

• 动物及兽医生物技术 •

基于猪圆环病毒 2 型复制子的复制型表达载体的构建

蔡晓雪, 李俊, 李章勋, 杜红旭, 曹立亭, 马跃*

西南大学动物医学院, 重庆 402460

蔡晓雪, 李俊, 李章勋, 杜红旭, 曹立亭, 马跃. 基于猪圆环病毒 2 型复制子的复制型表达载体的构建[J]. 生物工程学报, 2023, 39(7): 2634-2643.

CAI Xiaoxue, LI Jun, LI Zhangxun, DU Hongxu, CAO Liting, MA Yue. Construction of a replicative expression vector based on the porcine circovirus 2 replicon[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(7): 2634-2643.

摘要: DNA 疫苗在动物体内表达抗原基因的水平是决定 DNA 疫苗免疫效果的关键, 而提高 DNA 疫苗抗原基因表达水平的途径之一是利用可在动物细胞内复制的质粒作为载体。本研究利用 pcDNA3.1 构建了 1 个基于猪圆环病毒 2 (porcine circovirus 2, PCV2) 复制子的复制型 DNA 疫苗载体 pCMVori, 再将增强型绿色荧光蛋白(enhanced green fluorescent protein, EGFP)基因分别克隆入 pCMVori 和对照质粒 pcDNA3.1 中, 然后分别转染 PK-15 细胞, 48 h 后观察两组转染细胞 EGFP 表达情况后分别提取细胞质粒和 RNA。利用 Bcl I 酶切前、后的质粒为模板通过定量 PCR 检测质粒的复制效率, 并通过反转录聚合酶链式反应(reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR)检测 PCV2 复制子的 Rep 基因转录产物。通过 Image J 软件分析两组转染细胞的平均荧光强度, 并通过定量 RT-PCR 定量检测两组转染细胞的 EGFP 基因转录水平。结果显示, pCMVori 在细胞内 48 h 的复制效率达到 136%, RT-PCR 结果证实 Rep 和 Rep'均有转录。pCMVori-EGFP 转染细胞的平均荧光强度比 pcDNA3.1-EGFP 的高 39.14%, 定量 RT-PCR 检测结果显示, 前者的 EGFP 转录水平也比后者高 40%。本研究结果表明, 所构建的复制型 DNA 疫苗载体 pCMVori 可在真核细胞中独立复制, 克隆的目的基因的表达水平也因此获得提升, 为构建复制型 DNA 疫苗奠定了基础。
关键词: DNA 复制子; 表达载体; 猪圆环病毒 2 型; DNA 疫苗

*Corresponding author. E-mail: mayue1963@swu.edu.cn

Received: 2022-11-21; Accepted: 2023-02-22

Construction of a replicative expression vector based on the porcine circovirus 2 replicon

CAI Xiaoxue, LI Jun, LI Zhangxun, DU Hongxu, CAO Liting, MA Yue*

College of Veterinary Medicine, Southwest University, Chongqing 402460, China

Abstract: The antigen gene expression level of a DNA vaccine is the key factor influencing the efficacy of the DNA vaccine. Accordingly, one of the ways to improve the antigen gene expression level of a DNA vaccine is to utilize a plasmid vector that is replicable in eukaryotic cells. A replicative DNA vaccine vector pCMVori was constructed based on the non-replicative pcDNA3.1 and the replicon of porcine circovirus 2 (PCV2) in this study. An *EGFP* gene was cloned into pCMVori and the control plasmid pcDNA3.1. The two recombinant vectors were transfected into PK-15 cell, and the plasmid DNA and RNA were extracted from the transfected cells. Real-time PCR was used to determine the plasmid replication efficiency of the two plasmids using plasmid before and after *Bcl* I digestion as templates, and the transcription level of the *Rep* gene in PCV2 replicon was detected by RT-PCR. The average fluorescence intensity of cells transfected with the two plasmids was analyzed with software Image J, and the transcription level of *EGFP* was determined by means of real-time RT-PCR. The results showed that the replication efficiency of pCMVori in PK-15 cells incubated for 48 h was 136%, and the transcriptions of *Rep* and *Rep'* were verified by RT-PCR. The average fluorescence intensity of the cells transfected with pCMVori-EGFP was 39.14% higher than that of pcDNA3.1-EGFP, and the transcription level of *EGFP* in the former was also 40% higher than that in the latter. In conclusion, the DNA vaccine vector pCMVori constructed in this study can independently replicate in eukaryotic cells. As a result, the expression level of cloned target gene was elevated, providing a basis for developing the pCMVori-based DNA vaccine.

