

靶向狂犬病病毒 N 基因 shRNA 抑制 狂犬病病毒复制的研究

杨瑞梅^{1,2,3}, 杨松涛², 王承宇², 崔燕¹, 夏咸柱^{2*}

(1. 甘肃农业大学动物医学院, 兰州 730070; 2. 军事医学科学院军事兽医研究所, 长春 130062;

3. 青岛农业大学动物科技学院, 青岛 266109)

摘要: 为探讨小干扰 RNA (siRNA) 对狂犬病病毒 (RV) 复制的干扰作用, 以 RV N 基因为靶向目标, 设计合成 4 对编码 siRNA 的 DNA 序列, 然后分别连接到载体 pRNATU6.3-Hygro 上, 转染 BHK 细胞, 在潮霉素-B 抗性压力下筛选出 4 个阳性细胞株 (BHK-N1、BHK-N2、BHK-N3 和 BHK-N4)。用 100TCID₅₀ CVS-11 毒分别感染 24 孔板内的上述细胞, 利用 Real-time RT-PCR、半数细胞培养物感染量 (TCID₅₀)、直接免疫荧光和 Western blot 检测抑制效率。接毒后 48 h, 在 BHK-N1、BHK-N2、BHK-N3、BHK-N4 细胞株中, Real-time RT-PCR 检测到各细胞株均在不同程度上抑制了 RV 的增殖, 其中 BHK-N2、BHK-N1 抑制效率高, 分别为 99%、67.72%, 而 BHK-N3、BHK-N4 仅为 38.59% 和 11.33%, 抑制效果较弱; TCID₅₀ 检测病毒数量比空载体表达细胞毒价分别低 24.96、2.14 和 1.1 倍; 直接免疫荧光检测表明, 4 株细胞中 RV 含量为病毒对照的 31%、1%、54%、82%, 即 BHK-N1、BHK-N2 对病毒的沉默作用较强; Western blot 结果显示 BHK-N1、BHK-N2 细胞株中 RV N 蛋白条带明显减弱。4 种检测结果均表明 BHK-N1 和 BHK-N2 能有效干扰 RV 的复制。本研究在细胞水平筛选出具有高效抑制 RV 复制的 2 个靶位点 N-489 和 N-701, 为 RV 的基因功能研究、抗病毒药物的开发奠定了基础。

关键词: 狂犬病病毒; shRNA; RNA 干扰; 实时荧光定量 PCR

中图分类号: S852.659.5

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2010)03-0315-07

Detection of the Interference to the Replication of Rabies Virus by BHK Cell Strains Transcribing shRNA Targeted to the N Gene

YANG Rui-mei^{1,2,3}, YANG Song-tao², WANG Cheng-yu², CUI Yan¹, XIA Xian-zhu^{2*}

(1. College of Animal Veterinary Medicine, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China; 2. Institute of Military Veterinary, Academy of Military Medical Sciences, Changchun 130062, China; 3. College of Animal Science and Veterinary Medicine, Qingdao Agricultural University, Qingdao 266109, China)

Abstract: In this study, the replication of rabies virus (RV) was inhibited by RNA interference *in vitro* experimentally in order to accumulate essential data of the application of RNAi in the researches of RV genomic function and the post-exposure treatment of rabies. Targeting N gene of RV, four shRNA expression plasmids were designed and constructed based on the vector pRNATU-6.3-Hygro which expresses fusion protein of green fluorescent protein as a report gene. Four cell strains (BHK-N1, BHK-N2, BHK-N3, BHK-N4) expressing the short hairpin RNAs (shRNA) were obtained after the plasmids were transfected into the BHK-21 cell line and screened under the pressure of Hygromycin B (300 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$). These cell strains in a 24-well tissue culture cluster were infected by 100TCID₅₀ rabies virus CVS-11 strain respectively, and 24, 48, 72, 96 h

收稿日期: 2009-09-29

基金项目: 国家“863”计划 (2006AA02Z456); 农业公益性行业项目 (200803014)

