

基于 DNA 的 Semliki 森林病毒复制子载体 体内外高水平表达外源基因

余云舟 孙志伟 刘志刚 俞炜源*

(军事医学科学院生物工程研究所, 北京 100071)

摘要 基于 DNA 的复制子载体显著地提高了复制子载体的应用范围, 在体外可用于高水平表达外源基因, 大规模制备重组病毒颗粒, 在体内可用于复制子疫苗和基因治疗载体研究. 将复制子 RNA 的 cDNA 置于 RNA 聚合酶 II 启动子和转录终止子控制下时, 基于 RNA 的复制子载体可转变为基于 DNA 的复制子载体. 当 DNA 载体转染细胞后, 第一阶段, RNA 聚合酶 II 启动子在核内起始合成 RNA, 经过加工和修饰后运输到细胞质中, 相当于复制子 RNA, 第二阶段, 该 RNA 自我复制及表达外源基因, 相当于病毒 RNA 复制循环. 在成功地构建了基于 DNA 和 RNA 的双功能复制子表达载体 pSCTA 和辅助载体 pSHCTA 的基础上, 为了获得高效的基于 DNA 的复制子载体, 对其进行改进而构建了共 4 种不同的基于 DNA 的 semliki 森林病毒复制子, 通过对表达载体和相应的辅助载体表达报告基因及对制备重组病毒颗粒的能力进行比较, 获得了复制能力提高的复制子载体 pSCAR 和 pSHCAR. 该表达载体 pSCAR 可高水平表达外源基因, 与辅助载体 pSHCAR 共转染可制备高滴度的重组病毒颗粒, 并且也能表达抗原基因. 另外, 报告基因在 DNA 复制子载体注射的小鼠体内得到了高水平表达, 并且 DNA 免疫小鼠后也诱导产生高滴度特异性抗体以及细胞免疫反应. 结果表明, 经过改造 SFV 复制子载体, 获得了高效的基于 DNA 的 SFV 复制子载体. 该复制子载体增强了原复制子载体应用能力, 并有潜力作为复制子疫苗和基因治疗载体.

关键词 semliki 森林病毒, RNA 复制子, DNA, 重组病毒颗粒, 疫苗

学科分类号 Q78

甲病毒属于披膜病毒科, 基因组为单股正链 RNA, 长度约为 12 kb, 5'端 2/3 区域编码非结构蛋白 (nonstructural proteins, nsPs), 它们是病毒基因组 RNA 复制和转录所必需的, 3'端 1/3 区域编码结构蛋白 (structural proteins, sPs). 其基因组 RNA 一方面可以作为 mRNA 翻译合成非结构蛋白 (nsPs), 另一方面又可以作为复制的模板合成负链 RNA. 反过来负链 RNA 又是新的病毒基因组 RNA 和 26 S 亚基因组 RNA 合成的模板. 甲病毒 (alphaviruses) 的三个成员, 辛德比斯病毒 (Sindbis virus, SIN)、西门利克森林病毒 (Semliki Forest virus, SFV) 以及委内瑞拉马脑炎病毒 (Venezuelan equine encephalitis virus, VEE) 均已开发成复制子, 可成为极有应用价值的真核表达载体.

甲病毒复制子包含病毒基因组 5'和 3'端的顺式作用序列、全部非结构蛋白基因 (即复制 / 转录酶编码基因), 其病毒结构蛋白基因缺失或被外源基因所取代, 复制 / 转录酶控制载体 RNA 在胞浆

中高水平复制以及亚基因组 mRNA 高水平表达外源基因. 由辅助载体 RNA (缺失非结构蛋白基因) 提供反式互补的结构蛋白在体内将复制子 RNA 包装成重组病毒颗粒 (RVP). SFV 复制子载体是基于 semliki 森林病毒 (semliki forest virus, SFV) 的真核表达载体, 将 SFV 的 cDNA 置于 SP6 启动子下, 外源基因直接克隆于该载体中, 以其作为模板在体外转录生成重组 RNA, 转染细胞, 复制 / 转录酶控制载体 RNA 在胞浆中高水平复制以及亚基因组 mRNA 高水平表达外源基因. 与其他表达载体相比, SFV 复制子表达系统具有宿主范围广、表达效率高等优点, 已被广泛用于表达外源基因和构建复制子疫苗以及基因治疗导向载体制备等领域, 尤其是在疫苗研究方面, 已有病毒和肿瘤复制子候选疫苗进入临床前期及临床试验, 显示了其应用前景^[1,2].

* 通讯联系人. Tel: 010-66948828, E-mail: yuw@nic.bmi.ac.cn

收稿日期: 2005-06-29, 接受日期: 2005-07-31

基于 RNA 的 SFV 复制子系统的缺点是需要要在体外转录制备成加帽的 RNA, 成本高, 并且 RNA 不稳定, 转染效率不高, 因此限制其应用. 为了更好地应用 SFV 复制子载体, 最初将其改造成同时含有 CMV 和 T7 两个启动子的复制子表达载体 pSCTA 和辅助载体 pSHCTA. 该载体以 DNA 方式递送细胞, 在体内由细胞 RNA 聚合酶 II 转录成复制子 RNA, 无需体外转录过程制备 RNA, 可高水平表达报告基因以及共转染制备高滴度重组病毒颗粒, 也可由 T7 启动子体外转录制备 RNA, 并且制备的 RNA 产量高, 纯度好, 转染后细胞阳性率高, 制备的重组病毒滴度高, 为基于 DNA 和 RNA 的双功能复制子载体^[3]. 但该 DNA 载体转染细胞后, 在体内转录产生的 RNA 经过加工和修饰后, 在复制子 RNA 的 5' UTR 上游多余了 T7 启动子序列, 而在 3' UTR A69 下游附加了第二个 poly(A), 结果造成在体内产生的复制子 RNA 附带了非病毒序列. 研究表明, 5' 和 3' UTR 的准确性对正链 RNA 病毒基因组的感染性和复制效率是极其重要的^[4]. 为了去除这些非病毒序列, 进一步提高基于 DNA 复制子载体复制及表达外源基因的能力, 本研究以 semliki 森林病毒衍生的复制子载体 pSFV1 和辅助载体 pSFV-helper2 为骨架, 通过在 5' UTR 上游仅克隆入 CMV 启动子, 在 3' UTR 下游插入自我剪切核酶 HDVr 序列^[5]而构建了 4 种不同的基

