

重组禽腺联病毒介导的 miRNA 抑制传染性法氏囊病病毒在鸡胚内的复制

沈鹏鹏¹, 王永娟², 孙怀昌^{1*}, 张鑫宇¹, 夏晓莉¹

¹ 扬州大学兽医学院, 扬州 225009

² 江苏省畜牧兽医职业技术学院, 泰州 225300

摘要:【目的】在鸡胚水平上探索 VP1 和 VP2 基因特异 miRNA 抑制传染性法氏囊病病毒 (infectious bursal disease virus, IBDV) 复制的可行性。【方法与结果】将表达 VP1 基因特异 miRNA 重组载体 pAITR-RFPmiVP1 或 VP2 基因特异 miRNA 重组载体 pAITR-RFPmiVP2E 与禽腺联病毒 (avian adeno-associated virus, AAV) 包装载体 pcDNA-ARC 和腺病毒辅助载体 pHelper 共转染 AAV-293 细胞, 获得重组病毒 rAAAV-RFPmiVP1 和 rAAAV-RFPmiVP2E, 用同样方法获得不表达 miRNA 的 rAAAV-RFP 和表达对照 miRNA 的 rAAAV-RFPmiVP2con。电镜观察显示重组病毒具有典型的 AAV 颗粒形态; PCR 检测结果表明其基因组中含 miRNA 表达盒; 经 poly(A) 加尾 RT-PCR 检测证明重组病毒感染细胞能表达基因特异的 miRNA。分别将重组病毒经卵黄囊途径接种 8 日龄 SPF 鸡胚, 然后经绒毛尿囊膜途径用 Lukert 株 IBDV 攻毒, 收获鸡胚进行 IBDV 组织细胞半数感染剂量 (TCID₅₀) 测定。结果在攻毒后第 3 天, rAAAV-RFP 和 rAAAV-RFPmiVP2con 接种组的 IBDV TCID₅₀ 为 8.0 log₁₀, rAAAV-RFPmiVP1 和 rAAAV-RFPmiVP2E 接种组的 IBDV TCID₅₀ 分别下降到 1.0 和 1.5 log₁₀; 在攻毒后第 6 天, rAAAV-RFP 和 rAAAV-RFPmiVP2con 接种组的 IBDV TCID₅₀ 仍为 8.0 log₁₀, rAAAV-RFPmiVP1 和 rAAAV-RFPmiVP2E 接种组的 TCID₅₀ 分别下降到 0.8 和 2.0 log₁₀。【结论】rAAAV 是有效的 miRNA 鸡胚导入载体, 表达的 VP1 和 VP2 基因特异 miRNA 能有效阻断 IBDV 复制。

关键词: 重组禽腺联病毒, miRNA, 鸡胚导入, 传染性法氏囊病病毒抑制

中图分类号: Q392 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2011) 02-0256-06

传染性法氏囊病 (infectious bursal disease, IBD) 是鸡的一种高度接触性传染病, 严重危害世界养禽业的健康发展。虽然本病可以用疫苗接种进行预防, 但普遍使用的中等毒力活疫苗可引起鸡的法氏囊细胞凋亡, 加之变异毒株的频繁出现, 免疫效果呈明显下降趋势^[1-2]。传染性法氏囊病病毒 (infectious bursal disease virus, IBDV) 基因组由 A、B

两个双链 RNA 片段组成, 较小的 B 片段编码 97 kDa 具有 RNA 聚合酶和加帽酶活性的结构蛋白 VP1, 较大的 A 片段编码 110 kDa 前体蛋白, 由病毒蛋白水解酶 VP4 加工成结构蛋白 VP2 和 VP3^[3-4], 其中 VP2 是病毒的主要结构蛋白, 参与病毒的衣壳形成、进入细胞和诱导保护性免疫反应^[5]。

RNA 干扰 (RNA interference, RNAi) 是一种转

基金项目: 国家自然科学基金 (30571373)

