

CELO 病毒载体在人类和动物疾病控制上的应用*

王凤雪** 王云峰

(中国农业科学院哈尔滨兽医研究所兽医生物技术国家重点实验室 哈尔滨 150001)

摘要 CELO 病毒的 DNA 长 43.8kb, 具有末端倒转重复序列(ITR), 基因结构与人腺病毒的比较, 无可识别的 E1、E3 和 E4 区, 但存在可替代的新读码框。2 个 fiber 基因是病毒毒力基因, 表达 2 个不同的蛋白, 在病毒复制扩散中起作用, 缺失 fiber1 导致柯萨奇病毒和腺病毒受体(CAR)的特异性转导作用消失, 使 CELO 病毒只能感染禽类细胞, 不能感染哺乳类动物细胞。在基因组的某些区段可以删除并插入外源基因不影响病毒复制。CELO 病毒及其载体可在廉价的鸡胚中得到大量复制。CELO 病毒的这些特性为其发展成新型基因工程载体提供了条件。插入表达外源基因制备疫苗成为可能, 新型的无病毒基因的载体也可以应用 ITR 及一些调控元件、包装信号共同构建形成。CELO 病毒与人腺病毒属于同一属, CELO 病毒作为基因工程载体有同样的特性, 并且具有种属特异性和安全性, 在动物基因工程疫苗的研制方面有特殊而广阔的研究和应用前景。

关键词 CELO 病毒 基因组结构 fiber 基因工程载体 疫苗

CELO 病毒(Chicken Embryo Lethal Orphan Virus, CELOV)即鸡胚致死孤儿病毒, 属于腺病毒科, 禽腺病毒属, 鸡腺病毒 1 型, 归于腺病毒 A 群。1954 年 Yates 等首次报告从鸡胚中分离到一种新病毒, 并于 1957 年命名为鸡胚致死孤儿病毒, 简称 CELO 病毒^[1]。由于 CELO 病毒具有禽腺病毒属内各种的主要生物学特性及抗原特性, 1982 年国际病毒学分类委员会(ICTV)第四次报告把 CELO 病毒确定为禽腺病毒属的代表种。

1 CELO 病毒基因组结构

1.1 CELO 病毒基因组结构及其编码蛋白

CELO 病毒的 DNA 序列全长 43 804bp, 比人腺病毒 DNA 约长 8kb^[2]。病毒基因组线状双链 DNA 具有一个 abc...c'b'a'型的独特末端倒转重复序列(ITR), ITR 的确切功能还不知道, 有观点认为其在 DNA 复制中起着重要作用^[3]。基因组 3'端序列是保守序列, 保守区长度为 50~200 个核苷酸序列^[4]。

CELO 病毒主要结构蛋白(图 1)有 hexon、pB

(penton base)、pVI、pVIII、fiber1 和 fiber2; pTP (preterminal protein)、pol (DNA polymerase)、core 1、core 2、DBP (DNA-binding protein)、IVa2、52K、100K, 其中 fiber1 和 fiber2 2 种蛋白是 CELO 病毒独有的。

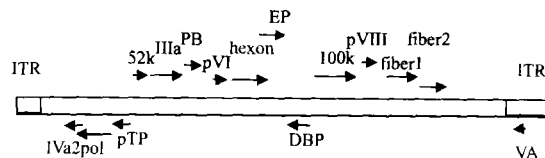


图 1 CELO 病毒基因组结构

Fig. 1 Genomic organization of CELO virus

1.2 CELO 病毒与其他腺病毒基因结构和功能的比较

1.2.1 E 区序列 CELO 病毒与人腺病毒 Ad2、Ad5 不同的是, 它没有可以识别的 E1、E3 和 E4 区。在人腺病毒 Ad2、Ad5 中 E1、E3、E4 有调控病毒基因表达、DNA 复制和病毒-宿主反应的作用, E1 区缺乏是 CELO 病毒的一大特点, E1 区对病毒的转化能力起主要作用, 对于 CELO 病毒基因组中的其它 ORFs 是否有代替 E1 区的功能还有待通过基因缺失试验来证明。

