

张晓溪, 李兰玉, 刘庆友, 等. 慢病毒介导多短发卡 RNA 串联载体构建与体内外抗口蹄疫效果评估[J]. 华南农业大学学报, 2014, 35(4): 1-6.

慢病毒介导多短发卡 RNA 串联载体构建与体内外抗口蹄疫效果评估

张晓溪¹, 李兰玉¹, 刘庆友¹, 郑海学², 李湘萍¹, 崔奎青¹, 石德顺¹

(1 广西大学 动物科学技术学院, 广西 南宁 530005; 2 中国农业科学院 兰州兽医研究所, 甘肃 兰州 730046)

摘要:【目的】探讨应用多短发卡 RNA(shRNA)串联沉默口蹄疫病毒 RNA 复制的可行性。【方法】针对口蹄疫病毒(Foot and mouth disease, FMDV)非结构蛋白基因 3B 和 3D 保守区域设计合成 3 个 shRNA 的串联片段,并分别用 3 个不同序列的启动子引导,成功构建了 3shRNA 串联的慢病毒 RNAi 载体. 利用慢病毒 3 质粒包装系统共转于 293T 细胞包装成慢病毒颗粒. 利用包装的慢病毒处理细胞及乳鼠,并接种 FMDV,观察 FMDV 抑制情况。【结果和结论】结果显示,慢病毒处理 BHK-21 获得的转基因细胞中检测 shRNA 表达;通过 O 型 FMDV 接种发现转基因细胞对口蹄疫病毒的复制有明显的抑制,其中在接种后 24 h 病毒拷贝量仅为普通细胞的 1/3;O 型 FMDV 毒株接种于抗口蹄疫慢病毒载体预处理过的 3~5 日龄乳鼠,在 5 LD₅₀滴度下全部乳鼠均存活,在 20 LD₅₀滴度下存活率也提高 50%. 构建的慢病毒介导多 shRNA 串联表达抗口蹄疫载体能提高 BHK-21 细胞和乳鼠对口蹄疫病毒的抵抗力,有效地避免了 5 LD₅₀滴度内乳鼠的死亡现象,具有抵抗口蹄疫病毒毒性的良好性能。

关键词:口蹄疫病毒; 多 shRNA; 慢病毒载体; 抗病毒
中图分类号:S813.3 **文献标志码:**A **文章编号:**1001-411X(2014)04-0001-06

Construction of lentivirus-mediated multi-shRNAs vector and evaluation of anti-FMDV *in vitro* and *vivo*

ZHANG Xiaoxi¹, LI Lanyu¹, LIU Qingyou¹, ZHENG Haixue², LI Xiangping¹, CUI Kuiqing¹, SHI Deshun¹

(1 College of Animal Sciences and Technology, Guangxi University, Nanning 530005, China;

2 Lanzhou Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou 730046, China)

Abstract:【Objective】The study was conducted to investigate the inhibit replication of foot-and-mouth disease virus (FMDV) by multi-shRNAs expression. 【Method】Three shRNAs were designed and chemically synthesized according to the conservative area in 3B and 3D regions of FMDV; induced by three different promoters respectively, they were constructed into a multi-shRNAs expressing lentiviral plasmid. The anti-FMDV multi-shRNAs expressing lentiviral particles were packaged by co-transfecting the three plasmid lentivirus packaging system into 293T cells. Infected FMDV into lentivirus-treated cells and suckling mice, inhibitions of FMDV were observed. 【Result and conclusion】Results showed that transgenic BHK-21 cells were obtained by infecting lentivirus. The expression of shRNAs in transgenic cells was detected by stem-loop RT-PCR. Inoculated with FMDV type O, the transgenic cells were proven to have an obvious inhibition to FMDV replication, which could reduce virus growth by three folds (24 h post-infection). After infection of FMDV type O strain into 3-5 days suckling mice, no mouse mortality

was observed under 5 LD₅₀ titer, and survival time of the dead mice extended compared with negative control under 20 LD₅₀ titer. Based on the above results, it can be concluded that the anti-FMDV multi-shRNAs expressing lentiviral vector can improve FMDV resistance of BHK-21 cells and suckling mice.

