

辅助病毒依赖型腺病毒载体转基因的体外表达效率

郑娴娴^{1,2}, 何金生^{1,2}, 付远辉², 徐少华², 谢灿¹, 石长信³, 张梅¹, 王小波^{1,2}, 洪涛^{2,4}

1 安徽医科大学免疫学教研室, 合肥 230032

2 北京交通大学生命科学与生物工程研究院, 北京 100044

3 Division of Hematology-Oncology, Mayo Clinic, Scottsdale AZ 85259, USA

4 中国疾病预防控制中心病毒病预防控制所, 北京 100052

摘要: 构建可表达增强型绿色荧光蛋白 (Enhanced green fluorescent protein, EGFP) 的辅助病毒依赖型腺病毒载体 (Helper-dependent adenoviral vector, HDAd), 并完成大量制备、纯化和体外表达鉴定。荧光显微镜证实 HDAd/EGFP 可表达, 电镜下观察到经 CsCl 纯化后的腺病毒的典型形态。分光光度计法测定病毒的浓度为 4.0×10^{12} 颗粒数 (Virus particle, vp)/mL。与可表达 EGFP 的第一代腺病毒载体 (First generation adenoviral vector, FGAd) FGAd/EGFP 进行了体外感染和转基因表达效率的比较研究, 分别用约 2 000 vp/细胞的 HDAd/EGFP 和 FGAd/EGFP 感染 A549 细胞, 流式细胞仪检测 EGFP 的表达情况。通过相同时间点流式细胞仪分析 EGFP 的表达情况, 可见 HDAd/EGFP 感染早期的 A549 细胞较 FGAd/EGFP 有更高的荧光表达率及更高的表达强度, 显示 HDAd 载体具有转基因瞬时高表达的特性, 是一种更有价值的疫苗载体。

关键词: 辅助病毒依赖型腺病毒载体, 第一代腺病毒载体, 增强型绿色荧光蛋白, 转基因表达

In vitro transgenic expression efficacy of a helper-dependent adenoviral vector encoding enhanced green fluorescent protein

Xianxian Zheng^{1,2}, Jinsheng He^{1,2}, Yuanhui Fu², Shaohua Xu², Can Xie¹, Changxin Shi³, Mei Zhang¹, Xiaobo Wang^{1,2}, and Tao Hong^{2,4}

1 Department of Immunology, Anhui Medical University, Hefei 230032, China

2 College of Life Sciences & Bioengineering, Beijing Jiaotong University, Beijing 100044, China

3 Division of Hematology-Oncology, Mayo Clinic, Scottsdale AZ 85259, USA

4 Institute of Viral Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 100052, China

Abstract: To investigate the transgenic expressing efficacy of helper-dependent adenoviral vector (HDAd) *in vitro*, we constructed a HDAd encoding enhanced green fluorescent protein (EGFP), denominated as HDAd/EGFP, performed large scale preparation and purification, and then identified the purified HDAd/EGFP under fluorescent microscope and electron microscope. After the concentration of HDAd/EGFP was determined by spectrophotometer, the transgenic expression efficiency of HDAd/EGFP was compared with first generation adenoviral vector encoding EGFP (FGAd/EGFP) *in vitro*. Therefore, we infected A549 cells with 2 000 virus particles (vp) per cell by HDAd/EGFP and FGAd/EGFP respectively and analyzed EGFP expressing level by flow cytometry. Consequently, the fluorescent expression rate and fluorescent intensity of

Received: February 21, 2010; Accepted: April 28, 2010

Supported by: National Natural Science Foundation of China (No. 30671965).

Corresponding author: Jinsheng He. Tel: +86-10-51684080; Fax: +86-10-51683887; E-mail: jshhe@bjtu.edu.cn

国家自然科学基金 (No. 30671965) 资助。

EGFP were higher in infected A549 cells by HDAd/EGFP than by FGAd/EGFP. HDAd, capable of expressing transgene instantly and efficiently in vitro, is a potential vaccine vector.

Keywords: helper-dependent adenoviral vector (HDAd), first generation adenoviral vector (FGAd), enhanced green fluorescent protein (EGFP), transgenic expression

辅助病毒依赖型腺病毒载体 (Helper-dependent adenoviral vector, HDAd) 是在第一代腺病毒载体 (First generation adenoviral vector, FGAd) 基础上研制的一种全缺失的腺病毒载体^[1], 仅含有腺病毒复制信号 (ITRs) 和包装信号 (Ψ), 需要辅助病毒为其提供包装所需的所有蛋白。与 FGAd 相比, HDAd 具有转基因容量大、转基因表达时间长、安全性高等优点, 十多年来, HDAd 主要用于基因治疗, 作为疫苗载体的研究起步较晚, 通过肌肉或静脉注射发现 HDAd 具有更强的诱导机体产生针对转基因的免疫反应^[2-4], 我们通过滴鼻途径免疫动物也获得了类似的结果^[5]。一般认为这种增强的免疫应答主要与 HDAd 可在体内高表达转基因及减弱的载体反应有关, 关于这 2 种载体体外转基因表达情况的研究较少。

