

新型重组 AAV5/5 载体及包装系统

董小岩^{1,2,3*}, 田文洪^{1*}, 袁振华¹, 谭淑萍¹, 吴小兵¹

1 中国疾病预防控制中心病毒病预防控制所 病毒基因工程国家重点实验室, 北京 100052

2 复旦大学 生命科学学院 遗传学研究所 遗传工程国家重点实验室, 上海 200433

3 北京五加和分子医学研究所有限公司, 北京 100176

摘要: 本研究组建了一种可用于规模化生产的以重组单纯疱疹病毒为辅助病毒的 AAV5/5 载体包装系统。首先, 将 5 型腺相关病毒 (AAV5) 的 *rep* 和 *cap* 基因插入 I 型单纯疱疹病毒 (HSV-1) 基因组非必需基因 *UL2* 中, 获得重组病毒 rHSV1-rep5cap5。其次, 构建一种携带 AAV5 ITR 的通用型载体质粒 pAAV5neo, 将报告基因 *EGFP* 插入 pAAV5neo 中, 得到 pAAV5neo-EGFP 质粒。将 pAAV5neo-EGFP 质粒导入 BHK-21 细胞, 用 G418 选择培养, 挑选出表达 EGFP 并在重组病毒 rHSV1-rep5cap5 感染下能高效产生 rAAV5/5-EGFP 的单克隆载体细胞株 C020。用 rHSV1-rep5cap5 感染 C020 细胞制备 rAAV5/5-EGFP, 用“氯仿处理-聚乙二醇-氯化钠-氯仿抽提”方法粗纯化 rAAV5/5-EGFP。用 100 kDa 分子量截流超滤方法进一步纯化和浓缩, 获得高纯度的 rAAV5/5-EGFP。SDS-PAGE 电泳分析可见 3 条特征性外壳蛋白带。电镜分析显示病毒颗粒以实心颗粒为主。用 rAAV5/5-EGFP 病毒按 1×10^5 vg/cell 感染体外培养的 HEK293 细胞, 可见 30% 细胞呈现绿色荧光。本研究提出了一种高效 AAV5/5 载体生产系统和纯化方法, 为重组 AAV5 载体的进一步应用提供了基础。

关键词: 5 型腺相关病毒 (AAV5), I 型单纯疱疹病毒 (HSV1), 病毒载体, 包装系统

A novel packaging system of recombinant AAV5/5 vector

Xiaoyan Dong^{1,2,3*}, Wenhong Tian^{1*}, Zhenhua Yuan¹, Shuping Tan¹, and Xiaobing Wu¹

1 State Key Laboratory for Molecular Virology and Genetic Engineering, Institute for Viral Disease Prevention and Control, Chinese Center for Disease Prevention and Control, Beijing 100052, China

2 State Key Laboratory of Genetic Engineering, Institute of Genetics, School of Life Science, Fudan University, Shanghai 200433, China

3 Beijing Fiveplus Molecular Medicine Institute, Beijing 100176, China

Abstract: We developed a scalable AAV5/5 vector packaging system by using replication competent recombinant herpes simplex type 1 virus as helper virus. The fragment containing *rep* and *cap* genes of AAV5 was inserted into the non-necessary gene (*UL2*) of HSV1 genome, resulting in the helper virus rHSV1-rep5cap5. An AAV5/5 vector pAAV5neo carrying two AAV5 ITRs was constructed by inserting a *neo* gene expression cassette into the plasmid backbone of pAV5CMV-GFP. pAAV5neo-EGFP was constructed by inserting *EGFP* gene into pAAV5neo. BHK21 cell was transfected with pAAV5neo-EGFP and cultured in the presence of G418. EGFP expression positive monoclonal cells were picked up, and one that produced rAAV5/5-EGFP with the

Received: January 3, 2010; **Accepted:** March 4, 2010

Supported by: National High Technology Research and Development Program of China (863 Program) (No. 2007AA021202), Autonomous Research Program of State Key Laboratory for Molecular Virology and Genetic Engineering (No. 2008-s-0008).

Corresponding author: Xiaobing Wu. Tel: +86-10-63523187; Fax: +86-10-63532053; E-mail: wuxb0168@vip.sina.com

*These authors contributed equally to this study.

国家高技术研究发展计划 (863 计划) (No. 2007AA021202), 病毒基因工程国家重点实验室自主课题 (No. 2008-s-0008) 资助。

highest efficiency under the help of rHSV1-rep5cap5 was chosen as the production cell line named as C020. rAAV5/5-EGFP was produced by infecting C020 cells with rHSV1-rep5cap5, and crudely purified by our previous method of 'chloroform treatment-PEG8000/NaCl precipitation- chloroform extract'. rAAV5/5-EGFP preparation with high purity was obtained by ultrafiltration with molecular weight cut-off value of 100 kDa. SDS-PAGE stained with Coomassie brilliant blue R250 showed clearly specific pattern of three bands of AAV capsid proteins. rAAV5/5-EGFP was also assayed using negative stain transmission electron microscopy and the majority of the virus particles were found solid. About 30% green fluorescent cells could be seen after infecting HEK293 cells with rAAV5/5-EGFP 24 h at 1×10^5 vg/cell. In conclusion, we have established an efficient AAV5/5 vector production system and could produce recombinant AAV5/5 virus in large amounts for gene therapy research.

