

表达分泌型脑源性神经营养因子的腺相关病毒载体的构建及其表达的检测

李惠明¹, 裘玮¹, 王丰¹, 韦芳¹, 陈霞芳¹, 吴小兵², 黄倩¹

1 上海交通大学附属第一人民医院中心实验室, 上海 200080

2 中国疾病预防控制中心病毒病预防控制所, 北京 100050

摘要: 采用 PCR 和体外连接的方法构建了带有信号肽的脑源性神经营养因子(BDNF)的融合基因, 将此基因插入到腺相关病毒载体穿梭质粒 pSNAV, 然后用重组质粒 pSNAV-Ig-BDNF 转染包装细胞, 筛选出永久细胞株后, 用携带腺相关病毒 rep 及 cap 基因的单纯疱疹病毒超感染包装细胞, 成功包装出含有目的基因的一型血清型腺相关病毒。经 PCR 鉴定该病毒含有目的基因片段, 被该病毒感染的细胞裂解液经 Western blotting 证实有 BDNF 表达, 其培养液经 ELISA 检测证实含有高水平的 BDNF 蛋白。该病毒与小量的非复制型腺病毒 Ad-null 联合应用时, 其 BDNF 蛋白的表达水平显著提高。可弥补腺相关病毒起效慢、对细胞转导效率低的弱点, 为今后应用 AAV 作基因治疗提供了实验证据。

关键词: 腺相关病毒, 脑源性神经营养因子, 基因表达, 基因治疗

Construction and Expression of Recombinant Adeno-Associated Virus Expressing Brain-Derived Neurotrophic Factor

Huiming Li¹, Wei Qiu¹, Feng Wang¹, Fang Wei¹, Xiafang Chen¹, Xiaobing Wu², and Qian Huang¹

1 Central Laboratory, the First People's Hospital, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200080, China

2 National Institute for Viral Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 100050, China

Abstract: A fusion gene called Ig-BDNF, in which brain-derived neurotrophic factor cDNA fused to the 3' end of signal peptide of Ig coding sequence, was constructed by PCR, digested and subcloned into shuttle plasmid pSNAV to obtain a recombinant plasmid pSNAV-Ig-BDNF. Then the plasmid encoding fusion protein was transfected into 293 cell lines and the stably transfected clones were selected with neomycin. AAV1 containing Ig-BDNF fusion gene vectors were obtained by super-infection by Herpes virus. The resultant adeno-associated virus vectors AAV-Ig-BDNF were confirmed by PCR, Western blotting and a sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) after infection of 293 cell lines. The results indicated that AAV-Ig-BDNF contained the target gene, and infected cells and produced the fusion protein into the supernatant. The content of BDNF in medium per 5×10^4 cells over a 24 h incubation period reached 1000 pg/mL. With the help of non-replicative adenovirus during AAV-Ig-BDNF infection, the expression of BDNF increased 7~8 fold, and the enhancement of BDNF gene expression was observed in a concentration-dependent manner. These results suggested that a functional AAV-Ig-BDNF was successfully constructed and it offers basis for further study for gene therapy

Received: April 25, 2007; **Accepted:** June 4, 2007

Supported by: the National Science Foundation for Distinguished Young Scholars(No. 30428015) and Major Project of Chinese National Programs for Fundamental Research and Development(No.2004CB518800).

Corresponding author: Xiaobing Wu, Qian Huang. Tel: +86-21-632400904601; E-mail: qhuang@sjtu.edu.cn

国家自然科学基金杰出青年项目(No. 30428015)和国家 973 项目(No.2004CB518800)。

of neural degeneration diseases.

