

崔潇婷,顾玲玲,吴萌,等. 杆状病毒表达系统制备的重组禽腺腺病毒的鉴定[J]. 江苏农业科学,2019,47(5):153-155.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2019.05.038

杆状病毒表达系统制备的重组禽腺腺病毒的鉴定

崔潇婷,顾玲玲,吴萌,张继玲,王安平

(江苏农牧科技职业学院/江苏省兽用生物制药高技术重点实验室,江苏泰州 225300)

摘要:为对杆状病毒表达系统制备的重组禽腺腺病毒进行生物学特性的鉴定,将含 GFP 报告基因及 AAV 两侧末端重复序列的重组杆状病毒 rBac - GFP、表达 AAV 结构蛋白的重组杆状病毒 rBac - VP、表达 AAV 功能蛋白的重组杆状病毒 rBac - Rep 以感染复数为 5,同时感染摇瓶培养中的昆虫细胞 Sf9,72 h 后收集细胞沉淀,反复冻融 3~5 次后,离心取上清。经滤膜过滤、氯仿抽提和 PEG 沉淀后,进行电镜观察和 Western blot 分析,并体外感染鸡成纤维细胞和鸡肝细胞系。SDS - PAGE 结果显示,rAAAV 得到了较好的纯化,电镜下可观察到大小约 20 nm 的典型细小病毒样粒子,Western blot 分析数据显示 rAAAV 由 3 个结构蛋白组成,与野生病毒相似。体外表达试验结果显示,rAAAV 能介导 GFP 报告基因在鸡细胞中稳定持久地表达。表明杆状病毒表达系统制备的 rAAAV 具有与野生病毒相似的性质,可应用于后继研究和开发应用。

关键词:重组禽腺腺病毒;杆状病毒表达系统;鉴定

中图分类号:S852.65 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2019)05-0153-03

腺腺病毒(adeno-associated virus, AAV)又称腺病毒相关病毒,作为一种新型的病毒载体,与其他重组病毒载体相比较,具有对宿主没有致病性、免疫原性极低、宿主范围广、表达时间持久等优点^[1],因此被认为是一种比较理想的基因转移载体,目前广泛地用于基因治疗和基因工程疫苗等方面的研究。rAAV 已有效地转导了小鼠和灵长类动物的多个组织和细胞,并能介导外源基因在肺脏、中枢神经系统、肝脏、视网膜及骨骼肌等器官和组织中的长期表达^[2-6]。

禽腺腺病毒(avian adeno-associated virus, AAV)于

1973年由Yates等首次发现并报道^[7],AAAV的理化性质、基因组结构与AAV基本相似,提示可作为有潜力的重组病毒载体开发应用^[8-9]。目前,重组禽腺腺病毒的制备方法主要是三质粒共转染法,即将顺式(携带ITR和外源基因)、反式(编码rep和cap)和辅助基因的3种质粒共同转染293细胞系,这种方法成本偏高、程序较繁、不宜扩大生产,且获得的重组禽腺腺病毒滴度偏低。2002年,Masahi等发现Rep78在昆虫细胞Sf9中无需辅助病毒或质粒就能支持AAV DNA复制^[10],将重组杆状病毒/昆虫细胞系统应用于rAAV的生产,这种方法克服了传统三质粒法的技术难关,rAAV滴度大大提高,生产出的rAAV与使用293细胞生产得到的病毒载体在生物功能上没有差异,杆状病毒/昆虫细胞悬浮生产系统被证明是一种简单、高效、经济的可以大规模生产的方法。

本实验室首次利用重组杆状病毒/昆虫细胞系统制备rAAAV的生产,本研究对昆虫细胞制备的rAAAV进行以系列的鉴定,为rAAAV的应用奠定基础。

收稿日期:2017-11-21

基金项目:国家自然科学基金(编号:31302096);江苏省科技支撑计划(编号:BE2013415);江苏省六大人才高峰项目(编号:NY-009)。

作者简介:崔潇婷,女,江苏如皋人,讲师,主要从事兽用生物制药的研究。E-mail:419445466@qq.com。

通信作者:王安平,博士,副教授,主要从事兽用生物制药的研究。E-mail:wap4017@163.com。

[14]姜军坡,李毅,王世英,等. Z-27菌剂对育肥猪生长性能、肠道酶活力及消化性能的影响[J]. 河南农业科学,2015,44(6):131-136.

[15]中华人民共和国卫生部. 公共场所空气微生物检验方法 细菌总数测定:GB/T 18204.1-2000[S]. 北京:中国标准出版社,2000.

[16]中华人民共和国卫生部. 食品安全国家标准 食品微生物检验 大肠埃希氏菌计数:GB 4789.38-2012[S]. 北京:中国标准出版社,2012.