Keywords: DNA replicon; expression vector; porcine circovirus 2; DNA vaccine

20 世纪 90 年代早期, 有研究首次证明编码来自病原体抗原的质粒 DNA 可以诱导产生抗原特异性抗体和 T 细胞应答^[1], 此后 DNA 疫苗就成为了继全病原体制备的疫苗和亚单位疫苗之后的研究热点。除了大量的实验研究外, 也已有不少 DNA 疫苗的临床前和临床研究报道, 现已有少数几种兽医 DNA 疫苗获得临床许可, 如马的西尼罗河病毒疫苗、鲑鱼的传染性造血坏死病毒疫苗以及犬的治疗性黑素瘤疫苗^[2], 证明 DNA 疫苗可以在动物中引发保护性免疫

并获得临床保护效果。

经典的 DNA 疫苗载体就是一个具有真核启动子的表达质粒, 利用该真核启动子在动物细胞内表达抗原基因从而呈递抗原^[3]。显然, 抗原基因表达效率是决定 DNA 疫苗免疫效果的限制性因素, 而提高 DNA 疫苗表达抗原基因效率的途径之一是用可以在真核细胞内复制的质粒作为 DNA 疫苗载体, 因此复制型 DNA 疫苗载体也成为了 DNA 疫苗研究的热点。

猪圆环病毒 2 型(porcine circovirus 2, PCV2)

是圆环病毒科圆环病毒属的成员^[4],其环状单链 DNA 基因组大小仅为 1 766–1 768 bp,是目前已知最小的自主复制的动物 DNA 病毒之一。PCV2 基因组复制起点为 1 个茎-环结构,其下游紧接有 3 个串联的六核苷酸保守序列,复制起点两侧为 2 个开放阅读框(open reading frame, ORF) ORF1 和 ORF2^[5]。ORF1 即 *Rep* 基因,位于正链上,编码复制起始蛋白 *Rep* 和 *Rep'* 及几个小蛋白。ORF2 编码序列位于复制过程中形成的双链 PCV2 基因组的负链上,编码 PCV2 的衣壳蛋白 *Cap*。PCV2 以滚环复制方式在细胞内进行复制,然后组装产生子代病毒^[6]。

PCV2 极小的复制子是用于构建复制型 DNA 疫苗载体的理想选择。本研究通过单碱基缺失突变破坏 *Cap* 基因的 ORF,然后将突变的 PCV2 基因组插入到真核表达载体 pcDNA3.1 中并替换其 fl ori-SV40 polyA 序列,构建了 1 个基于 PCV2 复制子的复制型 DNA 疫苗载体。制备的可复制 DNA 疫苗载体包含有 PCV2 的复制

起点以及复制所需的 *Rep* 基因,使其可在真核细胞内独立复制,以提高载体表达抗原基因的效率。

1 材料与方法

1.1 材料

质粒提取试剂盒、胶回收试剂盒、无内毒素质粒提取试剂盒、病毒 DNA 提取试剂盒等均购自 Omega Bio-Tek 公司。转染试剂 LipoFiter3.0 购自汉恒生物科技有限公司。2×*Taq* Master Mix 购自康为世纪生物科技有限公司。In-Fusion 无缝克隆试剂盒、反转录试剂盒、定量 PCR 试剂盒、高保真 *Taq* 酶和限制性内切酶 *Bcl* I 均购自大连宝生物(TaKaRa)公司。引物均由生工生物工程(上海)股份有限公司合成,各引物序列见表 1。PCV2RC-01 株(GenBank 收录号 OQ168431)、PK-15 细胞系、大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5 α 、pIRES2-EGFP 载体、pcDNA3.1 载体由西南大学动物医学院中兽医实验室保存。

表 1 DNA 克隆引物列表

Table 1 Primer sequences for DNA cloning

Primer name	Primer sequence (5'→3')	Product size (bp)
P-cDNA-f	AGGCGGTTTGCCTATTGG	3 256
P-cDNA-r	CGTGGGGATACCCCCTAGA	
P-Ori-f	GGGGGTATCCCCACGCTAGAATAACAGCACTGGAGCC	1 795
P-Ori-r	ATACGCAAACCGCCTTGATAACTTTGTAACAAAGGCCA	
P-BclI786-f	CGTGTACGGTGGGAGGTCT	281
P-BclI1066-r	AGGGGCAAACAACAGATGG	
P-EGFP-f	AGCTTGGTACCGAGCATAATATGGCCACAACCATGG	766
P-EGFP-r	GCTGGATATCTGCAGTTACTTGTACAGCTCGTCCATG	
P-pcDNA-f	CTGCAGATATCCAGCACAGTG	5 000 (pCMVori)/5 400 (pcDNA3.1)
P-pcDNA-r	GCTCGGTACCAAGCTTAAGTT	
P-EGFP277-f	GCGAGGAGCTGTTCACCG	277
P-EGFP277-r	CGTCCTGGACGTAGCCTT	
S- β -actin-f	GCTGTCCCTGTACGCCTCTG	281
S- β -actin-r	TGTCCCGCACGATCTCCC	
PC-Rep-f	ATGCCAGCAAGAATG	945
PC-Rep-r	GACTCAGTAATTTATTCATATGGAAA	

1.2 复制型 DNA 疫苗载体的设计及构建

1.2.1 载体设计

通过引物设计将 PCV2 环状基因组在 *Cap* 基因中后部 1 356 bp 处断开, 并缺失掉 1 357 位点碱基, 得到具有完整复制起点和 *Rep* 基因的 PCV2 复制子 PCV2 Rep-ori。 *Cap* 基因缺失 1 个碱基可避免其在细胞内产生完整的 PCV2 基因组并表达完整的 *Cap* 蛋白, 以避免其作为 DNA 疫苗载体在细胞内产生 PCV2 的可能性。将 PCV2 Rep-ori 插入真核表达载体 pcDNA3.1 的多克隆位点(multiple cloning site, MCS)序列后面, 并替换其后的 f1 ori-SV40 polyA 序列便得到基于 PCV2 复制子的复制型载体 pCMVori, 其物理图谱见图 1。

