

基于 DNA 和 RNA 的双功能 Semliki 森林病毒复制子载体的构建 Construction of DNA and RNA Based on Bifunctional Replicon Vector Derived from Semliki Forest Virus

余云舟, 孙志伟, 俞炜源*

YU Yun-Zhou, SUN Zhi-Wei and YU Wei-Yuan*

军事医学科学院生物工程研究所, 北京 100071

Institute of Biotechnology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071, China

摘要 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, 用 CMV IE 和 T7 启动子替换 SP6 启动子并在 3' UTR 下游插入 BGH 转录终止子, 构建了基于 DNA 和 RNA 的复制子表达载体 pSMCTA 和辅助载体 pSHCTA。在 DNA 和 RNA 二种递送方式上证实该表达载体可高水平表达外源基因, 与辅助载体共转染可制备具有感染能力并能表达外源基因的重组病毒颗粒。构建的基于 DNA 和 RNA 的双功能复制子载体显著地提高 SFV 载体应用范围, 在体外可用于高水平表达外源基因及大规模制备重组病毒颗粒, 在体内也可用于研制复制子疫苗和基因治疗载体。

关键词 semliki 森林病毒, RNA 复制子, 双功能复制子载体

中图分类号 Q784 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2005)05-0713-06

Abstract DNA-based replicon expression vector pSMCTA and helper vector pSHCTA were constructed by replacing the SP6 promoter used in the original system pSFV1 and pSFV-helper2 derived from Semliki Forest virus (SFV) with the RNA polymerase II -dependent cytomegalovirus immediate early (CMV IE) enhancer/promoter and T7 promoter, and inserting BGH transcription termination and polyadenylation signal downstream 3'-untranslated region (UTR). The RNA polymerase II -dependent cytomegalovirus immediate early (CMV IE) enhancer/promoter and T7 promoter in pSMCTA and pSHCTA could drive transcription to produce replicon RNA *in vivo* and *ex vivo*. High level expression of foreign genes (GFP and LacZ) could be demonstrated by transfecting BHK21 cells with the new replicon expression vectors based on both DNA and RNA, and recombinant virus particles (RVP) be prepared by cotransfecting the expression vectors with the helper vectors. Foreign genes were also highly expressed in cells (BHK21) which were infected with RVP activated by α -chymotrypsin. The bifunctional replicon vectors can be used in highly efficient expression of foreign genes and preparation of RVP *ex vivo*, also in development of replicon vaccines and gene therapy vectors *in vivo*.

Key words semliki forest virus, RNA replicon, bifunctional replicon vector

甲病毒复制子包含病毒基因组 5' 和 3' 末端的顺式作用序列、全部非结构蛋白基因, 其病毒结构蛋白基因被外源基因所取代, 外源基因由 26S 亚基因组 mRNA 启动子控制转录成 mRNA 并高水平表达, 另

外, 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可将复制子 RNA 包装成重组病毒颗粒 (RVP)。SFV 复制子是基于 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,非结构蛋白基因编码的转录/复制酶控制载体 RNA 在胞浆中复制及外源基因的高水平表达。与其它表达载体相比,SFV 复制子表达系统具有宿主范围广,表达效率高等优点。目前,SFV 复制子载体广泛地应用于病毒、肿瘤和细菌毒素新型疫苗研究以及基因治疗导向载体等领域^[1-2]。

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,并要求在特殊条件下处理 RNA,因此应用不太方便,成本高。为了克服这些缺点,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,用 CMV IE 和 T7 启动子替换 SP6 启动子并在 3'UTR 下游插入 BGH 转录终止子,构建了基于 DNA 和 RNA 的复制子载体 pSMCTA 和辅助载体 pSHCTA,在多克隆位点插入外源基因而构建的质粒 DNA 可直接转染细胞,首先在 CMV IE 和 BGH polyA 控制下由细胞 RNA 聚合酶 II 胞内转录成复制子 RNA,再在复制酶控制下复制 RNA,然后亚基因组 mRNA 得到转录并表达外源基因,完成整个复制过程,无需体外转录过程制备 RNA,同时也可利用含有 T7 启动子体外转录制备 RNA,通过报告基因验证了该复制子载体系统在 DNA 和 RNA 二种递送方式上均可实现外源基因的高水平表达及重组病毒颗粒制备。

