

载体介导的 shRNA 抑制猪瘟病毒在 PK-15 细胞中增殖特性的研究

冶贵生,张彦明*,徐浩

(西北农林科技大学 动物科技学院,杨凌 712100)

摘要: 利用生物学软件分析猪瘟病毒 NS3 基因,设计针对 NS3 基因不同位置的干扰序列,化学合成这些序列,然后退火连接为双链干扰片段,再定向克隆到干扰载体中,将酶切和序列测定鉴定正确的重组载体命名为 pGene-NS3-1、pGene-NS3-2、pGene-NS3-3、pGene-NS3-Negative。重组干扰载体经纯化后转染 PK-15 细胞,并进行 G418 抗性筛选。克隆细胞扩大培养后,接种猪瘟病毒 Shimen 株,收集细胞分别进行实时定量 PCR 和 ELISA 光吸收度分析。Real-time PCR 分析表明,与对照细胞比较,pGene-NS3-1、pGene-NS3-2、pGene-NS3-3 转录产生的 shRNA 分子均在一定程度上沉默了病毒的基因,抑制率约为 63%、46%、49%。ELISA 检测结果表明,转染 pGene-NS3-1、pGene-NS3-2、pGene-NS3-3 重组载体的 PK-15 细胞均在不同程度上抑制了猪瘟病毒粒子的增殖。

关键词: 猪瘟病毒;RNAi;NS3 基因;shRNA;PK-15 细胞

中图分类号:S852.65⁺1

文献标识码:A

文章编号:0366-6964(2007)05-0500-06

Inhibition of CSFV's Propagation in PK-15 Cells by shRNA Expression Vector

YE Gui-sheng,ZHANG Yan-ming*,XU Hao

(College of Animal Science and Technology, Northwest A & F University, Yangling 712100, China)

Abstract: Interference sequences toward different positions of CSFV NS3 gene were designed, these sequences were annealed and cloned into interferece plasmid. Recombinant interfering plasmids were named pGene-NS3-1, pGene-NS3-2, pGene-NS3-3 and pGene-NS3-Negative (negative control) by restriction analyzing and sequencing. These recombinant plasmids were transfected into PK-15 cells and were screened by G418. CSFV were inoculated in cultured cells, transfected by interference plasmid. Collected cells were analyzed by Real-time PCR and ELISA. The results of Real-time PCR indicated that gene were silenced by pGene-NS3-1, pGene-NS3-2 and pGene-NS3-3, and inhibition ratio were 63%, 46%, 49% respectively. The results of ELISA indicated that CSFV's propagation were inhibited in PK-15 cells by pGene-NS3-1, pGene-NS3-2 and pGene-NS3-3 in different extent.

Key words: classical swine fever virus; NS3 gene; RNA interference; small hairpin RNA; PK-15 cells

猪瘟(Classical swine fever, CSF)是由猪瘟病毒(CSFV)引起的猪的一种高度接触性传染病。该病流行广泛,发病率高,危害极大,被 OIE 列为 A 类动物疾病。CSFV 是黄病毒科瘟病毒属成员,基因

组类型为单股正链 RNA,基因组全长约 12.3 kb,含有一个大的开放阅读框(ORF),此 ORF 编码一条由结构蛋白和非结构蛋白组成的 3 898 aa 的多聚蛋白,此多聚蛋白进一步被蛋白酶加工成病毒所需的

收稿日期:2006-07-06

基金项目:国家自然科学基金项目(30270988);西北农林科技大学研究生教育创新计划项目(05Ych019)

作者简介:冶贵生(1977-),男,回族,新疆米泉人,博士,主要从事分子病原学与免疫学研究,E-mail: xjguisheng@163.com

* 通讯作者:张彦明,E-mail: ylzhangym@sohu.com

各种功能蛋白,病毒基因组结构从 5'到 3'依次为 5'-非翻译区、N^{pro}、C、E^{ns} (E0)、E1、E2、P7、NS2-3、NS4A、NS4B、NS5A、NS5B 和 3'-非翻译区,5'-端无帽子结构,3'-端无 poly(A)尾。其中,NS3 非结构蛋白基因在病毒的生命活动中起着重要的作用。

