

文章编号: 1673-3851 (2012) 06-0874-05

靶向肝癌细胞的嵌合 AAV 建库及筛选

赵景川¹, 严巧灵², 钱其军^{1,2}

(1. 浙江理工大学生命科学院 新元医学与生物技术研究所, 杭州 310018;

2. 第二军医大学东方肝胆医院 病毒基因治疗实验室, 上海 200438)

摘要: 采用 Shuffling 的方法, 将 AAV1-9 *Cap* 基因序列进行改组, 筛选出高效靶向肝癌细胞的嵌合 AAV 载体。以 pAAV-MCS 载体为骨架, 构建出含 AAV2 ITR 和 Rep2 序列的 pAdB 载体, 在此基础上, 构建含有嵌合 *Cap* 序列的 pARC 载体库, 用于转染 293 细胞, 并加入 5 型腺病毒(Ad5), 包装出嵌合 AAV 病毒。然后将包装出的嵌合 AAV 病毒与 Ad5 共感染 BEL7402 肝癌细胞, 经过三轮筛选后, 初步筛选出可以靶向肝癌细胞的嵌合 AAV。最后将筛选出的 AAV Rep2 嵌合 *Cap* 基因的融合片段连接到 pMD18-T 载体上, 构建出 pARC-T 载体, 与 AAV-EGFP 质粒共转染 293 细胞, 并加入 Ad5, 包装出病毒基因组含 EGFP 基因、病毒外壳为嵌合 *Cap* 的 AAV 病毒(cAAV-EGFP), 并用其感染 BEL7402 细胞, 观察绿色荧光的表达。最后观察到绿色荧光表达, 证明筛选出了靶向 BEL7402 肝癌细胞的嵌合 AAV。

关键词: Shuffling; 嵌合 AAV; 靶向; 肝癌细胞

中图分类号: Q782 **文献标识码:** A

0 引言

在基因治疗中, 关键是要将治疗基因有效导入病人的细胞或组织中。腺相关病毒(adeno-associated virus, AAV)既能转导分裂期细胞也能转导非分裂期细胞, 并且能够使治疗基因在机体内长期表达。而且, 目前没发现其对人类有致病性, 是临床基因治疗的理想载体。现在已鉴定出 100 多种血清型 AAV, 但是目前人们只对 1-9 型做了广泛的基因治疗研究^[1]。每种血清型都有各自不同的感染倾向性, 例如对 9 型的研究表明其对新生小鼠的神经细胞和成体星细胞有特殊的感染倾向性^[2]。Sharma A 等^[1]对 AAV 6, 8, 9 型感染人角膜成纤维细胞的效果做了对比。但是由于 AAV 的血清型有限, 目前常用的也就是 AAV1-9 型, 因此其感染多样性及专一性受到很大限制。为了使 AAV 的感染针对性和效果更好, 并且易于生产, 近年来研究人员做了大量的工作。一是换成通用性 *Rep* 和 *ITR* 的重组 AAV(rAAV), 利用 2 型的 *Rep* 和 *ITR* 与其它血清

型 AAV 的 *Cap* 组合, 这样做既安全又易于生产, 很多研究都是用重组 AAV^[3-5]; 二是对 *Cap* 进行改造, 使其有更多的靶向性。1994 年出现的 DNA 改组技术(Shuffling)^[6-7]是对 *Cap* 改造能力最强的一种技术。目前研究人员已经利用 shuffling 技术得到了一些理想的结果^[8-9]。Shuffling 是一种高通量的突变和筛选技术, 既可以使基因序列发生点突变, 也可以使基因序列片段发生插入、缺失、倒转和整合等, 而且可以反复改组, 实现突变的效应不断累加。本研究利用 Shuffling 技术对 AAV1-9 型的 *Cap* 进行改造, 以期获得有价值的 AAV 载体。

1 材料和方法

1.1 主要试剂仪器

含有 ITR 序列和氨苄抗性的 pAAV-MSC, AAV1~AAV9 九种血清型腺相关病毒, 含有自杀基因 *ccdb* 的 pUC19-RC 质粒, 病毒表达载体 pAAV-EGFP 均为本实验室所有, 大肠杆菌 DH5 α 为本实验所有, SURE 购自 STRATA GENE 公司, HEK-293、BEL7402 细胞、SK-OV-3 细胞购自

