



T7 噬菌体转运真核表达载体入胞表达平台的构建

徐海^{1,3}, 李睿婷¹, 张婕妮¹, 郭子杰¹, 林梦舟¹, 洪伟鸣¹, 李玲¹, 朱善元¹, 侯继波^{2*}, Hafizah Y. Chenia^{3*}

1 江苏农牧科技职业学院江苏省兽用生物制药高技术研究重点实验室, 江苏 泰州 225300

2 江苏省农业科学院动物免疫工程研究所, 江苏 南京 210014

3 南非夸祖鲁-纳塔尔大学农业工程与科学学院, 德班 4001

徐海, 李睿婷, 张婕妮, 郭子杰, 林梦舟, 洪伟鸣, 李玲, 朱善元, 侯继波, Hafizah Y. Chenia. T7 噬菌体转运真核表达载体入胞表达平台的构建. *微生物学报*, 2022, 62(3): 982–992.

Xu Hai, Li Ruiting, Zhang Jieni, Guo Zijie, Lin Mengzhou, Hong Weiming, Li Ling, Zhu Shanyuan, Hou Jibo, Chenia Hafizah Y.. Construction of T7 phage mediated eukaryotic expression vector transport platform. *Acta Microbiologica Sinica*, 2022, 62(3): 982–992.

摘要:【目的】构建携带锚定序列的真核表达载体, 研究 T7 噬菌体识别、包裹和转运真核表达载体进入细胞实现蛋白表达的可行性, 为 DNA 疫苗研发建立新的技术平台。【方法】本研究通过重叠延伸 PCR 方法获得候选锚定序列并插入真核表达载体; 建立荧光定量 PCR 方法比较 T7 噬菌体识别、包裹真核表达载体的效率; 激光共聚焦显微镜观察 T7 噬菌体转运真核表达载体进入细胞实现报告基因的表达。【结果】获得 4 条锚定序列(AS1–4)并成功插入 pcDNA3.0-EGFP 真核表达载体; 其中携带 2 号锚定序列(pcDNA3.0-EGFP-AS2)的真核表达载体可被 T7 噬菌体高效识别, 对其包裹效率高达 95%; T7 噬菌体包裹真核表达载体可以抵御核酸酶对质粒的降解, 并且转运真核表达载体进入树突状细胞内部实现报告基因 *EGFP* 的表达。【结论】该研究表明, T7 噬菌体通过识别锚定序列将真核表达载体包裹进衣壳内部, 完整的噬菌体颗粒作为转运工具将真核表达载体运送至细胞内部实现表达, 这为 DNA 疫苗研发提供新的技术平台。

关键词: T7 噬菌体; 锚定序列; 真核表达; 转运

基金项目: 江苏农牧科技职业学院院级课题(NSF201902)

Supported by the Intramural Research Program of Jiangsu Agri-Animal Husbandry Vocational College (NSF201902)

*Corresponding authors. HOU Jibo, Tel: +86-25-84392008, E-mail: houjibo@jaas.ac.cn; HAFIZAH Y. Chenia, Tel: +27-31-2607796, E-mail: Cheniah@ukzn.ac.za

Received: 15 June 2021; Revised: 5 August 2021; Published online: 26 October 2021

Construction of T7 phage mediated eukaryotic expression vector transport platform

XU Hai^{1,3}, LI Ruiting¹, ZHANG Jieni¹, GUO Zijie¹, LIN Mengzhou¹, HONG Weiming¹, LI Ling¹, ZHU Shanyuan¹, HOU Jibo^{2*}, HAFIZAH Y. Chenia^{3*}

1 Jiangsu Key Laboratory for High-Tech Research and Development of Veterinary Biopharmaceuticals, Jiangsu Agri-Animal Husbandry Vocational College, Taizhou 225300, Jiangsu, China

2 Institute of Veterinary Immunology & Engineering, Jiangsu Academy of Agricultural Science, Nanjing 210014, Jiangsu, China

3 School of Life Sciences College of Agriculture, Engineering and Science, University of KwaZulu-Natal, Durban 4001, South Africa

Abstract: [Objective] This study aimed to construct a novel T7 phage delivery platform for the recognition and packaging of eukaryotic expression vector harboring an anchor sequence, and to evaluate its feasibility for DNA vaccine research and development. [Methods] Anchor sequences were prepared by SOE-PCR method and inserted into the non-essential region of pcDNA3.0-EGFP to construct the recombinant eukaryotic expression plasmid. The recognition and packaging efficiency of recombinant plasmids by T7 phage was determined via fluorescence quantitative PCR method. Intact T7 phage particles carrying recombinant plasmids were then used as vehicle to deliver plasmids into dendritic cells. The *EGFP* gene expression was detected using a confocal microscope. [Results] Four PCR amplified-anchor sequence (AS1–4) were successfully inserted into pcDNA3.0-EGFP plasmid. The recombinant plasmid pcDNA3.0-EGFP-AS2 could be recognized and packaged by T7 phage at a package efficiency of approximately 95%. T7 phage packaging effectively prevented the nuclease degradation of recombinant plasmids. Moreover, intense *EGFP* expression was detected by confocal microscopy suggesting the successful phage-based delivery of plasmids into dendritic cells. [Conclusion] Our results demonstrate that eukaryotic expression plasmid harboring anchor sequences can be recognized and packaged by T7 phage, and the intact phage particles can be used as a vehicle to delivery plasmids into dendritic cells for endogenous gene expression. T7 phage mediated eukaryotic expression may provide a novel technical platform for the research and development of DNA vaccine.