于 DNA 的 semliki 森林病毒复制子表达载体和相应的辅助载体, 研究其表达外源基因和制备重组病毒颗粒的能力, 获得了复制能力提高的复制子载体. 该表达载体 pSCAR 在体外可高水平表达外源基因 (如 LacZ 基因), 或与辅助载体 pSHCAR 共转染可制备高滴度的重组病毒颗粒, 并且也能表达抗原基因, 同时体内实验证实, 报告基因在小鼠体内得到了高水平表达, 免疫小鼠后诱导产生高滴度特异性抗体以及细胞免疫反应.

1 材料与方法

1.1 细胞与载体

BHK21 细胞株于含 5% 小牛血清, 10 U/ml 青霉素和 10 g/L 链霉素的 DMEM 培养基 (Invitrogen 公司) 培养. pSFV1、pSFV3-LacZ 和 pSFV-helper2 (Invitrogen 公司) 为基于 SFV 的原始复制子载体, pSCTA、pSHCTA 和 pSCA-LacZ 为构建的基于 DNA 和 RNA 的双功能 SFV 复制子载体. pcDNA3.1 (+) (Invitrogen 公司), pFRT/LacZeo (Promega, 表达 β -半乳糖苷酶的表达载体), pCMV-LacZ (构建的表达 β -半乳糖苷酶的表达载体) 为本实验室保存.

1.2 引物和寡核苷酸

用于构建基于 DNA 的 SFV 复制子载体的引物和寡核苷酸见表 1.

Table 1 Primers used to construct DNA-based replicon vectors derived from semliki forest virus

Primer	Sequence (5'→3')	Enzyme site
CMV IE promoter		
F-CMV	<u>gccggcatgctagttattatagtaataattacggggtc</u>	<i>Sph</i> I
R-CMV	<u>catccgccatcgtagccagagactctgc</u>	Overlap
SFV vector 5' end		
F-SC	<u>ctctggctaacgatggcgatgtgtgacatac</u>	Overlap
R-SC	<u>cagtgatatccaagatgagtggtctcttg</u>	<i>EcoR</i> V
BGH transcription termination and polyadenylation signal		
F-SA	<u>ctagactagtctgtgccttctagttgccag</u>	<i>Spe</i> I
R-XA	<u>ctagtctagaagccatagagccaccc</u>	<i>Xba</i> I
HDV antigenomic ribozyme sequence		
F1	<u>ctagtgggtcggcatggcatctccacctctcggtcc</u>	<i>Spe</i> I ¹⁾
F2	<u>gacctgggcatccgaaggagacgtcgtctccactcggatgggctaaggagag</u>	Overlap
R1	<u>ctccttcggatcccaggtcgaccgcgaggaggtggagatgccatgccaccca</u>	Overlap
R2	<u>ctagctctcccttagccatccgagtgacgacgtc</u>	<i>Spe</i> I ¹⁾

Overlap, primer is partially complementary with another primer, for use in overlapping PCR. Underlined, enzyme recognition site. ¹⁾ Annealed and complementary enzyme recognition site which ligated with vector.

1.3 PCR 和分子克隆

PCR, 质粒提取和 DNA 连接、转化、酶切等分子克隆按常规方法进行, 参照《分子克隆》.

1.4 DNA 转染细胞

DNA 转染细胞采用 Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen 公司), 按照优化的程序进行. 将 DNA 以 1.6 μg /孔的剂量转染到 12 孔板中的 70%~80% 单层 BHK21 细胞, 37℃ 于 CO₂ 孵箱培养. 制备重组病毒颗粒时, 共转染表达载体和辅助载体 (摩尔数 1:1, 共 1.6 μg), 于培养 24 h 和 48 h 后分别收集重组病毒原液各 1 ml (即培养基上清).

1.5 外源基因表达的检测

X-Gal 原位染色法检测 LacZ 基因表达以及 β -半乳糖苷酶活性定量分析 LacZ 表达水平 (β -Galactosidase Enzyme Assay System with Reporter Lysis Buffer, Promega 公司, 根据标准曲线及酶标准量将吸光度值转变成蛋白质量). 定量分析外源基因表达水平至少 3 次重复, 扣除细胞本身的背景值, 取平均值.

1.6 重组病毒颗粒感染靶细胞及滴度测定

病毒原液中加入终浓度为 500 mg/L 的 α -胰凝乳蛋白酶 (α -chymotrypsin), 室温 20 min 后, 加入终浓度为 250 mg/L 的抑肽酶 (aprotinin) 以灭活 α -胰凝乳蛋白酶. 激活的病毒原液经梯度稀释后感染 BHK21 细胞以检测其重组病毒颗粒活性并测定其滴度. 每一个阳性细胞数相当于一个感染性重组病毒颗粒, 总病毒滴度由显微镜特征系数和稀释倍数以及阳性细胞数来计算, 至少 3 次重复, 并且取二批重组病毒原液的平均值作为病毒滴度.