[17]环境保护部. 环境空气和废气 氨的测定 纳氏试剂分光光度法:HJ 533-2009[S]. 北京:中国标准出版社,2009.

[18]中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局,中国国家标准化管理委员会. 饲料中水分的测定:GB/T 6435-2014[S]. 北京:中国标准出版社,2014.

[19]中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局,中国国家标准化管理委员会. 天然气 含硫化化合物的测定 第1部分:用碘量法测定硫化氢含量:GB/T 11060.1-2010[S]. 北京:中国标准出版社,2010.

[20]王晓锋,李凯,蒋亚东,等. 长白猪与杜洛克猪肥育阶段生长性能的比较分析[J]. 养猪,2014(4):59-61.

[21]王晓霞,易中华,计成,等. 果寡糖和枯草芽孢杆菌对肉鸡肠道菌群数量、发酵粪中氨气和硫化氢散发量及营养素利用率的影响[J]. 畜牧兽医学报,2006,37(4):337-341.

[22]杨峰. 枯草芽孢杆菌的抗逆特性及其对仔猪生化指标和氨气排放的影响[D]. 杭州:浙江工商大学,2011.

[23]李梓霖,姜军坡,周曙光,等. *Bacillus subtilis* Z-27 制剂对仔猪肠道酶活及消化性能的影响[J]. 饲料工业,2012,33(20):41-45.

1 材料与方法

1.1 载体和细胞

含 GFP 报告基因及 AAV 两侧末端重复序列的重组杆状病毒 rBac - GFP, 表达 AAV 结构蛋白的重组杆状病毒 rBac - VP, 表达 AAV 功能蛋白的重组杆状病毒 rBac - Rep 均由笔者所在实验室构建并保存; Sf9 细胞购自 Invitrogen 公司; 鸡胚成纤维细胞 (CEF) 用 9 ~ 11 日龄 SPF 鸡胚制备; 鸡胚肝细胞系 (CEL) 由中国农业科学院生物制品工程技术中心提供。

1.2 工具酶和试剂

昆虫细胞培养基 Sf - 900 II SFM (Serum free medium), 购自 GBICO 公司; HRP 标记的羊抗鼠 IgG, 购自康为世纪生物科技有限公司; 其他试剂均为国产分析纯级。

1.3 rAAAV - GFP 的制备

参照文献 [11] 的方法, 将 Sf9 昆虫细胞以 5×10^5 cells/mL 的初始密度接种于摇瓶中的昆虫细胞培养基, 110 r/min 27 °C 振荡培养, 至密度达 2×10^6 cells/mL 时, 以 MOI 为 5, 接种 3 种重组杆状病毒 rBac - GFP、rBac - VP、rBac - Rep。3 d 后, 离心收集细胞沉淀, 于 -80 °C、37 °C 反复冻融 3 ~ 5 次, 12 000 r/min 离心 10 min, 收集上清, 即为含 GFP 报告基因的重组禽腺病毒 rAAAV - GFP。

1.4 rAAAV - GFP 的纯化

将以上制备的病毒液先用 0.22 μm 的滤膜过滤, 除去杂质和大分子蛋白, 再加入 1/10 体积的氯仿在摇床上室温剧烈振荡 1 h, 加入 5 mol/L NaCl 至终浓度为 1 mol/L, 12 000 r/min 离心 10 min, 取上层水相, 加入 PEG 8000 至终浓度为 10%, 冰浴 1 h, 12 000 r/min 离心 15 min, PBS 溶解沉淀, 即为纯化的 rAAAV - GFP。

1.5 rAAAV - GFP 的电镜鉴定

将纯化的重组病毒 rAAAV - GFP 滴加于铜网上, 经 2% 磷钨酸负染后, 在投射电镜下观察。

1.6 rAAAV - GFP 的 Western blot 分析

取少量的 rAAAV - GFP 纯化产物, 与等体积的 $2 \times$ loading buffer 混匀后, 煮沸 3 min, 取 15 μL 进行 SDS - PAGE 分析, 以未接种病毒的细胞沉淀作为阴性对照。样品电泳结束后转印 PVDF 膜, 以鼠抗 VP3 多抗作为一抗, 以 HRP 标记的羊抗鼠作为二抗, 按常规方法进行 Western blot 分析。

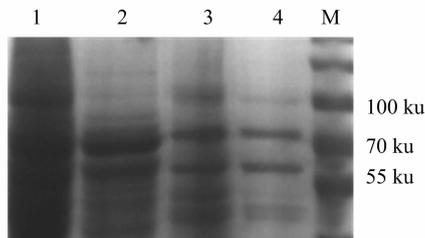
1.7 rAAAV - GFP 的体外表达试验

分别将 CEF 细胞和鸡胚肝 CEL 细胞系按 1×10^5 cells/孔接种 24 孔培养板, 37 °C、5% CO₂ 培养 24 h 后, 吸弃培养液, 将 rAAAV - GFP 以 10 倍倍比稀释感染细胞, 24 h 后, 在荧光倒置显微镜下观察荧光出现的时间、数量及持续时间。