Keywords: T7 phage; anchor sequence; eukaryotic expression; transport

1990年Wolff等^[1]将真核表达载体接种到小鼠骨骼肌中,并意外检测到表达载体上携带的编码基因在接种部位的肌细胞内实现蛋白表达,且产生了相应的抗体,这一发现开创了DNA疫苗的研究。DNA疫苗是基于真核表达质粒载体的第三代疫苗,真核表达载体携带抗原编码基因,在启动子作用下实现编码基因表达,模拟细

胞内致病性感染,胞内表达的抗原被加工递呈,从而高效活化CD4⁺T、CD8⁺T淋巴细胞,诱导全面的体液和细胞免疫反应^[2]。DNA疫苗已历经多年的研究,但由于裸露的核酸物质易于受到机体内各种酶的降解、真核表达载体靶向转运障碍等不利因素,DNA疫苗的免疫效率不尽如人意^[3],创新DNA疫苗研发平台具有现实意义。

纳米颗粒可用来包裹真核表达载体,避免裸露的核酸物质被酶降解,颗粒表面工程化配体分子,可以精准靶向树突状细胞、巨噬细胞和淋巴细胞等免疫细胞,提高 DNA 疫苗的转运效率、提高免疫原性^[4]。现已报道的纳米颗粒有多种材质与类型,包括:聚合物纳米颗粒、脂质体纳米颗粒、蛋白质纳米颗粒和无机纳米颗粒^[5]等。病毒样颗粒(virus-like particles, VLPs)是一类由病毒蛋白质组成的纳米颗粒,是遗传物质向宿主细胞转运的天然工具^[6-7]。噬菌体是侵染细菌的病毒粒子,也是天然的纳米颗粒,以 T7、T4、 λ 、MS2 和 M13 等噬菌体作为载体开发疫苗已有诸多报道^[8-12],在此基础上开发的疫苗主要有:噬菌体展示抗原多肽疫苗、噬菌体转运 DNA 疫苗以及整合上述 2 种方式的嵌合噬菌体疫苗。利用噬菌体作为疫苗开发平台优势众多^[11-12]:噬菌体颗粒本身理化性状稳定、颗粒的不对称性易于激发 T 细胞依赖的免疫反应、噬菌体可以表面展示靶向性配体分子进一步提高转运效率。

20 世纪 90 年代,Chung 等^[13-15]对 T7 噬菌体复制、组装过程进行解析,发现其线性基因组左、右两侧重复序列和复制原点共同组成锚定序列(anchor sequence, AS),并影响子代噬菌体核酸物质的包装。虽然较早地揭示了锚定序列在 T7 噬菌体复制周期中的作用,但如何对其加以利用尚未见文献报道。本研究进一步优化锚定序列的组成,然后将其插入真核表达载体,将构建的重组载体导入 T7 噬菌体宿主细菌,当 T7 噬菌体入侵宿主进行复制时,通过识别锚定序列进而将真核表达载体视为自身核酸物质而包裹在衣壳内部。利用包裹真核表达载体的 T7 噬菌体作为转运工具,验证 T7 噬菌体介导的胞内表达,为开发 DNA 疫苗研发提供一种全新的技术途径。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 菌株和质粒

T7 select 415-1b 噬菌体购于 Merck 公司; pcDNA3.0-EGFP 质粒由本实验构建保存。

1.1.2 主要试剂

限制性内切酶、*Taq* DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶、TB Green Advantage qPCR Premix 均为大连宝生物公司产品;脂质体 2000 为 Invitrogen 公司;其余试剂均为分析纯。

1.1.3 主要仪器

台式离心机购自美国 Beckman 公司; BTX 电转化仪、PCR 仪购自大连宝生物公司; Geldoc-It Imaging System 购自美国 UVP 公司; 荧光显微镜购自德国蔡司公司。

1.2 候选锚定序列的拼接

以 T7 select 415-1b 基因组为模板,扩增基因左右两侧基因片段,通过重叠延伸 PCR 方法^[16] (gene splicing by overlap extension, SOE-PCR) 将基因片段进行拼接,获得 4 条候选锚定序列(anchor sequence, AS),操作流程如图 1 所示:引物 F1/R1 扩增片段 a、引物 F2/R2 扩增片段 b、引物 F3/R3 扩增片段 c;以片段 a 和 b 的拼接产物为模板,引物 F4/R4 扩增片段 d、F5/R5 扩增片段 e、F6/R6 扩增片段 f、F7/R7 扩增片段 g。以片段 c 为模板,分别用引物 F3/R3d、F3/R3e、F3/R3f 二次扩增片段 c,从而在片段 c 下游分别引入约 20 bp 来自片段 d、e、f、g 的上游碱基;将二次扩增的片段 c 分别与对应的片段 d、e、f、g 进行拼接,引物 F3/R4、F3/R5、F3/R6、F3/R7 扩增候选锚定序列 AS_x (x 为数字 1-4)。PCR 扩增所用引物序列如表 1 所示。

1.3 携带锚定序列的真核表达载体构建

利用引物序列中引入的 *Bgl* II、*Nru* I 酶切位点处理 4 个候选锚定序列 AS_x, 分别与同酶

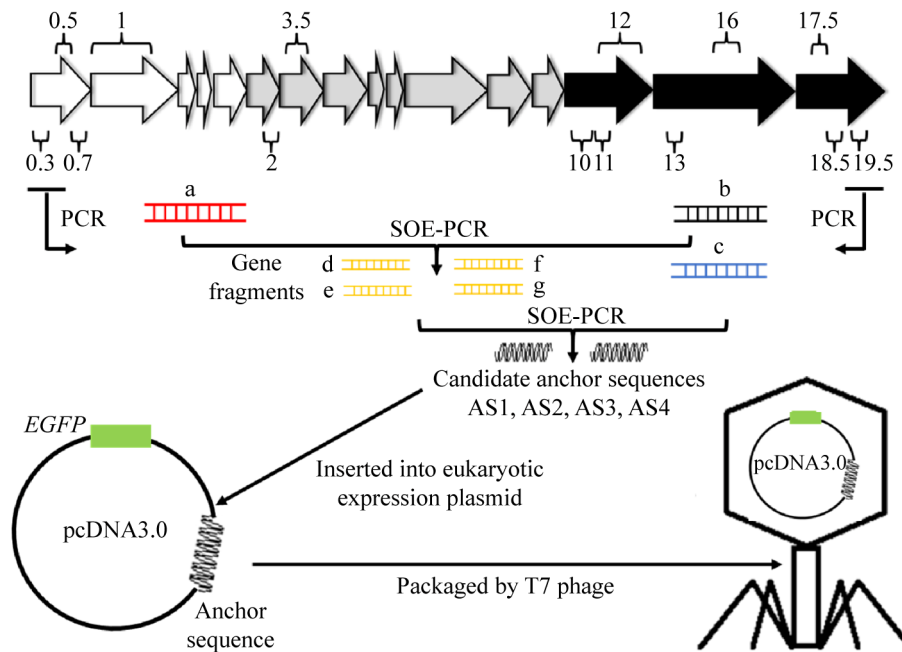


图 1 锚定序列拼接及载体构建流程图

Figure 1 A schematic diagram of anchor sequence assemble and expression plasmid construction.