1.7 体内 DNA 免疫和体液及细胞免疫检测

6~8 周龄的 SPF 级雌性 BALB/c 小鼠随机分组, 每组 3 只, 分别于小鼠的两侧四头肌中注射 30 μg 稀释于 PBS 中的质粒 DNA pSCAR-LacZ、pCMV-LacZ 和 pSCAR (空载体). 小鼠每条后腿肌肉各注射 15 μg DNA, 50 μl 体积, 注射后, 立即对注射部位进行电刺激, WJ-2002 活体基因导入仪参数为: 100 V、50 ms, 6 个脉冲后, 调转极性再进行 6 个脉冲. 间隔 2 周加强免疫, 共 2 次, 免疫剂量与初次免疫相同, 于最后加强免疫 3 周后眼眶采血, 分离血清用于抗体检测. 终末稀释 ELISA 法测定免疫动物血清中的特异性抗体. 以 β -半乳糖苷酶 (Promega 公司) 为抗原, 辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的酶标 IgG 为二抗, pSCAR (空载体) 组小鼠血清为阴性对照, 以 A_{492} 值达到 0.2 以上, $P/N \geq 2.1$ 为阳

性. 同时小鼠断颈处死, 取脾, 脾细胞经抗原刺激后, 用 MTT 法测定淋巴细胞的增殖反应. 每孔细胞加入 10 μl MTT (5 g/L), 5 h 后, 每孔再加入 100 μl 10% SDS, 37℃ 过夜孵育, 于 570 nm 处测定各孔的吸光度值, 刺激指数 (SI) = 实验组平均 A 值 / 空白组平均 A 值.

2 结 果

2.1 不同的基于 DNA 的 SFV 复制子载体的构建

参照构建基于 DNA 和 RNA 的双功能复制子载体 pSCTA 和 pSHCTA 的策略, 改进的基于 DNA 的复制子载体具体构建过程如下: 以 F-CMV/R-CMV 和 F-SC/R-SC 的引物组合重叠延伸 PCR 扩增 866 bp 大片段 (仅含 CMV 启动子) 替换了 SP6 启动子, F-SA 和 R-XA 为引物 PCR 扩增 238 bp BGH 转录终止子序列克隆入复制子载体的 *Spe* I 位点, 构建的重组质粒命名为 pSCA. 人工合成的 4 条引物 (F1、F2、R1 和 R2) 经磷酸化、退火复性后与酶 *Spe* I 线性并去磷酸化的载体 pSCTA 和 pSCA 相连, 构建的正向克隆的重组质粒分别命名为 pSCTAR 和 pSCAR, 即构建了另外 3 种基于 DNA 的复制子表达载体, 如图 1a. 在此基础上, 构建了 3 种相应的基于 DNA 的复制子辅助载体, 分别命名为 pSHCA、pSHCTAR 和 pSHCAR, 如图 1b, 以及 3 种含报告基因 LacZ 的基于 DNA 的复制子表达载体, 分别命名为 pSCA-LacZ、pSCTAR-LacZ 和 pSCAR-LacZ, 如图 1a.

另外, 通过酶 *Sac* II 消化 pSCAR-LacZ 后自连构建了非结构蛋白基因缺失 2.7 kb 片段的复制子表达载体 pSCAR-LacZ-del, 如图 1c. 以上构建的重组质粒均经酶切鉴定和序列测定为正确的克隆.

2.2 影响 DNA 复制子表达载体复制及表达外源基因水平的研究

含 LacZ 基因的 4 种 DNA 复制子表达载体转染细胞后, 通过 X-Gal 原位染色法检测 LacZ 基因表达, 阳性细胞呈蓝色, 表明基于 DNA 的 SFV 复制子载体能够表达外源基因. 4 种基于 DNA 的复制子表达载体转染细胞后 48 h, 对细胞进行 β -半乳糖苷酶活性定量分析, 比较其表达外源基因水平, 结果如图 2, 与 pSCTA 相比, pSCAR 表达外源基因水平提高了 3 倍, 表明改进的 pSCAR 载体具有更好的复制及表达外源基因的能力, 也证实了复制子 RNA 的 5' 和 3' UTR 非病毒序列影响其复制.

