

# 以 HSV-1 扩增子载体构建的新型重组 AAV 载体包装系统\*

舒跃龙 吴小兵 杨天忠 贡惠宇 侯云德 颜子颖 \*\*

(病毒基因工程国家重点实验室, 北京 100052)

**摘要** 将缺失两端 ITR 的 AAV-2 基因组克隆于 HSV-1 扩增子载体获得了质粒 pHSV-AAV。以 HSV-1 tsK 株为辅助病毒感染转染了该质粒的 Vero 细胞, 可获得一种具有包装重组 AAV 质粒能力的混合毒种。连续传代可使其包装能力迅速升高, 至 5~6 代达到最高并趋于平稳。此混合毒种中, 含有包装了多拷贝 AAV-2 基因组的复制缺陷性假型 HSV-1 病毒, 它可表达 AAV-2 编码的复制与包装所需的各种反式蛋白; 同时也含有 HSV-1 tsK 病毒, 它提供 AAV-2 复制与包装所需的全部辅助病毒功能。实验结果也表明, HSV-1 tsK 病毒的复制为混合毒种辅助重组 AAV 载体的包装所必需。这项研究首次报道了一种全新的重组 AAV 载体包装系统, 与传统的双质粒共转染、腺病毒辅助包装方案相比, 本系统简便易行, 并明显提高了重组 AAV 的包装效率。

**关键词** 重组 AAV 载体 HSV-1 扩增子载体 混合毒种 包装系统

腺病毒伴随病毒(Adeno-associated virus, AAV)是一种非自主复制的人细小病毒, 它的复制必须有辅助病毒(helper virus)参与<sup>[1]</sup>, 通常是由腺病毒提供辅助病毒的功能, 疱疹病毒<sup>[2]</sup>或痘病毒也能作为辅助病毒参与 AAV 的裂解性生长周期。以 AAV-2 为基础构建的重组 AAV 载体具有无致病性、可建立稳定表达及能转导有丝分裂后细胞等特点, 可用作基因治疗的外源基因荷载工具<sup>[3]</sup>。目前, 产生无 AAV 野毒污染的重组 AAV 质粒的常规方案多数是以 Samulski 报道的用双质粒共转染腺病毒感染的细胞的方法为基础的<sup>[4]</sup>。此外, 围绕重组 AAV 包装系统的研究, 主要致力于发展能反式提供 AAV 编码蛋白的包装细胞系, 如我们课题组曾建立了一种利用 Epstein barr 病毒(EBV)复制子载体构建重组 AAV 包装细胞系的新方法, 明显提高了重组 AAV 载体的包装效率<sup>[5]</sup>; 另一种策略是改造辅助病毒, 使之能表达 AAV 编码蛋白, 如 Lebkowski 等人曾构建了一种 E3 区或 E1 区为 AAV 基因组所替代的重组腺病毒, 亦有效地简化和提高了重组 AAV 的包装效率<sup>[6]</sup>。

本课题组在研究质粒型 HSV-1 扩增子载体取得初步成功的基础上<sup>[7]</sup>, 探索了利用该载体的特点组建新型重组 AAV 载体包装体系的可能。我们构建了两端 ITR 缺失的 AAV 全基因

1997-08-04 收稿, 1998-01-12 收修改稿

\* 国家“八六三”高技术发展计划(863-Z20-02-05)和国家攀登计划资助项目

\*\* 联系人

组与 HSV-1 复制子及其包装序列的嵌合质粒,此质粒转染细胞后,用辅助病毒 HSV-1 感染可提供使此质粒复制和被包装所需全部功能,质粒在细胞中复制并以头尾相接的多拷贝串连体(Concatenate)的形式被包入 HSV-1 毒粒中而成为一种复制缺陷的假型病毒。由于 HSV-1 辅助病毒本身亦能复制和包装,故得到的是一种混合毒种,它既含 HSV-1 辅助毒株,又含有带多拷贝 AAV 基因组的假型病毒,两者尚无法以物理手段分离。然而用此混和毒种感染细胞时,前者可充当重组 AAV 包装的辅助病毒,后者可表达出 AAV 复制和包装所必需的反式蛋白,当细胞转染了重组 AAV 载体时,就可产生具有感染性的重组 AAV 病毒。本文报道的这一全新的重组 AAV 包装系统目前尚未见有任何类似的文献报道。