RNA 干扰 (RNA interference, RNAi) 是指由小干扰 RNA 分子 (Small interfering RNA, siRNA) 介导,致使靶 mRNA 分子发生特异性降解,阻断基因正常翻译的过程,这一现象属于转录后基因沉默 (Post-transcriptional gene silencing, PTGS),它是生物体一种古老的防御机制^[1~4]。由 U6 启动子转录的小发卡 RNA (Short hairpin RNA, shRNA) 在细胞内会自动被加工成 siRNA 分子,从而引发靶基因的沉默。RNA 干扰自 1998 年 Fire 等^[5]首次在线虫中发现并证实后,经过几年的不断发展,逐渐显示出其在基因功能研究方面的巨大潜力。

CSFV 正链 RNA 病毒基因组兼具病毒 mRNA 和复制模板的作用,其核酸类型完全符合 RNA 干扰中靶基因的要求。针对 CSFV NS3 基因 3 个不同位置具备转录 shRNA 分子的重组载体,均在一定程度上抑制了猪瘟疫病毒在 PK-15 细胞中的增殖,从而为猪瘟疫的防治以及基因功能的研究提供了新思路、新方法。

1 材料与方法

1.1 毒株、菌株、细胞与载体

猪瘟疫病毒石门株购自中国兽医药品监察所;DH5 α 菌株、PK-15 细胞为本实验室保存。pGene-sil-1 干扰载体 (含 U6 启动子、neo 抗性基因以及 EGFP 荧光报告基因) 购自武汉晶赛生物工程技术有限公司。

1.2 内切酶、转染试剂、质粒纯化试剂以及细胞培养相关试剂

*Bam*H I、*Hind* III 和 *Eco*R I 购自 Promega 公司;LIPOFECTAMINE 2000 试剂为 Invitrogen 产品;Plasmid mini kit 购自 QIAGEN 公司;DMEM 干粉、G418 购自 GIBICO 公司;小牛血清购自四季青公司;猪瘟疫病毒检测采用 IDEXX 公司的 Classical Swine Fever Virus Antigen Test Kit;TRLZOL[®] LS Reagent 购自 GIBCOBRL 公司;实时荧光定量 PCR 试剂盒 (SYBR Green I) 购自宝生物工程 (大连) 有限公司。

1.3 特异性干扰序列的设计和重组载体的构建与

鉴定

根据干扰序列设计原则,利用生物软件设计了靶向猪瘟疫病毒 NS3 基因序列保守区 3 个位置的 shRNA 序列,其结构为正链 (19 nt) — 环 (9 nt) — 负链 (19 nt),序列上游含有 *Bam*H I 酶切位点,下游含有 *Hind* III 酶切位点,负链与转录终止信号之间设计了一个 *Eco*R I 酶切位点,设计完成的靶序列通过与 GenBank 基因库 Blast 比对后,排除此靶序列非特异性的干扰病毒基因组其他功能基因以及宿主细胞基因的可能性。

靶向 NS3 基因 3 个不同位置的 shRNA 干扰序列: pGene-NS3-1-Sense: 5'-GATCCGAGATAGG-GAGGCATAAGATTCAAGAGATCTTATGCCTC-CCTATCTCTTTTTTGAATTCA-3'; pGene-NS3-1-Antisense: 5'-AGCTTGAATTCAAAAAGAG-ATAGGGAGGCATAAGATCTCTTGAATCTTA-TGCCTCCCTATCTCG-3'; pGene-NS3-2-Sense: 5'-GATCCGACTTAGGCTCAGA GTACTTTCAGAG-AAGTACTCTGAGCCTAAGTCTTTTTTGAAT-TCA-3'; pGene-NS3-2-Antisense: 5'-AGCTTGA-ATTCAAAAAGACTTAGGCTCAGAGTACTT-CTCTTGAAAGTACTCTGAGCCTAAGTCG-3'; pGene-NS3-3-Sense: 5'-GATCCGGGTTACAAC-TAACCCTTTTTTGAATTCA-3'; pGene-NS3-3-Antisense: 5'-AGCTTGAATTCAAAAAGGGT-TACAACCTCAGGCTACTCTTGAAGTAGCC-TGAGTTGTAACCCG-3'。与 NS3 基因无关的干扰序列 (阴性对照): pGene-NS3-Negative-Sense: 5'-GATCCGTAGAGAGGAGATCAGGAATTCAA-GAGATTCCTGATCTCCTCTCTACTTTTTTGA-ATTCA-3'; pGene-NS3-Negative-Antisense: 5'-A-GCTTGAATTCAAAAAGTAGAGAGGAGAT-CAGGAATCTCTTGAATTCTGATCTCCTCTC-TACG-3'。

