

# 慢病毒介导稳定表达抑制 PRRSV 复制的 shRNA 细胞系的建立

吴锦艳, 田宏, 尚佑军, 陈妍, 王光祥, 刘湘涛\*, 张志东\*

(中国农业科学院兰州兽医研究所 家畜疫病病原生物学国家重点实验室 农业部畜禽病毒学重点开放实验室, 兰州 730046)

**摘要:** 利用慢病毒表达技术将稳定持续抑制 PRRSV 复制的 shRNA 导入 Marc-145 细胞, 建立稳定表达靶向抑制 PRRSV 复制的 shRNA 的 Marc-145 阳性细胞克隆, 并从细胞模型水平阐明抑制 PRRSV 复制的关键靶基因的干扰效果。采用 LR 重组技术, 将 pENTR/U6/Nsp9-4、pENTR/U6/Nsp9-6 及 pENTR/U6/-CON 分别与 pDEST 载体进行 LR 重组, 获得表达骨架, 重组后的表达载体在转染试剂介导下与已经优化的辅助质粒 Vira Power™ Packaging Mix 共转染 293-FT 包装细胞, 获得慢病毒样粒子, 并用其感染 Marc-145 细胞, 杀稻瘟菌素抗性筛选获得阳性细胞克隆, 通过 PCR、CPE、TCID<sub>50</sub>、Real-time PCR 和间接免疫荧光试验等方法分别验证上述细胞株的稳定整合以及其表达的 shRNA 对 PRRSV 增殖的抑制效果。结果显示: 优势干扰序列和无关序列被稳定整合在靶细胞基因组上, 无论观察细胞病变效应、免疫荧光产生情况、致细胞半数感染量还是实时定量分析相对表达量, 与正常 Marc-145 和整合有无关序列的两株阴性对照细胞相比, 整合有 NSP9-4 和 NSP9-6 的两株细胞由于表达了靶向抑制 PRRSV 复制的 shRNA, PRRSV 对其易感性降低, 而且差别显著, 分别将其命名为 Marc/pU6/NSP9-4 和 Marc/pU6/NSP9-6。经验证, 本研究成功构建两株稳定表达靶向抑制 PRRSV 复制的 shRNA 细胞——Marc/pU6/NSP9-4、Marc/pU6/NSP9-6, 同时获得一株表达无意义 shRNA 的 Marc/pU6-CON 辅助细胞, 该细胞表达的 shRNA 具有明显抑制 PRRSV 复制的功能, 不仅可以从细胞模型水平阐明抑制 PRRSV 复制的关键靶基因, 也为 PRRSV 感染引起宿主细胞的变化以及对机体的致病机制等研究提供资料。

**关键词:** PRRSV; shRNA; Marc-145 细胞系; 慢病毒表达技术

中图分类号: S852.659.6

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2016)11-2280-08

## Establishment of Cell Lines with Stable Expression of shRNA to Inhibit Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus Proliferation Using the Lentiviral Expression System

WU Jin-yan, TIAN Hong, SHANG You-jun, CHEN Yan, WANG Guang-xiang,  
LIU Xiang-tao\*, ZHANG Zhi-dong\*

(Key Laboratory of Animal Virology of Ministry of Agriculture, State Key Laboratory of Veterinary Biology, Lanzhou Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou 730046, China)

**Abstract:** In the present study, Marc-145 cell lines with stable expression of shRNA were established by lentiviral expression system to inhibit replication of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV), and its interference suppression effect to PRRSV key target genes was clarified from the level of cell model. LR recombination reaction between pENTR/U6/Nsp9-4 (pENTR/U6/Nsp9-6, or pENTR/U6/-CON, respectively) and pDEST were done by using the LR technology to obtain expression skeleton. Expression vector and auxiliary plasmid Vira Pow-

收稿日期: 2016-07-14

基金项目: 农业行业标准制定计划项目(2014-308)

作者简介: 吴锦艳(1975-), 女, 汉, 甘肃静宁人, 助理研究员, 博士, 从事分子病毒学与免疫学研究, E-mail: jingningcaixiong@163.com

\* 通信作者: 刘湘涛, E-mail: hnxiangtao@hotmail.com; 张志东, E-mail: zhangzhdong@caas.cn

er<sup>TM</sup> Packaging Mix were cotransfected into 293-FT cells by Lipofectamine 2000, respectively, to gain Lentiviral supernate and to infect Marc-145 cells. After 48 h, the cells were incubated in standard culture medium including blasticidin ( $3.3 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ), colonies with blasticidin were obtained when cells were cultured in selection medium within 14 d, monoclonal were expanded, passaged, screened to get monoclonal cell lines. The integration of the obtained monoclonal cell lines were identified by PCR, CPE observation and TCID<sub>50</sub> determination, and the inhibition effect of the cell lines with shRNA to PRRSV proliferation were detected by indirect immunofluorescence test and real-time PCR methods. pENTR/U6/Nsp9-4, pENTR/U6/Nsp9-6 and Marc/pU6-CON had been integrated into the chromosome of Marc-145 cells and expressed stably at high level. Results showed that the shRNA expressed by two cells with pEN/U6/Nsp9-4, pEN/U6/Nsp9-6 specifically suppressed PRRSV proliferation, respectively. The infection rates of PRRSV to the negative control and normal cells were higher than those to the recombinant Marc/pU6/NSP9-4 and Marc/pU6/NSP9-6, and the difference was obvious. These results demonstrate that Marc/pU6/NSP9-4 and Marc/pU6/NSP9-6 cell lines can effectively express shRNA to inhibit the replication and proliferation of PRRSV. It helps to clarify the key target genes that suppress PRRSV replication, and is expected to construct transgenic animals based on the siRNA targeted PRRSV.