绿色荧光蛋白 (Green fluorescent protein, GFP) 为 Shimomura 等^[6]于 1962 年从多管水母属 *Aequorea victoria* 中首次分离获得, 1992 年由 Prasher 等完成其 cDNA 的克隆, 其开放读码框 (Open reading frame, ORF) 编码 238 个氨基酸^[7]。GFP 无种属特异性、可在不同种属细胞或组织中稳定发出荧光, 荧光检测不需要外加底物和辅助因子^[8-9]。利用荧光显微镜和流式细胞术 (Flow cytometry, FCM) 可直接观察^[10], 无细胞毒性作用^[8,11], 因此被广泛应用于基因表达与调控、基因转导、细胞分化及蛋白质的胞内定位和功能研究等方面, 成为继 LacZ、CAT 后国内外分子生物学和细胞生物学领域广泛应用的报告基因。增强型绿色荧光蛋白 (Enhanced green fluorescent protein, EGFP) 是经过密码子优化及氨基酸突变等一些列基因改造后获得的 GFP 突变体^[12], 这种突变体不仅保留了 GFP 的所有优点, 且更易于在真核细胞中表达, 蛋白表达量增加, 使 EGFP 表达的荧光强度比 GFP 高 100 倍以上, 大大提高了检测灵敏度^[13], 而且因其具有 B 细胞、Th 细胞和 CTL 细胞表位^[14-15], 成为一种应用非常广泛

的示踪蛋白和模式蛋白。

因此, 本文以 EGFP 作为报告基因, 构建可表达 EGFP 的 HDAd/EGFP 载体, 大量扩增纯化及表达鉴定, 并与 FGAd/EGFP 一起开展转基因体外表达效率的比较研究, 以期 HDAd 作为疫苗载体的研究提供更全面的基础信息。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株和毒株

HDAd Cre/loxP 系统及 293Cre4 细胞和辅助病毒 H14 购自加拿大 Microbix 公司, A549 细胞由中国科学技术大学生命科学院魏海明教授馈赠, 293 细胞、CsCl 超速离心纯化的可表达 EGFP 的复制缺陷型重组腺病毒 FGAd/EGFP 由本室保存。

1.1.2 菌株和质粒

E. coli DH10B 菌株由本实验室保存, pSC11、pSC15B 由美国梅奥医院血液肿瘤科石长信博士构建^[16]。

1.1.3 主要试剂

限制性内切酶 *Pme* I、*I-Sce* I、*I-Ceu* I 购自美国 New England Biolabs 公司, SAP 酶、DL 1 kb marker 购自 Fermentas 公司, T4 DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶、*pfu* 酶购自上海 Promega 公司, DL2000 marker、*Ex Taq* DNA 聚合酶、其他限制性内切酶是 TaKaRa 公司的产品, 质粒提取及纯化试剂盒、PCR 产物回收及纯化试剂盒购自美国 Omega 公司, 引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。

1.2 方法

1.2.1 PCR 获得 CMV-EGFP-SV40 片段

用 FGAd/EGFP 按 500 vp/细胞感染丰度约为 90% 的 293 细胞, 待 72 h 后, 收集细胞采用 Hirt 法快速提取腺病毒 DNA, 以此为模板, 用 PCR 法扩增获得目的片段 CMV-EGFP-SV40。上、下游引物分别为: 5'-GTCGACTAGTAATCAATTACGGGG-3'

和 5'-ACGCGTTAAGATACATTGATGAG-3', 并在引物 5'端分别引入 *Sal* I 和 *Mlu* I 的酶切位点。PCR 条件: 95℃ 预变性 5 min; 94℃ 变性 1 min, 58℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 90 s, 30 个循环; 72℃ 最终延伸 10 min。1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定 PCR 产物。

将 CMV-EGFP-SV40 的 PCR 回收产物与 pGEM-T 连接、转化、挑菌、摇菌和小提质粒, 获得质粒命名为 pGEM-T/EGFP, 进行测序。测序鉴定正确后用 *Sal* I 和 *Mlu* I 酶切 pGEM-T/EGFP, 切胶回收纯化 CMV-EGFP-SV40 片段, 置于 -20℃ 保存备用。

1.2.2 重组腺病毒质粒 pSC15B/EGFP 的构建

用 *Sal* I 和 *Mlu* I 双酶切 pSC11, 将 CMV-EGFP-SV40 与 pSC11 连接、转化、挑菌、摇菌, 然后小提质粒, 用 *Sal* I 和 *Mlu* I 酶切鉴定。获得的重组质粒命名为 pSC11/EGFP。

用 *Nhe* I 和 *Pme* I 酶切 pSC11/EGFP, T4 DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶进行末端补平及连接, 去除 *Pme* I 酶切位点, 获得重组质粒命名为 pSC11/EGFP *Nhe* I -*Pme* I。

用 *I-Sce* I 和 *I-Ceu* I 双酶切 pSC11/EGFP *Nhe* I -*Pme* I 和 pSC15B, 进行连接、转化、挑菌和摇菌。提取质粒用 *Hind* III 酶切鉴定, 同时以 *Hind* III 酶切 pSC15B 作对照。得到连接成功的质粒进一步用 *Bam*HI、*Eco*RI、*Eco*RV、*Hind*III、*Pst*I 酶切鉴定, 获得的重组质粒命名为 pSC15B/EGFP^[17]。