1.2.2 载体构建

按照 In-Fusion 无缝克隆试剂盒说明书设计 2 对引物, 以 pcDNA3.1 载体为模板, P-cDNA-f 和 P-cDNA-r 为引物, PCR 扩增去除了 f1 ori-SV40 pA 序列的 pcDNA 序列。以 PCV2 基因组 DNA 为模板, P-Ori-f 和 P-Ori-r 为引物, PCR 扩增缺失 1 个碱基的 PCV2 全基因组序列 PCV2 ori-rep。PCR 扩增后胶回收得到 pcDNA3.1 载体片段和 PCV2 ori-rep 片段, 按照 In-Fusion 无缝克隆试剂盒说明书进行重组克隆, 然后转化入

E. coli DH5 α , 得到复制型载体 pCMVori。用 P-Ori-f 和 P-Ori-r 为引物对重组载体 pCMVori 进行 PCR 验证, 然后送生工生物工程(上海)股份有限公司对插入的 PCV2 复制子序列进行测序验证。

1.3 表达 EGFP 基因的复制型 DNA 载体构建

以 pIRES2-EGFP 为模板, P-EGFP-f 和 P-EGFP-r 为引物扩增 *EGFP* 基因片段。以 pCMVori 为模板, P-pcDNA-f 和 P-pcDNA-r 为引物扩增得到 pCMVori 载体片段。将扩增后胶回收的载体片段和 *EGFP* 片段按照 In-Fusion 无缝克隆试剂盒说明书进行重组克隆, 转化后得到表达 *EGFP* 基因的复制型载体 pCMVori-EGFP。采用相同的方法将 *EGFP* 基因克隆入非复制型 pcDNA3.1 载体中得到非复制型 pcDNA3.1-EGFP 表达载体, 作为复制型载体 pCMVori-EGFP 在真核细胞中的复制效率和外源基因表达效率检测的对照。克隆构建的重组载体均用 *EGFP* 基因特异引物进行 PCR 验证。

1.4 pCMVori 在真核细胞内的复制效率检测

1.4.1 细胞培养与转染

将 PK-15 置于 5% CO₂ 培养箱 37 °C 培养, 培养基为 DMEM (含 10% 胎牛血清、10 U/mL 青霉素和 10 mg/mL 链霉素)。转染前 1 d 将处于生长对数期的 PK-15 细胞接种到六孔板中, 细胞密度为 4×10⁵ 个/孔。24 h 后孔内细胞密度达到约 70% 时转染, 转染前将六孔板每孔内换成新鲜细胞培养液 2 mL, 按照转染试剂 LipoFiter3.0 说明书用 4 μ g 的无内毒素质粒 pCMVori-EGFP 和 pcDNA3.1-EGFP 分别转染 PK-15 细胞, 转染 6 h 后, 更换含有 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基继续培养。

1.4.2 pCMVori 复制效率的定量 PCR 检测

用质粒 pCMVori-EGFP 和 pcDNA3.1-EGFP 分别转染 PK-15 细胞, 48 h 后弃去六孔板中的

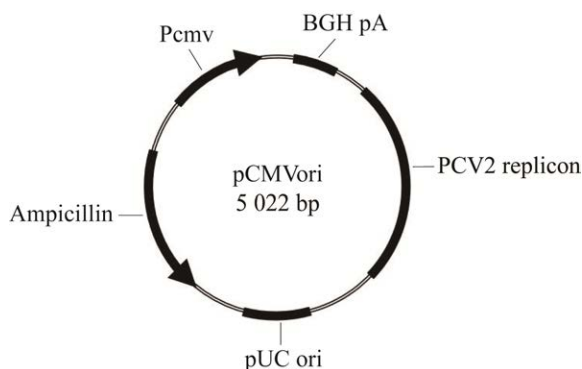


图 1 复制型载体 pCMVori 物理图谱

Figure 1 Physical map of the replicative vector pCMVori.

培养液, 磷酸缓冲盐溶液(phosphate buffered saline, PBS)洗2次, 胰酶消化2 min后弃去胰酶, 用新的培养液将细胞吹打下来, 将细胞悬液收集至1.5 mL离心管中, 然后按照病毒试剂盒说明书提取质粒DNA。

用6 U的 *Bcl* I 在10 μ L反应体系中分别过夜酶切0.1 ng从细胞中提取的 pCMVori-EGFP 和 pcDNA3.1-EGFP 质粒, 然后80 $^{\circ}$ C灭活15 min。用引物 P-BclI786-f 和 P-BclI1066-r 对酶切前后的质粒进行定量PCR检测, 酶切前后的质粒模板均设3个重复孔, 根据酶切前后质粒模板的 C_t 值差异计算质粒复制效率。

