

利用杆状病毒系统获得携带抗体表达基因的双链 AAV 的研究

刘海燕¹, 钱其军^{1,2}

(1. 浙江理工大学生命科学学院新元医学与生物技术研究所, 杭州 310018;
2. 第二军医大学东方肝胆外科医院病毒基因治疗实验室, 上海 200438)

摘要: 研究使用二杆状病毒-昆虫细胞系统获得携带抗体表达基因的 8 型双链腺相关病毒(scAAV)。首先利用杆状病毒系统获得 ssrAAV8-EGFP 和 scrAAV8-EGFP, 实验表明 scrAAV8-EGFP 比 ssrAAV8-EGFP 具有更高的转导效率; 然后以同样的方法获得 scrAAV8-AT7, 检测其滴度, 并感染 HEK293 细胞以检测抗体的表达情况。蛋白印迹法检测出阿瓦斯汀(Avastin)重链已成功表达, ELISA 检测出 Avastin 在体外的表达量可达 770 ng/mL。该研究表明利用杆状病毒系统所获得 8 型 scAAV 具有生物学活性并能实现外源基因的体外表达。

关键词: 杆状病毒; 双链 AAV; 病毒生产; 外源

中图分类号: Q782 **文献标志码:** A

0 引言

肿瘤治疗中化疗和放射性疗法仍是目前使用最广泛的治疗方法, 但是此方法的毒副作用较大, 患者易对使用的药物产生抗性或者治疗后仍有肿瘤细胞的残留, 不能达到理想的治疗效果。随着基因工程技术及 DNA 重组技术的崛起, 腺相关病毒(AAV)在肿瘤治疗中已经显示出良好的前景。

腺相关病毒(AAV)是除腺病毒和逆转录病毒外另一种常见的病毒载体, 在基因治疗中发挥着重要的作用。虽然 rAAV 已在 I 期和 II 期临床试验中应用, 但所用的 AAV 多为单链 DNA, 需要一个由单链转变为双链的过程, 影响了 AAV 表达的速度与效率。自身互补 AAV(scAAV)无需合成互补链 DNA, 越过了第二链合成的障碍, 与传统的单链 AAV 相比具有更高的转导效率^[1]。研究表明, scAAV 比传统的 AAV 载体至少能提高 20 倍的转导效率^[2-5]。

rAAV 的获得手段仍以三质粒共转染 HEK293 细胞为主^[6], 想要获得足够的病毒就需要大量的细胞及转染质粒, 昂贵的生产成本以及低效的生产过程成为大量获得 AAV 的一大难题。而杆状病毒系统具有高安全性、操作简单快捷、成本低、易于大规模培养等优势^[7], 进而受到越来越多研究者的青睐。

目前采用质粒共转染 HEK293 细胞获得携带治疗基因的双链 AAV^[4]和采用二杆状病毒系统获得表达抗体的单链 AAV^[8]的研究均有报道, 但采用二杆状病毒系统获得表达抗体的双链 AAV 的相关研究尚无报道, 因此笔者对此展开研究, 检测采用二杆状病毒系统获得表达抗体的双链 AAV 的可行性。

1 实验

1.1 材料与仪器

实验材料: 质粒 pABVN-EF1a-EGFP、pDC339-AT7-IRES、杆状病毒 ABPM8 由本实验室保存; sf9

收稿日期: 2013-03-12

基金项目: 国家自然科学基金(8107185)

作者简介: 刘海燕(1985—), 女, 山东威海人, 硕士研究生, 主要从事肿瘤的基因-病毒治疗研究。

通信作者: 钱其军, E-mail: qianqi@163.com

细胞、sf900 II Insect Media、Cellfectin® II Reagent 购自 Invitrogen 公司;限制性内切酶、DNA ladder mix 购自 NEB 公司;SYBR® *Premix Ex Taq*™ II 购自 TaKaRa 公司;QiAamp DNA Blood Mini Kit (250)试剂盒购自 QIAGEN 公司;商品化 Avastin 购自 Roche 公司;羊抗人 IgG(H+L)、兔抗羊 IgG(HRP)购自北京康为世纪生物科技有限公司。

实验引物:所用均由上海捷瑞生物工程有限公司合成,序列如下所示。

AT409:GTTGAAGCTCTTTGTGACG;

AT502:CAGCTCCCTGTCCGCCTCTG;