1 材料和方法

1.1 细胞与载体

BHK21 细胞株于含 5% 小牛血清,10u/mL 青霉素和 10mg/mL 链霉素的 DMEM 培养基(Invitrogen)培养。pSFV1、pSFV3-LacZ 和 pSFV-helper2(Invitrogen)为基于 SFV 的复制子载体,系本院秦鄂德教授惠赠。pcDNA3.1(+)(Invitrogen),pFRT/LacZeo(Promega)和 pEGFP-N3(Clontech)由本实验室保存。

1.2 引物和寡核苷酸

引物 F-GB(*Bam* H I):5'-tgcaggatccgcaccatggtgagcaaggg-3'和 R-GB(*Bam* H I):5'-tgcaggatccttactgtacagctcgtccatgc-3',用于 PCR 扩增基因 GFP 序列;引物 F-CMV(*Sph* I):5'-gccggcatgctagtattataatagtaataacacggggtc-3'和 R-CMVT:5'-catccgccatctatagtgagtcgtattaatttcg-3'用于 PCR 扩增 635bp CMVT 序列(同时含 CMV 和 T7 启动子);引物 F-SCT 5'-cgactcactatagatggcggatgtgtgacatac-3'和 R-SC(*Eco*R V):5'-cagtgatatccaagatgagtgctctttg-3',用于 PCR 扩增 SFV 5'UTR 前 281bp 序列;引物 F-

SAC(*Spe* I):5'-ctagactagtctgtgctcttagttgccag-3'和 R-XA(*Xba* I):5'-ctagtctagaagccatagagccacc-3',用于 PCR 扩增 238bp BGH 转录终止子序列。

两条寡核苷酸 5'-gatccatgatgcgcgatcgtgggcccgggatgcat-3'和 5'-gatcatgcatcccgggcccategatgcgcgatatg-3',经退火互补后克隆到 pSFV1 载体中的 *Bam*H I 位点,引入一个多克隆位点。

1.3 体外转录体 RNA 的制备

重组质粒经 *Spe* I 酶消化,以纯化后的线性化 DNA 为模板(2 μ g),采用 Promega 公司 SP6 和 T7 RNA 聚合酶系统转录试剂盒进行体外转录,20 μ L 体系,其中转录缓冲溶液 4 μ L,rNTP(25mmol/L ATP、CTP、UTP 8.33GTP)6 μ L,帽子结构类似物[m⁷G(5')ppp(5')G]50mmol/L,SP6 或 T7 酶复合物 2 μ L,37 $^{\circ}$ C 反应 4 h,30 $^{\circ}$ C 反应 1 h,加 DNase 酶消除模板 DNA,纯化 RNA 产物。

1.4 DNA 和 RNA 转染细胞

DNA 和 RNA 转染细胞分别采用 Invitrogen 公司 LipofectamineTM 2000 和 Qiagen 公司 TransMessengerTM Transfection Reagent 脂质体试剂盒进行。将 DNA 和 RNA 以 1.6 μ g/孔的剂量分别转染 12 孔板中的 70%~80% 单层的 BHK21 细胞,37 $^{\circ}$ C 于 CO₂ 孵箱培养,在培养不同时间后检测报告基因表达。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 μ g),于培养 24h 和 48h 后分别收集重组病毒原液各 1mL(即培养基上清)。

1.5 X-Gal 原位染色法

先用 PBS 洗单层细胞 1 次,加入 1mL 固定液(2% 甲醛、0.2% 戊二醛),室温放置 15min,弃去固定液,再用 PBS 洗 3 次,加入 X-Gal 染色液(2mg/mL X-Gal、5mmol/L 的铁氰酸钾和亚铁氰酸钾、2mmol/L MgCl₂),于 37 $^{\circ}$ C 作用 2h,在显微镜下观察,阳性细胞呈蓝色。

1.6 重组病毒颗粒的激活及感染细胞 BHK21

病毒原液中加入终浓度为 500 μ g/mL 的 α -胰凝乳蛋白酶(α -chymotrypsin),室温 20min 后,加入终浓度为 250 μ g/mL 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及测定其滴度。

2 结果

2.1 重组质粒的构建

2.1.1 含报告基因的基于 RNA 的表达载体 pSFV-GFP 的构建,以 pEGFP-N3 为模板,以 F-GB 和 R-GB 为

引物,PCR 扩增基因 GFP 序列,经酶 *Bam*H I 消化,克隆到 pSFV1 载体中的 *Bam*H I 位点,构建的正向克隆的重组质粒命名为 pSFV-GFP,而 pSFV3-LacZ 为含报告基因 LacZ 的基于 RNA 的表达载体。