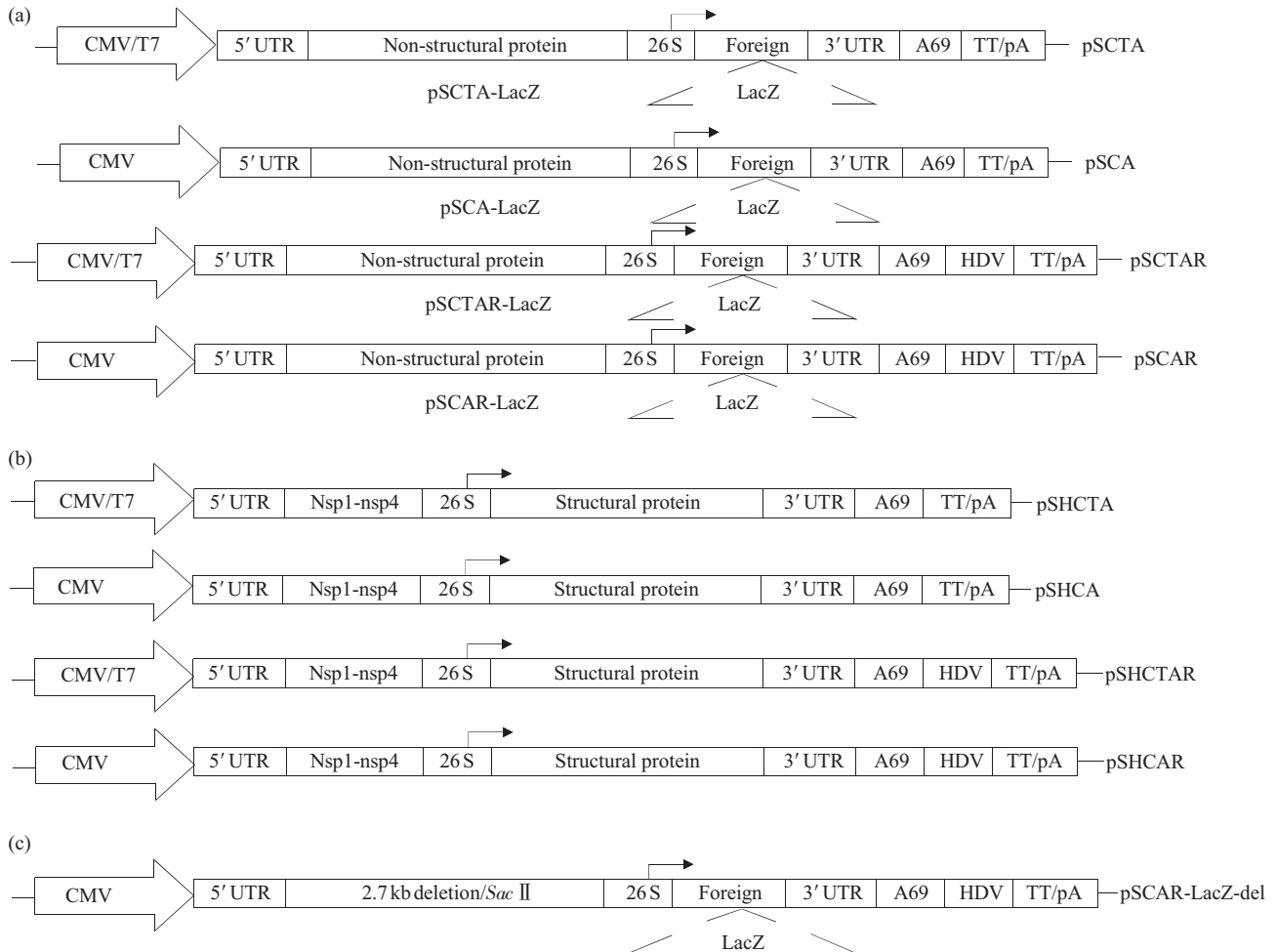


Fig. 1 Schematic illustration of DNA-based SFV replicon expression vectors and helper vectors used throughout this study

(a) DNA-based SFV expression vectors pSCTA, pSCA, pSCTAR and pSCAR; DNA-based β -Gal-encoding SFV replicon expression vectors pSCTA-LacZ, pSCA-LacZ, pSCTAR-LacZ and pSCAR-LacZ. (b) Helper vectors pSHCTA, pSHCA, pSHCTAR and pSHCAR. (c) pSCAR-LacZ-del deleted 2.7 kb *Sac* II fragment in nsP2-3 region from pSCAR-LacZ. CMV, cytomegalovirus immediate early (CMV IE) enhancer/promoter. T7, T7 promoter. TT/pA, BGH transcription termination and polyadenylation signal. HDV, HDV antigenomic ribozyme sequence.

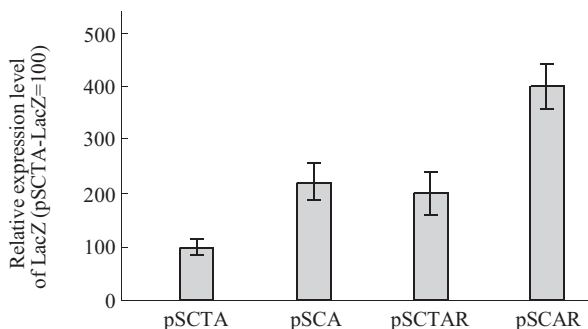


Fig. 2 Comparison of expression level of heterologous gene in cells transfected with different DNA-based replicon vectors

Relative expression levels of LacZ in cells transfected with four different replicon expression vectors pSCTA-LacZ, pSCA-LacZ, pSCTAR-LacZ and pSCAR-LacZ. Expression levels of LacZ in cells of 12-well transfected with replicon expression vectors 1.6 μ g were assayed by β -Galactosidase Enzyme Assay System 48 hours post-transfection.

在此基础上, 对复制能力提高的复制子载体 pSCAR 复制及表达外源基因水平进行了进一步的研究. 与常规哺乳动物细胞表达载体 (CMV 和 BGH pA 控制, 如 pCMV-LacZ) 相比, 复制子表达载体 pSCAR-LacZ 转染后阳性细胞表达量得到明显增加, 而 pSCAR-LacZ-del 载体转染后无阳性细胞 (图 3). 为了确定复制子表达载体相对提高外源基因的表达水平和复制子复制及表达外源基因的特性, 对其在转染后不同时间和转染不同剂量条件下, 表达外源基因水平与常规 DNA 载体以及 pSCAR-LacZ-del 载体进行了比较, 结果如图 4. pSCAR-LacZ 在细胞中表达 LacZ 水平是 pCMV-LacZ 的 10 倍, 可产生 6 μ g 以上 β -半乳糖苷酶, 而 pSCAR-LacZ-del 则没有表达外源基因, 即缺失非结构蛋白的复制子载体不能复制及表达外

源基因，证实 DNA 复制子复制、表达以及增强外源基因表达水平是依赖于复制酶功能的. 不同时间和不同剂量条件下表达外源基因水平结果也表明，基于 DNA 的复制子表达载体具有随着 RNA 复制而增强外源基因表达水平和低剂量高水平表达外源基因的特性，进一步证实 DNA 复制子复制、表达

以及增强外源基因表达水平是依赖于复制酶功能的. 另外，对含有另一个报告基因 GFP 复制子表达载体 (在荧光显微镜下直接观察 GFP 表达以及流式细胞仪定量分析其表达水平) 进行的实验结果与报告基因 LacZ 的结果一致，进一步证实了上述的结论.

