

# 病毒基因转移载体——真核细胞基因工程的有力工具

张德礼

(北京军区后勤部卫生防疫队,北京军区兽医防治中心  
病毒基因工程研究室,北京 100071)

朱关福

(中国军事医学科学院微生物流行病学研究所,北京 100850)

洪涛

(中国预防医学科学院病毒学研究所,北京 100052)

**[摘要]** 从四方面评述病毒基因转移载体是真核细胞基因工程的有力工具:(1) 逆转录病毒载体——基因治疗传统载体;(2) 人类腺病毒载体——基因治疗新载体;(3) 禽痘病毒载体和非复制性载体用于基因治疗及动物模型的潜力;(4) 植物病毒基因转移载体。

**[关键词]** 病毒载体, 基因转移, 基因治疗, 逆转录病毒, 腺病毒, 禽痘病毒, 植物病毒, 非复制性载体

基因转移的方法有多种, 都是使细胞获得某种基因以达到治疗疾病或抗病育种目的。由于有效的基因治疗以及抗病育种, 都与如何将外源基因转移到细胞内并进行有效的表达密切相关, 因此真核基因转移和表达的研究便成为基因工程前沿的一个重要领域。

病毒载体介导的基因转移是将需要转移的外源 DNA 插入病毒 DNA 或 RNA 中, 借助病毒的侵染机制将其携带进入体细胞, 有的并整合入体细胞基因组中。至于 RNA 病毒, 则可通过逆转录酶的作用产生 cDNA 克隆, 进而用来感染机体。通常采用的逆转录病毒载体当属典型代表, 并且应用最广。植物病毒载体在基因转移中也有独到用途。由于病毒基因组结构简单, 分子背景比较清楚, 易于改造和操作, 而且转染率高, 又有较高的靶细胞特异性, 这些都是其它载体系统所无法比拟的, 故病毒基因转移载体在真核细胞基因转移载体, 尤其是在以基因治疗为目的的载体系统中显得格外令人瞩目。

从理论上讲, 任何病毒包括 DNA 病毒、有逆转录过程的 RNA 病毒以及无逆转录过程的 RNA 病毒, 都可以改造成为基因转移或基因表达载体。目前, 以逆转录病毒介导的基因转移技术在欧美已用于临床试验。不论在体内, 还是在体外, 目前以逆转录病毒载体在具有分裂功能的细胞中进行基因转移和表达最为成功。而在分裂期后的基因转移中, 近年报道较多的病毒载体有重组腺病毒 (Ad) 载体、单纯疱疹病毒载体、EB 病毒载体和细小病毒载体等。

本文于 1995 年 5 月 17 日收到。

特别是以腺病毒等(甚至将来以禽痘病毒)作载体,可不必将基因整合入体细胞基因组中,但仍可通过基因表达达到治疗疾病的目的。

## 1 基因治疗传统载体——逆转录病毒基因转移载体

长期以来,逆转录病毒(RNA病毒)由于其特殊的生活周期一直受到青睐,人们将它改造成成为相当安全的、能将目的基因携入受体细胞基因组的载体,并已得到广泛应用。构建逆转录病毒载体的基本原理是,病毒的长末端重复序列(LTR)可以对插入的外源基因进行有效的转录。迄今,除极少数外,几乎所有成功的人类基因转移试验都是依赖于逆转录病毒载体转导基因<sup>[1-4]</sup>。所以,正确认识基因转移用逆转录病毒载体系统的优点和缺陷,具有重要意义。

基因转移用逆转录病毒载体是指去除或更换了所有病毒基因,从而使载体感染细胞后不产生病毒蛋白的逆转录病毒。病毒复制功能则通过采用产生所有病毒蛋白,而不产生感染性病毒的逆转录病毒包装细胞来提供。逆转录病毒载体以DNA形式引入包装细胞,从而产生病毒颗粒。此颗粒携带载体RNA,并能感染靶细胞,但感染机体后不会增殖,从而排除了进一步传播病毒的可能性。为了将这一过程与病毒持续复制和传播的常规病毒感染区别开来,经常使用术语“转导”,而不使用“感染”。对常用的鼠源逆转录病毒的结构与功能研究得比较清楚,载体病毒可以感染许多细胞类型,感染率可达100%。现已有多种外源基因经逆转录病毒在多种细胞(包括骨髓淋巴细胞、皮肤上皮细胞、成肌细胞、肝细胞、血管内皮细胞等)中获得转移和表达,不论是否加辅助病毒,均可获得较高表达。基因治疗用逆转录病毒载体的主要优点是,能将基因高效转入复制性细胞,转移的基因能精确整合入细胞DNA,基因转导后不发生进一步序列扩散。能将基因有效稳定转入靶细胞,尤其是原代体细胞(somatic cells),这是其它基因转移技术所不具备的。而这正是逆转录病毒载体用于基因治疗的主要诱人之处。

