

猪 *MyD88* 基因干扰重组慢病毒载体的构建、 病毒包装及效果评价

訾 臣¹, 夏日炜¹, 殷学梅¹, 喻礼怀¹, 朱国强², 吴圣龙^{1*}, 包文斌^{1*}

(1. 扬州大学动物科学与技术学院, 江苏省动物遗传繁育与分子设计重点实验室, 扬州 225009;

2. 扬州大学兽医学院, 扬州 225009)

摘要: 髓性分化因子 88 (*MyD88*) 作为 TLRs/IL-1R 信号通路中重要的接头蛋白, 在免疫应答和疾病防御中起重要作用, 作者拟通过慢病毒介导的 RNA 干扰技术获得 *MyD88* 基因沉默的猪小肠上皮细胞, 为致病菌引起肠道疾病机制研究提供有效模型。共构建 4 个靶向猪 *MyD88* 基因的 shRNA 表达载体和 1 个 *MyD88* 基因高表达载体, 通过实时荧光定量 PCR 方法鉴定瞬时共转染 293 细胞中 *MyD88* 基因转录水平, 筛选获得干扰猪 *MyD88* 基因效率最高的 shRNA 表达载体, 将其包装成慢病毒载体, 用于建立 *MyD88* 基因稳定沉默的猪小肠上皮细胞。最终成功获得 *MyD88* 基因沉默效率达到 69.3% 的小肠上皮细胞, 达到基因功能分析的要求。*MyD88* 基因稳定沉默猪肠上皮细胞的获得, 为猪肠道病原微生物所引起的 TLRs/IL-1R 信号通路作用机制的研究提供了宝贵材料。

关键词: 猪; *MyD88* 基因; 基因沉默; 慢病毒载体

中图分类号: S852.2

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2015)04-0657-08

Construction and Packaging of Recombinant Lentivirus Interference Vector Specific to Porcine *MyD88* Gene and the Evaluation of the Corresponding Lentivirus

ZI Chen¹, XIA Ri-wei¹, YIN Xue-mei¹, YU Li-huai¹, ZHU Guo-qiang², WU Sheng-long^{1*}, BAO Wen-bin^{1*}

(1. *Animal Science and Technology College, Yangzhou University, Key Laboratory for Animal Genetics, Breeding, Reproduction and Molecular Design of Jiangsu Province, Yangzhou 225009, China;*

2. *College of Veterinary Medicine, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China*)

Abstract: Myeloid differentiation factor 88 (*MyD88*), an important adaptor protein in TLRs/IL-1R signaling pathways, plays an important role in immune response and disease prevention. This study intends to obtain pig small intestinal epithelial cells in which *MyD88* gene is silent mediated by lentivirus, as an effective model for analyzing molecular mechanism of intestinal disease caused by pathogenic bacteria. In this study, four plasmid expression vectors were constructed, which coded shRNAs against pig *MyD88* gene, and the over-expression vector coding *MyD88* gene was also constructed. By the method of real-time fluorescent quantitative PCR, the level of *MyD88* gene in the cotransfected 293 cells was detected. The highest efficiency vector was adopted and packaged into lentiviral vector to obtain pig small intestinal epithelial cells with silent *MyD88* gene. The IPEC-J2 cell was obtained in which the *MyD88* mRNA expression was reduced by 69.3%, meeting the requirement for gene function analysis. The obtained pig intestinal epithelial cell with

收稿日期: 2014-07-28

基金项目: 国家自然科学基金 (31172183; 31140027); 转基因生物新品种培育科技重大专项 (2014ZX0800601B); 江苏省科技支撑计划 (BE2012330; BE2013345; BE2014357); 江苏高校优势学科建设工程资助项目 (PAPD)

作者简介: 訾 臣 (1987-), 男, 山东临沂人, 博士生, 主要从事猪抗病育种研究, E-mail: zchandy@163.com

* 通信作者: 包文斌 (1974-), 男, 博士, 研究员, 主要从事猪遗传育种研究, E-mail: wbbao@yzu.edu.cn; 吴圣龙 (1963-), 男, 博士, 研究员, 主要从事猪遗传育种研究, E-mail: slwu@yzu.edu.cn

stable *MyD88* gene silencing provides important material for mechanism research of TLRs/IL-1R signal pathway caused by pathogenic microorganisms in pig intestines.

Key words: pig; *MyD88* gene; gene silencing; lentiviral vector

髓性分化因子 88 (myeloid differentiation protein 88, *MyD88*) 是 TLRs/IL-1R (Toll-like receptors /interleukin-1 receptor) 信号通路中重要的接头蛋白,其本质是一种细胞质的可溶性蛋白质,包含 N 端的死亡结构域 (death domain, DD) 和 C 端的 TIR 结构域 (Toll/interleukin-1 receptor domain)^[1]。其 TIR 结构域与 TLRs 和 IL-1R 的 TIR 结构域结合后激活 IRAK-1/4 (interleukin receptor associated kinase) 和 TRAF-6 (TNF receptor associated factor 6), 最终活化 NF- κ B (nuclear factor kappa B) 从而激发促炎因子和多种细胞介质的释放,并活化淋巴细胞加速炎症反应蛋白的合成^[2-6]。TIR 结构域在 *MyD88* 信号转导中起到关键作用, *MyD88* 通过其 C 端的 TIR 结构域与膜受体的 TIR 结构域作用,向下游传递信号,且 *MyD88* 所参与的不同受体活化信号在下游传递中基本相似。除了 TLR3 之外,TLRs 家族所有成员均可以通过 *MyD88* 依赖途径介导下游信号传导。

