

禽腺病毒江苏株(JS)复制非必需片段的确定

何秀苗 秦爱建* 刘岳龙 金文杰

(扬州大学 江苏省动物预防医学重点实验室 扬州 225009)

摘 要 利用 PCR 方法从一株 I 群禽腺病毒的分离物(FAVI-JS)中扩增出其基因组的两个末端 L 片段和 r 片段、ITR 片段,并分别克隆进 pGEM-T easy 载体,然后将 L 片段、r 片段和 ITR 片段同时克隆进 pHC 粘粒载体中,获得质粒 pHC-FAVI-r-ITR-L,再在该克隆片段中插入增强型绿色荧光蛋白(eGFP)基因,获得转移质粒载体 pFAVI-eGFP。将 pFAVI-eGFP 转染已被该野生型 I 群禽腺病毒分离物感染了鸡胚肾细胞进行同源重组,通过无限稀释法筛选重组病毒,结果获得了表达增强型绿色荧光蛋白的重组 I 群禽腺病毒 rFAVI-eGFP,证明位于基因组右末端 r 片段和 ITR 片段之间的位点为病毒复制非必需区,为禽腺病毒的重组基因工程疫苗的研究奠定了基础。

关键词: I 群禽腺病毒,复制非必需片段,确定

中图分类号: Q78 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2004)03-0291-04

腺病毒(*Adenovirus*, Adv)最早发现于 1953 年,其基因组含有早期转录基因(E1-E4)和晚期转录基因(L1-L5),其中 E 区与病毒复制、病毒代谢调节有关,而 E3 区是腺病毒复制非必需区,位于病毒基因组 pVIII 基因和纤维蛋白基因之间,在该区域插入外源基因,不影响病毒复制而能使外源基因良好表达^[1]。此外,有研究表明,腺病毒还能够激发细胞免疫、体液免疫和黏膜免疫。各国研究学者充分利用了腺病毒的这些特点,目前已成功构建了一些人腺病毒^[2-4]和动物腺病毒载体^[5-11]并在临床上得到了成功应用。因此,腺病毒作为载体的研究更受到普遍的重视。

禽类腺病毒分为 3 个群, I 群禽腺病毒(*Fowl Adenovirus Group I*, FAVI)对所有家养禽都易感,与 II 群和 III 群禽腺病毒相比, I 群禽腺病毒作为病原的角色并不确定,但绝大多数分离物不致病^[12];在免疫学上, I 群禽腺病毒在感染后 8 周还可使鸡重复受到感染,诱发中和及沉淀两种抗体的二次应答,尽管有循环抗体存在,该群病毒仍能在鸡体内复制和排毒^[13],因此若以该病毒为载体表达外源基因,有可能在机体内诱发对靶基因较长时期的免疫反应。目前 Chiocca 等^[14]已完成了 I 群禽腺病毒 CELO 病毒全基因组的序列测定,为将该病毒发展成表达性载体打下了基础。Anne-Isabelle 等^[15]和 Achille 等^[16]已通过不同的系统筛选出了 CELO 病毒的复制非必需片段, Sheppard 等^[10]也对 I 群禽腺病毒 10 型进行

了复制非必需片段的筛选,并成功表达了 IBDV 的 VP2 基因。本研究以从鸡中分离的一株 I 群禽腺病毒(FAVI-JS)为材料,确定其复制非必需片段,以期构建更能适宜家禽免疫的可复制性病毒活载体,研制基因工程疫苗,将为禽类重要传染病的控制发挥重要作用。