AT501:CACGGAGCATGAGAAGACGTTC;

AT503:GGCTCACTCAGATTGTCCTG;

GT186:TGCTCTAGAGCTCCGGTGGCCGT
CAGTGGG;

GT187:CCCAAGCTTGCTAATTCCTCACG
ACACCTG;

GT702:GACAAGATGGTGATCTGGTG;

GT703:GTGTTCTGAAGGTCGTTGAGT;

AT7F:CCAACTACGGCATGAACTGG;

AT7H:AGGCTGTGCTTTTGGATGTG。

实验仪器:XDS-1B 倒置生物显微镜(重庆光学仪器厂);GIS-1000 凝胶成像系统(上海天能科技有限公司);HF90 CO2 细胞培养箱(力康生物医疗科技控股有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 dspABVN-EF1a-EGFP 菌株的合成构建及鉴定

取本实验室保存的 pABVN-EF1a-EGFP 质粒进行少量制备,然后进行酶切鉴定。鉴定正确后,以 pABVN-EF1a-EGFP 作为骨架载体对其进行改造,合成带有合适酶切位点的 dsITR 的部分,并进行酶切,随后连接到 pABVN-EF1a-EGFP 的剩余骨架上,构成 dspABVN-EF1a-EGFP,并进行酶切鉴定。

上海捷瑞生物工程有限公司提供的 dsITR 合成部分:ACTAGTCATATGCTCGACTTCGAGC
AACTTGTTTATTGCAGCTTATAATGGTTAC
AAATAAAGCAATAGCATCACAAATTTTACACA
AATAAAGCATTTTTTTTCACTGCATTCTAGT
TGTGGTTTGTCCAACTCATCAATGTATCT
TATCATGTCTGGATCGTCTAGCATCGAAGA
TCCCAGCTGGTTCGATTATGCCACTCCCTCTC
TGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGGCG
ACCAAAGGTCGCCCCGACGCCGGGCTTTGCC

CGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCA
GAGAGGGAGCAGATCCCCAGGAAGCTCCTC
TGTGCGGCCGC。

1.2.2 重组杆状病毒 ABVNM-EF1a-EGFP 及 dsABVNM-EF1a-EGFP 的获得及检测

dspABVN-EF1a-EGFP 质粒鉴定正确后,将 pABVN-EF1a-EGFP 及 dspABVN-EF1a-EGFP 两个质粒分别与 DH10Bac™感受态进行转座重组,在含有卡那霉素、庆大霉素、四环素及 IPTG 的培养板上挑选白色菌落,重新划线进行鉴定。然后提取阳性的重组杆状病毒载体 Bac-ABVN-EF1a-EGFP 及 Bac-dsABVN-EF1a-EGFP,转染 sf9 细胞获得初代重组杆状病毒并扩增获得滴度较高的重组杆状病毒 ABVNM-EF1a-EGFP 及 dsABVNM-EF1a-EGFP。

对重组杆状病毒 ABVNM-EF1a-EGFP、dsABVN-EF1a-EGFP 及 ABPM8 进行检测。检测主要有两部分:一部分是采用实时荧光定量 PCR(RT-PCR)检测重组杆状病毒 ABPM8、ABVNM-EF1a-EGFP 及 dsABVNM-EF1a-EGFP 的滴度。RT-PCR 检测方法为:用含有表达基因的质粒作为滴度测定的标准品,初始拷贝数为 2×10^7 copies/ μ L,然后作 5 个梯度稀释;按照 SYBR® *Premix Ex Taq*™ II 试剂盒配制反应液,采用 ABI StepOne™ Real-time PRC System 进行 PCR 反应及结果分析,对滴度检测结果进行计算以获得所需要的病毒添加量。另一部分是用重组杆状病毒 ABPM8 感染 sf9 细胞,收集细胞制样后,以 β -actin 为对照,采用蛋白免疫印迹法(Western blotting)检测重组杆状病毒 ABPM8 中 Cap 蛋白的表达情况。

1.2.3 srAAV8-EGFP 和 scrAAV8-EGFP 病毒的获得、纯化及转导效率检测

分别取 5 MOI 的上述经检测合格的重组杆状病毒 ABVNM-EF1a-EGFP 和 dsABVNM-EF1a-EGFP 与等 MOI 的经检验鉴定合格的重组杆状病毒 ABPM8 同时加入 27℃ 培养的 sf9 细胞中共转染,获得 ssrAAV8-EGFP 和 scrAAV8-EGFP 病毒,60℃ 加热 30 min 以灭活杆状病毒,-80℃ 保存待进一步纯化。