## 1 材料和方法

### 1.1 质粒和宿主菌

重组 AAV 质粒 pSub201 含克隆化的 AAV-2 的全基因组,在近两端处各有一个人工插入的 Xba I 位点将编码区与具有 AAV 复制、包装、整合和拯救全部顺式功能的反转末端重复(ITR)分开,质粒骨架为 pEMBL8; 助手质粒 pAd8 是 pSub201 的衍生质粒,其中 AAV-2 基因组两端的 ITR 及包装序列均由人腺病毒 5 型的 109 bp ITR 所取代;pAB11 为表达  $\beta$ -半乳糖苷酶基因的重组 AAV 表达载体。上述质粒均为 Samulski 实验室馈赠<sup>[4]</sup>。pHSV-Y 来源于 HSV-1 扩增子载体质粒 pHSL,含有 HSV-1 的包装信号(a'序列)及复制子与 IE68 启动子序列,但去除了  $\beta$ -半乳糖苷酶基因<sup>[7]</sup>。所有质粒的宿主菌均为大肠杆菌 DH5 $\alpha$  株。

### 1.2 细胞培养与病毒的制备

人肺癌上皮细胞 A549、非洲绿猴肾细胞 Vero 和人 5 型腺病毒(Ad5)均购自美国 ATCC;细胞均于含 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养液中培养。Ad5 在 A549 细胞上按常规方法传代扩增。用作 pHSV-AAV 包装的辅助病毒的 HSV-1 tsK 株<sup>[8]</sup>是英国 Glasgow 病毒所 Nigel Stow 赠送,它是一种严格的生长温度敏感 HSV-1 突变株,生长允许温度为 31℃,在 37℃ 时其复制被抑制,但仍保留感染性<sup>[8]</sup>。该病毒按常规方法在 31℃ 于 Vero 传代扩增并制备。病毒用有限稀释空斑计数法滴定,滴度以每毫升病毒液的空斑形成单位(pfu/mL)表示。

### 1.3 分子克隆常规技术

按文献[9]进行

### 1.4 HSV/AAV 扩增子嵌合质粒的构建

pSub201 以 Xba I 和 Cla I 双酶消化后,分离出含 ITR 缺失 AAV-2 基因组(196~4 484 bp)的约 4.3 kb Xba I 片段。此片段克隆于 HSV-1 扩增子质粒 pHSVapl 的多接头处,得到插入方向相反的两种 HSV 扩增子/AAV 嵌合质粒,其 AAV 的转录方向不同。AAV 的转录方向与 pHSVapl 骨架氨苄青霉素抗性基因转录方向相同,为 pHSV-AAV(+),相反的为 pHSV-AAV(-)。

### 1.5 HSV/AAV 假型病毒混合毒种的产生

用脂质体法将本文所构建的 pHSV-AAV(+)或 pHSV-AAV(-)质粒转染 60%~80% 汇片(confluence)的 Vero 细胞,48 h 后以 1 pfu / 株细胞的 HSV-1 tsK 株感染,31℃ 吸附 2 h。然后在含 10% 胎牛血清的培养液中于 31℃ 培养至 90%~100% 细胞发生病变。将细胞反复冻融 3 次,离心除细胞残渣,所得上清液即为混合病毒原种,命名为 HSV/AAV,其中含有 HSV/

AAV 假型病毒(含 ITR 缺陷的多拷贝 AAV 基因组)及辅助病毒 HSV-1 tsK。将该混合毒在 Vero 细胞中连续传 6 代, 收集每代感染 72 h 后的细胞裂解物, 用有限稀释空斑计数法滴定其中 tsK 辅助病毒滴度(假型病毒本身不形成空斑, 只有与 tsK 共感染时才能扩增)。以一定的感染复数(MOI)测试各代毒种辅助包装重组 AAV 载体 pAB11 的能力。用 Southern 印迹杂交方法检测第 6 代混合病毒 DNA 中的 AAV 基因组的存在。

