

重组禽腺联病毒介导的输卵管 暂态生物反应器的初步研究

王安平^{1*} 孙怀昌²

(1 江苏畜牧兽医职业技术学院 泰州 225300 2 扬州大学兽医学院 扬州 225009)

摘要 将输卵管特异表达启动子调控的人组织激肽释放酶(human tissue kallikrein, hKLK1)表达盒插入至 AAV 转移载体 pAITR 中,与 AAV 包装载体 pcDNA-ARC 及腺病毒辅助质粒 pHelper 三质粒利用磷酸钙沉淀法共转染 AAV-293 细胞,制备输卵管特异表达 hKLK1 的 rAAV。将获得的重组病毒以每只鸡 2×10^{10} 病毒颗粒数翅静脉注射正常产蛋母鸡,RT-PCR 结果显示 hKLK1 只在输卵管部位表达;酶活性检测结果表明:注射后第 2 天就可以检测到 rhKLK1 的活性,第 3 周表达量最高,达 107.3U/ml,表达时间持续 6 周之久;用含 rhKLK1 的蛋清灌喂自发性高血压大鼠(SHR),可使其血压下降 70mmHg,5 天后回升到饲喂前水平。以上结果表明重组禽腺联病毒介导的鸡输卵管暂态生物反应器不仅具有很好的组织特异性,而且可指导外源基因长期稳定的表达。

关键词 重组禽腺联病毒 人组织激肽释放酶 暂态 输卵管生物反应器

中图分类号 Q819

重组腺联病毒(recombinant adeno-associated virus, rAAV)作为一种新型的病毒载体,具有对宿主没有致病性、免疫原性极低、宿主范围广等优点^[1],因此被认为是一种比较理想的基因转移载体。rAAV 已有效地转导了小鼠和灵长类动物的多个组织和细胞,并能介导外源基因在肝脏、肺脏、中枢神经系统、视网膜及骨骼肌等器官和组织中的长期表达^[2,3]。

人组织激肽释放酶(human tissue kallikrein 1, hKLK1)又称为胰/肾激肽释放酶,是一种能水解激肽原的丝氨酸蛋白酶,在调节血压、电解质和葡萄糖运输以及肾脏功能中发挥主要作用,具有舒张血管、促进肾脏修复、改善微循环和保护心血管等生物学功能^[4,5],具有广泛的临床应用价值。目前市场上所用的组织激肽释放酶主要是从猪胰腺或下颌腺中提取,但存在诱发免疫反应和病原体污染等潜在问题,所以国内外学者们尝试用大肠杆菌表达体系、动物细胞表达体系、酵母表达体系、重组病毒表达体系等^[6,7]方法制备 hKLK1,这些方法各有利弊,因此目前还没有 hKLK1 基

因工程产品问世。

本实验室 Gao 等^[8]自行构建并优化了输卵管特异表达载体,并成功建立了鸡输卵管暂态生物反应器,将含有 hKLK1 基因的输卵管表达质粒用 PEI (polyethylenimine)包裹后,经翅静脉注射正常产蛋母鸡,蛋清中 hKLK1 的表达可持续 7 天左右,表达水平最高可达 59.1U/ml,这种暂态生物反应器主要存在需要重复注射表达质粒、容易对鸡产生应激、表达时间不长、表达水平不高等弊端。本研究尝试用重组禽腺联病毒为载体,构建表达 hKLK1 新型暂态输卵管生物反应器,并对重组蛋白表达特性进行初步研究,为其进一步应用打下基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒、宿主菌与病毒 含 AAV (avian adeno-associated virus, AAV)全基因组重组质粒 pCR-AAV、表达 AAV Rep 和 Cap 基因的包装质粒 pcDNA-ARC 及含有 hKLK1 基因的输卵管特异表达载体 pOV5-KLK1 由本实验室自行构建并保存;含 Ad5 E2A、E4 和

VA 基因的辅助质粒 pHelper 为 Stratagene 公司产品;含绿色荧光蛋白 (GFP) 报告基因的载体 pEGFP-N1 从 Clontech 公司引进;表达 GFP 报告基因的重组禽腺联病毒 rAAAV-GFP 由本实验室自行构建并保存;大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞由本实验室制备,冻存于 -76°C 冰箱中备用。