**Key words:** PRRSV; shRNA; Marc-145 cells; lentiviral expression system

猪繁殖与呼吸综合征 (porcine reproductive and respiratory syndrome, PRRS), 亦称蓝耳病, 由猪繁殖与呼吸综合征病毒 (porcine reproductive and respiratory syndrome virus, PRRSV) 引起, 是一种严重危害养猪业的接触性传染病。RNA 干扰 (RNA interference, RNAi) 是真核生物中的特异核苷酸序列产生的基因沉默现象, 被认为有抑制病毒复制的功能, 能够简单、高效地阻抑特定基因的表达。所以利用 RNAi 技术研究 siRNA 抑制病毒增殖时, 选择病毒基因组保守区域是关键, 众所周知, 选择的干扰靶序列越保守, 抑制各血清型基因复制能力会越强。PRRSV 基因组含有 9 个开放阅读框 (open reading frame, ORF), 分别为 ORF1a、ORF1b、ORF2a、ORF2b、ORF3、ORF4、ORF5、ORF6 和 ORF7。ORF1b 蛋白比较保守, 不编码蛋白水解酶, 借助 ORF1a 编码的蛋白水解酶 Nsp4 将其切割成 4 个成熟的非结构蛋白 Nsp9~Nsp12, 其具备聚合酶、复制酶及其蛋白酶, 是病毒复制所必需的<sup>[1-2]</sup>。Nsp9 为依赖于 RNA 的 RNA 聚合酶 (RNA-dependent RNA polymerase, RdRp), 含有正链 RNA 病毒所特有的 4 个序列<sup>[3]</sup>, 作为催化活性的基元其保守性最高。研究证实 *nsp9* 基因的替换会影响病毒在保守细胞上的生长<sup>[4]</sup>。反向遗传学研究结果显示如果缺失 Nsp9, 病毒的感染性 cDNA 无法包装成完整的病毒粒子。作为 PRRSV 重要的 RdRp, Nsp9 参与

病毒基因组和亚基因组 RNA 的复制及转录<sup>[5-6]</sup>, 而且 Nsp9 通过与宿主蛋白质相互作用参与病毒复制<sup>[7-8]</sup>。NSP9 C 端的 RdRp' 结构域与其聚合酶活性及病毒基因组的转录密切相关<sup>[9]</sup>。最近的研究表明, Nsp9 与 Nsp10 不仅影响我国高致病性 PRRSV (HP-PRRSV) 在体内外的复制和增殖, 而且与病毒的毒力密切相关<sup>[5]</sup>。也有报道显示, Nsp9 与宿主蛋白内 annexin A2 的相互作用有利于 PRRSV 在 Marc-145 中的复制<sup>[7]</sup>。赵双成<sup>[10]</sup>采用免疫共沉淀 (Co-IP) 技术证实 Nsp9 C 端的 RdRp 结构域与解旋酶蛋白 DDX5N 端的 DEXDc 与 HELICc 结构域存在相互作用, 激光共聚焦分析显示, 在 Nsp9 和 DDX5 真核表达质粒转染的情况下, 两者主要共定位于细胞质及细胞核的周围; 而 PRRSV 感染能诱导 DDX5 从细胞核转移到细胞质, 并与 Nsp9 共定位。可见, Nsp9 是 PRRSV 编码蛋白质中影响病毒复制和致病性最重要的非结构蛋白之一。由此推断, 以 PRRSV NSP9 作为靶标, 应用 RNAi 技术研究针对 NSP9 的干扰效果具有现实意义。

近几年应用 RNAi 技术研究 PRRS 方面也取得了可喜成绩。曹素芳等针对 PRRSV 核衣壳蛋白 (N 基因编码) 设计了 3 对 siRNA 靶序列, 将此克隆到真核表达载体, 经过相应鉴定后, 筛选到有效的干扰序列, 特异性地抑制阻断了 PRRSV 核衣壳蛋白 N 基因的表达, 为 PRRSV 新型防治技术研究奠定

了基础<sup>[11]</sup>。贺云霞<sup>[12]</sup>针对 PRRSV 较保守的 N 蛋白选取 4 个 siRNA 序列,通过一步 PCR 法制备 shRNA 表达盒,转染 293T 细胞后,发现 shRNA179-PCR 抑制 PRRSV 增殖效果明显。宋德武等<sup>[13]</sup>针对猪繁殖与呼吸综合征病毒 GP5 基因设计了 3 个 RNAi,构建 shRNA 表达质粒,瞬时转染 Marc-145 细胞,攻毒后,经过一系列试验验证,构建的干扰质粒可以高效抑制 PRRSV 在 Marc-145 细胞中的复制。可以看出,第一,上述针对的都是结构蛋白,结构蛋白是构成一个形态成熟的病毒颗粒所必需的蛋白质;而非结构蛋白特别是参与病毒复制或基因表达调控的酶,对病毒复制是必需的,只有在这些酶系统的参与下,病毒才具备复制和增殖的功能。第二,都停留在验证干扰效果阶段,仅仅筛选到具有抑制 PRRSV 复制效果的 shRNA,并没有建立真正具有稳定抑制 PRRSV 复制的细胞系。

经过前期设计、构建、瞬时转染,最终筛选到了 2 个干扰效果比较理想的靶序列 pENTR/U6-shRNA<sup>[14-15]</sup>,作者借助慢病毒表达系统构建 shRNA 干扰表达载体,经 LR 重组后,与辅助质粒共转染 293-FT 细胞,再将其包装成为成熟的缺陷型慢病毒颗粒后感染至 Marc-145 细胞中,将其整合到 Marc-145 细胞基因组染色体上,建立靶向抑制 PRRSV 复制的表达 shRNA 的阳性细胞株。该细胞株的建立将有助于阐明抑制 PRRSV 复制的关键靶基因,对病原体感染宿主的功能性进行定位,为动物抗病育种提供新思路。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