* 通信作者。Tel: +86-514-87979335; Fax: +86-514-87972218; E-mail: sunh@yzu.edu.cn

作者简介: 沈鹏鹏 (1984-), 男, 河南焦作人, 硕士研究生, 主要从事转基因生物制药研究。

收稿日期: 2010-09-25; **修回日期:** 2010-10-26

录后基因沉默机制,其基本原理是进入细胞的双链 RNA 被 Dicer 酶裂解成 21 - 23 个核苷酸的小干扰 RNA (small interfering RNA, siRNA) 或微小 RNA (microRNA, miRNA), 识别并激活 RNA 诱导的沉默复合物(RNA-induced silencing complex, RISC), 活化的 RISC 在单链 siRNA 或 miRNA 引导下识别靶序列, 导致 mRNA 的降解或翻译阻滞^[6-7]。自 1994 年发现以来, RNAi 已经成为功能基因研究、肿瘤治疗和抗病毒感染的强有力手段^[8], 目前制约其临床应用的主要瓶颈是 siRNA 或 miRNA 的体内导入效率低。作为基因转移载体, 腺联病毒(adeno-associated virus, AAV) 具有无致病性、宿主范围广、可感染静止和分裂细胞以及外源基因表达稳定等优点, 已广泛应用于基因治疗和疫苗研究^[9], 最近又被用作 siRNA 的体内外递送载体^[10-11], 但作为禽体内的 siRNA 递送载体尚无报道。我们的前期研究结果显示, 以重组质粒或禽腺联病毒(avian adeno-associated virus, AAV) 载体将针对 VP1 或 VP2 基因的 miRNA 导入禽源细胞后, 能有效抑制同源和异源株 IBDV 的复制^[11-12]。为了进一步探索该策略体内应用的可行性, 本研究用表达 VP1 和 VP2 基因特异 miRNA 的重组 AAV 接种鸡胚, 然后用同源株 IBDV 进行攻毒保护试验, 现将结果报告如下。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 细胞、鸡胚与病毒:含 Ad5 E1 基因的 AAV-293 细胞购自 Stratagene 公司; 鸡胚成纤维细胞系 DF-1 和 Lurkert 株 IBDV 由扬州大学兽医学院秦爱建教授提供; SPF 鸡胚购自山东实验种鸡厂。

1.1.2 质粒与菌种:表达 YZ-1 株 AAV Rep 和 Cap 基因 (GenBank: GQ368252.1) 的包装质粒 pcDNA-ARC 由本室构建^[13]; 含 Ad5 E2A、E4 和 VA 基因的辅助质粒 pHelper 来自 Stratagene 公司; 含 IBDV VP1 基因特异 miRNA 表达盒的 AAV 转移载体 pAITR-RFPmiVP1、VP2 基因特异 miRNA 表达盒的转移载体 pAITR-RFPmiVP2E、对照 miRNA 表达盒的转移载体 pAITR-RFPmiVP2con 和不含 miRNA 表达盒的空载体 pAITR-RFP 由本实验室构建, 这些转移载体及其构建的重组病毒中均含红色荧光蛋白 (RFP) 报告基因^[11]; DH5 α 大肠杆菌感受态细胞由本实验室保存。

1.1.3 主要试剂: microRNA purification kit 购自 Norgen Biotel Corporation; poly (A) polymerase 购自 New England Biolabs; DMEM 培养基购自美国 GIBCO 公司; 胎牛血清 (FCS) 购自 HyClone 公司; RevertAid™ MMLV Reverse Transcriptase 购自 Fermentas Life Sciences; 其它试剂为国产分析纯级。