Key words: foot-and-mouth disease virus; multi-shRNAs; lentiviral vector; anti-virus

口蹄疫 (Foot-and-mouth disease, FMD), 是由口蹄疫病毒 (Foot-and-mouth disease virus, FMDV) 引起的以侵害偶蹄动物为主的急性、热性、高度接触性人畜共患传染病, 在国际上受到高度重视. 该病毒属于小 RNA 病毒科 FMDV 属, 有 O 型、A 型、C 型、SAT I 型、SAT II 型、SAT III 型及 Asia I 型等 7 个血清型, 70 多个亚型, 各型之间无交叉反应. 流行病学调查和试验感染证明, 有 100 多种动物可以感染. 口蹄疫已被世界动物卫生组织 (World organization of animal health, OIE) 列为 A 类动物传染病之首. 至今, 科学家们已针对 FMDV 不同基因在细胞和动物等不同水平对 RNAi 抗 FMDV 效果进行了研究和探索^[1-4]. 有报道指出, 在长期使用 siRNA 抑制病毒复制的治疗过程中会使病毒基因变异而产生 RNAi 抗性, 导致病毒逃逸^[5-6]. 而为了解决这一问题, 人们开始将病毒基因组保守区或同时以不同基因序列作为靶基因^[6-9]. 经过科学家们多年研究表明, 具有茎环结构的 shRNA 分子比在细胞中直接导入 siRNA 对靶基因的抑制效率高; 而 shRNAs 通过转染可整合基因的质粒载体或反转录病毒载体、慢病毒载体进行表达, 能够稳定长效地抑制靶基因表达^[10]. 2008 年, Brake 等^[11]对慢病毒介导几种 shRNAs 以不同的启动子进行多重 shRNA 表达从而抑制 HIV-1 复制, 结果发现, 载体中每个 shRNA 的表达与单独表达这些 shRNA 的效率基本一致. 这样的多个 shRNA 串联表达载体设计可以在转入载体量不变的条件下整体增加 shRNA 表达的效率. 本研究拟选取高度保守的适于设计 shRNA 的位点, 以多个 shRNA 串联表达的载体形式, 构建靶向 FMDV 的 shRNA 表达载体, 并且对表达的 siRNA 在体外和体内抑制口蹄疫病毒复制的能力进行了评估, 为进一步生产抗口蹄疫转基因家畜奠定了基础.

1 材料与方法

1.1 主要试验材料

慢病毒 3 质粒包装系统 (pNRF、pVsvg 和 pSicoR)、293T 细胞和 BHK-21 细胞由广西大学亚热带农业生物资源保护与利用国家重点实验室自行保存; 脂质体 Lipofectamine™ 2000、DMEM 细胞培养基

及胎牛血清 (FBS) 为美国 Invitrogen 公司产品; 试验用昆明小鼠由中国农业科学院兰州兽医研究所提供. 所有涉及 FMDV 试验操作均在中国农业科学院兰州兽医研究所国家口蹄疫参考实验室进行.

1.2 主要试验方法

1.2.1 选择抗口蹄疫 shRNA 通过比对 O、Asia I、A、C 等血清型不同毒株的 FMDV 基因组序列 (AF189157、AY304994、AY593751 和 AF274010), 选择非结构蛋白基因 3B 和 3D 的保守区间设计 3 段 shRNA, 由南京金斯瑞生物科技有限公司合成.

1.2.2 构建多 shRNA 串联抗口蹄疫表达质粒 将水牛 7SK 启动子 (JN417658)、水牛 U6 启动子 (JN417659) 以及牛 U6 启动子 (DQ150532) 分别连接在 3 个 shRNA 的 5' 端, 并将 3 组 shRNA 表达框串联, 以慢病毒载体质粒 pSicoR 为载体骨架, 构建成多个抗口蹄疫 shRNA 表达载体 pSicoR-3shRNA. 获得的质粒 pSicoR-3shRNA 属于慢病毒载体中的载体质粒.

1.2.3 包装慢病毒和测定滴度 将 293T 细胞传代至事先铺过明胶的培养皿中, 使 293T 细胞贴壁能力增强, 减少其在转染过程中的脱落. 用脂质体法将载体质粒 pSicoR-3shRNA 与慢病毒包装质粒 pNRF、包膜质粒 pVsvg 以 2:3:1 的比例共转至 293T 细胞中. 转染后 24 h 观察荧光情况. 此时 pVsvg 表达形成的病毒衣壳会导致 293T 细胞变形, 但不影响病毒的形成. 转染后 72 h 收集细胞上清液, 3 000 r/min 离心 10 min, 以去除细胞碎片, 0.45 μm 滤器过滤, 其中一小部分分装成 500 μL/管, -80 °C 条件冷冻保存. 取 10 μL 病毒原液用 Reed-Muench 法进行慢病毒滴度测定.

