

AAV-ITR 单链 DNA 微载体在小鼠骨骼肌中的表达

朱冬琴, 张云, 刘晓玫, 张春

中国科学院苏州生物医学工程技术研究所 苏州市分子诊断和治疗技术重点实验室, 江苏 苏州 215163

朱冬琴, 张云, 刘晓玫, 等. AAV-ITR 单链 DNA 微载体在小鼠骨骼肌中的表达. 生物工程学报, 2014, 30(11): 1720-1732.
Zhu DQ, Zhang Y, Liu XM, et al. Gene expression of AAV-ITR ssDNA mini vector in skeletal muscle of mice. Chin J Biotech, 2014, 30(11): 1720-1732.

摘要: AAV-ITR 单链 DNA 微载体是一种基于腺相关病毒 (AAV) 倒置末端重复序列 (ITR) 的基因表达载体 (AAV-ITR ssDNA mini vector)。前期研究已证明 AAV-ITR 单链 DNA 微载体在 HEK 293T 细胞中具有较高的转染、表达效率。本文将相同拷贝数的 AAV-ITR 单链 DNA 微载体、3'-ITR 末端错配的 AAV-ITR 单链 DNA 微载体 (AAV-ITRmm ssDNA mutant vector)、AAV-ITR 双链 DNA 和质粒分别用 TurboFect 转入小鼠骨骼肌中, 比较检测 AAV-ITR 单链 DNA 微载体与其他基因表达载体在小鼠体内 1 周、1 个月及 3 个月的表达效率。组织切片经荧光显微镜观察及荧光灰度值分析表明, 相同分子摩尔数的 AAV-ITR 单链 DNA 微载体比 AAV-ITR 双链 DNA 和质粒在不同时期表达效率都要高且更稳定。提取注射 3 个月后的肌肉组织的 DNA, 用荧光定量 PCR 分析比较各载体的存留分子数。RT-PCR 的结果显示 AAV-ITR 单链 DNA 微载体在注射 3 个月后的存留分子数较其他载体高。综合结果显示 AAV-ITR 单链 DNA 微载体在动物体内具有表达效率高和长久稳定的优势, 有可能开发为基因治疗的一种高效、稳定的新型载体。

关键词: 腺相关病毒 (AAV), 倒置末端重复序列 (ITR), 基因表达微载体, 体内表达, RT-PCR, 基因治疗

Received: February 28, 2014; **Accepted:** May 5, 2014

Supported by: National Natural Science Foundation of China (No. 81371670), Natural Science Foundation of Jiangsu Province (No. BK2012629), Bureau of Suzhou City Science and Technology Project (No. ZXY2012005).

Corresponding author: Chun Zhang. Tel: +86-512-69588327; E-mail: chunzhangspring@gmail.com

Xiaomei Liu. Tel: +86-512-69588318; E-mail: lxmdou@126.com

国家自然科学基金 (No. 81371670), 江苏省自然科学基金 (No. BK2012629), 苏州市科技局项目 (No. ZXY2012005) 资助。

Gene expression of AAV-ITR ssDNA mini vector in skeletal muscle of mice

Dongqin Zhu, Yun Zhang, Xiaomei Liu, and Chun Zhang

Suzhou Municipal Key Laboratory of Molecular Diagnostics and Therapeutics, Suzhou Institute of Biomedical Engineering and Technology, Chinese Academy of Sciences, Suzhou 215163, Jiangsu, China

Abstract: AAV-ITR single strand DNA mini vector (AAV-ITR ssDNA mini vector) is a novel gene expression vector based on AAV-ITR. We have shown efficient gene expression of AAV-ITR ssDNA mini vector in HEK 293T. Here, we studied the efficacy of gene expression of AAV-ITR ssDNA mini vector *in vivo*. We injected the skeletal muscle of ICR mice separately with equal molar of AAV-ITR ssDNA mini vector, ITR mutated AAV-ITR single strand DNA mini vector (AAV-ITRmm ssDNA mutant vector), AAV-ITR dsDNA and pUC57-minivector-GFP, combined with TurboFect. Florescence microscope analysis of skeletal muscle section shows that AAV-ITR ssDNA mini vector had higher expression efficiency and longer expression period. We extracted DNA from the muscle three months after injection and quantified three vectors by Real-time PCR. RT-PCR analysis shows that there were highest copy numbers of AAV-ITR ssDNA mini vector existing in muscle. Stable existing of AAV-ITR ssDNA mini vector in muscle could be the molecular basis of long term gene expression of the vector. The results suggest that AAV-ITR ssDNA mini vector might be a promising vector for gene therapy.

Keywords: Adeno-associated virus (AAV), Inverted terminal repeats (ITR), single strand DNA mini vector, *in vivo* gene expression, RT-PCR, gene therapy

目前用于基因治疗的载体主要有病毒载体(如逆转录病毒、痘病毒、腺病毒、腺相关病毒等)和非病毒载体(如质粒载体)^[1-6]。病毒载体虽然效率高但容易引起不同程度的免疫反应和炎症反应,而且还存在插入突变、致癌等风险^[7-9]。一些病毒载体还有包装基因容量的限制,如腺相关病毒(AAV)载体,最大包装容量仅4.7 kb^[10]。而且,病毒基因载体的包装、生产复杂繁琐,不利于大规模的生产和临床使用。质粒载体虽然制备简单^[11],但它们的转染效率低^[12]。而且质粒载体中有质粒复制序列,抗菌素抗性选择基因等大量细菌DNA,特别是细菌DNA序列中CpG序列的含量是哺乳动物细胞DNA的4倍,会引起机体的组织免疫反应、细胞炎症和基因表达的沉默化^[13-14]。另外质粒载体分子量较大,

需要较多的非病毒转染试剂包装携带,从而很容易产生细胞毒性^[13-14]。因此,安全高效的基因治疗载体是当今基因治疗领域需要突破的一个瓶颈。

AAV基因组中的倒置末端重复序列(ITR)为125 nt的核苷酸序列,能形成自我互补的倒T型发夹结构^[8-9]。ITR的发夹结构不仅可以引发AAV的基因组合成第二条链,还可帮助其在细胞中形成稳定的环状多聚体和类染色质结构,从而使外源基因能持续稳定地表达^[10,15]。我们利用ITR的这种结构和功能优势,结合微环状DNA(Minicircle DNA)载体^[16-19]的特点,设计出AAV-ITR单链DNA微载体(AAV-ITR ssDNA mini vector)^[20]。AAV-ITR单链DNA微载体含有一个单链基因表达框,表达框两端为AAV基因

组的 ITR 序列。另外,有研究证明 ITR 中的 D 序列会阻碍 AAV 第二链的合成,从而阻碍基因的表达^[8-9]。所以 AAV-ITR 单链 DNA 微载体中 ITR 的 D 序列均被除去,以获得第二链的快速合成,使基因得到高效表达。前期实验已经证明去除了 D 序列的 AAV-ITR 单链 DNA 微载体在 HEK 293T 细胞中的确具有更高的表达效率^[20]。