表 1 试验中使用的引物

Table 1 Primers used in the research

Primers	Sequences (5'→3')
F1	TCTCACAGTGTACGGACCTA
R1	AAACTTTAAGATAGGCGTTGA
F2	GGCCATCCTATCAGTGTCAC
R2	AGGGACACAGAGAGACACT
F3	<u>AGATCT</u> GTCGAGGGTGAAGTACTTGCT
R3	GTTGGTCCTTAAGTTAAGGT
R3d	TAGGCCCTCTCTAAGACCCTGTTGGTCCTTAAGTTAAGGTGATA
R3e	TTAAAGGACCCTATAGGAACGTTGGTCCTTAAGTTAAGGTGA
R3f	TAGTCACTCAGATTTTTATGGTTGGTCCTTAAGTTAAGGTGA
R3g	GTGACACTGATAGGATGGCCGTTGGTCCTTAAGTTAAGGTGA
F4	AGGGTCTTAGAGAGGGCCTA
R4	<u>TCGCGA</u> GAGACTGTAACAGATAGGGAC
F5	GTTCCCTATAGGGTCCTTTAA
R5	<u>TCGCGA</u> GTGACTTTAGGAGGATACTT
F6	CATAAAAATCTGAGTGACTA
R6	<u>TCGCGA</u> GGTGTGGCTTTAGGATGGA
F7	GGCCATCCTATCAGTGTCAC
R7	<u>TCGCGA</u> AGGTAACACCCAAAGACAAA
F8	CGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTT
R8	GACGTTGTGGCTGTTGTAGTTGTA
F9	ATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTG
R9	TTACTTGTACAGCTCGTCCATGCC

Underline sequences stand for restriction enzyme sites.

处理的 pcDNA3.0-EGFP 真核表达载体相连接, 连接产物导入 *E. coli* BL21 宿主, 挑选转化重组菌培养, 提取质粒酶切鉴定, 将阳性克隆送金斯瑞生物科技公司测序鉴定, 鉴定正确的克隆命名为 pcDNA3.0-EGFP-AS_x。

1.4 携带锚定序列的载体表达能力鉴定

将处于对数生长期的 293T 细胞经胰酶消化后用无抗生素含 10% 胎牛血清 (fetal calf serum, FCS) 的 DMEM 培养液轻轻吹下, 调整细胞密度到 1.0×10^6 个/mL, 每孔 1 mL 细胞悬液接种至 24 孔细胞板, 于二氧化碳培养箱 37 °C 过夜培养。参照 Invitrogen 公司脂质体 2000 操作说明, 将提取的携带锚定序列的真核表达载体 pcDNA3.0-EGFP-AS_x 转染细胞, 共培养 24 h 后荧光显微镜观察, 检测改造后的真核表达载体胞内的表达情况。

1.5 真核表达载体荧光定量 PCR 检测方法的建立

提取 pcDNA3.0-EGFP 质粒载体, 经 Nanodrop 测定质粒的质量浓度, 并依据质粒载体分子量计算载体质量与拷贝数之间的关系, 将 pcDNA3.0-EGFP 质粒载体调到 1、10、100、1 000、10 000、100 000 和 1 000 000 个拷贝/ μ L 浓度。对照 EGFP 基因序列设计引物 F8/R8 (表 1), 取 1 μ L 各梯度的载体稀释液作为模板, 进行荧光 PCR 扩增, 绘制扩增标准曲线, 以建立荧光定量 PCR 方法测定样品中携带锚定序列的真核表达载体拷贝数。

1.6 T7 噬菌体包裹真核表达载体的定性检测

分别培养携带质粒载体 pcDNA3.0-EGFP、pcDNA3.0-EGFP-AS_x 的重组大肠杆菌至 $OD_{600}=1.0$, 以感染复数 (multiplicity of infection, MOI) 为 0.001 的比例接种 T7 噬菌体, 37 °C 摇床振荡培养直至细菌完全裂解。将培养的裂解液分

成 2 等份, 一份添加终浓度为 1 μ g/mL 的 RNase A、DNase I 继续振荡 1 h, 另一份不加酶处理。5 000 r/min、15 min 离心裂解液, 回收上清, 56 °C 灭活 30 min。处理后的裂解液分别做连续 10 倍比稀释, 取 1 μ L 作为模板、F9/R9 为引物 (表 1), PCR 方法检测载体中的 EGFP 基因。

1.7 T7 噬菌体包裹真核表达载体的定量检测

分别培养携带质粒载体 pcDNA3.0-EGFP-AS_x 的 4 个重组大肠杆菌至 $OD_{600}=1.0$, 以 MOI 为 0.001 的比例接种 T7 噬菌体, 37 °C 摇床振荡培养直至细菌完全裂解。将培养的裂解液分成 2 等份, 一份添加终浓度为 1 μ g/mL 的 RNase A、DNase I 继续振荡 1 h, 另一份不加酶处理。5 000 r/min、15 min 离心裂解液, 回收上清, 56 °C 灭活 30 min。处理后的裂解液分别做连续 10 倍比稀释, 取 1 μ L 作为模板、F8/R8 为引物 (表 1), 荧光定量 PCR 方法检测。根据实验步骤 3 中绘制的标准曲线计算样品中真核表达载体的拷贝数, 并用公式: 包裹效率=(核酸酶消化后质粒拷贝数/核酸酶消化前质粒拷贝数) \times 100%, 计算 T7 噬菌体包裹不同锚定序列载体的效率。