将上述化学合成的序列退火连接为双链片段后,与经 *Bam*H I 与 *Hind* III 双酶切后的 pGenesil-1 载体在 T4 DNA 连接酶的作用下,16 °C 作用 3 h,连接产物转化 DH5 α 感受态细胞,并涂布于 Kan⁺ 的平板中,37 °C 温育 12~15 h。挑取单克隆菌落,37 °C 摇菌 12~16 h,按碱裂解法提取质粒,然后以 *Eco*R I 做单酶切鉴定,阳性质粒送上海生工生物工程技术有限公司测定序列,将测序正确的阳性

克隆分别命名为 pGene-NS3-1、pGene-NS3-2、pGene-NS3-3 以及 pGene-NS3-Negative。

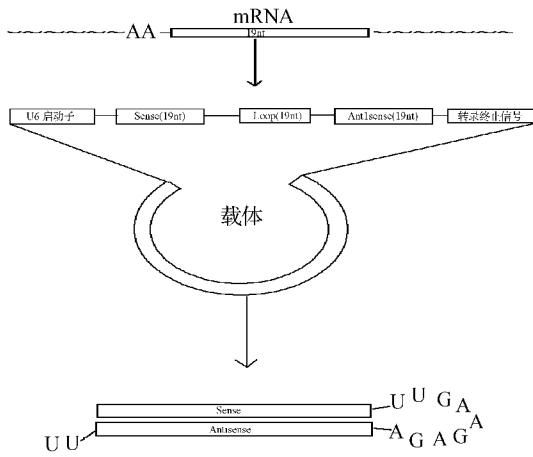


图1 靶向 CSFV NS3 基因 shRNA 分子产生机理
Fig. 1 Scheme of shRNA targeting NS3 gene of CSFV

1.4 PK-15 细胞的复苏与培养

取液氮中冻存的 PK-15 细胞,37 °C 水浴迅速解冻,以含 100 mL/L 小牛血清和青链霉素的 DMEM 培养基,在 37 °C、体积分数为 5% CO₂ 培养箱中培养。

1.5 重组载体转染 PK-15 细胞

转染的前一天,用胰酶消化细胞,传代于 24 孔细胞培养板,在 500 μL 无抗生素培养基中接种 1×10⁵ 个细胞,待细胞汇合度达到 70% 左右,开始转染细胞。在 50 μL 无血清、无抗生素的 DMEM 培养基中稀释 0.8 μg 经 Plasmid mini kit 纯化的 DNA,然后与 50 μL 无血清、无抗生素的 DMEM 稀释的 Lipofectamine™ 2000 转染试剂轻轻混匀,室温保温 20 min。将 DNA 与 Lipofectamine™ 2000 的混合物全量加入到 24 孔板的单孔中,每个样重复 3 孔,并设对照细胞(用于抗性筛选),6 h 后更换成含 10% 小牛血清的 DMEM,在 37 °C、体积分数为 5% CO₂ 培养箱中继续培养。

1.6 阳性克隆细胞的筛选与扩大培养

上述转染后的 PK-15 细胞,培养 48 h 后观察细胞的转染效率,然后进行 G418(600 μg/mL)真核细胞抗性筛选。7 d 左右,转染重组载体的细胞培养孔开始出现稳定的阳性克隆,而此时空白对照细胞全部脱落死亡,然后减半 G418 筛选浓度,继续培养阳性克隆细胞。