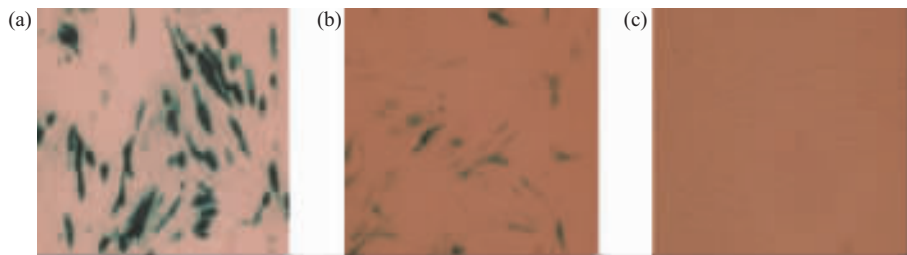


Fig. 3 Expression of LacZ gene in cells transfected with replicon expression vectors and plasmid DNA vector (×400)

The expression of LacZ in cells was assayed by X-gal. (a) Cells transfected with pSCAR-LacZ. (b) Cells transfected with pCMV-LacZ (Non-replication). (c) Cells transfected with pSCAR-LacZ-del (Deleted 2.7 kb *Sac* II fragment in nsP2-3 region). All stained with X-gal 48 hours post-transfection.

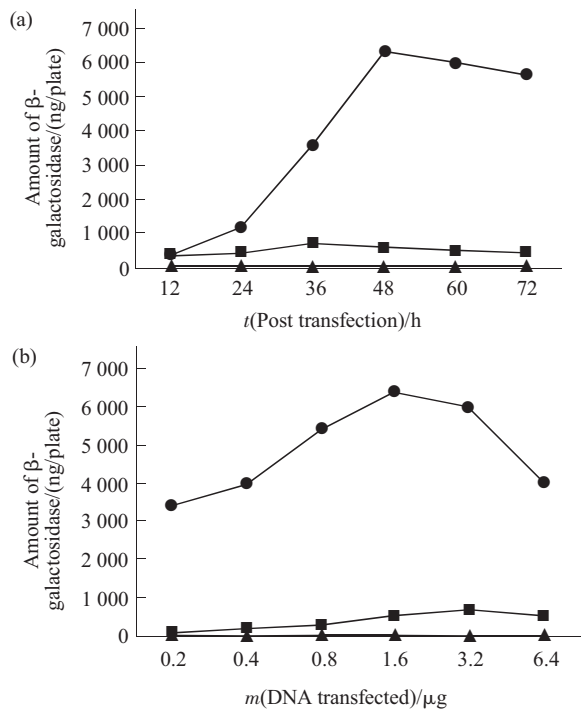


Fig. 4 Expression level of heterologous gene in cells transfected with replicon expression vector and DNA vector at different time points and with different amounts of DNA
(a) The expression levels of LacZ in cells at the indicated time points after transfection with pSCAR- LacZ, pCMV-LacZ and pSCAR- LacZ-del, respectively. (b) The expression levels of LacZ in cells transfection with the indicated amounts of pSCAR-LacZ, pCMV-LacZ and pSCAR-LacZ-del, respectively. β -Gal levels in cells (12-well) transfected with the expression vectors were measured by β -Galactosidase Enzyme Assay System. β -Gal standards were used to convert the readings of A_{405} for the ONPG assay results into nanograms of protein. ●—●: pSCAR-LacZ; ■—■: pCMV-LacZ; ▲—▲: pSCAR-LacZ-del.

2.3 基于 DNA 的复制子载体共转染制备高滴度的重组病毒颗粒

4 种 DNA 复制子表达载体与相应的辅助载体共转染获得的重组病毒颗粒感染细胞后，X-Gal 原位染色法检测 LacZ 基因表达，阳性细胞呈蓝色，统计 36~48 h 后阳性细胞数，计算重组病毒滴度，评价它们共转染制备有活性的重组病毒颗粒的能力，结果如图 5，与 pSCTA 相比，pSCAR 与相应的辅助载体 pSHCAR 共转染制备的重组病毒滴度提高了 7 倍，达到 8×10^5 个 /ml，另外，对含报告基因 GFP 的 DNA 复制子载体共转染制备的重组病毒颗粒进行的实验结果与报告基因 LacZ 的结果一致，表明改进的 pSCAR 载体具有更好的复制及包装能力，与外源基因表达水平的比较结果是一致的.

