

## XJ-160 病毒复制子型表达载体的构建\*

杨益良, 梁国栋\*\*, 付士红, 苏乃伦, 邓娟, 侯云德

(中国疾病预防控制中心病毒病预防控制所基因工程国家重点实验室, 北京, 100052)

## Construction of Replicon Expression Vector Derived from XJ-160 Virus\*

YANG Yi-liang, LIANG Guo-dong\*\*, FU Shi-hong, SU Nai-lun, DENG Juan, HOU Yun-de

(National Institute For Viral Disease Control and Prevention, Chinese Center For Disease Control And Prevention, Beijing 100052, China)

**Abstract:** XJ-160 is the first Chinese isolate of a Sindbis-like virus, and its genome was completely sequenced in our previous work. In this investigation, a full-length genomic cDNA clone was firstly constructed from RT-PCR products of the viral RNA. Then, the plasmid of replicon expression vector (pRepXJ160) was derived from this cDNA clone replacing viral structural sequence with multiclonal sequence by DNA recombination technique. To verify function of this vector, reporter genes, EGFP and *lacZ*, were cloned into this plasmid, respectively. And RNA transcribed from expression plasmid was inducted into BHK-21 cell line, resulting in expression of green fluorescent protein and  $\beta$ -galactosidase 14 hours later. The results indicated that the replicon vector derived from XJ-160 virus was self-replicating and that the following gene expression was efficient. Our study settled the basis for developing alphavirus vector system with Chinese intellectual property.

**Key words:** XJ-160 virus; Sindbis virus, Alphavirus; Replicon vector

**摘要:** XJ-160 病毒是我国首次分离的辛德毕斯病毒, 全基因组测序已经完成。本文利用该病毒全基因序列首先构建了全基因组 cDNA 克隆质粒, 在此基础上, 利用基因重组技术将病毒结构基因序列替换为含有多个单酶切位点的序列, 得到复制子表达载体质粒 pRepXJ160。为验证载体的功能, 将报告基因绿色荧光蛋白 (EGFP) 和  $\beta$ -半乳糖苷酶基因 (*lacZ*) 分别插入到载体的多克隆位点, 得到两个表达质粒; 经体外转录获得的转录体 RNA 转染 BHK-21 细胞后 14h, 可检测到报告基因的表达。结果表明我们构建的 XJ-160 病毒复制子型表达载体具有自主复制功能, 可以表达异源基因。本研究为进一步开发具有我国自主知识产权的甲病毒载体奠定了基础。

**关键词:** XJ-160 病毒; 辛德毕斯病毒; 复制子载体

中图分类号: Q939.4

文献标识码: A

文章编号: 1003-5125 (2003) 03-0221-06

XJ-160 病毒是我国于 1990 年从新疆地区分离得到的一株辛德毕斯病毒 (*Sindbis virus*)<sup>[1, 2]</sup>, 全基因组测序 (GenBank AF103728) 表明该病毒具有典型的甲病毒 (*Alphavirus*) 基因组结构, 基因组全长约 11.7kb, 5'端 2/3 区为非结构基因, 3'端 1/3 区为结构基因, 二者连接区有一保守序列, 含有亚基因启动子序列, 可起始结构基因的转录。该病毒基因组序列已申报专利, 具有我国自主知识产权。

近年来, 国外研究学者利用几种甲病毒开发了

多种表达载体系统, 已在生物医学研究中得到广泛应用, 其应用领域还在不断拓展<sup>[3, 4]</sup>。然而, 甲病毒载体的研究在我国生物医学领域还基本处于空白。本文主要利用 XJ-160 病毒全基因序列构建表达异源基因的甲病毒复制子型载体, 为我国甲病毒载体的开发作初步探索。

## 1 材料和方法

## 1.1 动物、细胞和病毒

收稿日期: 2003-03-03, 修回日期: 2003-03-18

\* 基金项目: 国家自然科学基金资助 (No. 39970037)

作者简介: 杨益良 (1969-), 男, 天津籍, 博士, 研究方向为分子病毒学。

\*\* 通讯作者: 梁国栋 (1951-), 男, 北京籍, 研究员, 博士生导师, 研究方向为分子病毒学和分子免疫学。

Correspondence author. Tel: 010-63581367 E-mail: gdliang@95777.com

昆明种乳鼠 (出生 2-3d) 购自中国医学科学院动物繁育中心; BHK-21 细胞为本室保存; XJ-160 病毒株为本室保存。

1.2 菌株和质粒

宿主菌 DH5  $\alpha$  和质粒 pBluescript SK、pEGFP-N1、pSV- $\beta$ -Galactosidase 为本室保存。

