

(2): 120

Application of Antisense RNA Technique in the Areas of Plant Gene Engineering. Zhou Yuegang (*Department of Biology, Southwest Agricultural University, Chongqing 630716, China*).

Abstract The antisense RNA technique and its application in the areas of plant gene engineering were reviewed, including (1) ripening control of tomato and some other fruits; (2) plant resis-

tance to diseases; (3) modification of flower colours; (4) control of starch synthesis in plants; (5) control of fatty acid synthesis in plant rapeseeds; (6) inducing male sterility or restoring male fertility in hybrid seed production; and (7) others, for example, reduction of lignin content in tobacco or trees, reduction of nicotine content in tobacco.

Key words antisense RNA, antisense gene, ripening gene, plant virus, flower colours, starch synthesis, fatty acid synthesis, sterility

痘苗病毒载体研究进展

金宁一 殷震

(解放军农牧大学解放军基因工程实验室, 长春 130062)

摘要 制备高活性的真核蛋白, 必须使用哺乳动物细胞, 痘苗病毒为这一工作提供了简便、实用的工具。痘苗病毒宿主范围广, 无致癌性, 插入长达 20 多 kb 的外源基因后仍有感染性, 能够高效表达外源蛋白, 有效地加工表达产物。而且, 痘苗病毒的表达产物可刺激机体免疫系统产生良好的体液免疫和细胞免疫。利用这些特点构建成的哺乳动物细胞高效表达系统将是基因工程药物和基因工程疫苗的有效工具。

关键词 痘苗病毒, 载体, 疫苗

1982 年, Paoletti 研究组^[1]将外源基因插入痘苗病毒的 TK 基因中, 首次成功地构建了在哺乳动物细胞中表达外源基因的重组痘苗病毒。10 多年来, 应用重组痘苗病毒成功地表达了来源于植物、动物乃至人类的数十种基因。重组痘苗病毒具有如下特点: a. 痘苗病毒宿主范围广, 感染几乎所有源于哺乳动物培养细胞, 并表达外源蛋白; b. 被表达的外源蛋白, 在感染细胞中, 能够有效地进行修饰, 产物接近天然; c. 具有较高的表达效率; d. 通过对动物接种重组痘苗病毒的方法, 能够了解外源蛋白对个体的作用及免疫应答; e. 表达抗原基因的重组痘苗病毒可作为基因重组疫苗。正因为有这些特点, 痘苗病毒载体广泛用

于分子生物学、细胞生物学、免疫学领域及新型疫苗的开发。

1 基因组结构与复制

痘苗病毒基因组为两端交叉闭锁的线型双链 DNA 分子, 根据毒株的不同其长度变化在 180~200 kb 间, 编码约 200 种蛋白^[2]。基因组的两端向内。并有 10 kb 的倒置重复序列, 即序列完全一致, 方向相反, 呈倒置互补^[2], 其中含 70~125 bp 的重复区, 此 70 bp 为痘苗病毒的复制所必要, 其中 20 bp (ATTTAGT-GTCTAGAAAAAAT) 尤为重要。此末端倒置

重复序列变异较大, 即使同一毒株其结构亦不尽相同. 这种两端变异较大的序列, 大多编码非必需蛋白, 与病毒毒力及宿主范围有关.

在痘苗病毒基因组中央区域约有 120 kb 的保守区, 核苷酸变异较小, 变异率在 10% 前后. 晚期基因大多集中于此区中, 主要编码结构蛋白. 痘苗病毒基因组编码约 198 个主要 ORF 和 65 个与其他基因重叠的小 ORF, 总共编码约 263 个蛋白. 痘苗病毒的读码框架间相距仅几个至几十个碱基, 有的读码框架相互重叠. 基因组中无内含子, 无基因编接机制. 痘苗病毒增殖均在哺乳动物细胞胞浆中进行, 并在 20 h 内完成一个病毒复制周期. 利用重组痘苗病毒表达外源基因时, 将外源基因插入到痘苗病毒非必需区基因中去. 因此, 目前为止人们常在 TK 基因和 HA 基因^[3]中插入外源基因进行表达. Paoletti 等^[1]在痘苗病毒基因组 HindIII M, K, F, E 片段的 Bgl II 位点中插入 β -半乳糖苷酶基因, 得到了表达 β -半乳糖苷酶的重组痘苗病毒.