作者简介: 杨瑞梅 (1975-), 女, 陕西长安人, 博士生, 主要从事动物病毒病研究, E-mail: yrm.cc@163.com

* 通讯作者: 夏咸柱, E-mail: Xia_xzhu@yahoo.com.cn

later, the virus replication were detected and evaluated by real-time RT-PCR, 50% tissue culture infective dose (TCID₅₀), directed immunofluorescence assay (DFA) and Western blot. At the 48th hour post-infection, the results of the real-time RT-PCR indicated that four strains inhibited RV replication in various degree, in which BHK-N2, BHK-N1 had resulted in a better inhibitory effect (99%, 67.72%) than BHK-N3, BHK-N4 (38.59%, 11.33%). TCID₅₀ analysis showed that the virus titer of the cell strains were reduced by 24, 96.2, 2.14, 1.1 folds respectively compared with that of empty vector control. Inhibition ratios were 31%, 1%, 54%, 82% respectively compared with empty vector control detected by DFA. The Western blot results showed that the RV N protein bands were significantly weakened in BHK-N2, BHK-N1 cell strains. These findings suggested that the levels of replication of RV were dramatically decreased by BHK-N1 and BHK-N2 targeting the regions starting at positions 489 and 701 of rabies virus nucleoprotein gene. This study provided an alternative to block the infection of RV and to research the functions of RV genome.

Key words: rabies virus; short hairpin RNA; RNA interference; real-time PCR

狂犬病是由狂犬病病毒 (Rabies virus, RV) 感染引起的一种病死率极高的人兽共患传染病, 在发达国家主要由野生动物咬伤人后引起人的零星发病, 而在发展中国家, 狂犬病仍是一个重要的社会公共问题^[1]。狂犬病暴露后主要采取伤口紧急处理, 并进行抗血清或免疫球蛋白的应用和疫苗的免疫接种, 这些措施对防治该病很有效, 但是如果未能及时采取这些措施或咬伤部位离颜面部很近, 都有可能造成该病的发生, 而一旦发病目前没有有效方法治疗。

RV 基因组为不分节段的单股负链 RNA, 大小为 12 kb 左右, 共有 N、P、M、G、L 5 种结构基因, 其中 N 蛋白在各病毒株间高度保守, 不同株系 N 蛋白的氨基酸同源性在 98%~99.6%; 现已证实 N 在病毒复制过程中与 RNA 结合成核糖核酸蛋白 (RNP), 保护 RNA 免遭核酸酶的破坏和对病毒 RNA 的免疫应答, 并能维护转录所需要的 RNA 螺旋对称结构^[2-3]。

RNA 干扰 (RNAi) 是近年来发现的短链双股 RNA 可高效阻断其互补 mRNA 转录的现象, 该现象在包括人类在内的大多数物种体内广泛存在^[4], 是研究基因功能、肿瘤治疗、抗病毒感染的新型工具^[5]。目前 RNAi 技术在人免疫缺陷病毒 (HIV)、乙肝病毒 (HBV)、口蹄疫病毒 (FMDV) 等抗病毒感染方面的成功尝试, 为预防和治疗病毒感染提供了新的工具^[6-8]。

本研究拟以狂犬病病毒核蛋白基因 (N) 为靶基因, 设计合成 shRNA 并构建相应表达载体, 建立抗

性细胞系, 在细胞水平评价不同 shRNA 分子对病毒复制的抑制作用, 为应用 RNAi 技术控制 RV 感染奠定基础。

1 材料与amp;方法

1.1 病毒、质粒与细胞株

狂犬病病毒 CVS-11 株购自中国疾病预防控制中心, 毒价为 10^{6.7} TCID₅₀ · mL⁻¹; 乳仓鼠肾细胞系 BHK-21 由本实验室保存, siRNA 表达载体 pRNAT-U6.3 Hygro 购自 GenScript 公司。

1.2 主要试剂和引物

T4 DNA 连接酶、SYBR[®] Premix Ex Taq[™] 购自 TaKaRa 公司; 凝胶回收试剂盒、质粒大提试剂盒均购自 AXYGEM 公司; 脂质体转染试剂盒 Lipofectamine2000 和 DMEM 购自 Invitrogen 公司; 潮霉素 B (Hygromycin-B) 为 Sigma 产品; 胎牛血清为奥地利 PAA 公司产品; 抗 RV 核蛋白单克隆抗体和 FITC 荧光素标记的抗 RV 核蛋白单克隆抗体, 由本实验室制备; β -actin 单克隆抗体、HRP-山羊抗小鼠 IgG 购于武汉博士德公司; 化学发光试剂为 Amersham Biosciences 公司产品。