1.2.3 重组腺病毒 HDAd/EGFP 的获得

用 60 mm×15 mm 培养皿培养 293Cre4 细胞待丰度达到 90% 左右时, 取 *Pme* I 酶切消化的 pSC15B/EGFP 线性化片段经磷酸钙共沉淀法转染。转染后第 2 天, 弃掉培养液, 加入含 2% FBS 的 DMEM 维持液。取辅助病毒 H14, 按 500 vp/细胞感染 293Cre4 细胞, 置 37℃、5% CO₂ 培养箱中继续培养。约 48~72 h 后, 细胞完全病变、脱落, 收集脱落后的细胞及上清, 转移至 15 mL 离心管中, 2 000 r/min 离心 5 min。弃部分上清, 保留约 4 mL, 用吸管重悬沉淀, -80℃ 冰箱冻存 30 min, 37℃ 水浴融化, 反复 3 次, 获得 P0 代 HDAd/EGFP 粗提液, 取 1 mL 接种至形成单层、含 2% FBS 的 DMEM 维持液的 293Cre4 细胞中, 同时按 100 vp/细胞加入辅助病毒, 37℃、5% CO₂

培养箱继续培养至细胞病变。约 48 h 后, 细胞完全病变、脱落, 按上法处理 293Cre4 细胞, 重复 6 轮获得 P6 代 HDAd/EGFP 粗提液^[17]。

1.2.4 重组腺病毒 HDAd/EGFP 的大量制备及纯化

用 30 个 150 mm×25 mm 培养皿培养 293Cre4 细胞, 待细胞丰度约为 90% 时, 取 HDAd/EGFP 和辅助病毒 H14 共感染 293Cre4 细胞, 约 48~72 h 后, 收集细胞及培养液。采用 CsCl 密度梯度和连续密度梯度法 2 次超速离心纯化 HDAd/EGFP, 样品在 4℃、10 mmol/L Tris-HCl 8.0 中透析 24 h, 期间换液 3 次^[17]。电镜下观察纯化后病毒形态并保存于 -80℃ 备用。

1.2.5 转基因 EGFP 的表达鉴定

用 100 mm×20 mm 培养皿培养 293Cre4 细胞, 待细胞丰度约为 90% 时, 用纯化的 HDAd/EGFP 感染 293Cre4 细胞, 荧光显微镜下观察。

1.2.6 分光光度计测定纯化重组腺病毒 HDAd/EGFP 的病毒颗粒数

用含 0.1% SDS 的 TE 溶液稀释纯化的 HDAd/EGFP, 同时设置阴性对照。56℃ 温育 10 min, 涡旋振荡样品后使用分光光度计测 OD₂₆₀ 的值。根据公式计算纯化重组腺病毒 HDAd/EGFP 的病毒颗粒浓度^[18]:

$$\text{病毒颗粒浓度 (vp/mL)} = (\text{OD}_{260} \text{ 值} \times \text{稀释倍数} \times 1.1 \times 10^{12} \times 36) / \text{HDAd/EGFP 碱基数 (kb)}$$

1.2.7 重组腺病毒 HDAd/EGFP 和 FGAd/EGFP 转基因 EGFP 表达的比较

用 2 块 24 孔板培养 A549 细胞, 待丰度达到 90% 左右时, 分别用 2 000 vp/细胞的 HDAd/EGFP 和 FGAd/EGFP 感染 A549 细胞, 同时以培养的正常 A549 细胞作为阴性对照。

在感染后 1、3、8 d 时分别随机取 HDAd/EGFP 或 FGAd/EGFP 感染的 A549 细胞各 3 孔, 弃培养液, 用 PBS 液洗涤 2 遍后用 0.25% 胰酶消化, 镜下观察待呈单个贴壁细胞时, 弃胰酶, 用 PBS 液吹打成单细胞悬液, 流式细胞仪检测每 10 000 个 A549 细胞的 EGFP 表达率和 EGFP 平均荧光强度。

1.2.8 统计学分析方法

采用 SPSS11.5 统计学软件对重组腺病毒

HDAd/EGFP 和 FGAd/EGFP 转基因 EGFP 表达率和表达强度进行统计学分析, 两组比较使用单因素多组方差分析, 当方差不齐时使用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异显著。

2 结果

2.1 PCR 获得 EGFP 表达盒

以 FGAd/EGFP 为模板, 用 PCR 法扩增获得 EGFP 表达盒 CMV-EGFP-SV40 片段, 1%琼脂糖凝胶电泳, 观察到介于 1 000~2 000 bp 的 DNA 片段, 与预期值 1 627 bp 相符 (图 1)。回收的 CMV-EGFP-SV40 片段与 pGEM-T 连接, 测序正确。

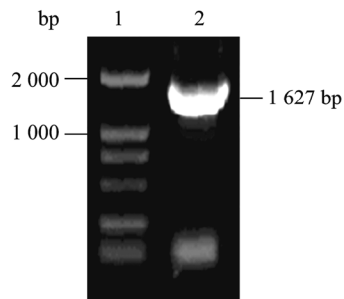


图 1 PCR 产物琼脂糖电泳结果

Fig. 1 PCR product of CMV-EGFP-SV40. 1: DL2 000 marker; 2: PCR product of CMV-EGFP-SV40.