2 基因表达的调控

为了使重组痘苗病毒更有效地表达外源基因, 首先要了解痘苗病毒基因表达的调控机制. 痘苗病毒同其他真核生物一样, 调控主要发生在转录水平上. 病毒 DNA 合成前的转录产物 (早期产物), 主要是与 DNA 合成有关的酶系. 病毒 DNA 合成后的转录产物 (晚期产物), 主要是病毒粒子结构蛋白和与病原性有关的蛋白. 早、晚期的 mRNA 均有 5' 端帽结构. 3' 端有聚腺苷酸 (poly A) 结构.

早期 mRNA 3' 端有 UUUUUNU 序列 (又称早期终止信号), 其被由 97 ku 和 33 ku 二个亚单位组成的转录终止因子 (VTF) 识别后, 使转录终止于此序列的下游 50 核苷酸处^[4], 而 VTF 又是 mRNA 5' 端形成帽结构酶, 这说明 5' 端帽结构与 RNA 聚合酶相互作用后可造成特殊序列依赖性转录终止; 或者形成帽结构酶与 RNA 聚合酶结合后, 通过识别终止信号的方式终止转录^[5].

晚期 mRNA 无早期终止信号结构, 但有特殊的 5' 端 poly A 结构. 推测此结构可能作用于翻译过程. poly A 酶由 55 ku 和 33 ku 二个亚单位组成. 为了解转录的调控机制, 对痘苗病毒各基因启动子结构进行了分析比较, 结果发现痘苗启动子与哺乳类共有的启动子结构 Hogness-Goldberg box (TATAA) 有所不同. 这说明痘苗病毒只利用自身的 RNA 聚合酶, 而不用细胞的 RNA 聚合酶. 通过在痘苗病毒一些基因启动子结构中导入置换性突变来检测其活性变化或比较了一些启动子结构的序列, 发现早期和晚期启动子结构有所不同.

早期启动子由上游的 16 bp 关键区、11 bp 间隔区和 7 bp 转录起始区三部分组成. 关键区中富含 A 碱基, 如果把 A 置换成其他碱基其启动子活性明显下降. 间隔区的碱基组成比其他两个区不规则, 只含嘌呤碱基则不影响启动子活性; 晚期启动子亦由三部分组成. 即, 上游的 20 bp T、A 富含区、6 bp 间隔区和高度保守的 5 bp (-1) TAAAT (+4) 区三部分组成. TAAAT 中的 A 尤为重要, 如用点突变法去掉 A 则完全丧失启动子活性. 上游 -7 的碱基组成对保证启动子活性甚为重要, 只要含 A 或 T 则提高启动子的活性, 如果只有 T 而无 A 时, 启动子活性进一步提高^[6].

对启动子结构的深入了解, 有助于改造利用自然界中的启动子. 在痘苗病毒早期启动子关键区中导入点突变, 使启动子的效率可提高几倍或十几倍^[7]. 在痘苗病毒晚期启动子 (28 ku 启动子) -8 至 -28 全部置换成 T, 则使其活性提高 100 倍^[6]. 痘苗病毒表达载体中常用的启动子为 7.5 ku 和 11 ku 启动子, 也有人用牛痘病毒 A 型包涵体启动子 (ATI). 近年来有人利用痘苗病毒以外的噬菌体 T7 启动子和 T7RNA 聚合酶试图提高痘苗病毒的表达效率. 但 ATI-P7.5 早期突变型启动子串连成复合体时的表达效率则高于 T7 表达系统^[8].

3 重组痘苗病毒制备与外源基因表达

制备重组病毒时, 首先准备含有痘苗病毒

非必需区基因的质粒, 在此非必需区中部插入痘苗病毒自身的启动子 (成为痘苗病毒表达载体), 启动子下游连接欲表达的外源基因. 接着对已感染痘苗病毒 1~2 h 的细胞, 转化上述重组质粒, 使重组质粒中所含的痘苗病毒非必需区序列与痘苗病毒非必需区序列发生同源重组. 在这一过程中外源基因重组到痘苗病毒基因组中, 形成重组痘苗病毒.

痘苗病毒重组率一般为 0.1% 左右, 若结合脂质体法、共转染、试管内重组后再转染及显性筛选标记, 可大大提高重组率和重组病毒的筛选机率.