质粒提取试剂盒购自 Omega 公司;DMEM-F12、OPTI-MEM 购自 Sigma 公司;胎牛血清购自杭州四季青生物公司;新生牛血清购自 PAA;LR Clonase Enzyme Mix、ViraPower<sup>TM</sup> Packaging Mix、Blasticidin、感受态细胞 One Shot Stbl3、Gateway LR Clonase II Enzyme Mix、pLenti6/BLOCK-iT<sup>TM</sup>-DEST Gateway Vector Kit 均购自 Invitrogen 公司;MX3005P 购自 Agilent;T4 DNA Ligase、One Step PrimerScript<sup>TM</sup> RT-PCR Kit 购自 TaKaRa 公司;pENTR/U6/Nsp9-4、pENTR/U6/Nsp9-6、pENTR/U6/-CON、293-FT(人胚肾)细胞、Marc-145 细胞由中国农业科学院兰州兽医研究所病毒病研究室保存。

### 1.2 慢病毒介导 shRNA 表达载体 pEX/U6-shRNA 的构建及其鉴定

参照 Gateway LR Clonase II Enzyme Mix 使用说明,分别将 pENTR/U6/Nsp9-4、pENTR/U6/Nsp9-6 和 pENTR/U6/-CON 与 pLenti6/Dest Gateway Vector 载体于 25 °C 进行 LR 重组反应,1.5 h 后加 1  $\mu$ L 蛋白酶 K 终止。依据 Invitrogen 公司 One Shot Stbl3 转化步骤,将 LR 重组后的产物全量转化感受态细胞 Stbl3,随机挑取单菌落,质粒提取试剂盒小量提取质粒,首先 PCR 扩增鉴定,然后将阳性质粒随机送生物公司测序,两种方法均鉴定合适的质粒即为构建的阳性质粒,分别命名为 pEX/U6/Nsp9-4、pEX/U6/Nsp9-6 和 pEX/U6/-CON。

### 1.3 pEX/U6/Nsp9-4 和 pEX/U6/Nsp9-6 慢病毒的包装

以  $5 \times 10^5$  的浓度将包装细胞 293-FT 接种于 6 孔细胞培养板中。待细胞密度达到 60%~80%时,利用 Lipfection 2000 将 pEX/U6/Nsp9-4、pEX/U6/Nsp9-6 和 pEX/U6/-CON 分别与已经优化的 Vira Power<sup>TM</sup> Packaging Mix 包装混合物共同转染 293-FT 细胞,转染后 8~10 h 吸出培养液,加入 3 mL 完全培养液,培养 48~72 h 后,收集包装细胞的培养液,用 0.22  $\mu$ m 的醋酸纤维素膜过滤。上清液即为慢病毒样粒子,置超低温冰箱备用。

### 1.4 Blasticidin 对 Marc-145 细胞致死浓度的检测

将 Marc-145 细胞按一定比例接种于 24 孔细胞板,48 h 后,将 blasticidin 杀稻瘟菌素用细胞完全培养基从 0.5~10  $\mu$ g  $\cdot$  mL<sup>-1</sup> 依次递增稀释,用稀释后的含杀稻瘟菌素培养基按梯度给 24 孔细胞培养板换液,置 37 °C CO<sub>2</sub> 培养箱,连续培养 2 周,期间可以更换抗性溶液,2 周后 Marc-145 细胞全部死亡对应 blasticidin 的最低浓度为 Marc-145 致死剂量。

### 1.5 转基因阳性细胞克隆的筛选

选取生长良好的 Marc-145 细胞,分别加入收获的 pEX/U6/Nsp9-4、pEX/U6/Nsp9-6 和 pEX/U6/-CON 慢病毒上清,置 37 °C,50 mL  $\cdot$  L<sup>-1</sup> CO<sub>2</sub> 温箱孵育,期间每 30 min 摇 1 次培养瓶,持续吸附 2 h,同时设阴性对照。吸弃感染液,加入上述已确定致死 Marc-145 细胞死亡最低 blasticidin 浓度的 DMEM 完全营养液,期间继续更换抗性营养液,大约 2 周后,细胞瓶内出现细胞克隆岛,扩大培养后,继续抗性筛选,直至找到干扰效率较高的阳性克隆,

然后扩大培养并且传代建立稳定细胞系,将本研究建立的稳定细胞系分别命名为 Marc/pU6/Nsp9-4、Marc/pU6/Nsp9-6 及 Marc/pU6-CON。

## 1.6 稳定整合鉴定

为了鉴定 shRNA 载体是否稳定整合入 Marc-145 细胞基因组,取抗性筛选后扩大培养的细胞各 1 瓶(25 m<sup>2</sup>),弃培养液,1 mL 胰酶消化后,弃掉,轻拍细胞瓶,1 mL PBS 收集整合后 Marc-145,4 000 r·min<sup>-1</sup>,离心 5 min,细胞用 400 μL PBS 重悬,方法参照试剂盒说明书,用基因组 DNA 提取试剂盒提取 Marc/pU6/Nsp9-4、Marc/pU6/Nsp9-6 及 Marc/pU6-CON 细胞基因组 DNA,分别用上游引物 U6 启动子、下游引物慢病毒载体 V5 进行 PCR 扩增。