本实验主要是检测 AAV-ITR 单链 DNA 微载体在小鼠骨骼肌中的表达效率。将相同拷贝数的 AAV-ITR 单链 DNA 微载体、AAV-ITR 双链 DNA 和质粒分别转入小鼠骨骼肌中,同时以相同拷贝数的 ITR 末端错配的 AAV-ITR 单链 DNA 微载体 (AAV-ITRmm ssDNA mutant vector) 作为对照,检测 AAV-ITR 单链 DNA 微载体在小鼠体内不同时期的表达效率。通过实时荧光定量 PCR 的方法比较分析了 3 种载体在注射第 3 个月后的载体分子数。综合结果表明 AAV-ITR 单链 DNA 微载体比 AAV-ITR 双链 DNA 和质粒在不同时期表达效率都要高且更稳定。

1 材料与方法

1.1 材料和试剂

pUC57-minivector-EGFP 质粒、pUC57-minivector-EGFP-mutant 质粒、大肠杆菌 *sure* 由苏州医工所医学制品检验室构建保存,HEK293T 细胞购自中国科学院上海细胞库,胎牛血清购自 Gibico 公司。限制性内切酶 *Not I*、*Sma I* 购自 Fermentas 公司。Goldview 染料购自 Solarbio 公司,琼脂糖粉购自 Biowest 公司,TurboFect *in vivo* transfection reagent 购自 Thermo 公司,多聚甲醛、水合氯醛、氯化钠等均为国产分析纯以上。核酸分子量标准 (DL5 000 marker) 购自

TaKaRa 公司,质粒提取试剂盒、凝胶回收试剂盒购自 Axygen 公司。DNeasy Blood & Tissue Kit 购自 QIAGEN 公司,GoTaq qPCR Master Mix 购自 Promega 公司。4-5 周 ICR 雄性小鼠、高压饲料、进口垫料、小鼠笼等购自上海斯莱克实验动物有限公司,微量注射器购自 Hamilton 公司。

1.2 载体的制备及鉴定

首先,将本研究中涉及的基因表达载体,包括 pUC57-minivector-EGFP 质粒、AAV-ITR 双链 DNA、AAV-ITR 单链 DNA 微载体、ITR 末端错配的 AAV-ITR 单链 DNA 微载体进行制备和鉴定。pUC57-minivector-EGFP 质粒 (图 1A) 由本实验已构建,通过转化 *sure* 大肠杆菌直接扩增,再用 Axygen 大抽试剂盒提取。通过 *Sma I* 酶切、Goldview 染色电泳检测鉴定 ITR 是否完整。pUC57-minivector-EGFP 通过 *Not I* 酶切,胶回收得到 AAV-ITR 双链 DNA (图 1B)。AAV-ITR 双链 DNA 95 °C 变性 5 min 后,迅速置于冰上冷却 5 min,得到 AAV-ITR 单链 DNA 微载体 (图 1C)。Goldview 染色电泳检测双链 DNA 及通过热变性得到的微载体片段,再经过体外转染 HEK 293T 细胞检测 GFP 的表达。ITR 末端错配的 AAV-ITR 单链 DNA 微载体 (图 1D) 的制备和鉴定同上。

1.3 基因表达载体转染 ICR 小鼠骨骼肌

通过如下公式,计算相同拷贝数下的各载体用量。样品拷贝数 (copies/ μ L)=样品浓度 (ng/ μ L) $\times 10^{-9} \times 6.02 \times 10^{23}$ (阿伏伽德罗常数)/样品分子量 (碱基对数 bp $\times 648$)。取相同拷贝数的 AAV-ITR 单链 DNA 微载体、AAV-ITR 双链 DNA、pUC57-minivector-EGFP 质粒、ITR 末端错配的 AAV-ITR 单链 DNA 微载体分别转染 ICR 小鼠骨骼肌。

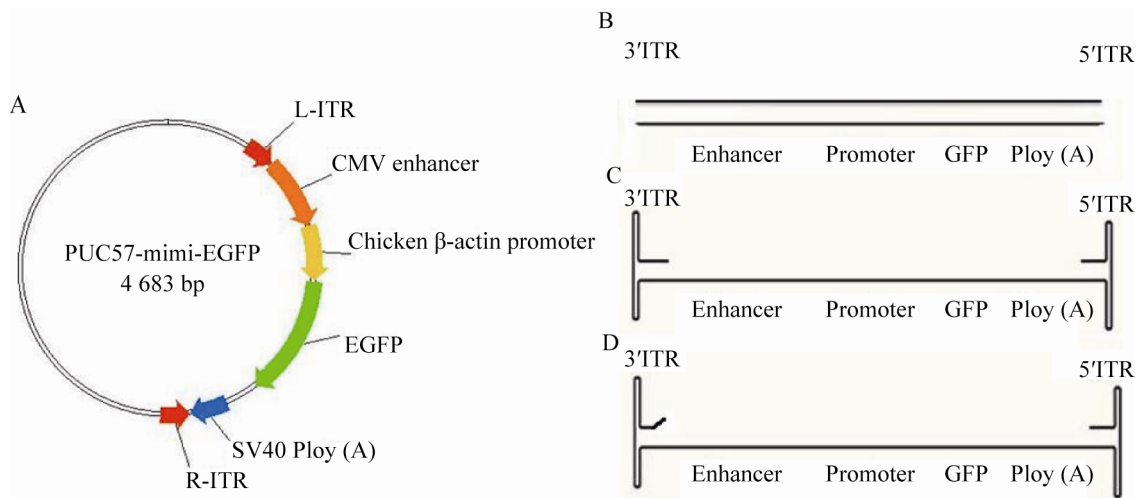


图 1 AAV-ITR 各载体的结构图

Fig. 1 The diagram of different AAV-ITR vectors. (A) pUC57-minivector-EGFP. (B) AAV-ITR double strand DNA. (C) AAV-ITR single strand DNA mini vector. (D) AAV-ITRmm ssDNA mutant vector.

注射 1 周表达效果检测：将 4-5 周的 ICR 雄性小鼠按体重年龄平均分成 13 个组，每组 3 只。第一组为空白对照，第二组到第四组分别注射 DNA 拷贝数呈梯度上升的 AAV-ITR 单链 DNA 微载体 2×10^{12} copies (2 μg)、 5×10^{12} copies (5 μg)、 1×10^{13} copies (10 μg)，第五组到第七组分别注射 DNA 拷贝数呈梯度上升的 AAV-ITR 双链 DNA 2×10^{12} copies (4 μg)、 5×10^{12} copies (10 μg)、 1×10^{13} copies (20 μg)，第八组到第十组分别注射 DNA 拷贝数呈梯度上升的 pUC57-minivector-EGFP 质粒 2×10^{12} copies (10 μg)、 5×10^{12} copies (25 μg)、 1×10^{13} copies (50 μg)，第十一组到第十三组分别注射 DNA 拷贝数呈梯度上升的 ITR 末端错配的 AAV-ITR 单链 DNA 微载体 AAV-ITR 2×10^{12} copies (2 μg)、 5×10^{12} copies (5 μg)、 1×10^{13} copies (10 μg)。上述十三组于 1 周后处死，取相应的骨骼肌置于 1%多聚甲醛中固定。