2 结果与分析

2.1 rAAAV - GFP 的纯化

为建立简单有效的病毒纯化方法, 将含有重组病毒的细胞裂解上清液分别经滤膜过滤、氯仿抽提以及 PEG 沉淀。SDS - PAGE 对纯化产物进行分析, 由图 1 可知, 经一系列纯化步骤后, 大量的杂蛋白被去除, 重组病毒得到了较好的纯化。



M—蛋白质 marker; 1—rAAAV 原始上清; 2—滤膜过滤后的产物; 3—氯仿抽提后产物; 4—PEG 沉淀后 PBS 溶解产物

图1 rAAAV 纯化产物的 SDS-PAGE 分析

2.2 rAAAV - GFP 的电镜鉴定

纯化的病毒液负染后电镜下观察, 可见大小为 25 nm 左右的二十面体样的病毒粒子, 并有空心 and 实心之分, 与野生 AAV 病毒粒子的大小和形态相似 (图 2)。

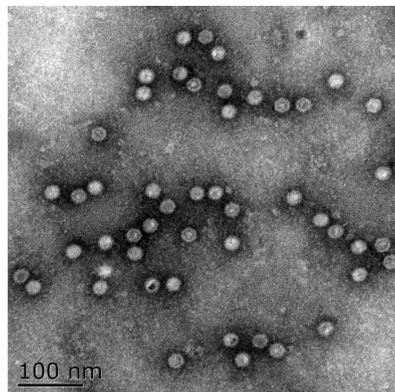
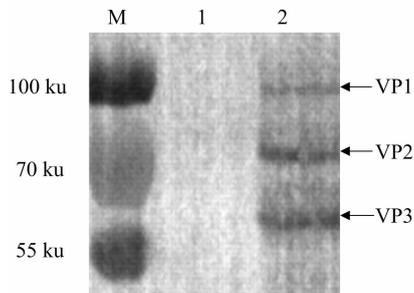


图2 rAAAV-GFP 电镜图(97 000 ×)

2.3 rAAAV - GFP 的 Western blot 分析

为鉴定 rAAAV 的结构蛋白组成, 将纯化的病毒液进行 Western blot 分析, 以 VP3 多抗血清作为一抗, 结果可见 3 个结构蛋白, 与野生病毒结构蛋白分子量相近 (图 3)。



M—蛋白质 marker; 1—空白上清对照; 2—rAAAV-GFP 纯化产物

图3 rAAAV 的 Western blot 分析

2.4 rAAAV - GFP 的体外表达试验

为探讨昆虫细胞制备的 rAAAV - GFP 的生物学特性, 将 rAAAV 分别感染鸡胚成纤维细胞 CEF 和鸡胚肝细胞系 CEL, 荧光显微镜结果显示, 在感染后约 24 h 可见绿色荧光, 随着时间推移, 荧光逐渐增强, 时间可持续至试验结束 (图 4), 说明 rAAAV 能介导 GFP 基因在鸡细胞中高效稳定表达。

3 讨论

家禽生产预防疾病主要靠疫苗的研发, 而新型疫苗的研发又依赖于病毒转移载体, 目前许多家禽病毒被开发为载体

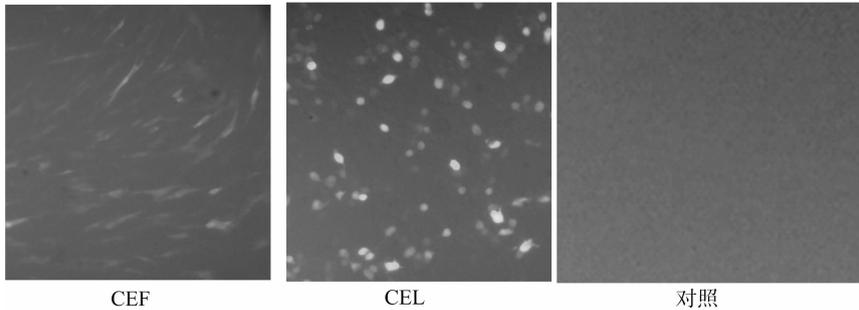


图4 昆虫细胞制备的 rAAAV 的体外细胞感染试验(100×)

进行应用,如新城疫病毒、禽流感病毒、马立克氏病毒等,这些病毒载体存在着一些缺点不能广泛应用,如操作繁琐、费用昂贵、难以大规模生产等^[12-14]。近年来,对腺联病毒的研究日趋成熟,作为一种良好的基因转移载体被广泛使用。禽腺联病毒由于无致病性,是一种良好的家禽基因转移载体,但其研究却相对滞后。