但是,重组逆转录病毒载体只能携带较小的基因或序列(重组病毒包装的上限为10—11 kb),病毒滴度与临床要求相比较低(重组病毒携带外源基因大于9 kb时,其滴度一般很难达到要求),并有一定的宿主细胞范围。即使双嗜性载体也还不能解决感染特异性靶细胞的问题,加之安全问题(致瘤性)尚未完全解决,这对于需要长期、反复治疗的单基因遗传病患者要慎重。逆转录病毒载体明显不能感染非分裂细胞,只能携带较小的基因或序列,安全问题尚未完全解决。此外,由于逆转录病毒载体不能合成,而必须通过细胞培养来生产,因此不能完全确定用于基因转导的逆转录病毒载体制剂的特性。逆转录病毒载体不同于蛋白或其它简单化合物,它是蛋白和核酸的复杂化合物,制成后不能纯化至同源性。这意味着,必须广泛检测载体生产用细胞系受外源微生物(包括自主复制性逆转录病毒)污染的可能性。其它污染物,如包装入逆转录病毒载体的细胞核糖核酸(RNAs)也可能存在。这类RNAs中,有些能逆转录并整合入经逆转录病毒载体转导的细胞内,但其可能性只能凭经验在动物模型和人体试验中确定。

逆转录病毒载体潜在的另外两个问题是插入突变和辅助病毒产生。原病毒DNA随机整合入靶细胞染色体可能发生插入诱变。以细胞致癌基因的激活为例,凡是导致新序列整合入细胞基因组的任何基因转移技术,都可能涉及这一问题,只有腺联病毒可能例外,因为基因

组优先整合入19号染色体上某一区域。尽管逆转录病毒激活小鼠细胞致癌基因已有多例,但都是在辅助病毒传播性感染的条件下发生的。复制缺陷性逆转录病毒载体感染后,致癌基因的活化是否以可观频率发生,尚待观察。

尽管在逆转录病毒载体生产期间,在人类试验中迄今还没有一个生产批次的逆转录病毒载体,也没有一名患者检出存在辅助病毒,但辅助病毒产生的潜力仍应当提防。辅助病毒产生的潜力,依赖于逆转录病毒载体及其生产用包装细胞中的病毒基因序列,包装细胞含有为病毒蛋白合成所必需的所有序列,逆转录病毒载体含有为病毒感染所必需的顺时序列,所以这些序列间的重组就有产生辅助病毒的潜力,但好在避免了不同序列间的同源重叠。迄今,美国食品和药物管理局(FAD)许可的所有载体,均是用PA317 amphotropic 逆转录病毒包装细胞生产的。PA317细胞是采用含有编码所有逆转录病毒蛋白的一个相邻序列的DNA转染小鼠细胞而建立的。显而易见,PA317细胞在引入上述相邻序列两端具有广泛同源重叠的逆转录病毒载体后,就能产生辅助病毒。但是,采用缺乏或没有上述PA317细胞病毒序列重叠的载体,就排除了辅助病毒产生的可能性,即使用允许此类事件放大的严格方法检测亦如此。其它包装细胞设计则置于不同质粒上的不同逆转录病毒编码区分离,这应能降低通过重组产生辅助病毒的可能性,采用这类包装细胞系生产的载体,目前正由FAD审批。

最近,通过逆转录病毒感染进行骨髓移植的8只恒河猴中,有3只已在移植后6个月左右发生了胸腺淋巴瘤<sup>[1]</sup>,所用逆病毒制剂是受辅助病毒严重感染过的。为产生高效价载体病毒,所用载体采用包装细胞共培养来生产。但这种方法也产生了辅助病毒,因为高效价载体可提高骨髓细胞感染率。已证实,采用污染辅助病毒的载体,猴体骨髓干细胞能受感染。这些情况与以前食蟹猴(cynomologous macaque)和恒河猴接触 amphotropic 辅助病毒后却未检查疾病形成对比。以前试验目的在于支持所实施的人类基因治疗试验的安全性,而现在事实说明,对用于人类的载体制剂,需要严格检测,必须缺乏辅助病毒才行。