Keywords: rAAV, BDNF, gene expression, gene therapy

腺相关病毒(简称AAV)作为基因治疗载体的优势表现在: (1) AAV是作为腺病毒的伴随病毒发现的, 迄今尚未发现对人体致病。与腺病毒不同, AAV几乎不引起免疫反应; (2) 野生型AAV可定点整合至人的19号染色体的q13-qter^[1], 重组AAV又称rAAV虽不能整合至人的染色体内, 但仍然能够以核外DNA的形式较长时期存在, 避免了逆转录病毒随机插入染色体引起突变的危险, 并能长期稳定表达外源基因^[2]; (3) AAV的宿主范围很广, 可感染分裂期和非分裂期的多种细胞; (4) AAV具有较好的热稳定性、抗酸碱(pH 3.0~9.0)性以及抗有机溶剂处理的特点, 便于制备和储存。但是, 很多研究都表明, AAV对细胞的转导效率较低, 这在很大程度上限制了AAV的实际应用^[1-6]。

鉴于AAV是一种安全的载体系统, 以及BDNF在治疗神经损伤方面具有潜在应用前景^[7,8], 为了使BDNF能够应用到神经系统损伤修复的基因治疗中, 我们构建了带有信号肽的脑源性神经营养因子重组AAV载体。为了提高rAAV的转导效率, 我们尝试模仿AAV的裂解性生活周期或称产毒性感染, 采用少量腺病毒作为辅助病毒与rAAV联合使用, 以增加AAV细胞的转导效率, 为今后实际应用AAV作基因治疗提供实验证据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试剂

腺相关病毒的构建及包装采用本元正阳基因技术有限公司的系统, 穿梭质粒为 pSNAV; BDNF 表达质粒pCRII-BDNF由Eric M. shooter赠送^[9]。限制性内切酶, T4 连接酶为 TaKaRa 公司产品; Lipofectamine 2000 转染试剂盒购自 Invitrogen 公司, 胎牛血清及新生牛血清, DMEM、Opti-MEM I 和 DMEM 培养基购自 Gibco 公司。BDNF 的多克隆抗体(SC-546), 购自 SantaCruz 公司, HRP 标记的山羊抗兔二抗(DC03L)为 Oncogene 公司产品, 小鼠 BDNF 的 ELISA 检测试剂盒购自上海森雄科技实业有限公司。

1.1.2 细胞株及病毒

细胞株为人胚肾细胞 AD-293, 购自 Stratagen 公司, 采用含 10%小牛血清的 DMEM 培养基培养。非复制型腺病毒 Ad-null 由本元正阳基因技术有限公司提供毒种, 本实验室扩增并浓缩保存。

1.2 分泌型重组 rAAV 的构建与包装

1.2.1 含信号肽的 mBDNF 融合基因的构建

BDNF表达质粒pCRII-BDNF-Cmyc以CMV为启动子调控BDNF表达。为了使BDNF能够更好地发挥作用, 我们拟构建分泌型BDNF。为此我们以含有免疫球蛋白IgG信号肽序列的质粒pHOOK-2 为模板, 分别用引物 1: 5'-ggggtaccatggagacagacacactc-3'(下划线为 *Kpn* I 切点)和引物 2: 5'-gtaaggaaaag-gatggtcatggccggctgggccccagcata-3'(红线部分为与 *Pcr*-BDNF-Cmyc 互补的序列), 首先 PCR 扩增含免疫球蛋白信号肽序列以及 HA-tag 的 DNA 片段, 此产物长 133 bp。再以此产物作为 5'引物作第二轮 PCR, 3'引物顺序如下 gaagatctgaattcggcttgatccctac(下划线为 *Bgl* II 和 *EcoR* I 切点), 以 pCRII-BDNF-Cmyc 为模板, 扩增 3'端带有 h-Cmyc 多肽编码顺序的全长 BDNF 基因 cDNA。因此, 最终的 PCR 产物编码的蛋白其 5'端加入了免疫球蛋白信号肽和 HA 多肽, 中间为 BDNF, 3'端带有 h-Cmyc 多肽, 能自行穿过细胞膜分泌到细胞外, 并很容易被抗 HA 和 h-Cmyc 的抗体检测并分离、纯化。

上述 PCR 产物经限制性内切酶 *Kpn* I 和 *EcoR* I 消化后, 插入到腺相关病毒穿梭质粒 pSNAV 中, 得到重组质粒 pSNAV-Ig-HA-BDNF-Cmyc。该质粒经限制性内切酶酶切鉴定后, 采用本元正阳基因技术有限公司的 AAV 包装系统包装 rAAV。包装方法简述如下: 先用重组质粒 pSNAV-mBDNF 转染包装细胞, 筛选出永久细胞株后, 用携带腺相关病毒 rep 及 cap 基因的单纯疱疹病毒超感染包装细胞, 最后成功包装出含有目的基因的一型血清型腺相关病毒。