CELO 病毒没有与人腺病毒基因组 E1、E3 和 E4 同源的序列的另外一种可能是基因组末端序列发生重排, 不能检测到 E1、E3、E4 区, 也可能是

收稿日期: 2004-07-12 修回日期: 2004-11-08

* 国家“863”计划资助项目(2003AA213020)

** 电子信箱: wangfx_vet@126.com

CELO 病毒与辅助性腺病毒相互作用的结果^[2]。

CELO 病毒基因组中含有许多新的或未注册的 ORFs, 这些 ORF 在 0 ~ 6000nt 和 31000 ~ 43804nt 之间, 编码 22 个大于 99 个氨基酸残基的蛋白, 其功能有待于缺失分析进一步研究, 新的 ORF 中可能存在与 E1、E3 和 E4 功能相似的读码框^[5], 深入研究这些新的读码框非常重要。

1.2.2 CELO 病毒两端的 ORFs CELO 病毒 DNA 中间段与哺乳动物腺病毒的序列同源, 两端的 22 个 ORF 与哺乳动物腺病毒的 E1、E3 和 E4 区无任何同源序列。这 22 个 ORF 中已经研究过 ORF8 和 ORF22。

通过对 E1B19K 和 Bcl-2 的筛选研究发现, CELO 病毒基因组中右端的 ORF8 编码一种 30kDa 蛋白 GAM-1, 该蛋白具有与其他腺病毒 E1B19K 和 Bcl-2 相似的生物学特性, 即抗凋亡活性, 但是却没有同源序列^[6]。ORF22 编码一种与视网膜神经胶质瘤蛋白(pRb)相互作用的蛋白, 这种蛋白与人腺病毒 E1A 蛋白相似^[7], 具有诱导凋亡的活性。CELO 病毒的 GAM-1 凋亡蛋白和 ORF22 产物能激活 E2F 途径促进细胞从 G1 期向 S 期的转化, 对病毒基因组的有效复制有重要的作用^[8]。

除了上述两个 ORF 外, 在 CELO 基因组的两端还有几个有特色的 ORF, 最引人注目的是 ORF2, 它与细小病毒 Rep 基因同源, 但是它的功能尚不清楚。Stefan 等^[9]通过蛋白水平分析 CELO 病毒基因组序列, 对 ORF2、ORF14 和 ORF18/19 等十几个读码框的功能作了推测, 对进一步研究这些基因的功能有重要的指导意义。同时, 他们还发现了两个新 ORF, 即 ORF₂₈₁₁₅₋₂₇₇₆₅ 和 ORF₃₂₈₉₅₋₃₂₄₃₄, 认为它们能够编码蛋白, 为其它 ORF 提供一个或两个跨膜片段。

1.2.3 CELO 病毒毒力基因 fiber 研究发现编码纤突蛋白的基因区与禽腺病毒的毒力和抗原性有关^[10]。CELO 病毒的两个 fiber 基因在每个病毒粒上表达两个 Fiber 蛋白, 一个长的 Fiber1, 另一个为短的 Fiber2, 这两个蛋白的多肽图谱是不同的^[11]。对 CELO 病毒纤突蛋白功能的分析表明, fiber2 对病毒增殖、组装或扩散的某个阶段是必须的, 缺失 fiber2 不能产生病毒粒子; fiber1 则对 CELO 病毒的体内生物学的表现至关重要, 缺失 fiber1 后会造成病毒产量下降, 导致柯萨奇病毒和腺病毒受体(CAR)的特异性转导作用消失, 使 CELO 病毒只能感染禽类

细胞, 不能感染哺乳类动物细胞^[12]。

1.2.4 CELO 病毒 DNA 末端倒转重复序列 ITR 有资料证明, 腺病毒 DNA 复制起始发生在末端 75 个 bp 或末端附近^[3]。对 CELO 病毒来说, 其基因组两末端倒转重复序列 ITR(54bp)是病毒 DNA 复制的起始点, 也是复制包装必需的顺式作用元件。可以利用 CELO 病毒两端包装信号、ITRs 与腺病毒(AAV)的末端重复序列(TR)构建成腺病毒微载体(mAd), 这是一种新型的无病毒基因的载体^[13]。