获得的 ssrAAV8-EGFP 和 scrAAV8-EGFP 病毒还需要进行一步纯化。首先采用聚乙二醇-氯化钠法对 ssrAAV8-EGFP 和 scrAAV8-EGFP 病毒进行粗纯化,然后用 Cell Biolabs ViraBind® AAV Purification Kit A 对其进行进一步纯化。

取等 MOI 纯化后的 ssrAAV8-EGFP 和 scrAAV8-EGFP 病毒分别感染 6 孔板中等量

HEK293 细胞,使用倒置荧光显微镜观察感染后的 HEK293 细胞,通过对比相同曝光条件下荧光显微镜视野范围内表达荧光的细胞数量及荧光强弱,检测两种病毒在细胞内的转导效率。

1.2.4 dspABVN-EF1a-AT7 质粒的构建及鉴定

取鉴定正确的质粒 dspABVN-EF1a-EGFP 和 pDC339-AT7-IRES 进行 EcoR I + Nhe I 双酶切,分别获得目的片段 dspABVN-EF1a(6 042 bp)以及 AT7(2 349 bp),检测目的片段 DNA 纯度及浓度,检测结果满足要求后使用 Solution I 连接酶于 4℃ 进行连接并转入 SURE 细胞,完成 dspABVN-EF1a-AT7 质粒的构建,并对提取的质粒进行酶切鉴定。

1.2.5 scrAAV8-AT7 病毒的获得、纯化及滴度检测

取鉴定正确的 dspABVN-EF1a-AT7 质粒,按 1.2.2 中操作完成重组杆状病毒 dsABVNM-EF1a-AT7 的扩增,获得所需的感染效率较高的重组杆状病毒 dsABVNM-EF1a-AT7。

取 5 MOI 的重组杆状病毒 dsABVNM-EF1a-AT7 与等量的 1.2.2 中鉴定正确的重组杆状病毒 ABPM8 共感染 sf9 细胞,从而获得 scrAAV8-AT7 病毒,60℃ 加热 30 min 以灭活杆状病毒。之后采用 1.2.3 中的纯化方法,对 scrAAV8-AT7 病毒进行纯化。并对纯化后的 scrAAV8-AT7 病毒进行滴度检测,检测采用 1.2.2 中所介绍的荧光定量 PCR 滴度检测方法。

1.2.6 scrAAV8-AT7 病毒表达蛋白的检测

将 HEK293 细胞以 3×10^5 个/孔的细胞密度铺设一块 6 孔板,每孔取 1 μ L 纯化后的 scrAAV8-AT7 病毒感染 HEK293 细胞(用含 5% FBS 的 DMEM 培养),72 h 后收集细胞上清液。将细胞上清进行制样,采用免疫印迹法检测目的蛋白是否成功表达;取细胞上清采用酶联免疫吸附法(ELISA)检测蛋白的表达量。

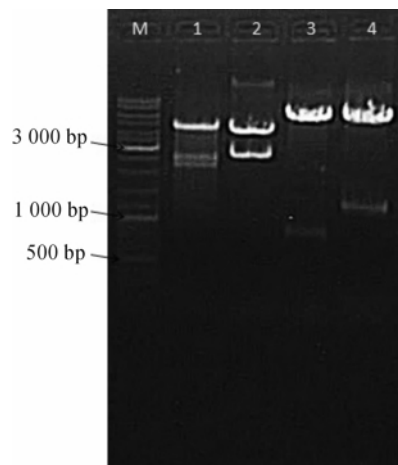
免疫印迹法:将细胞上清及商品化 Avastin(作为标准品)制样后然后分别取 16 μ L 细胞上清样品及 40 μ g 商品化 Avastin 样品加入加样孔中进行 SDS-PAGE 凝胶电泳,80 V 电泳 3 h。预先用甲醇浸泡的 PVDF 膜与滤纸用电转液润湿,置于电转仪中形成滤纸、膜、凝胶、滤纸的“夹心饼”,50 V 电转 2 h。封闭液封闭 1 h 后清洗,用一抗羊抗人 IgG(H+L)将膜孵育 60 min 后清洗,用二抗兔抗羊 IgG(HRP)对膜进行孵育 45 min 后清洗,最后进行化学发光并显影拍照。