此外,由于特定外源基因的导入以及其基因产物带来的不良后果,目前还很难评价。

## 2 基因治疗新载体——人类腺病毒载体

与逆转录病毒载体相比,人类腺病毒(Ad)载体的独特优点在于:具有携带大片段外源DNA(36 kb基因组)的潜力,很高的体外培养增殖滴度( $10^{11}$  pfu/mL),能感染分裂期后的非复制性细胞,适于感染原位组织尤其是肺脏等。因此,近年来Ad用作基因治疗载体受到重视,成为高科技前沿领域的一大研究热点。腺病毒载体介导的外源基因转入哺乳类和人体细胞的方法有:(1)体外,仅供研究;(2)体内,用于基因治疗。腺病毒载体介导的基因治疗是将目的基因直接转移到人体的组织细胞里,经适当表达来纠正病症,从而达到治疗目的。比如,借助重组复制缺陷型腺病毒载体,将正常人CFTR cDNA直接转移到体内呼吸上皮细胞,可能纠正基因突变所造成的肺部病症<sup>[5]</sup>。这种基因疗法之所以尚未采用体内、外结合的离体(ex vivo)策略,是由于重组腺病毒载体基因并不插入受体细胞的基因组,而是以染色体外形式长期存在和表达,故安全性亦高于逆转录病毒介导的基因治疗。

利用人类腺病毒(Ad)构建基因治疗载体有以下优点:

(1)有关Ad的基因结构与功能已研究得比较清楚<sup>[1,6-8]</sup>。对人类腺病毒血清2型(Ad<sub>2</sub>)和5型(Ad<sub>5</sub>)的遗传背景和生化特性已有深入研究<sup>[7-8]</sup>,尤其是对5种Ad的DNA全序列测

定工作即将完成<sup>[1,6,8-9]</sup>。人类腺病毒疫苗株——血清4型(Ad<sub>4</sub>)和7型(Ad<sub>7</sub>)的遗传背景和生物化学特性虽未研究透彻,但作为病毒疫苗株已广泛应用<sup>[6-8]</sup>。

(2) Ad 基因容量大。以 Ad 为载体,插入外源基因(DNA)的容量可与杜兴氏肌肉营养不良(DMD) mRNA (dystrophin mRNA) 的大小相比。假如采用辅助病毒增殖重组腺病毒,腺病毒特性容许插入外源 DNA 可达 30 kb 以上,最大可达 36 kb<sup>[1,10]</sup>。但实际上目前所重组的外源免疫原基因尚不足 6.0 kb。

(3) Ad 比较稳定,相对安全,致病性低<sup>[6-10]</sup>。与其它病毒如痘苗病毒相比,腺病毒相对稳定,含有外源基因的重组腺病毒,在哺乳动物细胞内增殖极其稳定,目前的研究没有发现序列丢失或重排现象。自 60 年代开发出 Ad<sub>4</sub> 和 Ad<sub>7</sub> 减毒口服活疫苗以来,美国(主要是美军)已有 1 亿人次口服使用 Ad<sub>4</sub>, Ad<sub>5</sub> 和 Ad<sub>7</sub> 活疫苗胶囊来预防上呼吸道感染。就目前所知,服苗者没有或几乎没有不良反应,有效率 99.7%。而且在人类的肿瘤细胞中,至今尚未发现有腺病毒基因的整合。

(4) Ad 易于大量培养而且成本低廉,采用旋转大立瓶组织培养细胞增殖可产生高滴价腺病毒(经常获得大于 10<sup>10</sup> pfu/mL 的毒价),纯化也容易,并可浓缩至滴度超过 10<sup>11</sup> pfu/mL,这对体内应用重组 Ad 活载体进行组织特异性表达外源目的基因来治疗疾病,亦是十分重要的<sup>[1,10,11]</sup>。

(5) 腺病毒感染的宿主细胞极为广泛,而且由于它是 DNA 病毒,不会受其它 RNA 信息的干扰。Ad 能将编码酶的基因转移到小鼠肝脏<sup>[1,5,12]</sup>、肺上皮<sup>[13]</sup>、棉鼠气管上皮<sup>[5]</sup>、大鼠和小鼠脑细胞<sup>[12,14]</sup>、人类内皮细胞<sup>[11]</sup>或肌肉组织<sup>[10,14]</sup>中,并获得成功表达,乃至长期高效表达,故被证明是有效的基因治疗载体。腺病毒宿主范围宽广,不依赖于宿主细胞增殖,这就许可使用动物模型研究治疗遗传病如 DMD 等<sup>[1,5,10-14]</sup>。