猪 *MyD88* 基因位于猪第 13 号染色体,编码 293 个氨基酸的序列,与人相比相似性达到 87%~88%,其在各组织中广泛表达,特别是在免疫组织和肠道组织中高表达^[7-8]。这种表达规律与 *MyD88* 的功能以及 TLRs/IL-1R 信号通路在猪肠道中免疫反应及感染防御中的重要作用有关。种类繁多和数量庞大的肠道微生物与消化食糜及肠道组织共同组成一个复杂环境,病原菌侵入和肠道菌群失衡都可能造成肠道疾病的发生,如产肠毒素大肠杆菌就是在仔猪断奶时引起腹泻和水肿病的主要病原菌。因此对 *MyD88* 基因功能的研究有利于解释其在猪肠道疾病发生及免疫调控中的作用机制,而肠上皮细胞系作为体外水平研究基因功能的有效模型,可用于模拟 *MyD88* 基因在肠道中的免疫调控作用。在国内外相关研究中,尚未见关于靶向猪 *MyD88* 基因的 shRNA 表达载体或者敲除的研究报道。鉴于 *MyD88* 基因在猪肠道抵御病原感染调控中的重要作用,本试验首次通过构建靶向猪 *MyD88* 基因的 shRNA 表达载体,筛选高效的干扰序列并包装成慢病毒载体,以猪肠上皮细胞系 (IPEC-J2) 为素材,获

得稳定沉默 *MyD88* 基因的猪肠上皮细胞,为 *MyD88* 的功能以及 TLRs/IL-1R 信号通路在猪肠道免疫应答和抗病原的作用机制研究提供宝贵的试验材料。

1 材料与方法

1.1 材料

干扰载体 pcDNATM6.2-GW/EmGFP-miR, pMD-18T, pcDNA3.1(+), pDONR 221, pLenti6.3/V5-DEST 载体、载体构建试剂盒 BLOCK-iTTM Pol II miR RNAi Expression Vector Kit with EmGFP、Packaging Mix、T4 DNA 连接酶、高纯度质粒提取试剂盒、脂质体 2000、Trizol 均购自 Invitrogen 公司 (美国); 克隆宿主菌大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5 α 由本实验室保存, IPEC-J2 小肠上皮细胞系由美国宾夕法尼亚大学惠赠; 胎牛血清、DMEM 和 Opti-MEM 培养基均购自 Gibco 公司 (美国); SYBR premix ExTaq 购自 TaKaRa 公司 (中国, 大连)。

1.2 引物设计及序列合成

根据 *MyD88* 基因编码序列 (NM_001099923.1) 设计 4 个针对 *MyD88* 基因的干扰序列, 序列情况见表 1; 设计 *MyD88* 编码区克隆 PCR 引物, 见表 2; 设计实时荧光定量 PCR 引物, 见表 3。

1.3 干扰载体构建

将合成序列的 Oligo DNA 序列通过退火处理, 克隆入 pcDNA6.2-GW/EmGFP 载体。方法如下: 将 5 对 Oligo 各自退火成双链, 正反单链各 5 μ L (100 μ mol \cdot L⁻¹), 退火缓冲液 (10 \times) 2 μ L, 双蒸水 8 μ L, 置于 95 $^{\circ}$ C 加热 5 min, 然后放置室温自然冷却 20 min, 形成双链。4 μ L 双链 DNA (10 nmol \cdot L⁻¹), 2 μ L pcDNA6.2-GW/EmGFP (100 ng \cdot μ L⁻¹), 1 μ L T4 DNA 连接酶 (1 U \cdot μ L⁻¹), 4 μ L 连接缓冲液 (5 \times), 9 μ L 双蒸水, 室温连接处理 30 min。连接产物分别转化感受态细胞 DH5 α , 从含大观霉素固体培养板上挑取多个单克隆提取质粒并进行测序验证。经测序验证序列连接正确后, 抽提高纯度质粒备用。