注射 1 个月表达效果检测 将 4-5 周的 ICR 雄性小鼠按体重年龄平均分成 10 个组，每组 3 只。

第一组为空白对照，第二组到第四组分别注射 DNA 拷贝数呈梯度上升的 AAV-ITR 单链 DNA 微载体 2×10^{12} copies (2 μg)、 5×10^{12} copies (5 μg)、 1×10^{13} copies (10 μg)，第五组到第七组分别注射 DNA 拷贝数呈梯度上升的 AAV-ITR 双链 DNA 2×10^{12} copies (4 μg)、 5×10^{12} copies (10 μg)、 1×10^{13} copies (20 μg)，第八组到第十组分别注射 DNA 拷贝数呈梯度上升的 pUC57-minivector-EGFP 质粒 2×10^{12} copies (10 μg)、 5×10^{12} copies (25 μg)、 1×10^{13} copies (50 μg)。上述十组于 1 个月后处死，取相应的骨骼肌置于 1%多聚甲醛中固定。

注射 3 个月表达效果检测：将 4-5 周的 ICR 雄性小鼠按体重年龄平均分成 4 个组，每组 3 只。第一组为空白对照，第二组注射 1×10^{13} copies (10 μg) 的 AAV-ITR 单链 DNA 微载体，第三组注射 1×10^{13} copies (20 μg) 的 AAV-ITR 双链 DNA，第四组注射 1×10^{13} copies (50 μg) 的 pUC57-minivector-EGFP 质粒。上述四组于 3 个月后处死，取相应的骨骼肌置于 1%多聚甲醛中固定。

转染试剂采用 TurboFect in vivo transfection reagent。转染方法如下：例如将 10 μg 的质粒 DNA 用 5% 的灭菌葡萄糖溶液补至 100 μL ，涡旋振荡充分混匀。加入 1.2 μL 的 TurboFect 试剂并涡旋混匀。于室温中静置 20 min。然后用微量注射器注入小鼠后腿肌肉中。其余实验组中的 TurboFect 的用量随转染用的 DNA 拷贝数的比例扩大。

1.4 制作石蜡切片及荧光显微分析

将固定后的肌肉组织冲洗后进行脱水和硬化，二甲苯透明 20 min，石蜡浸渗 5 h。浸蜡完全后再用石蜡包埋，最后再按 4 μm 厚度从不同角度进行切割。捞起切片后写上编号。将石蜡切片至于荧光显微镜 (ZEISS) 下观察并拍摄荧光图 (激发波长 488 nm，发射波长 507 nm)。

1.5 统计分析

将拍摄得到的荧光图通过 Image J (National institutes of health) 测量其平均灰度值 (Ostu 校准方法)，用以反映不同载体的表达强度。得到的荧光灰度值再进行方差分析 (SPSS 17.0 Inc, Chicago, USA) 并绘制柱状图以比较各载体的表达效率。

1.6 Real-time PCR 比较分析 pUC57-minivector-EGFP、AAV-ITR dsDNA 和 AAV-ITR ssDNA mini vector 注射 3 个月后的载体存留分子数

收取注射了 1×10^{13} copies、周期为 3 个月的 AAV-ITR 单链 DNA 微载体、AAV-ITR 双链 DNA 和 pUC57-minivector-EGFP 小鼠骨骼肌。然后用 QIAGEN DNA 提取试剂盒进行 DNA 抽提。设计并合成一对 GFP 片段引物 (由上海生工生物工程合成)， $5' \text{--} 3' \text{GCTCCTCCCAGACAACCA}$ ， $5' \text{--} 3' \text{CAGCAGCGGTCACAAACT}$ 。最后，以

SYBGreen 为荧光染料进行 Real-time PCR，比较 3 种载体的相对含量。

2 结果

2.1 各表达载体注射小鼠 1 周表达结果

注射 1 周小鼠骨骼肌切片的荧光显微镜分析和荧光灰度值分析结果显示 (图 2)，AAV-ITR 双链 DNA (图 2A, b1–b3)，pUC57-minivector-EGFP 质粒 (图 2A, c1–c3) 和 AAV-ITR 单链 DNA 微载体 (图 2A, a1–a3) 的 GFP 表达强度从 DNA 低拷贝数 2×10^{12} copies 到高拷贝数 1×10^{13} copies 呈现出递增的趋势。拷贝数为 1×10^{13} copies 时，双链 DNA 表达相对弱 (图 2A, b3)，质粒的荧光强度与单链微载体的相当 (图 2A, a3–c3)，且都比较高。ITR 末端错配的 AAV-ITR 单链 DNA 微载体 (图 2A, d1–d3) GFP 蛋白表达均不高。正如荧光灰度值分析结果显示 (图 2B)， 1×10^{13} copies 的 AAV-ITR 单链 DNA 微载体的灰度值最高，质粒其次，双链 DNA 的表达较低，ITR 末端错配的 AAV-ITR 单链 DNA 微载体表达最低。

2.2 各表达载体注射小鼠 1 个月表达结果

注射 1 个月小鼠骨骼肌切片的荧光显微镜分析和荧光灰度分析结果显示 (图 3)，低拷贝数 2×10^{12} copies 和 5×10^{12} copies 用量的载体表达较弱 (图 3A, a1–2, b1–2, c1–2)。在 1×10^{13} copies 用量下，双链 DNA 的荧光强度与质粒相当 (图 3A, b3 : c3)，而 AAV-ITR 单链 DNA 微载体 (图 3A, a3) 荧光最强。荧光灰度值分析 (图 3B) 也显示，双链 DNA 的灰度值与质粒相当， 1×10^{13} copies 的 AAV-ITR 单链 DNA 微载体的 GFP 表达是最高的。低拷贝数的载体表达很低，与空白对照相差不大，且不同载体在低拷贝数下的表达没有明显差别。

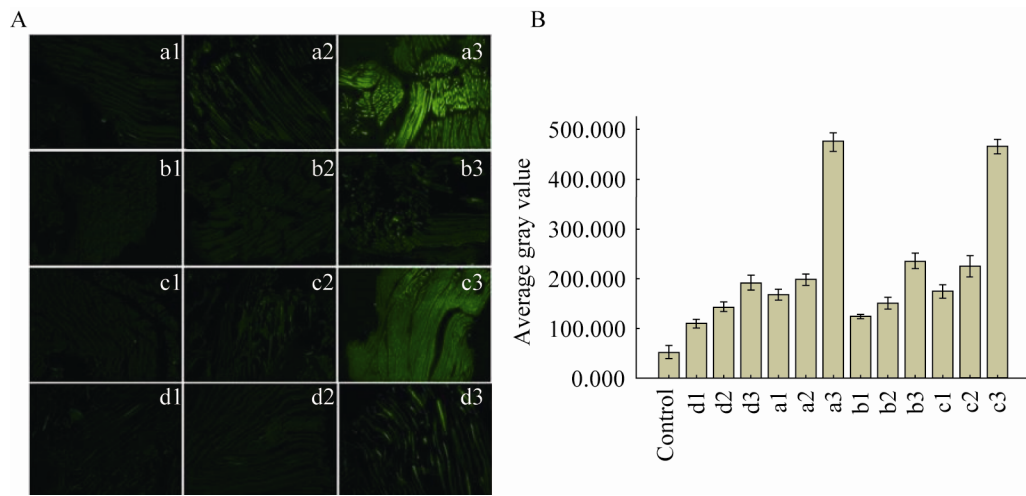


图 2 AAV-ITR 单链 DNA 微载体、ITR 末端错配的 AAV-ITR 单链 DNA 微载体、AAV-ITR 双链 DNA 和质粒载体在小鼠骨骼肌中一周的 GFP 表达