1.8 T7 噬菌体转运真核表达载体入胞表达

采用 Inaba 法^[17-18]制备 SPF 鸡骨髓源树突状细胞, 将诱导培养至第 6 天的细胞经胰酶消化后调整细胞密度到 10×10^6 个/mL, 转接 1 mL 至铺有细胞爬片的 24 孔板中, 于二氧化碳培养箱 37 °C 过夜培养。次日, 每孔接种 10^{10} 个 PFU (plaque-forming unit, PFU) 包裹 pcDNA3.0-EGFP-AS2 真核表达载体的 T7 噬菌体 (PEG-NaCl 浓缩纯化^[19]), 孵育 1 h 后更换新鲜的 1640 培养液, 继续培养 36 h。取出细胞爬片, PBS 洗涤 1 次, 用 1% 细胞固定液室温作用 15 min, PBS 洗涤 3 次。在载玻片上加一滴含有 4',6-二脒基-2-苯基吲哚 (4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI) 的封片液, 将爬片细胞面盖向封片液, 激光共聚

焦显微镜(扬州大学检测中心)观察报告基因 *EGFP* 的表达情况。

2 结果与分析

2.1 候选锚定序列的制备

以 T7 select 415 1b 噬菌体基因组为模板, 成功扩增基因组左侧 276 bp 的片段 a、右侧 257 bp 的片段 b 和 391 bp 的片段 c, 如图 2A 所示。由于片段 a 与 b 存在约 160 bp 重复序列, 以二者为模板在 PCR 体系中可以拼接成完整序列, 截选该完整序列中不同区域约 250 bp 片段为目标进行 PCR 扩增, 获得片段 d、e、f 和 g, 如图 2B 所示。通过 SOE-PCR 方法将片段 c 分别与片段 d、e、f 和 g 拼接, 获得 4 个长度约 650 bp 候选锚定序列 AS_x, 如图 2C。锚定序列

的拼接过程如图 1 所示。

2.2 携带锚定序列的真核表达载体构建及鉴定

将候选锚定序列 AS1、AS2、AS3 和 AS4 分别插入 pcDNA3.0-EGFP 载体, 提取 pcDNA3.0-EGFP-AS_x 质粒经 *Bgl* II、*Nru* I 双酶切鉴定, 切出 650 bp 目的条带(图 2D), 测序结果显示锚定序列插入在正确位置, 且基因序列符合预期。将构建正确的重组质粒转染导入 293T 细胞, 载体上携带的 *EGFP* 报告基因能够正确表达, 如图 3 所示, 说明锚定序列的插入不影响表达盒中目的基因的正确表达。

2.3 荧光定量 PCR 方法的建立

使用梯度稀释的标准样品 pcDNA3.0-EGFP ($1 \times 10^0 - 1 \times 10^6$ copies/ μ L)进行检测, 扩增曲线间

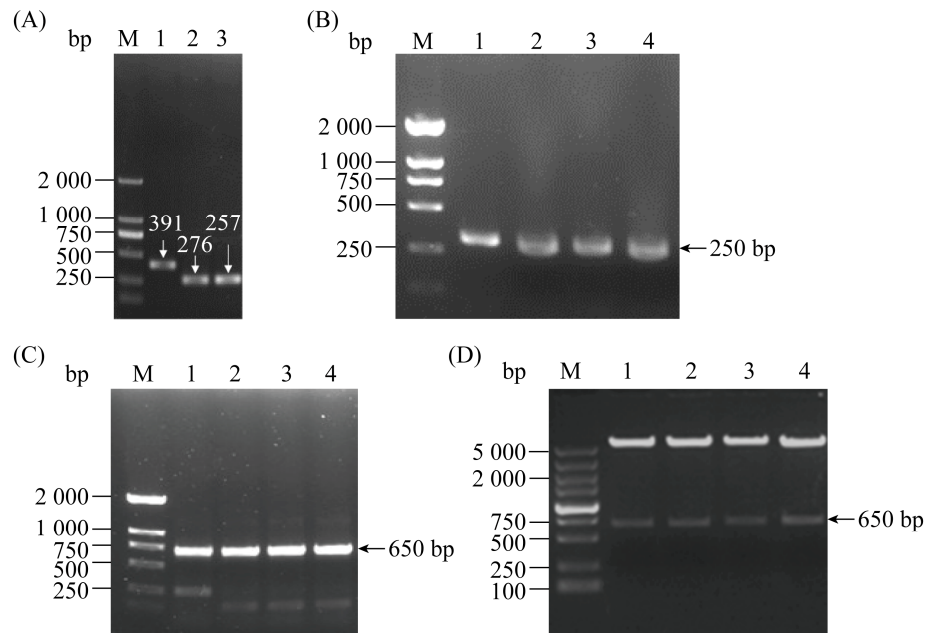


图 2 基因片段扩增及载体构建

Figure 2 Amplification of gene fragments and construction of plasmids. A: the gene fragments amplified from the left and right part of T7 phage genome. M: DL2000 marker; line 1–3: gene fragment c, b and a. B: the gene fragments selectively amplified from a and b fusion template. M: DL2000 marker; line 1–4: gene fragment d, e, f and g. C: candidate anchor sequences amplified by SOE-PCR. M: DL2000 marker; line 1–4: candidate anchor sequence AS1–AS4. D: enzyme digestion of recombinant plasmid. M: DL5000 marker; line 1–4: eukaryotic expression plasmid containing anchor sequence 1–4.