1.7 Real-time PCR 以及 ELISA 分析

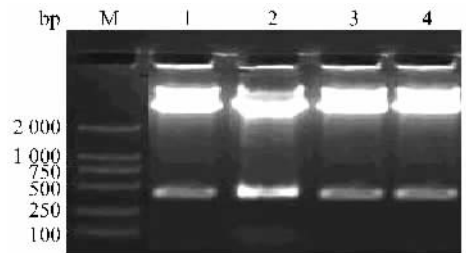
上述扩大培养后的阳性细胞,传代于培养板中,

次日于试验孔中每孔接种 CSFV Shimen 株,37 °C 孵育 1 h,同时设接种病毒的 PK-15 对照细胞,72 h 后收集细胞。分别进行病毒基因的 Real-time PCR 分析(被检测基因为病毒 NS3 基因,上游引物序列:5'-GAATTCACCTGTGTGACAGCATC-3',下游引物序列:5'-TGCCGACTACCCTTCCACTT-3')以及病毒粒子的 ELISA 分析。

2 结果与分析

2.1 重组干扰载体的酶切鉴定

靶向 CSFV NS3 基因 3 个位点的重组质粒用 EcoR I 单酶切,1% 琼脂糖凝胶电泳分析(图 2),在约 400 bp 处出现预期的目的片段,结果表明干扰序列与载体重组成功。鉴定后的阳性质粒经序列测定后,未出现核苷酸的缺失、插入等突变现象。



M. DL2000;1-4. pGene-NS3-1, pGene-NS3-2, pGene-NS3-3 and pGene-NS3-Negative recombinant plasmids
图2 重组干扰载体酶切鉴定结果

Fig. 2 Restricted determination of recombinant plasmids

2.2 阳性克隆细胞的筛选结果

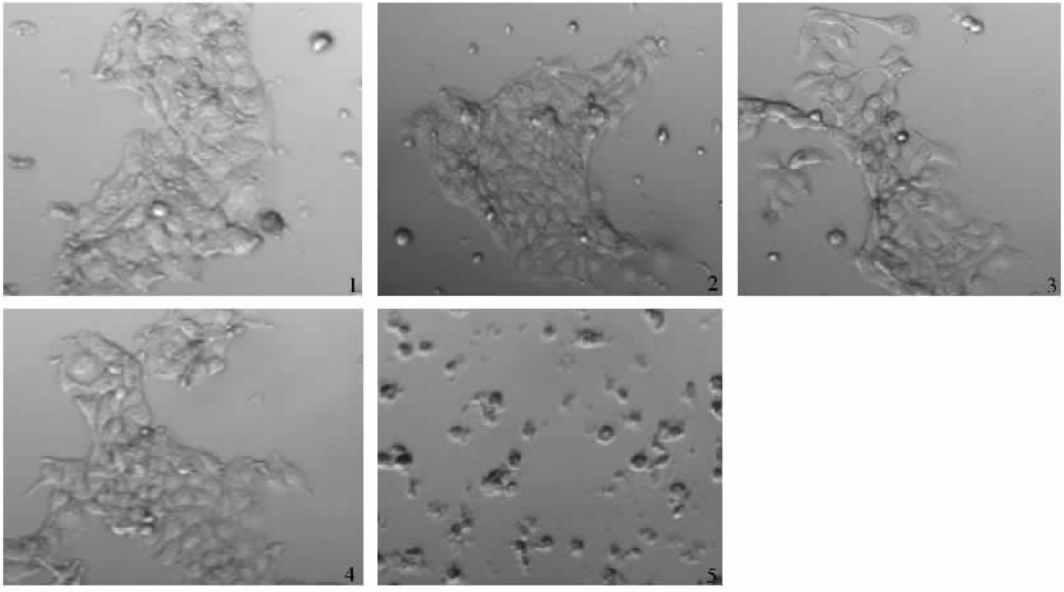
经 G418 抗性筛选的转染细胞与对照细胞(图 3),24 h 以后均逐渐开始出现脱落现象,7 d 以后转染的细胞出现稳定的阳性克隆,而此时对照细胞全部死亡。抗性筛选结果表明,存活的阳性克隆细胞即是后续试验所用的稳定转染细胞。