Keywords: Adeno-associated virus type 5 (AAV5), herpes simplex virus I, virus vector, production system

腺相关病毒 (Adeno-associated virus, AAV) 载体在基因治疗研究中受到广泛的关注。自然界中存在多种血清型的 AAV 病毒,目前得到公认的有 8 个型 (AAV 1 至 5 型, 以及 7 至 9 型)^[1]。不同血清型 AAV 病毒的细胞亲嗜性存在明显的差异,感染细胞时所利用的细胞受体也不一样。AAV2 的主要受体是硫酸肝素糖蛋白 (HSPG), $\alpha\beta 5$ 整合素和 bFGF 受体 1 是其辅助受体。通常认为 AAV5 的主要受体是含有 2,3-交联唾液酸 (2,3-linked sialic acid) 的糖蛋白^[2],血小板来源的生长因子受体 (PDGFR) 可能是 AAV5 的一种辅助受体^[3]。

AAV 载体的大量制备是开展其应用研究的前提。研究发现将 AAV2 的 *rep* 基因和 AAV5 的 *cap* 基因杂合成 *rep2cap5* 用于包装含有 AAV2 ITR (Inverted repeat terminal) 的基因组效率低^[4],可能是因为 AAV2 的 *rep* 蛋白不能有效地将带有 AAV2 ITR 的单链基因组 DNA 包装到 AAV5 的外壳中去。为了避免 AAV5 与 AAV2 ITR 之间可能存在的“不匹配”问题,本研究拟构建一种用携带 AAV5 自身 ITR (ITR5) 的通用型载体 pAAV5neo, 以及携带 AAV5 *repcap* 基因的重组单纯疱疹病毒 HSV1-*rep5cap5*, 组建成 rAAV5/5 载体的包装系统,为 AAV5/5 载体研究和应用提供基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒、菌种和细胞株

pAV5-Trans 质粒和 pAV5CMV-GFP 质粒由中国疾病预防控制中心病毒病预防控制所舒跃龙博士惠赠。pAV5-Trans 中携带了 AAV5 的 *rep* 和 *cap* 基因

编码区,长度约 4.3 kb,用 *Xba* I 可将其从质粒上完整切出。pAV5CMV-GFP 含有 AAV5 的两个反转末端重复序列 (ITR5),两个 ITR5 之间为 CMV-GFP-SV40 poly A 表达盒。pAAV2neo 为病毒基因工程国家重点实验室构建及保存。pSV2neo 为病毒基因工程国家重点实验室保存。携带重组 HSV1 病毒基因组的 5 个粘粒 Cos6、Cos28、Cos14、Cos56 和 Cos48 由英国 Glasgow 大学的 A.J. Davison^[5]惠赠。这些粘粒的骨架是 Supercos MW,分别携带了 HSV1(17 株)病毒的基因组的长约 40 kb 的 HSV1 基因组片段,这些片段的末端序列相互重叠,覆盖了全长的 HSV1 基因组 (152 kb)。Max Efficiency DH5 α 感受态菌购自 Invitrogen 公司。BHK21 及 HEK293 细胞为病毒基因工程国家重点实验室保存。

1.1.2 试剂

转染试剂 Lipofectamine 2000TM 为 Invitrogen 公司产品。磷酸钙转染试剂为北京五加和分子医学研究有限公司产品。T 载体试剂盒购自 Promega 公司。*Pac* I 酶为 NEB 公司产品,其他内切酶、修饰酶以及高保真 *Taq* 酶 (PyroBest *Taq*) 均为 TaKaRa 公司产品。地高辛标记检测试剂盒为 Boehringer Mannheim 公司的产品。胎牛血清购自 Hyclone 公司。细胞培养用低熔点琼脂糖 SeaPlaque Agarose 购自 Lonza 公司。BM2000 DNA Marker 购自 Biomed 公司。 λ /*Hind* III DNA marker 购自 TaKaRa 公司。

1.2 方法

1.2.1 质粒构建

重组粘粒 Cos6-*rep5cap5* 的构建步骤:用 *Xba* I 酶切 pAV5-Trans,回收约 4.3 kb 的 *rep5cap5* 基因片段,将该片段插入到粘粒 Cos6 的 *Xba* I 位点中,得

到重组粘粒 Cos6-rep5cap5。

pAAV5neo 的构建步骤: 通过酶切补平再连接的方法消除掉 pSV2neo 中的 *Hind* III 位点, 成为 pSV2neo-1。用 PCR 方法扩增质粒 pSV2neo-1 中的 *neo* 基因表达盒: 上游引物序列为: 5'-CTGCAAGCTTTGGGCGAAGAACTCCAGCAT-3', 下游引物序列为 5'-GCCAAAGCTTACGTGACTGGGTCATGGCTG-3', 两条引物均在 5'端引入了 *Hind* III 酶切位点, 用下划线标出。PCR 扩增获得长约 1.8 kb 的产物, 经 *Hind* III 酶切后插入到质粒 pAV5CMV-GFP 的骨架上 *Hind* III 位点中, 得到载体质粒 pAV5CMV-GFPneo。合成引物 5'-TTAGGATCCATAGAGCCACCGCATCC-3' 及 5'-GTTGGATCCCTCGAGGAGCTTGCCATT-3', 下划线标记处为 *Bam*H I 酶切位点。用 PCR 方法扩增 pAAV2neo 质粒中的 CMV-MCS-bGH polyA 片段, 经 *Bam*H I 酶切后插入 pAV5CMV-GFPneo 中的 *Bam*H I 位点中 (替代原来的 CMV-GFP-SV40 polyA), 得到 pAAV5neo。用 PCR 方法将 *EGFP* 基因插入 pAAV5neo 的 *Kpn* I 和 *Sal* I 位点之间, 构建成 pAAV5neo-EGFP。

