

犬 2 型腺病毒通用载体的构建及鉴定

Construction of a Transfer Vector Based on Canine Adenovirus Type-2

李 忠^{1,2}, 张守峰¹, 崔 艳¹, 王晓虎^{1,2}, 刘 晔¹, 扈荣良^{1*}

LI Zhong^{1,2}, ZHANG Shou-Feng¹, CUI Yan¹, WANG Xiao-Hu^{1,2}, LIU Ye¹ and HU Rong-Liang^{1*}

1 军事医学科学院军事兽医研究所, 长春 130062

2 吉林大学畜牧兽医学院, 长春 130062

1 Military Veterinary Institute, Academy of Military Medical Sciences, PLA, Changchun 130062, China

2 College of Animal Science and Veterinary Medicine, Jilin University, Changchun 130062, China

摘 要 为了获得能够携带较大外源基因的犬 2 型腺病毒 E3 区缺失性载体, 以犬 2 型腺病毒全基因组质粒 pPoly II-CAV-2 及 E3 区重组质粒 pVAX-E3 为基础, 缺失 1381bp 的 E3 区片段 (92.6% 的 E3 区全序列) 插入 Linker-NK (内含 *Not* I、*Cla* I、*Fse* I 多克隆位点), 获得重组载体质粒 pPoly II-CAV-2-ΔE3(NF) (31.9kb)。以 *Asc* I 和 *Pme* I 双酶切, 游离重组基因组, 在脂质体 Lipofectamine™ 2000 介导下, 转染 MDCK 细胞系, 获得了 E3 区缺失的重组病毒 CAV-2-ΔE3(NF)。通过病毒的形态学观察, 血凝性、生长特性、感染性实验证明, 该重组病毒与母源病毒没有差异。重组病毒 CAV-2-ΔE3(NF) 可以作为载体表达外源基因, 其外源基因插入片段不小于 3.3kb。

关键词 犬 2 型腺病毒, E3 区, 重组病毒, 载体

中图分类号 Q782 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2007)02-0319-04

Abstract Canine adenovirus type 2 (CAV-2) has been proposed as a vector for recombinant vaccine. Alternatively, it may be an attractive tool for gene transfer due to lack of pre-existing immunity in humans. In this study, a transfer vector based on CAV-2, in which the 1381bp fragment of the E3 region was deleted, and a linker containing the *Not* I, *Cla* I, *Fse* I restriction enzyme sites were cloned into the deleted region. The recombinant CAV-2 genome was released from the plasmids enzyme digestion and transfected into MDCK cells by lipofectamine to obtain the recombinant virus. No significant difference in morphology, hemagglutination and replication between the recombinant and the wide type CAV-2 was found. These results indicated that this recombinant virus CAV-2-ΔE3(NF) may be an efficient vector for gene transfer and the capacity of the vector for inserted foreign gene was up to 3.3kb.

Key words canine adenovirus type-2, E3 region, recombinant virus, vector

Received: September 14, 2006; Accepted: October 19, 2006.

This work was supported by a grant from the National Natural Science Foundation of China (No. 30471294).

* Corresponding author. Tel/Fax: +86-431-7961260; E-mail: hurongliang@hotmail.com

国家自然科学基金项目(No. 30471294)资助。

腺病毒(Adenovirus)是一类双链DNA病毒,包括可以感染人和动物的各种腺病毒,其具有感染宿主范围广、转染效率高、病毒滴度高、易制备、安全等优点,因此被广泛应用于基因治疗及基因重组疫苗等领域研究。目前,人腺病毒载体在临床应用中,存在初始抗体干扰、免疫记忆反应排斥、安全性等问题,极大地影响了病毒载体在人体内表达外源基因的效率,从而限制了人腺病毒载体在人体的临床应用,应用动物腺病毒载体可能会解决上述问题^[1]。犬腺病毒(Canine Adenovirus, CAV)可感染犬科和猫科的多种动物,宿主范围较广,基因组DNA全长31kb左右,具有感染性,且其E3区为复制非必需区,缺失后有一定的容量以插入外源基因,是一种良好的重组病毒载体^[2]。本研究在前期成功克隆犬2型腺病毒(CAV-2)感染性全基因组的基础上,对其E3区进行了1381bp的缺失,构建了CAV-2 E3区缺失性通用载体,为其应用于动物或人重组疫苗及基因治疗研究奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 材料