1.2.4 制备慢病毒介导转基因 BHK-21 细胞与检测 shRNA 表达 将 500 μL 病毒原液成滴加入 BHK-21 细胞培养皿中, 轻轻摇晃以使培养基混合均匀, 置于 37 °C CO₂ 培养箱孵育 12~24 h 后, 换成含体积分数为 10% FBS 的 DMEM 培养基. 感染 72 h 后通过荧光显微镜观察细胞荧光表达情况; 通过流式细胞仪分选, 得到转基因细胞系 (BHK-LV). 利用茎-环 RT-PCR 法, 以 U6 基因作为内参基因, 检测 3 条 shRNA 表达情况.

1.2.5 绘制 FMDV 在 BHK-LV 中的复制曲线 将 BHK-LV 和普通 BHK-21 细胞以 $2 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$ 分别接种于 7 个 24 孔板中,24 h 后,将 O 型口蹄疫病毒 HKN/2002 以每细胞 $5 \times 10^3 \text{ TCID}_{50}$ 的比例接种于细胞中. 分别在接毒后 6、12、18、24、36 和 48 h 收集细胞及所有上清液. 各取 200 μL 收集的细胞混合液至 96 孔 RNA 提取板中,用 QIAGEN 全自动高通量核酸提取工作站 (QIAxtractor) 提取总 RNA 后,吸取等体积的总 RNA,根据 Shaw 等^[12] 的文献报道,用 SuperScript III/Platinum Taq One-Step rRT-PCR 试剂盒进行荧光定量 PCR. 根据相关报道^[13],以 FMDV 基因组的 5'端 UTR 区保守序列为靶序列设计 TaqMan® 引物 (SA-IR-219-246F 和 SA-IR-315-293R) 以及探针 (SAmulti2-P-IR-292-269R). 定量 PCR 试验步骤参考 SuperScript III/Platinum Taq One-Step rRT-PCR 试剂盒使用说明书进行.

定量 PCR 反应结果测定、分析均利用 Stratagene® MxPro™ QPCR 软件获得^[13]. 通过 FMDV 复制的标准曲线回归方程计算出每个时间点的病毒 RNA 拷贝数,绘制细胞中 O 型 FMDV 1~48 h 内的病毒复制曲线.

1.2.6 抗口蹄疫慢病毒载体的乳鼠 FMDV 抗性试验 在预试验中,先对 FMDV 在本次试验用的昆明小鼠上的 LD₅₀ 进行校正. 将本次启用的 O 型 FMDV 原液用 PBS 缓冲液进行 10 倍稀释,并用 $10^5 \sim 10^8$ 稀释度的病毒液分别对每组 4 只小鼠进行颈后皮下接种,每组各设 1 只小鼠用生理盐水注射作为阴性对照,接种后 72 h 观察小鼠死亡情况.

将滴度 $>1 \times 10^8 \text{ TU/mL}$ 的纯化抗口蹄疫慢病毒颗粒 (LV-3shRNA) 用 PBS 稀释 10 倍,以每只 0.2 mL 的剂量颈后皮下注射 3~5 日龄乳鼠,阴性对照用 PBS 代替慢病毒接种 (表 1). 经 LV-3shRNA 处理 24 h 后,每只乳鼠颈后皮下分别注射 5、20、100 和 1 000 LD₅₀ 滴度的 O 型 FMDV 0.2 mL. 各滴度组乳鼠数量见表 1. 接毒后 12、24、30、36、48、72 h 和 7 d 观察 LV-3shRNA 组及阴性对照组各滴度接种鼠的死亡情况. 7 d 后每个滴度组各选择 1 只乳鼠,提取 RNA,用 SuperScript III/Platinum Taq One-Step rRT-PCR 试剂盒进行实时定量 PCR 检测病毒含量.