为检测所用 *Bcl* I 切割非甲基化DNA的效率, 以 pCMVori 为模板, P-BclI786-f 和 P-BclI1066-r 为引物, 扩增得到277 bp的非甲基化基因片段。取0.1 ng扩增产物用6 U的 *Bcl* I 在10 μ L反应体系中过夜酶切, 然后80 $^{\circ}$ C灭活15 min。用引物 P-BclI786-f 和 P-BclI1066-r 对酶切前后的DNA进行定量PCR检测, 酶切前后的模板均设3个重复孔, 根据酶切前后模板的 C_t 差计算酶切效率。

1.4.3 pCMVori 中 Rep 和 Rep' 的表达验证

用4 μ g的 pCMVori-EGFP 和对照质粒 pcDNA3.1-EGFP 分别转染 PK-15 细胞, 36 h后弃去培养基, 采用 TRIzol 法提取转染 pCMVori-EGFP 和 pcDNA3.1-EGFP 这2个表达载体的细胞RNA, 根据反转录试剂盒说明书将其反转录成cDNA。以cDNA为模板, PC-rep-f 和 PC-rep-r 为引物, 扩增 Rep 和 Rep' 基因片段。

1.5 pCMVori 的外源基因表达能力验证

按1.4.1中的方法用4 μ g的 pCMVori-EGFP 和对照质粒 pcDNA3.1-EGFP 分别转染 PK-15 细胞, 转染后48 h通过荧光显微镜观察 EGFP 的表达情况, 并采用 Image J 软件对两组细胞荧光图进行定量分析。采用 Trizol 法分别提取转染 pCMVori-EGFP 和 pcDNA3.1-EGFP 这2个表

达载体的细胞RNA, 根据反转录试剂盒说明书将其反转录成cDNA后进行定量PCR检测 EGFP 基因的表达水平, 检测时用猪的 β -actin 作为内参基因, 所有样本均设3个重复孔。

2 结果与分析

2.1 复制型载体 pCMVori 的构建

按照1.2中的方法采用 In-Fusion 无缝克隆技术进行重组克隆, 转化 *E. coli* DH5 α 后随机挑选7个单克隆进行菌落PCR验证, 均在1800 bp左右有PCV2的特异性扩增条带(图2), 与预期大小一致。构建的 pCMVori 经生工生物工程(上海)股份有限公司测序, 其中的PCV2基因组序列除了缺失1357位点碱基外与原序列完全一致, 证明所构建的载体具有完整的PCV2复制子。

2.2 pCMVori 在 PK-15 细胞内的复制效率检测

2.2.1 pCMVori 的复制效率检测

本研究将质粒的复制效率定义为转染后一定时间内复制新生成的质粒占转染进细胞内的原质粒的百分比。因为内切酶 *Bcl* I 对DNA甲基化敏感, 真核细胞不能甲基化复制新生成的质粒, 所以在细胞内复制新生成的质粒能被 *Bcl* I

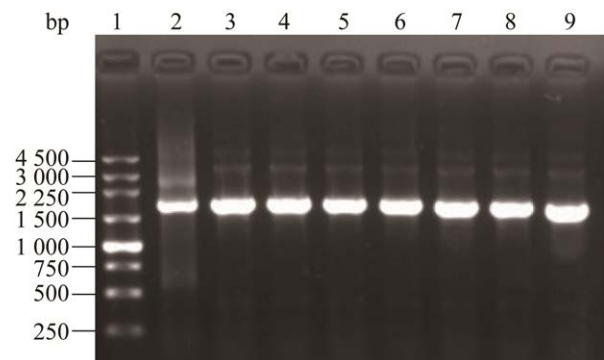


图2 pCMVori 质粒的菌落PCR检测

Figure 2 Colony PCR detection of pCMVori. 1: DNA marker DL250; 2: Positive control PCR; 3-9: PCR of colonies.

切断, 而转染入细胞内的原质粒因为是甲基化质粒不能被 *Bcl* I 切断。所以, *Bcl* I 酶切前、后的质粒模板用扩增片段内含 *Bcl* I 位点的引物进行定量 PCR 扩增时, 复制效率=(酶切前模板量-酶切后模板量)/酶切后模板量。设酶切前的模板量为 1, 酶切后样本 C_{t1} 减去酶切前样本 C_{t0} 为 ΔC_t , 根据前述公式可推导出质粒复制效率= $1-2^{-\Delta C_t}/2^{-\Delta C_t}$ 。

质粒复制效率检测的定量 PCR 结果显示, 含 PCV2 复制子的 pCMVori-EGFP 转染入 PK-15 细胞后 48 h 内的复制效率为 136.2%, 即 pCMVori-EGFP 在 48 h 内复制产生了 1.36 倍的新质粒。用相同方法检测不含 PCV2 复制子的对照质粒 pcDNA3.1-EGFP 的复制效率为 22.3% (图 3), 二者差异极显著, 说明本研究设计构建的复制型载体 pCMVori 能在真核细胞内以较高效率进行复制。对照质粒 pcDNA3.1-EGFP 达到 22.3% 的复制效率, 分析其原因可能是所用检测方法的系统误差造成, 包括移液器的误差和定量 PCR 仪的检测误差。