1.3 工具酶及其它试剂

Trizol 试剂和反转录试剂盒购自 Gibco 公司,

Taq 酶为 Boehringer Mannheim 公司产品, DNA 回收试剂盒为 Phamacia 公司产品, 限制性内切酶、T4DNA 连接酶、T-A 克隆试剂盒为 Promega 公司或 TaKaRa 公司产品, 体外转录试剂盒购自 Invitrogen 公司和 Ambion 公司, 转染试剂 DMRIE-C 购自 Gibco 公司。

1.4 引物合成

本文所有引物由上海生工公司合成。见表 1。

表 1 XJ-160 病毒 cDNA 扩增和复制子质粒构建所用引物

Table 1 Primers used amplifying cDNA fragment of XJ-160 virus and constructing replicon plasmid

Primer	Sequence	Position	R.E.
Sp6f2	5' <b>cgagctcg</b> <u>atttaggtgacactatag</u> attgacggcgtagtacacactattg 3'	1-25	Sac I
BamR	5' cttaggatccccggaagtactac 3'	2525-2502	BamH I
P5	5' <b>cgggatc</b> taagcagtgtgg 3'	2515-2533	BamH I
EP6	5' <b>ggaat</b> ccgcttgatgttacg 3'	5161-5147	EcoR I
EP7	5' <b>ggaat</b> ccgcttgatgttacg 3'	5154-5174	EcoR I
XbR	5' <b>ctctagat</b> ggttcgagggtg 3'	8457-8438	Xba I
XbF	5' <b>catctagagc</b> gttagatcctg 3'	8449-8471	Xba I
X2	5' ccgctcgag (0) <sub>35</sub> gaaatgtaaaacaaaattttggttaattg 3'	11626-11596	Xba I
MCSr	5' <b>tctagaag</b> taggggtgttacagtattag 3'	7568-7547	Xba I
MCSf	5' <b>tctagacgtc</b> actagtgcatg <b>cgccgctag</b> cccgctatgtccaatgac 3'	11307-11324	
GFPf	5' <b>tctagaat</b> ggtgagcaaggcaggagc 3'		Xba I
GFPr	5' <b>gctagctt</b> actgttacagctgctccatgc 3'		Nhe I
LacZf	5' <b>gcgtctaga</b> atggatcccgtcttttacaacg 3'		Xba I
LacZr	5' <b>tcagcggc</b> gcttattatttttgacaccag 3'		Not I

\* 黑体为酶切识别序列; 黑斜体为引入的核苷酸突变; 下划线处为 SP6 启动子序列

1.5 RT-PCR

从 XJ-160 病毒感染的乳小鼠脑组织悬液或感染的 BHK 细胞提取总 RNA, 反转录合成 cDNA 参考试剂盒提供的说明书; PCR 扩增病毒基因片段: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5min, 94 $^{\circ}$ C 30s, 55 $^{\circ}$ C 30s, 72 $^{\circ}$ C 3min, 循环 30 次, 72 $^{\circ}$ C 延伸 10min。

1.6 XJ-160 病毒全基因组 cDNA 克隆的构建

将病毒基因组分为 4 个片段扩增 cDNA, 引物 Sp6f2 和 BamR 扩增基因组 5' 末端 NS1 片段 (1-2525), 引物 P5 和 EP6 扩增基因组 NS2 片段 (2515-5161), 引物 EP7 和 XbR 扩增基因组 S1 片段 (5154-8457), 引物 XbF 和 X2 扩增基因组 S2 片段 (8448-11626), 获得 4 个基因片段 PCR 产物后, 分别克隆到 pGEM-T 载体, 每个片段需得到多个 T-A 克隆质粒。用相应的限制性内切酶 (Sac I, BamH I, EcoR I, Xba I, Xho I) 从 4 个基因片段的 T-A

克隆质粒获得片段 NS1 (Sac I/BamH I) NS2 (BamH I/EcoR I) S1 (EcoR I/Xba I) S2 (Xba I/Xho I), 然后在 pBluescriptSK 载体上进行全基因组 cDNA 片段组装, 得到全基因组 cDNA 克隆质粒 pBlue-xj160。