1.2 重组病毒制备

将 IBDV 基因特异 miRNA 表达 AAV 转移载体 pAITR-RFPmiVP1 或 pAITR-RFPmiVP2E、对照 miRNA 表达转移载体 pAITR-RFPmiVP2con、空载体 pAITR-RFP 与 AAV 包装载体 pcDNA-ARC 和腺病毒辅助载体 pHelper 组成三质粒转染系统, 用磷酸钙沉淀法^[11]共转染 AAV-293 细胞。转染后 72 h 收获细胞, 在 -20℃ 乙醇浴中反复冻融 4 次, 12000 × g 离心 10 min, 收集的上清即为重组病毒悬液。rAAV 的浓缩与纯化按文献报道^[11]的方法进行, 将获得的 10000 倍浓缩病毒液于 -20℃ 保存备用。

1.3 重组病毒电镜观察

用移液器直接将 50 μ L 纯化 rAAV 滴在有支持膜的铜网上, 10 min 后用滤纸吸去多余液体, 用 3% 磷钨酸 (pH6.0) 染色 2 - 3 min 后, 立即进行透射电镜观察。

1.4 重组病毒中 miRNA 表达盒的 PCR 检测

重组病毒 DNA 的提取参照文献报道^[11]的方法进行。根据 AAV 转移载体中 miRNA 表达盒上、下游序列设计一对引物, 序列分别为: 5'-TCCCTCGACCTGCAGCCCAAGCTTGC GGCCGCGACA ACACAAGCATCGAGCCC-3' 和 5'-CCGATTCATTAAT GCAGCGGATCCATCGATAAAAAAGCTTACCGT-3'。50 μ L PCR 反应体系为: 5 μ L 10 × 缓冲液, 2 μ L 重组病毒核酸, 15 pmol 正、反向引物, 5 U Taq DNA Polymerase。30 次循环 PCR 程序为: 94℃/45 s (第一次循环为 4 min), 69℃/45 s, 72℃/1 min (最后一次循环为 10 min)。同时设空载体 pRFPRNAiC 阴性对照和 miRNA 表达载体 pRFPRNAiVP2E 阳性对照。反应结束后, 取 5 μ L 扩增产物进行 0.8% 琼脂糖凝胶电泳分析。

1.5 重组病毒感染性滴度测定

将 DF-1 细胞按 1×10^4 细胞/孔的密度接种 96 孔培养板, 37℃、5% CO₂ 培养过夜后, 用含 2% FCS 的 DMEM 将纯化 rAAV 做连续倍比稀释, 每孔细胞接种 50 μ L 病毒稀释液, 37℃、5% CO₂ 孵育 2 h,

每孔补加 50 μL 含 10% FCS 和 10 mM 丁酸钠的 DMEM。37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 孵育 48 h 后,在荧光显微镜下计数各孔的 RFP 阳性细胞数。由于转移载体及其制备的 rAAAV 中含 RFP 报告基因,因此可根据感染细胞培养中的 RFP 阳性细胞数判定 rAAAV 的转导单位(transduction unit, TU)也即感染性病毒粒子的数量,计算公式为 $\text{TU}/\text{mL} = \text{RFP 阳性细胞数} \times \text{稀释倍数}$ 。

1.6 poly(A)加尾 RT-PCR 检测 miRNA 表达

将 DF-1 细胞接种 35 mm 培养皿,用不同的 rAAAV 感染,感染后 48 h 收获细胞,按照 microRNA 纯化试剂盒说明书提取 RNA。检测 miRNA 表达的 poly(A)加尾 RT-PCR 按文献报道^[14]的方法进行,50 μL 加尾反应体系包括:1 μg RNA,20 U poly(A) polymerase,5 μL 10 mmol/L ATP,20 U RNase inhibitor。反应条件为 37 $^{\circ}\text{C}$ 、1 h。反应产物经酚-氯仿抽提和乙醇沉淀后进行反转录,25 μL 反应体系包括:2 μg 加尾 RNA,200 U RevertAidTM MMLV Reverse Transcriptase,1 μg oligo(dT)₂₆ 引物。转录产物经 Tris-酚-氯仿抽提和乙醇沉淀后,以 miRNA 上游引物和通用下游引物(5'-CGAATTCTAGAGCTCGAGGCAGG-3')进行 PCR 扩增。40 次循环的 PCR 程序为:95 $^{\circ}\text{C}$ /15 s(第一次循环为 10 min),50 $^{\circ}\text{C}$ /30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ /30 s(最后一次循环为 10 min)。反应结束后,取 5 μL 扩增产物进行 2.0% 琼脂糖凝胶电泳分析。