1.2.2 重组辅助病毒 rHSV1-rep5cap5 的产生和鉴定

为获得携带 AAV5 *rep* 和 *cap* 基因的重组 HSV1 病毒 rHSV1-AAVrep5cap5, 将 Cos6-AAVrep5cap5、Cos28、Cos14、Cos56 和 Cos48 各取 2 μ g 混合, 分别用 1 μ L *Pac* I 酶切过夜。酶切反应液分别 2.5 倍体积的无水乙醇, -70 $^{\circ}$ C 放置 30 min 后, 于 4 $^{\circ}$ C 12 000 r/min 离心 10 min, 弃上清, 得到的 DNA 沉淀用 10 μ L 无菌 TE 溶液溶解, 以备转染用。

在 60 mm 培养皿中接种 2×10^6 个 HEK 293 细胞, 培养过夜。转染前 4~6 h 换新鲜培养液 (含 10% FBS 的 DMEM)。在无菌的 1.5 mL 的 Eppendorf 管加入上述酶切处理后回收的 DNA 各 10 μ L, 加入无菌超纯水 125 μ L, 混匀。后加入 2.5 mol/L CaCl_2 15 μ L, 用涡旋器充分混匀; 再沿管壁加入 $2 \times \text{HBS}$ 150 μ L, 轻轻混匀, 室温下静置 5 min, 加入 60 mm 平皿的 HEK293 细胞培养液中, 小心混匀。置 37 $^{\circ}$ C、5% CO_2 培养箱中培养过夜, 次日换成新鲜的含 10% FBS 的 DMEM 培养液。之后每 2~3 d 换液 1 次, 直到出现 CPE (细胞变大变圆现象)。收取病变细胞及

上清在 -70 $^{\circ}$ C 和 37 $^{\circ}$ C 反复冻融 3 次, 4 000 r/min、4 $^{\circ}$ C 离心 15 min, 取上清作为重组辅助病毒 rHSV1-rep5cap5 的原始毒种。

将原始毒种进行系列稀释后感染 6 孔板中的 BHK21 细胞, 用含有 0.5% 的低熔点琼脂糖 (SeaPlaque Agarose, Lonza 公司) 的完全培养液覆盖, 在 37 $^{\circ}$ C、5% CO_2 的条件下培养。3 d 后随机挑取彼此分离良好的单噬斑病毒分别扩增备用。

设计针对 AAV5 *cap* 基因的特异引物对用于 rHSV1-rep5cap5 的筛选鉴定。上游引物 cap5F 序列为 5'-ACGTACAACCTCCAGGAAAT-3', 下游引物 cap5R 序列为 5'-TCTCTGGGTTCCA CCTCTTG-3', 扩增片段长 310 bp。为了鉴定 rHSV1-rep5cap5 病毒基因组中 *rep5cap5* 片段的插入方向, 在插入位点 (*UL2* 基因的 *Xba* I 位点) 附近设计一对引物: HSV1 UL2 up 5'-ACCCTGACCGTCAAGCGCGG-3'; HSV1 UL2 down 5'-CGGATAACTCCGCCACGAA-3'。将 cap5F 引物分别与 HSV1 UL2 up 和 HSV1 UL2 down 引物配对进行 PCR 扩增。取 50 μ L rHSV1-rep5cap5 病毒液煮沸 10 min 作为 PCR 反应的样品 DNA 模板。

1.2.3 AAV5/5-EGFP 载体细胞株的建立和筛选

取纯化的 pAAV5neo-EGFP 质粒 DNA 按脂质体 Lipofectamine 2000 说明书中的操作方法转染 BHK21 细胞, 转染后 4~6 h 换成含 10% 胎牛血清的 DMEM 完全培养液; 24 h 后换成含 800 μ g/mL G418 的完全培养液培养, 之后每 2 d 换液 1 次, 抗性细胞克隆生长至融合时消化传代, 至 15 d 后撤去培养液中的 G418 继续培养并冻存, 命名为 BHK21/pAAV5neo-EGFP 细胞。

将 BHK21/pAAV5neo-EGFP 细胞消化后接种约 1×10^4 于 6 孔板的 1 孔中, 按 10 倍比连续稀释至其余 5 孔, 培养 2~3 d 后换成含 0.5% 低熔点琼脂糖的 DMEM/2% FBS 液铺板培养 1~2 d, 在荧光显微镜下标记发绿色荧光的细胞克隆, 挑取分离良好的单克隆细胞扩增培养及冻存。用重组辅助病毒 rHSV1-rep5cap5 感染各单克隆细胞株测试其包装 AAV 病毒的效果, 选择包装效率最高的单克隆细胞株作为 rAAV5/5-EGFP 的生产细胞。

