

## 论著

文章编号:1000-5404(2012)09-0862-04

### 重组腺病毒 Ad5F11pTPEGFP 的构建及其对 UT-7/Epo 细胞感染效率的检测

刘雪莉\*, 宋敬东\*, 郭小娟, 王敏, 曾茁壮, 洪涛 (100052 北京, 中国疾病预防控制中心病毒病所)

**[摘要]** **目的** 构建携带报告基因绿色荧光蛋白(GFP)的重组腺病毒 Ad5F11pTPEGFP, 并且研究该病毒对人白血病细胞 UT-7/Epo 的感染效率及其在细胞中的复制。**方法** 先通过分子克隆技术构建重组腺病毒质粒 pAd5F11pTPEGFP, 然后利用脂质体转染法, 将其转染至 HEK293 细胞包装出重组腺病毒 Ad5F11pTPEGFP, 经酶切和 PCR 鉴定正确后, 扩增并纯化得到滴度较高的重组腺病毒。以空载体病毒 Ad5GFP 作为对照, 将纯化的重组腺病毒感染 UT-7/Epo 细胞, 经流式细胞仪检测在不同感染复数(MOI)下荧光阳性细胞比例, 即为 Ad5F11pTPEGFP 病毒对 UT-7/Epo 细胞的感染效率, 同时将冻融后的重组腺病毒感染的 UT-7/Epo 细胞上清感染 HEK293 细胞, 48 h 后观察 GFP 在 HEK293 细胞中的表达。**结果** 成功制备了重组腺病毒 Ad5F11pTPEGFP, 其对 UT-7/Epo 细胞的感染效率明显高于空载体对照病毒 Ad5GFP, 在 MOI 为 200 时, 感染效率达 98.2%, 而空载体病毒在 MOI 为 200 时, 对 UT-7/Epo 细胞的感染效率仅为 29.7%。感染了重组腺病毒的 UT-7/Epo 细胞冻融上清感染新的 HEK293 细胞后, 荧光显微镜下观察到 GFP 的表达。**结论** 成功构建了重组腺病毒 Ad5F11pTPEGFP, 其对 UT-7/Epo 细胞有较高的感染效率, 并能在其中复制。

**[关键词]** 重组腺病毒; 端粒酶; 纤维顶球; UT-7/Epo 细胞

**[中图分类号]** R394.33; R394.3; R733.7

**[文献标志码]** A

### Construction of a recombinant adenovirus Ad5F11p-TPEGFp and evaluation of its transfection efficiency to UT-7/Epo cells

Liu Xueli, Song Jingdong, Guo Xiaojuan, Wang Min, Zeng Zhuozhuang, Hong Tao (Institute of Viral Disease, Chinese Centre for Disease Control and Prevention, Beijing, 100052, China)

**[ Abstract ] Objective** To construct a recombinant adenovirus Ad5F11p encoding promoter of telomerase reverse transcriptase (TPEGFp) and evaluate its efficiency in the transfection of UT-7/Epo cells. **Methods** A novel plasmid pAd5F11p-TPEGFp was constructed by molecular cloning. The recombinant adenovirus Ad5F11p-TPEGFp was packaged in HEK293 cells after transfection. The infectious titer of the identified recombinant adenovirus was determined by limiting dilution assay on HEK293 cells after purified by double CsCl density gradient ultracentrifugation. The recombinant adenovirus Ad5F11p-TPEGFp encoding green fluorescence protein (GFP) gene was transferred into human leukemic cell lines UT-7/Epo cells. The gene transduction efficiency was determined by fluorescence-activated cell sorting assay by flow cytometry. The lysates of UT-7/Epo cells which infected with the recombinant adenovirus were prepared by three cycles of freeze and thaw and used to infect fresh HEK293 cells, and the expression of GFP was observed in 48 h after infection with flow cytometry. **Results** The recombinant adenovirus was successfully prepared and the infectious titer of the virus was  $2 \times 10^{10}$  IU/ml. The recombinant adenovirus was significantly more effective than control Ad5GFP in the infection of UT-7/Epo cells. At 200 MOI, Ad5F11p-TPEGFp transduced about 98.2% UT-7/Epo cells, while Ad5GFP only transduced less than 30% at 200 MOI. GFP was observed in UT-7/Epo cells when infected with Ad5F11p-TPEGFp, and GFP was also seen in the fresh HEK293 cells which infected by lysate of UT-7/Epo cells. **Conclusion** The recombinant adenovirus pAd5F11p-TPEGFp is successfully constructed which can infect UT-7/Epo cells effectively and replicate in UT-7/Epo cells.