酶联免疫吸附法:将鼠抗人 IgG I 抗体(用包被液稀释至 1.0 μ g/mL)以 100 μ L/孔的量加入酶标反应板中,4℃ 孵育过夜。100 μ L/孔封闭液 37℃ 孵育后加入 6 个上清液样品及标准品 Herceptin(最高浓度为 500 ng/mL,经封闭液倍比连续稀释 6 次,100 μ L/孔,设复孔和对照孔,37℃ 孵育 60 min。加入用封闭液稀释的 HRP 标记的鼠抗人 IgG I 抗体,100 μ L/孔,37℃ 孵育 45 min。加入底物液 TMB,100 μ L/孔,37℃ 避光显色 10~20 min。加入 50 μ L/孔 2 mol/L H₂SO₄ 后在酶标仪上测其 A_{450 nm} 的 OD 值。绘制标准曲线,计算出蛋白的浓度。

2 结果与分析

2.1 dspABVN-EF1a-EGFP 质粒的鉴定

对 dspABVN-EF1a-EGFP 目的菌株进行处理,使用 Xma I、Pac I + Not I、EcoR I + Nhe I、EcoR I + Nco I 4 组酶对获得的 dspABVN-EF1a-EGFP 质粒进行酶切鉴定。理论上 Xma I 酶切后的目的条带应为 4 445 + 2 340 + 11 + 11 bp, Pac I + Not I 酶切后的目的条带应为 4 284 + 2 523 bp, EcoR I + Nhe I 酶切后的目的条带应为 6 042 + 765 bp, EcoR I + Nco I 酶切后的目的条带应为 5 703 + 1 104 bp。图 1 中给出了 dspABVN-EF1a-EGFP 质粒的酶切鉴定结果电泳图,可以看出, dspABVN-EF1a-EGFP 质粒酶切后所得到的条带与理论分析的结果相符,表明得到的 dspABVN-EF1a-EGFP 目的质粒是正确的。



M: DNA ladder mix;
1: Xma I 单酶切结果;
2: Pac I + Not I 双酶切结果;
3: EcoR I + Nhe I 双酶切结果;
4: EcoR I + Nco I 双酶切结果

图 1 dspABVN-EF1a-EGFP 质粒酶切鉴定结果

2.2 重组杆状病毒 ABPM8 的 *cap* 基因表达的

Western blotting 检测

重组杆状病毒 ABPM8 的 *cap* 基因表达的 Western blotting 检测结果如图 2 所示,以 43KD 的 β -actin 作为对照,重组杆状病毒 ABPM8 *cap* 基因成功表达,其分子量大小分别为 87 kDa (VP1)、72 kDa (VP2) 以及 62 kDa (VP3)。

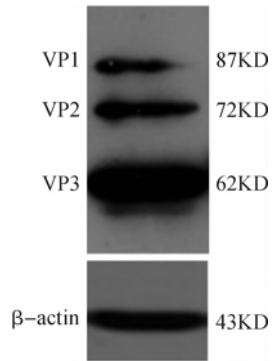
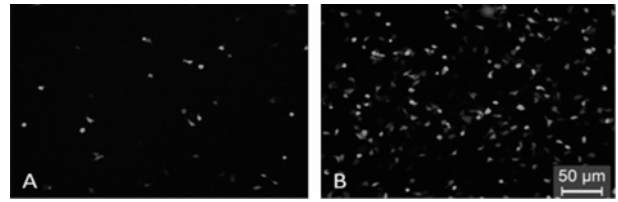


图 2 Cap 蛋白的 Western-blotting 检测

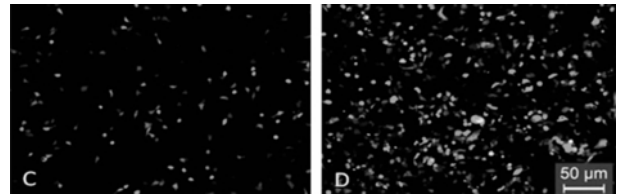
2.3 病毒 ssrAAV8-EGFP 和 scrAAV8-EGFP 转导效率的检测