1.2.4 rAAV5/5-EGFP 的大量制备和纯化

将 1.2.3 中挑选出的 rAAV5/5-EGFP 的生产细胞扩大培养至 5 个转瓶 (220 mm×10 cm), 用空斑纯化后的重组辅助病毒 rHSV1-rep5cap5 以 moi (Multiplicity of infection)=1~5 感染细胞, 72 h 后, 收集上清和病变细胞, 1 200×g 离心 15 min 收集病变细胞 (弃去上清), 用 PBS 液重悬细胞沉淀, -70℃ 与 37℃ 之间反复冻融 3 次。按吴小兵等^[6]发表的方法进行粗纯化。将粗纯的 rAAV5/5-EGFP 样品用 100 kDa 切向流膜包 (millipore 公司) 进行超滤, 用 PBS 液置换液体, 最后浓缩至约 5 mL, 用 0.22 μm 的滤膜过滤除菌, 分装于 -70℃ 条件下保存。用地高辛标记的 CMV 探针点杂交方法测定病毒滴度 (Viral genomes/mL, vg/mL)。

1.2.5 电镜分析

将纯化后的 rAAV5/5-EGFP 病毒用 2% 钨酸盐负染后, 置透射电子显微镜下, 观察病毒形态和空壳率, 并拍照。

1.2.6 SDS-PAGE 分析

将纯化的 rAAV5/5-EGFP 病毒用 10% SDS-PAGE 电泳分析纯度。用本课题组以前制备的 rAAV2/2-EGFP 及 rAAV2/1-EGFP 病毒作为对照。考马斯亮兰 R250 染色。

1.2.7 rAAV5/5-EGFP 病毒感染性检测

将 HEK293 细胞按 1×10^5 cell/孔的细胞量接种到 6 孔 (24 孔板) 中。培养过夜后, 按 1×10^5 vg/cell 加入 rAAV5/5-EGFP 病毒, 对照孔加等量 rAAV2/2-EGFP 病毒。24 h 后置倒置荧光显微镜下观察 EGFP 表达情况。

2 结果

2.1 AAV5 质粒载体

构建的通用型 AAV5 载体质粒 pAAV5neo 和携带 EGFP 的 AAV5 载体质粒 pAAV5neo-EGFP 结构如图 1 所示。pAAV5neo 质粒携带了 AAV5 病毒的 2 个 ITR(ITR5), CMV 立早启动子 (Pcmv)、可供外源基因插入的 *Kpn* I 和 *Sal* I 位点、牛生长激素基因的多聚腺苷酸加尾信号 (bGH polyA), 质粒骨架上含有氨苄青霉素抗性基因 (*Amp*^r) 和 *neo* 基因表达单位 (*neo*)。将 EGFP 基因插入 pAAV5neo 的 *Kpn* I 和 *Sal* I 位点间得到 pAAV5neo-EGFP。

2.2 辅助病毒 rHSV1-rep5cap5 的产生

将 AAV5 *rep*cap 基因片段插入到粘粒 Cos6 的 *Xba* I 位点中, 得到了重组粘粒 Cos6-rep5cap5。酶切鉴定结果 (图 2B) 显示, 用 *Xba* I 酶切可以切出 2 条带, 包括约 4.3 kb 的 *rep5cap5* 片段和一条更大的 DNA 片段 (cos6)。

将 Cos6-AAVrep5cap5、Cos28、Cos14、Cos56 和 Cos48 用 *Pac* I 线性化后共转染 293 细胞, 获得了重组单纯疱疹病毒 rHSV1-rep5cap5, 其基因组结构如图 2A 所示。用 PCR 方法鉴定空斑纯化后的 rHSV1-rep5cap5 (图 2C), 可见用 AAV5 *cap* 引物对可以扩增出一条位于 250~500 bp 之间的特异条带 (泳道 1), 与预期的 310 bp 扩增片段相符; 用 AAV5 *cap* 上游引物与 *UL2* 上游引物未扩增出条带 (泳道 3), 而用 AAV5 *cap* 上游引物与 *UL2* 下游引物可扩出约 500 bp 的条带 (泳道 4), 说明 *rep5cap5* 是正向插入 *UL2* 基因中的。

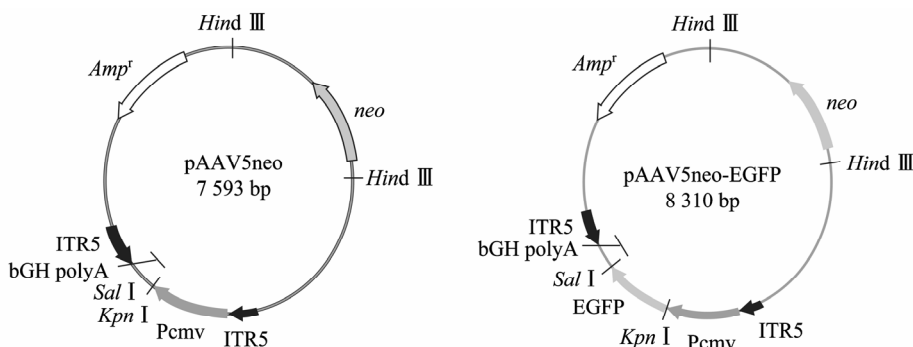


图 1 pAAV5neo 及 pAAV5neo-EGFP 质粒图谱

Fig. 1 Map of pAAV5neo and pAAV5neo-EGFP.