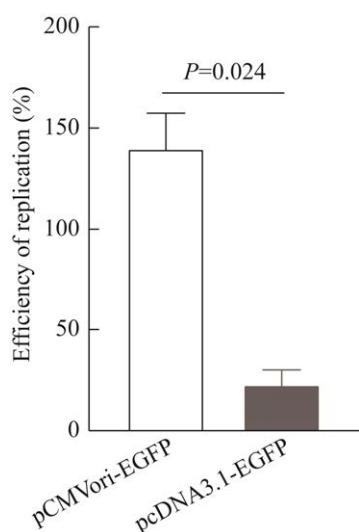


图3 pCMVori-EGFP 在 PK-15 细胞中的复制效率
Figure 3 Replication efficiency of pCMVori-EGFP in PK-15 cells.

用定量 PCR 检测 *Bcl* I 对非甲基化 DNA 酶切效率结果显示, *Bcl* I 对非甲基化 DNA 的酶切效率达到 99.26%, 说明本研究采用 *Bcl* I 酶切后进行定量 PCR 检测质粒复制效率的结果是准确可靠的。

2.2.2 pCMVori 的 Rep 和 Rep' 表达验证

按照 1.4.3 中的方法用 pCMVori-EGFP 和 pcDNA3.1-EGFP 的 cDNA 进行 Rep 和 Rep' 的 RT-PCR 表达验证, 并以质粒作为 PCR 扩增阳性对照。扩增产物经 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测, 结果如图 4 所示, pcDNA3.1-EGFP 转染细胞的 cDNA 无任何扩增条带, pCMVori-EGFP 转染细胞的 cDNA 则有 4 个扩增条带, 其中约 1 000 bp 的为 Rep 的转录产物, 约 600 bp 的为 Rep' 的转录产物, 2 个 500 bp 以下的则是 Rep 基因的另外 2 个小的转录产物。结果证明 pCMVori 载体在 PK-15 细胞内转录了 Rep 和 Rep', Rep 基因的这 2 个表达产物是 PCV2 复制子进行复制所必需的蛋白。

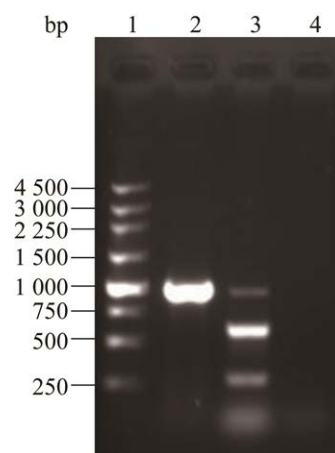


图4 pCMVori 中 Rep 和 Rep' 的表达验证
Figure 4 Expression verification of Rep and Rep' in pCMVori. 1: DNA marker DL250; 2: Positive control; 3: Products of cDNA of the pCMVori-EGFP-transfected cells; 4: PCR products of cDNA of the pcDNA3.1-EGFP-transfected cells.

2.3 pCMVori 的目的基因表达能力

用 pCMVori-EGFP 和 pcDNA3.1-EGFP 分别转染 PK-15 细胞, 48 h 后通过荧光显微镜观察 EGFP 表达情况, 结果如图 5 所示。pCMVori-EGFP 转染细胞的荧光水平明显高于 pcDNA3.1-EGFP 转染细胞, 前者所有转染细胞都发出强烈的荧光, 以至于无法区分细胞核和细胞质, 而后者大多数转染细胞为弱荧光细胞, 能清楚区别荧光较暗的细胞核区和荧光明亮的细胞质区。用图像分析软件 Image J 对两组细胞的平均荧光强度分析结果显示, pCMVori-EGFP 转染细胞的平均荧光强度比 pcDNA3.1-EGFP 转染细胞的高 39.14% (图 6)。

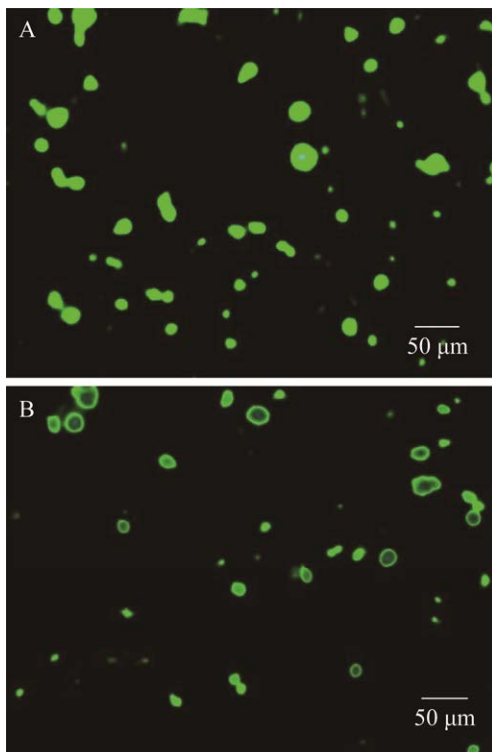


图 5 pCMVori-EGFP 和 pcDNA3.1-EGFP 转染细胞的荧光水平

Figure 5 Fluorescence levels of pCMVori-EGFP- and pcDNA3.1-EGFP-transfected cells. A: pCMVori-EGFP-transfected PK-15 cells. B: pcDNA3.1-EGFP-transfected PK-15 cells.