1.7 鸡胚病毒感染试验

以 5×10^7 TU/胚的剂量,分别将重组病毒 rAAAV-RFPmiVP1、rAAAV-RFPmiVP2E、rAAAV-RFPmiVP2con 和 rAAAV-RFP 经卵黄囊接种 8 日龄 SPF 鸡胚,每组 6 个鸡胚。重组病毒感染两天后,以 1000 TU rAAAV/1 个 TCID_{50} 的比例经绒毛尿囊膜接种 Lukert 株 IBDV。在感染后 3 天和 6 天,每组分别收获 3 个感染鸡胚绒毛尿囊膜,剪碎后加入 500 μL PBS,于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 乙醇浴中反复冻融 4 次,12000 \times g 离心 10 min 后,收集上清液进行 IBDV 毒价检测。

1.8 IBDV TCID_{50} 检测

用 DMEM 基础培养基将上述离心上清液作连续 10 稀释,分别接种 96 孔培养板中长成单层的 DF-1 细胞,100 μL /孔,每稀释度设 8 孔重复,同时设未感染对照。37 $^{\circ}\text{C}$ 吸附 2 h 后,弃去病毒液,细胞用 DMEM 洗 1 次,加入含 1% FCS 的维持液,继续

培养 5 天后弃上清,根据出现病变的最高稀释度以 Karber 法^[20] 计算病毒的 TCID_{50} 。

2 结果

2.1 重组病毒电镜观察

在电子显微镜下,纯化的 rAAAV 呈典型的 AAV 颗粒形态,直径约为 20 nm,包括实心 and 空心两种颗粒,rAAAV-RFPmiVP2E 的电镜照片如图 1 所示。

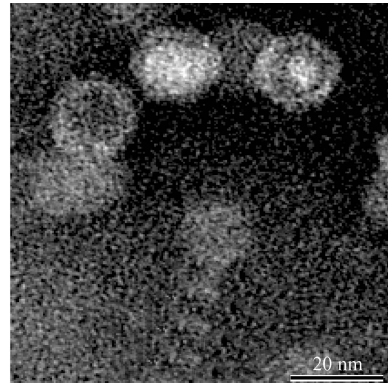


图 1 rAAAV-RFPmiVP2E 的电镜照片

Fig. 1 Electron photograph of rAAAV-RFPmiVP2E (65000x).

2.2 重组病毒中 miRNA 表达盒检测

为了排除 rAAAV 中因重组质粒污染导致的 PCR 检测假阳性,在 PCR 检测前先用 DNase I 消化 rAAAV 病毒液,然后以纯化的重组病毒核酸为模板,用 miRNA 表达盒上、下游引物进行 PCR 扩增。琼脂糖凝胶电泳分析结果显示,从 rAAAV-RFPmiVP1、rAAAV-RFPmiVP2E 和 rAAAV-RFPmiVP2con 中均能扩增出预期的约 1 kb 特异条带,而从 rAAAV-RFP 中未能扩增出相应的条带(图 2)。

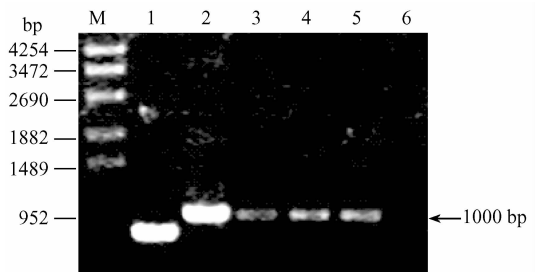


图 2 rAAAV 中 miRNA 表达盒的 PCR 检测

Fig. 2 PCR detection of miRNA expression cassettes in rAAAV. M. Lambda DNA/Eco1301 marker; 1. pAITR-RFP as the negative control; 2. pAITR-RFPmiVP2E as the positive control; 3. rAAAV-RFPmiVP2E; 4. rAAAV-RFPmiVP1; 5. rAAAV-RFPmiVP2con; 6. rAAAV-RFP.