1.1.2 工具酶与试剂 限制性内切酶、连接酶和 Klenow Fragment 聚合酶等工具酶购自宝生物工程(大连)有限公司;蛋白胨为北京奥博星生物技术有限责任公司产品;酵母提取物为 OXIOD 公司产品;小牛血清购自中美合资兰州民海生物工程有限公司;猪胰腺激肽释放酶纯品购自上海第一生化药业有限公司;盐酸-N-苯甲酸-L-精氨酸乙酯 (BAEE) 购于上海伯奥生物有限公司;其它试剂为国产分析纯级。

1.1.3 细胞与培养液 含 Ad5 E1 基因的 AAV-293 细胞购自 Stratagene 公司,培养基为含 10% 小牛血清 (NBS) 的 DMEM (GIBCO BRL);鸡胚成纤维细胞 (CEF) 用 9~11 日龄 SPF 鸡胚制备,培养基为含 5% NBS 的 DMEM;鸡肝癌 CEL 细胞系由中国农业科学院北京畜牧兽医研究所李刚博士提供,培养基为含 10% 胎牛血清 (FCS) 的 DMEM;鸡输卵管上皮细胞由正常产蛋鸡的输卵管上皮制备,培养基为含 10% FCS 的 DMEM;NBS 购自中美合资兰州民海生物工程有限公司;FCS 购自杭州四季青生物工程材料有限公司。

1.1.4 实验动物 邵伯蛋鸡由中国农业科学院家禽研究所提供。

1.2 方法

1.2.1 重组禽腺联病毒的体外表达 为鉴定重组禽腺联病毒对鸡细胞的感染性,将 CEF、CEL 以及鸡输卵管上皮细胞分别按 1×10^5 细胞/孔接种 24 孔细胞培养板, 37°C 、5% CO_2 培养 24h 后弃去培养液,用含 2% FCS DMEM 稀释的表达绿色荧光蛋白报告基因的重组禽腺联病毒 rAAAV-GFP 感染 2h,在含 10% FCS 和 10mmol/L 丁酸钠的 DMEM 中继续培养 24h,然后在荧光显微镜下观察并记录出现荧光阳性细胞的时间、数量及持续时间。

1.2.2 hKLK1 输卵管特异表达盒的 PCR 扩增 根据 pOV5-KLK1 中输卵管特异启动子的上游序列和 SV40 PolyA 信号下游序列设计一对 PCR 引物,引物序列为: Forward: 5'-CTTGCGCGCGCGAGACTGACATGCATTTCATAGG-3'; Reverse: 5'-TCGGGGTACCAGCGGAAGAGCGCCCAATACG-3'。PCR 反应体系为 50 μl ,其中包括 10

\times PCR 缓冲液 5 μl 、10pmol/ μl 正、反向引物各 2 μl 、2.5mmol/L dNTP 2 μl 、模板 DNA 50ng、Pfu DNA 聚合酶 2.5U,补水至 50 μl 。PCR 反应程序为: 95°C 变性 45s (第一次循环为 4min), 60°C 退火 45s, 72°C 延伸 3min (最后一次循环为 10min),共 30 个循环。取 5 μl PCR 产物进行 0.8% 琼脂糖凝胶电泳分析,其余样品于 4°C 保存备用。

1.2.3 含 hKLK1 输卵管特异表达盒 AAV 转移载体的构建 根据 AAV 基因组 DNA 酶切图谱,用 *Pml* I 和 *Bsm* B I 双酶切 pCR-AAAV 质粒,经琼脂糖凝胶电泳分离后,回收含 AAV 左右 ITR 的约 4.1kb 片段,用 Klenow Fragment 补平回收后,与用高保真 Taq DNA 聚合酶扩增的 KLK1 表达盒连接,获得的重组质粒命名为 pAITR-KLK1,结构如图 1。

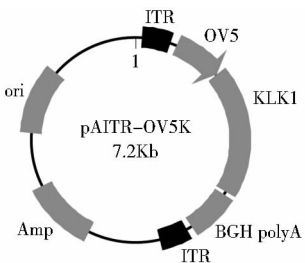


图 1 pAITR-KLK1 的结构示意图

Fig. 1 Schematic structure of pAITR-KLK1

1.2.4 rAAAV-KLK1 的制备 将 AAV 转移载体 pAITR-KLK1、AAAV 包装载体 pcDNA-ARC 及腺病毒辅助质粒 pHelper 组成三质粒转染系统,参考文献[9]报道的方法采用磷酸钙沉淀法共转染 AAV-293 细胞,AAV-293 细胞用 10% NBS 的 DMEM 培养,培养至细胞密度达 80% (约 48h) 进行质粒转染,3 种质粒用量均为 4 μg ,转染时间为 4~6h,换液后继续培养 72h,收获细胞,反复冻融 4 次,10000r/min 离心 10min 后收集的上清即为重组病毒悬液, -20°C 保存备用。