1 材料和方法

1.1 材料

FAVI 江苏分离株(FAVI-JS)由作者分离鉴定(另文发表);SPF 鸡胚种蛋购自山东无特定病原鸡实验种鸡场。细菌培养所用的胰蛋白胨和酵母提取物为 OXOID 公司产品;鸡胚肾细胞(CEK)生长所需的基础培养基 DMEM 购自 Gibco 公司,新生牛血清为兰州民海生物工程公司产品。pHC 粘粒载体和宿主菌 DH5 α 由本室保存。pGEM-T easy 载体和 T4 DNA 连接酶购自 Promega 公司;Taq 酶购自上海生工生物工程服务有限公司;限制性内切酶 EcoRI、SalI、NotI、SpeI、XbaI 等购自 TaKaRa 公司;琼脂糖凝胶回收试剂盒、质粒纯化试剂盒、转染试剂 Lipofectin 均为 Gibco 公司产品。其它试剂均为国产或进口分析纯试剂。

1.2 方法

1.2.1 FAVI-JS 的扩增和病毒 DNA 的提取 将病毒原液进行 100 倍稀释后接种 9 日龄 SPF 鸡胚,37 $^{\circ}$ C 孵化 6d 后取尿囊液,做适当处理后负染,观察病毒

基金项目: 国家 863 计划(2002AA245051)江苏省十五科技攻关项目(BE2001619)

* 通讯作者。E-mail: aijian@yzu.edu.cn

作者简介: 何秀苗(1975-),女,广西东兰人,博士研究生,研究方向为禽畜病原体分子生物学。E-mail: xiumiaohe0839@sina.com.cn

收稿日期: 2003-08-28, 修回日期: 2004-01-08

形态,然后取尿囊液用蛋白酶 K 消化,参照文献 [17] 提取病毒基因组 DNA 备用。

1.2.2 引物设计:根据已发表的 FAVI 病毒全基因组序列,设计了 3 对引物,它们分别是 PL1:5'-GGGGCGCCGCGATGATGTATAATAACCT-3';PL2:5'-GGGTCTAGACTCAC-GCGACATGACTGTCT-3';Pr1:5'-GCGTCTAGACCAGAACCATTCTCAGCCG-3';Pr2:5'-GCGGAATTCGTACCGGACTGTTGTCCGA-3';PITR1:5'-GCGGAATTCACACACGGACAACCTCAAAG-3';PITR2:5'-GCGGTTCGACGATGATGTATAATAACCTC-3'。分别扩增 I 群腺病毒基因组左末端 L 片段、右末端 r 片段和右 ITR 片段。上述引物均由 TaKaRa 公司合成。

1.2.3 PCR 扩增:取 0.1 μ g 的病毒 DNA 进行 PCR 扩增,采用 50 μ L 的 PCR 体系:DNA 0.1 μ g,10 \times PCR buffer 5 μ L,25mmol/L MgCl₂ 3 μ L,10mmol/L dNTP 1 μ L,上游引物和下游引物各 25pmol,Taq 酶 0.5U,加灭菌超纯水至 50 μ L,并按以下程序进行:94 $^{\circ}$ C 5min;94 $^{\circ}$ C 1min,56 $^{\circ}$ C 1min,72 $^{\circ}$ C 2min,30 个循环;72 $^{\circ}$ C 10min 4 $^{\circ}$ C 保存。

1.2.4 PCR 产物的回收、连接和测序:将 PCR 产物通过 0.8% 琼脂糖凝胶电泳,切下目的片段,并用琼脂糖凝胶回收试剂盒回收纯化,取回收产物按 3:1 的比例与 pGEM-T easy 载体于 4 $^{\circ}$ C 连接 8h 以上,转化 DH5 α 感受态细菌,通过 X-Gal 板筛选白斑,酶切鉴定,3 个片段的阳性质粒 pGEM-T-L、pGEM-T-r、pGEM-T-ITR 用于下一步的克隆并送上海生工生物工程技术有限公司测序。