Fig. 2 The GFP expression of AAV-ITR ssDNA mini vector, AAV-ITR dsDNA, pUC57-minivector-EGFP and AAV-ITRmm ssDNA mutant vector in mice skeletal muscle one week after injection. (A) Fluorescence microscope pictures, 50 \times . a1–3: GFP expression of AAV-ITR ssDNA mini vector with 2×10^{12} copies, 5×10^{12} copies, 1×10^{13} copies respectively; b1–3: GFP expression of AAV-ITR dsDNA mini vector with 2×10^{12} copies, 5×10^{12} copies, 1×10^{13} copies respectively; c1–3: GFP expression of pUC57-minivector-EGFP plasmid with 2×10^{12} copies, 5×10^{12} copies, 1×10^{13} copies respectively; d1–3: GFP expression of AAV-ITRmm ssDNA mutant vector with 2×10^{12} copies, 5×10^{12} copies, 1×10^{13} copies respectively. (B) The average GFP fluorescence strength of ssDNA mini vector, AAV-ITR dsDNA mini vector, pUC57-minivector-EGFP and AAV-ITRmm ssDNA mutant vector in ICR mice skeletal muscle.

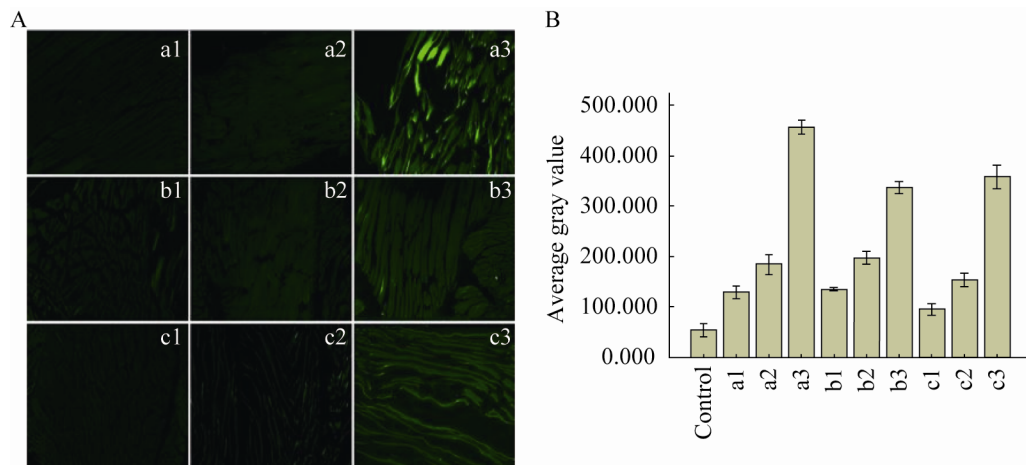


图 3 AAV-ITR 单链 DNA 微载体、AAV-ITR 双链 DNA 和质粒载体在小鼠骨骼肌中一个月的 GFP 表达

Fig. 3 The GFP expression of AAV-ITR ssDNA mini vector, AAV-ITR dsDNA and pUC57-minivector-EGFP in mice skeletal muscle one month after injection. (A) Fluorescence microscope pictures, 50 \times . a1–3: GFP expression of AAV-ITR ssDNA mini vector with 2×10^{12} copies, 5×10^{12} copies, 1×10^{13} copies respectively; b1–3: GFP expression of AAV-ITR dsDNA mini vector with 2×10^{12} copies, 5×10^{12} copies, 1×10^{13} copies respectively; c1–3: GFP expression of pUC57-minivector-EGFP plasmid with 2×10^{12} copies, 5×10^{12} copies, 1×10^{13} copies respectively. (B) The average green GFP fluorescence strength of ssDNA mini vector, AAV-ITR dsDNA mini vector and pUC57-minivector-EGFP in ICR mice skeletal muscle.

2.3 各表达载体注射小鼠 3 个月表达结果

为了检测 AAV-ITR 单链 DNA 微载体能否像 AAV 病毒载体那样能在体内较长时期地表达, 实验比较分析了高拷贝数 1×10^{13} copies 的 AAV-ITR 单链 DNA 微载体在小鼠骨骼肌中 3 个月的表达。骨骼肌切片的荧光显微镜分析和荧光灰度值分析结果显示 (图 4), 在高拷贝数 1×10^{13} copies 下, AAV-ITR 单链 DNA 微载体 (图 4A, a) 荧光强度在 3 个月后仍保持很强, 与相同分子摩尔数质粒和双链 AAV-ITR DNA 载体比较, 其表达效率最高, 质粒最低 (图 4A, c)。灰度分析 (图 4B) 也表明, AAV-ITR 单链 DNA 微载体的 GFP 表达水平最高, 质粒的表达水平接近空白对照, 而双链 DNA 表达水平也很低, 略高于质粒。实验结果表明 AAV-ITR 单链 DNA

微载体在体内也能长久稳定地表达。

2.4 不同注射量的各表达载体的表达效率综合比较分析

1 月与 1 周各载体表达的荧光图对比 (如图 5A) 所示, 在最高拷贝数 1×10^{13} copies 用量下, 质粒 (图 5A, c3-c3') 荧光下降最明显, AAV-ITR 双链 DNA 的荧光 (图 5A, b3-b3') 反而有所增强, 而 AAV-ITR 单链 DNA 微载体的荧光 (图 5A, a3-a3') 略有下降, 但仍是三者中最强的。正如荧光灰度分析比较 (图 5B) 所反映的, AAV-ITR 单链 DNA 和质粒的荧光表达均有不同程度的下降。其中, 单链 DNA 微载体的荧光强度下降不明显, 而质粒下降较明显。唯一不同的是, 1 个月后双链 DNA 的荧光表达反而上升。