1.7 复制子质粒的构建

利用获得的全基因组 cDNA 克隆质粒 pBlue-xj160 为模板, 以 EP7/MCSr 作引物扩增片段 S1'(2413bp) (去除了 S1 片段中 3' 端的结构基因部分), 以 MCSf/X2 作引物扩增片段 S2' (396bp) (去除了 S2 片段中 5' 端的结构基因部分)。经亚克隆步骤将 S1' 和 S2' 在 pGEM-T 载体通过 Xba I 酶切位点连接成 2.8kb 片段 S1'-S2'。将 EcoR I/Xho I 双切的 S1'-S2' 片段替换 pBlue-xj160 质粒中的 S1-S2 片段, 获得的质粒即为复制子载体质粒 pRepXj160。

以 pEGFP-N1 质粒为模板, 通过 PCR 扩增得到

绿色荧光蛋白基因 EGFP (720bp), 分别用 *Xba* I 和 *Nhe* I 酶双切 GFP 基因片段和 pRepXj160 质粒, 回收目的片段后经连接、转化得到克隆绿色荧光蛋白基因的表达质粒 pRepXj160-EGFP (见图 4)。

以 pSV- $\beta$ -Galactosidase 质粒为模板, 通过 PCR 扩增得到  $\beta$ -半乳糖苷酶基因 LacZ (3106bp), 分别用 *Xba* I 和 *Not* I 酶双切 LacZ 基因片段和 pRepXj160 质粒, 回收目的片段后经连接、转化得到克隆  $\beta$ -半乳糖苷酶基因的表达质粒 pRepXj160-LacZ (见图 5)。

### 1.8 序列鉴定

用 ABI PRISM377DNA 测序仪对 cDNA 片段的 T-A 克隆和全基因克隆质粒以及复制子质粒的基因组 cDNA 和重要基因片段连接区序列进行测序。

### 1.9 体外转录

制备转录模板: 用 *Xho* I 酶切获得的含有报告基因的复制子质粒成线性, 加入 5% SDS 和 1/10 体积的蛋白酶 K (20mg/mL), 于 50°C 水浴至少 30min, 用等体积酚: 氯仿抽提一次, 然后加入 1/10 体积的 5mol/L 醋酸铵和 2 倍体积的无水乙醇沉淀线性质粒 DNA, 4°C 10 000r/min 离心 10min, 弃上清, 室温干燥, 用无 Rnase 的 ddH<sub>2</sub>O 溶解使其浓度为 0.5 $\mu$ g/ $\mu$ L。RNA 合成和纯化: 用 mMESSENGER<sup>TM</sup>transcription SP6 Kit (Ambion) 完成体外转录。反应体系 20 $\mu$ L, 5mmol/L dATP, dCTP, dUTP, 2mmol/L dGTP, 4mmol/L capanalog 类似物 m7G (5') ppp (5') GTP, 1 $\mu$ g 线性质粒 DNA 模板, 2 $\mu$ L enzyme Mix, 37°C 水浴 2h, 取 1 $\mu$ L 反应液进行电泳检测 RNA 产量。用 2.5mol/L LiCl 沉淀 RNA, 于 -20°C 放置至少 30min, 4°C 10 000 r/min 离心 15min, 弃上清, 用 70% 乙醇洗涤一次, 离心弃上清, 室温干燥, 用无 RNase 的 ddH<sub>2</sub>O 溶解至适当体积, 于 -20°C 储存。

### 1.10 RNA 转染

在 35mm 细胞培养皿接种 10<sup>5</sup>BHK 细胞, 37°C 孵育 24~48h 待细胞生长至 50%~80% 融合时用于 RNA 转染, 弃去细胞上清, 用无血清 Eagles 培养基洗涤 BHK 细胞一次, 配制脂质体-RNA 复合物 (1mL 无血清无抗生素 Eagle's 培养液+10 $\mu$ L DMRIE-C 转染试剂+约 7-8 $\mu$ g RNA, 充分混匀), 立刻转移至洗涤好的 BHK 细胞上, 37°C 5%CO<sub>2</sub> 孵育 4-5h, 然后更换完全培养基 2.5mL, 37°C 5%CO<sub>2</sub> 继续孵育。