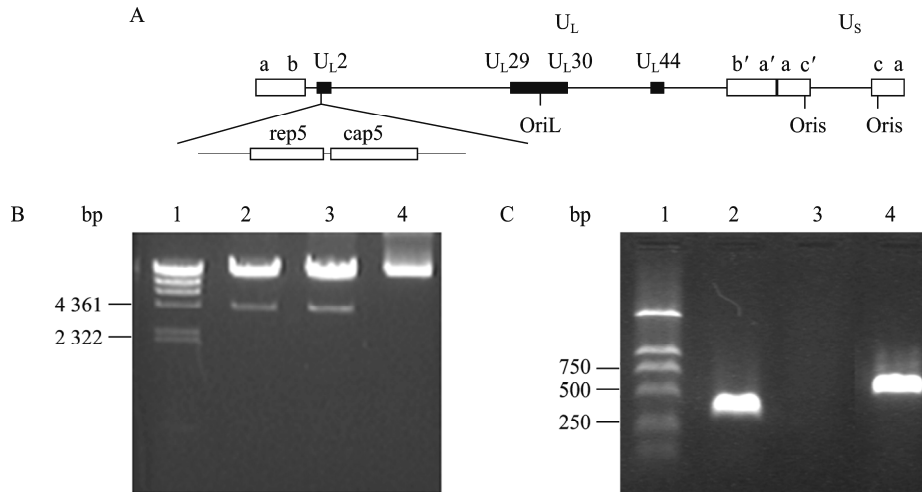


图2 重组辅助病毒 rHSV1-rep5cap5 的产生和鉴定

Fig. 2 Generation and identification of rHSV1-rep5cap5. (A) Map of rHSV1-rep5cap5 genome structure. (B) Cos6-rep5cap5 digested by *Xba* I. 1: λ /Hind III DNA marker; 2, 3: cos6- rep5cap5 digested by *Xba* I; 4: cos 6. (C) Identification of rHSV1-rep5cap5 by PCR. 1: BM2000 DNA marker; 2: PCR with primers cap5F and cap5R; 3: PCR with primers cap5F and UL2 up; 4: PCR with primers cap5F and UL2 down.

2.3 rAAV5/5-EGFP 生产细胞株的获得

将 pAAV5neo-EGFP 转染至 BHK21 细胞中, 用含 800 mg/L G418 的完全培养基培养 15 d 后, 获得混合克隆的载体细胞株 BHK21/pAAV5neo-EGFP。挑取表达绿色荧光蛋白的单克隆细胞株 12 株, 并用重组辅助病毒 rHSV1-rep5cap5 测试其 AAV 病毒包装功能, 选出一株包装效果最好的单克隆细胞株 C020 作为 rAAV5/5 的生产细胞株 (图 3)。结果可见 C020 细胞几乎 100% 表达绿色荧光蛋白。

2.4 纯化后的 rAAV5/5-EGFP 的 SDS-PAGE 分析

AAV5 的衣壳由 3 种蛋白质组成, 即 VP1、VP2、VP3, 进行 10% SDS-PAGE 电泳时, 可以见到二细一粗的 3 条特征性条带。将纯化后的 rAAV5/5-EGFP 病毒进行 SDS-PAGE 分析, 如图 4 所示, VP1、VP2、VP3 这 3 种蛋白的条带十分清晰, 由杂蛋白产生的条带基本不可见, 经凝胶扫描图像分析, 杂蛋白含量少于 5%, 且与 rAAV1/2-EGFP (图 4, 泳道 3) 和 rAAV2/2-EGFP (图 4, 泳道 2) 相比, 带型有一定的差别。

2.5 纯化后的 rAAV5/5-EGFP 的电镜分析

将纯化后的 rAAV5/5-EGFP 经钨酸盐负染后在透射电子显微镜下观察并照相 (图 5)。从图中可见, rAAV5/5-EGFP 病毒粒子清晰可见, 其中有少量的空壳。

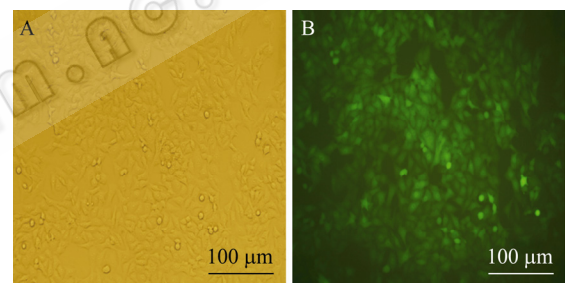


图3 rAAV5/5-EGFP 的生产细胞株 C020

Fig. 3 Production cells C020 for rAAV5/5-EGFP. (A) C020 cells under visible light. (B) C020 cells under UV light.