在感染早期、晚期表达外源基因的量, 主要取决于外源基因上游的痘苗病毒启动子结构. 其次, 取决于同源重组的非必需区. 最常用的启动子是在痘苗病毒感染早、晚期均有活性的 P7.5 启动子^[9] 和晚期启动子 P11、ATI 等. 利用痘苗病毒载体表达的外源蛋白的修饰接近天然, 例如 N-和 O-糖基化、磷酸化、蛋白酶加工处理、分泌及细胞器内积聚等.

利用 P11 或 ATI 晚期启动子, 可以高效表达外源蛋白. 但如果考虑到表达蛋白的免疫诱导, 则在重组痘苗病毒感染早期高效表达尤其重要. 因为有实验表明, 一些蛋白在感染早期表达可诱导体液免疫和细胞免疫, 而感染后期表达则主要诱导体液免疫^[10]. 由于早期启动子的活性很弱, 用其所启动表达的外源蛋白往往只占细胞总蛋白的 0.1% 左右. 作者等^[11] 构建的 ATI-P7.5 突变型早期启动子串联复合体, 启动表达氯霉素乙酰转移酶 (CAT) 的量占细胞总蛋白的 18%. 利用相同的启动子下表达外源蛋白, 若插入到非必需区 HA 基因区时, 其产量要高于 TK 基因区时的产量^[11].

4 病原性

多年来的体外研究表明, 痘苗病毒基因组中约 1/3 的基因, 并非在自身复制中必需. 但体内感染研究表明, 痘苗病毒的很多非必需区基因在体内增殖必需. 对于痘苗病毒致病基因的

研究表明, 痘苗病毒具有巧妙的生活方式, 即痘苗病毒具有逃避机体的免疫攻击的机制. 痘苗病毒合成的 35 ku 分泌蛋白与 C4b 结合, 抑制经典的补体激活途径. 痘苗病毒具有一定的抵抗干扰素的作用. 另外, 痘苗病毒产生一种丝氨酸蛋白酶抑制剂, 这说明它可抑制由重组痘苗病毒表达的外源蛋白与抗体之间反应. 痘苗病毒基因组中还存在着与肿瘤坏死因子、白介素 1 和白介素 6 可溶性受体相对应的 ORF, 推测其产物可能与这个细胞因子受体结合.

痘苗病毒的 TK 基因属于致病基因, 它在 DNA 复制中必需, 但为何 TK⁻ 痘苗病毒能在细胞中增殖, 这是由于它利用了细胞酶系的缘故. 如果进入机体则会使 TK⁻ 病毒增殖能力降低, 变成弱毒化的痘苗病毒. 野生型痘苗病毒中也存在 HA⁻ 变异株. 实际上 HA 基因也属于致病基因. HA 促进病毒粒子吸附细胞的作用^[7]. HA⁺ 痘苗病毒形成的空斑吸附鸡红细胞成为红色空斑, 而 HA⁻ 痘苗病毒空斑不吸附鸡红细胞. 利用这种红细胞吸附原理, 在 HA 基因中插入外源基因, 可筛选 HA⁻ 重组痘苗病毒, 同时又成了弱毒化的痘苗病毒.

随着对痘苗病毒基因组结构的深入了解, 以缺失致病基因的手段可以制备弱毒化的痘苗病毒. Paoletti 等将 TK 基因、HA 基因、ATI 基因等 18 个基因进行定向缺失, 得到缺失变异痘苗病毒株 NYVAC, 将其接种小鼠脑内, 计算了小鼠 50% 致死量, 发现这种缺失变异株比原始的毒株毒力弱 10 000 倍^[12]. NYVAC 在鸡胚细胞中增殖, 却不能在人源细胞株中增殖. 用 NYVAC 作为野生型痘苗病毒, 制备了表达狂犬病毒糖蛋白重组痘苗病毒, 将其接种小鼠后, 可抵抗狂犬病强毒的攻击^[12].

5 疫苗制备

痘苗病毒载体已广泛用于外源基因的表达调控研究, 逐步成为常规表达外源蛋白的工具. 利用痘苗病毒载体进行疫苗开发研究主要有如下两个大的方面.

首先, 利用痘苗病毒载体高效表达外源基

因生产多肽或亚单位疫苗. 如何构建和利用高效表达痘苗病毒载体系统成为表达外源基因的关键一步.