### 1.11 报告基因的检测

绿色荧光蛋白表达检测: 转染后 14h 在荧光显微镜观察 EGFP 的表达, 用激光共聚焦显微镜扫描记录细胞形态。LacZ 基因表达检测: 转染 14h 后可以进行检测, 弃去细胞培养液, 用 PBS 洗涤细胞两

次, 用 0.2% 甲醛 0.2% 戊二醛 (PBS 配制 pH7.3) 固定细胞, 室温 10min; PBS 洗涤两次, 用相当于 1/2 体积细胞培养液的 X-Gal 试剂 (1mg/mL X-Gal, 4mmol/L K<sub>3</sub>Fe (CN)<sub>6</sub>, 4mmol/L K<sub>3</sub>Fe (CN)<sub>6</sub>·3H<sub>2</sub>O, 2mmol/L MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O in PBS) 染色, 37°C 孵育 15min -60min; 在显微镜下观察是否出现兰色细胞。

## 2 结果

### 2.1 XJ-160 病毒全基因组 cDNA 克隆的构建

根据已知 XJ160 病毒基因组序列 (GenBank, AF10378) 将基因组全长分为四个相互衔接的片段 (NS1、NS2、S1、S2) 进行全长 cDNA 序列拼接。扩增 NS1 片段时利用上游引物 SP6F2 在基因组 5' 端引入 SP6 启动子序列; 扩增 S2 片段时利用下游引物 X2 在基因组 3' 端引入 poly A 序列; 为方便克隆, 在扩增 cDNA 片段时利用引物于基因组 5156 (T $\rightarrow$ A) 位和 5159 (A $\rightarrow$ T) 位引入静息突变产生 *Eco*R I 酶切识别序列, 在 8453 位 (C $\rightarrow$ T) 引入静息突变产生 *Xba* I 酶切识别序列。4 个 cDNA 片段的 RT-PCR 产物电泳鉴定结果见图 1。

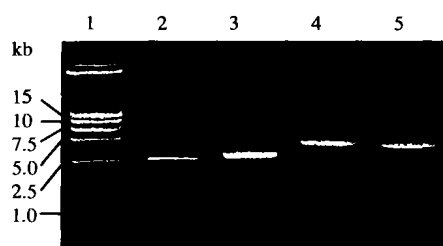


图 1 XJ-160 病毒基因组 RT-PCR 产物电泳图

Fig.1 Electrophoresis result of cDNA fragment (RT-PCR product) of XJ-160 virus

1. DL15000Marker; 2. NS1 2.5kb; 3. NS2 2.6kb; 4. S1 3.3kb; 5. S2 3.2kb.

利用高拷贝克隆载体 pBluescriptSK 质粒作骨架, 经多步亚克隆获得病毒全长基因组 cDNA 克隆质粒 pBlue-xj160 (见图 2)。其中 NS1 (*Sac* I / *Bam* H I) 片段包括 SP6 启动子序列、病毒基因组 5'UTR、非结构基因 *nsp1* 和非结构基因 *nsp2* 的 5'端序列; NS2 (*Bam* H I / *Eco* R I) 片段包括病毒基因组非结构基因 *nsp2* 的 3'端序列和非结构基因 *nsp3* 的 5'端序列; S<sub>1</sub> (*Eco* R I / *Xba* I) 片段包括病毒基因组非结构基因 *nsp3* 的 3'端序列、非结构基因 *nsp4*、连接区和结构基因 *sp* 的 5'端序列; S<sub>2</sub> (*Xba* I / *Xho* I) 片段包括病毒基因组结构基因 *sp* 大部分序列、基因组 3'UTR 和 PolyA 序列 (参见图 2 中 pBlue-xj160 质粒图, 组装片段名称未作标注)。质粒测序表明病毒基因