共转染 1.6 μ g 的 pSCARR-LacZ 和 pSHCAR DNA 于 12 孔板中的 BHK21 细胞，可产生约 10^6 个 /ml 有活性的重组病毒颗粒，通过优化条件，在低温条件下(31~33℃)培养细胞，获得的重组病毒颗粒达到 10^7 个 /ml，与 37℃ 培养条件相比提高了 10 倍，而高滴度的重组病毒可应用于高水平表达有价值的外源基因和制备疫苗及基因治疗的载体. 用 2×10^5 个重组病毒颗粒 (含 LacZ 基因) 感染 4×10^5 BHK21 细胞，定量分析结果表明，在细胞中可产生约 5 μ g β - 半乳糖苷酶，即一次共转染制备的总重组病毒能够产生 200 μ g 以上 β - 半乳糖苷酶. 重组病毒感染细胞后 36 h，取其细胞裂解液

(Reporter Lysis Buffer, Promega 公司) 进行 SDS- 聚丙烯酰胺凝胶电泳 (图 6), 结果表明, β - 半乳糖苷酶在细胞中获得了高水平的表达. pSFV-helper2 为第二代辅助载体, 制备的重组病毒颗粒具有条件感染性, 必须先用 α - 胰凝乳蛋白酶将前体蛋白 P62 切割成 E2 和 E3 而激活重组病毒颗粒^[9], 故具有一定的安全性. 但制备的重组病毒颗粒应用于疫苗和基因治疗载体时, 共转染 DNA 复制子载体制备的高滴度的病毒颗粒会不会由于突变及同源重组而产生野生型病毒, 对此进行了两组实验以评估产生野

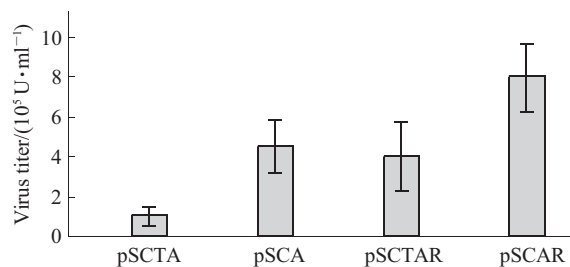


Fig. 5 Comparison of titer of recombinant virus particles in cells transfected with different DNA-based replicon vectors

Total virus titer from cells (12-well) co-transfected with four different expression vectors pSCTA-LacZ, pSCA-LacZ, pSCTAR-LacZ and pSCAR-LacZ and corresponding helper vectors pSHCTA, pSHCA, pSHCTAR and pSHCAR. Virus was harvested 24 h or 48 h after transfection and titer was assessed by statistic numbers of positive cells stained with X-Gal 36~48 h post-infection cells (BHK21).

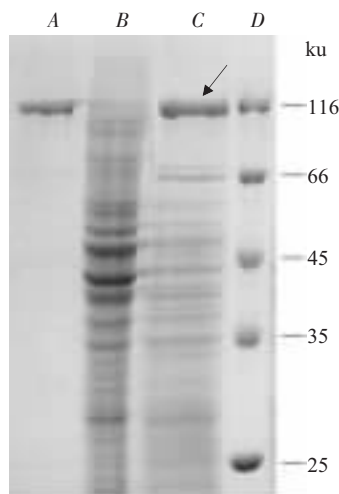


Fig. 6 Analysis of the expressed products in cells infected with RVP by SDS-PAGE

A: β -Gal (Promega), positive control; B: The lysates of the BHK21 cells infected with RVP contained no foreign gene, negative control; C: The lysates of the BHK21 cells infected with RVP contained LacZ gene; D: Protein molecular mass marker. Arrowhead indicates β -Gal of expression product in cells 36 h post-infection with RVP contained LacZ gene.

生型病毒可能性. 将不经激活重组病毒颗粒感染细胞(试验 I, 多次重复)和经激活重组病毒颗粒感染细胞后的培养基上清再感染细胞(试验 II, 多次重复), 均没有检测到阳性细胞, 也就是没有产生野生型病毒, 表明该策略制备的重组病毒颗粒的安全性较好.

2.4 DNA 免疫诱导产生特异性抗体和细胞免疫反应

对本研究构建的基于 DNA 复制子表达载体 pSCAR 在体内表达外源基因的能力和水平进行检测. 小鼠的两侧四头肌中分别注射 $10 \mu\text{g}$ 稀释于 PBS 中质粒 DNA pSCAR-LacZ、pCMV-LacZ 和 pSCAR(空载体), 注射后, 立即对注射部位进行电刺激, 4 天后, 通过 X-Gal 原位染色法检测报告基因在肌肉组织中表达情况 (图略), 染色结果提示, 在复制子载体注射的肌肉组织部位可直接观察到大片组织呈蓝色, 常规 DNA 载体注射的肌肉组织部位仅观察到蓝点, 而空载体注射的肌肉组织部位没有观察到蓝点. 结果表明, DNA 复制子载体在体内可高水平表达报告基因.

在此基础上, 对构建的基于 DNA 复制子作疫苗载体的可行性进行了探索. ELISA 检测 DNA 免疫后抗 β - 半乳糖苷酶抗体反应, pSCAR-LacZ 免疫组血清中特异性抗体滴度高达 12 800, 而 pCMV-LacZ 免疫组血清中特异性抗体滴度仅为 400~800, pSCAR (空载体) 免疫组血清与免疫前相比始终为阴性. 淋巴细胞的增殖能力是细胞免疫应答的一个重要指标, 将免疫后制备的脾细胞悬液在体外用抗原进行刺激, 4 天后用 MTT 法测定淋巴细胞的增殖能力. pSCAR-LacZ 免疫组平均 SI 值为 3.3, 明显高于 pCMV-LacZ 免疫组平均 SI 值 1.6 ($P < 0.01$), 而 pSCAR (空载体) 免疫组淋巴细胞增殖反应 (平均 SI 值为 1.15) 是低水平的, 表明 DNA 免疫后诱导产生了特异的 T 细胞免疫反应. 这些结果表明, 基于 SFV 的 DNA 复制子载体能够在体液及细胞免疫水平上增加核酸疫苗的免疫原性、有效性, 并且仅免疫 $30 \mu\text{g}$ 剂量就能产生良好的免疫效果.