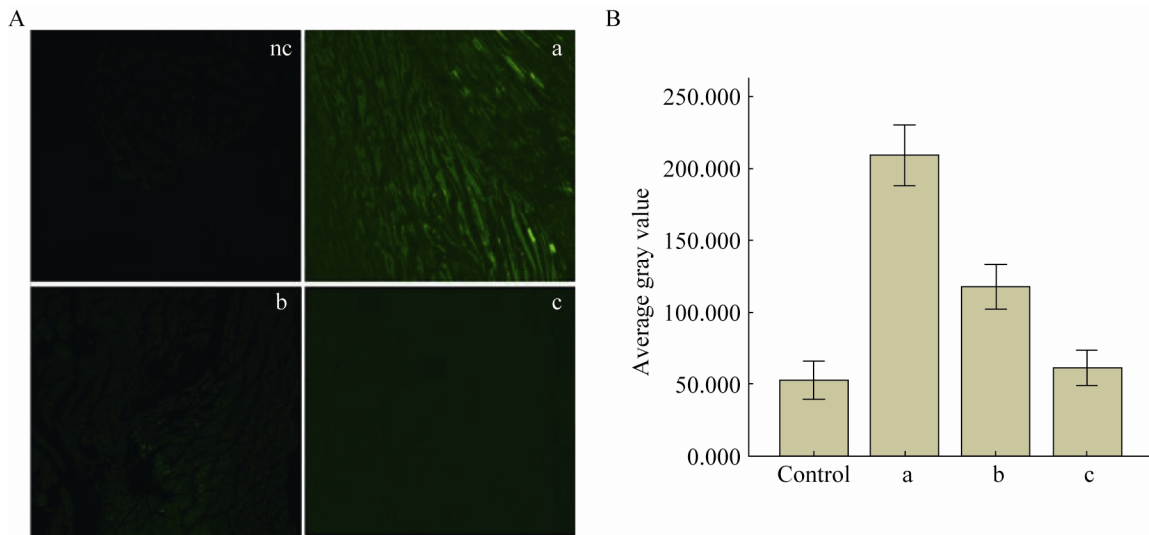


图 4 AAV-ITR 单链 DNA 微载体、AAV-ITR 双链 DNA 和质粒载体在小鼠骨骼肌中三月的 GFP 表达

Fig. 4 The GFP expression of AAV-ITR ssDNA mini vector, AAV-ITR dsDNA and pUC57-minivector-EGFP in mice skeletal muscle three months after injection. (A) Fluorescence microscope pictures, 50 \times . Nc: negative control; a: GFP expression of AAV-ITR ssDNA mini vector with 1×10^{13} copies; b: GFP expression of AAV-ITR dsDNA mini vector with 1×10^{13} copies; c: GFP expression of pUC57-minivector-EGFP plasmid with 1×10^{13} copies. (B) The average green GFP fluorescence strength of ssDNA mini vector, AAV-ITR dsDNA mini vector and pUC57-minivector-EGFP in ICR mice skeletal muscle.

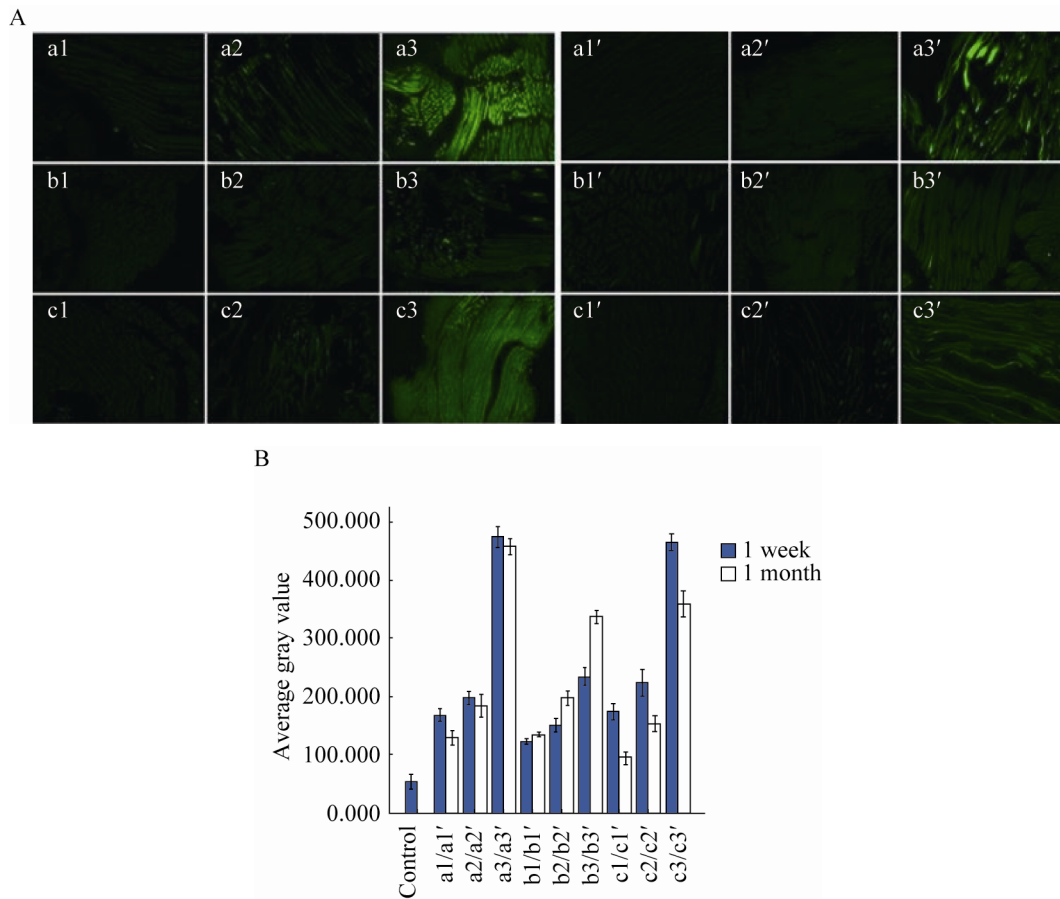


图5 AAV-ITR 单链 DNA 微载体、AAV-ITR 双链 DNA 和质粒载体在 1 周和 1 个月的 GFP 表达比较分析

Fig. 5 The difference of GFP expression of AAV-ITR ssDNA mini vector, AAV-ITR dsDNA and pUC57-minivector-EGFP in mice skeletal muscle between one week and one month after injection. (A) Fluorescence microscope pictures, 50 \times . a1–3: GFP expression of AAV-ITR ssDNA mini vector with 2×10^{12} copies, 5×10^{12} copies, 1×10^{13} copies respectively; b1–3: GFP expression of AAV-ITR dsDNA mini vector with 2×10^{12} copies, 5×10^{12} copies, 1×10^{13} copies respectively; c1–3: GFP expression of pUC57-minivector-EGFP plasmid with 2×10^{12} copies, 5×10^{12} copies, 1×10^{13} copies respectively; a'1–3: GFP expression of AAV-ITR ssDNA mini vector with 2×10^{12} copies, 5×10^{12} copies, 1×10^{13} copies respectively; b'1–3: GFP expression of AAV-ITR dsDNA mini vector with 2×10^{12} copies, 5×10^{12} copies, 1×10^{13} copies respectively; c'1–3: GFP expression of pUC57-minivector-EGFP plasmid with 2×10^{12} copies, 5×10^{12} copies, 1×10^{13} copies respectively. (B) The comparison of average green GFP fluorescence strength of ssDNA mini vector, AAV-ITR dsDNA mini vector and pUC57-minivector-EGFP between one week and one month in ICR mice skeletal muscle.