**[ Key words ]** recombinant adenovirus; telomerase; fiber; UT-7/Epo cells

Supported by the Major Program of National Science and Technology(2011ZX10004-001). Liu Xueli and Song Jingdong are first authors who contributed equally to the article. Corresponding author: Wang Min, E-mail: minw\_12@163.com

**[ 基金项目 ]** 国家科技重大专项(2011ZX10004-001)

\* 同等贡献者

**[ 通信作者 ]** 王敏, E-mail: minw\_12@163.com

目前 B19 在体外不能常规培养,这不但限制了感染性 B19 病毒的来源(目前只能从病毒血症者的血清中获得),也使得 B19 病毒致病机制研究相对滞后。细小病毒 B19 可以在红系骨髓细胞中复制产生高滴度的子代病毒,但骨髓造血细胞来源有限,不能用来扩毒。至今为止,B19 还不能通过体外培养获得足量能维持病毒滴度的子代病毒产量。新近研究表明腺病毒相关基因对 B19 病毒复制有辅助作用<sup>[1]</sup>,在腺病毒或携带腺病毒相关基因质粒(简称腺病毒质粒)的辅助作用下,人细小病毒 B19 能在非容许细胞 HEK293 中复制,并产生低水平的感染性子代病毒。而此辅助作用在 B19 病毒的半容许细胞 UT-7/Epo-s1(UT-7/Epo 细胞的 1 株亚克隆)中表现较弱。受这一研究结果的启发,我们试图构建 1 株能高效感染 UT-7/Epo 细胞并能在其中复制的重组腺病毒,以重组腺病毒作为 B19 的辅助病毒感染 UT-7/Epo 细胞,既能提供帮助 B19 复制的腺病毒相关基因产物,又可避免由于腺病毒对 UT-7/Epo 细胞感染效率较低或电转造成细胞的较大损伤而导致在 UT-7/Epo 细胞中表现出的较弱的辅助作用。为此,我们应用肿瘤特异性启动子端粒酶逆转录酶启动子(promoter of telomerase reverse transcriptase, TERTp)作为重组腺病毒的启动子,利用溶瘤腺病毒特异性杀伤肿瘤细胞的策略之一<sup>[2]</sup>,即在关键基因前加入肿瘤细胞的特异性启动子,使得腺病毒复制的基因能在肿瘤细胞内有效表达。前期研究表明,将 Ad5 纤维顶球(fiber)基因替换为 Ad11p 同源基因的重组腺病毒 Ad5F11pGFP 具有高效感染 U937、K562 等造血肿瘤细胞的能力<sup>[3]</sup>。结合以上两方面实验策略,本实验构建了携带 GFP 报告基因,受端粒酶逆转录酶启动子 TERTp 控制。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 病毒、细胞及质粒 病毒 Ad5GFP 和 HEK293 细胞, *E. coli* TOP10 感受态细胞,质粒 pAd5F11pGFP<sup>[3]</sup> 和 pAdTPEGFP<sup>[4]</sup> 均为本实验室保存;UT-7/Epo 细胞为军事医学科学院放射与辐射医学研究所实验血液学研究室惠赠。