表 1 shRNA 寡聚单链 DNA 序列

Table 1 The single-strand DNA sequence of shRNAs

| 名称 Name | oligo 序列 (5'-3') Sequence of the oligo (5'-3') |
|---------|---|
| 1F | <i>TGCTG</i> <u>ttcggcagctccttcaatgc</u> <u>GTTTTGGCCACTGACTGAC</u> <i>gcattgaaggactgccgaa</i> |
| 1R | <i>CCTG</i> <u>ttcggcagctccttcaatgc</u> <u>GTCAGTCAGTGGCCAAAAC</u> <i>gcattgaaggactgccgaaC</i> |
| 2F | <i>TGCTG</i> <u>aagggatgctgctatctacag</u> <u>GTTTTGGCCACTGACTGAC</u> <i>ctgtagatcagatccctt</i> |
| 2R | <i>CCTG</i> <u>aagggatgctgctatctacag</u> <u>GTCAGTCAGTGGCCAAAAC</u> <i>ctgtagatagcagatcccttC</i> |
| 3F | <i>TGCTG</i> <u>atctcggtcagacacacataa</u> <u>GTTTTGGCCACTGACTGAC</u> <i>ttatgtgtctgaccgagat</i> |
| 3R | <i>CCTG</i> <u>atctcggtcagacacataa</u> <u>GTCAGTCAGTGGCCAAAAC</u> <i>ttatgtgtgtctgaccgagatC</i> |
| 4F | <i>TGCTG</i> <u>taacaggatcagctgtttct</u> <u>GTTTTGGCCACTGACTGAC</u> <i>gagaacagatccctgtta</i> |
| 4R | <i>CCTG</i> <u>taacaggatcagctgtttct</u> <u>GTCAGTCAGTGGCCAAAAC</u> <i>gagaacagactgatccctgttaC</i> |
| N-F | <i>TGCTG</i> <u>aaatgtactgcgctggagac</u> <u>GTTTTGGCCACTGACTGAC</u> <i>gtctccacgcagtacattt</i> |
| N-R | <i>CCTG</i> <u>aaatgtactgcgctggagac</u> <u>GTCAGTCAGTGGCCAAAAC</u> <i>gtctccacgcagtacatttC</i> |

斜体部分为引入酶切位点,小写字母部分为干扰序列及其互补序列,下划线部分为 loop 序列

The italic is the introduced enzyme loci, the lowercase is the interference sequence and complementary sequence, and underline represents the loop sequence

表 2 *MyD88* 编码区克隆 PCR 引物Table 2 The PCR primers for coding area of *MyD88* gene

| 引物名称 Name of the primer | 引物核苷酸序列 (5'-3') Nucleotide sequence of the primer (5'-3') |
|----------------------------|---|
| <i>MyD88</i> -F | CCATGGCTGCAGGAGGC |
| <i>MyD88</i> -R | GCAGTTCAGGGCAGGGATAG |

表 3 检测 *MyD88* 转录水平的实时荧光定量 PCR 引物Table 3 The Real-time PCR primers for transcription of *MyD88* gene

| 引物名称 Name of the primer | 引物核苷酸序列 (5'-3') Nucleotide sequence of the primer (5'-3') |
|----------------------------|---|
| <i>MyD88</i> -F | GTGCCGTCGGATGGTAGT |
| <i>MyD88</i> -R | CAGTGATGAACCGCAGGAT |
| <i>GAPDH</i> -F | GAAGGTCGAGTCAACGGATT |
| <i>GAPDH</i> -R | CGCTCCTGGAAGATGGTGAT |

1.4 表达载体构建

MyD88 基因克隆入 pMD-18T 载体,测序验证序列正确后用 *Bam*H I / *Eco*R I 各 1 μ L, 5 μ L 10 \times buffer, 5 μ L TA 克隆质粒, 38 μ L 双蒸水, 37 $^{\circ}$ C 酶

切 2 h。pcDNA3.1(+)质粒进行相同酶切处理,琼脂糖凝胶电泳并回收酶切的目的片段。用 T4 DNA 连接酶连接回收的片段与载体, 0.5 μ L T4 DNA 连接酶, 2 μ L 回收片段, 1 μ L 线性载体, 1 μ L 连接缓冲液 (10 \times), 5.5 μ L 双蒸水, 室温连接 2 h。连接产物转化感受态细胞 DH5 α , 从含氨苄青霉素培养板上挑取多个单克隆提取质粒, 并进行测序验证。经测序验证连接序列及方向正确后, 摇菌并抽提高纯度质粒备用。

1.5 细胞转染及干扰效率验证

将干扰载体和高表达载体共转染 HEK293 细胞进行干扰效果评价, 挑选干扰效果最好的载体。六孔板中 DMEM (10% 胎牛血清) 培养 HEK293 细胞覆盖率达 80% 左右时, 进行转染; 用无血清 Opti-MEM 轻洗细胞 2 次, 加入 1.5 mL Opti-MEM; 分别用 250 μ L Opti-MEM 稀释 4 个干扰质粒以及阴性对照质粒各 3 μ g, 轻轻混匀后各加入 1 μ g 高表达质粒载体; 用 250 μ L Opti-MEM 稀释 10 μ L 脂质体 2000 试剂, 轻轻混匀, 室温孵育 5 min; 将两种稀释液轻轻混合, 室温放置 20 min; 将每管 500 μ L 脂质体-质粒复合物慢慢加入到各细胞孔中, 轻轻混匀; 每个处理重复 3 孔。37 $^{\circ}$ C, 5% 的 CO $_2$ 培养箱中培养 6 h 后, 换不含抗生素完全培养液继续培养过夜观察荧光表达情况。