ATCC 公司; pMD18-T 载体和 T4 连接酶购自 TaKaRa 公司; Taq 聚合酶、KOD-Plus 聚合酶购自 ToYoBo 公司; QiAamp DNA Blood mini Kit(250) 试剂盒、Plasmid Midi Kit(100) 试剂盒购自 QIA-GEN 公司; 胶回收试剂盒购自 Macherey-Nagel 公司; 蛋白酶 K 购自 Qiangen 公司; 各种限制性核酸内切酶及 DNA marker 购自 NEB 公司; FBS、DMEM 培养基及胰酶购自 Gibco 公司。

1.2 pAdB 载体的制备

合成以下引物(划线部分为限制性内切酶识别位点):

引物 1, GC-TCTAGA-ATAGGGTTAGG-GAGGTC; 引物 2, CC-AAGCTT-CCGCGTCT-GACGTCGAT G; 引物 3, CC-AAGCTT-ACCTG-CAGACTGGCTGTGT; 引物 4, AT-CAGCTG-AC-TAGT-GCCGATCTG GATCCGGCTT; 引物 5, TT-GCGGCCGC-TCTAGA-ATAGGGTTAGGGAG-GTCCTG; 引物 6, TA-GCG GCCGC-ACTAGT-GC-CGATCTGGATCCGGCTTACT。应用 PCR 技术从野生型 AAV2 中获得 *Rep2* 片段, 经 *XbaI* 和 *HindIII* 酶切后, 用 SolutionI 连接到用相同酶双酶切以后的 pABV359 载体上, 所得载体命名为 pARep。接着以 pUC19-RC 质粒为模板, 用引物 3 和引物 4 进行 PCR 获得 *CCDB* 片段, 与 pARep 一起进行 *PvuII* 和 *Hind III* 双酶切, 回收后用 T4 连接酶进行连接, 阳性克隆酶切鉴定并测序, 所获得质粒命名为 pARB。然后以 pARB 为模板, 用引物 5 和 6 扩增 *Rep2-CCDB* 片段, 与 pAAV-MCS 一起用 *NotI* 酶切, 回收后用 T4 连接酶进行连接, 阳性克隆酶切鉴定并测序, 所获得质粒命名为 pAdB。

1.3 pARC 文库的构建

合成以下引物(划线部分为限制性内切酶识别位点):

引物 7, CCC-AAGCTT-CGATCAACTACGCAGACAGGTACCAA; 引物 8, CGG-ACTAGT-AGAGACCAAAGTTCAACTGAAACGA; 引物 9, CTCCCTTCTTATTGTTTCAGATTGGTTGGAAGAAGTT GG; 引物 10, CGGCCGCTCATTAAAGGGGTCGGGTAAGGTATCGGGTTCCG。用引物 7 和引物 8 扩增 AAV1-9 *Cap*(*Cap5* 除外) 序列。反应条件如下: 95°C 3 min; 95°C 30 s, 60°C 30 s, 72°C 130 s, 20 个循环; 72°C 10 min; 4°C 保存。用引物 9 和引物 10 扩增 *Cap5*, 反应条件如下: 95°C 3 min; 95°C 30 s, 53°C 30 s, 72°C 2 min, 20 个循环; 72°C 10 min; 4°C 保存。将 PCR 产物混合后柱回收。

然后用 *DNaseI* 酶切, 条件为 16°C, 0.01 U/ μ g DNA, 2 min。酶切产物加 500 μ L TE 稀释, 然后加入 70% 异丙醇沉淀 DNA, 12 000 r/min 离心 15 min, 取上清, 1 mL 70% 乙醇洗涤沉淀, 12 000 r/min 离心 3 min。56°C 烘箱短暂烘干。加适量 TE 溶解 DNA。以此 DNA 为模板进行 DNA 改组 (Shuffling), 条件如下: 95°C 3 min; 95°C 30 s, 60°C 30 s, 72°C 130 s, 20 个循环; 72°C 10 min; 4°C 保存。PCR 产物柱回收。用 *HindIII* 和 *SpeI* 酶切回收产物和 pAdB, 将酶切后回收的 Shuffling 产物和 pAdB 大片段用 SolutionI 连接。连接产物即为 pARC 载体。不断重复连接过程, 构建 pARC 载体文库。