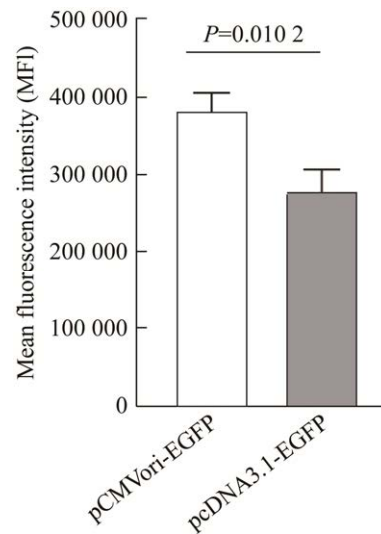


图 6 pcDNA3.1-EGFP 和 pCMVori-EGFP 转染细胞的平均荧光强度

Figure 6 Mean fluorescence intensities of pcDNA3.1-EGFP- and pCMVori-EGFP-transfected cells.

本研究还进一步检测了两组转染细胞的 EGFP 的基因转录水平。定量 RT-PCR 结果显示, 含 PCV2 复制子的 pCMVori-EGFP 转染 PK-15 细胞 48 h 后 EGFP 基因转录水平比不含 PCV2 复制子的对照质粒 pcDNA3.1-EGFP 高 40%, 差异显著 ($P=0.011$) (图 7)。两组转染细胞 EGFP 基因转录水平的差异与转染细胞平均荧光强度的差异高度一致, 进一步证实本研究构建的复制型 DNA 疫苗载体确实能提高目的基因在细胞内的表达水平。

3 讨论与结论

DNA 疫苗是继全病原体制备的疫苗(第一代疫苗)和亚单位疫苗(第二代疫苗)之后在分子生物学技术基础上新起的第三代疫苗^[7-8]。DNA 疫苗有很多优势, 如具有良好的稳定性, 可以长时间储藏, 安全性高, 能够同时诱导细胞免疫和体液免疫等^[9]。但迄今为止商用化的 DNA

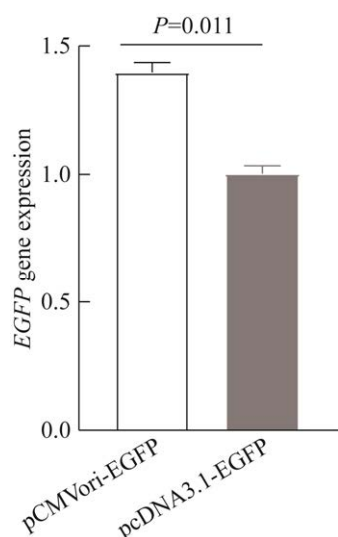


图 7 pCMVori 的外源基因表达水平

Figure 7 Expression level of the heterologous gene in pCMVori.

疫苗还很少,主要是因为 DNA 疫苗的实际免疫效果还很难超过第一代和第二代疫苗。造成这种情况的原因较多,但主要原因有 2 个:一是作为载体的质粒 DNA 注射入动物体内后进入细胞的效率低,因此免疫后动物体内整体的抗原表达水平低;二是普通质粒不能在真核细胞内复制,而且通常也只含有单拷贝的抗原基因,所以 DNA 疫苗进入细胞后的抗原基因表达效率也低。显而易见,设计、构建可在动物细胞内复制的 DNA 疫苗载体就是一个提高 DNA 疫苗细胞内抗原基因表达效率、从而提高疫苗免疫效果的有效途径。

基于甲病毒 RNA 复制子的 DNA 疫苗载体是迄今研究最多的复制型 DNA 疫苗载体。甲病毒是披膜病毒科的单股正链的 RNA 病毒,包括辛德毕斯病毒(Sindbis virus, SIN)、塞姆利基森林病毒(Semliki forest virus, SFV)及委内瑞拉马脑炎病毒(Venezuelan equine encephalitis, EEV)等^[10]。甲病毒复制子 DNA 疫苗载体包含甲病毒的 RNA 复制结构和 RNA 复制酶基因,插入

并替换其结构蛋白基因的外源目的基因借由其 RNA 复制机制复制生成大量 mRNA 拷贝,表达水平随之得以提高^[11]。基于甲病毒 RNA 复制子的 DNA 疫苗安全性较好,因为它在免疫动物体内表达外源基因后能诱导细胞凋亡而被清除,从而避免了质粒 DNA 长期存在于细胞内所带来的隐患,因此又称为自杀性 DNA 疫苗^[12]。大量实验研究证实,基于甲病毒复制子的 DNA 疫苗能高水平表达外源基因并诱导免疫小鼠产生强烈的体液免疫和细胞免疫应答^[13-15]。