小鼠管家基因 β actin 引物及其荧光定量标准品由侯小强博士构建。设计并人工合成针对核蛋白基因保守序列的一对引物, N-up: 5'-GCCAAAT-AGGAACATACATCGTC-3'; N-low: 5'-AT-TCAAAGTCAATACTCAGCTGGTC-3', 作为荧光定量 RT-PCR 扩增的引物。

1.3 siRNA 序列的设计及寡核苷酸的合成

以 RV CVS-11 株的 N 基因为靶基因,选择高度保守区,利用 Ambion 在线服务软件 (<http://www.ambion.com/teclib/misc/siRNAfinder.html>) 设计 4 对编码 shRNA DNA 片段,以 ERA 株的 N 基因 ORF 为模板,选 AA 起始,中间无 4 个连续碱基重复,GC 含量在 40%~55%,二级结构无或少

二聚体、发卡结构、引物无错配,然后在 BLAST 比较,与狂犬病病毒的 N 基因序列一致,与库内其它基因无明显同源性靶序列。通过这种方法选定了 4 个序列。在 5'端设计 *Bam*H I 酶切位点,在 3'端设计 *Hind*III 酶切位点。设计的 siRNA 序列见表 1,由 TaKaRa 公司合成。

表 1 设计的 N shRNA 序列

Table 1 N siRNA sequence designed

命名 Name	靶标 Target	GC%	序列 Sequence
N1	489-509	42.9	5'-GATCCACATTGCAGACAGGATAGAttcaagagaTCTATCCTGTCTGCAATGTTTTTTGGAAA-3' 5'-AGCTTTTCCAAAAAACATTGCAGACAGGATAGAtctcttgaaTCTATCCTGTCTGCAATGTG-3'
N2	701-721	42.9	5'-GATCCGACTGTTTCAGGACTGGTATtccaagagaATACCAGTCTGAACAGTCTTTTTTTGGAAA-3' 5'-AGCTTTTCCAAAAAAGACTGTTTCAGGACTGGTATtctcttgaaATACCAGTCTGAACAGTCTG-3'
N3	1 094-1 114	47.6	5'-GATCCCTTCAAGAATACGAGGCGGtccaagagaCCGCTCGTATTCTTGAAGTTTTTTGGAAA-3' 5'-AGCTTTTCCAAAAAACAAAGAAATACGAGGCGGtctcttgaaCCGCTCGTATTCTTGAAGG-3'
N4	1 162-1 182	52.4	5'-GATCCCTCTGACGACGAGGACTACTtccaagagaGTAGTCTCGTCGTCAGAGTTTTTTGGAAA-3' 5'-AGCTTTTCCAAAAACTCTGACGACGAGGACTACTctcttgaaGTAGTCTCGTCGTCAGAGG-3'

1.4 重组质粒的构建与抗性细胞系的建立

1.4.1 重组质粒的构建与鉴定 以去离子水溶解合成的单链 DNA 片段,终浓度 $20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$,针对同一靶序列的 2 个单链,各取 $30 \mu\text{L}$,混合,沸水浴 5 min,缓慢降至室温后, $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ 冻存备用。

载体 pRNATU6.3-Hygro 用 *Bam*H I、*Hind*III 酶切后,胶回收试剂盒回收。将退火后的双链 DNA 片段克隆到酶切后的 pRNATU6.3-Hygro 载体中,转化入大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞中。在氨苄平板上挑取乳白色菌落,获得阳性重组质粒。分别用 *Eco*R I 酶切鉴定质粒 pRNATU6.3-Hygro 和重组质粒,初步鉴定正确后送大连 TaKaRa 生物工程公司测序。

1.4.2 重组质粒的纯化与抗性细胞系的建立

用 Axyen 大提质粒试剂盒提取重组阳性质粒和 pRNATU6.3-Hygro 空质粒,用分光光度计测定核酸纯度与含量,按脂质体 Lipofectamine 2000 说明书转染 24 孔板中培养 20~24 h 的 BHK-21 细胞,即每孔 $1 \mu\text{g}$ 质粒和 $2 \mu\text{L}$ Lipofectamine 2000。转染后 48 h 加 $300 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ Hygromycin-B 筛选,11 d 左右形成细胞克隆,挑取单个克隆在 Hygromycin-B 压力下扩大培养,并按常规方法冻存。