### 1.6 以混合病毒辅助包装重组 AAV 表达质粒

用脂质体法将 pAB11 转染 80% 汇片的 A549 细胞, 48 h 后用 0.5 mL 混和毒种感染, 在 31℃ 吸附 2 h, 然后在含 10% 胎牛血清的培养液中于相应温度继续培养。3 d 后, 收获不同温度的细胞培养液和细胞, 反复冻融 3 次使细胞完全裂解, 离心去掉细胞碎片, 65℃ 加热 1 h 以灭活 HSV-1 病毒和 HSV-AAV 假病毒, 再经 0.22 μm 醋酸纤维膜过滤, 得到可用于转导细胞的重组 AAV 病毒颗粒 AA Vlac。

### 1.7 双质粒共转染 Ad5 辅助包装重组 AAV 表达质粒

按文献[4]进行: 细胞以 5 型腺病毒感染后, 用脂质体法转染等量 pAd8 和 pAB11 产生的重组 AAV 病毒, 收获重组病毒的方法同上(65℃ 加热 1 h 灭活 Ad5)。

### 1.8 重组 AAV 病毒转导培养细胞及报道基因 β 半乳糖苷酶组织化学检测

重组 AAV 病毒原种做 10 倍倍比稀释, 取原液和各稀释度的病毒稀释液 1 mL 感染培养于 35 mm 培养皿的约 70%~80% 汇片的 A549 细胞(细胞计数约 10<sup>6</sup>)。感染 48 h 后按文献[10]方法检测 β 半乳糖苷酶的表达。以受染细胞的蓝染率或蓝细胞数估算重组 AAV 载体的相对滴度。

## 2 结果

### 2.1 辅助包装重组 AAV 载体的混合毒种的制备

将所构建的 HSV-1 扩增子/AAV 嵌合质粒(见图 1) pHSV-AAV(+) 或 pHSV-AAV(-) 转染进细胞后, 当细胞被 HSV-1 tsK 野毒感染时, 随 tsK 的复制, 质粒中的 HSV-1 复制子也可在 tsK 繁殖时产生的病毒蛋白作用下, 以滚环复制的形式产生头-尾相连的多拷贝串连体。通过识别串连体上的 HSV-1 包装信号, 此串连体可被切割如 HSV-1 基因组的大小并被包装进病毒的衣壳而形成 HSV-1 假病毒颗粒, 其中的 DNA 成分为约 15 个拷贝头-尾相连的 pHSV-AAV 的线性化双链。受染细胞裂解后得到的上清液中含有两种 HSV-1 病毒, 一种是辅助病毒 tsK 病毒株, 另一种是 HSV/AAV 假病毒颗粒。

将此 HSV-1 混合毒种[命名为 HSV/AAV(+) 或 HSV/AAV(-)]于 31℃ 在 Vero

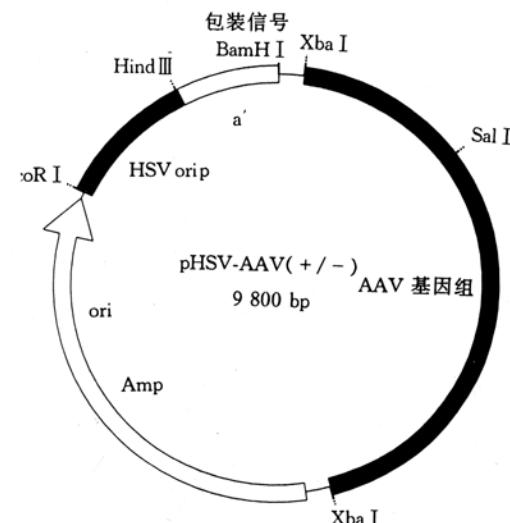


图 1 HSV-1/AAV 嵌合质粒简图  
HSVoriP 为 HSV-1 复制子, a' 为 HSV-1 包装序列, AAV 为两端 ITR 缺失的 AAV 全基因组