2.3 扩大培养的阳性克隆细胞

筛选的阳性稳定转染细胞,经扩大培养后,细胞中载体的 EGFP 基因表达稳定,荧光蛋白表达效率高,细胞生长状况良好(图 4)。

2.4 猪瘟病毒基因的实时定量 PCR 分析

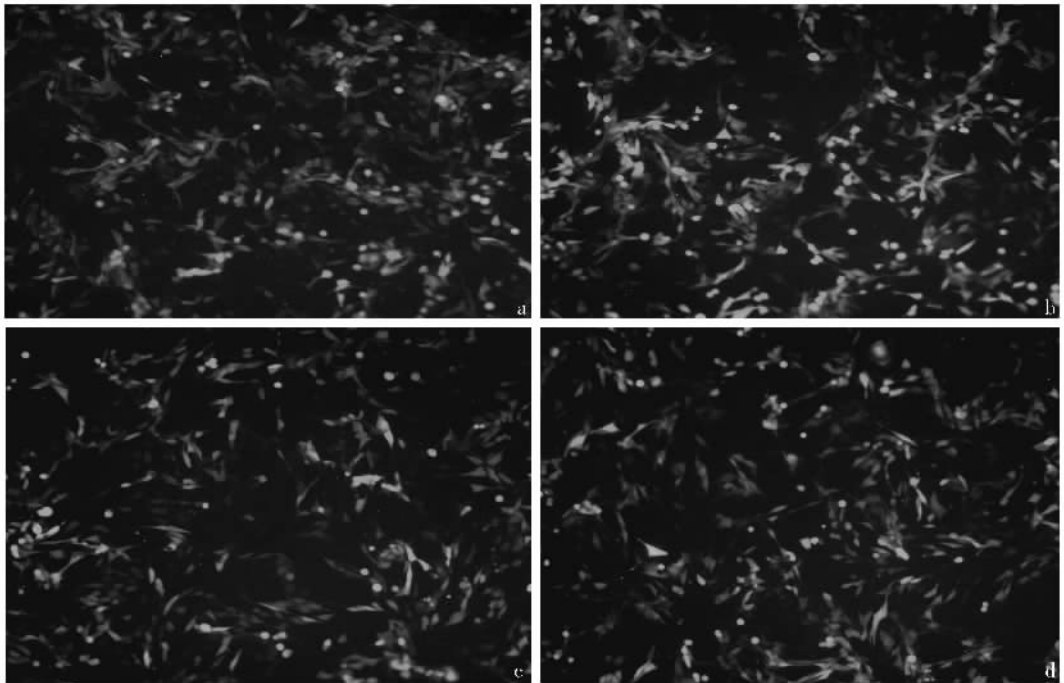
通过 Real-time PCR 分析病毒基因的含量,结果表明,转染 pGene-NS3-1、pGene-NS3-2、pGene-NS3-3 重组载体的稳定细胞株对病毒基因抑制率分别达到 63%、46%、49%,而阴性对照 pGene-NS3-Negative 无明显的抑制作用。



a. pGene-NS3-1; b. pGene-NS3-2; c. pGene-NS3-3; d. pGene-NS3-Negative; e. Blank control cells

图 3 转染重组载体以及空白对照细胞后 G418 抗性筛选结果 (×100)

Fig. 3 G418 screened cells transfected with recombinant plasmids and blank control cells after seven days (×100)



a. pGene-NS3-1; b. pGene-NS3-2; c. pGene-NS3-3; d. pGene-NS3-Negative

图 4 阳性克隆细胞扩大培养后的荧光镜检结果 (×100)

Fig. 4 Fluorescence results of culturing largely clone cells for recombinant plasmids (×100)