细胞瞬时转染 48 h 后, 提取总 RNA。按照

TaKaRa 试剂盒说明进行实时荧光定量 PCR, 检测细胞中目的基因的干扰情况, 干扰效率为 $1-2^{-\Delta\Delta Ct}$ 。

1.6 慢病毒载体包装及滴度测定

利用 Gateway 重组技术将挑选干扰效果最好的载体重组克隆到慢病毒载体; 并利用 293T 细胞进行慢病毒的包装; 将病毒原液浓缩, 并测定病毒滴度。

Eag I 线性化处理干扰质粒, 纯化收集酶切产物。通过 BP 重组系统将干扰序列重组到 pDONR 221 载体, 继而通过 LR 重组系统将干扰序列重组到 pLenti6.3/V5-DEST 载体中。转化挑取克隆, 测序正确重组质粒克隆命名为 pLenti-MyD88-shRNA, 进行大量菌液培养并抽提质粒。

9 μg Packaging Mix (pLP1, pLP2, pLP/VS-VG) 和 3 μg pLenti-MyD88-shRNA 质粒加入 1.5 mL Opti-MEM, 取 36 μL 脂质体 2000 加入 1.5 mL Opti-MEM, 室温静置 5 min, 轻轻将两者混合, 室温放置 20 min。293T 细胞的 10 cm 培养皿换 5 mL Opti-MEM, 将 3 mL 混合液加入培养皿中。37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 的培养箱中培养, 6 h 后换 DMEM (10% 胎牛血清) 完全培养液。48 h 后收集细胞培养上清, 3 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 去除细胞和碎片, 并用 0.45 μm 的滤器过滤; 将病毒原液在 50 000 g 下超速离心 2 h, 去除上清, 重悬于 opti-MEM 培养液中。

用含 8 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ Polybrene、2% FBS 的 DMEM 培养液, 按 10 倍梯度稀释病毒液, 每梯度各取 100 μL 加入培养有 293T 细胞的 96 孔板, 每梯度 3 个重复孔。24 h 后, 在荧光显微镜下观察各孔中荧光细胞数量, 病毒滴度为各孔中表达荧光的细胞数平均数除以每孔中含有的慢病毒液体积。

1.7 病毒液感染猪小肠上皮细胞

取滴度为 $1 \times 10^8 \text{ TU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 pLenti-MyD88-shRNA 及阴性对照病毒液 10 μL , 分别加入指数生长期 IPEC-J2 细胞 12 孔板中, 24 h 后观察荧光情况, 并于 36 h 收集总 RNA; 检测 MyD88 相对转录情况, 并计算干扰效率。

2 结果

2.1 载体构建

通过对所挑取阳性克隆进行测序验证, 最终获得连接正确的 4 个干扰和 1 个阴性质粒载体, 分别命名为 pcDNA6.2-GW/EmGFP-shRNA-1、pcD-

NA6.2-GW/EmGFP-shRNA-2、pcDNA6.2-GW/EmGFP-shRNA-3、pcDNA6.2-GW/EmGFP-shRNA-4、pcDNA6.2-GW/EmGFP-shRNA-NC, 测序图谱见图 1; 以及 1 个 MyD88 高表达载体, 命名为 pcDNA3.1-MyD88。

2.2 干扰效率验证

通过干扰载体与高表达载体共转染 293 细胞, 实时荧光定量检测 MyD88 基因转录水平, 由图 2 可知, 1 号干扰载体处理的 293 细胞中猪 MyD88 基因相对转录水平为 0.36, 干扰效率为 0.64, 即 pcDNA6.2-GW/EmGFP-shRNA-1 干扰效率最高, 用于慢病毒包装。