2.3 重组病毒感染性滴度

分别用纯化的 rAAAV 感染 DF-1 细胞,在感染后 48 h,在荧光显微镜下可见典型的红色荧光阳性细胞(图 3)。根据每孔中荧光阳性细胞数计算结果,纯化、浓缩后的 rAAAV-RFPmiVP1、rAAAV-RFPmiVP2E 和 rAAAV-RFPmiVP2con 的感染滴度分别为 6×10^8 TU/mL, rAAAV-RFP 的感染性滴度为 7×10^8 TU/mL。

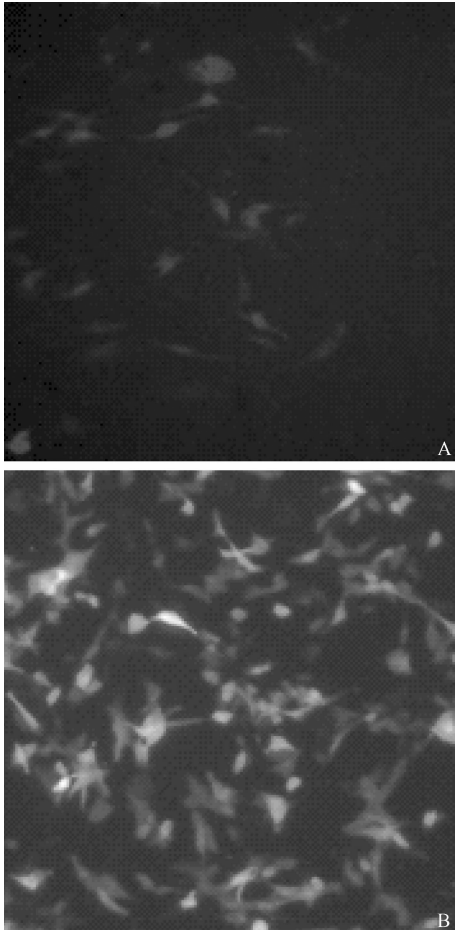


图 3 rAAAV-RFPmiVP2E 感染细胞的荧光显微镜观察

Fig. 3 Fluorescent microscopy of rAAAV-RFPmiVP2E-infected DF-1 cells ($100 \times$). A. 24 h; B. 48 h

2.4 miRNA 表达检测

分别用表达 IBDV 基因特异 miRNA 的重组病毒 rAAAV-RFPmiVP1 和 rAAAV-RFPmiVP2E、表达对照 miRNA 的重组病毒 rAAAV-RFPmiVP2con 以及不表达 miRNA 的重组病毒 rAAAV-RFP 转导 DF-1 细胞,在感染后 48 h 收获细胞和提取 RNA,用 poly (A) 加尾 RT-PCR 检测 miRNA 表达。琼脂糖凝胶电泳分析结果显示,从 rAAAV-RFPmiVP1、rAAAV-

RFPmiVP2E 和 rAAAV-RFPmiVP2con 感染细胞中可扩增出预期的约 120 bp 的条带,而从 rAAAV-RFP 转导细胞中未能扩增出相应的条带(图 4)。