组 5'端序列、3'端序列和 cDNA 片段各连接处序列完全正确。

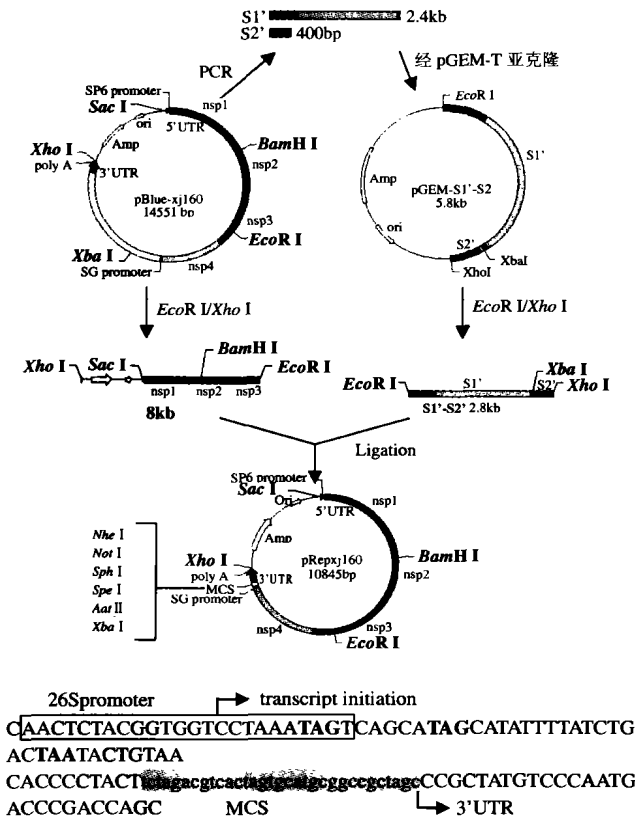


图 2 复制子质粒 pRepXj160 构建和多克隆位点序列  
 Fig.2 Construction of replicon plasmid pRepXj160 and multicloning site (MCS) sequence

2.2 复制子载体的构建

以全基因 cDNA 克隆质粒为基础，通过 PCR 方法缺失掉结构基因，利用引物引入多克隆酶切识别序列，经多步亚克隆得到复制子质粒 pRepXj160。在该质粒中病毒基因组中的结构基因区域被替换为由限制性内切酶 Xba I、Aat II、Spe I、Sph I、Not I、Nhe I 识别的多克隆位点序列 (tctagacgtcactagtgcacgtcggccgctagc)。质粒构建过程见图 2。

复制子质粒 pRepXj160 的测序结果表明 XJ-160 病毒的结构基因区 (3738bp) 已经被含有多克隆酶切点的序列 (tctagacgtcactagtgcacgtcggccgctagc) 替代 (见图 2)。

2.3 报告基因表达载体的构建

利用 pEGFP-N1 质粒和 pSV-β-Galactosidase 质粒经 PCR 方法扩增获得报告基因绿色荧光蛋白 EGFP (720bp) 和 β-半乳糖苷酶 LacZ (3106bp)，分别插入复制子质粒 pRepXj160 的多克隆位点，构

建得到两个报告基因表达质粒 pRepXj160-EGFP (见图 3) 和 pRepXj160-LacZ (见图 4)。质粒测序表明两个报告基因序列正确。

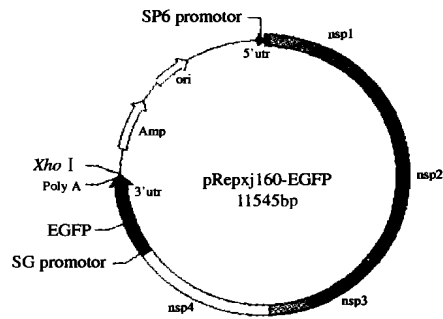


图 3 绿色荧光蛋白表达质粒 pRepXj160-GFP  
 Fig.3 EGFP expression plasmid pRepXj160-GFP

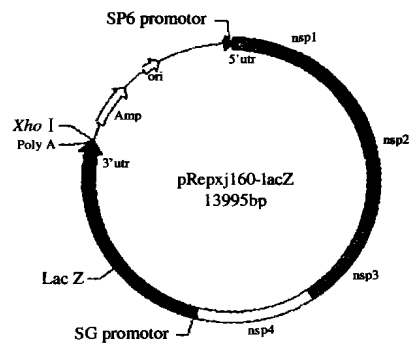


图 4 β-半乳糖苷酶的表达质粒 pRepXj160-LacZ  
 Fig.4 β-Galactosidase expression plasmid pRepXj160-LacZ