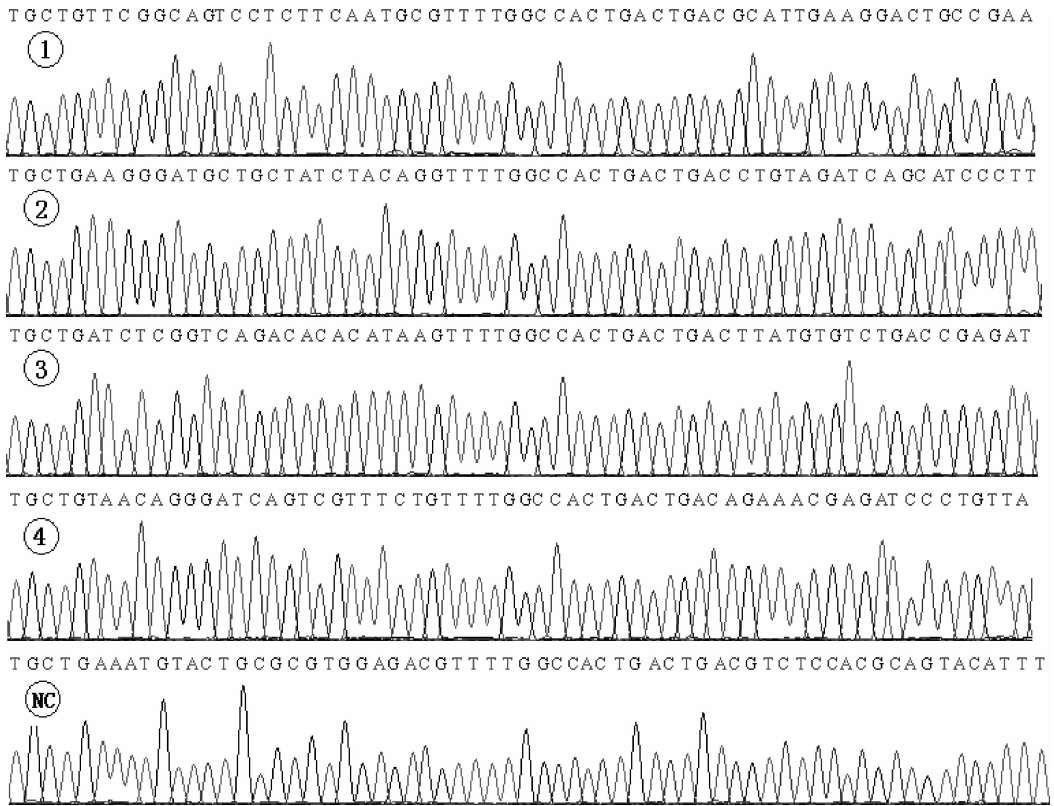
2.3 慢病毒液滴度测定

包装载体和慢病毒载体 pLenti-MyD88-shRNA 共转染 293 细胞, 24 h 后荧光显微镜下观察到绿色荧光, 见图 3P, 说明包装成功, 可用于病毒液收集及浓缩处理。

病毒液梯度稀释后用于病毒滴度检测, pLenti-MyD88-shRNA 病毒颗粒感染细胞 24 h 后各孔的荧光情况见图 3, 图中 A~E 的处理分别加入浓缩病毒液量为 2×10^{-3} 、 2×10^{-4} 、 2×10^{-5} 、 2×10^{-6} 、 $2 \times 10^{-7} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。每个处理孔均可观察到发绿色荧光的细胞, 说明所包装慢病毒颗粒能够实现对细胞的感染; 且每孔发出绿色荧光细胞的数量随病毒液梯度浓度变化呈现倍数差异, 由此能够判断滴度检测的准确性, 并通过 E 处理孔中观察到的少量表达绿色荧光细胞进行病毒滴度 ($\text{TU} \cdot \text{mL}^{-1}$) 的计算, 病毒滴度的计算公式为: 平均每孔荧光细胞个数/病毒液体积。 $(30 + 32 + 37) / 3 / (2 \times 10^{-7}) = 1.65 \times 10^8 \text{ TU} \cdot \text{mL}^{-1}$, 该滴度水平达到了细胞感染的要求。用 Opti-MEM 培养液将慢病毒液稀释至 $1 \times 10^8 \text{ TU} \cdot \text{mL}^{-1}$, 并分装保存于 $-80 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 。

2.4 干扰病毒颗粒对猪小肠上皮细胞 MyD88 表达的干扰效率

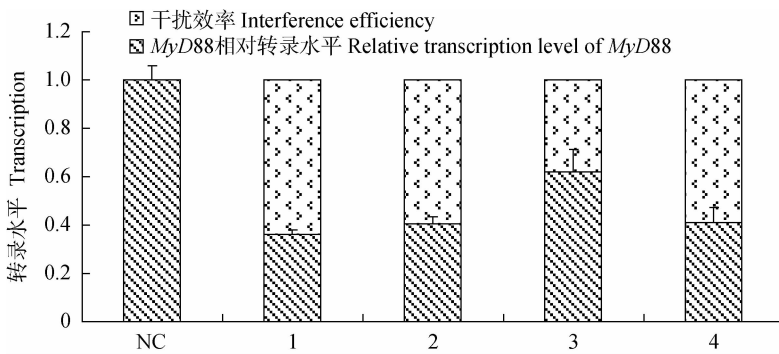
pLenti-MyD88-shRNA 慢病毒颗粒液感染 IPEC-J2 细胞 24 h 后观察荧光效果, 由图 4 可见荧光表达率较高, 能够用于 MyD88 基因表达水平检测和干扰效率的分析。由图 5 可知, pLenti-MyD88-shRNA 病毒颗粒对 IPEC-J2 的 MyD88 基因的干扰效率为 69.3%。与干扰效率筛选结果相近, 可用于 MyD88 基因在肠上皮细胞中免疫相关功能分析。



1~4. pcDNA6. 2-GW/EmGFP-shRNA-1, pcDNA6. 2-GW/EmGFP-shRNA-2, pcDNA6. 2-GW/EmGFP-shRNA-3, pcDNA6. 2-GW/EmGFP-shRNA-4; NC. pcDNA6. 2-GW/EmGFP-shRNA-NC. 下图同
1-4. pcDNA6. 2-GW/EmGFP-shRNA-1, pcDNA6. 2-GW/EmGFP-shRNA-2, pcDNA6. 2-GW/EmGFP-shRNA-3, pcDNA6. 2-GW/EmGFP-shRNA-4; NC. pcDNA6. 2-GW/EmGFP-shRNA-NC. The same as below

图 1 干扰载体测序结果

Fig. 1 The sequencing results of interference vectors



NC 和 1~4 依次为阴性和 4 个干扰质粒载体与高表达载体共转染 293 细胞处理
NC and 1-4, in turn, represent the 293 cells cotransfected by four interference vectors and the negative plasmid vector respectively together with *MyD88* over-expression vector