1.2.5 含 eGFP 基因 FAVI-JS 转移质粒载体的构建:首先将 pGEM-T-r 用 EcoR I、Spe I 酶切,回收 2kb 的 r 片段,克隆进已用相应酶酶切的 pHC 载体中,然后再将 pGEM-T-ITR 中的 ITR 片段以 EcoR I、Sal I 插入到已含有 r 片段的 pHC-FAVI-r 载体中,获得载体 pHC-FAVI-r-ITR,在该载体的 EcoR I 位点插入含 CMV 启动子和 SV40 polyA 的 eGFP 表达盒,获

得含有报告基因的 pHC-FAVI-r-ITR-eGFP 质粒载体,为了利于细胞内的同源重组,最后还在 pHC-FAVI-r-ITR-eGFP 插入 FAVI-JS 的 L 片段,获得的转移质粒载体命名为 pFAVI-eGFP。

1.2.6 含 eGFP 基因 FAVI-JS 转移质粒载体的转染:在 60mm 培养皿中培养原代 CEK 至形成 80% 单层,以 100 个 TCID₅₀wt-FAVI-JS 感染 CEK,37 $^{\circ}$ C 作用 2h,同时在 2 个 Eppendorf 管中各加入 100 μ L 无血清的 DMEM,然后分别加入 7~8 μ L Lipofectin 和 1.5~4 μ g 的 pFAVI-eGFP 质粒 DNA,置室温 45min,将 2 管混合,室温作用 15min,加入 800 μ L 无血清的 DMEM,轻轻将此转染混合液转移到已感染 FAVI-JS 的 CEK 上,在 37 $^{\circ}$ C,5% CO₂ 作用 6h,吸去转染液,加入含 8% 小牛血清的 DMEM,37 $^{\circ}$ C 培养 2~3d,每天观察荧光直至出现重组病毒荧光斑。

1.2.7 含 eGFP 基因重组 FAVI-JS 的筛选和传代:在出现荧光的培养皿中覆盖营养琼脂,待琼脂凝固后翻转培养皿,37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 继续培养 24~48h。将细胞核中出现荧光的细胞及细胞集落在荧光显微镜下作好标记,然后用吸管将其吸出,置于 1mL 细胞培养维持液中,冻融 3 次后,取上清,以不同的稀释倍数感染 24 孔细胞培养板上的 CEK,待出现荧光后,再进行荧光挑斑。

2 结果

2.1 FAVI-JS 在尿囊液中的繁殖

尿囊液经过适当处理后,进行负染,在电镜下看到了腺病毒样颗粒,证实 FAVI-JS 在鸡胚中有效扩增(另文发表)。

2.2 PCR 结果

按上述 PCR 引物和扩增条件,均扩增出了相应的目的片段,即 2kb 的 L 片段,2kb 的 r 片段和 1.5kb 的 ITR 片段,与预期的目的片段大小相符(图 1)。

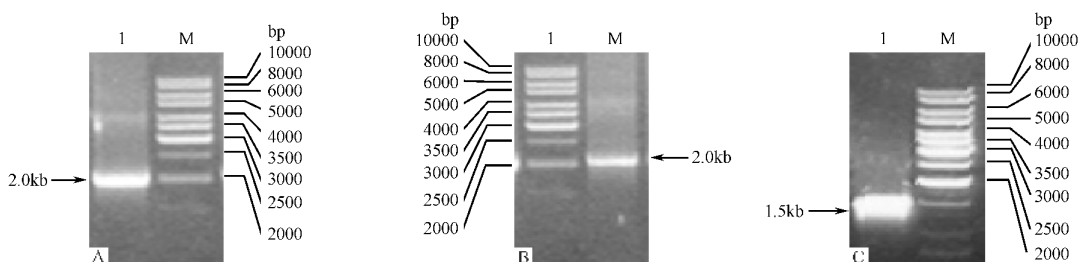


图 1 (A) FAVI-JS 左末端片段的扩增结果电泳图 (B) FAVI-JS 右末端片段的扩增结果电泳图; (C) FAVI-JS 右末端含 ITR 片段的扩增结果电泳图