用显微镜观察病毒 ssrAAV8-EGFP 和 scrAAV8-EGFP 感染后的 HEK293 细胞,观测到的荧光表达结果如图 3、图 4 所示,可以看出,随着时间的推移,两种病毒感染的 HEK293 细胞中表达荧光的细胞数量都在增加;在相同的时间内,病毒 scrAAV8-EGFP 感染的 HEK293 细胞中表达荧光的细胞数量明显比 ssrAAV8-EGFP 多。表明,在同等条件下,病毒 scrAAV8-EGFP 比 ssrAAV8-EGFP 具有更高的转导效率。



A 和 B:分别为感染后 24 h 和感染后 48 h 的荧光图

图 3 ssrAAV8-EGFP 感染 HEK293 细胞的荧光表达结果

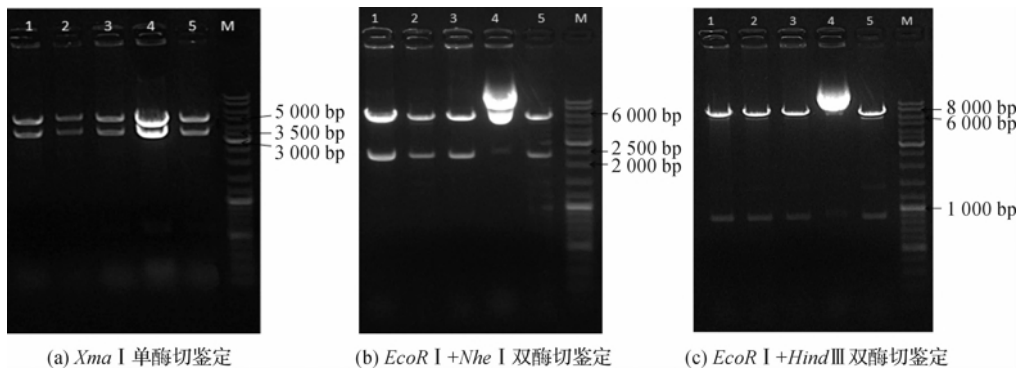


C 和 D:分别为感染后 24 h 和感染后 48 h 的荧光图

图 4 scrAAV8-EGFP 感染 HEK293 细胞的荧光表达结果

2.4 dspABVN-EF1a-AT7 质粒的鉴定

对采用 1.2.4 的方法构建的 dspABVN-EF1a-AT7 质粒进行酶切鉴定,酶切鉴定采用了 *Xma* I、*Eco*R I + *Nhe* I、*Eco*R I + *Hind* III 3 组酶,理论分析 *Xma* I 酶切后的目的条带应为 4 445 + 3 175 + 560 + 189 + 11 + 11 bp, *Eco*R I + *Nhe* I 酶切后的目的条带应为 6 024 + 2 349 bp, *Eco*R I + *Hind* III 酶切后的目的条带应为 7 488 + 903 bp。图 5 给出了 dspABVN-EF1a-AT7 质粒的酶切鉴定结果电泳图。从图中可以看出 1、2、3 前三个质粒的目的条带清晰无杂带,且与理论分析结果相符,表明三个 dspABVN-EF1a-AT7 质粒的构建正确。



(a) *Xma* I 单酶切鉴定

(b) *Eco*R I + *Nhe* I 双酶切鉴定

(c) *Eco*R I + *Hind* III 双酶切鉴定

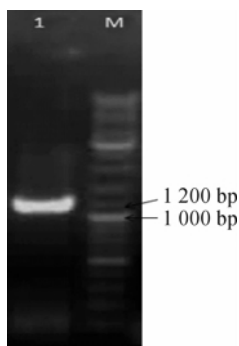
M: DNA ladder mix; 1~5: dspABVN-EF1a-AT7 5 个质粒的酶切结果

图 5 dspABVN-EF1a-AT7 质粒的酶切鉴定结果电泳图

2.5 重组杆状病毒 dsABVNM-EF1a-AT7 的鉴定

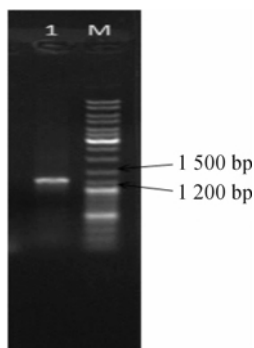
用引物 GT186 和 GT187 鉴定重组杆状病毒 dsABVNM-EF1a-AT7 的 EF1a 部分,鉴定结果如图 6 所示,目的条带大小 1 187 bp;引物 AT501 和 AT503 鉴定重组杆状病毒 dsABVNM-EF1a-AT7