Barrett 等^[13]已成功地利用 T7 启动子/聚合酶系统高效表达了 HIV-1 外膜 gp160, 10⁷ 个细胞中的产量为 22 μg 左右. 作者等利用 ATI-P7.5 早期突变型复合启动子表达载体, 表达了 HIV-1 外膜 gp160, 10⁷ 个细胞中的产量为 60 μg 左右^[8]. 有人已用痘苗病毒表达的 HIV-1 外膜 gp 120 或 gp 160 进行了人体试验^[10], 有的 HIV 带毒者经两年连续免疫, 用 PCR 检测不出体内的 HIV 核酸.

其次, 利用痘苗病毒载体进行重组活疫苗研究. 由于重组痘苗病毒不仅诱导机体产生体液免疫, 且诱导坚强的细胞免疫. 痘苗病毒作为基因重组活疫苗载体, 不需佐剂即可免疫动物, 病毒在体内增殖过程中产生的外源蛋白可刺激机体产生免疫反应.

重组痘苗病毒已用于人类疾病的临床研究, 有些重组痘苗病毒活疫苗正进行免疫观察阶段. 在北欧从 1989 年 9 月起野外投放狂犬痘苗重组病毒 3 次, 到了 1990 年后半叶投放区野生狐狸及其周围家畜, 已无狂犬病发生^[14]. 猴免疫缺陷病毒 (SIV) 痘苗重组病毒接种猴体后可抵抗强毒的攻击^[5]. HIV-1 痘苗重组病毒接种人体, 已进入 I - II 期临床试验.

总之, 痘苗病毒无致癌性、稳定性好、宿主范围广、基因组容量大 (可插入 25 kb 的外源基因)、非必需区多、能诱发机体坚强的体液免疫和细胞免疫等优点. 虽然存在百万分之一的种痘后脑炎和全身性发痘, 但随着对其基因组结构、功能深入认识和改造, 会成为分子生物学、基因工程生物活性物质生产、基因重组疫苗及多价疫苗研究的有效工具.

参 考 文 献

1 Panicali D, Paoletti E. Proc Natl Acad Sci USA, 1982; 79: 4927

- 2 Baroudy B M, Venkatesan S, Moss B. Cell, 1982; 28: 315
- 3 Shida H, Tochikura T, Sato T *et al.* EMBO J, 1987; 6: 3379
- 4 Rohrmann G, Yuen L, Moss B. Cell, 1986; 46: 1029
- 5 Shuman S, Broyles S S, Moss B. J Biol Chem, 1987; 262: 11592
- 6 Davison A J, Moss B. J Mol Biol, 1989b; 210: 771
- 7 Oie M, Shida H, Ichihashi Y. Virology, 1990; 176: 494
- 8 Jin N-Y, Funahashi S, Shida H. Arch Virol, 1994; 138: 315
- 9 Davison A J, Moss B. J Mol Biol, 1989; 210: 749
- 10 Coupar B E H, Andrew M E, Both B W *et al.* Eur J Immunol, 1986; 16: 1479
- 11 McElrath M J, Corey L, Berger D *et al.* J Infect Dis, 1994; 169: 41
- 12 Sugimoto M, Yasuda A, Miki K *et al.* Microbiol Immunol, 1985; 29: 421
- 13 Barrett N, Mitterer A, Mundt W *et al.* AIDS Res Human Retroviruses, 1989; 5: 159
- 14 Brochir B, Kieny M P, Costy F *et al.* Nature, 1991; 354: 520

Progress on the Study of Vaccinia Virus Vectors. Jin Ningyi, Yin Zhen (*University of Changchun Agriculture and Animal Sciences, Changchun 130062, China*).

Abstract It is prospective to use mammalian cells for producing fully active eukaryotic proteins. Vaccinia virus vector provides a simple, practical means for this purpose. As a vector, vaccinia virus has a number of useful characters: wide host range, non-carcinogenicity, permitting of cloning large fragments of foreign DNA (> 20 kb), retention of infectivity after insertion of foreign DNA, relatively high level of protein synthesis as well as "appropriate" transportation, secretion, processing and posttranslation modifications. In addition, the expressed proteins can prime immune system well to develop humoral and cellular immunity. Vaccine virus vector with high level expression will be or very useful in producing bioactive substances and constructing recombinant vaccines in mammalian cells.

Key words vaccinia virus, vector, vaccine