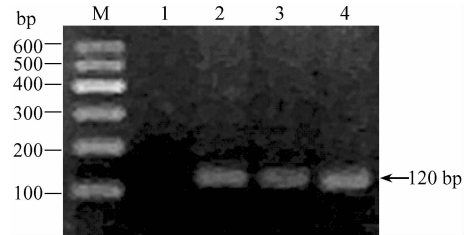


图 4 rAAAV 转导细胞中 miRNA 的表达检测

Fig. 4 Detection of miRNA expression in DF-1 cells transduced with rAAAVs. M. DNA molecular marker; 1. rAAAV-RFP-transduced cells; 2. rAAAV-RFPmiVP2con-transduced cells; 3. rAAAV-RFPmiVP1-transduced cells; 4. rAAAV-RFPmiVP2E-transduced cells.

2.5 鸡胚水平的 RNA 干扰 IBDV 复制

为了在鸡胚水平上探索用基因特异 miRNA 抑制 IBDV 复制的可行性,分别用表达 VP1 基因特异 miRNA 的 rAAAV-RFPmiVP1、表达 VP2 基因特异 miRNA 的 rAAAV-RFPmiVP2E、表达对照 miRNA 的 rAAAV-RFPmiVP2con 和不表达 miRNA 的 rAAAV-RFP 接种 SPF 鸡胚,然后用 IBDV 攻毒,分别在攻毒后第 3 天和第 6 天收获鸡胚尿囊膜进行 TCID₅₀ 测定。结果显示, rAAAV-RFP 接种组的 IBDV TCID₅₀ 为 8.0 log₁₀, rAAAV-RFPmiVP1 接种组的 IBDV TCID₅₀ 分别下降到 1.0 和 0.8 log₁₀, rAAAV-RFPmiVP2E 接种组的 IBDV TCID₅₀ 分别下降到 1.5 和 2.0 log₁₀, 而 rAAAV-RFPmiVP2con 接种组的 IBDV TCID₅₀ 无明显变化(图 5)。

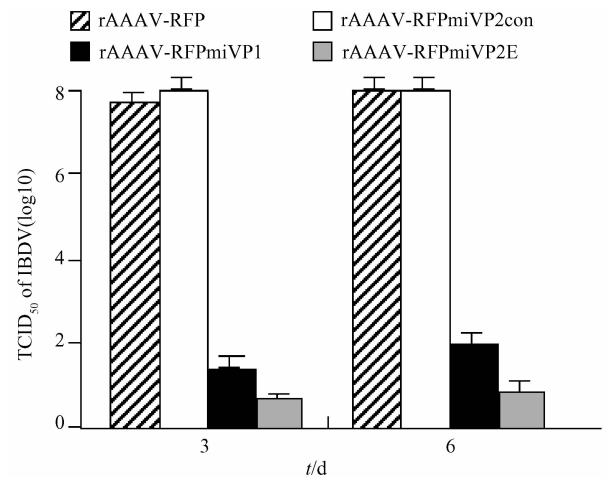


图 5 鸡胚水平的 RNA 干扰 IBDV 复制

Fig. 5 Inhibition of IBDV replication by gene-specific miRNAs in chicken embryos.

3 讨论

疫苗接种是预防 IBD 的重要手段,但由于 IBDV 频繁变异和疫苗本身的缺点,防疫效果不理想且有下降趋势^[1-2],很有必要研究防控 IBD 的新策略。RNAi 是从原虫到高等动植物普遍存在的先天性抗病毒机制^[6-7]。近年来的研究资料显示,用细胞转染、质粒表达或病毒载体导入的 siRNA 或 miRNA 对多种病毒感染具有显著的抑制作用,在抗病毒感染研究方面已经显示出巨大的应用前景^[8]。