3 种载体在最高拷贝数 1×10^{13} copies 时 1 周、1 月和 3 月的荧光显微分析和荧光灰度分析差异显示 (图 6A), 从 1 月到 3 月, 1×10^{13} copies 的各载体都有一定程度的下降。其中, 质粒 (图 6A, c2–c3)

下降最显著, AAV-ITR 双链 DNA (图 6A, b2–b3) 也下降许多, 而 AAV-ITR 单链 DNA 微载体 (图 6A, a2–a3) 虽有所下降, 但仍是表达最强的。荧光灰度差异结果显示 (图 6B), 从 1 周到

3个月,质粒的表达逐渐下降,到第3个月时几乎与空白对照相当。而1个月表达有所上升的双链DNA在第3个月时也下降到很低。只有AAV-ITR单链DNA微载体的表达稍稳定,1个月时下降不明显,到第3个月时虽有下降但仍是表达最高的。这说明AAV-ITR单链DNA微载体相对而言具有高表达效率和长期稳定表达的特点。

2.5 Real-time PCR 比较分析注射3个月后各载体的存留分子数

三种载体 RT-PCR 的结果如图7所示,从扩增曲线(图7A)中可以看出,空白对照组中因为没有目的GFP基因的存在而图线杂乱。而其

他载体均能正常扩出。各载体的CT值如表1所示,未注射载体的空白样品的CT值因为没有GFP基因而无法测定。注射了 1×10^{13} copies的AAV-ITR单链DNA微载体的样品CT值最小,为25.28。而AAV-ITR双链DNA和pUC57-minivector-EGFP的载体残余量较少,CT值为28.86和32.15,即质粒最后剩余的含量最低。说明AAV-ITR单链DNA微载体在小鼠骨骼肌中最稳定,在细胞中能长期稳定存在。上述RT-PCR产物在1%琼脂糖凝胶中电泳的结果如图7B所示,AAV-ITR单链DNA微载体的PCR产物条带最亮(图7B,泳道2)。

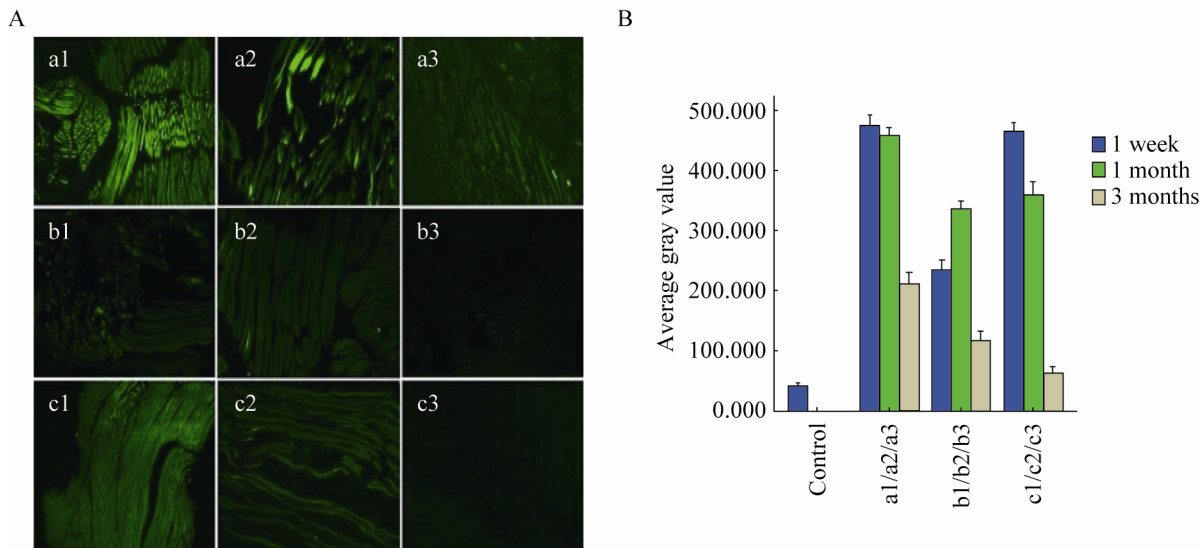


图6 AAV-ITR单链DNA微载体、AAV-ITR双链DNA和质粒载体在1周、1个月和3个月的GFP表达比较分析

Fig. 6 The difference of GFP expression of AAV-ITR ssDNA mini vector, AAV-ITR dsDNA and pUC57-minivector-EGFP in mice skeletal muscle among one week, one month and three months after injection. (A) Fluorescence microscope pictures, 50 \times . a1-3: GFP expression of AAV-ITR ssDNA mini vector with 1×10^{13} copies in one week, one month and three months; b1-3: GFP expression of AAV-ITR dsDNA mini vector with 1×10^{13} copies in one week, one month and three months; c1-3: GFP expression of pUC57-minivector-EGFP plasmid with 1×10^{13} copies in one week, one month and three months. (B) The comparison of average green GFP fluorescence strength of ssDNA mini vector, AAV-ITR dsDNA mini vector and pUC57-minivector-EGFP among one week, one month and three months in ICR mice skeletal muscle.

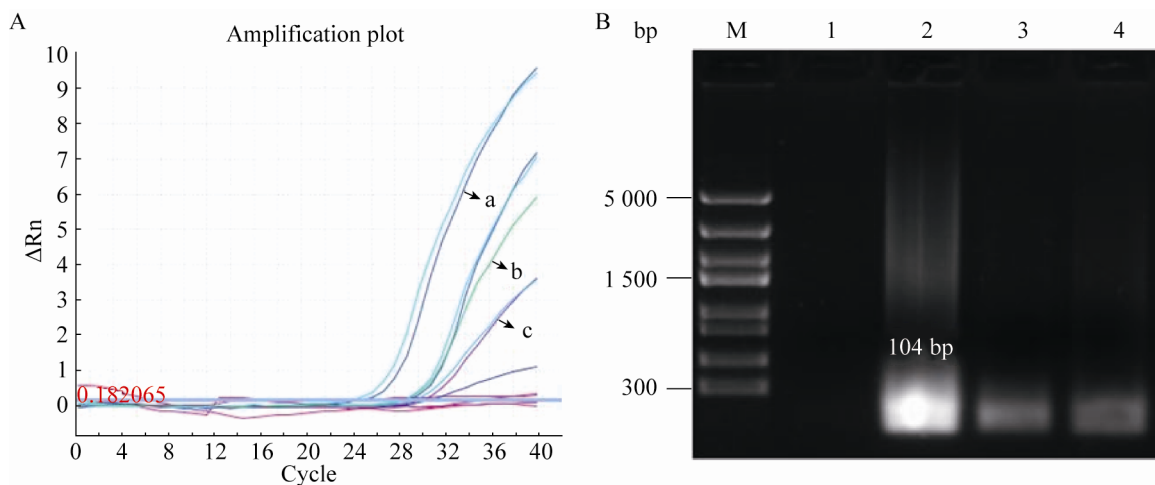


图 7 AAV-ITR 单链 DNA 微载体、AAV-ITR 双链 DNA 和 pUC57-minivector-EGFP 三个月后存留分子数的 RT-PCR 分析