2.2 构建 HDAd/EGFP 重组质粒 pSC15B/EGFP 及酶切鉴定

将 CMV-EGFP-SV40 克隆至载体 pSC11, *Sal* I 和 *Mlu* I 酶切鉴定, 琼脂糖凝胶电泳结果显示得到 2 条带, 约为 3 000 bp 和 1 600 bp, 与 pSC11、CMV-EGFP-SV40 大小一致 (图 2)。为进一步将 EGFP 表达盒克隆至 pSC15B, 需去除 pSC11/EGFP 中的 *Pme* I 酶切位点, 用 *Nhe* I 和 *Pme* I 酶切 pSC11/EGFP, 末端补平、连接后用 *Pme* I 和 *Xba* I 进行酶切鉴定, 可观察到 5 000 bp 左右的线性化条带, 证实已去除了 *Pme* I 酶切位点。

进一步克隆 EGFP 基因至 pSC15B, 大提质粒并用 *Bam*H I、*Eco*R I、*Eco*R V、*Hind* III、*Pst* I 酶切鉴定, 与预计结果一致 (图 3)。

2.3 超速离心纯化后病毒带的观察

HDAd/EGFP 与辅助病毒 H14 共感染 293Cre4 细胞进行扩增, 经 CsCl 密度梯度和连续密度梯度超

速离心纯化后, 在管的中下部可见上下 2 条乳白色病毒带, 上面的带即为纯化后的 HDAd/EGFP (图 4)。

2.4 电镜鉴定重组腺病毒 HDAd/EGFP 形态

纯化后的 HDAd/EGFP 经磷酸钨负染, 在透射电镜下可见腺病毒典型的二十面体结构, 直径约为 70 nm, 病毒结构完整 (图 5)。

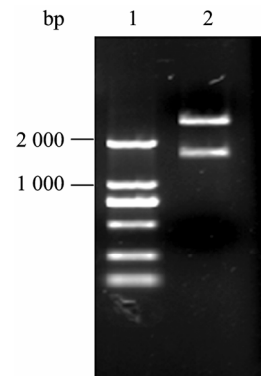


图 2 酶切鉴定 pSC11/EGFP

Fig. 2 pSC11/EGFP identified by restriction endonuclease assay. 1: DL2 000 marker; 2: pSC11/EGFP digested with *Sal* I and *Mlu* I.

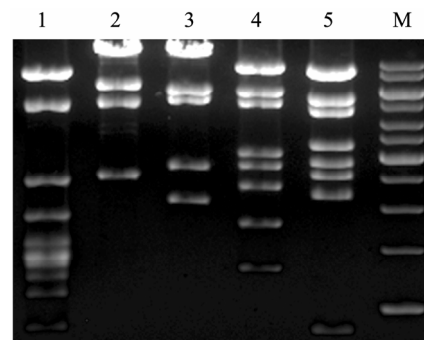


图 3 酶切鉴定 pSC15B/EGFP

Fig. 3 pSC15B/EGFP identified by restriction endonuclease assay. 1: *Pst* I; 2: *Eco*R V; 3: *Eco*R I; 4: *Bam*H I; 5: *Hind* III; M: DL1kb marker.

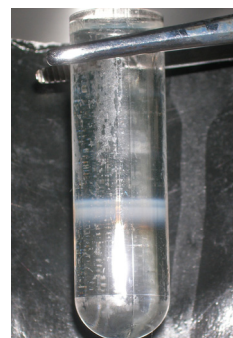


图 4 经 CsCl 超速离心后 HDAd/EGFP 病毒条带

Fig. 4 HDAd/EGFP purified by CsCl ultracentrifugation.

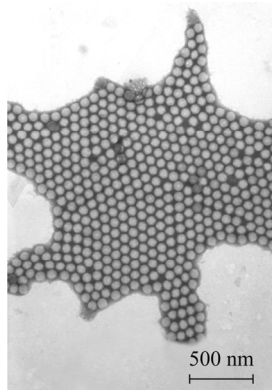


图 5 纯化的 HDAd/EGFP 电镜下形态 (1% 磷钨酸 pH 6.8 负染, TECNAI-12)

Fig. 5 Purified HDAd/EGFP under electron microscope (TECNAI-12).