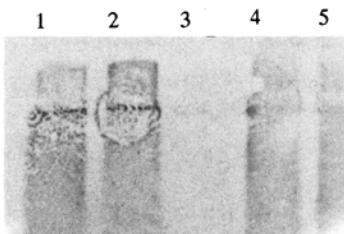


图 2 Southern 杂交分析结果

1 为 HSV/AAV(+) 混合毒种 DNA, 2 为 HSV/AAV(-) 混合毒种 DNA, 3 为 HSV-1 tsK 株 DNA, 4 为 pHSV-AAV(+) 质粒 DNA,  
5 为 pHSV-AAV(-) 质粒 DNA

细胞中连续传 6 代, 收集各代混合毒种。将第 6 代的混合毒种按 Hirt<sup>[11]</sup>方法提取病毒 DNA, 同时提取 HSV-1 tsK DNA 作为对照。DNA 以 XbaI 消化后进行 Southern 印迹杂交, 所用 AAV 探针是以 pSub201 的 Hind III ~ XbaI (1 883~4 484) 的 2.6 kb 片段为模板, 随机引物标记法合成, 使用 Boehringer Mannheim 公司的地高辛标记与检测系统。结果(图 2)可见, 混合毒种中提取的 DNA 可被切出 4.3 kb 的阳性片段, 与质粒 pHSV-AAV(+) 或 pHSV-AAV(-) 酶切结果一致, 但 tsK 病毒 DNA 酶切后杂交结果阴性。

## 2.2 用 HSV-1 混合毒种辅助包装重组 AAV 表达载体

各代 HSV/AAV 混合毒种辅助包装产生的病毒原种在滴定其中所含 HSV-1 tsK 株的滴度后, 均以感染复数(MOI)为 5 的病毒量于 31℃ 分别感染转染了 pAB11 的 A549 细胞, 48 h 后收取细胞裂解液, 65℃ 加热 1 h 以灭活 HSV-1 tsK 及 HSV/AAV 假病毒, 细胞裂解液适当稀释后于 37℃ 分别感染 A549 细胞, 48 h 后均可以组织化学方法检出报道基因 β 半乳糖苷酶的表达, 表明所得的细胞裂解液中含有感染性的重组 AAV 颗粒 AAVlac, 计数产生的蓝细胞数以计算 AAVlac 的相对滴度。结果表明, HSV/AAV 混合毒种具有辅助和支持重组 AAV 载体质粒包装产生感染性重组 AAV 颗粒的全部功能。

从图 3 可见, 混合毒种在传代过程中(31℃)辅助病毒 HSV-1 tsK 株的滴度变化出现较小的波动, 但以相同感染复数的 HSV/AAV 假型病毒辅助包装 pAB11 所产生的重组 AAVlac 的相对滴度则随传代而呈迅速升高的趋势, 至 5~6 代达到最高并趋于平稳。这与我们先前报道的 HSV-1 扩增子载体/HSV-1 tsK 系统<sup>[11]</sup>中辅助病毒 tsK 株与假型病毒 HSVlac 的滴度变化规律一致, 该现象与混合毒种中辅助病毒和假型病毒的相对滴度有关。受包装效率的限制, 串联体 DNA 的包装在第 1 代混合毒种的并不具优势, 但随着传代次数的增加, 具有多拷贝 HSV-1 复制子的假型病毒的复制优势逐渐表现, 并在一定程度上弥补了其在包装上的劣势, 结果使混合毒种中假型病毒的相对含量迅速升高, 从而其辅助包装 pAB11 的工作效率也将随之提高。

图 4 比较 HSV/AAV 混合毒种包装系统与常规的 pAB11 和 pAd8 双质粒共转染, 并辅以腺病毒感染方法的包装效率。HSV/AAV 混合毒种(第 6 代)辅助 pAB11 包装所产生的 AAVlac 滴度可达  $10^6$  以上, 比共转染法( $5 \times 10^4$  左右)有了明显的改进, 同时, 工作方案更为简捷。此外, 实验结果反映 HSV-1 扩增子载体中 AAV 基因组的插入方向对最终获得的重组 AAV 病毒的滴度有一定的影响, 在几次的重复试验中, 反向插入的质粒获得的重组 AAV 病毒滴度均高于正向质粒的所得(如图 4 所示), 其作用机制有待进一步确证和研究。