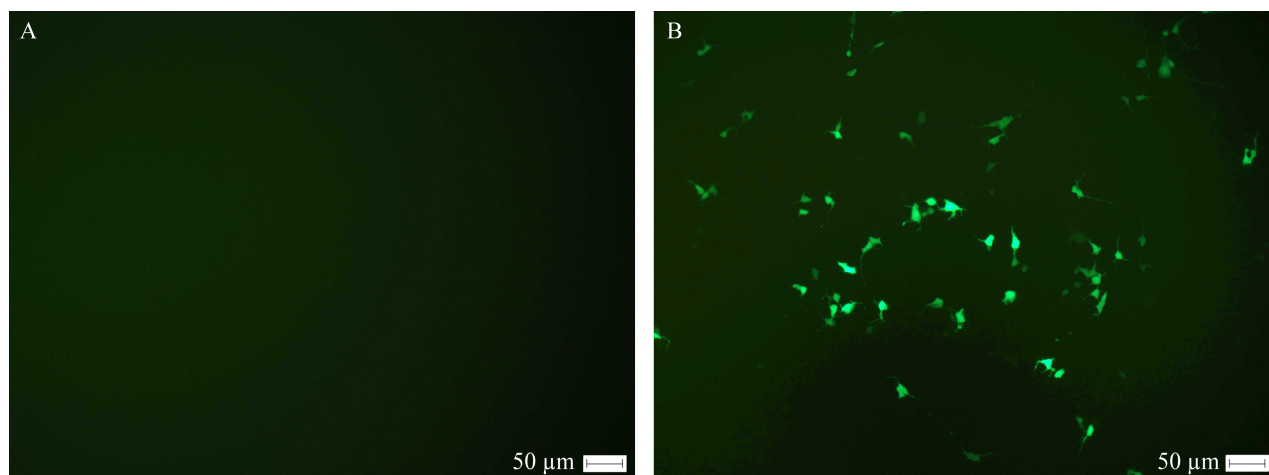


图 3 携带锚定序列的载体表达 EGFP 蛋白

Figure 3 The expression of EGFP by anchor sequence containing plasmid. A: cell control; B: pcDNA3.0-EGFP-ASx.

距均一，平行性好；根据 C_t 值绘制标准曲线，经过计算得到线性方程 $Y = -3.257X + 38.45$ ($R^2 = 0.994$) 线性良好。该方法可用于本研究中真核表达载体的定量检测。

2.4 T7 噬菌体识别锚定序列包裹真核表达载体

携带锚定序列的真核表达载体导入 T7 噬菌体宿主，当 T7 噬菌体侵染该宿主时真核表达载体被包裹在子代噬菌体衣壳内部(图 4D, E)；相反不携带锚定序列的真核表达载体不被噬菌体包裹而游离在裂解体系中(图 4A, B)。用核酸酶处理前后的裂解液作为模板，PCR 检测载体上的报告基因 *EGFP*，受到衣壳包裹、保护的载体不被核酸酶消化，在处理前后均能检测到报告基因(图 4F)，而不被包裹游离的载体被核酸消化，在酶处理后不能检测到报告基因(图 4C)。该结果表明，T7 噬菌体能够识别锚定序列并将携带该序列载体包裹在衣壳内部，且衣壳的包裹对载体起到保护作用而免受核酸的破坏。

用建立的荧光定量 PCR 方法检测 T7 噬菌体包裹 pcDNA3.0-EGFP-ASx 质粒的效率。从

图 5 可以看出，包裹 AS2 锚定序列的效率最高，达到 95%；而包裹 AS3 的效率最低，仅为 23%。

2.5 T7 噬菌体转运真核表达载体入胞表达

包裹 pcDNA3.0-EGFP-AS2 真核表达载体的 T7 噬菌体转与鸡骨髓源树突状细胞共孵育，激光共聚焦显微镜观察到胞内报告基因的表达，如图 6D 所示。不携带锚定序列的 pcDNA3.0-EGFP 载体对照由于不能被 T7 噬菌体包裹、转运，在胞内检测不到 EGFP 蛋白的表达(图 6A)，上述实验结果表明，T7 噬菌体具有转运真核表达载体进入细胞内表达的能力。

3 讨论

真核表达载体是 DNA 疫苗的核心，将抗原基因插入真核表达载体转染细胞，实现抗原的胞内表达，激发机体的免疫应答反应，为无数疫病的预防和治疗提供了一个灵活多样的平台。由于 DNA 疫苗靶向细胞的递送障碍和低免疫原性限制其发展和临床应用，尤其针对大型动物和人类效果往往较差^[2,20]，如何提高 DNA 疫苗效率一直是研究焦点。近年来的研究成果