2.4 转录体 RNA 的制备

含有报告基因的复制子表达质粒经 Xho I 酶切线性化作为体外转录模板，用 SP6 RNA 聚合酶合成 5'末端带帽状结构 (m7G (5') ppp (5') GTP) 的 RNA 转录体，即复制子 RNA (见图 5)。为提高含帽子结构 RNA 的产量，我们对转录反应体系进行了优化。在 20μL 含有 1μg 线性化转录模板的反应体系中，根据转录 RNA 的长度调节帽子类似物 (Cap analogue) 与鸟苷酸 (GTP) 的比例，使带帽 RNA 的产率达到最佳。合成 RepXj160-LacZ 转录体 RNA (长约 11kb) 时比例为 1.3 : 1，合成 RepXj160-EGFP 转录体 RNA (长约 8.6kb) 时比例为 2 : 1。

2.5 转录体 RNA 的转染和报告基因的表达

用脂质体包裹转录体 RNA (RepXj160-GFP) 转染 BHK-21 细胞，转染后 14h 在荧光显微镜下观察，可见到 35mm 细胞培养皿中有散在多处细胞表达绿色荧光蛋白，在 ×100 放大倍数下，平均每个视野

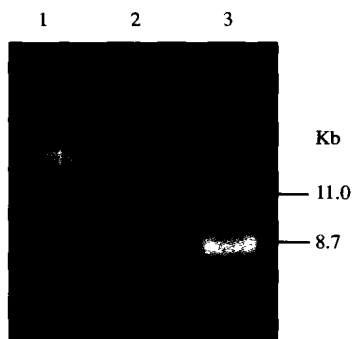


图5 转录体 RNA 琼脂糖凝胶电泳

Fig.5 Agarose gel electrophoresis of Transcript RNA

1, M, DL15000; 2, Transcript RNA (RepXj160-LacZ); 3, Transcript RNA (RepXj160-EGFP)

可见 2-5 个绿色细胞; 而阴性对照细胞未见到任何表达绿色荧光蛋白的细胞。激光共聚焦显微镜扫描结果见图 6。

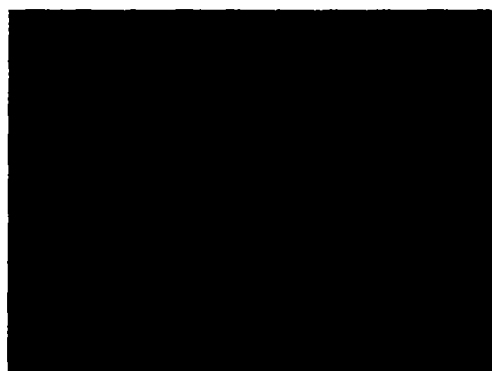


图6 转录体 RNA (RepXj160-EGFP) 转染 BHK-21 细胞后 14h 绿色荧光蛋白的表达 ( $\times 100$ )

Fig.6 The expression of green fluorescent protein in BHK-21 cell transfected by transcript RNA (RepXj160-eGFP) 14 hours after transfection ( $\times 100$ )

用脂质体包裹转录体 RNA 复制子 (RepXj160-LacZ) 转染 BHK-21 细胞, 在转染后 14h 经 X-Gal 试剂染色以检测  $\beta$ -半乳糖苷酶的表达, 结果显示 35mm 细胞培养皿中散在有多处细胞表达了  $\beta$ -半乳糖苷酶, 在  $\times 100$  放大倍数下, 平均每个视野可见到 1-3 处蓝色细胞; 阴性对照细胞染色后未发现任何细胞表达报告基因。见图 7。

### 3 讨论

本研究中我们首先利用克隆载体 pBluescript 构建了 XJ-160 病毒的全基因组 cDNA 克隆质粒 (pBlue-xj160), 然后在此基础上删除全部结构基

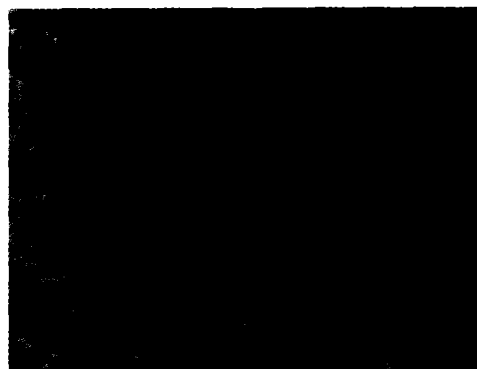


图7 转录体 RNA (RepXj160-LacZ) 转染 BHK-21 细胞后 14h 经 X-Gal 试剂染色结果 ( $\times 200$ )