的重链部分,鉴定结果如图 7 所示,目的条带大小为 1 254 bp。引物 AT499 和 AT502 鉴定重组杆状病毒 dsABVNM-EF1a-AT7 的轻链部分,鉴定结果如图 8 所示,目的条带为 607 bp;结果表明:重组杆状病毒 dspABVNM-EF1a-AT7 在昆虫细胞中已被成功包装。



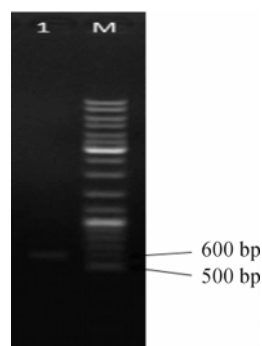
M: DNA ladder mix; 1: 杆状病毒的 PCR 产物

图 6 EF1a 的鉴定



M: DNA ladder mix; 1: 杆状病毒的 PCR 产物

图 7 重链的鉴定



M: DNA ladder mix; 1: 杆状病毒的 PCR 产物

图 8 轻链的鉴定

2.6 scrAAV8-AT7 病毒的滴度检测

取 2 μL 纯化后 scrAAV8-AT7 病毒进行 RT-PCR 检测,结果如图 9 所示。从图 9(a)扩增曲线看,两个重复之间具有比较好的重复性;从图 9(b)熔解曲线看,在基因扩增中并未出现明显的非特异性扩增,也未见明显的引物二聚体形成,表明所设计引物的特异性比较好;从图 9(c)定量 PCR 标准曲线看,2 μL 的纯化后 scrAAV8-AT7 病毒的模板 DNA 含量平均值为 1.41×10^7 ,经过换算得到其实际滴度为 1.41×10^{11} VG/mL。