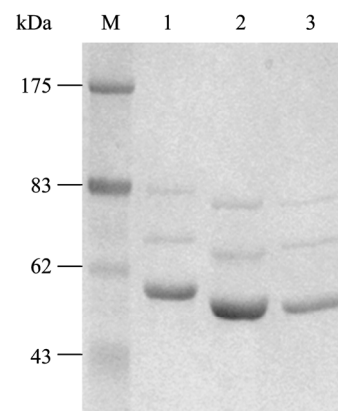


图4 rAAV5/5-EGFP、rAAV2/2-EGFP 和 rAAV2/1-EGFP 病毒样品的 SDS-PAGE 电泳图

Fig. 4 SDS-PAGE with coomassie bright blue stain for rAAVs. M: protein molecular marker; 1: rAAV5/5-EGFP; 2: rAAV2/2-EGFP; 3: rAAV2/1-EGFP.

2.6 rAAV5/5-EGFP 转导 HEK293 细胞实验

为了检测 rAAV5/5-EGFP 的感染性,用每细胞 1×10^5 vg rAAV5/5-EGFP 病毒感染培养的 HEK293 细胞,等量的 rAAV2/2-EGFP 病毒作为对照。24 h 在荧光显微镜下照相结果见图 6。可见感染 rAAV5/5-EGFP 的 HEK293 细胞约 30% 绿色荧光阳性,且荧光强度较弱;而感染 rAAV2/2-EGFP 的对照细胞几乎 100% 阳性,荧光强度较强。

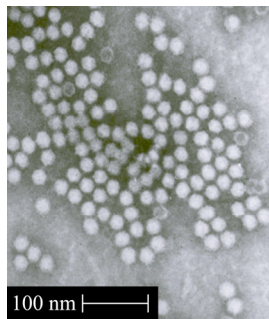


图 5 rAAV5/5-EGFP 病毒的透射电镜图 (52 000 \times)
Fig. 5 Transmission electron microscopy of rAAV5/5-EGFP (52 000 \times).

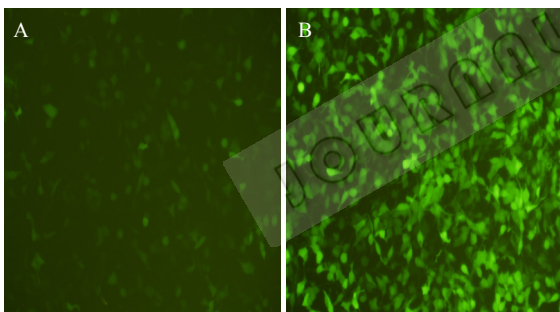


图 6 rAAV5/5-EGFP 及 rAAV2/2-EGFP 感染 HEK293 细胞

Fig. 6 Infection of HEK293 cells by rAAV5/5-EGFP and rAAV2/2-EGFP. A: 293 cells infected by rAAV5/5-EGFP with 1×10^5 vg/cell, 24 h; B: HEK293 cells infected by rAAV2/2-EGFP with 1×10^5 vg/cell, 24 h.

3 讨论

AAV 病毒载体因具有广泛的细胞和组织嗜性、转染效率高、安全性好、免疫原性较低等优点而在基因治疗中得到越来越多的应用。近年来多种血清型的 AAV 载体 (AAV1~11) 的发展使得 AAV 载体的应用有了更多的选择^[7]。不同血清型的 AAV 载体具有明显不同的组织细胞嗜性。目前,除了 AAV2 载体之外,受到广泛关注的还有 AAV1、AAV5、

AAV8、AAV9 等载体。AAV1 载体在肌肉组织高表达, AAV8 载体在肝脏、肌肉组织中高表达; AAV5 载体在呼吸道上皮、视网膜、神经组织中高表达; AAV9 载体在心肌组织中高表达;而 AAV2 载体在各种组织的表达相对其他 AAV 载体来说都是中等水平^[1]。

最早建立起来的 AAV 载体系统是基于 AAV2 病毒的。载体质粒构建时将外源基因表达单位插入两个 AAV2 ITR 之间,在 AAV2 *rep* 质粒及辅助病毒 (腺病毒或疱疹病毒) 或辅助质粒 (如携带了腺病毒 *E2A*、*E4ORF6*、*VA RNA* 的 pHelper 质粒) 存在下包装成重组 AAV2 病毒。目前国际上包装其他血清型 AAV 病毒载体通常采用交叉包装的方式^[4],即用杂合的 *rep2cap(n)* 质粒 (n 代表相应的血清型) 替代 AAV2 *rep* 质粒包装携带了 AAV2 ITR 的病毒,形成重组 AAV2/(n) 病毒。

AAV5 与其他血清型 AAV 在基因组序列水平上的差异较大。AAV5 与 AAV2 的 *rep* 基因的同源性仅为 67%,而 AAV2、AAV3 和 AAV6 之间的 *rep* 基因同源性约为 90% 左右。AAV5 的 ITR 与 AAV2 的 ITR 之间的同源性只有 58%,远比 AAV2 与 AAV3、AAV6 之间的 ITR 的同源性要低^[8]。研究发现在包装重组 AAV2/5 时包装效率较低^[4]。可能是因为 AAV2 的 *rep* 蛋白不能有效地将带有 AAV2 ITR 的单链基因组 DNA 包装到 AAV5 的外壳中去。