(6) Ad 可在肠道繁殖,也可在呼吸道繁殖,因而适于感染原位组织器官,尤其是肺脏(如人肺囊性纤维化(CF)的基因治疗等<sup>[1,6-10]</sup>),为基因治疗提供了便利。迄今,Ad 基因治疗载体最杰出的应用,就是通过气管内滴注将 CF 跨膜传导调节因子(CFTR)基因转入棉鼠气管上皮<sup>[1,5]</sup>。已转移 CFTR 基因的表达,经 Northern 分析法检测可持续 6 周。感染后 11—14 天,用抗人 CFTR 抗体均检出人 CFTR 蛋白。这些令人鼓舞的实验结果,为业已开始的人类基因治疗临床试验奠定了基础。

(7) Ad 载体最大的优点之一是,它能感染分裂期后的非复制性细胞,如肌管(myotubes)、神经元(包括脑组织细胞)及逆转录病毒无法感染的一些细胞,从而进一步拓宽了基因治疗的应用范围<sup>[8,10-14]</sup>。例如,Quantin 等(1992)<sup>[10]</sup>设计了指导 β-半乳糖苷酶(lacZ)肌肉特异性表达的一株重组 Ad<sub>5</sub>,此重组体能指导体外肌管中 lacZ 表达。重组体感染后可在小鼠肌肉内表达达到 75 天。与机体肌肉组织基因转移或成肌细胞转移等方法相比,他们获得重组体表达的效率 and 稳定性都非常好。此重组体在两种啮齿动物肌原细胞系肌管和小鼠肌肉组织中,能有效地表达基因。最近将 lacZ 基因由 Ad 载体转入大鼠脑细胞并获得成功表达,这又为 Ad 载体介导的脑组织基因治疗展现了光明前景。

目前研究使用的均为缺陷型 Ad 基因治疗载体,它虽不能单独复制和增殖,但其基因转录可以相当活跃,在适当的结构下,外源基因可以在 Ad 不繁殖的情况下获得持续高效表达,这为使用这类载体进行人类基因治疗开辟了新途径<sup>[1,5,10-14]</sup>。美国 Hung PP 教授 1992 年指出,

通过缺失人类腺病毒(属 Ad<sub>4</sub>, Ad<sub>5</sub> 或 Ad<sub>7</sub> 中某一血清型)基因组某区段序列而构建成非复制性重组载体活疫苗,口服此疫苗仍可一过性感染(Abortive infection)机体很多部位,在早期启动子驱动下表达重组的外源基因,使接种者获得免疫保护,但不产生子代病毒。这从另一方面说明了缺陷型 Ad 载体有重要研究使用价值。

利用 Ad 构建基因治疗载体也存在一些问题。当前,用作载体的很多腺病毒结构基因表达蛋白的包涵体具有很强的免疫原性,可以激发免疫应答或者具有其它不良反应<sup>[1,11]</sup>。不过,能诱生免疫应答这一缺陷可通过使用不同血清型腺病毒载体予以弥补。

另外,腺病毒载体转移的基因在表达上潜在着不稳定性,因为载体本身不会整合入染色体 DNA 中,Ad 载体 DNA 不能整合到靶细胞基因组中<sup>[1,5,11]</sup>。不过,这在基因治疗上不必考虑会发生插入突变,这就提供了逐剂使用治疗基因的灵活性。

### 3 禽痘病毒载体和非复制性载体用于基因治疗及动物模型的潜力

近年来,禽痘病毒作为基因工程疫苗的重要载体已被确认。非复制性禽痘、痘苗及人类腺病毒载体疫苗的构建成功,尤其是最近非复制性金丝雀痘狂犬病毒重组疫苗的人体初免疫试验取得良好效果,更是举世瞩目。现已发现,禽痘病毒具有病毒基因组庞大、易于操作和价格低廉等与痘苗病毒载体相似的优点。其产毒性复制自然限于禽类,却又成为禽痘病毒载体最大的优势。研究表明,非复制性禽痘、痘苗及人类腺病毒重组活载体疫苗在技术上可行,免疫效果可靠。