大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH10B、犬肾细胞系(MDCK)、CAV-2自然弱毒YCA-18株均由本室保存。含CAV-2感染性全基因组的质粒pPoly II-CAV-2^[3] (33.3kb)含CAV-2 E3区的中间质粒pVAX-E3 (7.8kb)由本室构建并保存。克隆载体pBluescript-II-KS(3.0kb)购自Invitrogen公司。各种限制性内切酶、T4 DNA连接酶、牛小肠碱性磷酸酶(CIAP)、Klenow大片段等均为NEB产品;脂质体LipofectamineTM2000为Invitrogen产品;电激转化仪为BTX产品(ECM399)。

1.2 CAV-2 E3区缺失性载体的构建

CAV-2 E3区缺失性载体的构建策略见图1,质粒的提取、基因片段的酶切回收、去磷酸化、黏末端的补平、连接反应、连接产物的转化、重组子的鉴定等方法,参照文献4方法进行。

1.3 重组病毒的包装

取改造的病毒全基因组质粒pPoly II-CAV-2-ΔE3(NF) 5μg,以Asc I和Pme I双酶切释放重组的全基因组。氯仿抽提1次,加入2倍体积无水乙醇及1/10体积的醋酸钠沉淀后,以500μL的70%乙醇漂洗,干燥后溶于100μL的无血清无双抗的MEM,用100μL无血清MEM稀释5~15μL Lipofectamine Reagent,与100μL无血清MEM稀释的5μg DNA轻混

均匀,置室温15~45min;以上混合物加入0.8mL无血清MEM,混匀后覆盖在经2mL无血清MEM洗过的细胞上,37℃ 5% CO₂培养箱中培养5~12h后,加入1mL含5%血清的DMEM,37℃ 5% CO₂培养箱中继续培养传代,直到细胞出现病变。

1.4 重组病毒基因组的提取及酶切鉴定

参照文献5的方法提取重组CAV-2-ΔE3(NF)病毒的基因组,以不同的限制性内切酶消化,并以母源病毒CAV-2基因组酶切做对照,琼脂糖凝胶电泳,鉴定重组病毒。

1.5 重组病毒的形态学观察

取重组病毒原代冻融物1%量接种于80%覆盖的单层MDCK细胞上,37℃ 5% CO₂温箱培养,待80%的细胞出现病变后,取细胞上清用0.5%磷钨酸负染作电镜观察;无菌将细胞刮下以戊二醛与锇酸双固定,用F812环氧树脂包埋,切片、染色作电镜超微结构观察。

1.6 重组病毒血凝、血凝抑制试验及生长特性

病毒血凝、血凝抑制试验参照文献6介绍的方法进行。按照文献[6]测定重组病毒CAV-2-ΔE3(NF)及母源病毒CAV-2的TCID₅₀。分别用1×10⁵ TCID₅₀/mL的CAV-2-ΔE3(NF)和母源病毒CAV-2接种MDCK细胞,37℃静置培养,分别在12h、24h、36h、48h、60h收毒。然后用MDCK细胞在96孔微量细胞培养板上分别测定CAV-2-ΔE3(NF)和母源病毒CAV-2的TCID₅₀,试验设3个重复。

2 结果

2.1 CAV-2 E3区缺失性载体的构建

以pVAX-E3为中间质粒,用Sph I和Nhe I消化去除E3区1381bp的片段,然后在缺失部位插入Linker-NR(内含Not I, Cla I, Fse I多克隆位点),最后将插入Linker的基因片段克隆入感染性全基因组pPoly II-CAV-2,最终获得CAV-2 E3区缺失性载体pPoly II-CAV-2-ΔE3(NF)。质粒pPoly II-CAV-2-ΔE3(NF)的酶切鉴定结果见图2。