1.2.5 rAAAV-KLK1 的纯化和浓缩 rAAAV-KLK1 的纯化方法按文献[10]报道的方法进行。将上述含 rAAAV-KLK1 的病毒上清与 1/10 体积的氯仿混合,摇床中室温剧烈振摇 1h,加入氯化钠至终浓度为 1mol/L, 4°C 、12000r/min 离心 15min,取上层水相;加入 PEG8000 至终浓度为 10% (w/v),冰浴 1h,11000r/min 离心 15min,沉淀用 PBS 溶解,加入 DNase 和 RNase 室温消化 30min;加等体积的氯仿抽提, 4°C 、12000r/min 离心 5min,取上层水相即为初步纯化的 rAAAV-KLK1。为了进一步缩小 rAAAV 病毒溶液的体积,按参考文献

[11]报道的方法用 -20°C 预冷的无水乙醇与 rAAAV-KLK1 样品按 3:1 的体积比混合, -20°C 静置 1~2h, 4°C 、13000r/min 离心 15min,弃上清,待残余乙醇基本挥发后,加入 PBS 缓冲液溶解沉淀,0.22 μm 滤膜过滤除菌, -20°C 保存备用。

1.2.6 rAAAV-KLK1 基因组 DNA 的制备 rAAAV-KLK1 核酸提取参照文献[12]进行。取 rAAAV-KLK1 病毒液 1ml,加入 2 μl DNase, 37°C 消化 2h;加入 1/10 体积的 $10\times$ 病毒裂解液(500mmol/L Tris, 200mmol/L EDTA, 5% SDS, pH7.2)和 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的蛋白酶 K, 45°C 消化 2h;用等体积的苯酚:氯仿混合物抽提一次;取上清,加入 2.5 倍体积的无水乙醇, -20°C 孵育 2h,12000r/min 离心 15min,沉淀用 30 μl 去离子水溶解, 4°C 保存备用。

1.2.7 rAAAV-KLK1 物理滴度的测定 根据 KLK1 基因序列设计引物,上、下游引物序列分别为:5'-TAGAAT TCCCCCGATTTCAGTCCCGGATTG-3'和 5'-TTGCGGCC GCTCAGGAGTTCTCCGCTATGGTG-3',参考 Odyssey 仪器说明书,以 pOV5-KLK1 为模板,Biotin-16-dUTP 为标记,经 PCR 的方法制备 KLK1 探针。然后用点杂交方法检测病毒溶液中 rAAAV-KLK1 的物理滴度,以每毫升中病毒基因组数表示,简写为 v. g./ml。以 pAITR-KLK1 为阳性对照,将质粒 pAITR-KLK1 准确定量,用去离子水进行系列梯度稀释,与 rAAAV-KLK1 基因组 DNA 一起,分别于沸水浴 10min 变性后置于冰水浴中 5min,点样于中性尼龙膜上,将点有各样品的尼龙膜先于浸湿有变性液(0.5mol/L NaOH, 1.5mol/L NaCl)的滤纸上变性 20min,再于浸湿有中和液(1.5mol/L NaCl, 1.0mol/L Tris-HCl)的滤纸上中和 20min,最后置于 $2\times\text{SSC}$ 中 10min,待膜自然干燥后 80°C 烤膜 0.5~2h,预杂交 2h 左右,用含 KLK1 探针的杂交液杂交过夜,洗膜,用封闭液(含 10% 小牛血清和 0.1% SDS 的 PBS)封闭至少 30min 后,用含 1:10000 稀释的 IRDye 800CM conjugated streptavidin 的封闭液避光孵育 30min,PBST 洗膜 3 次,PBS 洗膜一次后,用 Odyssey 仪器于 800CM 处进行扫描显色。通过计算 pAITR-KLK1 的分子数,乘以与其杂交信号强度一致的病毒液样品的稀释倍数计算出 rAAAV-KLK1 的物理滴度。