Fig.7 The expression of  $\beta$ -galactosidase in BHK-21 cell transfected by transcript RNA (RepXj160-LacZ) 14 hours after transfection ( $\times 200$ )

因区域, 将多克隆序列置于病毒亚基因启动子区后, 构建出辛德毕斯病毒 XJ-160 株复制子型载体质粒 pRepXj160。利用该复制子质粒分别构建了含有报告基因 EGFP 和 LacZ 的表达质粒, 含报告基因质粒的转录体 RNA 转染 BHK-21 细胞后分别检测出了绿色荧光蛋白和  $\beta$ -半乳糖苷酶的表达。这些报告基因的表达证明我们利用 XJ-160 病毒构建的复制子质粒可体外转录产生具有自主复制功能的重组 RNA 分子, 在宿主细胞中可以表达异源蛋白。

目前, 生物医学研究中用于外源基因表达的病毒载体大多来自 DNA 病毒 (如: 痘苗病毒、腺病毒、疱疹病毒、腺病毒伴随病毒等) 和逆转录病毒 (如: 鼠白血病相关病毒、HIV), 利用这些病毒载体进行的蛋白表达、疫苗、基因治疗研究非常广泛; 而利用逆转录病毒以外的 RNA 病毒构建病毒载体的研究相对较少。除逆转录病毒外, 很多 RNA 病毒感染宿主细胞后其基因组在细胞浆中完成复制和转录, 病毒 RNA 不受细胞核剪切作用的影响, 病毒蛋白的表达水平很高; 另外, 病毒自身调节功能蛋白的表达不受宿主细胞影响, 而且不经过 DNA 阶段, 因而排除了病毒基因组整合细胞染色体的可能, 避免了细胞的转化。正是由于 RNA 病毒的这些特点, 人们对利用 RNA 病毒开发病毒载体的研究兴趣日益浓厚。目前已有多种 RNA 病毒 (如脊髓灰质炎病毒、甲病毒、麻疹病毒、流感病毒等) 被改造成病毒载体, 其中甲病毒表达载体系统是最成功最具前景的 RNA 病毒载体。

披膜病毒科甲病毒属含有很多成员, 基因组结构和复制机制基本相同。基因组全长约 11-12kb,

有两个 ORF 编码区, 5' 端约 2/3 区域为非结构基因, 编码病毒复制和转录所必须的功能蛋白, 组成复制酶和转录酶; 3' 端 1/3 区域为结构基因, 编码包装基因组 RNA 的衣壳蛋白和病毒外膜蛋白。病毒吸附宿主细胞后, 将基因组 RNA 释放到胞浆中, 病毒基因组 RNA 可作为 mRNA 直接合成非结构蛋白, 形成复制酶/转录酶系统, 在负链 RNA 和 26SRNA 合成中起作用; 新合成的负链 RNA 作为模板合成更多的子代病毒基因组 49S RNA, 在负链 RNA 上有一个内部转录起始位点用以产生 26S 亚基因 RNA; 26S 亚基因 RNA 在细胞浆内的浓度很高, 翻译的效率也很高, 可以产生大量结构蛋白; 最后, 结构蛋白包装 49S RNA 形成子代病毒颗粒, 以出芽方式释放出细胞。十多年来, 正是对甲病毒复制及包装机制的不断认识, 使人们致力于以甲病毒为基础发展在动物细胞中高效表达异源 RNA 及蛋白质的新型表达载体。

目前的甲病毒载体主要是以辛德毕斯病毒、西门利克森林病毒 (Semliki forest virus) 和委内瑞拉马脑炎病毒为基础的甲病毒表达系统, 三种病毒构建的载体各具特色, 但其构建策略基本相同<sup>[5]</sup>。主要策略有两种: 第一种, 构建出病毒基因组 cDNA 克隆, 将异源基因取代结构基因放置于转录 26S 亚基因 RNA 的启动子后, 体外转录产生带甲病毒非结构基因的感染性重组 RNA 分子, 通过物理方法转染宿主细胞, 非结构蛋白的表达使 26S 亚基因 RNA 转录, 进而翻译出外源基因产物。第二种, 构建出缺失大部分非结构基因的病毒基因组 cDNA 克隆, 体外转录产生复制缺陷的表达甲病毒结构基因的 RNA 分子, 与第一种策略的感染性重组 RNA 分子共转染宿主细胞, 获得重组病毒颗粒, 进而以感染的方式将感染性重组 RNA 分子转移入宿主细胞, 提高了载体的效率。