表 1 试验乳鼠的分组

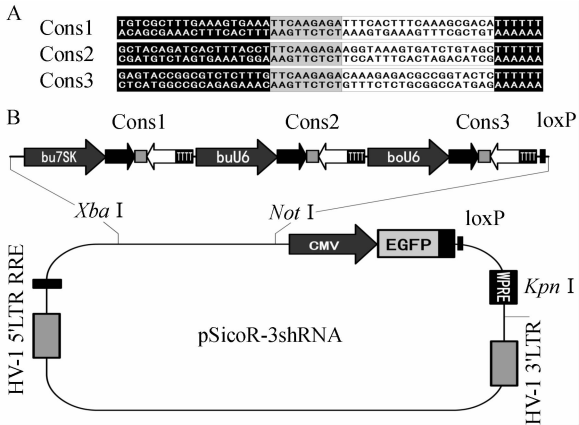
Tab.1 Grouping the experimental suckling mice				
组别	各滴度 FMDV 接种乳鼠数量			
	5 LD ₅₀	20 LD ₅₀	100 LD ₅₀	1 000 LD ₅₀
LV-3shRNA	4	4	4	2
PBS(阴性对照)	4	4	4	2

2 结果与分析

2.1 多 shRNA 串联抗口蹄疫表达质粒构建

根据 GenBank 上 O 型 FMDV 基因组序列 (AF189157),选择 3 个 FMDV 非结构蛋白基因 3B 和 3D 保守区间:(1) 3B 区域中 5'-CCT GTC GCT TTG AAA GTG AAA GC-3' 位于 4 900~4 922 nt;(2) 3D 区域中 5'-GAG ATT CCA AGC TAC AGA TCA CTT TAC CTG CGT TGG GTG AAC GCC GTG TGC GGT GAC GC-3' 位于 6 934~6 992 nt;(3) 3D 区域中 5'-GAC GAG TAC CGG CGT CTC TTT GAG CC-3' 位于 6 892~6 917 nt^[1]. 设计 3 个 shRNA,其序列如图 1A.

将启动子依次连入 3 个 shRNA 串联序列后,得到 p18T-3shRNA,用 Xba I/Not I 双酶切得到的片段 (Xba I -bu7SK-Cons1- buU6-Cons2-boU6-Cons3-loxP-Not I) 约 1 298 bp. 多个抗口蹄疫 shRNA 表达载体 pSicoR-3shRNA 结构如图 1B.



A: shRNA 序列;B: 抗口蹄疫 shRNA 表达载体 pSicoR-3shRNA 结构.
图 1 shRNA 序列和抗口蹄疫载体构建
Fig.1 Sequences and expression vector constructions of multiple FMDV-specific shRNAs

2.2 转基因细胞 BHK-LV 制备和阳性细胞表达检测

应用 QIAGEN 去内毒素质粒纯化试剂盒,获得高质量的 pSicoR-3shRNA、pNRF 与 pVsug 载体质粒. 将 3 个慢病毒质粒共转染 293T 细胞,72 h 后在荧光倒置显微镜 488 nm 波长蓝光下观察绿色荧光表达情况,如图 2A 显示,接近 100% 的 293T 细胞检测到绿色荧光,部分细胞之间无明显间隙,细胞有明显拉丝现象,说明细胞已经开始生产慢病毒颗粒. 此时收集细胞培养上清液,即为慢病毒原液. 将大量收集的慢病毒原液,经超速离心机 30 000 r/min 离心 30 min 后,用 PBS 重悬病毒沉淀,得到纯化慢病毒载体. 纯化后慢病毒 PBS 稀释液滴度测定结果如图 2B. 滴度测定结果显示,包装出的 LV-3shRNA 慢病毒载体滴

度大约为 1×10^8 TU/mL.

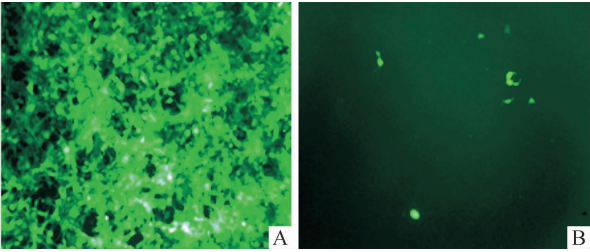


图2 慢病毒包装(A)及滴度测定(B)结果
Fig.2 Lentivirus package (A) and titre detection (B)

用未纯化的慢病毒原液感染 BHK-21 细胞,经流式细胞分选后,阳性细胞率接近 100% (图 3). 收集部分转基因细胞 BHK-LV,提取总 RNA,应用茎-环法进行实时定量 PCR. 定量 PCR 结果显示,3 个针对 FMDV 的 shRNA 在 BHK-LV 细胞中均有表达,而在普通 BHK-21 细胞中几乎没有表达. 比较 3 个 shRNA 的相对表达量,发现 Cons1 相对表达量最高,而 Cons3 的表达量相对最低(图 4).