1.2.2 融合基因 Ig-HA-BDNF-Cmyc 蛋白表达的检测

穿梭质粒 pSNAV-Ig-HA-BDNF-Cmyc 表达的鉴定: 采用脂质体 Lipofectamine 2000 将穿梭质粒

pSNAV-Ig-HA-BDNF-Cmyc 转染入 AD-293 细胞, 转染方法如下: 于转染前一天将细胞接种在直径 6 cm 的细胞培养盘中, 转染当天达到 80%左右密度, 转染后 24 h, 改换 2%血清的培养基, 24 h 后收集上清, 并同时收集细胞。

rAAV1-BDNF表达的鉴定: 将 1×10^9 rAAV1-BDNF病毒颗粒加入培养在 24 孔板中的 1×10^5 细胞后, 于感染后 48 h收集细胞培养液和细胞。

然后分别采用 ELISA 和 Western blot 鉴定 BDNF 表达。Western blot 鉴定方法如下: 用蛋白抽提液 (Tris-HCl 5 mmol, pH 7.5, EDTA 5 mmol, NP-40 1%, PMSF 2 μ mol)抽提细胞总蛋白, 紫外分光光度计测定蛋白含量。采用 50 μ g 总蛋白作 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 电转移至硝酸纤维素膜上。用抗 BDNF 的多克隆抗体(Santa Cruz 公司)及相应的二抗孵育后, 采用 ECL 试剂盒(Roche 公司)在暗室中作自显影。

采用上海森雄科技实业有限公司进口分装的 BDNF ELISA 检测试剂盒测定培养液中 BDNF 的含量, 以未感染病毒的 AD293 细胞的培养液作为阴性对照。

1.3 非复制型腺病毒提高腺相关病毒的转导效率

将AD293 细胞按照 1×10^5 /孔铺于 24 孔板中, 在 1mL培养液中培养过夜。24 h后将 1×10^9 rAAV1-BDNF病毒颗粒加入 1×10^5 细胞后, 同时加入不同剂量的非复制型腺病毒 Ad-null, 与单独加 rAAV1-BDNF作为对照, 于 37 $^{\circ}$ C 含 5% CO_2 的培养箱中培养 24 h, 然后更换为 2%血清的新鲜培养基,

继续培养 24 h。同时收集各孔的上清。采用上海森雄科技实业有限公司的BDNF ELISA 检测试剂盒测定培养液中BDNF的含量。

2 结果

2.1 重组质粒 pSNAV-Ig-HA-BDNF-Cmyc 的酶切与 PCR 鉴定结果

经两次 PCR 获得的 BDNF 表达质粒 pSNAV-Ig-HA-BDNF-Cmyc 经限制性内切酶 *Kpn* I 和 *Eco*R I 酶切消化后获得 7015 bp 和 750 bp 左右两个片段, 符合酶切后理论片段大小, PCR 扩增能得到特异性的 909 bp 左右的条带。

2.2 重组目的蛋白表达的鉴定

携带目的基因的穿梭质粒 pSNAV-Ig-HA-BDNF-Cmyc 在脂质体 Lipofectamine 2000 辅助下转染 AD-293 细胞后, 以及纯化的 rAAV1-BDNF 病毒颗粒感染 AD-293 细胞后, Western blot 检测, 二者在约 13 kD 和 17~28 kD 之间处均出现两条蛋白条带, 与文献报告的完整的 BDNF 蛋白含 113 氨基酸, 分子量约 13 kD,前体含 252 个氨基酸基本一致。进一步经抗 HA tag 的抗体检测也为阳性。为了确定细胞能被感染及感染效率, 我们同时以 rAAV2-EGFP 作为对照。

我们还进一步采用 ELISA 方法检测经 rAAV1-BDNF 感染的 AD293 细胞培养液中 BDNF 含量, 与阴性对照相比, 被感染的细胞培养液中 BDNF 的含量明显增加, 在 5×10^4 被感染细胞中 24 h BDNF 的分泌量达 1000 pg/mL。