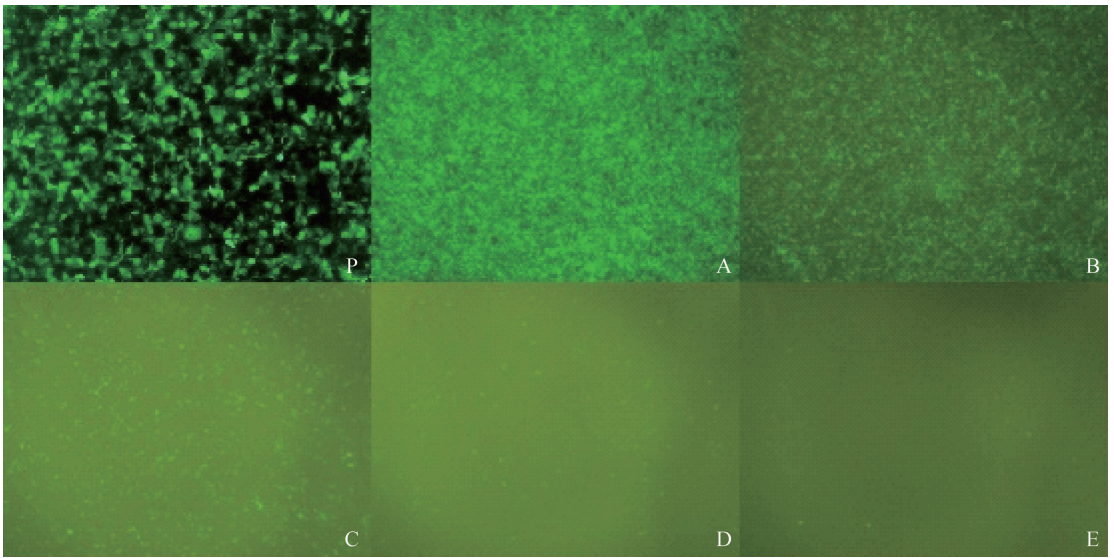
图 2 实时荧光定量检测 *MyD88* 基因 mRNA 转录水平及干扰效率分析

Fig. 2 The mRNA level of *MyD88* gene and the interference efficiency detected by Real-time PCR

3 讨论

MyD88 是作为 TLRs/IL-1R 信号通路中一个

关键接头分子, 激发 NF- κ B 构成炎症反应通路, 在传递炎症信号和增强炎症强度, 引发肠道炎症介质的释放中具有重要的作用^[9]。M. Loiarro 等通过合



P. 病毒包装共转染 24 h 后荧光显微镜拍照(100×); A~E. 加入浓缩病毒液量分别为 2×10^{-3} 、 2×10^{-4} 、 2×10^{-5} 、 2×10^{-6} 、 $2 \times 10^{-7} \cdot \text{mL}^{-1}$ (40×)

P. The photo of lentivirus package by the fluorescence microscope 24 hours after cotransfection (100×); A-E. Disposed respectively with 2×10^{-3} 、 2×10^{-4} 、 2×10^{-5} 、 2×10^{-6} 、 $2 \times 10^{-7} \cdot \text{mL}^{-1}$ concentrated virus (40×)

图 3 病毒包装及病毒滴度检测(24 h)

Fig. 3 The lentivirus package and virus titer testing

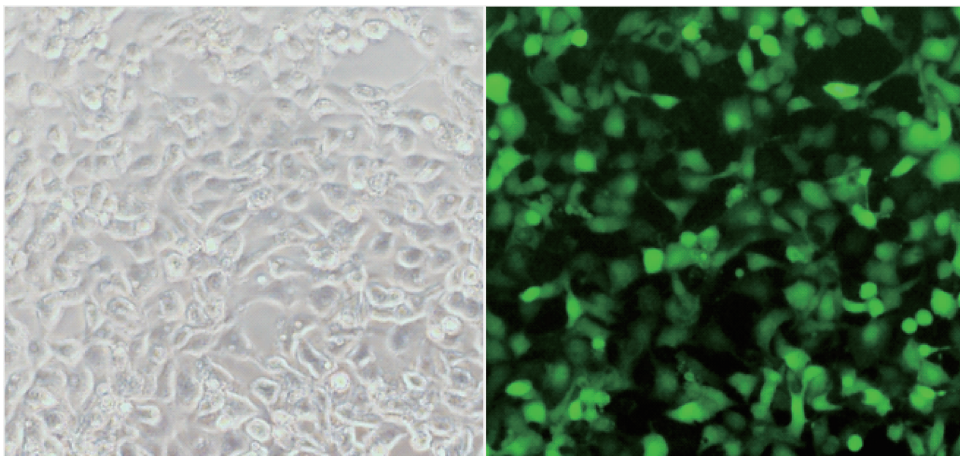


图 4 pLenti-MyD88-shRNA 病毒颗粒侵染 IPEC-J2 细胞 24 h 荧光效果(400×)

Fig. 4 The fluorescent image of IPEC-J2 cell infected by pLenti-MyD88-shRNA virus after 24 hours (400×)