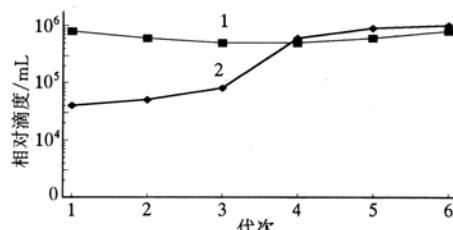


图 3 HSV/AAV(-) 混合毒种传代过程中 HSV-1 tsK 的滴度及辅助包装重组 AAVlac 的效率变化  
1 为 tsK, 2 为 AAVlac

### 2.3 温度对 HSV/AAV 混合毒种包装重组 AAV 的影响

为了观察 HSV-1 辅助病毒的作用, 我们在实验设计上特选用对生长温度敏感的 HSV-1 tsK 株作为产生复制缺陷的 HSV-AAV 病毒的辅助包装病毒。tsK 株病毒 Vmw175 蛋白氨基酸链上有一个误义突变, 是一种严格的温度敏感株, 在非允许温度仍具有感染性, 但 Vmw175 功能的丧失使其受调控的早期基因失去转录活性, 病毒早期基因的转录不能启动, 因而不能进行病毒的复制。本研究观察了在 tsK 株允许温度 31℃ 及非允许温度 37℃ 下, 第 6 代 HSV/AAV(-) 混合毒种辅助包装 pAB11 时温度对包装效果的影响。结果表明, 在 37℃ 时混合毒种包装出的重组 AAVlac 的滴度明显降低(约 10<sup>2</sup>), 这是由于 tsK 株在 37℃ 时的生长繁殖受到抑制。但此时若同时辅以 HSV-1 KOS 株(野毒株)的感染, 感染复数为 0.5~2.0, 结果产生的重组 AAVlac 的滴度有大幅度提高, 与混合毒种在 31℃ 用于 pAB11 的包装时产生的重组 AAVlac 的水平相似, 说明此混合毒种中, 提供辅助病毒功能的 HSV-1 tsK 病毒的复制和/或病毒基因的表达为混合毒种包装重组 AAV 载体所必需, 其机制可能与假型病毒中 AAV-2 编码蛋白的表达和 DNA 的复制有关, 但此混合毒种辅助包装重组 AAV 的确切作用机制仍需进一步研究。

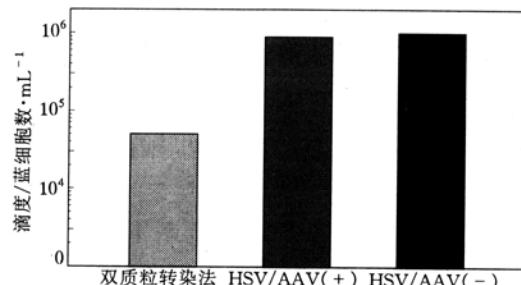


图 4 HSV/AAV 混合毒种(第 6 代)与双质粒共转染法辅助 pAB11 包装效率比较

## 3 讨论

在重组 AAV 载体的研究中, 一直未见一种高效、简便、实用的重组病毒包装系统的报道。为提高获得重组 AAV 的效率和简化制备过程, 许多实验室致力于发展有效的重组 AAV 反式包装细胞系。本实验室曾报道过一种全新的重组 AAV 病毒包装系统, 利用 EBV 复制子载体在细胞可以多拷贝附加子形式存在并形成稳定细胞系的特点, 将 ITR 缺失的 AAV-2 全基因组克隆于 EBV 复制子载体中, 获得在辅助病毒存在下可反式提供重组 AAV 包装所需的复制蛋白和结构蛋白的稳定的包装细胞系, 有效地提高了重组病毒的包装效率<sup>[5]</sup>。