1.1.2 主要试剂及仪器 脂质体 Lipofectamine 2000 购自 Invitrogen 公司, Solution I 连接酶、*Hpa* I 核酸内切酶及 DNA 分子量标准均为 TaKaRa 公司产品, *Pac* I、*Bam*H I 核酸内切酶、牛小肠碱性磷酸酶(CIAP)均为 NEB 公司产品,IMDM(Iscove modified Dulbecco medium)培养基、胎牛血清均为 HyClone 公司产品,流式细胞仪(BD 公司产品)。荧光倒置显微镜(Nikon 公司产品),CO<sub>2</sub> 培养箱(Thermo 公司产品)。

### 1.2 方法

1.2.1 重组腺病毒质粒 pAd5F11pTPEGFP 的构建和鉴定 *Bam*H I 分别酶切 pAd5F11pGFP 和 pAdTPEGFP 质粒,回收目标片段和载体,载体用 CIAP 去磷酸化后,经连接酶 Solution I

连接过夜。连接产物转化感受态细菌 TOP10,挑取单个转化菌落,小量提取质粒,经 *Hpa* I 和 *Pac* I 酶切鉴定和 PCR 鉴定正确后,进行大量制备。

1.2.2 重组腺病毒 Ad5F11pTPEGFP 的制备 pAd5F11pTPEGFP 质粒经 *Pac* I 酶切线性化,加入醋酸钠(0.3 mol/L)混匀,经预冷的无水乙醇沉淀后冰置过夜,75% 乙醇洗涤沉淀,溶于 20 μl 无菌水中。按照 Lipofectamine 2000 的说明操作,将 5 μg 线性化 Ad5F11pTPEGFP 质粒转染至融合度为 80% ~ 90% 的 HEK293 细胞,制备 Ad5F11pTPEGFP 重组腺病毒。

1.2.3 重组腺病毒 Ad5F11pTPEGFP 的鉴定 Hirt 法<sup>[5]</sup> 提取 Ad5F11pTPEGFP 重组腺病毒基因组,对基因组分别进行酶切和 PCR 鉴定。*Hpa* I 酶切理论可获得 1 857、1 610、7 708、956、10 368、11 936 bp 片段大小酶切产物;针对 AdF11p fiber(以下简称为 F11p)和端粒酶逆转录酶启动子(以下简称为 TPE)基因各设计 1 对引物,F11p 上游引物为 5'-GAAAGAAAA-CATAAGTCCACC-3',下游引物为 5'-CAGTAGAATCGAAAAA-CAGCTCT-3',扩增产物大小 374 bp;TPE 上游引物为 5'-AAACATCAATGTATCTTAACGC-3',下游引物为 5'-CACCTCCGTGGCAGATAATA-3',扩增产物大小 521 bp;取 Ad5F11pTPEGFP 重组腺病毒基因组 1 μl 作为模板,对 TPE 和 F11p 基因进行同时扩增。循环参数为 94 °C 预变性 3 min;94 °C 变性 30 s,48 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 40 s,30 个循环;72 °C 延伸 5 min,0.8% 琼脂糖凝胶电泳,以正常 HEK293 细胞为阴性对照,质粒 pAd5F11pGFP 和 pAd5TPEGFP 分别作为 F11p 和 TPE 基因的阳性对照。

1.2.4 重组腺病毒 Ad5F11pTPEGFP 的扩增、纯化与滴度测定 用已获得的重组腺病毒感染 HEK293 细胞,得到扩增的病毒液,经 CsCl 密度梯度超速离心纯化后,于 -80 °C 保存。用紫外分光光度计法<sup>[6]</sup> 和有限稀释法<sup>[7]</sup> 测定 Ad5F11pTPEGFP 重组腺病毒的颗粒滴度(viral particle unit per milliliter, vp/ml)和感染滴度(infection unit per milliliter, IU/ml)。