1.5 抗性细胞系中绿色荧光蛋白(GFP)表达的观察

质粒 pRNATU6.3-Hygro 中增强型 CMV 启

动子后为 U6 启动子,启动 shRNA 转录,其后为普通 CMV 启动子表达的 GFP,所以可观察到绿色荧光蛋白,可据此判断质粒是否转入细胞,并且启动了 shRNA 的转录。

1.6 双标准曲线相对定量法检测特异性 siRNA 抑制 RV 复制的效率

1.6.1 标准品的制备 根据 RNA 提取试剂盒说明书,从 ERA 株细胞毒悬液中提取总 RNA,用 oligo dT 和 Primer 反转录成 cDNA,反应体系:模板 $5 \mu\text{L}$, $5 \times \text{RT Buffer}$ $4 \mu\text{L}$, dNTP ($10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) $2 \mu\text{L}$, RNase inhibitor $0.5 \mu\text{L}$, Primer $2.0 \mu\text{L}$, oligo dT $2.0 \mu\text{L}$, AMV 反转录酶 $2 \mu\text{L}$, DEPC 水 $4.5 \mu\text{L}$,于 $42 \text{ }^\circ\text{C}$, 1 h,并用引物 N-up、N-low 扩增一段 198 bp DNA,克隆到 pMD18-T 载体上,转化 DH5 α 大肠杆菌感受态细胞,提取质粒,初步酶切鉴定后,送测序。鉴定正确后,大量提取并纯化阳性质粒,用分光光度计测定纯度和浓度。以此为基础,10 倍递增稀释,作为标准品模板使用。

1.6.2 Real-time RT-PCR 试验 于 100 TCID_{50} 接毒后 24、48、72、96 h 分别取出一培养板,将细胞反复冻融 2 次,将平板上每孔中所有细胞及上清取出。取其中 $300 \mu\text{L}$ 细胞悬液,用 Trizol 提取核酸,用 Primer、oligo dT 反转录获得 cDNA。取 cDNA 产物 $1.0 \mu\text{L}$ 为模板,SYBR[®] Premix Ex Taq[™] 酶进

行 Real-time RT-PCR。同时进行 β -actin 标准品和目的基因标准品扩增,建立双标准曲线。反应结果用公式计算: $F = (\text{样本相对数值} / \text{样本内参照数值}) / (\text{对照相对数值} / \text{对照内参照数值})$, 获得样本相对定量数值。每个样本均进行 3 次重复。

1.7 病毒感染力测定 (TCID₅₀)

于接毒后 48 h 将 24 孔板反复冻融 2 次,将相应孔的细胞及上清一起放入 1.5 mL 无菌离心管中,每孔细胞做 10 倍系列稀释,设 7 个稀释度,每个稀释度设 6 个重复,50 μ L \cdot 孔⁻¹,然后加入 $(3 \sim 5) \times 10^4$ 个 \cdot mL⁻¹ 的 BHK 细胞 100 μ L \cdot 孔⁻¹,48 h 后荧光抗体染色,荧光显微镜下观察各孔荧光灶情况,按 Kärber 法计算 TCID₅₀ \cdot mL⁻¹ (50% cell culture infectious dose)。每个稳定表达 shRNA 的细胞株重复 3 次试验,分别测定各细胞株的 TCID₅₀。

1.8 直接免疫荧光法检测特异性 siRNA 抑制 RV 复制效率

胰酶消化 siRNA 稳定表达细胞株,传入 24 孔板,37 $^{\circ}$ C 5% CO₂ 培养箱培养 20 h,每孔内接入 100TCID₅₀ CVS-11,接毒后 48 h 取出培养板,直接免疫荧光染色后荧光显微镜下观察,200 \times 紫外视野下,每孔随机选取 20 个视野,以数码相机拍照,在 Photoshop 软件辅助下计数有荧光染色的细胞数目,以每孔 20 个视野荧光细胞的平均数作为病毒增殖的定量指标,以待检细胞株与空载体对照细胞株荧光细胞数目的百分比作为 RNA 干扰效果的定量评价指标^[9]。