1.2.8 rAAAV-KLK1 的体内实验 将纯化得到的 rAAAV-KLK1 病毒样品,以每只鸡 2×10^{10} 病毒颗粒数经翅静脉注射 3 只正常产蛋母鸡,以注射生理盐水的正常产蛋母鸡为对照。从注射的次日起收集鸡蛋,无

菌取出浓蛋清, -20°C 保存备用。

1.2.9 目的基因表达的 RT-PCR 检测 将产完鸡蛋的鸡宰杀,取其心、肝、脾、肺、肾、肌肉、输卵管膨大部等组织,参照 TRAGOL RNA 抽提说明书提取总 RNA,用 DNase I 经 37°C 消化 15min,去除其中可能残余的 DNA,用 KLK1 特异引物(引物序列同上)进行 PCR 检测,以确认无 DNA 的污染,然后参照 RT-PCR 试剂盒说明书进行 RT-PCR 反应,RT 反应体系为 20 μl ,包括 $10\times$ 缓冲液 2 μl 、dNTPs 10pmol、RNA 抑制剂 0.5pmol、反转录酶 1 μl 、RNA 1 μg 、反向引物 10pmol,反应程序为 37°C 60min;50 μl PCR 反应体系为 5 μl $10\times$ 缓冲液、2 μl RT 产物、15pmol 正、反向引物、2.5U DNA Polymerase,30 次循环的 PCR 程序为 $94^{\circ}\text{C}/30\text{s}$ (第一次循环为 4min)、 $62^{\circ}\text{C}/30\text{s}$ 和 $72^{\circ}\text{C}/45\text{s}$ (最后一次循环为 10min)。反应结束后取 3 μl 扩增产物进行 0.8% 琼脂糖凝胶电泳分析。

1.2.10 rhKLK1 活性测定 按文献[13]报道的方法进行 KLK1 的活性测定,标准品为猪胰腺激肽释放酶纯品,阴性对照为载体注射前采集的蛋清。将 500 μl BAEE (3.0mmol/L) 和 2.2ml 三乙醇胺缓冲液(67mmol/L, pH 8.0)置于每一试管中, 25°C 水浴预热,然后将 100 μl 标准品或稀释好的蛋清加入试管中,混匀,用分光光度计分别测定 25°C 水浴 1min 和 15min 时在波长 340nm 处的吸收值,最后根据公式:

$$U/\text{ml} = [(\Delta E_s / \Delta E_t \times \text{取样量}) \times \text{稀释倍数}] / \text{ml}$$

ΔE_s 表示样品 OD_{340} 的变化值, ΔE_t 表示标准品 OD_{340} 的变化值。

1.2.11 rhKLK1 生物学活性检测 将舒张压在 190mmHg 以上的 15 周龄雌性自发性高血压大鼠(SHR)分为 4 组,每组 3 只,第一组为对照组,口服 1ml 经生理盐水稀释的正常蛋清,另 3 组分别灌服含 2、4 和 6U 重组酶的生理盐水稀释蛋清,然后定时用大鼠血压计测定尾静脉血压,以 3 次重复读值的平均值为试验鼠的尾静脉血压。

2 结果

2.1 重组禽腺联病毒的体外表达

为验证重组禽腺联病毒对鸡细胞的感染性,用 rAAAV-GFP 感染 CEF、CEL 和鸡输卵管上皮细胞,以 pGFP-N1 质粒感染的 CEF 为阳性对照。荧光显微观察结果显示:pEGFP-N1 转染的 CEF、CEL 中 10h 后即出现绿色荧光阳性细胞,转染后 24h 荧光阳性细胞数最

多, 荧光强度最强(图2); 重组病毒感染的 CEF、CEL 及鸡输卵管上皮细胞在感染后 24h 可观察到荧光阳性细胞, 感染后 48h 荧光阳性细胞数最多, 荧光强度最强, 且 GFP 表达可维持近 2 周, 明显高于 pEGFP-N1 转染的细胞(图2)。

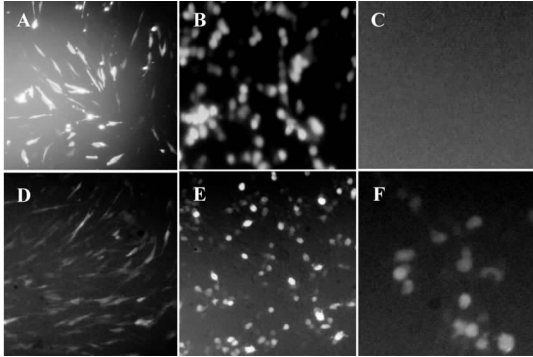


图2 rAAAV-GFP 感染细胞荧光观察(100 ×)
Fig.2 Fluorescence of rAAAV-GFP-infected avian cells(100 ×)