在本研究中, 我们首次利用 HSV-1 扩增子载体建立了另一种新型重组 AAV 包装系统。ITR 缺失的 AAV-2 基因组被克隆于 HSV-1 扩增子载体中, 在野生型 HSV-1 感染的存在下可简单而有效地产生用于包装重组 AAV 载体的混合毒种, 所得的混合毒种中假型病毒中含有以串连体形式多拷贝存在的 AAV 基因组 DNA, 可以反式提供 AAV 的复制蛋白和结构蛋白; 而混合毒种中的 HSV-1 野毒株则充当辅助病毒的作用, 两者共同支持将携带有外源基因的重组 AAV 载体包装成重组 AAV 病毒颗粒。与 Lebkowski 曾获专利的一种含 AAV 基因组的重组腺病毒包装系统相比, 本系统的 AAV/HSV 假型病毒可提供多拷贝的 AAV 功能基因, 并且省去了产生含 AAV 基因组的重组腺病毒而进行的同源重组及重组病毒的分离筛选和纯化, 大大简化了工作步骤。

本课题组在发展可望应用于神经系统基因治疗的 HSV-1 扩增子载体的工作中, 一直受困于无法以物理手段从所得的混合毒种中去除具有复制能力的 HSV-1 辅助病毒的污染的问题。

(此问题国际上也一直未能提供理想的解决方案). 但本工作恰好利用了 HSV-1 扩增子载体的这一特点, 成功地以之构建了一种能提供包括辅助病毒功能(在传统方案中通常由腺病毒提供)的能完全支持重组 AAV 载体包装的 HSV-1 混合毒种. 本文确证了利用 HSV-1 扩增子载体进行重组 AAV 包装的可行性, 与传统的共转染并辅以腺病毒感染的方法比较, 有效地提高了重组 AAV 的包装效率, 与以辅助病毒为对象的改良 AAV 包装系统相比, 更为简捷易行. 结合我们先前报道的利用 EBV 复制子载体构建包装细胞系所取得的经验和结果, 我们往重组 AAV 表达质粒中引入 EBV 复制子, 使之能稳定维持于 293 细胞或 Vero 细胞中, 所得的转化细胞系以此混合毒种感染, 能简便有效地产生高滴度重组 AAV, 此工作已取得初步进展, 此一全新的重组 AAV 产生体系正在进一步发展和完善之中.

### 参 考 文 献

- 1 Berns K I, Linden R M. The cryptic life style of adeno-associated virus. *BioEssays*, 1995, 17: 27~245
- 2 Buller R M, Janik J E, Sebring E D, et al. Herpes simplex virus type 1 and 2 completely help adeno-associsted virus replication. *J Virol*, 1981, 40: 241~247
- 3 Muzyczka N. Use of adeno-associated virus as a general transduction vector for mammalian cells. *Curr Topic Microbiol Immunol*, 1992, 158: 97~129
- 4 Samuski R J, Chang L S, Shenk F A, et al. Helper free stocks of recombinant andeno-associated virus: normal integration does not require viral gene expression. *J Virol*, 1989, 63: 1 329~1 341
- 5 颜子颖, 姚二梅, 张 桐, 等. 一种以 EB 病毒复制子载体为基础的新型重组腺病毒伴随病毒载体包装系统. *科学通报*, 1997, 42(17): 1 860~1 863
- 6 Lebkowski J S, Valley P, McNally M A, et al. Production of recombinant adeno-assiated virus vector. *United States Patent*, 1994, 5: 354~738
- 7 杨天忠, 王晓丹, 颜子颖, 等. 利用缺陷型单纯疱疹病毒载体在大鼠中枢神经系统表达外源基因. *中华实验和临床病毒学杂志*, 1997, 11(4): 306~310
- 8 Brown S M. Genetic studies with HSV-1, the isolation of temperature-sensitive mutants, their arrangement into complementation groups and recombination analysis leading to linkage map. *J Gen Verol*, 1973, 18: 329~346
- 9 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2 nd. New York: CSH Press, 1989
- 10 Grant R M, Anne E M, Julian F B, et al. Histochemical staining of clonal mammalian cell lines expression E coli  $\beta$  galactosidase indicates heterogeneous expression of the bacterial gene. *Somatic Cell Mol Genet*, 1987, 13: 253~265
- 11 Hirt B. Selective extraction of polyoma DNA from infected mouse cell culture. *J Mol Biol*, 1967, 266: 4 812~4 819