2.1.2 质粒载体 pSFV1 和 pSFV-helper2 的改造:合成的两条寡核苷酸,经退火互补后克隆到 pSFV1 载体中的 *Bam*H I 位点,构建的重组质粒命名为 pSM,含 *Bam*H I、*Nde*I、*Bss*H II、*Cla*I、*Apa*I、*Sma*I 和 *Nsi*I (GGATCCATATGCGCGCATCGATGGGCCCCGGGATGCAT) 等多个单一酶切位点。首先以 pcDNA3.1(+) 为模板, F-CMV 和 R-CMV 为引物,PCR 扩增 635bp CMV 序列(同时含 CMV 和 T7 启动子),再以 pSFV1 为模板, F-SCT 和 R-SC 为引物,PCR 扩增 SFV 5' UTR 前 281bp 序列,最后以 635bp 和 281bp 扩增产物为模板, F-CMV 和 R-SC 为引物,重叠延伸 PCR 扩增 916bp 大片段,经酶 *Sph*I 和 *Eco*R V 消化后,连入相同酶消化的 pSM 载体(去掉了 SP6 启动子)中,即用 CMV 和 T7 启动子替换了 SP6 启动子,构建的重组质粒命名为 pSMCT。以 pcDNA3.1(+) 为模板, F-SA 和 R-XA 为引物,PCR 扩增 238bp BGH 转录终止

子序列,经酶 *Spe*I 和 *Xba*I 消化后,连入 pSMCT 载体的 *Spe*I 位点,构建的正向克隆的重组质粒命名为 pSMCTA,该载体为基于 DNA 和 RNA 的 SFV 复制子表达载体。在此基础上,酶 *Spe*I 和 *Eco*R V 消化 pSMCTA 回收的 3.5kb 片段与酶 *Spe*I 和 *Eco*R V 消化 pSFV-helper2 其中 *Eco*R V 为非完全酶切)回收的 5.2kb 片段相连,构建的重组质粒命名为 pSHCTA,即将辅助载体改造为基于 DNA 和 RNA 的复制子辅助载体。

2.1.3 含报告基因的基于 DNA 和 RNA 的表达载体 pSMCTA-GFP 和 pSMCTA-LacZ 的构建:酶 *Bgl*II 和 *Spe*I 消化 pSFV-GFP 和 pSFV3-LacZ 回收的 2.3kb 和 4.6kb 片段分别与相同酶消化 pSMCTA 回收的 9.9 kb 片段相连,构建的重组质粒命名为 pSMCTA-GFP 和 pSMCTA-LacZ。

另外,构建由相同调控元件控制(CMV 和 BGH TT/pA)的含报告基因 GFP 和 LacZ 的表达载体 pCMV-GFP 和 pCMV-LacZ。原始的复制子载体和构建的复制子载体结构如图 1。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。