将上述 PCR 产物克隆进 pGEM-T easy 载体,酶切鉴定证实获得 pGEM-T-L、pGEM-T-r、pGEM-T-ITR 3 种阳性克隆,送上海生工生物工程技术服务有限公司测序,将所获得的 3 个片段与 GenBank 上发表的 CELO 病毒全基因组的相应序列比较,结果各片段间均显示高度同源性,仅部分碱基发生改变。

2.3 含 eGFP 基因 FAVI-JS 转移质粒载体的构建

通过 *Eco*R I、*Spe* I、*Sal* I、*Not* I 等酶切鉴定,证实 L 片段、r 片段和 ITR 片段均已成功克隆到 pHC 粘粒载体中,其中 L 片段和 ITR 片段中 ITR 的方向与它们在基因组中的方向一样,在 r 片段和 ITR 片段之间的缺失部分插入了含有 CMV 启动子和 SV40 polyA 的 eGFP 基因,获得了转移质粒载体 pFAVI-eGFP。

2.4 含 eGFP 基因重组 FAVI-JS 的构建和纯化

含有 Lipofectin 的转染混合物在 CEK 上作用 6h 后换上细胞生长液,3h 后即能观察到荧光蛋白的表达(图 2-A)。经荧光斑的筛选纯化,获得了较纯的含有 eGFP 的重组 I 群禽腺病毒 rFAVI-eGFP,所获得的重组病毒荧光斑如图 2-B、C 所示。随着病毒的纯化,该病毒荧光斑更加明显。

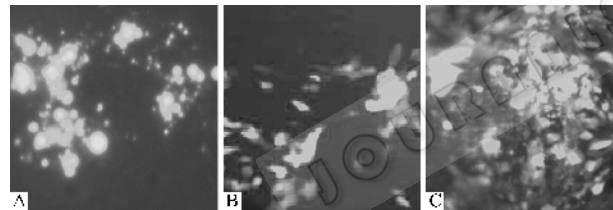


图 2 (A) pFAVI-eGFP 转染 CEK;(B)第二代 rFAVI-eGFP 病毒在鸡胚肾细胞上的荧光 (C)第四代 rFAVI-eGFP 病毒在鸡胚肾细胞上的荧光

Fig. 2 (A) CEK was transfected by pFAVI-eGFP;(B) The second passage of rFAVI-eGFP in CEK (C) The forth passage of rFAVI-eGFP in CEK

3 讨论

本研究利用插入 FAVI-JS 核酸片段的转移质粒载体和野生病毒在鸡胚肾细胞内的同源重组,以增强绿色荧光蛋白基因(eGFP)为报告基因,直接通过荧光显微镜进行观察,最终确定了 FAVI-JS 的复制非必需片段,并通过荧光斑的纯化,获得表达 eGFP 的重组禽腺病毒,证实本研究所缺失的 2.6kb 的片段为该禽 I 型腺病毒(FAVI-JS)复制非必需区之一,是否还存在其他非必需区则有待于进一步的研究。该研究结果将为利用该病毒表达重要疫病的保护性抗原基因,研制基因工程疫苗奠定了基础。

目前构建重组腺病毒载体的方法主要有两种,即体外直接连接(Direct ligation *in vitro*)或体内同源重组(*In vivo* homologous recombination)。但这些方法均需在体外操作病毒基因组,难度较高。本研究则在这些方法的基础上,利用野生病毒先感染细胞,然后再转入转移质粒载体,使带有同源序列的片段在细胞内进行同源重组,获得重组病毒,避免将病毒基因组在体外操作时碰到的困难。