1.4 细胞培养及嵌合 AAV 的筛选

1.4.1 嵌合 AAV 的包装

将 293 细胞以 1×10^5 /孔铺六孔板, 在 5% CO_2 、37°C 培养 12~24 h 后进行细胞转染。转染前 2 h 将含 10% FBS 的 DMEM 换成无血清的 DMEM 培养基, 每个孔加的试剂量如下: pARC 质粒 DNA 6 μ g, 2M CaCl_2 7 μ L, 用灭菌水定容至 50 μ L, 混匀后再逐滴加入 $2 \times \text{HBS}$ 盐溶液, 静置 2 min 后, 将其逐滴加入 293 细胞中。8 h 后将无血清 DMEM 换成含 10% FBS 的 DMEM, 并按照 $\text{MOI} = 0.5$ 加入 Ad5, 72 h 后收细胞。4 000 r/min 离心 5 min。去掉约四分之三上清。反复冻融 3 次, 4 000 r/min 离心 5 min, 取上清, 56°C 0.5 h 灭活腺病毒。

1.4.2 嵌合 AAV 的筛选

将 BEL7402 肝癌细胞以 2×10^5 /孔铺六孔板, 在 5% CO_2 、37°C 培养 12~24 h 后, 加入收取已灭活腺病毒的嵌合 AAV 上清液 200 μ L/孔, 并按 MOI 值为 0.5 加入 Ad5。加病毒 72 h 后收细胞, 4 000 r/min 离心 5 min。去掉约四分之三上清。反复冻融 3 次, 4 000 r/min 离心 5 min, 取上清, 56°C 0.5 h 灭活腺病毒。然后再用此感染 BEL7402 肝癌细胞, 其他步骤与前面一致, 共 3 次。每轮收病毒后取 200 μ L 用试剂盒回收病毒 DNA。用引物 5 和 6 扩增嵌合 *Cap* 序列, 反应条件同扩增 AAV1-9 *Cap* 序列 (*Cap5* 除外)。最后一轮提取的病毒 DNA 用引物 1 和 6 扩增 *Rep2* 嵌合 *Cap* 序列, 反应条件为: 95°C 3 min; 95°C 30 s, 53°C 30 s, 72°C 250 s, 25 个循环; 72°C 10 min。电泳检测扩增结果。

1.5 含有绿色荧光蛋白基因嵌合 AAV(cAAV-EGFP) 的包装及荧光蛋白的表达

1.5.1 cAAV-EGFP 的包装

将引物 1 和 6 扩增的 *Rep2* 嵌合 *Cap* 片段与

pMD-18T 载体连接,构建出载体 pARC-T,对载体测序,并用其和 pAAV-EGFP 质粒共转染 293 细胞。转染过程为:将 293 细胞以 1×10^5 /孔铺六孔板,在含 5%CO₂ 的 37℃温箱中孵育 12~24 h 后进行细胞转染。转染前 2 h 将含 10%FBS 的 DMEM 换成无血清的 DMEM 培养基,每个孔加的试剂量如下:pARC-T 质粒 DNA 3 μg,pAAV-EGFP 质粒 DNA 3 μg,2M CaCl₂ 7 μL,用灭菌水定容至 50 μL,混匀后再逐滴加入 2×HBS 盐溶液,静置 2 min 后,将其逐滴加入 HEK293 细胞中。8 h 后将无血清 DMEM 换成含 10%FBS 的 DMEM,并按照 MOI=0.5 加入 Ad5,72 h 后收细胞。4 000 r/min 离心 5 min。去掉约四分之三上清。反复冻融 3 次,4 000 r/min 离心 5 min,取上清,56℃0.5 h 灭活腺病毒。

1.5.2 荧光蛋白的表达

将 BEL7402 细胞和 SK-OV-3 细胞分别以 2×10^5 /孔铺六孔板,在含 5%CO₂ 的 37℃温箱中孵育 12~24 h 待细胞贴壁后,加入收取的包装有 EGFP 基因的嵌合 AAV(cAAV-EGFP)上清液 200 μL/孔。72~96 h 后观察绿色荧光蛋白表达。

2 结果

2.1 pAdB 载体的鉴定

pAdB 载体上有 *Xba*I、*Hind*III、*Spe*I、*Eco*RI 和 *Xma*I 等酶切位点。用这几种酶进行单酶切和双酶切鉴定,酶切产物电泳结果(图 1)显示,酶切条带正确,证明该质粒构建正确,可用于下一步的 pARC 载体库的构建工作。