## 1.7 整合基因组 Marc-145 细胞表达 shRNA 抑制 PRRSV 复制的验证

1.7.1 病毒接种转基因阳性细胞检测病毒感染情况 扩大培养 Marc/pU6/Nsp9-4、Marc/pU6/Nsp9-6 及 Marc/pU6-CON 转基因细胞株,至细胞铺满度达到 85%以上,一般细胞分种后培养 48 h 就可达到要求。三种转基因细胞,每种做 3 个平行组,首先用维持液清洗细胞面两次,一方面可以去除代谢产物,另一方面除去血清影响。然后每个细胞瓶接种 2 mL Marc-145 细胞适应病毒<sup>[16]</sup>,其毒价为 10<sup>-4.29</sup> TCID<sub>50</sub>,感作 1 h 后换用正常维持液。第一组分别在 12、24、48 及 72 h 收集病毒,冻融后测定细胞毒价并观察细胞病变效应;第二组待 36 h 做间接免疫荧光试验;第三组分别于 24、48 和 72 h 收病毒,冻融后做 Real-time RT-PCR 验证。

1.7.2 TCID<sub>50</sub>测定转基因阳性细胞的抗病毒效果 分别取第一组制备好的病毒材料按照 100 μL 病毒加 900 μL 维持液依次倍比稀释,使成 10<sup>-1</sup>~10<sup>-10</sup>。选择生长良好的 Marc-145 细胞接种于 96 孔培养板,48 h 后,弃营养液,每孔加入倍比稀释的病毒液 100 μL,每个滴度做 8 个重复。第 11 和 12 列每孔加入 100 μL 维持液,作为阴性对照,然后将 96 孔培养板置 37 °C 含 5%的 CO<sub>2</sub> 培养箱,每天观察记录病变情况,并用 Reed-Muench 公式计算 TCID<sub>50</sub>。

1.7.3 间接免疫荧光验证转基因阳性细胞表达 shRNA 抑制 PRRSV 复制情况 对第二组转基因阳性 Marc-145 细胞接毒培养 36 h 后,弃去培养液,按照常规方法以 0.5 mol·L<sup>-1</sup>,pH7.6 的 PBS

缓冲液洗涤细胞 2 次,加入预冷的丙酮,置 -20 °C 冰箱固定 30 min, PBS 洗涤细胞 4~5 次,吸水纸吸干,稀释液稀释 PRRSV 阳性血清,按照一定浓度加入一抗,置湿盒中,37 °C 作用 1 h,吸干,用 PBS 洗涤单层细胞 4~5 次,吸水纸吸干,每孔加入已稀释 FITC 标记抗猪的二抗 IgG,再孵育 1 h,吸弃液体, PBS 洗涤,吸干后滴加 50%甘油,观察结果。

1.7.4 Real-time RT-PCR 验证整合 Marc-145 细胞对 *nsp9* 基因干扰效果 针对 *nsp9* 基因设计并合成探针法检测引物以及探针引物,同时合成 *βactin* 管家基因的引物。分别稀释成 10 μmol·L<sup>-1</sup>,收集第三组已经准备材料的各个时间段细胞,反复冻融后,各取 400 μL,Trizol 法分别提取其 RNA,ND2000 测定其浓度,稀释使所有 RNA 保持在一个浓度下,每个样品 3 μL,引物 1 μL,按照 One Step PrimerScript<sup>TM</sup> RT-PCR Kit 说明书配比,同步扩增 *nsp9* 和 *βactin* 基因,每个样重复 3 次。然后,用比较阈值法分析不同样品中 PRRSV 的相对拷贝数。

## 2 结果

### 2.1 慢病毒介导 shRNA 构建质粒的重组鉴定

pENTR/U6/Nsp9-4、pENTR/U6/Nsp9-6 和 pENTR/U6/-CON 经 LR 重组、PCR 及测序鉴定,证实,构建的入门载体和慢病毒载体 pLenti6/Dest 已正确重组,初步证明 pEX/U6/Nsp9-4、pEX/U6/Nsp9-6 和 pEX/U6/-CON 重组质粒已经成功构建。

### 2.2 Marc-145 细胞抗性筛选浓度的确定

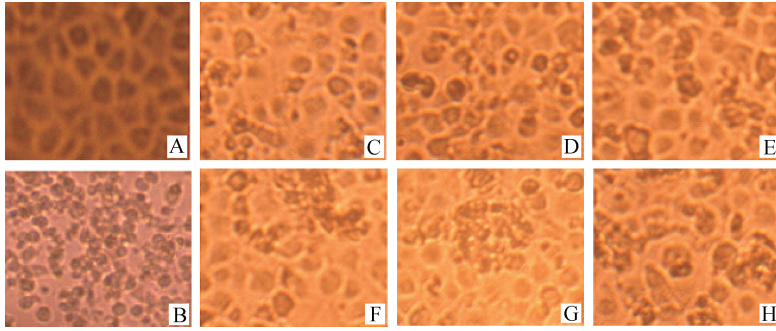
杀稻瘟菌素按一定比例稀释后,配成含抗性 DMEM 完全培养基,给 24 孔正常 Marc-145 细胞换液,连续观察,孔内 Marc-145 细胞会逐渐出现死亡现象,2 周后发现,最低质量浓度为 3.3 μg·mL<sup>-1</sup> 杀稻瘟菌素孔细胞全部死亡,故将其作为转基因 Marc-145 细胞筛选浓度。

### 2.3 Marc-145 细胞整合基因组阳性细胞的获得

慢病毒上清感染正常 Marc-145 细胞后,经适合浓度 blasticidin 筛选,得到了细胞克隆,经过连续传代和筛选,出现了 blasticidin 抗性的阳性克隆,细胞扩大培养后如图 1 中 C~E 所示。与正常 Marc-145 细胞相比,整合后的细胞其形态眼观上有所改变。

### 2.4 Marc-145 细胞基因组整合鉴定

Marc/pU6/Nsp9-4、Marc/pU6/Nsp9-6 及 Marc/pU6-CON 细胞基因组经 U6 启动子和慢病毒载体 V5 引物 PCR 鉴定后,从图 2 可以看出,本研