腺病毒 DNA 复制起始于 DNA 分子的 5' 端,呈单向复制,当复制形成子代 dsDNA 后,被置换出的另一条亲代 DNA 单链通过末端重复序列互补产生锅柄样环形分子,并能够以此作为模板进一步合成出另一条子代 DNA 链,并由二者互补形成 dsDNA^[18]。为了便于细胞内同源重组,我们利用了腺病毒 DNA 复制的这一特点,将 PCR 扩增出的 FAVI-JS 基因组两末端连起来,使其形成一个病毒基因组的简缩体,在细胞内利用这两个末端启动同源重组,带动外源片段插入病毒基因组中相应位点,随基因组进行复制。

人腺病毒的 E3 区位于病毒基因组 pVIII 基因和纤维蛋白基因之间,是病毒复制的非必需区,但其编码产物在病毒逃逸机体免疫监视,确保病毒高效复制和病毒粒子释放方面具有重要的作用。但禽类腺病毒 E3 区功能明显减少甚至缺失 E3 区^[19]。Susanna 等^[14]的测序结果表明,FAVI 中 CELO 病毒没有明显的 E3 区,与人类 Ad E3 区相应的区域只有 230bp,而其所含有的 2 个阅读框所编码的蛋白质与鼠的和其它 E3 区没有同源性,因此,CELO 病毒的 E3 区不位于 pVIII 基因和纤维蛋白基因之间。Anne-Isabelle 等^[15]和 Achille 等^[16]的研究结果证实,在 CELO 病毒基因组右末端缺失 40065~43685bp 的 3600bp 的片段不影响病毒在 LMH 细胞系和鸡胚上的复制,这一片段所编码的蛋白质有可能参与了病毒对宿主免疫反应的逃逸与调节。因此缺失这一区域的重组病毒在体内的复制如何,还有待于进一步的研究,但这一区域仍然是 CELO 病毒基因组承载外源基因最好的区域,此外,Sheppard 等^[10]对 I 群禽腺病毒 10 型的研究也表明,在基因组的右末端存在着一个病毒复制非必需区,因此在我们所构建的转移质粒载体中,参照了 CELO 病毒和 10 型病毒的研究结果,外源基因插入了与其相应的区域,在满足一般性的需要外,我们缩小了缺失的区域,把右末端的 119bp 的 ITR 区向左推进到 1.5kb,这将有利于鸡胚肾细胞内的同源重组。