2.2 重组病毒的包装及基因组的酶切鉴定

感染性犬2型腺病毒E3区缺失性载体pPoly II-CAV-2-ΔE3(NF),经酶切游离病毒基因组,转染MDCK细胞,连续转染3次,10d后出现细胞病变。病变细胞呈膨大、变圆、葡萄串样。将病毒扩大培养,提取病毒基因组,以限制性内切酶酶切鉴定,鉴定结果正确(图3)。

2.3 重组病毒的形态观察

将 CAV-2-ΔE3(NF)细胞培养物的上清进行负染 电镜观察 见有 20 面体立体对称、直径约 80nm、表面具有排列整齐壳粒的腺病毒样粒子(见图 4)。

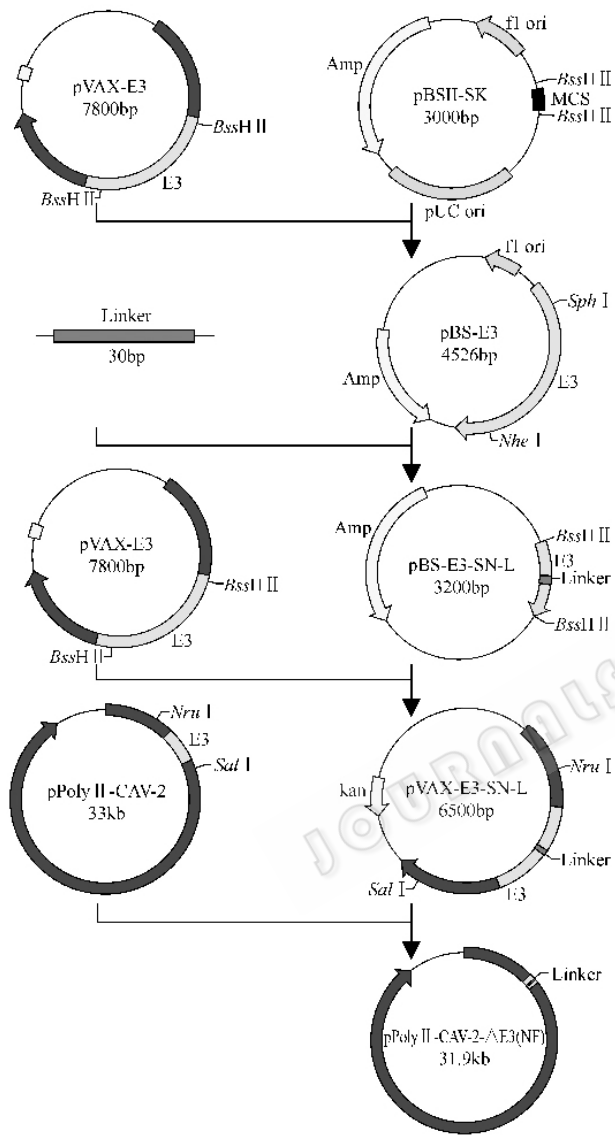


图 1 CAV-2 E3 区缺失性载体 pPoly II -CAV-2-ΔE3(NF) 的构建策略

Fig.1 Construction procedure of pPoly II -CAV-2-ΔE3(NF)vector

2.4 重组病毒的血凝性及生长特性

重组病毒 CAV-2-ΔE3(NF)可凝集人红细胞 ,血凝效价为 1 : 1280 ,且可被犬抗 CAV-2 高免血清抑制 ;以 Kärber 氏法测得该重组病毒的 TCID₅₀ 为 10^{8.5} /mL。病毒的生长增殖特性实验结果表明该重组病毒与母源病毒差异不显著(*P* > 0.05)(图 5)。