2.5 荧光显微镜观察转基因 EGFP 的表达

将纯化后的 HDAd/EGFP 感染 294Cre4 细胞, 荧光显微镜下观察可见明显的绿色荧光 (图 6)。

2.6 重组腺病毒 HDAd/EGFP 浓度计算

纯化后的 HDAd/EGFP 稀释 10 倍后测得 OD₂₆₀ 值为 0.33, HDAd/EGFP 碱基数为 3.3089 kb, 可得

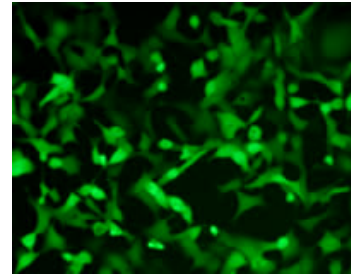


图 6 HDAd/EGFP 感染 293Cre4 细胞后表达的 EGFP (Nikon TE2000-S, 100×)

Fig. 6 EGFP expressed by HDAd/EGFP infected 293Cre4 cells (Nikon TE2000-S, 100×).

HDAd/EGFP 的病毒颗粒数为: $(0.33 \times 10 \times 1.1 \times 10^{12} \times 36) / 3.3089 \approx 4.0 \times 10^{12}$ vp/mL。

2.7 流式细胞仪检测 HDAd/EGFP 和 FGAd/EGFP 感染 A549 细胞后 EGFP 的表达

以 2 000 vp/细胞的 HDAd/EGFP 和 FGAd/EGFP 感染 A549 细胞后用流式细胞仪检测 A549 细胞的荧光表达率和表达强度。

图 7、图 8、图 9 分别显示 A549 细胞感染重组

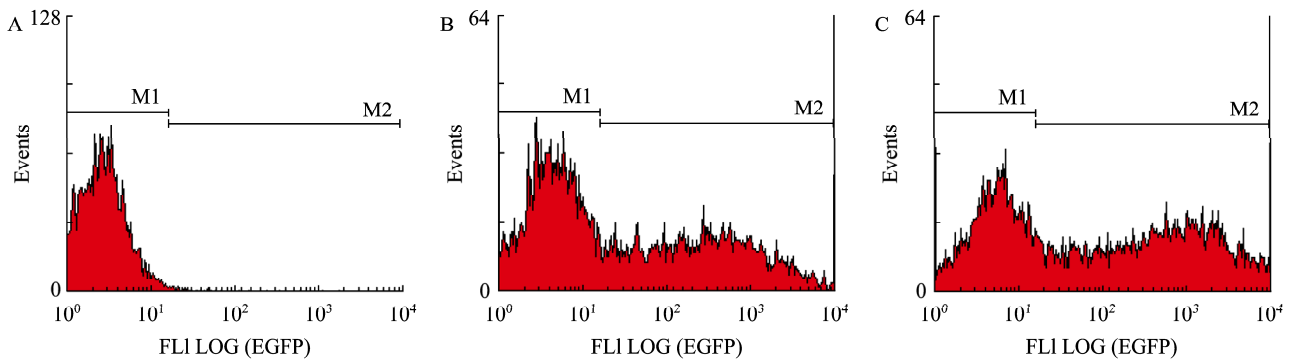


图 7 A549 细胞感染后 1 天时的流式直方图

Fig. 7 Flowcytometric histograms of infected A549 cells on day 1 after HDAd/EGFP or FGAd/EGFP infection (BECKMAN COULTER XL). (A) A549 cells. (B) FGAd/EGFP infected A549 cells. (C) HDAd/EGFP infected A549 cells.

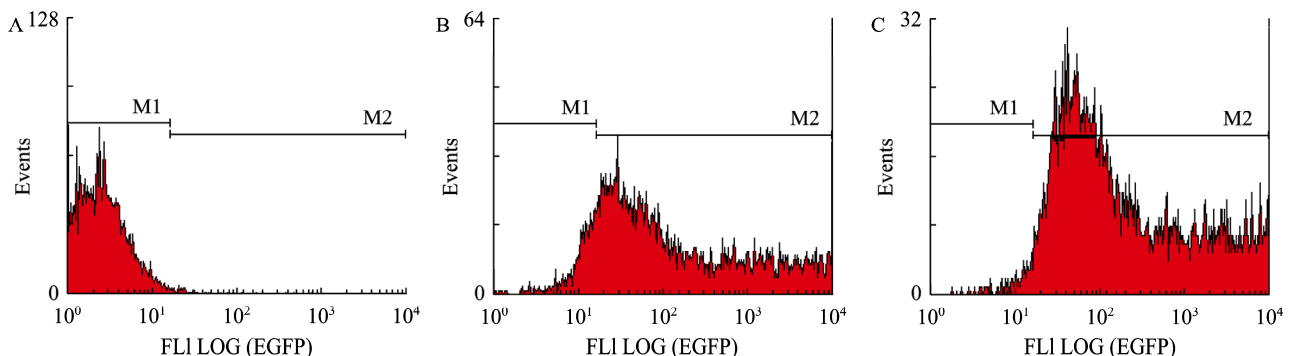


图 8 A549 细胞感染后 3 天时的直方细胞图

Fig. 8 Flowcytometric histograms of infected A549 cells on day 3 after HDAd/EGFP or FGAd/EGFP infection (BECKMAN COULTER XL). (A) A549 cells. (B) FGAd/EGFP infected A549 cells. (C) HDAd/EGFP infected A549.