Fig. 7 Comparison of the residue of AAV-ITR ssDNA mini vector, AAV-ITR dsDNA and pUC57-minivector-EGFP three months after injection by RT-PCR. (A) The amplification plot of AAV-ITR ssDNA mini vector, AAV-ITR dsDNA and pUC57-minivector-EGFP by RT-PCR. a: AAV-ITR ssDNA mini vector; b: AAV-ITR dsDNA; c: pUC57-minivector-EGFP. (B) The electrophoresis of products from RT-PCR of AAV-ITR ssDNA mini vector, AAV-ITR dsDNA and pUC57-minivector-EGFP. M: marker; 1: control; 2: the product from Real-time PCR of AAV-ITR ssDNA mini vector; 3: the product from Real-time PCR of pUC57-minivector-EGFP; 4: the product from Real-time PCR of AAV-ITR dsDNA.

表 1 AAV-ITR 单链 DNA 微载体、AAV-ITR 双链 DNA 和 pUC57-minivector-EGFP 三个月后存留分子数的 RT-PCR CT 值分析

Table 1 CT value of the residue of AAV-ITR ssDNA mini vector, AAV-ITR dsDNA, and pUC57-minivector-EGFP three months after injection by RT-PCR

Sample	CT(Cycle)			
	1	2	3	$\bar{x} \pm s$
Control	Undetermined	Undetermined	Undetermined	Undetermined
ss-10	24.56	25.52	25.78	25.28±0.64
ds-20	29.25	29.30	28.86	29.14±0.24
ps-50	31.07	30.31	32.15	31.18±0.92

3 讨论

我们利用腺相关病毒 (AAV) ITR 的结构优越性^[10,21-22]和微环状 DNA^[16-18]载体构造特性, 构建出 AAV-ITR 单链 DNA 微载体^[20]。类似微环状 DNA 的载体结构简单且安全^[19]。AAV 的

ITR 结构可以自动形成 T 形发卡结构, 末端的稳定环状结构也增加了整个微载体的结构稳定性^[22]。另外 ITR 之间可以形成多聚体, 一种类似染色体的结构, 这样使单链 DNA 微载体在细胞中可以长期表达, 所以 ITR 结构又赋予这种载体较高的稳定性和表达效率^[23]。

在小鼠骨骼肌表达结果中,从低拷贝数 2×10^{12} copies 到高拷贝数 1×10^{13} copies (按 1 5 10 增加), AAV-ITR 单链 DNA 微载体、AAV-ITR 双链 DNA 和质粒的荧光表达都逐渐增强。在 1×10^{13} copies 时都得到了很好的表达。 1×10^{13} copies 的 AAV-ITR 单链 DNA 微载体在所有时间点的表达都是最高的。在第 1 周时,质粒的表达与其相差不大,双链 DNA 表达较弱,单链 DNA 载体的突变体表达最弱。到第 1 个月时,AAV-ITR 单链 DNA 微载体的表达下降不显著,质粒的荧光强度下降显著,而双链 DNA 表达有所提升。到第 3 个月时,单链 DNA 微载体表达也有所下降,但仍较高。质粒下降最显著,而且大部分已经被降解;双链 DNA 的表达也下降许多。并且,3 个月后各载体的 RT-PCR 结果也显示,AAV-ITR 单链 DNA 微载体的剩余量是 3 种载体最高的,AAV-ITR 单链 DNA 微载体在骨骼肌中的稳定存在可能是其在骨骼肌中稳定表达的分子基础。总而言之,AAV-ITR 单链 DNA 微载体是一种具有较高的稳定性和表达效率的新型载体。

AAV-ITR 单链 DNA 微载体之所以具有较高的稳定性和表达效率,主要因素在于 ITR 结构。AAV-ITR 单链 DNA 微载体在动物体内以 ITR3' 末端作为引物合成第二条链,形成一个稳定的环状结构,并且还有可能通过 ITR 进一步形成环状多聚体。在一周表达的对照组中,ITR 末端错配的 AAV-ITR 单链 DNA 微载体正是由于 ITR 末端发生突变,无法形成完整的发卡结构,无法进行第二条链的合成,更加无法形成多聚体结构。在其进入动物体内后容易发生降解而无法稳定存在于细胞中,从而无法得到较高的表达。而 ITR 末端错配的 AAV-ITR 单链 DNA 微

载体的少量表达可能是由于单链 DNA 的配对形成双链 DNA。

AAV-ITR 双链 DNA 的 GFP 表达水平也低于 AAV-ITR 单链 DNA 微载体,可能是因为双链 DNA 两端 ITR 处于线性状态,没有形成发卡结构。在双链 DNA 进入动物体内后,游离线性的状态使其不稳定,逐渐发生降解,所以一周检测时表达不高。有文献报道过游离的 AAV-ITR 双链 DNA 在小鼠肝脏细胞也能形成多聚体^[24]。因此,在降解的过程中有部分双链 DNA 可能通过 ITR 结构形成了多聚体结构。所以,在 1 个月的表达检测中有所上升。但是剩余的稳定 AAV-ITR 双链 DNA 多聚体拷贝数已经不多,因此其表达还是不及单链 DNA 微载体。这点从 RT-PCR 结果中可以得到验证,AAV-ITR 双链 DNA 的剩余拷贝数低于 AAV-ITR 单链 DNA 微载体,但高于质粒。到第 3 个月时,AAV-ITR 双链 DNA 表达也有所下降,但仍比质粒高。由此可以看出 ITR 结构对整个单链 DNA 微载体的稳定性和高效表达具有重要作用。

AAV-ITR 单链 DNA 微载体与质粒载体相比有显著的优越性。首先,在 DNA 的注射量上,相同拷贝数 1×10^{13} copies 的质粒用量 50 μg ,而 AAV-ITR 单链 DNA 微载体因分子量小只需要 10 μg 。其次,在结构上,质粒上有复制序列,抗菌素抗性选择基因等大量细菌 DNA,特别是细菌 DNA 序列中 CpG 序列的含量是哺乳动物细胞 DNA 的 4 倍,会引发机体组织免疫反应,细胞炎症和表达基因的沉默化^[13-14]。而 AAV-ITR 单链 DNA 微载体中除了 ITR 只剩下基本的真核基因表达原件,使得其在体内应用时,免疫原性小。最后,在表达稳定性方面,AAV-ITR 单链 DNA 微载体在 1 个月和 3 个月时表达就明

显高于相同摩尔数的质粒。随着表达时间的延长, AAV-ITR 单链 DNA 微载体表达变化不大, 但质粒基因的表达却迅速下降, 到第 3 个月时几乎下降到空白水平。所以无论从安全性还是表达效率上考虑, AAV-ITR 单链 DNA 微载体都具有较大的优越性。