Xiao 等^[8]提出的三质粒共转染生产 AAV 载体至今仍是国际上 AAV 载体制备的主要方法。该系统的特色在于用携带了 5 型腺病毒的 *E2A*、*E4 ORF6* 和 *VA RNA* 基因的辅助质粒代替腺病毒作为辅助病毒的功能,将该质粒与 AAV 载体质粒、*rep* 助手质粒共转染 HEK293 细胞,即可包装出重组 AAV 载体病毒。与传统方法相比,其主要优越性在于生产系统中无需辅助病毒,因此称为无辅助病毒的 AAV 包装系统 (Helper free AAV packaging system)。然而,这个系统依赖于转染,需要大量制备高质量的质粒 DNA 等不足之处,更为不利的是,用三质粒共转染包装系统生产的 AAV 病毒含有较多的空壳病毒,需要用超速离心方法去除。

本课题组曾用“一种病毒感染一个载体细胞株”

的策略建立了一种高效制备 AAV2/2 载体的方法^[9], 并在基因治疗研究中得到广泛应用。随后本课题组用同样的策略成功地建立了 AAV2/1 载体包装系统并用于基因治疗研究^[10-11]。这种生产策略具有操作简便、无需转染细胞、可以大规模生产的优点。本研究拟用类似的策略组建一种 rAAV5/5 病毒的包装系统。

本研究构建了通用型的 AAV5 载体 pAAV5neo, 其中携带了 2 个 AAV5 的 ITR (172 bp, 比 AAV2 ITR 145 bp 稍长)。两个 AAV5 ITR 之间是 CMV 启动子、多克隆位点和牛生长激素基因 polyA 加尾信号。在质粒骨架上插入了 *neo* 基因表达单位, 用于筛选稳定转染的 AAV5 载体细胞株。在此基础上构建了 pAAV5neo-EGFP, 用于测试该载体的功能。同时, 本研究利用携带 HSV1 (17 strain) 的一套粘粒 (setC, 包含 *cos6*、*cos14*、*cos28*、*cos48*、*cos56*) 获得了重组单纯疱疹病毒 rHSV1-rep5cap5, 并进行空斑纯化, 作为包装 AAV5/5 载体的辅助病毒。

为了测试该包装系统的功能, 本研究用 pAAV5neo-EGFP 转染 BHK-21 细胞, 用 G418 选择培养, 并挑选出单克隆细胞株 C020 作为生产 rAAV5/5-EGFP 的生产细胞。用 HSV1-AAV5repcap 感染 C020 细胞株, 72 h 后收获上清和细胞, 用本课题组建立的“氯仿处理-聚乙二醇/氯化钠-氯仿抽提”方法^[6]进行粗纯化, 之后用 100 kDa 分子量截流超滤方法进一步纯化和浓缩。从 SDS-PAGE 分析结果看, rAAV5/5-EGFP 病毒显示出清晰的 3 条外壳蛋白条带 (从大到小为 VP1、VP2、VP3), 未见其他杂蛋白带。与对照的 rAAV2/2-EGFP 和 rAAV2/1-EGFP 病毒相比, 3 条外壳蛋白带之间的相对距离略有差别。电镜分析结果表明 rAAV5/5-EGFP 病毒颗粒完整, 以实心颗粒为主。

体外细胞实验表明, rAAV5/5-EGFP 病毒可以有效感染 HEK293 细胞。然而与相同量的 rAAV2/2-EGFP 病毒相比, rAAV5/5-EGFP 病毒的感染效率和细胞表达 EGFP 的水平都不如 rAAV2/2-EGFP。这个结果与 Klein 等^[12]的报道是一致的。他们的研究认为不同血清型 AAV 载体介导 EGFP 基因体外感染 HEK293 细胞的表达水平依次是 AAV2 >>AAV1 >>

AAV8 >AAV5。然而, 值得注意的是, AAV 载体的体外感染实验与体内感染实验的结果往往是不一致的^[13], 因此不能依据体外实验的结果选择体内应用的 AAV 载体血清型。

本研究表明, “一株载体细胞/一株辅助病毒”策略及“氯仿处理-聚乙二醇/氯化钠-氯仿抽提”粗纯化方法^[6]同样适合于制备 rAAV5/5 病毒。在此基础上, 用 100 kDa 分子量截流超滤方法可以进一步纯化 AAV 病毒并置换缓冲液。

Wustner 等也曾报道过用携带 AAV5 *rep* 和 *cap* 基因的重组 HSV1 病毒来包装 AAV5/5 载体^[14]。本研究与其不同之处是本研究采用了 BHK-21 细胞而不是 HEK293 细胞作为生产细胞; 本研究的 *rep5cap5* 插入 HSV1 基因组中的位置是 *UL2* 基因, 获得的 rHSV1-*rep5cap5* 是复制型的, 而他们的 *rep5cap5* 是插入 HSV1 TK 中, 并且是复制缺陷的 (缺失了 *ICP27* 基因); 他们采用瞬时转染载体质粒加辅助病毒感染的方式制备 AAV5/5 病毒, 而本研究采用辅助病毒感染稳定转染的载体细胞的方式。他们的研究表明其生产系统的包装效率受到辅助病毒引起生产细胞 (HEK293 细胞) 产生病变的限制。本研究未发现 AAV5/5 载体包装效率低的问题, 下一步拟对 AAV5/5 载体的包装效率做更深入的研究。总之本研究建立的 rAAV5/5 载体包装系统和纯化方法为下一步开展 rAAV5/5 的规模化制备和应用研究打下了基础。