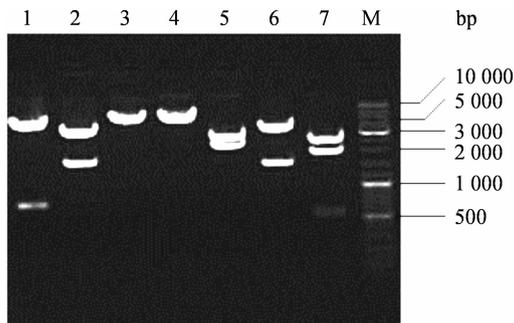


图 1 重组 pAdB 载体酶切电泳图

M:DNA ladder mix; 1:Digested by *Hind*III and *Spe*I(697+4618); 2:Digested by *Hind*III and *Xba*I(1716+3587); 3:Digested by *Xba*I(5303); 4:Digested by *Hind*III(5303); 5:Digested by *Xba*I and *Spe*I(2408+2907); 6:Digested by *Xba*I and *Eco*RI(1596+3707); 7:Digested by *Xma*I(11+11+587+2017+2687)

2.2 PARC 文库构建中主要实验结果

(a) 用引物 9 和 10 扩增 *Cap*5,用引物 7 和 8 扩

增其它 8 种 *Cap*,得到 *Cap*5 为 2 143 bp,其它 8 种 *Cap* 大小为 2 500 bp 左右(图 2)。

(b) 用 DNaseI 16℃酶切 AAV1~9 *Cap* 2 min 后,电泳结果显示,条带大小在 100~300 bp 之间,与预期的大小相符,可用于 Shuffling(图 3)。

(c) 用引物 7 和 8 对 DNaseI 酶切 AAV1-9 *Cap* 产物进行扩增,产物大小约为 2 500 bp 的条带,与用相同引物扩增的 *Cap* 大小相同(图 4)。

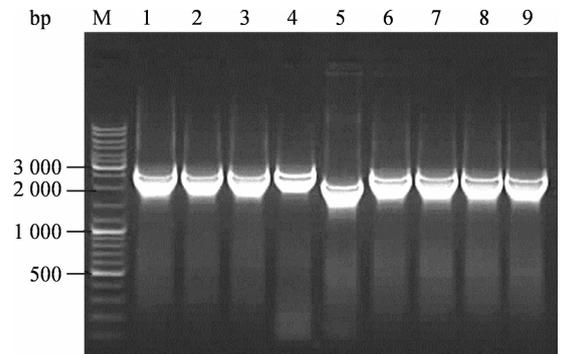


图 2 AAV1~9 *Cap* 基因 PCR 结果

M: DNA ladder mix, 1~9: AAV1~AAV9 *Cap*

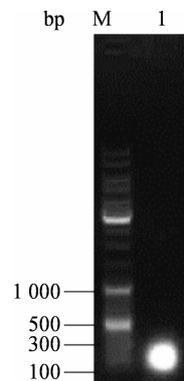


图 3 DNase I 酶切产物鉴定图

M: DNA ladder mix, 1: production of DNaseI

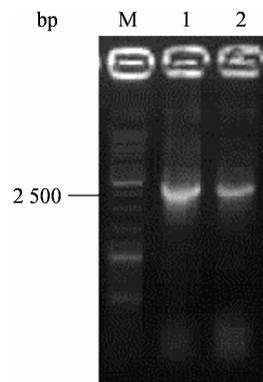


图 4 DNA shuffling PCR 产物鉴定图

M: DNA ladder mix, 1,2: AAV1~9 *Cap* Shuffling PCR

2.3 嵌合 AAV(cAAV)筛选 PCR 检测结果

每轮筛选后,提取病毒 DNA,用引物 5 和 6 扩

增嵌合 *Cap* 序列进行电泳检测(图 5)。第一轮筛选后,条带非常微弱;第二轮筛选后基本看不到扩增条带;而第三轮筛选后 2 500 bp 左右的条带很明亮,说明第三轮筛选对 cAAV 起到了富集作用,筛选到了 cAAV。因此,决定用此筛选到的 cAAV 构建 pARC-T 载体,检测其感染效率。

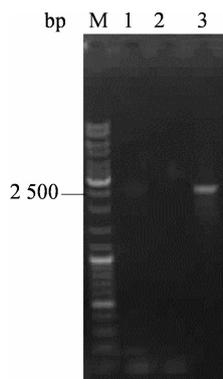


图 5 cAAV 筛选 PCR 检测图

1: one round of screening; 2: two round of screening;
3: three round of screening