表 1 重组干扰载体对 CSFV 基因的抑制效果

Table 1 The inhibition results of recombinant plasmids

空白对照 Blank control	pGene-NS3-Negative	pGene-NS3-1	pGene-NS3-2	pGene-NS3-3	
病毒基因平均拷贝数 /(copies/ μ L)	4.65×10^5	4.64×10^5	1.72×10^5 (63%)	2.51×10^5 (46%)	2.37×10^5 (49%)

括号内为抑制率

Inhibition rate was given in bracket following the data

2.5 猪瘟病毒粒子的 ELISA 检测分析

根据试剂盒说明,为了确保结果分析的可靠性,阳性对照的 OD₄₅₀ 值(吸光度)应大于 0.500,阴性对照的 OD₄₅₀ 值不能大于阳性对照 OD₄₅₀ 值的 20%,本试验的阴阳性对照结果均符合要求。阳性结果的判定:校正 OD₄₅₀ 值应 ≥ 0.300 ,本试验中只有 PK-15 对照细胞以及 pG-NS3-Negative(阴性对照)呈现强阳性,而 pG-NS3-2、pG-NS3-3 样品组略呈阳性,

pG-NS3-1 样品组检测结果表现为可疑。从 ELISA 检测光吸收度来看,pG-NS3-1、pG-NS3-2、pG-NS3-3 样品组明显低于 PK-15 对照细胞以及阴性对照 pG-NS3-Negative,测定结果经重复试验表明数值可靠。因此,ELISA 光吸收度分析结果表明(表 2),靶向 CSFV NS3 基因的 pG-NS3-1、pG-NS3-2、pG-NS3-3 重组载体转录的 shRNA 分子均在一定程度上抑制了猪瘟病毒粒子在 PK-15 细胞中的增殖。

表 2 ELISA 测定结果
Table 2 The results of ELISA

	阳性对照 Positive control	阴性对照 Negative control	接种病毒的 PK-15 对照 Virus infected PK-15 cells	pGene-NS3 -Negative	pGene-NS3-1	pGene-NS3-2	pGene-NS3-3
OD ₄₅₀ 值	1.337	0.116	0.981	0.979	0.380	0.545	0.493
校正 OD 值	1.221		0.865	0.863	0.264	0.429	0.377

3 讨论

RNA 干扰作为一项强大的基于功能的研究工具,已经成功用于沉默 PV^[6]、SARS^[7]、HCV^[8]、FMDV^[9]、HIV^[10,11] 等多种病毒的功能基因。瘟病毒属的 NS3(p80)蛋白是一个胰凝乳蛋白酶样的丝氨酸蛋白酶,瘟病毒 NS3 蛋白具有丝氨酸蛋白酶、NTPase、解螺旋酶活性^[12]。CSFV 与同属的牛病毒性腹泻病毒(BVDV)基因组序列具有高度同源性,BVDV NS3 蛋白的产生一般与病毒的致细胞病变效应(CPE)密切相关^[13]。p80 蛋白通过水解 NTP 获得能量使结合在模板链上的 RNA 或 DNA 解旋下来,在瘟病毒的复制过程中 p80 蛋白使新合成的 RNA 链与模板链分离。因此,瘟病毒 p80 蛋白在病毒的复制及病毒与宿主细胞的相互关系中起着极为重要的作用。基于 NS3 基因在病毒增殖中的作用,所以笔者选择 NS3 基因作为本研究基因沉默的靶基因。

本试验靶序列的转录启动是以载体中的 U6 启动子启动,靶序列转录起始碱基为 G,以连续的“T”作为转录终止信号。为了方便重组干扰载体的鉴定,在设计干扰序列时在转录终止信号与 HindⅢ 酶切位点之间加了一个 EcoRⅠ 的酶切位点,这样可以利用载体自身含有的一个 EcoRⅠ 酶切位点的特点,切出一个含有 U6 启动子和干扰序列约 400 bp 的片段,通过琼脂糖凝胶电泳方便地鉴定重组载体的