但是基于甲病毒复制子的 DNA 疫苗载体体积很大,超过了 10 000 bp,比研究和应用最多的 DNA 疫苗载体 pcDNA3.1 大了 1 倍多。载体过大会显著降低 DNA 疫苗进入动物细胞的效率从而负面影响 DNA 疫苗的免疫效果。本研究构建的复制型 DNA 疫苗载体大小仅为 5 022 bp,比 pcDNA3.1 还小 406 bp,因此在这方面不但比甲病毒复制子 DNA 疫苗载体具有较大的优势,比常用的 DNA 疫苗载体 pcDNA3.1 也有优势。

利用病毒基因组携带抗原基因并在免疫动物体内进行表达的基因工程疫苗还有病毒载体疫苗,常用的病毒载体有腺病毒、痘病毒、疱疹病毒等^[16]。腺病毒有较强的免疫原性,能够触发较强的体液免疫和细胞免疫反应,而且腺病毒载体能携带较大的外源基因,因此腺病毒载体疫苗得到了广泛的研究并已进入临床应用^[17-22]。病毒载体疫苗分为复制型和非复制型两种,复制型的病毒载体疫苗因为在免疫动物的体内能进行重组病毒的复制,因此与 DNA 疫苗相比存在较大的安全性隐患。而非复制型的病毒载体疫苗和传统的质粒 DNA 疫苗一样,携带的抗原基因不能进行复制,因此抗原基因表达水平受限。此外,病毒载体疫苗需要制备重组病毒作为疫苗,因此其生产成本明显高于 DNA 疫苗,保存和运输条件要求也高于 DNA 疫苗。

目前报道的利用 PCV 复制子构建复制型 DNA 疫苗载体的尝试是 Faurez 等^[23]的一项研究,他们将 PCV2 基因组的复制起点和 *Rep* 基因序列插入 pcDNA3.1 中构建了 1 个复制型 DNA 疫苗载体。但是该研究的结果表明,其构建的载体并不能独立复制,需要另外 1 个表达 *Rep* 基因的辅助质粒共转染才能复制,因此该研究构建的载体没有作为 DNA 疫苗载体的实际应用价值。

在 PCV2 的复制过程中,ORF1 编码的复制蛋白 *Rep* 和 *Rep'*起着至关重要的作用,此外 ORF1 还编码 6 个小蛋白 *Rep3a*、*Rep3b*、*Rep3c*、*NS515*、*NS672* 和 *NS0*。由于 ORF1 的启动子存在于编码 *Cap* 基因的 ORF2 序列中^[6,24-25],因此,本文分析 Faurez 构建的载体之所以不能独立复制很可能是因为它们在设计载体时去除了过多的 *Cap* 基因序列,影响了 *Rep* 基因启动子的功能。尽管没有任何文献报道,但理论上 *Cap* 基因序列中还可能包含 *Rep* 基因的转录后剪切信号序列,因此去除过多的 *Cap* 基因序列还可能影响 *Rep* 基因的转录后剪切。上述 2 种可能性都会导致他们构建的载体不能正确表达 *Rep* 和 *Rep'*蛋白而失去复制的能力。

基于上述分析,本研究构建复制型 DNA 疫苗载体时是将 PCV2 全基因组插入到真核表达载体 pcDNA3.1 中,仅缺失 *Cap* 基因序列中部 1 个碱基,以确保能正确表达 *Rep* 和 *Rep'*蛋白,同时还能避免本载体在细胞内表达完整的 *Cap* 蛋白从而产生 PCV2 的可能性。结果证实本文的载体设计是成功的,构建的载体 pCMVori 在 PK-15 细胞内能够完全独立复制,不像 Faurez 等构建的载体需要辅助质粒共存于细胞中才能复制,因此具备了实用化的潜力。定量 PCR 检测结果表明,pCMVori 转染细胞后 48 h 的复制效率达到了 136.2%,比 Faurez 构建的载体借助

辅助质粒获得的复制效率更高。

本研究还以 *EGFP* 基因为示例验证了所构建的复制型载体表达外源基因的能力,结果表明,与传统的非复制型载体 pcDNA3.1 相比,能显著提高外源基因的表达水平。

综上所述,本研究构建了基于 PCV2 复制子的复制型 DNA 疫苗载体,该载体能够在真核细胞内独立复制,并因此提高外源基因的表达水平。本团队将在后续研究中通过动物免疫实验进一步验证该载体作为 DNA 疫苗载体提升免疫效果的潜力。

REFERENCES

- [1] ULMER JB, DONNELLY JJ, PARKER SE, RHODES GH, FELGNER PL, DWARKI VJ, GROMKOWSKI SH, DECK RR, DeWITT CM, FRIEDMAN A, HAWELA, LEANDER KR, MARTINEZ D, PERRY HC, SHIVER JW, MONTGOMERY DL, LIU MA. Heterologous protection against influenza by injection of DNA encoding a viral protein[J]. *Science*, 1993, 259(5102): 1745-1749.
- [2] HOBERNIK D, BROS M. DNA vaccines—how far from clinical use?[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2018, 19(11): 3605.
- [3] LI L, PETROVSKY N. Molecular mechanisms for enhanced DNA vaccine immunogenicity[J]. *Expert Review of Vaccines*, 2016, 15(3): 313-329.
- [4] ALLAN GM, ELLIS JA. Porcine circoviruses: a review[J]. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 2000, 12(1): 3-14.
- [5] MAHÉ D, BLANCHARD P, TRUONG C, ARNAULD C, LE CANN P, CARIOLET R, MADEC F, ALBINA E, JESTIN A. Differential recognition of ORF2 protein from type 1 and type 2 porcine circoviruses and identification of immunorelevant epitopes[J]. *Microbiology*, 2000, 81(7): 1815-1824.
- [6] FAUREZ F, DORY D, GRASLAND B, JESTIN A. Replication of porcine circoviruses[J]. *Virology Journal*, 2009, 6: 60-60.
- [7] FRANCIS MJ. Recent advances in vaccine technologies[J]. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 2018, 48(2): 231-241.
- [8] LU S, WANG SX, GRIMES-SERRANO JM. Current