参 考 文 献

- [1] 殷 震, 刘景华. 动物病毒学. 第二版. 北京: 科学出版社, 1997.
- [2] Dan J V S, Charles Y C, Shoma K F, *et al.* A helper-independent adenovirus vector with E1, E3 and fiber deleted: structure and infectivity of fiberless particles. *J Virol*, 1999, **73**(2): 1601 - 1608.
- [3] Morsy M A, Gu M, Motzel S, *et al.* An adenoviral vector deleted for all viral encoding sequences results in enhanced safety and extended expression of a leptin transgene. *Pro Natl Sci USA*, 1998, **95**: 7866 - 7877.
- [4] Danthinne X Werth. New tool for the generation of E1-and/or E3-substituted adenoviral vectors. *Gene Ther*, 2000, **7**(1): 80 - 87.
- [5] Hammond J M, McCoy R J, Jansen E S, *et al.* Vaccination with a single dose of a recombinant porcine adenovirus expressing the classical swine fever virus gp55 (E2) gene protects pigs against classical swine fever. *Vaccine*, 2000, **18**: 1040 - 1050.
- [6] Klongkowski B, Gilardi-Hebensteit P, Hadchouel J, *et al.* A recombinant E1-deleted canine adenoviral vector capable of transduction and expression of a transgene in human-derived cells and in vivo. *Human Gene Ther*, 1997, **8**: 2103 - 2115.
- [7] Rasmussen U B, Benchaibi M, Meyer V, *et al.* Novel human gene transfer vectors: evaluation of wild-type and recombinant animal adenoviruses in human-derived cells. *Hum Gene Ther*, 1999, **10**: 2587 - 2599.
- [8] Reddy P S, Idamakanti N, Chen Y, *et al.* Replication-defective bovine adenovirus type 3 as an expression vector. *J Virol*, 1999, **73**: 9137 - 9144.
- [9] Reddy P S, Idamakanti N, Hyun B H, *et al.* Development of porcine adenovirus-3 as an expression vector. *J Gen Virol*, 1999, **80**: 563 - 570.
- [10] Sheppard M, Werner W, Tsatas E, *et al.* Fowl adenovirus recombinant expressing VP2 of infectious bursal disease virus induces protective immunity against bursal disease. *Archives of Virology*, 1998, **143**: 915 - 930.
- [11] Monteil M, Le Pottier M F, Ristov A A. Single inoculation of replication-defective adenovirus-vectored vaccines at birth in piglets with maternal antibodies induces high level of antibodies and protection against pseudorabies. *Vaccine*, 2000, **18**(17): 1738 - 1742.
- [12] Calnek B W, Witter R L. Adenovirus Infections. In: Calnek B W, *et al.* Disease of Poultry(10th ed) USA: Iowa State University Press, 1997, 607 - 642.
- [13] Yates V J, Rhee Y O, Fry D E. Serological response of chickens exposed to a type 1 avian adenovirus alone or in combination with the adeno-associated virus. *Avian Dis*, 1977, **21**: 408 - 414.
- [14] Chiocca S, Kurzbauer R, Schaffner G, *et al.* The complete DNA sequence and genomic organization of avian adenovirus CELO. *J Virol*, 1996, **70**: 2939 - 2949.
- [15] Anne-Isabelle M, Heike L, Mediyha S, *et al.* Mutational analysis of the avian adenovirus CELO, which provides a basis for delivery vectors. *J Virol*, 1999, **73**(2): 1399 - 1410.
- [16] Achille F, Nicolas E, Bernard D, *et al.* Construction of avian adenovirus CELO recombinants in cosmids. *J Virol*, 2001, **75**(11): 5288 - 5301.
- [17] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. 分子克隆实验指南. 金冬雁, 黎孟枫, 等译. 第二版. 北京: 科学出版社, 1996.
- [18] 侯云德. 分子病毒学. 北京: 学苑出版社, 1990.
- [19] 李茂祥, 章金刚, 殷 震. 人和动物腺病毒 E3 区的结构及其编码蛋白的功能. *生命科学*, 1999, **11**(6): 1 - 4.

Identification of Non-essential Region for Fowl Adenovirus Replication of JS Strain

HE Xiu-Miao QIN Ai-Jian* LIU Yue-Long JIN Wen-Jie

(Key Lab of Jiangsu Animal Preventive Medicine, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China)

Abstract: The non-essential region of a strain of fowl adenovirus group I virus (FAVI-JS) isolated from chicken was identified. The left terminal (L fragment) and right terminal (r fragment and ITR fragment) of virus genome were respectively amplified by PCR. PCR products were cloned into pGEM-T easy vector respectively. L fragment, ITR and r fragment were then cloned into pHC cosmid to construct pHC-FAVI-r-ITR-L. The enhanced green fluorescence protein (eGFP) coding sequence was cloned between r fragment and ITR fragment to construct transfer vector pFAVI-eGFP. Then the pFAVI-eGFP was transfected CEK infected with wt-FAVI-JS. The recombinant FAVI (rFAVI-eGFP) were recovered by homologous recombination in CEK between wt-FAVI-JS genome and pFAVI-eGFP DNA. rFAVI-eGFP was purified by serial dilution of the supernatant of transfected cells. These results showed that the region between r fragment and ITR fragment was dispensable for virus replication *in vitro*.

Key words: Fowl adenovirus group I, Identification, Replication non-essential region

Foundation item: Chinese National Programs for High Technology Research and Development (2002AA245051); Jiangsu " tenth five-year plan " Key Grant in Scientific Research (BE2001619)

* Corresponding author. E-mail: aijian@yzu.edu.cn

Received date: 08-28-2003