REFERENCES

- [1] Wu ZJ, Asokan A, Samulski RJ. Adeno-associated virus serotypes: vector toolkit for human gene therapy. *Mol Ther*, 2006, **14**(3): 316-327.
- [2] Walters RW, Yi SMP, Keshavjee S, *et al.* Binding of adeno-associated virus type 5 to 2,3-linked sialic acid is required for gene transfer. *J Biol Chem*, 2001, **276**(23): 20610-20616.
- [3] Pasquale GD, Davidson BL, Stein CS, *et al.* Identification of PDGFR as a receptor for AAV5 transduction. *Nat Med*, 2003, **9**(10): 1306-1312.
- [4] Rabinowitz JE, Rolling F, Li CW, *et al.* Cross-packaging of a single Adeno-associated virus (AAV) type 2 vector

- genome into multiple AAV serotypes enables transduction with broad specificity. *J Virol*, 2002, **76**(2): 791–801.
- [5] Cunningham C, Davison AJ. A cosmid-based system for constructing mutants of herpes simplex virus type 1. *Virology*, 1993, **197**(1): 116–124.
- [6] Wu XB, Dong XY, Wu ZJ, *et al.* A novel method for purification of recombinant adeno-associated virus vectors on a large scale. *Chin Sci Bull*, 2001, **46**(6): 485–489.
吴小兵, 董小岩, 伍志坚, 等. 一种快速高效分离腺病毒伴随病毒的方法. *科学通报*, 2000, **45**(19): 2071–2075.
- [7] Choi VW, McCarty DM, Samulski RJ. AAV hybrid serotypes: improved vectors for gene delivery. *Curr Gene Ther*, 2005, **5**(3): 299–310.
- [8] Xiao X, Li J, Samulski RJ. Production of high-titer recombinant adeno-associated virus vectors in the absence of helper adenovirus. *J Virol*, 1998, **72**(3): 2224–2232.
- [9] Wu ZJ, Wu XB, Hou YD. Construction of a recombinant herpes simplex virus which can provide packaging function for recombinant adeno-associated virus. *Chin Sci Bull*, 1999, **44**(8): 715–719.
伍志坚, 吴小兵, 侯云德. 具有 AAV 载体包装功能的重组 HSV 的产生. *科学通报*, 1999, **44**(5): 506–509.
- [10] Yan H, Guo Y, Zhang P, *et al.* Superior neovascularization and muscle regeneration in ischemic skeletal muscles following VEGF gene transfer by rAAV1 pseudotyped vectors. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, **336**(1): 287–298.
- [11] Han G, Wang R, Chen G, *et al.* Gene delivery GAD500 autoantigen by AAV serotype 1 prevented diabetes in NOD mice: transduction efficiency do not play important roles. *Immunol Lett*, 2008, **115**(2): 110–116.
- [12] Klein RL, Dayton RD, Leidenheimer NJ, *et al.* Efficient neuronal gene transfer with AAV8 leads to neurotoxic levels of tau or green fluorescent proteins. *Mol Ther*, 2006, **13**(3): 517–527.
- [13] Lipshutz GS, Titre D, Brindle M, *et al.* Comparison of gene expression after intraperitoneal delivery of AAV2 or AAV5 *in utero*. *Mol Ther*, 2003, **8**(1): 90–98.
- [14] Wustner JT, Arnold S, Lock M, *et al.* Production of recombinant adeno-associated type 5 (rAAV5) vectors using recombinant herpes simplex viruses containing rep and cap. *Mol Ther*, 2002, **6**(4): 510–518.

科学出版社科学出版中心生命科学分社新书推介

免疫信息学：计算机辅助预测免疫原性

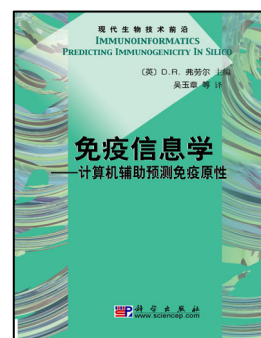
(英) 弗劳尔 (Darren R Flower) 主编 吴玉章等译

978-7-03-026270-7 ¥ 68.00 2010年1月 出版

内容简介

随着基因组学、计算机技术以及免疫学的快速发展，免疫信息学已经成为一个新兴的且逐步完善的研究领域。免疫信息学分析就是利用免疫学的规律，对免疫学实验结果进行预测，再通过有效的免疫学实验进行验证，从而大幅度地减少免疫学研究的工作量，节约研究成本，促进现代免疫学的发展。本书系统介绍了免疫信息学的概念、产生和发展、相关数据库、研究方法及其应用等，特别着重于抗原性的预测、分析和计算机辅助疫苗设计，并介绍了一些复杂软件的使用方法，因此理论性和实用性都很强。

本书定位于免疫信息学初学者，尤其适合本科生、研究生，对于免疫学研究工作者也有很大的参考价值。



欢迎各界人士邮购科学出版社各类图书 (免邮费)

邮购地址：北京东黄城根北街 16 号 科学出版社 科学出版中心 生命科学分社 邮编：100717

联系人：周文字 (010-64031535)

网上订购：www.dangdang.com www.joy.com www.amazon.cn www.beifabook.com

更多精彩图书请登陆网站 <http://www.lifescience.com.cn>，欢迎致电索要书目