2.4 cAAV-EGFP 感染 BEL7402 和 SK-OV-3 细胞结果

通过对比感染实验,发现 cAAV 对 BEL7402 细胞的感染效率要远远高于对 SK-OV-3 的感染效



图 7 cAAV *Cap* 序列组成图

3 讨论

到目前为止,DNA 改组的研究成果主要涉及到以下几个方面:提高蛋白质的功能(酶活,底物特异性,热稳定性和抗体的产量),开发新的代谢途径,医药研究(生物制药、疫苗研制、基因治疗),改变离子通道,改造报告基因和创造新的毒素基因等^[10]。Lin Yang 等^[9]曾利用 shuffling 技术筛选出对心肌感染性较强的嵌合 AAV。本文利用 shuffling 技术在基因治疗的载体构建方面做了一些探索性研究。

Shuffling 技术虽然已是非常成熟的技术,可是在实际操作过程中有许多条件还是要仔细的摸索,比如 DNaseI 酶切片段的大小,以及控制好 DNaseI 酶切的时间和温度等。按文献上所说,改组模板在 1 000 bp 以上时,一般最好控制在 200 bp 左右;不到 1 000 bp 时,一般最好将基因切成 50 bp 左右,随机片段的大小与重组频率、突变频率有重要关系,片段越小,突变重组的频率越高^[10]。本研究扩增的 AAV1~9 *Cap* 基因大小在 2 500 bp 左右(*Cap* 基

率(图 6)。几乎所有的 BEL7402 细胞都表达出了绿荧光,但只有一小部分的 SK-OV-3 细胞表达了绿荧光,说明筛选出的嵌合 AAV 对 BEL7402 细胞具有很好的靶向性。

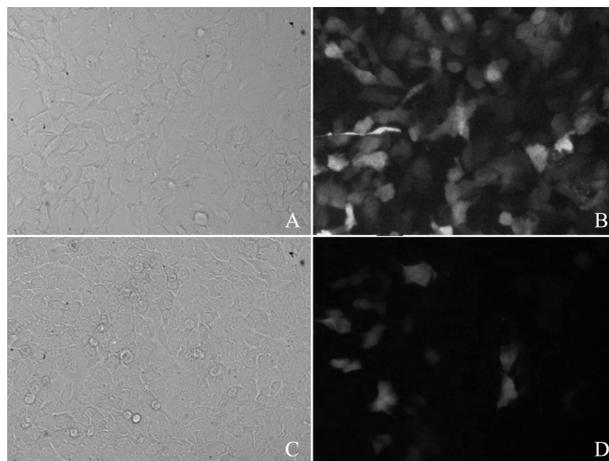


图 6 cAAV-EGFP 病毒感染能力检测

A、B: BEL7402; C、D: SK-OV-3; 放大倍数 200

2.5 cAAV *Cap* 序列的组成

用 Vector NTI 将测序结果与 AAV1~9 *Cap* 序列进行序列比对,发现 cAAV *Cap* 序列由 AAV2, AAV7 和 AAV8 三种 AAV 的 *Cap* 序列组成的,全长 2 209 bp(图 7)。

因实际大小约 2 200 bp)。酶切片段大小在 100~300 bp 之间,比较符合文献中的原则。如果片段过大的话,可能会无法扩增成完整的嵌合片段;而太小的话,又会使酶切后小片段的回收效率大大降低。DNaseI 酶切效率非常高,其本来的用途是将 DNA 切成单核苷酸,完全分解 DNA,消除其对 RNA 的影响。在常温下,DnaseI 的作用非常强烈,短暂的十几秒时间就会将 DNA 切成寡核苷酸片段,而此时反应液可能并未混匀,造成有的片段完全酶解,有的还没有被酶解。因此降低温度,使酶的活性降低,以获得理想的酶切产物。实验证实,10~16℃ 之间作用 2~3 min 都可将 DNA 片段切成 100~300 bp 大小的片段,而 2~3 min 的时间是易于控制的,16℃ 的温度也与实验室的连接反应温度一样,免于频繁调节,因此最终选用 16℃ 反应 2 min。

另外,在进行 shuffling 时模板的浓度也非常关键。因为需要将同源性的片段扩增成完整的 DNA 片段,因此,如模板浓度过低有可能扩增不出来。实验表明,在进行 50 μ L shuffling 反应时,加入的模

板量最好不要低于 $0.1 \mu\text{g}$, $0.1 \sim 0.3 \mu\text{g}$ 之间都可产生较亮的扩增片段。随着模板量的减少,合拉的片段浓度会越来越低,以至于最终产生不了完整的合拉片段。