非复制性载体同样可适用于基因治疗。以细胞因子和反义技术阻断乙型肝炎病毒复制及基因表达的研究为例,只要求载体所携带的细胞因子基因能得到适度表达,产生有生物学活性的细胞因子,起到广泛的免疫学效应及抑制病毒复制的作用;要求针对抑制病毒复制有效区段基因的反义 RNA 基因、瑞泊酶基因(Ribozyme 基因)和反义瑞泊酶基因(Antizyme 基因)得到高效表达,从而重点在 mRNA 水平上达到充分抑制病毒复制增殖的效果,而病毒载体是否增殖就无关紧要了,且病毒载体不增殖亦能达到效果则更安全。因此,如能发现对人体尤其是人肝脏产生一过性感染的禽痘病毒,用其作为非复制性载体进行短期基因治疗,以抑制乃至清除携带者体内乙型肝炎病毒,这将是一个很值得探讨的问题。

鉴于非复制性载体的高度安全性,除逆转录病毒载体外,非复制性痘病毒和腺病毒(包括禽痘病毒和禽腺病毒)载体等用于基因治疗会有所作为。当然,这里所说的基因治疗,实际上是一般意义上的生物工程治疗,因为很可能不涉及基因的整合,只要求短期有效达到目的即可。这类措施有其适用范围,也应有生命力。

此外,鸡、鸭、雉、鹌鹑等禽类均是重要的实验动物,重组禽痘病毒载体对建立人类疾病家禽实验动物模型会有助益,尤其在人类疾病基因治疗的禽类实验动物模型研究及疗效观察上更有用处。如“阻断乙型肝炎病毒复制及基因表达的研究”是国家“863”计划课题,并以鸭乙型肝炎病毒在鸭体内复制及基因表达的阻断情况作为实验动物模型,来考查细胞因子,反义 RNA、Ribozyme 和 Antizyme 基因治疗的效果。但所用载体是痘苗病毒,增殖能力低且缺乏嗜肝性,对疗效观察尤其是反义基因的治疗效果观察很不利,因为只有反义基因得到高效表达,反义 RNA、Ribozyme 和 Antizyme 远远多于 mRNA 才能有效。用对鸭敏感的火鸡痘病毒或其它具有一定嗜鸭肝性的禽痘病毒为载体则会收到较好效果。

最近,以腺病毒为基因转移载体的工作表明,这一载体系统不久将成为基因治疗的一项重要工具。同样,禽痘病毒载体也可能成为人类疾病实验动物模型研究,及传染病、遗传病和肿瘤病基因治疗研究的有效工具。

总之,非复制性病毒载体,在基因治疗研究与动物模型建立等生物工程领域,具有应用前景。

#### 4 植物病毒基因转移载体

Brisson 等(1984)<sup>[15]</sup>首次报道,通过烟草花叶病毒(CAMV)携带标记基因转化植物取得成功,并获得表达。近年来,病毒载体和具有 Ti 质粒转移能力的载体相结合,产生了一种农杆菌感染(Agro-infection)技术。它是将病毒 DNA 或 cDNA 通过无致癌能力(disarmed)的质粒转入植物,获得受系统感染的植株。这种转移 DNA 的方式,实际上与农杆菌介导的转移非常相似。至于目前发现的两种农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens* 和 *A. rhizogenes*),其作为基因转移载体的原理之所以相同,那是由于它们体内都有一种质粒(Ti 或 Ri),这种质粒中有一段 DNA,称为 T-DNA,能够整合到植物基因组中,并得到表达,且转化频率相当高。进一步研究发现:(1)去除了对植物有害的 onc(致癌)区的 T-DNA,仍具有整合到植物基因组中并再生植株的能力;(2)Vir 基因为 T-DNA 转移所必要,但能从另一种质粒上转移过来而发挥作用。这两点重要发现,使农杆菌在植物基因工程中的应用得以实现。首先,去除 onc 基因可使 T-DNA 的长度减短,并使转化后的植株具有正常的生长形态。其次,Vir 基因在质粒间的移动功能为双元载体的产生奠定了基础。这种双元载体既能在大肠杆菌中复制,又能在农杆菌中复制。目前,对 T-DNA 最重要的改造是,去除对植物有害的 onc 区段和其它为 T-DNA 转移所不需要的部分,进而在 T-DNA 两端中间插入各种有用的 DNA 片段,如植物选择标记基因、克隆位点以及结构基因等。