(A) pEGFP-N1 transfected CEF cells (B) pEGFP-N1 transfected CEL cells (C) Mock-infected CEF cells (D) rAAAV-GFP-transduced CEF cells (E) rAAAV-GFP-transduced CEL cells (F) rAAAV-GFP-transduced chicken oviduct epithelial cells

2.2 含 hKLK1 输卵管特异表达盒 AAV 转移载体的构建与鉴定

含 AAV 全基因组的 pCR-AAAV 质粒经限制酶 *Pml* I 和 *Bsm*B I 双酶切, 回收含 AAV 左右 ITR 的 4.1kb 大片段, 与 KLK1 表达盒连接, 获得输卵管特异表达 hKLK1 的重组载体命名为 pAitr-KLK1。根据其 DNA 酶切图谱分析结果, 用限制性内切酶 *Kpn* I 消化 pAitr-KLK1, 切出 3.1kb + 4.0kb 左右大小的条带(图3), 与理论值相符, 说明 pAitr-KLK1 克隆正确。

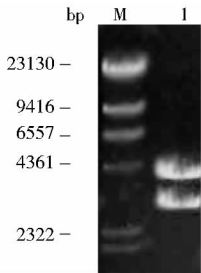


图3 pAitr-KLK1 酶切鉴定

Fig.3 Restriction enzymes analysis of pAitr-KLK1
M: λDNA/*Hind* III markers; 1: pAitr-KLK1/*Kpn* I

2.3 rAAAV-KLK1 的物理滴度测定

用生物素标记的 KLK1 为探针通过点杂交的方法

来测定纯化、浓缩后病毒液中 rAAAV-KLK1 的物理滴度, 以 pAitr-KLK1 质粒为阳性对照, 去离子水作为阴性对照, 提取的 rAAAV-KLK1 的基因组 DNA 为样品, 通过比较杂交信号的强弱来判断重组病毒物理滴度。结果表明, 纯化、浓缩后病毒液中 rAAAV-KLK1 的物理滴度为 2.632×10^{10} v. g./ml(图4)。这一滴度说明纯化的重组病毒可以用于 KLK1 的体内表达。



图4 rAAAV-KLK1 的点杂交

Fig.4 Dot-blotting of rAAAV-KLK1

1: 4 μl, 2 μl, 1 μl of rAAAV-KLK1 genome DNA and the negative control; 2: 8 ng, 4 ng, 2 ng, 1 ng of pOV5-KLK1 as the positive control

2.4 目的基因表达的 RT-PCR 检测

为了验证 rAAAV-KLK1 介导的目的基因 KLK1 的表达是否具有好的组织特异性, 将注射重组病毒后的鸡和不注射重组病毒的鸡提取各组织总 RNA, 并进行 RT-PCR 检测, 结果显示, 仅在注射重组病毒鸡的输卵管膨大部组织中扩增出预计大小的目的条带, 而在其它各组织及对照鸡各组织中均未扩增出目的条带(图5)。

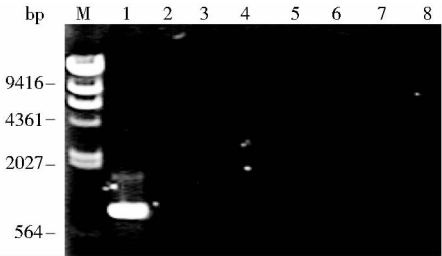


图5 重组病毒注射后鸡组织中 KLK1 的 RT-PCR 检测

Fig.5 Transcription of KLK1 gene in tissue of recombinant avian adeno-associated virus injected laying hens

M: λDNA/*Hind* III markers; 1 ~ 7: Oviduct, heart, liver, spleen, lung, kidney, and muscle of rAAAV-injected hens; 8: Negative control

2.5 rhKLK1 的活性测定

为了解 rhKLK1 在蛋清中的表达, 收集重组病毒注射后 6 周内所产的鸡蛋进行活性测定。结果表明(图6), 在注射重组病毒第二天就可检测出 rhKLK1 的表达, 在第三周表达量达到最高, 活性高达 107.3 U/ml, 此