3 讨 论

甲病毒复制子是一种新型的真核表达载体, 有三种递送方式: 一是体外转录成裸 RNA(RNA 载体), 二是将复制子置于 RNA 聚合酶 II 启动子控制下, 构建成基于 DNA 的复制子载体 (DNA 载体),

三是将 RNA 复制子包装成重组病毒颗粒 (RVP 载体). 原始的甲病毒载体由于需要在体外制备加帽的 RNA, 应用上和操作方面存在一定的技术困难, 故构建基于 DNA 的甲病毒载体 (如 SIN^[7,8], SFV^[9,10]) 具有独特的优越性, 可不经 RNA 环节, 仅转染 DNA 即可起始 RNA 复制实现高水平表达外源基因, 也可共转染制备重组病毒颗粒, 显著地提高复制子载体应用能力, 在体外可用于高水平表达外源基因, 大规模制备重组病毒颗粒, 在体内也可广泛地用于复制型核酸疫苗和基因治疗载体研究^[1,11].

DNA 载体转染细胞后, 在体内转录产生的 RNA 经过加工和修饰后, 其复制子 RNA 的 5' 和 3' UTR 的准确性对正链 RNA 病毒基因组的感染性和复制效率是极其重要的, 并且附带的非病毒序列也能够影响 RNA 复制子复制能力^[4,8,12]. 用 CMV 替换 CMV/T7 并在 A69 的下游插入自我剪切核酶 HDVr 序列, 依次构建另外 3 种复制子载体 pSCA、pSCTAR 和 pSCAR. pSCAR 载体在体内转录产生的 RNA 在 5' 端为精确的 SFV 5' UTR 序列 (CMV 的转录起始点为 SFV 5' 端序列), 而在 3' 端由于 HDV 核酶可将其后序列进行自我剪切 UTR, 产生的 3' 端为 A69, 与体外转录的 RNA 以及病毒 RNA 一样具有真实的 5'、3' UTR 结构, 实验结果也证实了改进的 pSCAR 载体具有更好的复制能力, 并且表达报告基因及共转染产生重组病毒颗粒水平相当或略高于 RNA 载体. 本研究在构建基于 DNA 的复制子载体时引入了 HDVr 序列, 提高了其复制及表达外源基因的能力, 与 Dubensky 等^[8]和 Xanthopoulos 等^[12]在构建基于 DNA 的 SIN 复制子载体时的结果一致. DNA 复制子载体高水平表达外源基因是在复制/转录酶的控制下通过 26 S 亚基因组启动子高水平合成 mRNA, 从而高水平表达外源基因, 实验结果也证实 DNA 复制子复制、表达以及增强外源基因表达水平是依赖于复制酶的功能. 通过进一步优化条件 (如采用电穿孔法转染 DNA), 基于 DNA 复制子载体与相同调控元件的常规 DNA 载体相比, 可提高 β -半乳糖苷酶表达量 10~20 倍, 并且与辅助载体共转染后可大规模制备重组病毒颗粒, 该重组病毒颗粒在体外可用于表达有价值的外源蛋白. 另外, 制备这种安全的重组病毒颗粒在体内可用于基因治疗导向载体和新型疫苗载体. 本实验构建的基于 DNA 的辅助载体也可用于建立一个稳定的包装细胞系, 应用于大规

模制备重组病毒颗粒, 这一策略已在 SIN 病毒载体中得到了应用^[13]. 另外, 我们也对该表达载体进行了进一步改造, 在 26 S 亚基因组启动子下的单一 *Bam*H I 位点引入一多克隆位点, 并且在下游也引入了 E-tag 序列, 可方便地克隆外源基因和检测其表达.

含 LacZ 基因的 DNA 复制子载体在小鼠体内的高水平表达以及其免疫小鼠后诱导产生高滴度的特异性抗体和细胞免疫反应, 表明该复制子载体可用于新型核酸疫苗研究. 甲病毒复制型核酸疫苗作为自杀性的 DNA 疫苗, 在增强免疫原性和提高传统 DNA 疫苗的安全性是一种重要的策略. 不像传统 DNA 疫苗, 外源基因的表达是由 RNA 聚合酶 II 启动子控制的, SFV 复制型核酸疫苗是通过分为二个阶段的 DNA/RNA 转录及复制表达机制发挥作用的. 复制子不仅可高水平表达外源基因, 而且其复制过程模仿病毒感染宿主细胞, 产生 dsRNA 中间体可激活树突状细胞 (DCs) 并且本身也作为免疫佐剂 (危险信号) 激活免疫网络系统, 增强细胞免疫^[14]. 另外, 它可诱导转染细胞逐渐发生细胞凋亡, 而凋亡细胞更容易被树突状细胞吸收递呈到 CD8⁺ 细胞, 从而增强细胞免疫, 同时转染细胞由于凋亡而死亡, 避免了 DNA 整合带来的安全性问题^[15,16]. 甲病毒复制子载体能够增加核酸疫苗的免疫原性、有效性及安全性, 极有潜力作为新型疫苗载体.

本研究获得的高效的基于 DNA 的 SFV 复制子载体与已构建的基于 DNA 的 SIN 和 SFV 复制子载体一样, 均可高水平表达外源基因, 具备较好的应用能力, 极大地拓宽原复制子载体应用范围. 我们已利用该表达载体有效地在细胞中表达多个抗原基因, 并且正在进行复制型核酸疫苗研究.