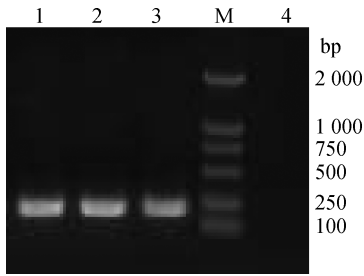


A. 正常 Marc-145; B. 正常 Marc-145 感染 PRRSV; C~E. 分别为整合基因组后 Marc/pU6/Nsp9-4、Marc/pU6/Nsp9-6 及 Marc/pU6/-CON 细胞; F~H. 分别为整合基因组后发生 CPE 的 Marc/pU6/Nsp9-4、Marc/pU6/Nsp9-6 及 Marc/pU6-CON 细胞

A. Normal Marc-145; B. Infected Marc-145 by PRRSV; C. Marc/pU6/Nsp9-4; D. Marc/pU6/Nsp9-6; E. Marc/pU6/-CON; F-H. Infected Marc/pU6/Nsp9-4, Marc/pU6/Nsp9-6 and Marc/pU6-CON by PRRSV, respectively

图 1 PRRSV 感染转基因前、后及发生病变的 Marc-145 细胞

Fig. 1 Normal Marc-145, integrated and infected Marc-145 cell by PRRSV



1. Marc/pU6/Nsp9-4; 2. Marc/pU6/Nsp9-6; 3. Marc/pU6-CON; M. DL2000 DNA 相对分子质量标准; 4. 空白对照

1. Marc/pU6/Nsp9-4; 2. Marc/pU6/Nsp9-6; 3. Marc/pU6-CON; M. DL2000 marker; 4. Control

图 2 Marc-145 细胞基因组整合后 PCR 鉴定

Fig. 2 PCR identification of integrated Marc-145 cellular genome

究构建的慢病毒携带干扰序列已经成功整合在 Marc-145 细胞基因组上。

## 2.5 转基因阳性细胞接种 PRRSV 后致细胞病变效应 (CPE)

Marc/pU6/Nsp9-4、Marc/pU6/Nsp9-6、Marc/pU6-CON 及正常 Marc-145 细胞接毒后第 3 天, 对照 Marc/pU6-CON 及正常 Marc-145 部分细胞聚集变圆, Marc/pU6/Nsp9-4、Marc/pU6/Nsp9-6 也有部分细胞变圆, 但变化程度比较轻微。第 4 天时对照病变明显, 转基因细胞病变情况类似对照第 3 天, 第 5 天时接近对照第 4 天, 可见, 转基因细胞表达 shRNA 且出现明显抑制 PRRSV 复制现象(见图 1 中 F~H)。

## 2.6 间接免疫荧光试验验证转基因阳性细胞表达的 shRNA 对 PRRSV 复制的抑制

Marc/pU6/Nsp9-4、Marc/pU6/Nsp9-6、Marc/pU6-CON 及正常 Marc-145 细胞接种 100 TCID<sub>50</sub>

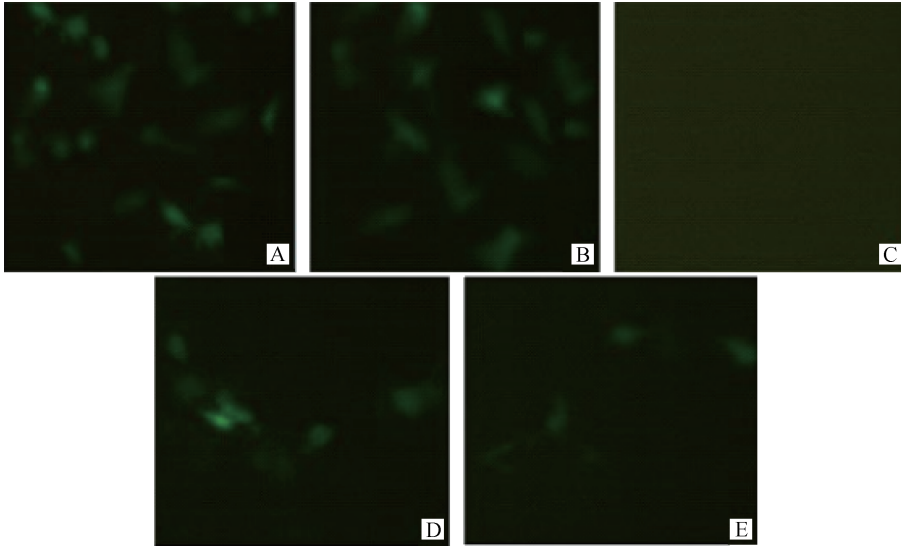
的 PRRSV, 同时设不接毒的细胞为阴性对照, 36 h 后, 荧光显示如图 3, Marc/pU6-CON 及正常 Marc-145 细胞间接免疫后产生荧光比稳定整合的 Marc/pU6/Nsp9-4 和 Marc/pU6/Nsp9-6 细胞强, 眼观上有明显差异。说明 Marc/pU6/Nsp9-4、Marc/pU6/Nsp9-6 两株细胞表达的 shRNA 有效抑制了 PRRSV 的复制和表达。

## 2.7 转基因阳性细胞抗病毒结果

Marc/pU6/Nsp9-4、Marc/pU6/shRNA/Nsp9-6、Marc/pU6/shRNA-CON 及正常 Marc-145 细胞接毒后, 第 5 天收毒, 置 -70 °C 反复冻融 2 次, 倍比稀释, 测定 12、24、48、72 h 等不同时间的 TCID<sub>50</sub>。结果, 不管哪个时间点, Marc/pU6/Nsp9-4 和 Marc/pU6/Nsp9-6 组 TCID<sub>50</sub> 值明显低于 Marc/pU6-CON 及正常 Marc-145 对照组。说明转基因阳性细胞表达的 shRNA 具有抑制 PRRSV 复制的能力, 这一结果进一步印证了“2.5 和 2.6”中直接观察到的细胞病变效应结果(图 4)。