重组效果,避免了通过聚丙烯酰胺电泳分析经 BamHⅠ 与 HindⅢ 酶切小片段带来的繁琐步骤。

猪瘟病毒在 PK-15 细胞中增殖时,感染 60 h 时培养液中的病毒滴度达到最高值^[14],加之随着培养时间的延长,细胞所需培养液的营养也逐渐降低,所以本试验在病毒感染细胞 72 h 时适时收集细胞,供 Real-time PCR 分析。猪瘟病毒在 PK-15 细胞中增殖时不引起 CPE 作用^[15],在观察基因沉默作用效果时,无法从细胞形态学方面做出判断。但根据病毒转录水平与蛋白水平的 Real-time PCR 与病毒粒子检测结果可以看出,转染后筛选的在胞内能稳定转录 shRNA 分子的 3 株 PK-15 细胞,对猪瘟病毒的复制与增殖均有一定的抑制效果。RNA 干扰沉默靶基因存在位置效应^[16],pGene-NS3-1、pGene-NS3-2、pGene-NS3-3 重组载体对 CSFV 基因的抑制率分别为 63%、46%、49%,pGene-NS3-1 重组载体的抑制率较高。

参考文献:

- [1] Zamoer P D. RNA interference; listening to the sound of silence [J]. Nat Struct Biol, 2001, 8(9): 746~751.
- [2] Fire A. RNA-triggered gene silencing [J]. Trends Genet, 1999, 15: 358~363.
- [3] Hutvagner G, Zamore P D. RNAi; nature abhors a double-strand [J]. Curr Opin Genet Dev, 2002, 12: 225~232.
- [4] Marx J. Interfering with gene expression [J]. Science, 2000, 88: 1 370~1 372.

- [5] Fire A, Xu S, Montgomery M K, *et al.* Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*[J]. *Nature*, 1998, 391: 806~811.
- [6] Gitlin L, Karelsky S, Andino R. Short interfering RNA confers intracellular antiviral immunity in human cells [J]. *Nature*, 2002, 418: 430~434.
- [7] Wang Z, Ren L, Zhao X, *et al.* Inhibition of severe acute respiratory syndrome virus replication by small interfering RNAs in mammalian cells[J]. *J Virol*, 2004, 78: 7 523~7 527.
- [8] Hilla G, Mali K G, Ludmila R. Small interfering RNA inhibits Hepatitis B virus replication in mice[J]. *Molecular Therapy*, 2003, 8: 769~776.
- [9] Santos T, Wu Q, Sonia A B. Short hairpin RNA targeted to the highly conserved 2B nonstructural protein coding region inhibits replication of multiple serotypes of foot-and-mouth disease virus [J]. *Virology*, 2005, 335: 222~231.
- [10] Cave E, Weinberg M S, Cilliers T, *et al.* Silencing of HIV-1 subtype C primary isolates by expressed small hairpin RNAs targeted to gag[J]. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 2006, 22(5): 401~410.
- [11] Westerhout E M, Vink M, Joost Haasnoot P C, *et al.* A conditionally replicating HIV-based vector that stably expresses an antiviral shRNA against HIV-1 replication[J]. *Mol Ther*, 2006, 14(2): 268~275.
- [12] Wiskerchen M M, Collett M S. Pestivirus gene expression: p80 of the bovine viral diarrhoea virus is a proteinase involved in polyprotein processing [J]. *Virology*, 1991, 184: 341~350.
- [13] Meyers G, Thie H J. Molecular characterization of pestivirus[J]. *Adv Virus Res*, 1996, 47: 53~118.
- [14] 王 镇, 陆 宇, 周鹏程, 等. 猪瘟病毒在 PK 细胞和 MPK 细胞中繁殖过程的研究[J]. *微生物学报*, 1999, 39(3): 189~195.
- [15] 田 宏, 张彦明, 林 彤, 等. 猪瘟病毒及其全长 cDNA 在猪肾细胞中增殖表达特性的比较研究[J]. *畜牧兽医学报*, 2005, 36(10): 1 038~1 042.
- [16] Holen T, Amarzguioui M, Wiiger M T, *et al.* Positional effects of short interfering RNAs targeting the human coagulation trigger tissue factor [J]. *Nucleic Acids Res*, 2002, 30(8): 1 757~1 766.