参 考 文 献

- 1 Jonathan O R, Sergey A D, Kurt I K. Alphavirus vectors and vaccination. *Rev Med Virol*, 2002, **12** (5): 279~296
- 2 Lundstrom K. Semliki Forest virus vectors for gene therapy. *Expert Opin Biol Ther*, 2003, **3** (5): 771~777
- 3 余云舟, 孙志伟, 俞炜源. 基于 DNA 和 RNA 的双功能 semliki 森林病毒复制子载体的构建. *生物工程学报*, 2005, **21** (5): 33~38
Yu Y Z, Sun Z W, Yu W Y. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2005, **21** (5): 33~38
- 4 Boyer J C, Haenni A L. Infectious transcripts and cDNA clones of RNA viruses. *Virology*, 1994, **198** (2): 415~426
- 5 Perrotta A T, Been M D. A pseudoknot-like structure required for efficient self-cleavage of hepatitis delta virus RNA. *Nature*, 1991, **350** (6317): 434~436

- 6 Berglund P, Sjoberg M, Garoff H, *et al.* Semliki Forest virus expression system: prodence of conditionally infectious recombinant particles. *Biotechnology*, 1993, **11** (8): 916~920
- 7 Herweijer H, Latendresse J S, Williams P, *et al.* A plasmid-based self-amplifying Sindbis virus vector. *Hum Gene Ther*, 1995, **6** (9): 1161~1167
- 8 Dubensky J R T W, Driver D A, Polo J M, *et al.* Sindbis virus DNA-based expression vectors: utility for *in vitro* and *in vivo* gene transfer. *J Virol*, 1996, **70** (1): 508~519
- 9 DiCiommo D P, Rod B. Rapid, high level protein production using DNA-based Semliki Forest virus vectors. *J Biol Chem*, 1998, **273** (29): 18060~18066
- 10 Kohno A, Emi N, Kasai M, *et al.* Semliki Forest virus-based DNA expression vector: transient protein production followed by cell death. *Gene Ther*, 1998, **5** (3):415~418
- 11 Lundstrom K. Alphavirus vectors for vaccines production and gene therapy. *Expert Rev Vaccines*, 2003, **2** (3): 447~459
- 12 Xanthopoulos K G. Development of improved Sindbis virus-based DNA expression vector. *DNA Cell Biol*, 2004, **23** (2):75~80
- 13 Polo J M, Belli B A, Driver D A, *et al.* Stable alphavirus packaging cell lines for Sindbis virus and Semliki Forest virus-derived vectors. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, **96** (8): 4598~4603
- 14 Leitner W W, Hwang L N, Devere M J, *et al.* Alphavirus-based DNA vaccine breaks immunological tolerance by activating innate antiviral pathways. *Nat Med*, 2003, **9** (1): 33~39
- 15 Leitner W W, Ying H, Driver D A, *et al.* Enhancement of tumor-specific immune response with plasmid DNA replicon vectors. *Cancer Research*, 2000, **60** (1): 51~55
- 16 Leitner W W, Hwang L N, Bergmann-Leitner E S, *et al.* Apoptosis is essential for the increased efficacy of alphavirus-based DNA vaccines. *Vaccine*, 2004, **22** (11-12):1537~1544

High-level Expression of Foreign Genes *In vivo* and *In vitro* by Improved DNA-Based Replicon Vector Derived From Semliki Forest Virus

YU Yun-Zhou, SUN Zhi-Wei, LIU Zhi-Gang, YU Wei-Yuan*
(Institute of Biotechnology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071, China)

Abstract The design of DNA-based alphavirus vectors significantly improves the utility of these replicon vectors. The DNA-based replicon vectors can be used in expressing foreign genes and preparing RVP *in vitro* efficiently, also in developing replicon vaccines and gene therapy vectors *in vivo*. The approach involved the conversion a RNA-based replicon vector into a layered DNA-based replicon vector by the RNA polymerase II promoter and transcription termination/polyadenylation signal transcribed replicon RNA from DNA. When DNA-based alphavirus vector tranfected into cells, the first layer includes a eukaryotic RNA polymerase II expression cassette that initiates transcription of RNA in nucleus. Following transport of this RNA from the nucleus to the cytoplasm, the second layer, autocatalytic amplification of the RNA vector corresponds to virus RNA replication cycle and results in high level expression of foreign gene. DNA and RNA-based bifunctional replicon expression vector pSCTA and helper vector pSHCTA were successfully constructed by replacing the SP6 promoter used in the original system pSFV1 and pSFV-helper2 derived from Semliki Forest virus (SFV) with CMV promoter and T7 promoter, and inserting BGH transcription termination and polyadenylation signal downstream 3'-untranslated region (UTR). In order to obtain DNA-based highly efficient replicon vectors, they were further modified to construct additional three DNA-based SFV replicon expression vectors and corresponding helper vectors. To investigate the efficiency of foreign gene expression level by the four different DNA-based SFV expression vectors and recombinant virus particle (RVP) prepared by cotranfecting with corresponding helper vectors, improved DNA-based replicon vectors pSCAR and pSHCAR derived from SFV were developed. high level protein could be generated using the new vector system by transfecting DNA into BHK21 cells and High titer of RVP produced by cotranfecting with helper vector. Antigen genes were also expressed in cells by the replicon expression vector. Additionally, reporter gene expression was observed in mice muscle following injection with SFV DNA vector. Anti-β-Gal antibody response and cell-mediated immune response were induced after intramuscular inoculation of the β-Gal-encoding SFV replicon DNA. The results suggested that highly efficient DNA-based replicon vectors pSCAR and pSHCAR were constructed by modifying the SFV vectors. The improved DNA-based replicon vectors enhance the utility of them, and can be developed as potentially replicon vaccines and gene therapy vectors.

Key words Semliki Forest virus, RNA replicon, DNA, recombinant virus particle, vaccine

*Corresponding author . Tel: 86-10-66948828, E-mail: yuwy@nic.bmi.ac.cn

Received: June 29, 2005 Accepted: July 31, 2005