1.2.5 重组腺病毒 Ad5F11pTPEGFP 感染 UT-7/Epo 细胞的效率 UT-7/Epo 细胞于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 条件下培养于含 10% 胎牛血清的 IMDM 培养基中。取对数生长期细胞接种于 24 孔板,2 × 10<sup>5</sup>/孔,分为 2 组进行感染,其中 1 组感染空载体病毒 Ad5GFP,另 1 组感染重组腺病毒 Ad5F11pTPEGFP。用无血清培养基分别将 Ad5GFP、Ad5F11pTPEGFP 病毒原液稀释成不同浓度的病毒悬液,以 10 ~ 400 MOI 的感染复数分别感染 UT-7/Epo 细胞,终体积为 250 μl/孔。感染后 6 h 补加新鲜培养基,250 μl/孔(每个感染剂量设 3 个复孔,实验重复 3 次)。感染 48 h 后,流式细胞仪检测荧光阳性细胞比例,即为该病毒相应感染剂量下的感染效率。

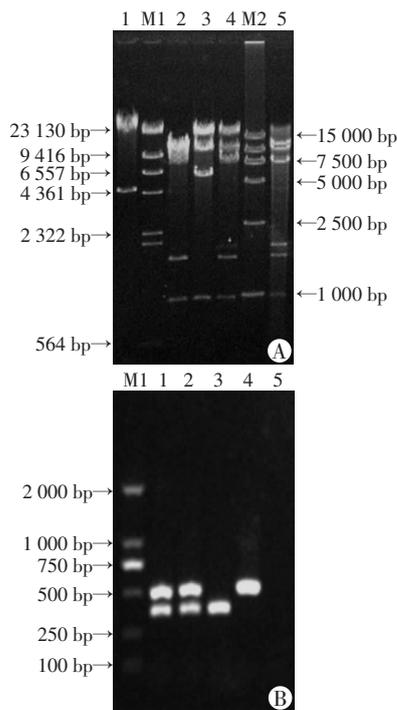
### 1.3 统计学分析

采用 SPSS 12.0 统计软件进行两组间均数比较的 *t* 检验。

## 2 结果

### 2.1 重组腺病毒质粒 pAd5F11pTPEGFP 的鉴定

*Hpa* I 酶切获得 1 610、7 708、956、10 368、18 373 bp 片段大小产物,*Pac* I 酶切获得 4 580、34 435 bp 片段大小产物(图 1A);酶切和 PCR 产物大小(图 1B)均与理论值一致,表明含有 F11p 和 TPE 基因的重组腺病毒质粒构建成功。



A: 酶切鉴定 1: *Pac* I 酶切腺病毒质粒 pAd5F11pTPEGFP; M1:  $\lambda$ -Hind III DNA 标准; 2~4: *Hpa* I 分别酶切 pAdTPE-GFP 质粒、pAd5F11pGFP 质粒和重组腺病毒质粒 pAd5F11pTPEGFP; M2: DL15000 DNA 标准; 5: *Hpa* I 酶切重组腺病毒 Ad5F11pTPEGFP 基因组; B: PCR 鉴定 M1: DL2000 DNA 标准; 1~4: 分别为以重组腺病毒质粒 pAd5F11pTPEGFP、重组腺病毒 Ad5F11pTPEGFP 基因组、质粒 pAd5F11pGFP 和质粒 pAdTPEGFP 为模板同时扩增 F11p 和 TPE 基因; 5: 阴性对照

图1 重组腺病毒质粒 pAd5F11pTPEGFP 及病毒基因组的鉴定

## 2.2 重组腺病毒 Ad5F11pTPEGFP 的拯救

将线性化的 pAd5F11pTPEGFP 质粒转染 HEK293 细胞, 获得了重组腺病毒 Ad5F11pTPEGFP。荧光倒置显微镜观察发现转染后 24~48 h 可见绿色荧光产生(图 2A), 转染后 8~10 d 出现典型的细胞病变效应(图 2B)。

## 2.3 重组腺病毒 Ad5F11pTPEGFP 能感染 UT-7/Epo 细胞并能在其中复制

病变的 HEK293 细胞经冻融裂解后离心, 取上清感染 UT-7/Epo 细胞, 48 h 内可见绿色荧光产生(图 2C), 表明获得的重组腺病毒可以感染 UT-7/Epo 细胞。将感染的 UT-7/Epo 细胞冻融, 取上清感染新的 HEK293 细胞, 48 h 内可见绿色荧光产生(图 2D), 表明构建的重组腺病毒 Ad5F11pTPEGFP 能在 UT-7/Epo 细胞中复制并产生子代病毒。