后表达缓慢下降,并持续6周(本实验所检测的最长时间)。对照组未检测出 KLK1 的表达。

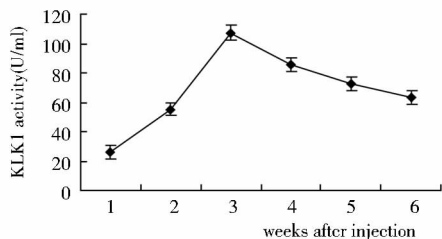


图6 rAAAV-KLK1 注射鸡蛋清中 rhKLK1 的活性表达

Fig. 6 Dynamic expression of rhKLK1 in the egg white of rAAAV-KLK1 injected hens

2.6 rhKLK1 生物学活性检测

为了证明表达在蛋清中的 KLK1 具有与天然 KLK1 相似的降血压作用,用生理盐水稀释含 rhKLK1 的蛋清灌服 SHR 大鼠,尾静脉血压测定结果显示,在口服 2、4、6 U KLK1 的蛋清 7h 后,SHR 的舒张压平均下降 40mmHg 左右,第二天 4 U 和 6 U 两个剂量组的血压降幅达到 70mmHg 左右,第五天回升到治疗前水平,而口服正常蛋清大鼠的血压无明显变化(图7)。

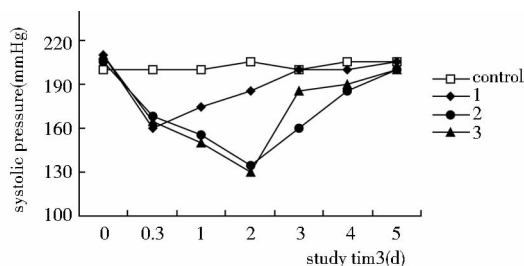


图7 rhKLK1 对高血压大鼠的降血压作用

Fig. 7 Hypotensive effect of rhKLK1 on spontaneous hypertension rats

Control: normal egg white; 1, 2, 3: Egg white containing 2, 4, 6U of KLK1

3 讨论

重组腺联病毒作为一种新型基因转移载体,已经被用来表达多种治疗性基因,如酪氨酸羟化酶基因、 γ -和 β -血红蛋白基因、CFTR 基因、叶酸受体基因等^[14,15],并且在白血病、囊性纤维化、帕金森综合症等的临床性治疗中获得了可喜的成绩^[16,17]。

鸡输卵管生物反应器是一种极具吸引力的生产重组蛋白的新技术,在农业、生物医药、制药业等领域具

有广阔的应用前景,国内外许多报道成功培育出了表达人生长因子、干扰素、促红细胞生成的转基因鸡^[18],但这种方法存在研制周期长、操作复杂、成本较高等缺点,目前仅限于实验室研究阶段。因此许多学者转向研制鸡输卵管暂态生物反应器, Gao 等^[8]将构建的含有输卵管特异启动子的重组质粒经翅静脉注射产蛋鸡,建立了输卵管暂态表达体系,虽然这种方法简单易行、成本较低,但存在表达水平较低、需重复注射重组质粒等弊端。

本研究为克服以上主要问题,利用重组禽腺联病毒为载体,尝试构建新型高效的鸡输卵管暂态生物反应器,将输卵管特异启动子、KLK1 开放阅读框及 BGH polyA 加尾信号一起插入禽腺联病毒两侧 ITR 序列当中,构建 AAV 转移载体 pAITR-KLK1,将其与 AAV 包装载体及腺病毒辅助载体三质粒共转染 AAV-293 细胞,获得了 rAAAV-KLK1。为验证构建的重组病毒介导的外源基因体内表达仍然具有良好的组织特异性,将重组病毒翅静脉注射正常产蛋鸡, RT-PCR 检测结果显示, KLK1 基因只在输卵管膨大部表达,而在其它部位不表达,这一结果说明禽腺联病毒的 ITRs 序列对输卵管特异启动子的组织特异性表达没有影响,不影响外源启动子的表达特性,这与表达的 ITRs 的性质相符^[19]。