1.9 Western blot 检测 RV N 蛋白的表达

接毒后 48 h,用预冷的细胞裂解液(50 mmol \cdot L⁻¹ Tris-HCl pH8.0,150 mmol \cdot L⁻¹ NaCl,100 mg \cdot L⁻¹ PMSF,1% NP-40,蛋白酶抑制剂 1 片 \cdot 10 mL⁻¹) 裂解上述细胞。裂解上清经 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)后转膜,以 5 g \cdot L⁻¹ 脱脂奶粉室温封闭 1 h,依次加入鼠抗狂犬病病毒 N 蛋白单克隆抗体(1:100 稀释,37 $^{\circ}$ C 1.5 h),HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG(1:2 000 稀释,37 $^{\circ}$ C 1.5 h),进行免疫印迹检测。抗原抗体复合物用化学发光试剂显色,同时用抗 β -actin 的单克隆抗体检测其表达作为内参照。

1.10 统计学方法

所得数据采用 SPSS13.0 软件分析,数据分别从 3 次重复试验获得,组间比较用 One-way ANOVA 进行方差分析, $P < 0.05$ 为差异显著。

2 结果

2.1 重组干扰载体的鉴定和阳性克隆细胞的筛选

靶向 RV N 基因的 4 个重组质粒用 EcoR I 酶切,0.8% 琼脂糖凝胶电泳分析正确,经序列测定确认无误后,各质粒以 Lipofectamine 介导分别转染 BHK 细胞,经 G418 抗性筛选的转染细胞与对照细胞,11 d 左右形成稳定的阳性克隆,存活的阳性克隆细胞即是后续试验所用的稳定转染细胞。各株细胞分别命名为 BHK-N1、BHK-N2、BHK-N3、BHK-N4 和空质粒对照 BHK-pU6.3。

2.2 扩大培养的阳性克隆细胞的荧光镜检结果

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 1)。

2.3 荧光定量 PCR 试验结果

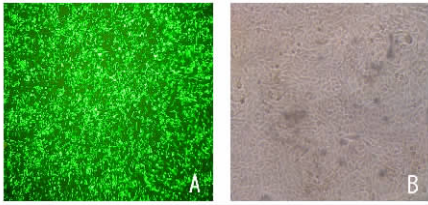
2.3.1 标准曲线的建立 将提取的质粒 RV N-T 载体,分光光度计测定其 OD 值后,按公式计算质粒拷贝数,1:10 递增稀释,做 6 个梯度,得到标准曲线。经 ABI 7000 SDS 分析软件分析其 R² 值达到 0.99,表明检测数据具有很高的相关性。

2.3.2 样品扩增实时检测结果 为了检测 RV N 基因特异 siRNA 干扰病毒效果,样品提取总 RNA 后,反转录后进行荧光定量 PCR,将各细胞株中相应的 mRNA 经 β -actin 校正后,与空载体相比,并计算抑制率(图 2)。结果显示,接毒后 48 h, BHK-N2 抑制病毒效率最高,为 99%;其次为 BHK-N1,抑制效果为 67.72%;BHK-N3 抑制率为 38.59%;BHK-N4 为 11.33%。另外,对稳定表达 shRNA 的 BHK-N1、BHK-N2、BHK-N3、BHK-N4 细胞,接入 100TCID₅₀ 病毒后,24、48、72、96 h 对病毒的抑制效率基本保持不变。

2.4 病毒感染力测定结果

将 100TCID₅₀ 病毒接入稳定表达 shRNA 的 BHK 细胞,48 h 后检测各个细胞株 TCID₅₀,表明 BHK-N1、BHK-N2、BHK-N3、BHK-N4、BHK-pU6.3 的细胞株 TCID₅₀ 平均值分别为 2.39×10^4 、 5.86×10^3 、 2.63×10^5 、 5.11×10^5 、 5.64×10^5 TCID₅₀ \cdot mL⁻¹,比空载体 BHK-pU6.3 表达细胞株毒价分别低 24、96.2、2.14 和 1.1 倍(图 3)。经过单因素方差分析, BHK-N1、BHK-N2 组与空载体表达组之间病毒滴度差异极显著 ($P < 0.01$), BHK-N3、BHK-N4 组与空载体表达组之间病毒滴

度差异显著 ($P < 0.05$), 表明 BHK-N1、BHK-N2、BHK-N3、BHK-N4 细胞株对 RV 复制都能产生抑制作用, 而 BHK-N1、BHK-N2 抑制效果强。