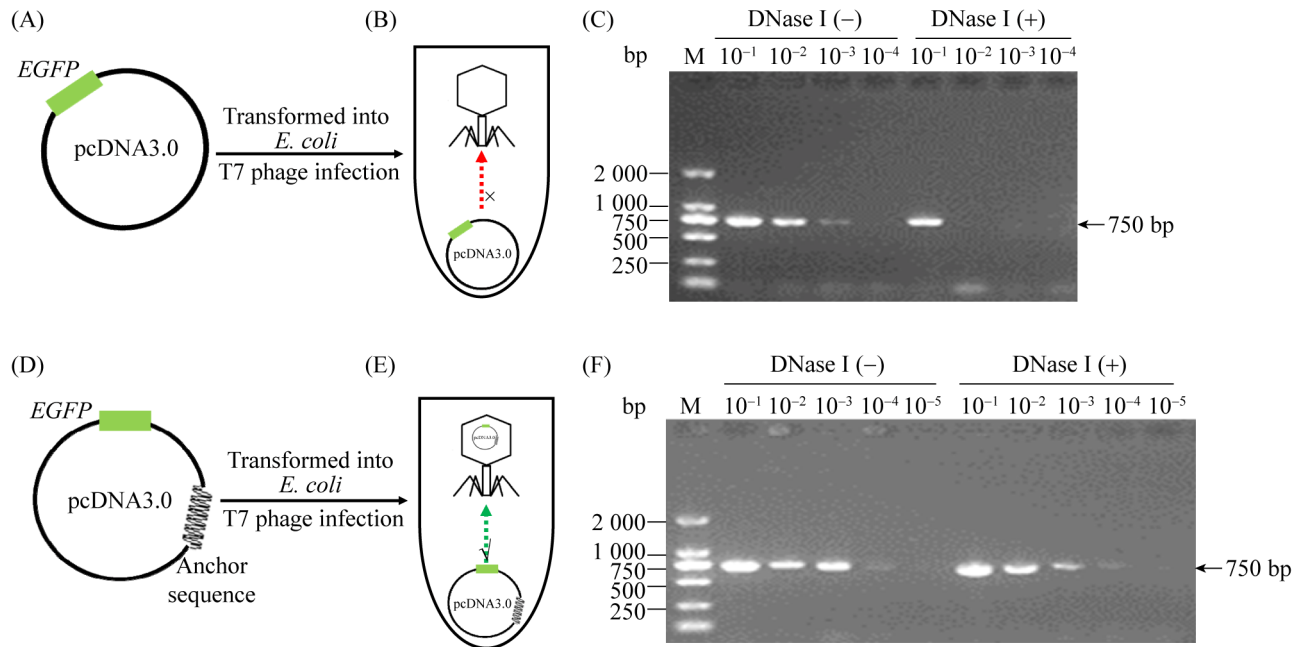


图 4 T7 噬菌体包裹真核表达载体的定性检测

Figure 4 Qualitative detection of T7 phage package eukaryotic expression plasmid. A and B: eukaryotic expression plasmid without anchor sequence insertion cannot be packaged by T7 phage. C: PCR detection of report gene in lysate. M: DL2000 marker; DNase I (-): lysate without nuclease digestion; DNase I (+): lysate digested by nuclease. D and E: T7 phage package eukaryotic expression plasmid which contains anchor sequence. F: PCR detection of report gene in lysate. M: DL2000 marker; DNase I (-): lysate without nuclease digestion; DNase I (+): lysate digested by nuclease.

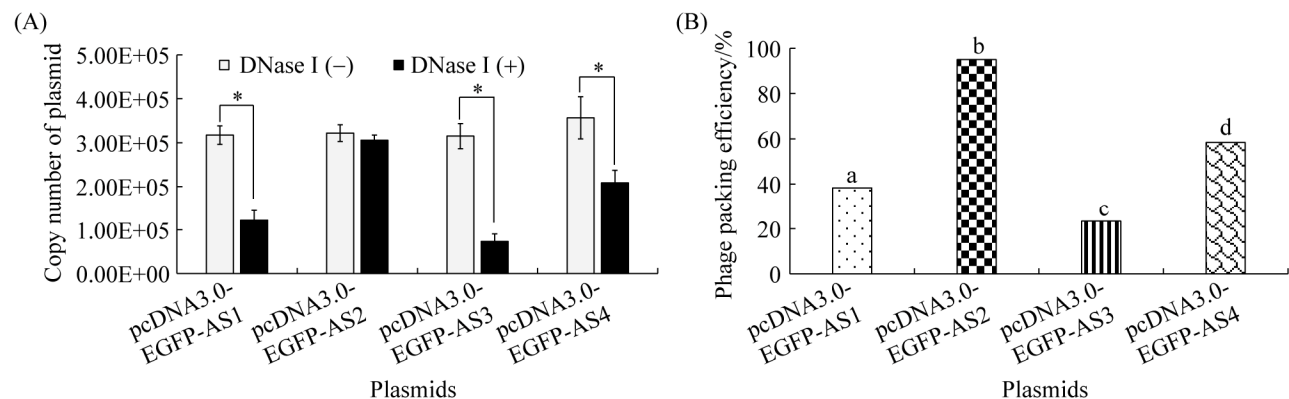


图 5 T7 噬菌体包裹真核表达载体的定量检测

Figure 5 Quantitative detection of T7 phage package eukaryotic expression plasmid. A: real-time PCR detection of eukaryotic expression plasmids contain different anchor sequence which packaged by T7 phage. Bars with a * maker indicate significant difference ($P < 0.05$). B: the efficiency of T7 phage packing eukaryotic expression plasmids contain different anchor sequence. Packing efficiency = (plasmid copy number post-nuclease digestion / plasmid copy number pre-nuclease digestion) $\times 100\%$. Bars with different letters (a, b, c, d) indicate significant difference ($P < 0.05$).

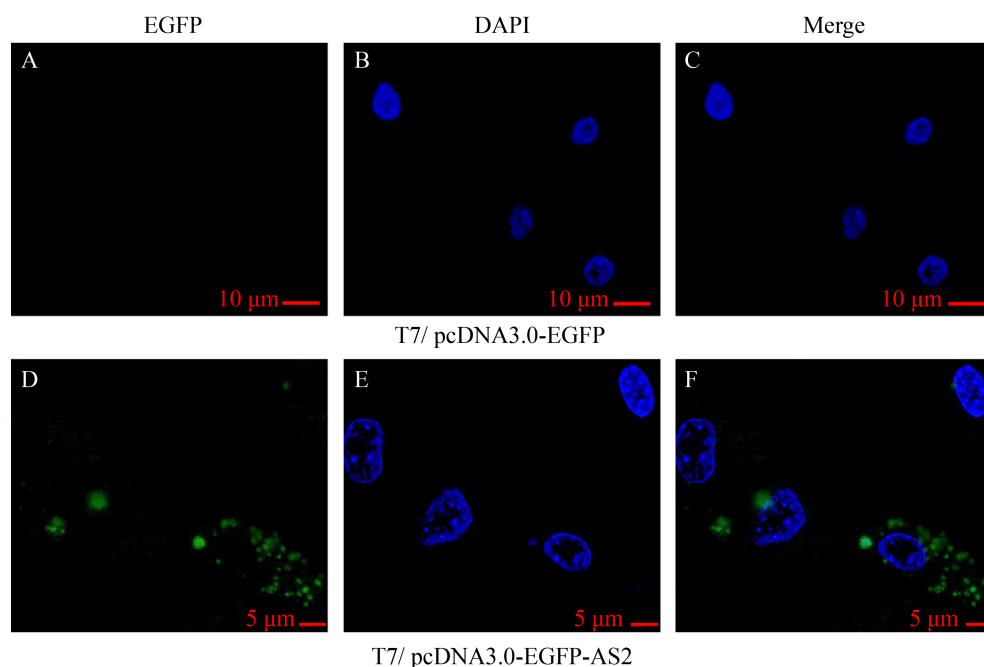


图 6 T7 噬菌体转运真核表达载体入胞表达

Figure 6 Intracellular expression mediated by T7 phage deliver eukaryotic expression plasmid. Eukaryotic expression plasmid containing anchor sequence 2 was packaged by T7 phage, and then incubated with chicken bone marrow dendritic cells. The expression of report gene *EGFP* was detected by laser confocal microscopy (D, E and F). pcDNA3.0-EGFP without anchor sequence was set as a negative control (A, B and C).