进一步检测 rhKLK1 在蛋清中的表达,结果显示: KLK1 的表达明显优于以重组质粒为平台构建的鸡输卵管暂态表达水平^[8],表达水平最高可达 107.3 U/ml,表达时间可持续 6 周(我们所检测的最长时间),重组病毒之所以能够介导外源基因进行较长时间的表达,大部分学者认为重组病毒是以 episomal 的形式存在的,至于该基因能否整合到宿主基因组中尚有争议^[20]。这一表达结果与文献报道的重组腺联病毒的表达特性有一定的差距,文献报道重组腺联病毒介导的外源基因表达在注射后 24h 即可检测到,表达时间少则 3 个月,多则可以达到 6 个月之久^[21]。造成这一差异的原因有二:注射的重组病毒的量不够多;由于鸡产蛋率的影响,没有能够对 6 周后鸡蛋清中 KLK1 的表达进行检测。对于能否通过提高重组病毒的注射剂量、能否通过重复注射来提高 KLK1 的表达量尚待进一步研究。

为进一步证实所表达的 rhKLK1 具有与天然产物相似的生物学效应,将含有不同剂量 rhKLK1 的蛋清灌喂自发性高血压大鼠,尾静脉血压测定结果显示: rhKLK1 能引起血压下降,降幅最高可达 70mmHg,降压时间可维持 5 天,这一结果与以重组质粒为载体获得

的 rhKLK1 的降压水平相当^[8]。以上数据表明利用新构建的鸡输卵管暂态表达体系表达在蛋清中的重组蛋白,不仅具有与天然产物相同的生物学效应,而且在表达量、表达时间上都远远超过以往所报道的水平,克服了以往输卵管暂态生物反应器操作繁琐、表达水平低等弊端。因此,可以得出结论,本研究建立的禽腺联病毒介导的鸡输卵管暂态生物反应器可用于 rhKLK1 及其它重组蛋白的高效表达,为外源蛋白的高效表达提供了新的途径,为鸡输卵管暂态生物反应器的进一步应用奠定了理论和实践基础。

参考文献

- [1] During M J. Adeno-associated virus as a gene delivery system. *Advanced Drug Delivery Reviews*,1997,27: 83 ~ 94
- [2] Harrison P T, Dalziel R G, Ditchfield N A, et al. Neuronal-specific and nerve growth factor-inducible expression directed by the preprotachykinin-A promoter delivered by an adeno-associated virus vector. *Neuroscience*,1999,94: 997 ~ 1003
- [3] Rolling F, Shen W Y, Tabarisa H, et al. Evaluation of adeno-associated virus-mediated gene transfer into the rat retina by clinical fluorescence photography. *Hum Gene Ther*,1999,10: 641 ~ 648
- [4] Naicker S, Naidoo S, Ramsaroop R, et al. Tissue kallikrein and kinins in renal disease. *Immunopharmacology*,1999,44(1-2): 183 ~ 192
- [5] Meneton P, Bloch-Faure M, Hagege A A, et al. Cardiovascular abnormalities with normal blood pressure in tissue kallikrein-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA*,2001,98: 2634 ~ 2639
- [6] Lu H S, Hsu Y R, Narhi L O, et al. Purification and characterization of human tissue prokallikrein and kallikrein isoforms expressed in Chinese hamster ovary cells. *Protein expression and purification*, 1996,8: 227 ~ 237
- [7] Costanza E, Antonella Z. Adenovirus-mediated human tissue kallikrein gene delivery induces angiogenesis in normoperfused skeletal muscle. *Aneriocsler Thromb Vasc Biol*,2000,20: 2379 ~ 2385
- [8] Gao B, Sun H C, Chen Q, et al. Transfection and expression of exogenous gene in the laying hens oviduct *in vitro* and *in vivo*. *Journal of Zhejiang University Science*,2005,6B(2): 137 ~ 141
- [9] Mizukami H, Okada T, Matsushita T, et al. A protocol for AAV vector production and purification. *Division of Genetic Therapeutics, Center for Molecular Medicine*,1998
- [10] 吴小兵,董小岩,伍志坚,等.一种快速高效分离和纯化重组腺病毒伴随病毒载体的方法. *科学通报*,2000,45(19): 2071 ~ 2075
Wu X B, Dong X Y, Wu Z J, et al. *Chinese Science Bulletin*, 2000,45(19): 2071 ~ 2075
- [11] 彭建强,彭悠,谭淑萍.一种高效快速浓缩腺相关病毒载体的方法. *病毒学报*,2005,21(1): 11 ~ 14
Peng J Q, Peng Y, Tan S P. *Chinese Journal of Virology*,2005,21(1): 11 ~ 14
- [12] Synder R O, Xiao X, Samulski R J. Production of recombinant adeno-associated viral vectors. In *Current Protocols in Human Genetics*. N. Dracopoli New York; John Wiley,1996
- [13] Gao B, Sun H C, Fang H X, et al. Expression and preliminary characterization of recombinant human tissue kallikrein in egg white of laying hens. *Poult Sci*,2006,85: 1239 ~ 1244
- [14] Einerhand M P, Antoniou M, Zolotukhin S, et al. Regulated high-level human beta-globin gene expression in erythroid cells following recombinant adeno-associated virus-mediated gene transfer. *Gene Ther*,1995,2: 336 ~ 343
- [15] Sun X L, Murphy B R, Li Q J, et al. Transduction of folate receptor cDNA into cervical carcinoma cells using recombinant adeno-associated virions delays proliferation *in vitro* and *in vivo*. *J Clin Invest*,1995,96: 1535 ~ 1547
- [16] Nakai H, Herzog R W, Hagstrom J N, et al. Adeno-associated viral vector-mediated gene transfer of human blood coagulation factor IX into mouse liver. *Blood*,1998,91: 4600 ~ 4607
- [17] Qing K, Mah C, Hansen J, et al. Human fibroblast growth factor receptor 1 is a co-receptor for infection by adeno-associated virus 2. *Nature Med*,1999,5: 71 ~ 77
- [18] Sang H. Prospects for transgenesis in the chick. *Mech Dev*,2004, 121: 1179 ~ 1186
- [19] Flotte T R, Afione S A, Solow R, et al. Expression of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator from a novel adeno-associated virus promoter. *J Biol Chem*,1993,268: 3781 ~ 3790
- [20] McLaughlin S K, Collis P, Hermonat P L, et al. Adeno-associated general transduction vectors: analysis of proviral structures. *J Virol*,1988,62: 1963 ~ 1973
- [21] Flotte T R, Afione S A, Conrad C, et al. Stable *in vivo* expression of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator with an adeno-associated virus vector. *Proc Natl Acad Sci USA*,1993,90: 10613 ~ 10617