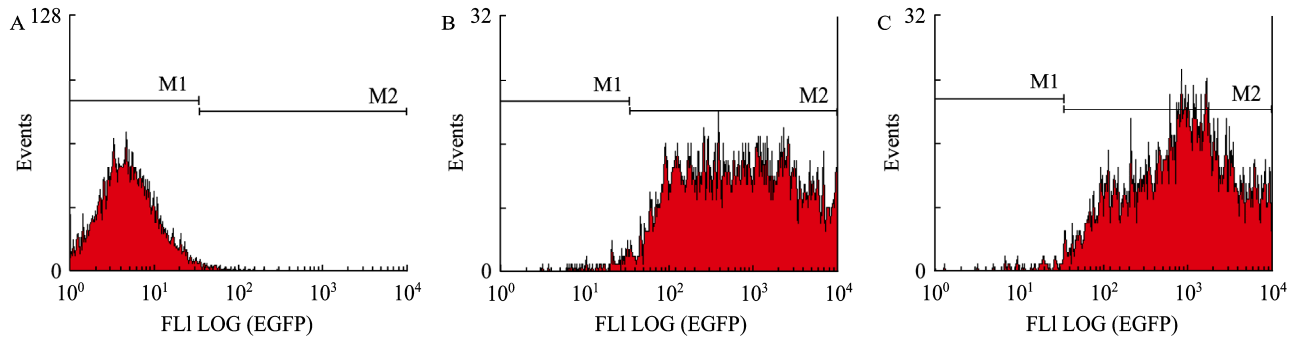


图 9 A549 细胞感染后 8 天时的直方细胞图

Fig. 9 Flow cytometric histograms of infected A549 cells on day 8 after HDAd/EGFP or FGAd/EGFP infection (BECKMAN COULTER XL). (A) A549 cells. (B) FGAd/EGFP infected A549 cells. (C) HDAd/EGFP infected A549.

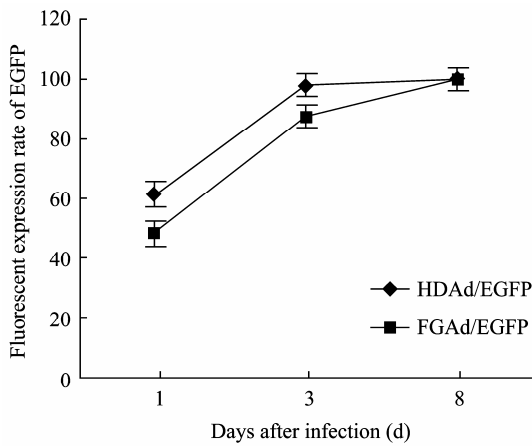


图 10 HDAd/EGFP、FGAd/EGFP 感染 A549 细胞后 EGFP 的表达率分析

Fig. 10 Percentage of EGFP expressed A549 cells after HDAd/EGFP or FGAd/EGFP infection (BECKMAN COULTER XL).

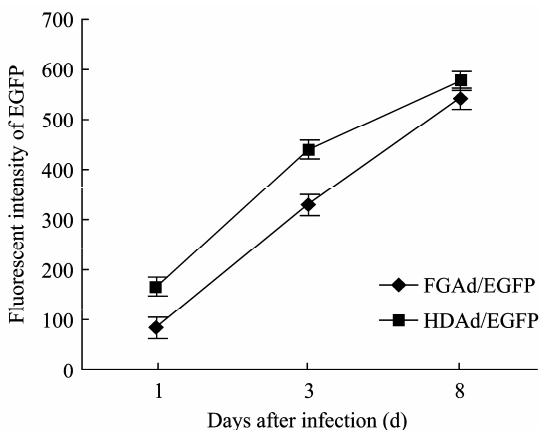


图 11 HDAd/EGFP、FGAd/EGFP 感染 A549 细胞后 EGFP 的荧光强度

Fig. 11 Fluorescence intensity of EGFP expressed by A549 cells after HDAd/EGFP or FGAd/EGFP infection (BECKMAN COULTER XL).

腺病毒后 1、3、8 d 时流式细胞仪所检测得到的流式直方图。图 7A、图 8A、图 9A 为 A549 细胞作为阴性对照, 设置 M1 区域, 图 7B/C、图 8B/C、图 9B/C 中 M2 区代表有 EGFP 表达的 A549 细胞。图 10 显示感染 HDAd/EGFP 的 A549 细胞在感染后的第 1 天和第 3 天较 FGAd/EGFP 有更高的 EGFP 表达率 ($P < 0.05$), 在第 8 天两者没有明显差异 ($P > 0.05$); 图 11 显示感染 HDAd/EGFP 的 A549 细胞在感染后第 1 天和第 3 天, EGFP 的平均荧光强度均比 FGAd/EGFP 强 ($P < 0.05$), 在第 8 天两者的平均荧光强度没有明显差异 ($P > 0.05$)。