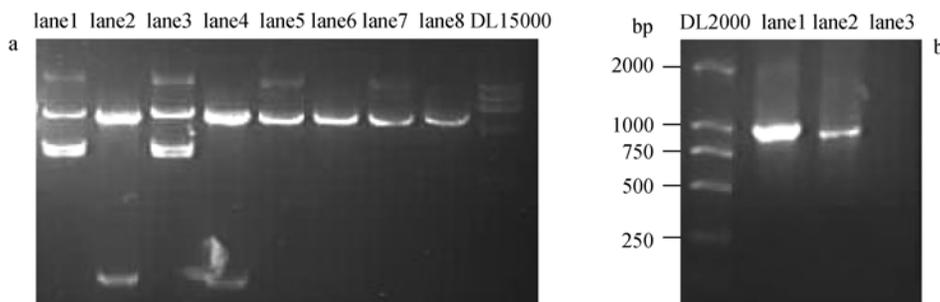


图 1 重组质粒 pSNAV-Ig-HA-BDNF-cmyc 酶切鉴定图谱(a)和 PCR 产物电泳图谱(b)

Fig. 1 Electrophoresis of clones transformed with recombinant plasmid pSNAV-Ig-HA-BDNF-Cmyc and digested with different restriction enzymes(a)and PCR product of BDNF(b)

a: the map of recombinant plasmid digested by restriction enzymes. 1: clone1 digested by *hind* III; 2: digested by *Kpn* I and *Eco*R I; 3: clone2 digested by *hind* III; 4: clone2 digested by *Kpn* I and *Eco*R I; 5,6: negative plasmid digested by *Hind* III or *Kpn* I and *Eco*R I respectively; 7,8: control shuttle plasmid digested by *Hind* III or *Kpn* I and *Eco*R I respectively; 9: DNA marker DL15000

b: PCR analysis of recombinant plasmid pSNAV-Ig-HA-BDNF-cmyc and the packaged adeno-associated virus rAAV1-BDNF. Lane1: PCR product of pSNAV-Ig-HA-BDNF-cmyc; lane 2: PCR product of rAAV1-BDNF; lane 3: PCR product of negative control shuttle plasmid pSNAV

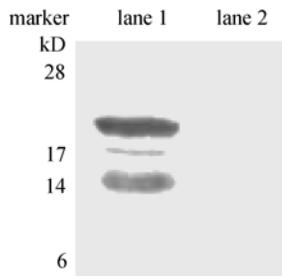


图2 包装的腺相关病毒感染细胞后 Western blot 分析
Fig. 2 Western blot of BDNF expression in 293 cells infected with rAAV1-BDNF or rAAV2-EGFP

Protein marker; 1: the 293 cell lines infected with rAAV1-BDNF showed positive signal with MW 13kD or 17~28 kD; 2: the 293 cell lines infected with rAAV2-EGFP showed no signal

2.3 非复制型腺病毒 Ad-null 显著提高 rAAV-BDNF 的表达和分泌量

将AD293 细胞按每孔 1×10^5 接种在 24 孔细胞培养板中, 置 37 $^{\circ}\text{C}$ 5% CO_2 培养箱中培养过夜。以 1×10^9 rAAV-BDNF 单独或联合不同剂量的非复制型腺病毒感染细胞, 感染后继续培养 24 h 后, 更换为仅含 2% 胎牛血清的培养基, 24 h 后收集细胞培养液检测上清中 BDNF 的分泌量, 每一种条件重复 3 孔。结果显示随着所加入的腺病毒的数量增加, 分泌到培养液中的 BDNF 的含量逐渐增加, 与单独用 rAAV-BDNF 病毒感染的细胞比较, 分泌量提高了 7~8 倍左右, 并显示明显的剂量效应关系。结果见表 1 和图 3。

表 1 小剂量腺病毒增强腺相关病毒感染细胞后目的蛋白 BDNF 的分泌(培养基中 BDNF 的分泌量)