## 2.8 Real-time RT-PCR 验证整合 Marc-145 细胞表达 shRNA 对 nsp9 基因干扰效果

Marc/pU6/Nsp9-4、Marc/pU6/Nsp9-6、Marc/pU6-CON 及正常 Marc-145 细胞, 提取其 RNA, ND2000 测定质量浓度为 200 ng · μL<sup>-1</sup>, 如果模板浓度太高会影响扩增曲线, 故每个样品稀释为 100 ng · μL<sup>-1</sup>, 在完全一致的 PCR 条件下, 于同一块板上同时扩增 nsp9 基因和 βactin 基因; 用比较阈值法分析不同样品中 PRRSV 的相对拷贝数<sup>[17]</sup>。从转录水平验证转基因细胞表达的 shRNA 对 nsp9 基因干扰效果。由图 5 可知, 与 Marc/pU6-CON 和



a. 正常 Marc-145 细胞; b. Marc/pU6/-CON 细胞; c. 空白对照; d. Marc/pU6/Nsp9-4 细胞; e. Marc/pU6/Nsp9-6 细胞  
a. Infected normal Marc-145; b. Marc/pU6/-CON; c. Control; d. Marc/pU6/Nsp9-4; e. Marc/pU6/Nsp9-6

图 3 转基因阳性细胞表达的 shRNA 抑制 PRRSV 复制的间接免疫荧光验证

Fig. 3 To verify PRRSV replication inhibition of shRNA expressed by transgenic positive cells through IFA

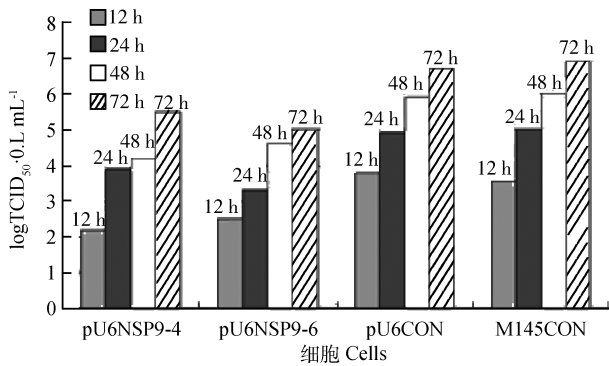


图 4 接毒后转基因阳性 Marc-145 细胞不同时间 TCID<sub>50</sub> 比较

Fig. 4 Comparison of transgenic Marc-145 cells' TCID<sub>50</sub> post-infection at different time

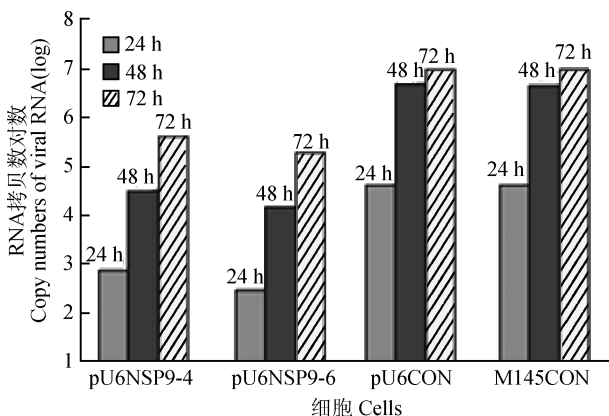


图 5 Real-time RT-PCR 检测转基因阳性细胞表达的 shRNA 对 PRRSV 复制的抑制效果

Fig. 5 Detection of suppression of PRRSV replication of shRNA expressed by transgenic positive cells through real-time RT-PCR

正常细胞 Marc-145 相比, Marc/pU6/Nsp9-4、Marc/pU6/Nsp9-6 病毒计算拷贝数在 0.058 以下,对 *nsp9* 基因干扰效率达到 90.05% 以上,说明 2 个干扰组都表现出很强的抑制病毒感染的效果。

### 3 讨论

本研究通过多种方法及多步骤验证,不仅筛选到具有抑制 PRRSV 复制能力的两株 shRNA,而且成功构建了能够稳定表达 shRNA 的两株 Marc-145 细胞系,将其命名为 Marc/pU6/Nsp9-4、Marc/pU6/Nsp9-6。同时,为便于验证,构建了一株表达随机序列的 Marc/pU6/Nsp9-CON 细胞系。该细胞系经过 PCR、间接免疫荧光、TCID<sub>50</sub> (组织细胞半数感染量)及 Real-time RT-PCR 等试验验证后,发现,PRRSV 对 Marc/pU6/Nsp9-CON 和正常 Marc-145 两者的易感性没有差异;相反,整合在 Marc-145 细胞上的干扰序列对应两株细胞系由于稳定表达靶向抑制 PRRSV 复制的 shRNA,而具有干扰 *nsp9* 基因表达的效果,由此说明整合在细胞上的干扰序列获得表达,从图 1~5 中也可以看出干扰 PRRSV 增殖效果显著。

值得注意的是,建立的 Marc/pU6/Nsp9-4、Marc/pU6/Nsp9-6 细胞系虽然实验室验证能够持续产生干扰效果,但体内抑制病毒的效率还需要大量试验。另外,siRNA 研究证实,载体介导 shRNA