利用 shuffling 技术得到高效嵌合 AAV 的关键是足够大的库容,以及细致的筛选工作。本研究筛选到了符合预期的嵌合 AAV 再次证明此实验方案有很好的可行性。笔者得到了能够包装出病毒的,并且对肝癌细胞有一定靶向性的嵌合 AAV。由于库容量的限制,暂时还未筛选到更为高效的嵌合 AAV。此外,筛选到的嵌合 AAV 对 SK-OV-3 也有一定的感染性,说明其靶向性还有待提高,原因可能是 AAV2 本身对 SK-OV-3 细胞具有一定的感染性,而且在形成嵌合体时并没有完全破坏其对 SK-OV-3 的感染能力。本研究为筛选更高效的嵌合 AAV 提供了一条可行的实验思路。

参考文献:

- [1] Sharma A, Ghosh A, Hansen E T, et al. Transduction efficiency of AAV 2/6, 2/8 and 2/9 vectors for delivering genes in human corneal fibroblasts[J]. Brain Research Bulletin, 2010, 81(2-3): 273-278.
- [2] Foust K D, Nurre E, Montgomery C L, et al. Intravascular AAV9 preferentially targets neonatal neurons and adult astrocytes[J]. Nat Biotechnol, 2009, 27(1): 59-65.

- [3] Ku C A, Chiodo V A, Boye S L, et al. Gene therapy using self-complementary Y733F capsid mutant AAV2/8 restores vision in a model of early onset Leber congenital amaurosis [J]. Hum Mol Genet, 2011, 20(23): 4569-4581.
- [4] Li H, Malani N, Hamilton S R, et al. Assessing the potential for AAV vector genotoxicity in a murine model [J]. Blood, 2011, 117(12): 3311-3319.
- [5] Aartsen W M, van Cleef K W, Pellissier L P, et al. GFAP-driven GFP expression in activated mouse Müller glial cells aligning retinal blood vessels following intravitreal injection of AAV2/6 vectors [J]. PLoS ONE, 2010, 5(8): e12387.
- [6] Stemmer W P. DNA shuffling by random fragmentation and reassembly: in vitro recombination for molecular evolution[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994, 91(22): 10747-10751.
- [7] Stemmer W P. Rapid evolution of a protein in vitro by DNA shuffling[J]. Nature, 1994, 370(6488): 389-391.
- [8] Rosic N N, Huang W, Johnston W A, et al. Extending the diversity of cytochrome P450 enzymes by DNA family shuffling[J]. Gene, 2007, 395(1-2): 40-48.
- [9] Yang L, Jiang J, Drouin L M, et al. A myocardium tropic adeno-associated virus (AAV) evolved by DNA shuffling and in vivo selection[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009, 106(10): 3946-3951.
- [10] 单世平, 夏立秋, 丁学知, 等. DNA 改组的最新动态及应用前景[J]. 中国生物工程杂志, 2009, 29(10): 92-97.

The Libraries Building and Screening of Chimeric AAV Targeting Liver Cancer Cells

ZHAO Jing-chuan¹, YAN Qiao-ling², QIAN Qi-jun^{1,2*}

(1. Xinyuan Institute of Medicine and Biotechnology, School of Life Sciences, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China; 2. Laboratory of Virus and Gene Therapy, Eastern Hepatobiliary Surgical Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200438, China)

Abstract: To screen chimeric AAV vectors targeting liver cancer cells effectively, AAV 1-9 *Cap* genes are shuffled. A pAdB vector is made containing AAV 2 ITR and Rep2 gene by reforming a pAAV-MCS vector. Then, a pool of pARC vectors with chimeric *Cap* gene based on pAdB is built. Chimeric AAV viruses are packaged by cotransfecting 293 cells with Ad5 and pARC vectors. Chimeric AAV virus and Ad5 coinfect BEL7402 cells to obtain the chimeric AAV virus that can effectively infect the BEL7402 cells through three rounds of screening. In the end, the *Rep2*-Chimeric *Cap* genes are linked to the pMD18-T vector to build the pARC-T vector. The pARC-T vector cotransfect 293 cells with AAV-EGFP plasmid and Ad5, and the AAV virus with EGFP gene and AAV *Cap* capsid is made to infect BEL7402 cells and express the EGFP proteins. The EGFP proteins are expressed, which proves that the chimeric AAV virus targeting BEL7402 cells have been screened.

Key words: shuffling; chimeric AAV; targeting; liver cancer cells

(责任编辑: 许惠儿)