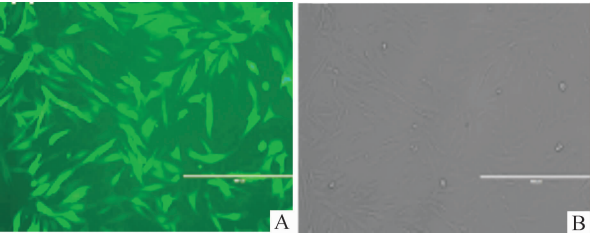


图3 荧光显微镜下观察转基因细胞 BHK-LV(200 ×)
Fig.3 The transgenic cells BHK-LV under fluorescence microscope (200 ×)

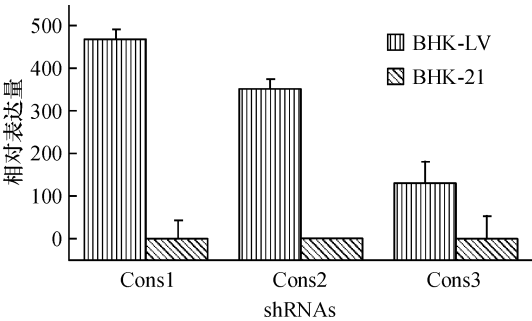


图4 转基因细胞 BHK-LV 中 3 个 shRNA 表达量
Fig.4 The bar graph of the expression of 3 shRNAs in the transgenic cells BHK-LV

2.3 FMDV 在转基因细胞内的复制情况

根据 10 倍梯度稀释后标准品所得的 C_t 值和拷贝数计算出标准曲线及回归方程, $y = -3.416x + 42.850$, R^2 值为 0.998,并且计算出引物的扩增效率为 96%.

用 O 型口蹄疫病毒 HKN/2002 感染转基因细胞 BHK-LV,分别在 1、6、12、18、24、36 和 48 h 等 7 个时

<http://xuebao.scau.edu.cn>

间点收集细胞及上清液,提取 RNA 进行实时定量 PCR,以测定病毒 RNA 拷贝数. 用线性图(图 5)表示等量的 FMDV 病毒在转基因细胞和普通细胞中复制情况. 结果显示,接 10^7 TCID₅₀ O 型 FMDV 强毒后 6 h 时,图 5 中复制曲线上 2 种细胞病毒 RNA 拷贝数几乎没有差别,因此这一时间点可视为 shRNA 作用导致病毒复制差异的起始点,此时,2 种细胞的病毒 RNA 拷贝数均达到约 1.50×10^7 . 在接毒后 12 h 时转基因细胞 BHK-LV 中病毒拷贝数明显低于普通细胞 BHK-21 中的病毒. 而 24 h 时转基因细胞 BHK-LV 中的病毒量减少到普通细胞 BHK-21 中的约 1/3,直到 48 h 时转基因细胞仍表现出一定的抑制效果.