- progress of DNA vaccine studies in humans[J]. *Expert Review of Vaccines*, 2008, 7(2): 175-191.
- [9] TIPTIRI-KOURPETI A, SPYRIDOPOULOU K, PAPPAS A, CHLICHLIA K. DNA vaccines to attack cancer: strategies for improving immunogenicity and efficacy[J]. *Pharmacology & Therapeutics*, 2016, 165: 32-49.
- [10] LUNDSTROM K. Alphavirus-based vaccines[J]. *Viruses*, 2014, 6(6): 2392-2415.
- [11] LUNDSTROM K. Plasmid DNA-based alphavirus vaccines[J]. *Vaccines*, 2019, 7(1): 29.
- [12] KIM TW, HUNG CF, JUANG J, HE L, HARDWICK JM, WU TC. Enhancement of suicidal DNA vaccine potency by delaying suicidal DNA-induced cell death[J]. *Gene Therapy*, 2004, 11(3): 336-342.
- [13] ZHOU X, BERGLUND P, RHODES G, PARKER SE, JONDAL M, LILJESTRÖM P. Self-replicating Semliki Forest virus RNA as recombinant vaccine[J]. *Vaccine*, 1994, 12(16): 1510-1514.
- [14] JOHANNING FW, CONRY RM, LoBUGLIO AF, WRIGHT M, SUMEREL LA, PIKE MJ, CUIEL DT. A sindbis virus mRNA polynucleotide vector achieves prolonged and high level heterologous gene expression *in vivo*[J]. *Nucleic Acids Research*, 1995, 23(9): 1495-1501.
- [15] PUSHKO P, PARKER M, LUDWIG GV, DAVIS NL, JOHNSTON RE, SMITH JF. Replicon-helper systems from attenuated venezuelan equine encephalitis virus: expression of heterologous genes *in vitro* and immunization against heterologous pathogens *in vivo*[J]. *Virology*, 1997, 239(2): 389-401.
- [16] KALLEL H, KAMEN AA. Large-scale adenovirus and poxvirus-vectored vaccine manufacturing to enable clinical trials[J]. *Biotechnology Journal*, 2015, 10(5): 741-747.
- [17] WATANABE M, NISHIKAWAJI Y, KAWAKAMI H, KOSAI KI. Adenovirus biology, recombinant adenovirus, and adenovirus usage in gene therapy[J]. *Viruses*, 2021, 13(12): 2502.
- [18] WOLD W, TOTH K. Adenovirus vectors for gene therapy, vaccination and cancer gene therapy[J]. *Current Gene Therapy*, 2014, 13(6): 421-433.
- [19] LIU XS, ZHAO DH, ZHOU P, ZHANG YG, WANG YL. Evaluation of the efficacy of a recombinant adenovirus expressing the spike protein of porcine epidemic diarrhea virus in pigs[J]. *BioMed Research International*, 2019, 2019: 1-8.
- [20] SAHA B, PARKS RJ. Human adenovirus type 5 vectors deleted of early region 1 (E1) undergo limited expression of early replicative E2 proteins and DNA replication in non-permissive cells[J]. *PLoS One*, 2017, 12(7): e0181012.
- [21] ROJAS JM, MORENO H, GARCÍA A, RAMÍREZ JC, SEVILLA N, MARTÍN V. Two replication-defective adenoviral vaccine vectors for the induction of immune responses to PPRV[J]. *Vaccine*, 2014, 32(3): 393-400.
- [22] ZHOU XY, XIANG ZQ, ERTL HCJ. Vaccine design: replication-defective adenovirus vectors[M]//*Vaccine Design*. New York, NY: Springer New York, 2016: 329-349.
- [23] FAUREZ F, DORY D, HENRY A, BOUGEARD S, JESTIN A. Replication efficiency of rolling-circle replicon-based plasmids derived from porcine circovirus 2 in eukaryotic cells[J]. *Journal of Virological Methods*, 2010, 165(1): 27-35.
- [24] MANKERTZ A, MUELLER B, STEINFELDT T, SCHMITT C, FINSTERBUSCH T. New reporter gene-based replication assay reveals exchangeability of replication factors of porcine circovirus types 1 and 2[J]. *Journal of Virology*, 2003, 77(18): 9885-9893.
- [25] MANKERTZ A, HILLENBRAND B. Analysis of transcription of porcine circovirus type 1[J]. *Journal of General Virology*, 2002, 83(11): 2743-2751.

(本文责编 陈宏宇)