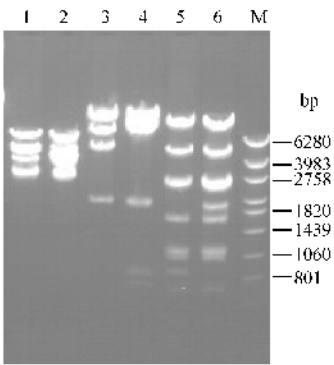


图 2 重组质粒 pPoly II -CAV-2-ΔE3(NF)(A)与质粒 pPoly II -CAV-2(B)酶切图谱比较

Fig.2 Restriction enzyme digestion analysis of plasmid pPolyII-CAV-2-ΔE3(NF)(A) and its original pPolyII-CAV-2(B) (A) , 2(B) : digested with *Pst* I ; 3(A) , 4(B) : digested with *Bam*HI ; 5(A) , 6(B) : digested with *Dra* I ; M : pT13/ *Hind*III marker .

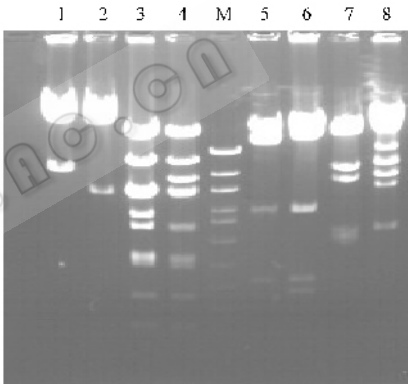


图 3 重组病毒与母源病毒基因组酶切图谱比较

Fig.3 Restriction enzyme digestion analysis of genome DNA from the recombinant virus (A) and wild type virus (B) (A) , 2(B) : digested with *Sna*B I ; 3(A) , 4(B) : digested with *Dra* I ; M : pT13/ *Hind*III marker ; 5(A) , 6(B) : digested with *Bam*HI ; 7(A) , 8(B) : digested with *Sac* I .

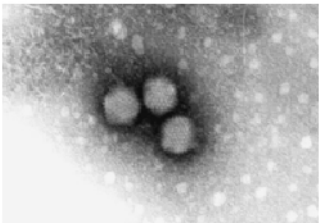


图 4 重组病毒 CAV-2-ΔE3(NF)的负染电镜照片(80 000 ×)

Fig.4 CAV-2-RN is negatively strained and observed in electron microscopy(80 000 ×)

3 讨论

人腺病毒衣壳的稳定包装能力约为其基因组总量的 105% ,超出该范围 ,基因组 DNA 会发生缺失或重排 ,使基因组的大小低于该范围。Morrison^[7]等人

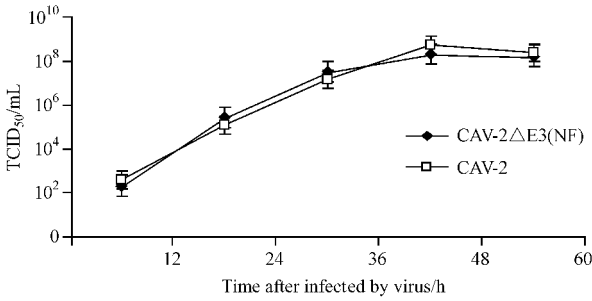


图 5 重组病毒与母源病毒的生长增殖特性比较

Fig.5 Productive Replication compare of recombinant virus and origin virus

构建 CAV-1 载体,将 CPV VP2 基因的表达盒插到 E3 区缺失处,获得了重组病毒,证明 CAV-1 最大包装容量为其野生型基因组的 106% ~ 109%。关于犬 2 型腺病毒 E3 区的包装容量还不清楚。Kremer^[1]等用 CAV-2 Toronto A26/61 株在 E1 反式互补细胞系内构建了多个 CAV-2 载体,其中包装容量最大的是野生型基因组的 105.7%。Fischer^[8]等人以 CAV-2 为载体缺失 E3 区,构建了表达 CDV H 蛋白和 F 蛋白的重组病毒,其最大包装容量为 105.3%。闫芳^[9]等人以本实验室 CAV-2 为载体缺失部分 E3 区,构建了表达 CDV H 蛋白的重组病毒,其包装容量为 106.17%,是目前报道 CAV-2 E3 区部分缺失后,基因组包装的最大容量。本研究对全长 31323bp 的 CAV-2 基因组的 E3 区进行了 1381bp 的缺失,该缺失片段占 E3 区全基因 92.6%。由于 CAV-2 的结构蛋白 PVIII 的基因与 E3 区 ORF1 的前 14bp 核苷酸为重叠基因,为了不影响结构蛋白的复制,因此本实验未将 E3 区基因全部缺失,保留了 E3 区前 110bp 碱基。由目前所报道的 CAV-2 的最大基因组包装量 106.17%,可以推测本实验获得的 CAV-2-ΔE3(NF)载体的外源基因容量最小约为 3.3kb,从而扩大了 CAV-2 E3 区缺失性载体的外源基因的容量。