我们的前期研究结果显示,以重组质粒或 AAV 载体将 VP1 或 VP2 基因特异 miRNA 导入禽源细胞,能显著抑制同源和异源株 IBDV 的复制^[11-12]。为了进一步探索 AAV 载体体内导入 miRNA 及其抑制 IBDV 复制的可行性,本研究用细胞共转染法获得了表达 VP1 基因特异 miRNA 的 rAAV-RFPmiVP、表达 VP2 基因特异 miRNA 的 rAAV-RFPmiVP2E、表达对照 miRNA 的 rAAV-RFPmiVP2con 和不表达 miRNA 的 rAAV-RFP。荧光显微镜观察和 RT-PCR 检测结果显示,这些重组病毒不仅能有效转导鸡胚细胞,而且能正确表达 miRNA(图 3 和图 4),提示可用于鸡体内 RNA 干扰 IBDV 复制试验。

鸡胚接种及攻毒保护试验显示, rAAV-RFPmiVP1 和 rAAV-RFPmiVP2E 接种组的 IBDV TCID₅₀ 较 rAAV-RFP(不表达 miRNA)和 rAAV-RFPmiVP2con(表达对照 miRNA)接种组均显著下降(图 5),不仅表明重组 AAV 能有效转导鸡胚细胞和表达目的 miRNA,而且说明其介导的 RNA 干扰 IBDV 复制作用具有序列特异性。这种抑制作用至少维持 6 天(试验结束),表明重组 AAV 介导的 RNA 干扰 IBDV 复制作用具有持久性。相比之下, rAAV-RFPmiVP1 介导的 RNA 干扰作用较 rAAV-RFPmiVP2E 更为明显和稳定,可能的原因有两个:一是 VP2 是 IBDV 的主要结构蛋白(约占衣壳蛋白的 50%),而 VP1 为次要结构蛋白^[4],两者转录水平的不同势必导致 miRNA 丰度的差异,因而相同水平的 miRNA 有可能导致 RNA 干扰作用的差异;二是 VP2 的抗原性易变,而 VP1 是相对保守的酶^[5],尽管本研究表达的 miRNA 是根据 Lukert 株 IBDV 基因序列设计,攻毒试验也用同源毒株进行,但该毒株已经体外反复传代,其 VP2 基因可能有所变

异,进而影响 RNA 干扰作用的发挥。尽管这些猜测有待用实验研究进一步证实,但对于用 RNA 干扰 IBDV 复制而言,至少在理论上 VP1 是更为适合的靶基因。

参考文献

- [1] Snyder DB. Changes in the field status of infectious bursal disease virus. *Avian Pathology*, 1990, 19:419-423.
- [2] Sharma JM, Kim IJ, Rautenschlein S, Yeh HY. Infectious bursal disease virus of chickens: pathogenesis and immunosuppression. *Developmental & Comparative Immunology*, 2000, 24:223-235.
- [3] Murphy FA, Fauquet CM, Bishop DH. Virus taxonomy, classification and nomenclature of viruses. Sixth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses (*Archive Virology Suppl10*). New York: Springer Verlag, 1995.
- [4] Boot HJ, ter-Huurne AH, Peeters BP. Generation of full-length cDNA of the two genomic dsRNA segments of infectious bursal disease virus. *Virological Methods*, 2000, 84:49-58.
- [5] Caston JR, Martinez JL, Lombardo E. C-terminus of infectious bursal disease virus major capsid protein VP2 is involved in definition of the T number for capsid assembly. *Journal of Virology*, 2001, 75:10815-10828.
- [6] Fire A, Xu S, Montgomery MK. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 1998, 391:806-811.
- [7] Meister G, Tuschl T. Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. *Nature*, 2004, 431:343-349.
- [8] Haasnoot PCJ, Cupac D, Berkhout B. Inhibition of virus replication by RNA interference. *Journal of Biomedical Science*, 2003, 10:607-616.
- [9] During MJ. Adeno-associated virus as a gene delivery system. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 1997, 27: 83-94.
- [10] Fechner H, Sipo I, Westermann D, Pinkert S, Wang X, Suckau L, Kurreck J, Zeichhardt H, Müller O, Vetter R, Erdmann V, Tschöpe C, Poller W. Cardiac-targeted RNA interference mediated by an AAV9 vector improves cardiac function in coxsackievirus B3 cardiomyopathy. *Journal of Molecular Medicine*, 2008, 86:987-997.
- [11] Wang Y, Sun H, Shen P, Zhang X, Xia X. Effective inhibition of infectious bursal disease virus replication by recombinant avian adeno-associated virus-delivered microRNAs. *Journal of General Virology*, 2009, 90 (Pt 6):1417-1422.