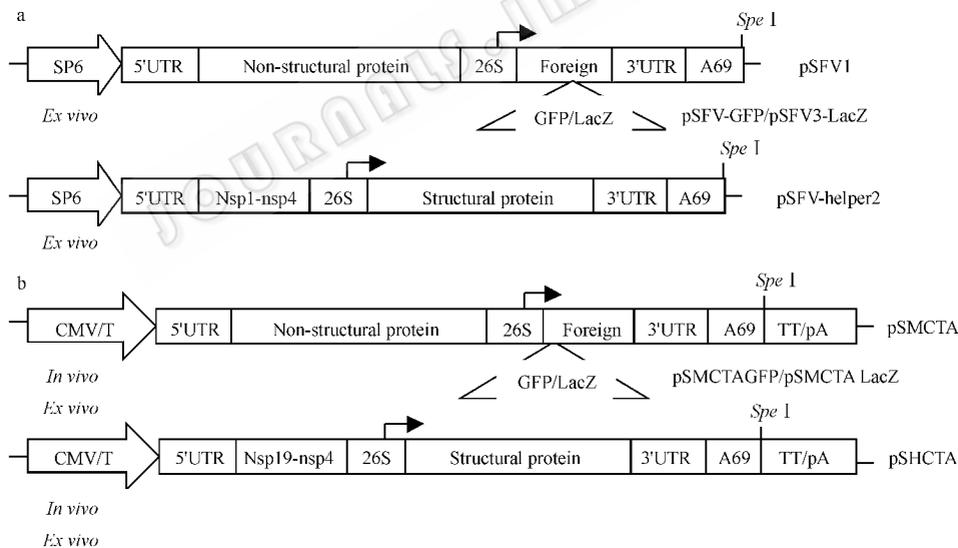


图 1 SFV 复制子载体结构示意图

Fig. 1 Schematic illustration of SFV replicon vectors used throughout this study

(a) The original SFV expression vector pSFV1 and helper vector pSFV-helper2 (RNA vectors). pSFV-GFP and pSFV3-LacZ are RNA-based expression vectors contained GFP and LacZ genes, respectively. (b) New DNA and RNA-based bifunctional SFV expression vector pSMCTA and helper vector pSHCTA (DNA and RNA vectors). pSMCTA-GFP and pSMCTA-LacZ are DNA and RNA-based expression vectors contained GFP and LacZ gene, respectively. CMV/T, cytomegalovirus immediate early (CMV IE) enhancer/promoter and T7 promoter. TT/pA, BGH transcription termination and polyadenylation signal.

2.2 复制子表达载体 pSMCTA 通过 DNA 和 RNA 两种递送方式表达外源基因

2.2.1 基于 DNA 的复制子载体表达外源基因:DNA 载体转染细胞后,12、24、36、48、72h 分别检测报告基

因表达。在荧光显微镜下直接观察 GFP 表达,阳性细胞呈亮绿色,而通过 X-Gal 原位染色法检测 LacZ 基因表达,阳性细胞呈蓝色,48h 时呈阳性细胞最多,并且表达量最高,与常规 DNA 载体(非复制型)

相比,表达量得到明显增加(图 2a),对含有 GFP 基因和 LacZ 基因的载体分别进行了流式细胞仪和 β -半乳糖苷酶活性 (β -Galactosidase Enzyme Assay System with Reporter Lysis Buffer, promega) 定量分析,结果表明其表达量提高了 3~4 倍。

2.2.2 基于 RNA 的复制子载体表达外源基因: 新型复制子载体通过 T7 启动子制备 RNA 纯度好、质量高,而原始的复制子载体通过 SP6 启动子制备的 RNA 有杂带(图 3)。体外转录制备的 RNA 载体转

染细胞后,36h 时呈阳性细胞最多,并且表达量最高(图 2b)。但后者的阳性细胞数明显低于前者,这与通过 SP6 启动子制备 RNA 有杂带,质量不高有关,影响了其转染效率及复制能力。

以上结果表明,RNA(T7 体外转录体)载体和 DNA 复制子载体转染细胞后,RNA 复制子能大量复制并表达外源基因,证实我们构建的表达载体能够高水平表达外源基因。