植物病毒载体具有容易感染、宿主专一性、复制能力较强以及表达效率较高等特点。但是,植物病毒载体在基因工程中的广泛应用,仍受到许多限制:(1)转移 DNA 片段的大小受限;(2)病毒感染使植物出现病状甚至死亡;(3)病毒 RNA 合成时错误率较高,从而导致基因表达错误;(4)外源 DNA 并不一定能传递给下一代;(5)病毒基因组对重组入的外源 DNA 的排斥作用;(6)病毒基因组很难整合到植物基因组上。

中国医学科学院副院长兼中国协和医科大学副校长卢圣栋教授审阅此文,特致谢意。

#### 参 考 文 献

- [1] Miller AD. Human gene therapy comes of age. *Nature*, 1992, **357** (6373): 455.
- [2] 薛京伦, 卢大儒. 成纤维细胞基因治疗血友病 B 的临床 I 期试验. *中国科学 (B 辑)*, 1993, **23** (1): 53.
- [3] 吴旻. 基因治疗纵横谈. *中华医学杂志*, 1993, **73** (7): 389-392.
- [4] 汤键, 周爱儒. 心血管病的基因治疗. *中华医学杂志*, 1994, **74** (6): 331-332.
- [5] Rosenfeld MA, Yoshimura K, Trapnell BC et al. In vivo transfer of the human cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene to the airway epithelium. *Cell*, 1992, **68** (1): 143.
- [6] Natuk RJ, Chanda PKm, Lubeck MD et al. Adenovirus-human immunodeficiency virus (HIV) envelope recombinant vaccines elicit high-titred HIV-neutralizing antibodies in the dog model. *PNAS USA*, 1992, **89** (16): 7777-7781.

- [7] Ye WW, Hung PP. Co-expression of hepatitis B virus antigens by a non-defective adenovirus vaccine vector. *Arch Virol*, 1991, **118** (1-2): 11-27.
- [8] Johnson DC et al. Adenovirus vectors as potential vaccines against herpes simplex virus. *Rev Infect Dis*, 1991, **13** (S11): S912-S916.
- [9] OV. Recombinant adenovirus nucleotide sequence; vector with SV40 virus DNA cassette for e. g. rabies virus recombinant vaccine construction. *Vaccine*, 1991, **9** (10): 772.
- [10] Quantin B, Perricauder LD, Tajbakhsh S et al. Adenovirus as an expression vector in muscle cells in vivo. *PNAS USA*, 1992, **89** (7): 2581.
- [11] Lemarchand P. Adenovirus-mediated transfer of a recombinant human alpha-1-antitrypsin cDNA to human endothelial cells. *PNAS USA*, 1992, **89** (14): 4382.
- [12] Ragot T, Vincent N, Chafey P et al. Efficient adenovirus-mediated transfer of a human minidystrophin gene to skeletal muscle of mdx mice. *Nature*, 1993, **361** (6413): 647.
- [13] Rosenfeld MA, Siegfried W, Yoshimura K et al. Adenovirus-mediated transfer of a recombinant alpha-1-antitrypsin gene to the lung epithelium in vivo. *Science*, 1991, **252**: 431.
- [14] Patel T, Brown P. Virus transports 'foreign' gene into rat's brain. *New Scientist*, 1993, **137** (1861): 15.
- [15] Brisson N, Paszkonski J, Penswick JR et al. Expression of a bacterial gene in plants by using a viral vector. *Nature*, 1984, **310**: 511-514.

## VIRAL VECTORS FOR GENE TRANSFER——EFFECTIVE TOOLS FOR GENETIC ENGINEERING OF EUKARYOTIC CELLS

Zhang Deli

*(Chinese Army Laboratory of Molecular Virology & Genetic Engineering,  
Institute of Preventive Medicine & Veterinary Science in Beijing  
Military Area of Chinese PLA, Beijing 100071)*

Zhu Guanfu

*(Department of Virology, Institute of Microbiology & Epidemiology,  
Chinese Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850)*

Hung Tao

*(Institute of Virology, Chinese Academy of Preventive Medicine, Beijing 100052)*

**Abstract** The update advances, existing questions, developing countermeasures & application prospects of viral vectors for gene transfer as affective tools for genetic engineering of eukaryotic cells have been critically reviewed form the following four aspects; (1) Retrovirus vectors for gene transfer——Traditional vectors for gene therapy; (2) Human adenovirus vectros——New vectors for gene therapy; (3) Potential use of avipoxvirus vectors and non-replicating virual vectors for gene therapy and animal models; and (4) Plant virus vectors for gene transfer.

**Key words** viral vectors, gene transfer, gene therapy, retrovirus; adenovirus, avipoxvirus, plant virus, non-replicating vectors