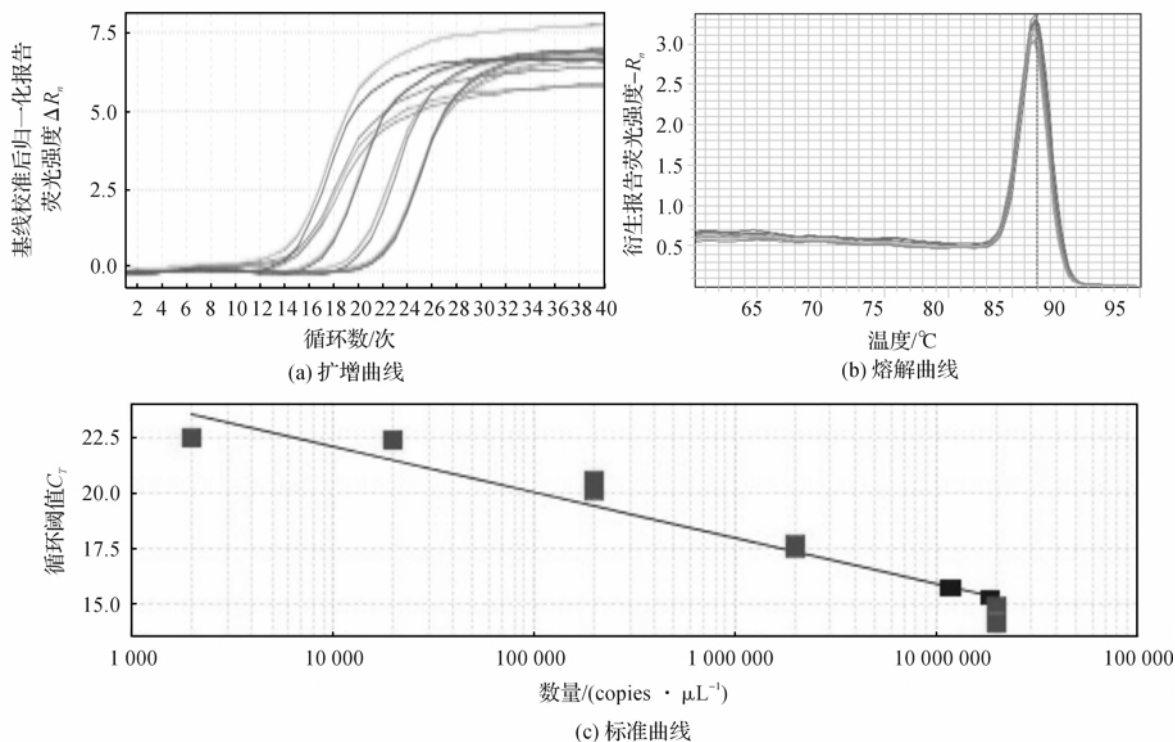


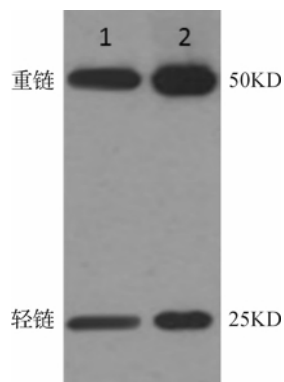
图 9 scrAAV8-AT7 的病毒滴度检测结果

2.7 Avastin 表达的蛋白检测

取细胞上清液用于检测 scrAAV8-AT7 病毒中 AT7 的表达结果,检测结果如图 10、图 11 所示。其

中图 10 为 Western Blotting 检测结果,图中上方为 Avastin 蛋白重链,下方为 Avastin 蛋白轻链,从图中可以看出表达出的 Avastin 重、轻链分子量大小

分别为 50 kDa 和 25 kDa,与商品化的 Avastin 条带大小相同,表明 scrAAV8-AT7 病毒的 AT7 基因在 HEK293 细胞中获得成功表达;图 11 为 ELISA 检测结果,最终检测出 6 个样品的平均值为 3.07, Avastin 的平均表达量为 700 ng/mL。



1: scrAAV8-AT7 中 AT7 表达的检测结果;
2: 商品化 Avastin 的检测结果

图 10 Avastin 的 Western Blotting 检测

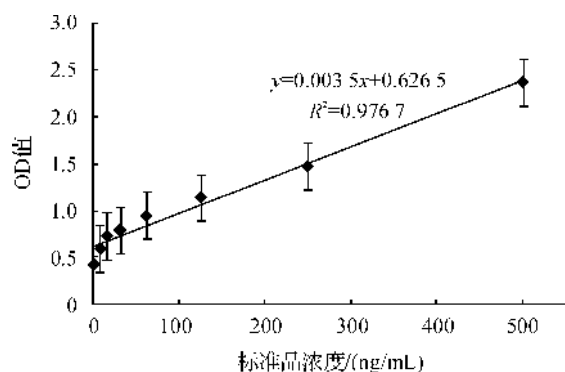


图 11 ELISA 检测标准曲线

3 结 论

随着基因工程技术及 DNA 重组技术的崛起,腺相关病毒(AAV)在肿瘤治疗中已经显示出良好的前景。AAV 基因治疗载体目前被广泛应用于各种疾病中,而利用质粒共转染 HEK293 细胞^[6]进行治疗的 AAV 的生产效率较低,有研究表明采用杆状病毒系统能够获得更高的 rAAV 产率^[9]。而采用二杆状病毒系统获得表达抗体的单链 AAV^[8]已见报道,获得的单链 AAV 以 5MOI 体外感染 5×10^5 个 HEK293 细胞 7 d 上清中抗体的表达量仅为 156.6 ng/mL。但单链 AAV 在宿主体内需要先完成双链 DNA 的转变,转导效率低,因此本课题研究了采用二杆状病毒-昆虫细胞系统获得携带抗体表达基因的 8 型双链 AAV,研究结果表明:a)同等条

件下 scrAAV8-EGFP 病毒比 ssrAAV8-EGFP 病毒具有更高的转导效率,即双链 AAV 比单链 AAV 具有更高的转导效率;b)生产的 scrAAV8-AT7 成功的表达出 Avastin,1 μ L 纯化后的 scrAAV8-AT7 病毒感染 3×10^5 个 HEK293 细胞 72 h 后的上清液中表达量为 700 ng/mL,即能够有效地包装出双链 AAV,且包装出的双链 AAV 具有生物学活性,并能实现外源基因的体外表达;c)采用二杆状病毒系统获得表达抗体的双链 AAV 的方法是可行的,通过该方法可以获得较高浓度的抗体。