Table 1 Improved secretion of rAAV1-BDNF enhanced by Ad-null

Ad-null/MOI	0	0.01	0.1	1	10
AAV-BDNF/(ng/mL)	0.931	2.531	5.234	5.925	7.537

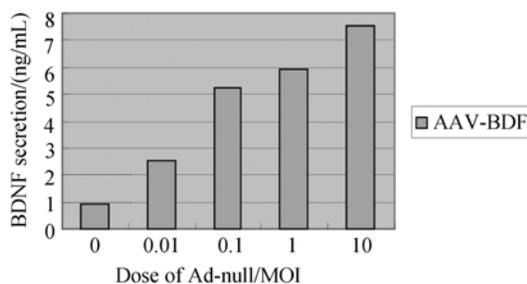


图3 Ad-null 增强 rAAV1-BDNF 感染 Ad293 细胞后的分泌
Fig. 3 Improved secretion of rAAV1-BDNF enhanced by Ad-null

The secretion of target protein BDNF in mediums of 293 cell lines was enhanced significantly combined with low dose Ad-null after rAAV1-BDNF infection; the enhancement of protein expression was observed in a concentration-dependent manner

3 讨论

腺相关病毒是一种微小病毒, 直径大约 20~26 nm^[10], 至今尚未发现该病毒是任何疾病的致病因素。根据 AAV 基因组序列和凝血特征不同, 分不同的血清型, 目前已发现有八种血清型, 称 AAV1-8, 不同的血清型可能通过不同的受体感染宿主细胞。AAV1 和 AAV2 是基因治疗中最常用的血清型^[11], 很多实验表明 AAV1 在体内感染细胞的效率较高, 虽然其受体目前尚不清楚^[11,12]。在本研究中我们尝试使用 1 型 AAV 外壳蛋白包装的 2 型 AAV 基因组, 成功包装出杂合型病毒颗粒。该重组 AAV 能够感染体外培养的细胞, 且感染的细胞能够表达并且分泌目的蛋白。

在多数情况下, AAV 在正常细胞中不产生毒性感染。AAV 病毒颗粒进入细胞脱衣壳后, AAV 的调节蛋白发生有限表达, 并抑制病毒基因的进一步表达和病毒 DNA 的复制, 这种负调节作用的结果是促进病毒基因组整合到宿主的基因组中建立潜伏感染。由于 AAV 是一种单链 DNA 病毒, 其携带的基因必须转变成双链才能有效表达, 由 AAV 载体介导的基因转导, 转基因表达开始时间较晚, 表达水平较低。当有辅助病毒存在时, 或细胞受到 DNA 损伤因素影响后, AAV 发生毒性感染, 单链 AAV 或整合到宿主细胞基因组的病毒 DNA 被拯救出基因组开始大量复制^[13]。然而, 基因治疗用 AAV 载体由于缺乏与 AAV 复制及包装有关的 rep 和 cap 基因, 即使在有辅助病毒存在的情况下, 出现单链到双链的转变, 但仍然不能包装出新的 AAV 病毒颗粒, 因此是安全的^[5,6,11]。

目前腺病毒载体包括复制型和非复制型, 已广泛应用于肿瘤的基因治疗研究和临床实验, 实践证明腺病毒载体是安全的, 但是存在免疫原性较强, 表达时间短等缺点^[4]。为了利用 AAV 能够介导外源基因较长时间表达的优势, 克服 AAV 转导效率较低的缺点, 我们在使用 AAV 感染细胞时联合使用少量腺病毒, 实验证明低剂量的腺病毒可以弥补腺相关病毒起效慢、转导效率低的弱点。我们的初步实验结果表明, 非复制型腺病毒可显著增强腺相关病毒感染 293 细胞株后目的蛋白的表达和分泌, 并且存在明显的剂量效应关系。有此基础, 可期待更好利用 AAV 作基因治疗。