Preliminary Study of a New Transient Oviduct Bioreactor Mediated
by Recombinant Avian Adeno-associated Virus

WANG An-ping¹ SUN Huai-chang²

(1 Jiangsu Animal Husbandry and Veterinary College, Taizhou 225300, China)

(2 College of Veterinary Medicine, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China)

Abstract To research a new transient oviduct bioreactor expressing recombinant human tissue kallikrein, hKLK1 cDNA-expression cassette was subcloned into avian adeno-associated virus transfer vector pAITR, and transfected into AAV-293 cells with AAV helper vector pcDNA-ARC and adenovirus helper vector pHelper using calcium phosphate precipitation method. The recombinant AAV-KLK1 were injected into laying hens via wing vein at 1×10^{10} virus particles per hen. Oviduct-specific expression of hKLK1 was demonstrated by reverse transcription-PCR; the enzymatic activity results showed that the kallikrein expression could be detected at the second day after injection, reaching the highest level of 107.3U/ml at the third week, and lasted for 6 weeks after injection; Oral administration of hKLK-contained egg white had significant hypotensive effect on spontaneous hypertension rats, which lasted for 5 days. These data suggest that the transient oviduct reactor mediated by recombinant avian adeno-associated virus can be used for high level and long-lasting hKLK1 expression, and the production of other recombinant proteins.

Key words Recombinant avian adeno-associated virus Human tissue kallikrein Transient Oviduct bioreactor

致 谢

近期为本刊审稿的专家(按姓氏笔画顺序排列):

牛天贵 王才林 王明丽 王 恒 王锡锋 邓 宁 卢文玉 石继红 刘纯杰 刘佳佳
刘彦君 刘 斌 孙启鸿 孙建光 朱俊萍 江 宁 许雪梅 何振艳 张博润 李乐攻
李校堃 李 寅 杜卫华 杜 伟 杜 杰 杜冠华 沈亚领 花宝光 邱德有 陆 伟
陈三凤 陈靠山 周志华 金宁一 侯 伟 哈小琴 姚冬生 段明星 赵肃清 钞亚鹏
唐 宏 夏 强 郭 宁 顾 军 高雪芹 崔玉芳 常智杰 曹泽虹 梁 平 梁前进
阎锡蕴 黄国亮 黄 波 黄秉仁 韩文玲 蔡海波 裴雪涛 潘 皎