A. BHK 细胞中 GFP 的表达; B. 光学显微镜下细胞
A. GFP stably expressed in BHK cell; B. Cell at light microscope

图 1 阳性克隆细胞扩大培养后的荧光镜检结果 40×

Fig. 1 Fluorescence results of culturing largely clone cells for recombinant plasmids 40×

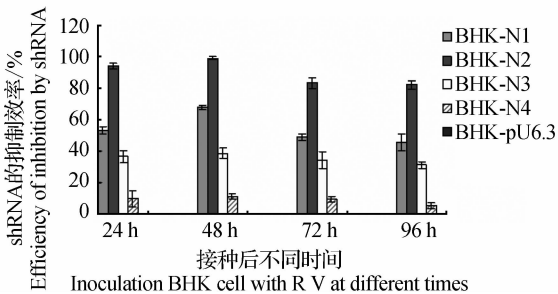
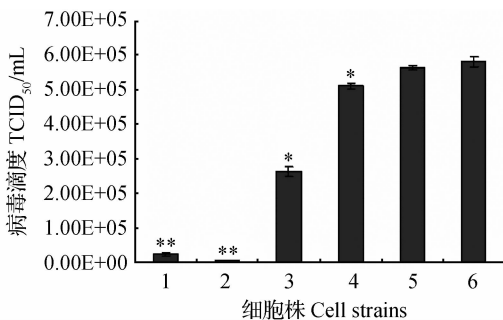


图 2 Real-time RT-PCR 试验结果计算得到的抑制效率

Fig. 2 The efficiency of inhibition based on the results of real-time RT-PCR



与空载体细胞对照组比较, * 表示差异显著 ($P < 0.05$), ** 表示差异极显著 ($P < 0.01$)。1. BHK-N1 细胞株; 2. BHK-N2 细胞株; 3. BHK-N3 细胞株; 4. BHK-N4 细胞株; 5. BHK 空载体细胞株; 6. 病毒对照

*, $P < 0.05$, **, $P < 0.01$, compared with BHK-pU6.3 empty vector control group. 1. BHK-N1 cell strain; 2. BHK-N2 cell strain; 3. BHK-N3 cell strain; 4. BHK-N4 cell strain; 5. BHK-pU6.3 empty vector control; 6. RV infected cell control

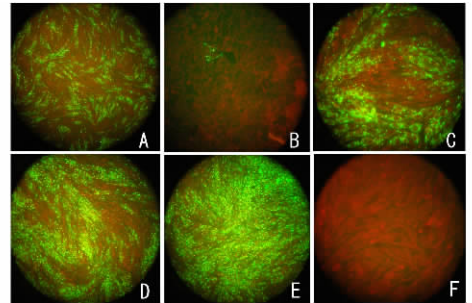
图 3 shRNA 对 BHK 细胞上 RV 毒价的影响

Fig. 3 Inhibition effect of shRNA on the titre of RV on BHK cells

2.5 直接免疫荧光 (DFA) 试验结果

将稳定表达 shRNA 的细胞株传入 24 孔细胞

培养板, 次日接入 100TCID₅₀ 狂犬病病毒 CVS-11 株, 继续培养, 在接毒后 48 h 进行 DFA 检测。结果显示, RV 在 BHK-pU6.3 空载体细胞上感染后, 经荧光抗体染色形成的荧光数目为每视野平均 1 850 个, 约为视野总细胞数的 70%。各稳定转染细胞株每视野荧光细胞数为 BHK-pU6.3 细胞的 1% ~ 82%, 其中病毒增殖水平低的为 BHK-N2 (1%) 和 BHK-N1 (31%); 而 BHK-N3 (54%) 和 BHK-N4 (82%) (图 4) 对病毒的抑制水平较弱。



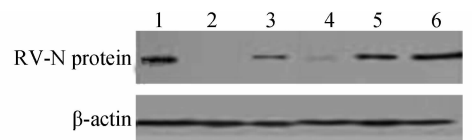
A. BHK-N1; B. BHK-N2; C. BHK-N3; D. BHK-N4; E. BHK-pU6.3; F. 细胞对照