在抑制病毒核酸复制的同时使病毒产生对 RNAi 的耐受性,一方面源于体内本身就存在 siRNA,病毒粒子会对此产生适应性耐受;另一方面由于转染 siRNA 的压力以及外源的导入使得病毒粒子选择优势得到进化,为了避免病毒对 RNA 干扰产生免疫耐受,设计时尽可能选择多对针对多个靶点的 siRNA,事实上,以前的研究也证实了这点,并且得到了重视,再者,并非所有干扰片段都能对病毒复制产生较好的抑制效果,所以本研究最初设计了 6 对针对 *nsp9* 基因的 shRNA,多种方法筛选,验证后,最终才筛选到 2 对有意义序列。值得关注的最后一点,虽然 siRNA 片段比较短,仅仅 21~23 bp,但是,研究证实 siRNA 也许会通过调节干扰素 IFN 而引起非特异免疫反应<sup>[18]</sup>,因此,如果用此做转基因动物,siRNA 引起的副反应、注射靶点以及如何注射等都值得我们深思。

外源基因进入细胞通常需要“运载工具”,即载体,目前常用的载体有慢病毒载体、逆转录病毒载体、腺病毒载体等,各种病毒载体各具其优缺点。郑海学等利用逆转录病毒载体系统将 T7 RNA 聚合酶基因稳定整合在 IB-RS-2 细胞,建立稳定表达 T7 RNA 聚合酶 IBRS-2 细胞系从而体内拯救 SVDV<sup>[19]</sup>。田宏应用逆转录病毒载体系统研制猪水疱病和猪瘟基因工程亚单位疫苗<sup>[20]</sup>,免疫动物后抗体效价达 1:8 以上。本研究选用慢病毒载体(lentiviral vector),其属于逆转录病毒科,是一种来源于逆转录病毒的载体。与逆转录病毒载体相比,虽然都是去除基因组中部分基因,并插入所需的目的基因和标记物构建而成,但慢病毒系统转染效率更高,因为慢病毒不但可感染分裂期细胞,而且还可以感染非分裂期细胞,并可容纳较大的基因片段<sup>[21]</sup>。而其他载体(如非病毒载体、腺病毒载体、腺相关病毒载体)不具备整合到靶细胞染色体的特性,或者只能整合到分裂细胞的染色体。另外,研究证实自身失活慢病毒载体的安全性比逆转录病毒载体更高<sup>[22]</sup>。目前慢病毒载体系统应用于 RNAi 研究已有许多成功的例子。有学者应用慢病毒介导 RNAi 技术,设计合成针对 *Clusterin* 基因的 siRNA,研究 *CLU* 基因对肾癌 786-O 细胞的作用,发现具有抑制作用,并建立了 *CLU* 基因稳定干扰的人肾癌 786-O 细胞系<sup>[23]</sup>。研究 shRNA 沉默 HDAC1 表达对食管癌细胞 EC109 细胞的生长特性后证实,慢病毒介导的干扰序列能有效抑制 EC109 中的

HDAC1 的表达,不仅如此,还能抑制细胞的增殖分裂<sup>[24]</sup>。另外,以前关于 RNAi 的研究大部分建立在瞬时转染基础上,只是对某个靶点的瞬时验证,仍停留在基因水平,没有形成有形的东西。王晓红等研究发现 GP5<sup>Δ84-119</sup> 的表达能够抑制 PRRSV 的复制,建立了稳定表达缺失 84-119 氨基酸残基(第二个胞外区)的截短型 GP5 的 Marc-145 细胞系<sup>[25]</sup>。受此启发,本研究在前人研究基础上选用慢病毒表达系统及包装细胞系 293-FT,将具有干扰效果 shRNA 整合在 Marc-145 细胞基因组染色体上,并建立稳定表达 shRNA 的 Marc-145 细胞系,为下一步转基因动物的研究提供理论及物质基础。

### 参考文献(References):

- [1] 吴娟,王潇博,黄志强,等.抗猪呼吸与生殖综合征病毒 Nsp9 蛋白单克隆抗体的制备及初步鉴定[J].中国生物制品学杂志,2012,25(9):1180-1184. WU J, WANG X B, HUANG Z Q, et al. Preparation and preliminary identification of monoclonal antibodies against Nsp9 protein of porcine reproductive and respiratory syndrome virus[J]. *Chinese Journal of Biologics*, 2012, 25(9):1180-1184. (in Chinese)
- [2] GORBALENYA A E, KOONIN E V, DONCHENKO A P, et al. Coronavirus genome: prediction of putative functional domains in the non-structural polyprotein by comparative amino acid sequence analysis[J]. *Nucleic Acids Res*, 1989, 17(12):4847-4861.
- [3] ZHAO M, NING Z, WANG H, et al. Sequence analysis of NSP9 gene of 25 PRRSV strains from Guangdong province, subtropical southern China[J]. *Virus Genes*, 2013, 46(1):88-96.
- [4] KWON B, ANSARI I H, PATTHAIK A K, et al. Identification of virulence determinants of porcine reproductive and respiratory syndrome virus through construction of chimeric clones[J]. *Virology*, 2008, 380(2):371-378.
- [5] LI Y, ZHOU L, ZHANG J, et al. Nsp9 and Nsp10 contribute to the fatal virulence of highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus emerging in China[J]. *PLoS Pathog*, 2014, 10(7):e1004216.
- [6] ZHOU Y, ZHENG H, GAO F, et al. Mutational analysis of the SDD sequence motif of a PRRSV RNA-dependent RNA polymerase [J]. *Sci China Life Sci*, 2011, 54(9):870-879.
- [7] LI J, GUO D, HUANG L, et al. The interaction between host Annexin A2 and viral Nsp9 is beneficial