1.2.5 CELO 病毒的 VA RNA 基因和 IVa2 蛋白 VA RNA 是重要的翻译调控因子, 它通过封闭细胞内的由干扰素诱导的蛋白激酶(PKR)活性来中和干扰素抗病毒作用^[14]。

CELO 病毒的 IVa2 蛋白在病毒 DNA 包装过程中起重要作用, 这种作用是型特异性的^[15]。

2 CELO 病毒与基因工程载体

随着对 CELO 病毒的生活周期、分子生物学、与疾病发生及发展的关系等认识的不断深化, 对该病毒的研究逐渐转向实用性载体开发工作上。腺病毒载体研究过程中存在的问题是载体的安全性、靶向性和有效性。CELO 病毒的 Fiber1 与柯萨奇病毒和腺病毒受体(CAR)的特异性转导作用的关系表明, 可构建具有靶向特异性的载体, 使疫苗具有更好的安全性和靶向特性。而较大的基因组确保可以插入较长的外源目的片段, 构建多价苗。病毒及载体可在鸡胚中增殖, 这样在临床应用的过程中更简便节省。

2.1 CELO 病毒作为基因工程载体在基因水平上的研究

重组腺病毒的构建方法通常有三种, 第一种方法是于真核细胞内在两段重叠的病毒 DNA 片段之间同源重组, 这个过程较难, 且重组病毒 DNA 产量较少。第二种方法是在真核细胞中两个质粒之间应用同源重组, 一个含有完整的病毒基因组, 并且有足够的外源 DNA 防止它包装, 另一个带有经过预期的修饰(插入、缺失)的同源序列经两侧到病毒基因组必须修饰的区段。第三种方法是直接通过体外分子克隆的方法构建嵌合病毒。

CELO 病毒载体的构建策略可以按照第二种方法, 先构建带有多克隆位点(MCS)、报告基因和 CELO 病毒基因组某段早期序列的穿梭质粒, 将外源基因的表达盒插入右侧 ITR 区之间, 再构建含非

必需区基因缺失后的环状腺病毒 DNA 质粒,最后外源基因的穿梭质粒与带有环状腺病毒 DNA 质粒共转染包装细胞,同源重组获得重组腺病毒。

大肠杆菌内同源重组法获得的 CELO 病毒的基因缺失重组突变体的研究发现,缺失 CELO 的基因组左端 938bp ~ 2300bp,可从辅助菌中得到复制所需的多种调节因子;右端 40065bp ~ 43684bp 基因区段的缺失对病毒的复制没有可见的影响^[16]。带有荧光表达单位(如 eGFP 表达单位)具有复制能力的 CELO 载体已经研制成功,Shmarov 等^[17]首次在鼠肿瘤细胞中表达携带在 CELO 病毒载体上的 GFP 基因,首次在 CELO-IL-2 载体感染的鸡胚尿囊液中检测到人的 IL-2 基因的表达及该蛋白的富集。有人利用柯斯质粒构建腺病毒载体的方法构建的重组病毒也具有产生感染性粒子的能力,并且估计其基因组在 LMH 细胞中是稳定的^[18]。缺失 CELO 病毒右端 KpnI (nt40065) 和 EcoRV (nt43685) 之间 3620bp 的片段,插入约 5kb 的外源 DNA,不影响 CELO 病毒载体的复制。将 IBDV 的两段基因分别插入 CELO 病毒的右端 D 片段,使该基因与 GFP 融合,由 CMV 启动子调控感染 LMH 细胞,证明重组 CELO 病毒载体可以复制,重组蛋白也能从 CELO 载体中表达并且具有完全的功能^[18]。

2.2 CELO 病毒作为基因工程载体的应用前景

利用 CELO 病毒载体重组表达肿瘤抑制因子 p53,检测其在体外人的肿瘤细胞内和体内异种移植植物内的活性,结果显示该载体可以携带外源基因进入各种器官,而这些器官往往对人的腺病毒产生免疫反应。同时重组腺病毒 CELO-p53 仍然保存了 p53 的肿瘤抑制活性^[19]。