3 讨论

腺病毒为长约 36 kb 的线性双链 DNA 病毒, 无包膜, 具有宿主范围广、可感染分裂和非分裂细胞、外源基因容纳量大、转导效率高、病毒滴度高、易繁殖和纯化等优点^[19], 被广泛应用于基因治疗和疫苗研究中。FGAd 由于保留了腺病毒的大部分基因, 低水平表达的腺病毒蛋白不仅对转导的细胞产生毒性作用, 在体内也可引起针对腺病毒载体的免疫反应, 当再次使用腺病毒载体时, 容易被机体免疫系统快速清除而无法长期表达转基因^[20]。HDAd 又被称为空壳载体 (Gutless or gutted vector), 缺失除了腺病毒复制信号 (ITRs) 和包装信号 (Ψ) 以外的其他所有腺病毒基因, 感染后无病毒自身蛋白表达^[1], 大大降低了细胞毒性和机体的免疫反应^[20], 可以持续表达转基因达 1 年以上^[21], 安全性更好; 大量病

毒自身基因的缺失使得 HDAd 的外源基因容纳量高达 37 kb,可同时表达多个基因用于多基因疾病的研究^[22];另外,HDAd 在包装过程中需要借助辅助病毒为其提供所有的结构和功能蛋白,来源于不同血清型的辅助病毒,可形成不同血清型的腺病毒,避免反复使用同一血清型腺病毒载体所产生的中和抗体的影响^[23]。

本实验对 HDAd 和 FGAd 体外感染转基因表达率和表达强度进行了比较,我们分别用约 2 000 vp/细胞的 HDAd/EGFP 和 FGAd/EGFP 感染 A549 细胞,结果显示感染 HDAd/EGFP 的细胞 3 d 内 EGFP 的表达率高于 FGAd/EGFP 感染的细胞,随着时间的推移 2 组 EGFP 的表达率无统计学差异,提示在体外感染肺泡来源的上皮细胞后,感染的早期 HDAd 较 FGAd 有更高的转基因表达率;同时我们监测了 HDAd/EGFP 和 FGAd/EGFP 感染 A549 细胞后 EGFP 的表达强度,结果同样显示在感染后 3 天内 HDAd/EGFP 较 FGAd/EGFP 有更高的 EGFP 表达,随着时间的推移 2 组的表达率也无统计学差异,说明感染早期 HDAd 在体外感染的肺泡上皮来源的细胞中转基因的表达较 FGAd 具有一定优势。我们的结果与文献报道的体内结果基本一致^[2-3]。由于 HDAd/EGFP 和 FGAd/EGFP 均为 5 型腺病毒来源,具有相同的衣壳蛋白,HDAd/EGFP 较 FGAd/EGFP 有更高的体外转基因表达效率的原因,目前仍不是十分清晰,我们推测:1) FGAd/EGFP 除了含有 EGFP 表达盒外,还含有 17 个腺病毒蛋白的 ORF^[3],虽然缺失了 E1 和 E3 区,仍存在的低水平表达会影响或干扰 EGFP 的表达,而 HDAd/EGFP 仅有一个 EGFP 表达盒,不存在任何腺病毒蛋白的干扰,因此转基因的表达更加迅速、高效;2) 两种载体转基因表达效率趋向一致的时间长短,与细胞生长状况有关,细胞活性的下降直接影响了 HDAd 转基因的高效表达。我们认为 HDAd 载体这种转基因瞬时高表达的特性是其作为疫苗载体,获得比 FGAd 载体更好的免疫原性的重要原因之一。需要指出的是转基因的表达水平由多种因素决定,不仅与载体有关,也与转基因本身的生物学性质如细胞毒性作用等有关,这些因素会对 HDAd 的转基因表达效率产生一定影响。

由于大多数病毒通过黏膜途径,尤其是呼吸道入侵机体,因此我们认为应及时开展 HDAd 作为黏膜免疫载体的可行性及效率研究,以期开发 RSV 等经黏膜途径感染的病毒疫苗探索一条新的途径。鉴于这种认识,我们选择了具有较好的免疫原性、不抑制机体的免疫应答^[3,15-16]、也没有细胞毒性的 EGFP 作为模式蛋白,用于探讨 HDAd 作为黏膜疫苗载体的可行性,避免转基因对 HDAd 免疫效果不利的影响,以期真实反映 HDAd 作为黏膜疫苗载体的可行性。进一步的实验证实了我们的想法,经滴鼻途径免疫 BALB/c 小鼠的比较研究表明:HDAd/EGFP 能诱导产生更好的体液、细胞及黏膜免疫应答,具有 Th1 和 Th2 平衡的特点,HDAd/EGFP 加强 (Boost) 免疫具有明显的免疫增强效果。证实了 HDAd 作为黏膜疫苗载体用于预防经呼吸道黏膜途径感染的 RSV 等病毒病原的疫苗研究是合理、可行的,将有助于克服目前 RSV 等疫苗研究中存在的安全性不足、免疫效果不理想等问题,作为安全有效的黏膜疫苗载体,HDAd 具有较好的应用前景^[5]。

总之,我们已成功构建了 HDAd/EGFP 载体,获得可高效表达 EGFP 的 HDAd/EGFP,并在体外开展了转基因表达效率的初步研究,与 FGAd 载体相比,HDAd 载体具有转基因瞬时高表达的特性,证实 HDAd 是很有潜力的疫苗载体。