显示，通过改进注射方法将真核表达载体直接注入细胞来提高效率，例如电穿孔、基因枪注射^[21-22]等方法；或是采用组织相容性好的材料包裹真核表达防止生物降解，常用的包材有聚乙烯亚胺(polyethylenimine, PEI)、聚乳酸共乙醇酸(poly lactic-co-glycolic acid, PLGA)和脂质体^[23-24]等。此外，病毒样颗粒是由病毒蛋白组成的纳米级生物颗粒，不仅可以递送核酸物质进入细胞，还能有效地诱导先天性和适应性免疫应答^[6]。T7 噬菌体作为侵染大肠杆菌的病毒，同样具有纳米颗粒结构，具备开发成真核表达载体转运工具的潜力。

在前期研究中，我们曾将真核表达盒插入 T7 噬菌体基因组非必需区，拯救携带真核表达盒的重组噬菌体，以此噬菌体颗粒作为转运工具，成功实现了报告基因在真核细胞内的表

达^[12,25]。但是，重组噬菌体的构建操作繁琐、成功率较低，每次更换表达盒中的抗原基因均需要重新拯救噬菌体，不利于该方法的推广应用。本研究中我们基于 T7 噬菌体复制、组装机理，构建插入锚定序列的真核表达载体，噬菌体通过识别锚定序列而将真核表达载体包裹进衣壳。由于可以在质粒载体上进行抗原基因的更换，操作简便、快捷，更具有实用性。该方法可以高效地将真核表达载体包裹在 T7 噬菌体衣壳内部，针对 pcDNA3.0-EGFP-AS2 的包裹效率高达 95% (图 5B)。通过荧光定量检测发现，单个细菌携带约 15 个拷贝的质粒载体，而单个细菌可以释放约 180 个 PFU 的子代噬菌体 (数据未在文中列出)，尽管噬菌体的包裹效率很高(图 5B)，受限于质粒拷贝数较低，平均约 10 个噬菌体才包裹 1 个拷贝的质粒。与基因组

携带真核表达盒介导转运的方式相比, 噬菌体识别锚定序列包裹真核表达载体的能力未能最大化加以利用。

噬菌体作为原核生物的病毒, 自身缺乏相应的配体来识别真核细胞表面受体, 作为转运工具应用时其细胞靶向能力有待进一步提高。本研究中应用的 T7 噬菌体(T7 select 415-1b)购自 Merck 公司, 可用于噬菌体表面展示外源蛋白^[26]。在 T7 噬菌体表面展示真核细胞表面受体的特异性配体分子, 特别是靶向树突细胞、巨噬细胞等抗原递呈细胞的配体分子, 将有助于提高转运效率和免疫原性^[27-28]。本实验制备的鸡骨髓源树突状细胞, 能够在体外捕获与之互作的 T7 噬菌体, 实现真核表达载体进入胞内实现表达。但 T7 噬菌体介导的 EGFP 基因表达强度(图 6D)明显弱于脂质体转染(图 3)。一方面, T7 噬菌体没有靶向真核细胞的能力, 转运效率较低; 另一方面, 树突状细胞为抗原递呈细胞, 胞内表达的 EGFP 蛋白有被加工、切割的可能而导致荧光淬灭。

本研究通过筛选锚定序列, 构建携带锚定序列的真核表达载体, 从定性与定量两个方面评价 T7 噬菌体识别锚定序列和包裹真核表达载体的能力, 并且证明了 T7 噬菌体转运真核表达载体进入树突细胞实现蛋白表达的可行性。尽管现阶段该转运方式效率偏低, 但 T7 噬菌体表面展示能力可进一步加以利用, 通过展示靶向真核细胞的配体分子来弥补不足^[12]。本研究为创新 DNA 疫苗的转运技术做出有益的探索。

参考文献

[1] Wolff JA, Malone RW, Williams P, Chong W, Acsadi G, Jani A, Felgner PL. Direct gene transfer into mouse muscle *in vivo*. *Science*, 1990, 247(4949 Pt 1): 1465-1468.

[2] Li L, Petrovsky N. Molecular mechanisms for

enhanced DNA vaccine immunogenicity. *Expert Review of Vaccines*, 2016, 15(3): 313-329.

[3] Tejeda-Mansir A, García-Rendón A, Guerrero-Germán P. Plasmid-DNA lipid and polymeric nanovaccines: a new strategic in vaccines development. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, 2019, 35(1): 46-68.

[4] Wang WQ, Saeed M, Zhou Y, Yang LL, Wang DG, Yu HJ. Non-viral gene delivery for cancer immunotherapy. *The Journal of Gene Medicine*, 2019, 21(7): e3092.

[5] Franck CO, Fanslau L, Bistrovic Popov A, Tyagi P, Fruk L. Biopolymer-based carriers for DNA vaccine design. *Angewandte Chemie International Edition*, 2021, 60(24): 13225-13243.

[6] P.O. Editors. Retraction: a DNA inducing VLP vaccine designed for HIV and tested in mice. *PLoS One*, 2018, 13(8): e0203635.

[7] Uddin MN, Henry B, Carter KD, Roni MA, Kouzi SS. A novel formulation strategy to deliver combined DNA and VLP based HPV vaccine. *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences*, 2019, 22: 536-547.

[8] Zhai LK, Peabody J, Pang YYS, Schiller J, Chackerian B, Tumban E. A novel candidate HPV vaccine: MS2 phage VLP displaying a tandem HPV L2 peptide offers similar protection in mice to Gardasil-9. *Antiviral Research*, 2017, 147: 116-123.