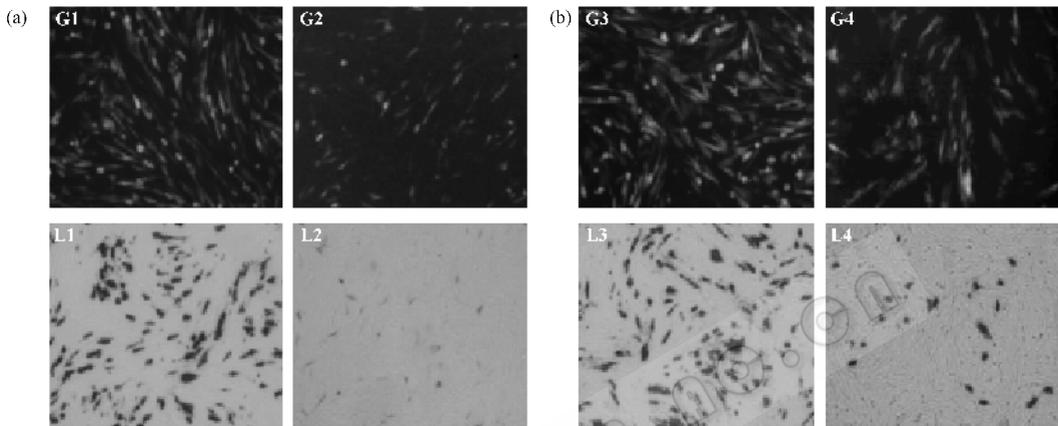


图 2 复制子表达载体和常规 DNA 载体表达报告基因 GFP 和 LacZ

Fig.2 Expression of GFP and LacZ genes in cells transfected with replicon expression vectors and plasmid vectors (Non-replication). The expression of GFP and LacZ in cells were assayed. (a) G1 and G2 indicate cells transfected with pSMCTA-GFP and pCMV-GFP (plasmid vector) were observed by fluorescence, respectively. L1 and L2 indicate cells transfected with pSMCTA-LacZ and pFRT/LacZ or pCMV-LacZ plasmid vector were stained with X-gal, respectively. All assayed 48 hours post-transfection. (b) G3 and G4 indicate cells transfected with RNA transcripts from pSMCTA-GFP and pSFV-GFP were observed by fluorescence, respectively. L3 and L4 indicate cells transfected with RNA transcripts from pSMCTA-LacZ and pSFV3-LacZ were stained with X-gal, respectively. All assayed 36 hours post-transfection.

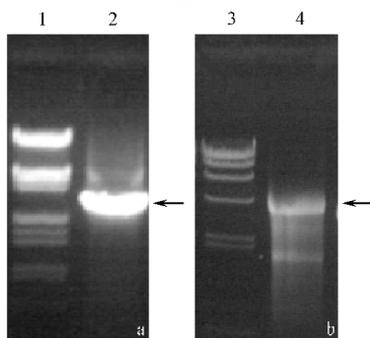


图 3 体外转录的 RNA 产物琼脂糖电泳图

Fig.3 Agarose gel analysis of *ex vivo* transcripts RNA (2): RNA transcribed from new replicon vector by T7 promoter. (4): RNA transcribed from original replicon vector by SP6 promoter. 1, Lambda DNA (*Hind* III + *Eco*R I). 3, Lambda DNA (*Eco*R I). Arrowhead indicate transcripts RNA.

2.3 重组病毒颗粒的制备及其滴度测定

共转染表达载体和辅助载体后收集重组病毒原

液经激活后梯度稀释感染 BHK21, 12、24、36、48、72h 后均检测到报告基因在细胞中得到了表达,并统计 36~48h 后阳性细胞数,感染后第 3 天细胞呈现变圆、萎缩和脱落等特征,逐渐由于细胞病变而死亡,表明制备的含有外源基因的重组病毒颗粒具有感染性并能表达外源基因。统计 24h 和 48h 后收集的二批重组病毒原液,报告基因 GFP 和 LacZ 表达的阳性细胞数,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及 GFP 和 LacZ 统计的病毒滴度平均值作为指标评价三种递送方式。RNA (SP6) 称为 A, RNA (T7) 称为 B 和 DNA 称为 C,共转染后制备有活性的重组病毒颗粒能力(见图 4)。B 方式明显高于 A 和 C,而 C 略高于 A,仅共转染 1.6 μ g RNA 或 DNA 于 12 孔板中的 BHK21 细胞,可产生高达 10^5 个/mL 有活性的重组病毒颗粒,并且在低温条件下

(31 ~ 33℃) 培养细胞时, 获得的重组病毒颗粒可提高 10 倍以上, 达到 10^6 个/mL, 这些结果进一步证明构建的新型 SFV 载体具有良好的复制及包装能力。

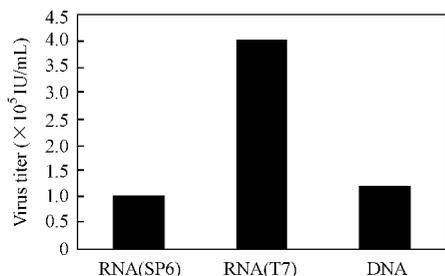


图 4 不同复制子载体制备重组病毒颗粒滴度结果

Fig. 4 Production of recombinant virus particles from cells co-transfected with different replicon vectors

RNA (SP6), RNA (T7) and DNA indicate virus titer from cells co-transfected expression replicon vectors and helper vectors with RNA transcribed by SP6 promoter, by T7 promoter and DNA (pSMCTA-GFP/LacZ and pSHCTA), respectively. Virus was harvested 24 hours or 48 hours after transfection and titer was assessed by statistic numbers of positive cells 36 ~ 48 hours post-infection cells (BHK21).