REFERENCES

- [1] Mitani K, Graham FL, Caskey CT, *et al.* Rescue, propagation and partial purification of a helper virus-dependent adenovirus vector. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, **92**(9): 3854-3858.
- [2] Harui A, Roth MD, Kiertcher SM, *et al.* Vaccination with helper-dependent adenovirus enhances the generation of transgene-specific CTL. *Gene Ther*, 2004, **11**(22): 1617-1626.
- [3] Eric AW, Pramod NN, Stephanie SB, *et al.* Comparison of replication-competent, first generation, and helper-dependent adenoviral vaccine. *PLoS ONE*, 2009, **4**(3): 5059.
- [4] Weaver EA, Nehete PN, Nehete BP, *et al.* Protectin against mucosal sHIV challenge by peptide and helper-dependent adenovirus vaccine. *Viruses*, 2009, **1**(2): 920-938.

- [5] Fu YH, He JS, Zheng XX, *et al.* Intranasal vaccination with a helper-dependent adenoviral vector enhances transgene-specific immune responses in BALB/c mice. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010, **391**(1): 857–861.
- [6] Shimomura O, Johnson FH, Saiga Y. Extraction, purification and properties of Aequoria, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusa Aequorea. *J Cell Comp Physiol*, 1962, **59**(2): 223–229.
- [7] Prasher DC, Eckenrode VK, Ward WW, *et al.* Primary structure of the Aequorea victoria green-fluorescent protein. *Gene*, 1992, **111**(2): 229–233.
- [8] Chalfie M, Tu Y, Euskirchen G, *et al.* Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science*, 1994, **263**(5148): 802–805.
- [9] Heim R, Prasher DC, Tsien RY. Wavelength mutations and posttranslational autooxidation of green fluorescent protein. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, **91**(26): 12501–12504.
- [10] Cormack BP, Valdivia RH, Falkow S. FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP). *Gene*, 1996, **173**(1 Spec No): 33–38.
- [11] Simon PD, Vorwerk CK, Mansukani SS, *et al.* bcl-2 Gene therapy exacerbates excitotoxicity. *Hum Gene Ther*, 1999, **10**(10): 1715–1720.
- [12] Zhang G, Gurtu V, Kain SR. An enhanced green fluorescent protein allows sensitive detection of gene transfer in mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 1996, **227**(3): 707–711.
- [13] Chiu WL, Niwa Y, Zeng W, *et al.* Engineered GFP as a vital reporter in plants. *Curr Biol*, 1996, **6**(3): 325–330.
- [14] Stripecke R, Carmen Villacres M, Skelton D, *et al.* Immune response to green fluorescent protein: implications for gene therapy. *Gene Ther*, 1999, **6**(7): 1305–1312.
- [15] Rosenzweig M, Connole M, Glickman R, *et al.* Induction of cytotoxic T lymphocyte and antibody responses to enhanced green fluorescent protein following transplantation of transduced CD34(+) hematopoietic cells. *Blood*, 2001, **97**(7): 1951–1959.
- [16] Shi CX, Graham FL, Hitt MM. A convenient plasmid system for construction of helper-dependent adenoviral vectors and its application for analysis of the breast-cancer-specific mamaglobin promoter. *J Gene Med*, 2006, **8**(4): 442–451.
- [17] Yang B, He JS, Shi CX, *et al.* Construction and preparation of helper-dependent adenoviral vector expressing human respiratory syncytial virus F gene. *Acta Microbiol Sin*, 2007, **47**(4): 682–685.
杨兵, 何金生, 石长信, 等. 可表达人呼吸道合胞病毒融合蛋白辅助病毒依赖型腺病毒载体的构建与制备. *微生物学报*, 2007, **47**(4): 682–685.
- [18] Ng P, Parks RJ, Graham FL. *Methods in Molecular Medicine. Gene Therapy Protocols*. 2nd ed. Totowa: Humana Press Inc., 2002, **69**: 384.
- [19] Patterson S, Papaqatsias T, Benlahrech A. Use of adenovirus in vaccines for HIV. *Handb Exp Pharmacol*, 2009, (188): 275–293.
- [20] Fu YH, He SJ, Shi CX, *et al.* Advances in helper-dependent adenoviral vector. *Acta Microbiol Sin*, 2009, **49**(2): 147–152.
付远辉, 何金生, 石长信, 等. 辅助病毒依赖型腺病毒载体的研究进展. *微生物学报*, 2009, **49**(2): 147–152.
- [21] Morral N, O'Neal W, Rice K, *et al.* Administration of helper-dependent adenoviral vectors and sequential delivery of different vector serotype for long-term liver-directed gene transfer in baboons. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, **96**(22): 12816–12821.
- [22] Jozkowicz A, Dulak J. Helper-dependent adenoviral vector in experimental gene therapy. *Acta Biochim Pol*, 2005, **52**(3): 589–599.
- [23] Parks R, Eveleigh C, Graham F, *et al.* Use of helper-dependent adenoviral vectors of alternative serotypes permits repeat vector administration. *Gene Ther*, 1999, **6**(9): 1565–1573.