REFERENCES

- [1] During MJ, Leone P. Adeno-associated virus vectors for gene therapy of neurodegenerative disorders. *Clin Neurosci*, 1995-1996, **3**(5): 292-300.
- [2] Flotte TR, Carter BJ. Adeno-associated virus vectors for gene therapy. *Gene Ther*, 1995, **2**(6): 357-362.
- [3] Bueler H. Adeno-associated viral vectors for gene transfer and gene therapy. *Biol Chem*, 1999, **380**(6): 613-622.
- [4] Lai CM, Lai YK, Rakoczy PE. Adenovirus and adeno-associated virus vectors. *DNA Cell Biol*, 2002, **21**(12): 895-913.
- [5] Goncalves MA. Adeno-associated virus: from defective virus to effective vector. *Virol J*, 2005, **2**: 43.
- [6] Li C, Bowles DE, van Dyke T, et al. Adeno-associated virus vectors: potential applications for cancer gene therapy. *Cancer Gene Ther*, 2005, **12**(12): 913-925.
- [7] Obata K, Noguchi K. BDNF in sensory neurons and chronic pain. *Neurosci Res*, 2006, **55**(1): 1-10.
- [8] Chao MV, Rajagopal R, Lee FS. Neurotrophin signaling in health and disease. *Clin Sci(Lond)*, 2006, **110**(2): 167-173.
- [9] Moller JC, Kruttgen A, Heymach VJ Jr, et al. Subcellular localization of epitope-tagged neurotrophins in neuroendocrine cells. *Journal of Neuroscience Research*, 1998, **51**(4): 463-472.
- [10] Srivastava A. Parvovirus-based vectors for human gene therapy. *Blood Cells*, 1994, **20**(2-3): 531-538.
- [11] Grimm D, Kleinschmidt JA. Progress in adeno-associated virus type 2 vector production: promises and prospects for clinical use. *Hum Gene Ther*, 1999, **10**(15): 2445-2450.
- [12] Ding W, Zhang L, Yan Z, et al. Intracellular trafficking of adeno-associated viral vectors. *Gene Ther*, 2005, **12**(11): 873-880.
- [13] Geoffroy MC, Salvetti A. Helper functions required for wild type and recombinant adeno-associated virus growth. *Curr Gene Ther*, 2005, **5**(3): 265-271.

中国科学院微生物研究所期刊 2008 年联合征订启事

中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部共编辑出版《微生物学报》、《生物工程学报》、《微生物学通报》和《菌物学报》四种学术期刊，均为中国自然科学核心期刊，分别被美国化学文摘(CA)、生物学数据库(BIOSIS)、生物学文摘(BA)、医学索引(Medical Index)、俄罗斯文摘杂志(AJ)以及 NCBI、CABI 等 20 多种国内外重要检索系统与数据库收录。刊登内容包括普通微生物学、工业、农业、医学、兽医微生物学、病毒学、免疫学、菌物学(真菌、粘菌、卵菌、地衣等)研究领域的科研成果以及基因工程、细胞工程、酶工程、生化工程、组织工程、生物制药、生物信息、生物芯片等生物工程研究的新发展、新成果、新技术。读者对象为基础医学、农林牧渔、生命科学领域的科研与教学人员、以及卫生防疫(检疫监察部门)、生物工程公司、环境保护、企业厂矿等单位。发行范围涵盖教育、科研、工业、农业、医药、环境、食品保健等领域。

2008 年起，《微生物学报》、《生物工程学报》、《微生物学通报》分别由原来的双月刊变更为月刊，《菌物学报》由原来的季刊变更为双月刊，具体如下：

《微生物学报》(ISSN 0001-6209, CN11-1995/Q)为月刊，全年 12 期，国内邮发代号 2-504，国外发行代号：BM67。2008 年定价 55 元，全年 660 元。

《生物工程学报》(ISSN 1000-3061, CN11-1998/Q)为月刊，全年 12 期，国内邮发代号 82-13，国外发行代号：BM5608。2008 年定价 65 元，全年 780 元。

《微生物学通报》(ISSN 0253-2654, CN11-1996/Q)为月刊，全年 12 期。国内邮发代号 2-817，国外发行代号：BM413。2008 年定价 48 元，全年 576 元。

《菌物学报》(ISSN 1672-6472, CN11-5180/Q)为双月刊，全年 6 期。国内邮发代号 2-499，国外发行代号：Q723。2008 年定价 80 元，全年 480 元。

欢迎订阅，欢迎网上注册投稿，欢迎发布广告

详情请登陆：<http://journals.im.ac.cn>