[9] Iwagami Y, Casulli S, Nagaoka K, Kim M, Carlson RI, Ogawa K, Lebowitz MS, Fuller S, Biswas B, Stewart S, Dong XQ, Ghanbari H, Wands JR. Lambda phage-based vaccine induces antitumor immunity in hepatocellular carcinoma. *Heliyon*, 2017, 3(9): e00407.

[10] Wu P, Yin XY, Liu QQ, Wu WX, Chen CF. Recombinant T7 phage with FMDV AKT-III strain VP₁ protein is a potential FMDV vaccine. *Biotechnology Letters*, 2021, 43(1): 35-41.

[11] Jafari N, Abediankenari S. Phage particles as vaccine delivery vehicles: concepts, applications and prospects. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 2016, 16(18): 8019-8029.

[12] Xu H, Bao X, Wang YW, Xu Y, Deng BH, Lu Y, Hou JB. Engineering T7 bacteriophage as a potential DNA vaccine targeting delivery vector. *Virology Journal*, 2018, 15(1): 49.

[13] Chung YB, Hinkle DC. Bacteriophage T7 DNA packaging: I. Plasmids containing a T7 replication origin and the T7 concatemer junction are packaged into transducing particles during phage infection. *Journal of Molecular Biology*, 1990, 216(4): 911-926.

[14] Serwer P, Watson RH, Hayes SJ. Formation of the right

- before the left mature DNA end during packaging-cleavage of bacteriophage T7 DNA concatemers. *Journal of Molecular Biology*, 1992, 226(2): 311–317.
- [15] Sun M, Louie D, Serwer P. Single-event analysis of the packaging of bacteriophage T7 DNA concatemers *in vitro*. *Biophysical Journal*, 1999, 77(3): 1627–1637.
- [16] Zhao C, Zhao J, Wang W, Fan Y, Ma C, Zhang D, Lv Y. Expression of MLAA34-HSP70 fusion gene constructed by SOE-PCR. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2017, 30: 1125–1127.
- [17] 付佳, 梁金逢, 阴银燕, 杨倩. 鸡骨髓源树突状细胞体外诱导培养及鉴定. *南京农业大学学报*, 2013, 36(2): 110–114.
Fu J, Liang JF, Yin YY, Yang Q. Culture and identification of chicken bone marrow-derived dendritic cells *in vitro*. *Journal of Nanjing Agricultural University*, 2013, 36(2): 110–114. (in Chinese)
- [18] Han P, Hanlon D, Sobolev O, Chaudhury R, Edelson RL. *Ex vivo* dendritic cell generation—a critical comparison of current approaches. *International Review of Cell and Molecular Biology*. Amsterdam: Elsevier, 2019: 251–307.
- [19] Xu H, Bao X, Lu Y, Liu YM, Deng BH, Wang YW, Xu Y, Hou JB. Immunogenicity of T7 bacteriophage nanoparticles displaying G-H loop of foot-and-mouth disease virus (FMDV). *Veterinary Microbiology*, 2017, 205: 46–52.
- [20] Van Drunen Littel-Van Den Hurk S, Gerdtts V, Loehr BI, Pontarollo R, Rankin R, Uwiera R, Babiuk LA. Recent advances in the use of DNA vaccines for the treatment of diseases of farmed animals. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2000, 43(1): 13–28.
- [21] Fry LM, Bastos RG, Stone BC, Williams LB, Knowles DP, Murphy SC. Gene gun DNA immunization of cattle induces humoral and CD4 T-cell-mediated immune responses against the *Theileria parva* polymorphic immunodominant molecule. *Vaccine*, 2019, 37(12): 1546–1553.
- [22] Graham BS, Enama ME, Nason MC, Gordon IJ, Peel SA, Ledgerwood JE, Plummer SA, Mascola JR, Bailer RT, Roederer M, Koup RA, Nabel GJ, Team TVS. DNA vaccine delivered by a needle-free injection device improves potency of priming for antibody and CD8⁺ T-cell responses after rAd5 boost in a randomized clinical trial. *PLoS One*, 2013, 8(4): e59340.
- [23] Lu YX, Wu FP, Duan WH, Mu X, Fang S, Lu NN, Zhou XF, Kong W. Engineering a “PEG-gPEI/DNA nanoparticle-in- PLGA microsphere” hybrid controlled release system to enhance immunogenicity of DNA vaccine. *Materials Science and Engineering: C*, 2020, 106: 110294.
- [24] Lim M, Badruddoza AZM, Firdous J, Azad M, Mannan A, Al-Hilal TA, Cho CS, Islam MA. Engineered nanodelivery systems to improve DNA vaccine technologies. *Pharmaceutics*, 2020, 12(1): 30.
- [25] 徐海, 鲍熹, 王义伟, 卢宇, 许梦薇, 侯继波. 转运真核表达盒的重组 T7 噬菌体构建. *江苏农业学报*, 2015, 31(1): 117–121.
Xu H, Bao X, Wang YW, Lu Y, Xü MW, Hou JB. Construction of recombinant bacteriophage T7 delivering eukaryotic expression box. *Jiangsu Journal of Agricultural Sciences*, 2015, 31(1): 117–121. (in Chinese)
- [26] K.G. Alan Rosenberg, F. William Studier. T7 Select[®] phage display system: a powerful new protein display system based on bacteriophage T7. *InNovations*, 1996, 6: 1–6.
- [27] Wadia J, Eguchi A, Dowdy SF. DNA delivery into mammalian cells using bacteriophage displaying the TAT transduction domain. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2013, 2013(1): pdb.prot072660.
- [28] Eguchi A, Akuta T, Okuyama H, Senda T, Yokoi H, Inokuchi H, Fujita S, Hayakawa T, Takeda K, Hasegawa M, Nakanishi M. Protein transduction domain of HIV-1 Tat protein promotes efficient delivery of DNA into mammalian cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 2001, 276(28): 26204–26210.

(本文责编 张晓丽)