A. BHK-N1; B. BHK-N2; C. BHK-N3; D. BHK-N4; E. BHK-pU6.3; F. Cell control

图 4 直接免疫荧光检测 shRNA 抑制狂犬病病毒复制 40×
Fig. 4 Replication of RV in cell strains stably expressing siRNA (detected by DFA, 40×)

2.6 Western blot 结果

用抗狂犬病病毒 N 蛋白单克隆抗体进行 Western blot 分析, 证明 BHK-N2 和 BHK-N1 细胞株能使 RV N 蛋白明显减少, BHK-N3 使 N 蛋白部分减少, BHK-N4 抑制 RV N 蛋白作用不明显 (图 5)。说明 BHK-N2 和 BHK-N1 抑制病毒作用强, BHK-N3 和 BHK-N4 抑制作用弱, 这与直接免疫荧光和荧光定量 PCR 结果一致。同时检测 β -actin 的表达作为内参照。



1. BHK-pU6.3 空载体对照; 2. 细胞对照; 3. BHK-N1; 4. BHK-N2; 5. BHK-N3; 6. BHK-N4

1. BHK-pU6.3 empty vector control; 2. BHK cells control; 3. BHK-N1; 4. BHK-N2; 5. BHK-N3; 6. BHK-N4

图 5 Western blot 检测 shRNA 对 RV N 蛋白表达的抑制
Fig. 5 Inhibition of RV N protein expression by shRNA expressing cassettes detected by Western blot

3 讨论

RNAi 技术可用于有效抑制特定基因表达,由于 siRNA 分子小、能特异性结合并切割病毒 mRNA、持续作用时间长,因而在抗病毒感染方面展现了巨大潜力,在细胞上和实验动物体内均有 siRNA 有效抑制病毒复制的报道^[10-11],siRNA 也有望成为治疗 RV 早期感染的药物,当有跨血脑屏障物质介导时 siRNA 可能进入中枢神经系统而干扰病毒复制,为狂犬病的中后期治疗带来曙光。

RV 是一种不分节段的负链 RNA 病毒,其基因组 RNA 不能作为模板翻译蛋白质,必须首先合成 mRNA 才能进行蛋白质合成。一般情况下,RV RNA 聚合酶并不识别裸露的 RNA 模板,只能识别被 N 蛋白包装成核衣壳的 RNA。RV N 蛋白在使 RNA 基因组和反基因组衣壳化的过程中起重要作用,因此,可能与转录和复制之间的开启和关闭有关。针对 RV N 基因 mRNA 设计的 RNA 干涉试验,有较大机会获得良好的干涉效果^[12-14]。

目前狂犬病 siRNA 研究已取得了一定进展。张守峰等^[9]针对 RV G、N、L 基因,设计小干扰 RNA,获得 2 个抑制效率高的 siRNA,其中有一个是针对 N 基因 19 位的 siRNA;其次,2007 年巴西 Brandão 等^[15]针对 RV N 基因保守区合成 siRNA,用转染试剂 Lipofectamine 2000 瞬时转染 BHK 细胞,使病毒滴度比对照大约降低了 5 倍。

由于 siRNA 质量及其瞬时转染效果的影响因素过多且难于控制,本试验首先进行了 siRNA 稳定转录细胞系的构建并检测其对 RV 感染的干扰效果,以此筛选有效的 siRNA 序列。仅用一种方法检测病毒含量的变化,结果可能会因为方法本身或操作中不可避免的一些原因产生误差,所以作者根据该病毒特点使用了直接免疫荧光、Real-time PCR、TCID₅₀、Western blot 检测病毒数量、病毒 mRNA 含量和核蛋白的变化,从而全面、准确的确定 RNA 的干扰效果。4 种检测结果一致表明 BHK-N2、BHK-N1 在病毒感染 48 h 后,均显示了较好抑制作用。

本研究针对 RV N 基因,设计 4 对 shRNA,其中 BHK-N2 对病毒抑制效率最高,接毒后 48 h,TCID₅₀ 比对照降低 96.2 倍,显示了较好抑制作用;其次,BHK-N1 比对照降低 24 倍,而 BHK-N3、BHK-N4 对病毒的抑制作用不明显,说明目的 mR-

NA 的靶序列及其所处位置不同,干涉效果往往有极大差异。从接毒后不同时间的检测结果来看,各稳定表达细胞株在接毒后 96 h 内对病毒抑制效果相似,在此时间段内抑制效果没有明显降低。