3 讨论

甲病毒复制子是一种新型真核表达载体, 已被广泛用于表达外源基因和构建复制子疫苗, 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^[3-5], SFV^[6,7]) 具有其独特的优越性, 显著地提高其应用能力, 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的研究^[8,9]。

由于 SFV 的非结构蛋白和结构蛋白编码基因分别位于表达载体和辅助载体上, 因此, 只有同时将两种载体共转染细胞, 由辅助载体 RNA 表达的结构蛋白反式将重组表达载体 RNA 包装成重组病毒颗粒, 而辅助载体由于无包装信号 (位于 nSP2 基因上) 却不能被包装, 制备的重组病毒颗粒感染细胞后, 仅能进行一轮复制, 而不能繁殖子代。pSFV-helper2 为第二代辅助载体, 前体蛋白 P62 由于点突变 (三个氨基酸突变) 而不能被切割成 E2 和 E3, 而这种切割对病毒的感染性是必需的, 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^[10], 因此制备的重组病毒颗粒具有条件感染性, 也具有一定的安全性。低温条件下 (31 ~ 33℃) 培养细胞时, 由于低温延迟了细胞凋亡出现, 复制子可大量复制 RNA 并表达大量的结构蛋白, 更有利于重组病毒颗粒的产生及释放, 获得的重组病毒颗粒可提高 10 倍, 因此通过优化条件和扩大共转染的规模完全能够制备高滴度的重组病毒颗粒。

与原始的复制子载体相比, 基于 DNA 的复制子载体, 具有以下优点 (1) 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; (2) DNA 可大量制备, 满足大规模生产有价值的外源蛋白, 故在应用上操作简单, 生产成本低; (3) 与辅助载体共转染后可大规模制备重组病毒颗粒, 在体外可用于表达有价值的外源蛋白, 在体内可用于基因治疗导向载体和新型疫苗载体; (4) 也可直接用于复制型核酸疫苗和体内基因治疗载体。与 DiCiommo^[6]和 Kohno^[7]等人构建的基于 DNA 的 SFV 复制子一样, 本研究构建的基于 DNA 的复制子载体能够高水平表达外源基因, 与辅助载体共转染后可制备高滴度的重组病毒颗粒, 并且通过报告基因 (GFP 和 LacZ) 证实其有效性。我们也对该表达载体 pSMCTA 进行了改造, 引入了多克隆位点, 可方便地克隆外源基因, 同时该复制子载体也可由 T7 启动子制备 RNA, 并且制备的 RNA 产量高, 纯度好, 转染后阳性率高以及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, 扩大其应用范围。另外, 对基于 DNA 的复制子载体进行了改进, 进一步提高其在体内外表达外源基因水平, 并且 DNA 复制子免疫动物可诱导产生较强的体液和细胞免疫反应 (另文发表)。该新型载体与其他基于 DNA 和 RNA 的甲病毒载体一样, 可作为真核表达载体用于表达外源基因和制备重组病毒颗粒, 也可作为复制子载体用于研制复制子疫苗和基因治疗载体等领域。

REFERENCES (参考文献)

- [1] Jonathan OR, Sergey AD, Kurt IK. Alphavirus vectors and vaccination. *Rev Med Virol*, 2002, 12: 279 - 296
- [2] Lundstrom K. Semliki Forest virus vectors for gene therapy. *Expert Opin Biol Ther*, 2003, 3(5): 771 - 777
- [3] Herweijer H, Latendresse JS, Williams P et al. A plasmid-based self-amplifying Sindbis virus vector. *Hum Gene Ther*, 1995, 6(9): 1161 - 1167.
- [4] Dubensky, JR TW, Driver DA, Polo JM et al. Sindbis virus DNA-based expression vectors: utility for *in vitro* and *in vivo* gene

- [5] Xanthopoulos KG. Development of improved Sindbis virus-based DNA expression vector. *DNA Cell Biol* , 2004 , **23** (2) : 75 – 80
- [6] DiCiommo DP , Rod Bremner. Rapid , high level protein production using DNA-based Semliki Forest virus vectors. *J Bio Chem* , 1998 , **273** : 18060 – 18066
- [7] 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
- [8] Polo JM , Gardner JP , Ji Y *et al* . Alphavirus DNA and particle replicons for vaccines and gene therapy. *Dev Biol* , 2000 , **104** : 181 – 185
- [9] Leitner WW , Hwang LN , DeVeer MJ *et al* . Alphavirus-based DNA vaccine breaks immunological tolerance by activating innate antiviral pathways. *Nat Med* , 2003 , **9** (1) : 33 – 39
- [10] Berglund P , Sjoberg M , Garoff H *et al* . Semliki Forest virus expression system : production of conditionally infectious recombinant particles. *Bio/Technology* , 1993 , **11** : 916 – 920