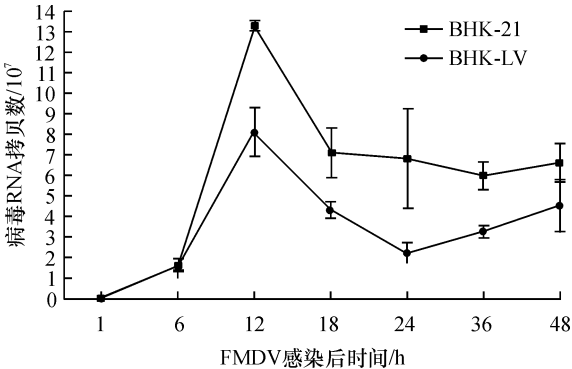


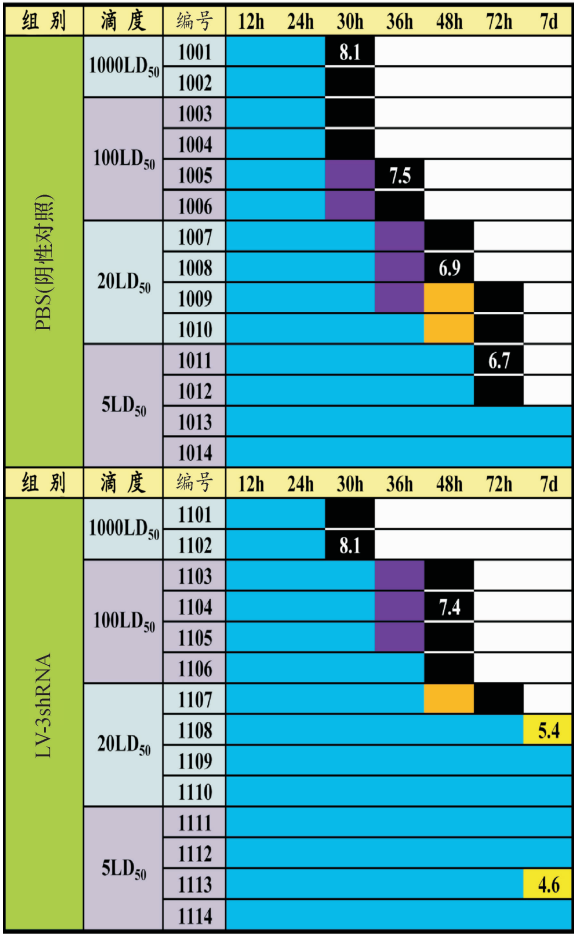
图5 FMDV 在转基因细胞 BHK-LV 中的复制曲线
Fig.5 The application curve of FMDV in transgenic cells BHK-LV

2.4 慢病毒 LV-3shRNA 处理乳鼠的抗 FMDV 感染力

预试验接种后 72 h 观察结果显示,稀释度 $10^5 \sim 10^7$ 组的昆明小鼠均无存活,而稀释度 10^8 组有 2/4 的小鼠存活,4 组的阴性对照小鼠均正常存活,故确定该批次 FMDV 的 LD₅₀ 为 10^8 稀释度.

将纯化后的 LV-3shRNA 经 PBS 稀释,颈后皮下注射 0.2 mL 试验乳鼠(LV-3shRNA 组)及 PBS 处理的阴性对照乳鼠,72 h 后均分别以不同滴度的 O 型 FMDV 攻毒,观察乳鼠在各时间点发病、濒死或死亡的情况. 检测结果显示,接毒后 72 h 内 NC 组在 5 LD₅₀ 滴度下有 2 只乳鼠发病死亡,在 20 LD₅₀ 滴度下无乳鼠存活;而 LV-3shRNA 组在 5 LD₅₀ 滴度下没有乳鼠发病死亡,在 20 LD₅₀ 滴度下仍有 3 只乳鼠存活至第 7 天;此外 LV-3shRNA 组在 1 000、100、20 和 5 LD₅₀ 滴度攻击时,其死亡乳鼠的存活时间相比 NC 组均有所延长(图 6). 在各滴度内随机选取 1 只乳鼠解剖,取等质量胴体提取 RNA,对 3D 基因定量检测结果显示,在 1 000 和 100 LD₅₀ 滴度内,LV-3shRNA 组样品中病毒含量的 log10 值分别为 8.1 和 7.4,而阴性对照组样品同滴度测定数值分别为 8.1 和 7.5,两

组数值无显著差别. 而 LV-3shRNA 组 20 和 5 LD₅₀ 滴度内存活乳鼠的胴体样品中,病毒含量的 log₁₀ 值分别为 5.4 和 4.6,这明显低于阴性对照组中死亡乳鼠样品中的数值 6.9 和 6.7(图 6).



蓝色表示健康,黑色表示死亡,紫色表示发病,橙色表示濒死,黄色表示健康乳鼠为检测而进行解剖. 各色块上的数值为乳鼠胴体病毒拷贝数的 log₁₀ 值.