## 2.4 重组腺病毒 Ad5F11pTPEGFP 的鉴定

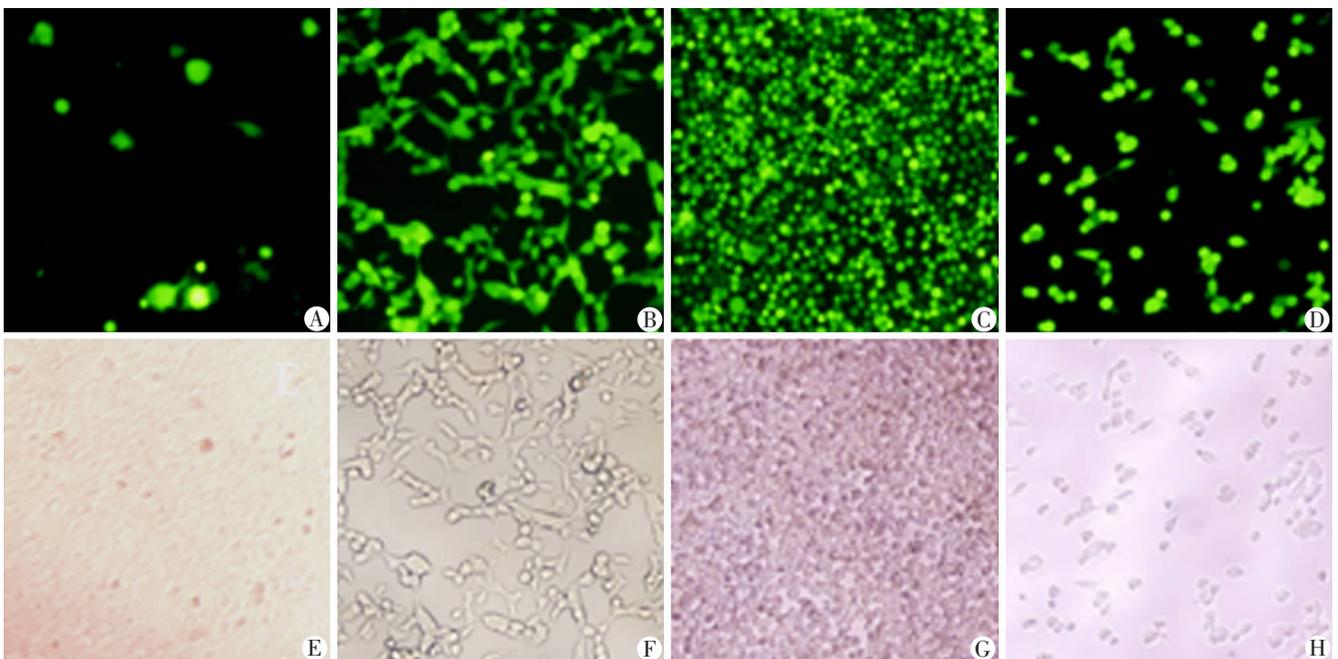
重组腺病毒 Ad5F11pTPEGFP 基因组酶切片大小和 PCR 产物大小均与理论值一致(图 1A 泳道 5 和图 1B 泳道 2), 表明同时含有 F11p 和 TPE 基因的重组腺病毒构建成功。

## 2.5 重组腺病毒 Ad5F11pTPEGFP 的扩增、纯化与滴定

在 HEK293 细胞中大量扩增重组腺病毒, 收集细胞, 冻融 3 次释放病毒, 经 CsCl 密度梯度超速离心纯化后, 获得高度浓缩病毒, Ad5F11pTPEGFP 病毒颗粒浓度和感染滴度分别为  $3.75 \times 10^{11}$  vp/ml 和  $2 \times 10^{10}$  U/ml, 两者比值约为 19, 重组腺病毒的颗粒浓度、感染滴度值及其比值均符合本实验要求, 可用于实验研究。