成 MyD88 基因 TIR 结构域的多肽模拟物,成功干扰 MyD88 的二聚体化作用^[10]。肠道致病性大肠杆菌主要通过释放内毒素(LPS)引起肠道疾病的发生,TLR4 是识别 LPS 的主要受体^[11]。TLR4 信号通路主要通过 MyD88 依赖和 MyD88 非依赖途径传导,对于 MyD88 基因的功能分析有助于解释致病性大肠杆菌引起断奶仔猪腹泻和水肿病的分子机制。

研究表明,MyD88 基因缺陷小鼠表现出对 LPS

刺激的抗性,而野生型个体在注射 LPS 后大部分死亡^[12]。果蝇中 MyD88 的过表达能诱导抗菌肽的产生,而在 MyD88 基因突变体中则相反^[13]。有研究表明 MyD88 在 LPS 诱导的 STAT3 磷酸化和 SOCS3 表达过程中起到显著的调控作用,且发现 MyD88 缺陷小鼠可以抵抗 LPS 所引起的食欲不振^[14]。另外,神经方面研究表明 MyD88 缺陷会造成小鼠认知和行为障碍^[15]。

随着分子生物技术的发展,各种基因修饰技术

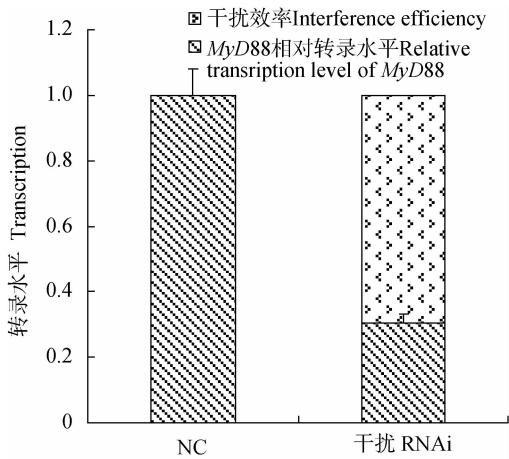


图 5 pLenti-MyD88-shRNA 病毒颗粒对 IPEC-J2 细胞 *MyD88* 基因干扰效果

Fig. 5 The interference efficiency of pLenti-MyD88-shRNA virus inhibiting *MyD88* gene in IPEC-J2 cell

应用于基因功能分析。其中,慢病毒载体法已成熟用于转基因细胞、胚胎和动物个体的制备^[16]。对于 *MyD88* 基因功能的研究方法主要依靠基因敲除技术获得基因缺失型突变个体,分析其在信号通路中作用。基因敲除后,依赖于 *MyD88* 的信号通路被中断,免疫信号传递过程发生改变,虽然能突出目的基因的重要功能,但是不能分析 *MyD88* 表达水平差异所引起的免疫反应变化。而 RNAi 技术(RNA interference)能在一定水平上沉默靶基因的表达,为基因不同表达水平功能分析提供可能,杨浩等通过构建 *GRN* 基因短夹 RNA 慢病毒干扰载体感染猪前体脂肪细胞,结果发现 *GRN* 基因表达的降低能够促进猪前体脂肪细胞分化^[17];同样,程佳等利用慢病毒介导 shRNA 干扰猪 *RBP4* 基因,发现 *RBP4* 基因也起着抑制猪前体脂肪细胞成脂分化的作用^[18]。此外, RNAi 技术还被用于抗病毒以及人类疾病的治疗研究等^[19-20]。周谦君等针对猪 *MyD88* 基因设计并人工合成双链 siRNA 分子,成功干扰猪外周血树突状细胞 *MyD88* 基因的表达^[21],而人工合成 siRNA 作用的局限在于不能实现靶基因的长期稳定沉默,慢病毒载体介导的基因整合则能实现外源 shRNA 高效稳定表达,从而起到稳定沉默靶基因的效果。本研究通过靶向 *MyD88* 基因设计并成功构建了 4 个干扰的 shRNA 表达载体,通过共转染干扰效率筛选试验,发现 4 个干扰载体均能对 *MyD88* 基因起到显著的干扰作用,但针对不同靶点的序列表现出不同的沉默效率,

其中 1 号干扰载体沉默效率最高。同时,成功将其包装成慢病毒,获得了较高滴度的慢病毒液。通过侵染 IPEC-J2 细胞系,沉默效率接近 70%,能成功应用于稳定沉默 *MyD88* 基因小肠上皮细胞系的建立和靶基因功能影响的测定。

鉴于 *MyD88* 在 TLRs/IL-1R 信号通路发挥的重要作用,本研究成功构建包装了慢病毒介导的 *MyD88* 基因干扰载体,得到良好的侵染和干扰效果,并成功获得 *MyD88* 基因稳定沉默的猪肠上皮细胞,为 *MyD88* 及 TLRs/IL-1R 信号通路在猪肠道病原微生物感染所引起的天然免疫分子作用机制研究奠定了基础。

参考文献 (References):