由于 RV 在细胞上不产生病变,检测细胞上的狂犬病病毒,最常用和国际认可的方法是直接免疫荧光染色,即以 FITC 标记的单抗为一抗染色;由于稳定表达 shRNA 的 BHK 细胞同时表达 GFP,而 GFP 也为绿色,这样就需比较载体表达绿色荧光蛋白与直接免疫荧光抗体染色中荧光染料 FITC 染色效果的不同。首先,有绿色荧光蛋白的细胞,整个细胞都呈绿色,细胞核不可见;而 FITC 染色细胞中,细胞核暗褐色,不发绿光。另外,在预试验中,作者也证明了两者并不互相干扰,对表达大量 GFP 的 BHK 细胞,当用冷 80% 丙酮 4 °C 固定 30 min,进行常规荧光抗体染色,结果只有荧光抗体染色细胞,而无绿色荧光蛋白。推测可能的原因是丙酮作用下,细胞膜孔径增大,细胞膜和细胞质中的 GFP 被 PBS 洗去。所以,对已表达绿色荧光蛋白的 BHK 细胞,仍然可以用直接免疫荧光法进行病毒检测。

综上所述,本试验成功设计和构建了 RV N 基因 siRNA 表达质粒,转染 BHK 细胞,建立了抗性细胞系,通过 Real-time PCR、TCID₅₀、直接免疫荧光和 Western blot 试验筛选出能高效抑制 RV 复制的靶位点,从而为 RV 基因功能研究、抗病毒药物的开发奠定了基础。

参考文献:

- [1] JACKSON A C, WARRELL M J, RUPPRECHT C E, et al. Management of rabies in humans[J]. *Clin Infect Dis*, 2003, 36(1): 60-63.
- [2] 俞永新. 狂犬病和狂犬病疫苗[M]. 第 2 版. 北京: 中国医药科技出版社, 2009: 215-230.
- [3] WUNNER W H, PALLATRONI C, CURTIS P J. Selection of genetic inhibitors of rabies virus[J]. *Arch Virol*, 2004, 149(8): 1653-1662.
- [4] 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(6669): 806-811.
- [5] TUSCHL T, BORKHARDT A. Small interfering RNAs: a revolutionary tool for the analysis of gene function and gene therapy[J]. *Mol Interv*, 2002, 2(3): 158-167.

- [6] QIN X F, AN D S, CHEN I S, et al. Inhibiting HIV-1 infection in human T cells by lentiviral-mediated delivery of small interfering RNA against CCR5 [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100(1): 183-188.
- [7] RADHAKRISHNAN S K, LAYDEN T J, GARTEL A L, et al. RNA interference as a new strategy against viral hepatitis[J]. *Virology*, 2004, 323(2): 173-181.
- [8] ELBASHIR S M, HARBORTH J, LENDECKEL W, et al. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells[J]. *Nature*, 2001, 411(6836): 494-498.
- [9] 张守峰,李清竹,李 忠,等. 细胞水平狂犬病病毒感染的 RNA 干扰[J]. *病毒学报*, 2006, 22(6): 462-465.
- [10] KIM D, ROSSI J. RNAi mechanisms and applications [J]. *Biotechniques*, 2008, 44(5):613-616.
- [11] VAN RIJ R P, ANDINO R. The silent treatment: RNAi as a defense against virus infection in mammals [J]. *Trends Biotechnol*, 2006, 24(4): 186-193.
- [12] 徐葛林,LI K,吴 杰,等. 中国 19 个狂犬病病毒街毒分离株 N 基因的序列分析[J]. *病毒学报*, 2002, 18(1): 48-51.
- [13] TAN F L, YIN J Q. RNAi, a new therapeutic strategy against viral infection[J]. *Cell Res*, 2004, 14(6): 460-466.
- [14] KOUZNETZOFF A, BUCKLE M, TORDO N. Identification of a region of the rabies virus N protein involved in direct binding to the viral RNA[J]. *J Gen Virol*, 1998, 79(Pt 5): 1005-1013.
- [15] BRANDÃO P E, CASTILHO J G, FAHL W, et al. Short-interfering RNAs as antivirals against rabies [J]. *Braz J Infect Dis*, 2007, 11(2):224-225.