CELO 病毒能插入的外源基因是有限的,构建只含有腺病毒末端倒转重复序列、包装信号及中间的转基因表达盒的重组腺病毒载体的产生,对发展新的基因治疗方法的载体有重要的意义。

禽类疾病防治中,基因工程载体疫苗的制备可以应用 CELO 复制型病毒或复制缺陷性病毒作为载体,该病毒可感染禽源性细胞并在其中增殖,研究表明 CELO 病毒及突变载体能够在来源于禽类细胞的 LMH 细胞系上复制增殖,最新的研究表明利用 CELO 病毒重组表达感染性法氏囊病病毒的 VP2 蛋白可以在鸡体内诱导产生对法氏囊病病毒的保护性^[20]。

CELO 病毒右端区段允许插入较大的外源片

断,已经成为当前研究的热点之一,利用这一区域构建 CELO 病毒基因转移载体,为 CELO 病毒作为基因转移工具提供了条件。CELO 病毒及其载体可在廉价的鸡胚中得到大量复制,可以预料 CELO 病毒载体作为哺乳动物和禽类基因治疗的基因转移工具将有广阔的应用前景。

参考文献

- [1] Yates V J, Fry D E. Observation of a chicken embryo lethal orphan (CELO) virus. *Am J Vet Res*, 1957, 18: 657 ~ 660
- [2] Susanna C, Kurzbauer R, Schaffner G, et al. The complete DNA sequence and genomic organization of the avian adenovirus CELO. *J Virol*, 1996, 70 (5): 2939 ~ 2949
- [3] Morikazu S, Ishiyama T, Padmanabhan R, et al. Comparative sequence analysis of the inverted terminal repetition in the genomes of animal and avian adenoviruses. *J Virol*, 1983, 125: 491 ~ 495
- [4] Li P A, Bellett J D, Parish C R. A comparison of the terminal protein and hexon polypeptides of avian and human adenoviruses. *J Genet Virol*, 1983, 64: 1375 ~ 1379
- [5] Vincent P, Arnauld C, Picault J, et al. Transcriptional organization of the avian adenovirus CELO. *J Virol*, 1998, 72 (11): 9278 ~ 9288
- [6] Chow L T, Broker T R, Lewis J B. Complex splicing patterns of RNAs form the early regions of adenovirus. *J Mol Biol*, 1979, 134: 265 ~ 303
- [7] Chiocca S, Baker A, Cotton M, et al. Identification of a novel anti-apoptotic protein, GAM-1, encoded by the CELO adenovirus. *J Virol*, 1997, 71(4): 3168 ~ 3177
- [8] Heike L, Matt C. Characterization of CELO virus protein that modulate the pRb/E2F pathway. *J Virol*, 1999, 73 (8): 6517 ~ 6525
- [9] Stefan W, Frank E. Reannotation of the CELO genome characterizes a set of previously unassigned open reading frames and points to novel modes of host interaction in avian adenoviruses. *BMC Bioinfo*, 2003, 4(55): 1471 ~ 2105
- [10] Jackie P, Wright P J, Sheppard M. A single gene encoding the fiber is responsible for variations in virulence in the fowl adenoviruses. *J Virol*, 1996, 70(8): 5115 ~ 5122
- [11] Emy K M, Pallister J A, Sheppard M. Immunological and molecular comparison of fowl adenovirus serotypes 4 and 10. *Airol*, 1995, 140: 491 ~ 510
- [12] Poi Kiang T, Anne-Isabiller M, Jeffrey M, et al. Defining CAR as a cellular receptor for the avian adenovirus CELO using a genetic analysis of the two viral fiber proteins. *J Gen Virol*, 2001, 82: 1465 ~ 1472
- [13] Ziv S, Gnateko D V, Bahou W F, et al. Adeno-Associated virus (AAV) rep protein Enhances the generation of a recombinant mini-Adenovirus(Ad) utilizing an Ad/AAV hybrid virus. *J Virol*, 2000, 74(22): 10381 ~ 10389