## 2.6 重组腺病毒 Ad5F11pTPEGFP 体外感染 UT-7/Epo 细胞的感染效率

经流式细胞仪检测得到, 当以 10 MOI 感染 UT-7/Epo 细胞时, 重组腺病毒 Ad5F11pTPEGFP 感染效率可达 50% 以上; 此后



A~D: 绿色荧光; E~H: 可见光; A, E: 线性化 pAd5F11pTPEGFP 质粒转染 HEK293 (48 h); B, F: 线性化 pAd5F11pTPEGFP 质粒转染 HEK293 (8 d); C, G: 转染的 HEK293 细胞冻融上清感染 UT-7/Epo 细胞; D, H: 感染 Ad5F11pTPEGFP 的 UT-7/Epo 细胞冻融上清感染 HEK293 细胞

图2 重组腺病毒 Ad5F11pTPEGFP 的拯救 (×100)

随着 MOI 升高,感染效率逐渐增加,MOI 为 200 时,感染效率达 98.2%。Ad5GFP 空载体病毒感染 UT-7/Epo 细胞,在 MOI 达到 400 时感染效率仅为 33.7% (表 1),由此可见重组腺病毒 Ad5F11pTPEGFP 对 UT-7/Epo 细胞的感染效率高于空载体病毒 Ad5GFP( $n=3, P<0.01$ )。

表 1 重组腺病毒 Ad5F11pTPEGFP 和空载体病毒 Ad5GFP 感染 UT-7/Epo 细胞的感染效率的比较 (%)

MOI	Ad5GFP	Ad5F11pTPEGFP
10	-	57.9
20	-	69.5
50	17.8	75.3 <sup>a</sup>
100	23.8	97.4 <sup>a</sup>
200	29.7	98.2 <sup>a</sup>
400	33.7	-

a:  $P<0.01$ , 与 Ad5GFP 比较

### 3 讨论

本研究基于 Ad5 构建的重组腺病毒 Ad5F11pTPEGFP,兼有以下两个特点,第一,Ad5 的纤维顶球 (fiber) 基因由 B 组人腺病毒 Ad11p 的同源基因构成,新近的研究表明,除 CD46 分子外,Ad11p 还可以通过其他受体分子进入细胞<sup>[8-9]</sup>,预想构建的重组腺病毒对 UT-7/Epo 造血肿瘤细胞有较高的感染效率。这一点得到了证实,携带有 Ad11p 纤突蛋白同源基因的重组腺病毒 Ad5F11pTPEGFP 对 UT-7/Epo 的感染效率明显高于空载体腺病毒 Ad5GFP。当重组腺病毒 Ad5F11pTPEGFP MOI 为 10 时,荧光阳性细胞比例即可达 50% 以上,而空载体腺病毒 Ad5GFP MOI 为 400 时,荧光阳性细胞比例仅为 33.7%。第二,新构建的重组腺病毒基因组内,肿瘤特异性启动子 TERTp 替代内源性腺病毒 E1A 启动子,它含有除 E1A 启动子之外的全部 E1 区基因,即重组腺病毒基因组 E1A 区受 TERTp 控制,能够特异地启动 Ad5F11pTPEGFP 在端粒酶阳性肿瘤细胞中复制。有研究表明,在 85% 以上的恶性肿瘤中都有端粒酶的激活<sup>[10]</sup>,我们期望新构建的重组腺病毒能在人白血病细胞 UT-7/Epo 中复制。UT-7/Epo 细胞作为细小病毒 B19 的半容许细胞之一,用于细小病毒 B19 的体外培养体系的研究,尽管细小病毒 B19 感染 UT-7/Epo 细胞时,病毒复制程度和子代病毒产量远不及感染骨髓细胞高<sup>[11]</sup>,且 1 项比较研究表明 UT-7/Epo 细胞的 1 株亚克隆 UT-7/Epo-s1 对细小病毒 B19 更为敏感<sup>[12]</sup>,但后两者细胞的来源有限,在用于 B19 体外培养的研究方面,其应用受到限制。故我们应用常用于 B19 病毒体外培养研究的半容许细胞 UT-7/Epo 进行实验。利用 GFP 作为报告基因,通过荧光显微镜我们观察到,感染重组腺病毒 Ad5F11pTPEGFP 的 UT-7/Epo 冻融上清感染新的 HEK293 细胞,48 h 内出现 GFP 的表达。这表明构建