目前,构建重组腺病毒的方法主要有体内同源重组法和体外连接法,本实验室采用后者。在前期的工作中,构建重组 CAV-2 往往需要多步的克隆,操作步骤繁琐。在本实验中,大片段缺失 CAV-2 E3 区后,在其内插入了含有多克隆位点的 Linker,由于 CAV-2 内部酶切位点丰富,插入的 Linker 仅含有 Not I、Cla I、Fse I 三个位点,为方便克隆,我们还以克隆载体 pBluescript- II -KS 为原始质粒,对其多克隆位点(MSC)进行了改造,获得了一个 MSC 两端具有

Not I、Fse I 位点的辅助质粒,这样大大方便了外源基因的插入,简化构建重组病毒的步骤。

与母源毒株 CAV-2 相比,重组病毒 CAV-2-ΔE3(NF)在基因组水平缺失了早期蛋白 E3 基因的两个开放性读码框架(ORF),而参与病毒装配和感染的晚期结构蛋白没有任何改变。从理论上讲,该重组病毒的生物学特性不会有任何变化。实验从重组病毒的形态学特征、血凝性、生长特性及感染力都证明了该重组病毒与母源病毒没有差异。同时病毒多次传代后其 DNA 酶切图谱保持不变,证实病毒具有良好的遗传稳定性。因此该重组病毒可以作为一种携带外源基因的通用病毒载体。

REFERENCES(参考文献)

[1] Kremer EJ, Boutin S, Chillon M, et al. Canine adenovirus vectors: an alternative for adenovirus-mediated gene transfer. *J Virol*, 2000, **74**: 505 - 512.

[2] Anne K, Ce'L R', Chad G, et al. Canine adenovirus vectors for lung-directed gene transfer: Efficacy, immune response, and duration of transgene expression using helper-dependent vectors. *J Virol*, 2006, **80**: 1487 - 1496.

[3] Zhang SF(张守峰), Hu RL(扈荣良), Niu JQ(牛建强), et al. Cloning and identification of the full length infectious genome of canine adenovirus type-2. *J Vet Med(中国兽医学报)*, 2002, **22**: 533 - 535.

[4] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1989, pp. 1.21 - 6.60.

[5] Morikazu S. A rapid and simple method for preparation of adenovirus DNA from infected cells. *Microbiol Immunol*, 1983, **27**: 817 - 822.

[6] Yin Z(殷震), Liu JH(刘景华). *Animal Virology*. Chinese Science Press, Beijing, 1997, pp.343 - 348, pp.329 - 331, pp. 422 - 428.

[7] Morrison MD, Reid D, Onions D, et al. Generation of E3-deleted canine adenoviruses expressing canine parvovirus capsid by homologous recombination in bacteria. *Virology*, 2002, **293**: 26 - 30.

[8] Laurent F, Jean PT, Camilla PD, et al. Vaccination of puppies born to immune dams with a canine adenovirus-based vaccine protects against a canine distemper challenge. *Vaccine*, 2002, **20**: 3485 - 3497.

[9] Yan K(闫芳), Xia XZ(夏咸柱), Hu RL(扈荣良), et al. Construction and identification of the recombinant virus expressing canine distemper virus H gene based on canine adenovirus type-2. *J Vet Med(中国兽医学报)*, 2004, **24**: 425 - 428.