- [14] Mathews M B. Interactions between viruses and the cellular machinery for protein synthesis. In *Translational Control*, 1996: 505 ~ 548
- [15] Wei Zhang, Jonathan A L, Joan B C, et al. Role for the adenovirus IVa2 protein in packaging of viral DNA. *J Virol*, 2001, 75(21): 10446 ~ 10454
- [16] Anne-isabelle M, Heike L, Mediyha S, et al. Mutational analysis of the avian adenovirus CELO, Which provides a basis for gene delivery vectors. *J Virol*, 1999, 73(2): 1399 ~ 1410
- [17] Shmarov M M, Cherenova L V, Shashkova E V, et al. Eukaryotic vectors of CELO avian adenovirus genome, carrying GFP and human IL-2 genes. *Mol Gen Mikrobiol Virusol*, 2002, 2: 30 ~ 35
- [18] Achille F, Etteradossi N, Delmas B, et al. Construction of avian adenovirus CELO recombinants in cosmid. *J Virol*, 2001, 75(11): 5288 ~ 5301
- [19] Logunov D Y, Ilyinskaya G V, Cherenova L V, et al. Restoration of p53 tumor-suppressor activity in human tumor cells *in vitro* and in their xenografts *in vivo* by recombinant avian adenovirus CELO-p53. *Gene Ther*, 2004, 1: 79 ~ 84
- [20] Achille F, Christophe C, Bernard D, et al. Avian adenovirus CELO recombinants expressing VP2 of infectious bursal disease virus induce protection against bursal disease in chickens. *Vaccine*, 2004, 22(17-18): 2351 ~ 2360

Characters in Molecular Biology of CELOV and Its Application as a Gene Vector

WANG Feng-xue WANG Yun-feng

(National Key Laboratory of Veterinary Biotechnology, Harbin Veterinary Research Institute of Chinese Academy of Agricultural Sciences Harbin 150001, China)

Abstract The complete DNA sequence of the avian adenovirus chicken embryo lethal orphan (CELO) virus (FAV-1) is 43,804bp in length, approximately 8kb longer than those of the human subgenus C adenovirus (Ad2 and Ad5). The CELO virus has inverted terminal repeats (ITRs). The conventional E1, E3, and E4 regions are no longer discernible, but there might be a protein of recognizable function in the left end of the CELO virus genome in place of the function of E regions. The fibers at each vertex of the virion are responsible for differences in virulence, and is essential for some stage in virus growth, assembly or spread. Fiber1 is related to the character of CAR-dependent transduction behaviors. CELO virus, without fiber1, can enter chicken cells. A set of open reading frames can be deleted and allows the insertion of an expression cassette or foreign gene. The CELO vector is exceptionally stable, can be grown inexpensively in chicken embryos. The development of CELO vector bases on the characters of CELO virus. New-style vector with ITR and regulative element, packaging signal can be designed. CELO virus shares the common character with the human adenovirus but has super security, so the CELO vector as an interesting engineering vector will be a valuable tool in gene therapy and engineering vaccine development.

Key words CELO virus Genome structure Fiber Engineering vector Vaccine

广告索引

美国贝克曼库尔特公司(封面), 大龙医疗设备(上海)有限公司(封2), 德国赛多利斯公司(彩1), 上海保兴生物工程有限公司(彩2), 镇江达森发酵设备公司(彩3), 北京科诺德流体设备有限公司(彩4), 百欧设备(广州)有限公司(彩5), 镇江东方生物工程设备公司(彩6), 东洋纺(上海)科技有限公司(彩7), 杭州华东医药集团投资有限公司(彩8), 上海日泰生物工程有限公司(彩9), 长沙开发区湘仪离心机仪器公司(彩10), 韩国韩华公司上海代表处(彩12), 美国爱思进科学有限公司中国代表处(中插), 上海国强生化装备工程有限公司(中插), Promega 公司(后1), 潍坊康华生物技术公司(后2), 扬中威柯特生物工程设备有限公司(后3), 北京清大天一生物技术有限公司(后4), 维通利华实验动物技术公司(后彩1), 迈思通(北京)管路系统有限公司(后彩2), 宝生物工程(大连)有限公司(封3), 英杰生命技术公司(封底)