AAV-ITR 单链 DNA 微载体的实验室制备需要酶切后回收, 得率不高且花费高。但是目前已经有人在酵母和昆虫细胞中成功表达制备这种 AAV-ITR 单链 DNA^[25-26], 从而有望实现 AAV-ITR 单链 DNA 微载体能像质粒一样在细胞中大量制备。总而言之, AAV-ITR 单链 DNA 微载体具有免疫原性小, 基因表达稳定等优越性, 有可能开发成为基因治疗的一种高效、稳定的新型载体。

REFERENCES

- [1] Verma IM, Weitzman MD. Gene therapy: twenty-first century medicine. *Ann Rev Biochem*, 2005, 74(1): 711-738.
- [2] Hedman M, Hartikainen J, Ylä-Herttuala S. Progress and prospects: hurdles to cardiovascular gene therapy clinical trials. *Gene therapy*, 2011, 18(8): 743-749.
- [3] Aiuti A, Biasco L, Scaramuzza S, et al. Lentiviral hematopoietic stem cell gene therapy in patients with Wiskott-Aldrich syndrome. *Science*, 2013, 341(6148): 1233-151.
- [4] Breitbach CJ, Burke J, Jonker D, et al. Intravenous delivery of a multi-mechanistic cancer-targeted oncolytic poxvirus in humans. *Nature*, 2011, 477(7362): 99-102.
- [5] Mueller C, Flotte TR. Clinical gene therapy using recombinant adeno-associated virus vectors. *Gene Therapy*, 2008, 15(11): 858-863.
- [6] Taniyama Y, Tachibana K, Hiraoka K, et al. Development of safe and efficient novel nonviral gene transfer using ultrasound: enhancement of transfection efficiency of naked plasmid DNA in skeletal muscle. *Gene Therapy*, 2002, 9(6): 372-380.
- [7] Hacein-Bey-Abina S, von kalle C, Schmidt M, et al. A serious adverse event after successful gene therapy for X-linked severe combined immunodeficiency. *N Engl J Med*, 2003, 348(3): 255-256.
- [8] Bigger BW, Tolmachov O, Collombet JM, et al. An araC-controlled bacterial cre expression system to produce DNA minicircle vectors for nuclear and mitochondrial gene therapy. *J Biol Chem*, 2001, 276(25): 23018-23027.
- [9] Doenecke A, Krömer A, Scherer MN, et al. AAV plasmid DNA simplifies liver-directed in vivo gene therapy: comparison of expression levels after plasmid DNA-, adeno-associated virus- and adenovirus-mediated liver transfection. *J Gene Med*, 2010, 12(10): 810-817.
- [10] Henckaerts E, Linden RM. Adeno-associated virus: a key to the human genome? *Future Virol*, 2010, 5(5): 555-574.
- [11] Schleef M, Schmidt T. Animal-free production of ccc - supercoiled plasmids for research and clinical applications. *J Gene Med*, 2004, 6(S1): S45-S53.
- [12] Walther W, Stein U. Viral vectors for gene transfer. *Drugs*, 2000, 60(2): 249-271.
- [13] Hyde SC, Pringle IA, Abdullah S, et al. CpG-free plasmids confer reduced inflammation and sustained pulmonary gene expression. *Nat Biotechnol*, 2008, 26(5): 549-551.
- [14] Tolmachov O. *Gene Therapy of Cancer. Methods in Molecular Biology™*. 2009: 117-129.
- [15] Choi VW, Samulski RJ, McCarty DM. Effects of adeno-associated virus DNA hairpin structure on recombination. *J Virol*, 2005, 79(11): 6801-6807.
- [16] Kobelt D, Schleef M, Schmeer M, et al. Performance of high quality minicircle DNA for *in vitro* and *in vivo* gene transfer. *Mol Biotechnol*, 2013, 53(1): 80-89.

- [17] Mayrhofer P, Iro M. Gene Vaccines. Thalhamer J, Weiss R, Scheiblhofer S, Editors. Springer Vienna, 2012: 297–310.
- [18] Maniar LEG, Maniar JM, Chen ZY, et al. Minicircle DNA vectors achieve sustained expression reflected by active chromatin and transcriptional level. *Mol Ther*, 2013, 21(1): 131–138.
- [19] Mayrhofer P, Schleaf M, Jechlinger W. Gene Therapy of Cancer. *Methods in Molecular Biology™*. 2009: 87–104.
- [20] Li TM, Ping H, Zhang C. Construction of a new gene delivering mini vector based on AAV-ITR. *Pharm Biotech*, 2013, 20(4): 318–321 (in Chinese). 李泰明, 平茵, 张春. 基于AAV-ITR的基因表达微载体. *药物生物技术*, 2013, 20(4): 318–321.
- [21] Coura Rdos S, Nardi NB, The state of the art of adeno-associated virus-based vectors in gene therapy. *Virology*, 2007, 4: 99.
- [22] Grieger JC, Samulski RJ. Adeno-associated virus as a gene therapy vector: vector development, production and clinical applications. *Adv Biochem Eng Biotechnol*, 2005, 99: 119–145.
- [23] Duan D, Yan Z, Yue Y, et al. Structural analysis of adeno-associated virus transduction circular intermediates. *Virology*, 1999, 261(1): 8–14.
- [24] Nakai H. Free DNA ends are essential for concatemerization of synthetic double-stranded adeno-associated virus vector genomes transfected into mouse hepatocytes *in vivo*. *Mol Ther*, 2003, 7(1): 112–121.
- [25] Cervelli T, Backovic A, Galli A. Formation of AAV single stranded DNA genome from a circular plasmid in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS ONE*, 2011, 6(8): e23474.
- [26] Li L, Dimitriadis EK, Yang Y, et al. Production and characterization of novel recombinant adeno-associated virus replicative-form genomes: a eukaryotic source of DNA for gene transfer. *PLoS ONE*, 2013, 8(8): e69879.

(本文责编 郝丽芳)



科学出版社科学出版中心生命科学分社新书推介

《肿瘤生物学导论》

从书名：新生物学丛书

ISBN：978-7-03-040522-7/Q·3292 开本：16

定价：88

作者：许兴智，朱卫国，詹启敏

内容简介：癌症，又称恶性肿瘤，已经成为人类健康的第一威胁。我们每个人自己、至亲或好友都会受到癌症或癌症死亡的威胁。幸运的是，大多数癌症是可以预防的，同时，癌症研究的进展为征服癌症提供了越来越大的可能。因此，不仅仅是生物类、医学类的学生，所有关注癌症的人都有必要熟悉肿瘤的生物学行为、诊断和治疗。肿瘤生物学导论就是为此而写的。该书由从事肿瘤生物学导论教学的教授及相关领域的专家以浅显的语言介绍癌细胞不同于正常细胞的十大特征、癌症的诊断和治疗，更为重要的是，通过介绍致癌因素强调癌症死亡是可以预防的。