建立甲病毒表达载体的核心是产生感染性重组 RNA, 即复制子 RNA。该复制子 RNA 进入宿主细胞后应可以产生与病毒基因组 RNA 相同的复制功能, 从而使外源基因得到表达。由于病毒 RNA 基因组存在异源性以及基因片段的扩增和 DNA 重组中可能出现的基因突变, 会导致最终的复制子 RNA 没有功能。因此获得忠实性良好的病毒基因序列是复制子载体构建成功的关键。本研究中通过多次更换非结构基因区的基因片段才获得成功充分证实这一点。

利用甲病毒载体对大量的来自病毒、细菌的蛋白和肿瘤抗原进行了表达研究<sup>[5]</sup>。在疫苗研究方面<sup>[6]</sup>

尤其是近年来在 HIV 疫苗的研究<sup>[7, 8]</sup>中甲病毒载体所表现出的优势, 使其成为新型疫苗研究的有力工具。另外, 甲病毒载体瞬时表达和基因不整合的特点使其在肿瘤治疗性疫苗和一些疾病的基因治疗研究中有广阔的前景<sup>[9-11]</sup>。

我们利用具有自主知识产权的病毒株构建的复制子型病毒载体将为我国甲病毒载体系统研究和应用提供了很好的开端, 填补了我国在甲病毒载体研究的空白。

总之, 我们利用我国首次分离的辛德毕斯病毒 XJ-160 株病毒基因组建立了复制子型表达载体, 成功表达了报告基因绿色荧光蛋白和  $\beta$ -半乳糖苷糖。该结果为进一步开发甲病毒载体系统奠定了一定的基础。

## 参考文献

- [1] Liang G D, Li L, Zhou G L, *et al.* Isolation and complete nucleotide sequence of a Chinese Sindbis-like virus[J]. *J Gen Virol*, 2000, 81, 1347-1351.
- [2] 李蕾, 梁国栋, 李富胜, 等. XJ-160 病毒为辛德毕斯病毒新亚型[J]. *病毒学报*, 2000, 16: 106-110.
- [3] Lundstrom K. Alphavirus vectors for gene therapy applications[J]. *Curr Gene Ther*, 2001, 1: 19-29.
- [4] Lundstrom K. Alphavirus-based vaccines[J]. *Curr Opin Mol Ther*, 2002, 4: 28-34.
- [5] Frolov I, Hoffman T A, Pragab B M, *et al.* Alphavirus-based expression vectors: strategies and applications[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93: 11371-11377.
- [6] Schlesinger S, Dubensky T W. Alphavirus vectors for gene expression and vaccines[J]. *Curr Opin Biotechnol*, 1999, 10: 434-439.
- [7] Vajdy M, Gardner J, Neidleman J, *et al.* Human immunodeficiency virus type 1 Gag-specific vaginal immunity and protection after local immunizations with sindbis virus-based replicon particles[J]. *J Infect Dis*, 2001, 184: 1613-1616.
- [8] Caley I J, Betts M R, Irlbeck D M, *et al.* Humoral, mucosal, and cellular immunity in response to a human immunodeficiency virus type 1 immunogen expressed by a Venezuelan equine encephalitis virus vaccine vector[J]. *J Virol*, 1997, 71 (4): 3031-3038.
- [9] Cheng W F, Hung C F, Hsu K F, *et al.* Cancer immunotherapy using Sindbis virus replicon particles encoding a VP22-antigen fusion [J]. *Hum Gene Ther*, 2002, 13: 553-568.
- [10] Daemen T, Regts J, Holtrop M, *et al.* Immunization strategy against cervical cancer involving an alphavirus vector expression high levels of a stable fusion protein of human papillomavirus 16 E6 and E7 [J]. *Gene Ther*, 2002, 9: 85-94.
- [11] Tseng J C, Levin B, Hirano T, *et al.* In vivo antitumor activity of Sindbis viral vectors[J]. *J Natl Cancer Inst*, 2002, 94 (23): 1790-1802.