- [1] MUZIO M, POLENTARUTTI N, BOSISIO D, et al. Toll-like receptor family and signalling pathway[J]. *Biochem Soc Trans*, 2000, 28(5): 563-566.
- [2] GHOSH S, KARIN M. Missing pieces in the NF-kappaB puzzle[J]. *Cell*, 2002, 109(Suppl): S81-S96.
- [3] JANSSENS S, BEYAERT R. Functional diversity and regulation of different interleukin-1 receptor-associated kinase (IRAK) family members[J]. *Mol Cell*, 2003, 11(2): 293-302.
- [4] O'NEILL L A. Signal transduction pathways activated by the IL-1 receptor/toll-like receptor superfamily[J]. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2002, 270: 47-61.
- [5] SUZUKI N, SUZUKI S, YEH W C. IRAK-4 as the central TIR signaling mediator in innate immunity[J]. *Trends Immunol*, 2002, 23(10): 503-506.
- [6] SUZUKI N, SUZUKI S, DUNCAN G S, et al. Severe impairment of interleukin-1 and Toll-like receptor signalling in mice lacking IRAK-4[J]. *Nature*, 2002, 416(6882): 750-756.
- [7] LI X, LIU H, YANG S, et al. Characterization analysis and polymorphism detection of the porcine *MyD88* gene[J]. *Genet Mol Biol*, 2009, 32(2): 295-300.
- [8] TOHNO M, SHIMAZU T, ASO H, et al. Molecular cloning and functional characterization of porcine *MyD88* essential for TLR signaling[J]. *Cell Mol Immunol*, 2007, 4(5): 369-376.
- [9] MOSES T, WAGNER L, FLEMING S D. TLR4-mediated Cox-2 expression increases intestinal ischemia/reperfusion-induced damage[J]. *J Leukoc Biol*, 2009, 86(4): 971-980.
- [10] LOIARRO M, CAPOLUNGI F, FANTÒ N, et al. Pivotal advance: Inhibition of *MyD88* dimerization and

- recruitment of IRAK1 and IRAK4 by a novel peptidomimetic compound[J]. *J Leukoc Biol*, 2007, 82(4): 801-810.
- [11] POLTORAK A, HE X, SMIRNOVA I, et al. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice; mutations in Tlr4 gene[J]. *Science*, 1998, 282(5396): 2085-2088.
- [12] KAWAI T, ADACHI O, OGAWA T, et al. Unresponsiveness of MyD88-deficient mice to endotoxin[J]. *Immunity*, 1999, 11(1): 115-122.
- [13] TAUSZIG-DELAMASURE S, BILAK H, CAPOVILLA M, et al. Drosophila MyD88 is required for the response to fungal and Gram-positive bacterial infections[J]. *Nat Immunol*, 2002, 3(1): 91-97.
- [14] YAMAWAKI Y, KIMURA H, HOSOI T, et al. MyD88 plays a key role in LPS-induced Stat3 activation in the hypothalamus[J]. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2010, 298(2): R403-410.
- [15] DROUIN-OUELLET J, LEBEL M, FILALI M, et al. MyD88 deficiency results in both cognitive and motor impairments in mice[J]. *Brain Behav Immun*, 2012, 26(6): 880-885.
- [16] 罗庆苗, 苗向阳, 张瑞杰. 转基因动物新技术研究进展[J]. *遗传*, 2011, 33(5): 449-458.
LUO Q M, MIAO X Y, ZHANG R J. An update on the development of transgenic animal technology[J]. *Hereditas (Beijing)*, 2011, 33(5): 449-458. (in Chinese)
- [17] 杨 浩, 李新建, 程 佳, 等. 慢病毒介导 shRNA 干扰颗粒体蛋白前体 (GRN) 促进猪前体脂肪细胞分化[J]. *农业生物技术学报*, 2012, 20(6): 599-605.
YANG H, LI X J, CHENG J, et al. Lentivirus mediated granulin shRNA interference silencing promotes pig preadipocyte differentiation[J]. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2012, 20(6): 599-605. (in Chinese)
- [18] 程 佳, 蒲 蕾, 杨 浩, 等. 慢病毒介导 shRNA 干扰 RBP4 促进猪前体脂肪细胞成脂分化[J]. *畜牧兽医学报*, 2013, 44(6): 937-943.
CHENG J, PU L, YANG H, et al. Lentivirus mediated shRNA interference silencing RBP4 promoted differentiation of porcine preadipocytes[J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2013, 44(6): 937-943. (in Chinese)
- [19] LAN Y, ZHAO K, HE W, et al. Inhibition of porcine hemagglutinating encephalomyelitis virus replication by short hairpin RNAs targeting of the nucleocapsid gene in a porcine kidney cell line[J]. *J Virol Methods*, 2012, 179(2): 414-418.
- [20] BAVYKIN A S, MISHIN D V, KARPUKHIN A V, et al. The ability of small interfering RNA oligonucleotides to decrease the infective activity of hepatitis C virus in the cell cultures[J]. *Vopr Virusol*, 2012, 57(2): 32-34.
- [21] 周谦君, 范慧敏, 刘中民. MyD88siRNA 诱导猪调节性树突状细胞的实验研究[J]. *中国细胞生物学学报*, 2010, 32(3): 415-421.
ZHOU Q J, FAN H M, LIU Z M. MyD88 knockdown by liposome-mediated RNA interference to porcine monocyte-derived dendritic cell[J]. *Chinese Journal of Cell Biology*, 2010, 32(3): 415-421. (in Chinese)

(编辑 白永平)