Scholars (No.20071108)

*Corresponding author. Tel: 86-535-6693825, E-mail: fuxiangmail@163.com