的重组腺病毒能够在 UT-7/Epo 细胞中复制,并且产生了有感染性的子代病毒。

综上所述,本实验构建的重组腺病毒 Ad5F11pTPEGFP 既能高效感染 UT-7/Epo 细胞,又能在其中复制。基于这两点,预计构建的重组腺病毒 Ad5F11pTPEGFP 在体外以低剂量高效感染 UT-7/Epo 细胞,既不足以对 UT-7/Epo 细胞产生明显的杀伤作用,又可在细胞中复制,反式提供细小病毒 B19 复制的基因转录产物<sup>[1]</sup>E1A、E1B55K、E2A、E4orf6 和 VARNA,从而为细小病毒 B19 在 UT-7/Epo 细胞的高效复制创造条件,为实现 B19 在 UT-7/Epo 细胞中产生更高水平的感染性子代病毒及其体外培养研究奠定基础。

### 参考文献:

- [1] Guan W, Wong S, Zhi N, *et al.* The genome of human parvovirus b19 can replicate in nonpermissive cells with the help of adenovirus genes and produces infectious virus [J]. *J Virol*, 2009, 83 (18): 9541 - 9553.
- [2] Kanerva A, Hemminki A. Modified adenoviruses for cancer gene therapy [J]. *Int J Cancer*, 2004, 110(4): 475 - 480.
- [3] Lu Z Z, Ni F, Hu Z B, *et al.* Efficient gene transfer into hematopoietic cells by a retargeting adenoviral vector system with a chimeric fiber of adenovirus serotype 5 and 11p [J]. *Exp Hematol*, 2006, 34(9): 1171 - 1182.
- [4] Liu H Y, Han B J, Zhong Y X, *et al.* A three-plasmid system for construction of armed oncolytic adenovirus [J]. *J Virol Methods*, 2009, 162(1/2): 8 - 13.
- [5] Hirt B. Selective extraction of polyoma DNA from infected mouse cell cultures [J]. *J Mol Biol*, 1967, 26(2): 365 - 369.
- [6] Sweeney J A, Hennessey J P Jr. Evaluation of accuracy and precision of adenovirus absorptivity at 260 nm under conditions of complete DNA disruption [J]. *Virology*, 2002, 295(2): 284 - 288.
- [7] Nyberg-Hoffman C, Shabram P, Li W, *et al.* Sensitivity and reproducibility in adenoviral infectious titer determination [J]. *Nat Med*, 1997, 3(7): 808 - 811.
- [8] Wang H, Li Z Y, Liu Y, *et al.* Desmoglein 2 is a receptor for adenovirus serotypes 3, 7, 11 and 14 [J]. *Nat Med*, 2011, 17(1): 96 - 104.
- [9] Tuve S, Wang H, Ware C, *et al.* A new group B adenovirus receptor is expressed at high levels on human stem and tumor cells [J]. *J Virol*, 2006, 80(24): 12109 - 12120.
- [10] Kim N W, Piatyszek M A, Prowse K R, *et al.* Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer [J]. *Science*, 1994, 266(5193): 2011 - 2015.
- [11] Shimomura S, Komatsu N, Frickhofen N, *et al.* First continuous propagation of B19 parvovirus in a cell line [J]. *Blood*, 1992, 79 (1): 18 - 24.
- [12] Wong S, Brown K E. Development of an improved method of detection of infectious parvovirus B19 [J]. *J Clin Virol*, 2006, 35(4): 407 - 413.

(收稿:2011-11-01;修回:2012-01-04)

(编辑 邓强庭)