- [12] Wang Y, Sun H, Shen P, Zhang X, Xia X, Xia B. Effective inhibition of replication of infectious bursal disease virus by miRNAs delivered by vectors and targeting the VP2 gene. *Virological Methods*, 2010, 165 (2):127-132.
- [13] Wang AP, Sun HC, Wang JY, Wang YJ, Yuan WF. Recombinant avian adeno-associated virus-mediated oviduct-specific expression of recombinant human tissue kallikrein. *Poultry Science*, 2008, 87(4):777-782.
- [14] Ro S, Park CJ, Jin JL, Sanders KM, Yan WA. PCR-based method for detection and quantification of small RNAs. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2006, 351(3):756-763.

Inhibition of infectious bursal disease virus replication in chicken embryos by miRNAs delivered by recombinant avian adeno-associated viral vector

Pengpeng Shen¹, Yongjuan Wang², Huaichang Sun^{1*}, Xinyu Zhang¹, Xiaoli Xia¹

¹ College of Veterinary Medicine, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China

² Animal Husbandry and Veterinary Vocational & Technical College, Taizhou 225300, China

Abstract: [**Objective**]: We studied the inhibition of infectious bursal disease virus (IBDV) replication in chicken embryos by recombinant avian adeno-associated virus (AAAV)-delivered VP1- and VP2-specific microRNAs (miRNAs). [**Methods and Results**] We co-transfected AAV-293 cells with the VP1- or VP2 gene-specific miRNA expression vector pAitr-RFPmiVP1 or Aitr-RFPmiVP2E, AAAV packaging vector pcDNA-ARC and adenovirus helper vector pHelper, resulting in recombinant virus rAAAV-RFPmiVP1 or rAAAV-RFPmiVP2E. We also generated the recombinant viruses rAAAV-RFP (without miRNA expression cassette) and rAAAV-RFPmiVP2con (expressing control miRNA) using the same method as the control purpose. Electron microscopy showed that the recombinant viruses had a typical morphology of AAV. We confirmed the presence of miRNA expression cassette in the recombinant viral genomes by using PCR. Our poly (A)-tailed RT-PCR showed correct expression of the miRNAs in the rAAAV-transduced DF-1 cells. We inoculated the recombinant viruses individually into 8-day-old SPF chicken embryos and then challenged them using Lukert strain IBDV on day 2 after inoculation. Our IBDV titration assay showed that the 50% tissue culture infectious dose (TCID₅₀) of rAAAV-RFP- or rAAAV-RFPmiVP2con-inoculated group was 8.0 log₁₀, whereas the TCID₅₀ of rAAAV-RFPmiVP1-inoculated group decreased to 1.0 and 0.8 log₁₀ on day 3 and 6 after challenge, respectively. Similarly, the TCID₅₀ of rAAAV-RFPmiVP2E-inoculated group decreased to 1.5 and 2.0 log₁₀, respectively. [**Conclusion**]: These data suggest that rAAAV can transduce efficiently chicken embryos and the expressed VP1- and VP2-specific miRNAs can inhibit the replication of IBDV efficiently.

Keywords: recombinant avian adeno-associated virus, miRNAs, chicken embryo delivery, infectious bursal disease virus replication

(本文责编:张晓丽)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30571373)

* Corresponding author. Tel: +86-514-87979335; Fax: +86-514-87972218; E-mail: sunh@yzu.edu.cn

Received: 25 September 2010/Revised: 26 October 2010