- for replication of porcine reproductive and respiratory syndrome virus[J]. *Virus Res*, 2014, 189:106-113.
- [8] DONG J, ZHANG N, GE X, et al. The interaction of nonstructural protein 9 with retinoblastoma protein benefits the replication of genotype 2 porcine reproductive and respiratory syndrome virus *in vitro* [J]. *Virology*, 2014, 464-465: 432-440.
- [9] ZHAO M, NING Z, WANG H, et al. Sequence analysis of NSP9 gene of 25 PRRSV strains from Guangdong province, subtropical southern China[J]. *Virus Genes*, 2013, 46 (1): 88-96.
- [10] 赵双成. PRRSV Nsp2、Nsp9 与宿主细胞蛋白 DDX3X、DDX5 相互作用的分子机制[D]. 北京: 中国农业大学, 2015.
- ZHAO S C. Molecular mechanisms of the interactions of PRRSV Nsp2 with DDX3X and Nsp9 with DDX5. [D]. Beijing: China Agricultural University, 2015. (in Chinese)
- [11] 曹素芳, 李明, 王岩, 等. 靶向 PRRSV 核衣壳蛋白 N 基因的 siRNA 表达载体的构建及鉴定[J]. *安徽农业科学*, 2009, 37(28):13490-13491,13518.
- CAO S F, LI M, WANG Y, et al. Construction and identification of siRNA expression vector targeting nucleocapsid protein N gene of PRRSV[J]. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2009, 37 (28): 13490-13491,13518. (in Chinese)
- [12] 贺云霞. 应用 RNAi 技术抑制猪繁殖与呼吸综合征病毒复制的研究 [D]. 哈尔滨: 中国农业科学院哈尔滨兽医研究所, 2006.
- HE Y X. Inhibition of porcine reproductive and respiratory syndrome virus replication by RNA interference technology [D]. Harbin: Harbin Veterinary Research Institute, CAAS, 2006. (in Chinese)
- [13] 宋德武, 袁洁, 李鑫, 等. 靶向 GP5 基因脱氧核酶抑制 PRRSV 在 MARC-145 细胞中的复制[J]. *中国兽医学报*, 2011, 31(12):1695-1701.
- SONG D W, YUAN J, LI X, et al. Inhibition of PRRSV replication by DNazymes targeted to matrix-protein GP5 gene in MARC-145 cells[J]. *Chinese Journal of Veterinary Science*, 2011, 31(12):1695-1701. (in Chinese)
- [14] 刘湘涛, 吴锦艳, 田宏, 等. 一种用于抑制猪繁殖与呼吸综合征病毒复制的 RNAi 及其制备方法: 中国, ZL201210180401.0[P]. 2014-07-02.
- LIU X T, WU J Y, TIAN H, et al. A kind of RNAi and preparation method to inhibit PRRSV replication; China, ZL201210180401.0[P]. 2014-07-02. (in Chinese)
- [15] 刘湘涛, 吴锦艳, 田宏, 等. 一种用于抑制猪繁殖与呼吸综合征病毒复制的 1010shRNA 及其制备方法: 中国, ZL201310752351.3[P]. 2015-9-23.
- LIU X T, WU J Y, TIAN H, et al. A kind of 1010shRNA and preparation method to inhibit PRRSV replication; China, ZL201310752351.3[P]. 2015-9-23. (in Chinese)
- [16] 吴锦艳, 田宏, 尚佑军, 等. 猪生殖与呼吸综合征病毒 HN/XT/07 株的分离鉴定及其 Nsp2 基因的特性分析[J]. *中国兽医科学*, 2008, 38(12):1033-1037.
- WU J Y, TIAN H, SHANG Y J, et al. Isolation and Nsp2 genetic characterization of one strain HN/XT/07 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus[J]. *Chinese Veterinary Science*, 2008, 38(12): 1033-1037. (in Chinese)
- [17] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method[J]. *Methods*, 2001, 25 (4):402-408.
- [18] SLEDZ C A, HOLKO M, DE VEER M J, et al. Activation of the interferon system by short-interfering RNAs[J]. *Nat Cell Biol*, 2003, 5(9):834-839.
- [19] YAN N, CHEN Z J. Intrinsic antiviral immunity[J]. *Nat Immunol*, 2012, 13 (3): 214-222.
- [20] ALBINA E, PIRIOU L, HUTET E, et al. Immune responses in pigs infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) [J]. *Vet Immunol Immunopathol*, 1998, 61(1): 49-66.
- [21] ALBINA E, CARRAT C, CHARLEY B. Interferon-alpha response to swine arterivirus (PoAV), the porcine reproductive and respiratory syndrome virus[J]. *J Interferon Cytokine Res*, 1998, 18(7): 485-490.
- [22] OVEREND C, MITCHELL R, HE D, et al. Recombinant swine beta interferon protects swine alveolar macrophages and MARC-145 cells from infection with Porcine reproductive and respiratory syndrome virus[J]. *J Gen Virol*, 2007, 88 (Pt 3): 925-931.
- [23] HUANG C, ZHANG Q, FENG W H. Regulation and evasion of antiviral immune responses by porcine reproductive and respiratory syndrome virus[J]. *Virus Res*, 2015, 202:101-111.
- [24] LI E, SUN N, ZHAO J X, et al. *In vitro* evaluation of antiviral activity of tea seed saponins against porcine reproductive and respiratory syndrome virus[J]. *Antivir Ther*, 2015, 20(7):743-752.
- [25] 王晓红, 宋林林, 李亮亮, 等. GP5<sup>Δ84-119</sup> 稳定表达对猪繁殖与呼吸综合征病毒复制的影响[J]. *畜牧兽医学报*, 2016, 47(2):315-324.
- WANG X H, SONG L L, LI L L, et al. The effect of GP5<sup>Δ84-119</sup> stable expression on the replication porcine reproductive and respiratory syndrome virus[J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2016, 47 (2):315-324. (in Chinese)