参考文献:

- [1] Grieger J C, Choi V W, Samulski R J. Production and characterization of adeno-associated viral vectors [J]. Nat Protoc, 2006, 1(3): 1412-1428.
- [2] Ferrari F K, Samulski T, Shenk T, et al. Second-strand synthesis is a rate-limiting step for efficient transduction by recombinant adeno-associated virus vectors [J]. J Virol, 1996, 70(5): 3227-3234.
- [3] Chen H. Intron splicing-mediated expression of AAV Rep and Cap genes and production of AAV vectors in insect cells[J]. Mol Ther, 2008, 16(5): 924-930.
- [4] Nathwani A C, Gray J T, Ng C Y, et al. Self-complementary adeno-associated virus vectors containing a novel liver-specific human factor IX expression cassette enable highly efficient transduction of murine and nonhuman primate liver [J]. Blood, 2006, 107(7): 2653-2661.
- [5] Gao G P, Lu Y, Sun X, et al. High-level transgene expression in nonhuman primate liver with novel adeno-associated virus serotypes containing self-complementary genomes[J]. J Virol, 2006, 80(12): 6192-6194.
- [6] McCarty D M. Self-complementary AAV vectors—advances and applications[J]. Mol Ther, 2008, 16(10): 1648-1656.
- [7] Wang Yu, Gao Hui, Chen Chuan, et al. Promoter activity of different promoters in recombinant baculovirus-infected Sf9 cells[J]. Chin J Biotech, 2008, 24(4): 598-603.
- [8] 丁娜. 利用杆状病毒系统规模化生产 rAAV1 的研究[D]. 杭州: 浙江理工大学, 2011.
- [9] Smith R H, Levy J R, Kotin R M. A simplified baculovirus-AAV expression vector system coupled with one-step affinity purification yields high-titer rAAV stocks from insect cells[J]. Mol Ther. 2009, 17(11): 1888-1896.

Study on Production of Double-strand AAV Carrying Antibody Expressed Gene Using Baculovirus System

LIU Hai-yan¹, QIAN Qi-jun^{1,2}

(1. School of Life Science, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China;

2. Laboratory of Viral and Gene Therapy, Eastern Hepatobiliary Surgical Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200438, China)

Abstract: This study uses baculovirus-insect cell system to produce 8-type double-strand adeno-associated virus (scAAV) carrying antibody expressed gene and first obtains ssrAAV8-EGFP and scrAAV8-EGFP using baculovirus system. The experiment shows that scrAAV8-EGFP has higher transduction efficiency than ssrAAV8-EGFP. Then, it obtains scrAAV8-AT7 with the same method, detects its titer and infects HEK293 cell so as to test antibody expression. It is detected that Avastin heavy and light chains are successfully expressed with western blotting method and that Avastin's expression quantity in vitro can reach 770 ng/mL with ELISA. This study shows that 8-type scAAV obtained using baculovirus system has biological activity and can realize expression of exogenous gene in vitro.

Key words: baculovirus; double-strand AAV; virus production; exogenous

(责任编辑: 许惠儿)

(上接第 853 页)

Relationship between Sewing Process Parameters of Thin Silk Fabric and Sewing Smoothness

WU Qiao-ying^{a,b}, FENG De-meng^b, TONG Lin-mei^b, FANG Lei-lei^b, LI Ya-ling^b

(a. Zhejiang Provincial Research Center of Clothing Engineering Technology;

b. School of Fashion Design and Engineering, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China)

Abstract: In allusion to compatibility problems of sewing process parameters of thin silk fabrics, this paper uses orthogonal test design, selects $L_{16}(4^4 \times 2^3)$ repeated test blended orthogonal table, measures sewing smoothness of thin silk fabrics under different sewing conditions and studies the influence of various sewing conditions on sewing smoothness. The result shows that tension of sewing thread, stitch density, type of sewing thread and tension applied to fabrics have influence on sewing smoothness of thin silk fabrics in descending order. Using finer sewing thread, smaller stitch density and lower tension of sewing thread and meanwhile applying appropriate tension to fabrics in the sewing process are good for improving the sewing smoothness of thin silk fabrics.

Key words: thin silk fabric; sewing process parameters; sewing smoothness

(责任编辑: 杨一舟)