为提高 rAAV 的滴度,建立简便高效的 rAAV 生产方法,研究者们作出了不断努力,如建立表达 *Rep*、*VP* 基因的细胞系、利用 HSV-1 作为辅助病毒等,其中最为成功的是利用昆虫细胞系制备 rAAV。目前,制备 rAAAV 的方法仍然是传统的三质粒共转染法,笔者所在实验室首次尝试利用杆状病毒表达系统制备 rAAAV。

本研究对该系统制备的 rAAAV 进行一系列的鉴定,首先将昆虫细胞制备的重组病毒进行纯化,SDS-PAGE 结果显示,建立的滤膜过滤、氯仿抽提、PEG 沉淀的方法能有效纯化重组病毒;电镜结果可见重组病毒粒子,大小为 20 nm 左右,与 AAV 粒子大小、结构相似;Western blotting 结果揭示,重组病毒由 3 个结构蛋白组成,均能被 AAV VP3 特异识别,且大小与 AAV 的 3 个结构蛋白相近;体外细胞感染试验证明,rAAAV 具有与三质粒共转染法制备的 rAAAV 相似的生物学功能,能成功感染鸡成纤维细胞、鸡肝细胞等,并能介导 GFP 表达长达 2 周之久。以上结果说明,杆状病毒系统制备的 rAAAV 具有与野生病毒相似的理化特征,且能介导外源基因在鸡细胞中长期稳定表达,为 rAAAV 的进一步应用奠定了基础。

参考文献:

- [1] During M J. Adeno-associated virus as a gene delivery system[J]. *Advanced Drug Delivery Reviews*,1997,27:83-94.
- [2] Koeberl D D, Alexander I E, Halbert C L, et al. Persistent expression of human clotting factor IX from mouse liver after intravenous injection of adeno-associated virus vectors[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1997, 94: 1426-1431.
- [3] Afione S A, Conrad C K, Kearns W G, et al. In vivo model of adeno-associated virus persistence and rescue[J]. *Journal of Virology*, 1996, 70:3235-3241.
- [4] Harrison P T, Dalziel R G, Ditchfield N A, et al. Neuronal-specific and nerve growth factor-inducible expression directed by the preprotachykinin-A promoter delivered by an adeno-associated virus vector[J]. *Neuroscience*, 1999, 94:997-1003.
- [5] Rolling F, Shen W Y, Tabarias H, et al. Evaluation of adeno-associated virus-mediated gene transfer into the rat retina by clinical fluorescence photography[J]. *Human Gene Therapy*, 1999, 10(4): 641-648.
- [6] Xiao X A, Li J A, Samulski R J. Efficient long-term gene transfer into muscle tissue of immunocompetent mice by adeno-associated virus vector[J]. *Journal of Virology*, 1996, 70(11):8098-8108.
- [7] Yates V J, El-Mishad A M, McCormick K J, et al. Isolation and characterization of an avian adenovirus-associated virus[J]. *Infect Immun*, 1973(7):973-980.
- [8] Bossis I, Chiorin J A. Cloning of an avian adeno-associated virus (AAAV) and generation of recombinant AAAV particles[J]. *Journal of Virology*, 2003, 77(12):6799-6810.
- [9] Estevez C, Villegas P. Sequence analysis, viral rescue from infectious clones and generation of recombinant virions of the avian adeno-associated virus[J]. *Virus Research*, 2004, 105(2):195-208.
- [10] Urabe M, Ding C T, Kotin R M. Insect cells as a factory to produce adeno-associated virus type 2 vectors[J]. *Human Gene Therapy*, 2002, 13:1935-1943.
- [11] Wang A P, Wang Y J, Wu S, et al. Efficient production of an avian adeno-associated virus vector using insect cell/baculovirus expression system[J]. *Journal of Virological Methods*, 2017, 240: 26-31.
- [12] Farson D, Harding T C, Tao L, et al. Development and characterization of a cell line for large-scale, serum-free production of recombinant adeno-associated viral vectors[J]. *Journal of Gene Medicine*, 2004(6):1369-1381.
- [13] Durocher Y, Pham P L, St-Laurent G, et al. Scalable serum-free production of recombinant adeno-associated virus type 2 by transfection of 293 suspension cells[J]. *Journal of Virological Methods*, 2007, 144(1/2):32-40.
- [14] Lock M, Alvira M, Vandenberghe L H, et al. Rapid, simple, and versatile manufacturing of recombinant Adeno-Associated viral vectors at scale[J]. *Human Gene Therapy*, 2010, 21(10):1259-1271.