图 6 慢病毒处理乳鼠抵抗 FMDV 能力检测
Fig. 6 The detection of Anti-FMDV ability of lentivirus-treated sucking mice

3 讨论

本研究借鉴 Kahana 等^[1]研究,设计了 3 个 shRNA,并用新克隆的水牛 RNA 聚合酶 III 启动子来引导,希望整合这些基因后,能在细胞内转录出高效 siRNA,以达到提高细胞甚至动物对 FMDV 的抵抗力. 此外笔者设计了多个 shRNA 串联表达的结构,并分别用不同的启动子引导,使转入的载体能同时表达多个 shRNA,而每个 shRNA 表达的效率与单个 shRNA 表达载体的效率无显著差别^[11]. 这样的结构一方面避免了多次转染以及多次慢病毒包装带来的不便和对细胞或动物带来的不必要的损伤;另一方

面这样的针对多个位点的 shRNA 表达,能有效地降低病毒逃逸的几率^[11]. 本研究利用第 3 代慢病毒载体 3 质粒系统,构建多个抗口蹄疫 shRNA 表达慢病毒载体. 慢病毒载体因其转染效率、整合效率高,且既可转染处于有丝分裂活跃期的细胞,又可转染分裂缓慢及处于分裂终末期的细胞,受到科学家们的青睐,成为体内和体外基因转移的一种有效方便的工具. 由于 BHK-21 是公认的 FMDV 感染试验模型,本研究选择 BHK-21 制备转基因细胞. 通过检测转基因细胞中 3 个 shRNA 的表达量,确保该多个抗口蹄疫 shRNA 表达载体的有效性,以保证抑制 FMDV 复制试验的可行性和真实性. RNAi 的作用时间短和病毒的抑制效率低一直是 RNAi 用于病毒防治上的一个挑战^[14]. 在 2004 年 Chen 等^[15]报道中,构建了针对 FMDV 的 1D 基因的 shRNA 表达载体,在 BHK-21 中没有产生对 FMDV 完全抑制的效果. 同样,科学家们在 IBR-2 细胞中转染针对 2B 基因的 shRNA 表达载体^[3],以及在 BHK-21 中直接转染化学合成或通过 Cocktail 试剂盒合成的 siRNA,所得结果也是相似的^[2, 4]. 在本研究中,用高滴度的慢病毒载体作为转基因细胞的介导表达载体,是为了更高效地获得转基因细胞. 在转基因细胞 BHK-LV 抑制病毒复制试验中,为了证明转基因细胞抑制 FMDV 的能力,本研究对普通和转基因细胞接种 10⁷ TCID₅₀ O 型 FMDV (HKN/2002),这个剂量是常规检测剂量的 10⁴ 倍^[2, 15-17]. 通过观察试验结果,在高滴度 FMDV 感染下,转基因细胞具有的稳定持续表达 shRNA 并能有效减少 2/3 的病毒量,达到超过 50% 的抑制率,从功能上证明这个多抗口蹄疫 shRNA 在慢病毒载体中得以有效表达.

在细胞水平上验证抗口蹄疫慢病毒载体对 FMDV 的抑制能力后,本试验进一步在 3~5 日龄的小鼠中验证多 shRNA 表达慢病毒载体抵御 FMDV 的能力. 之前的相关报道中,人们曾用单一针对口蹄疫病毒 shRNA 的表达质粒以及腺病毒载体注射入小鼠^[18]、豚鼠或仔猪^[17]体内,之后接种 FMDV,通过观察动物的发病率或死亡率发现,在乳鼠 5 LD₅₀ (半数致死量)以及豚鼠和猪的 50 ID₅₀ (半数传染量)内载体对动物有一定保护效果,而 FMDV 高滴度下均对动物无保护效果. 本试验通过超速离心,获得高度纯化的多个抗口蹄疫 shRNA 表达慢病毒颗粒,以确保其在动物体中的转染效率. 预处理慢病毒载体的乳鼠在 5 LD₅₀ 的滴度下均得到存活,而且在 20 LD₅₀ 的滴度下死亡率仅为 1/4. 这样的试验结果优于之前的

相关报道^[17-18],进一步证明多个 shRNA 表达慢病毒载体在动物体内抗病毒作用比单个 shRNA 表达质粒或腺病毒载体明显。

预处理 LV-3shRNA 的乳鼠能成功获得较强的 FMDV 抗性,从一定程度上证明了慢病毒载体的免疫注射对于病毒病的防治是有效的,这为进一步探讨多个 shRNA 串联表达抗口蹄疫慢病毒载体介导的基因治疗在偶蹄类家畜中的应用提供了试验依据,也为通过转基因方法改良家畜品种、提高抗病能力这一途径奠定了基础。

参考文献:

- [1] KAHANA R, KUZNETZOVA L, ROGEL A, et al. Inhibition of foot-and-mouth disease virus replication by small interfering RNA[J]. J Gen Virol, 2004, 85 (Pt 11): 3213-3217.
- [2] LIU Mingqiu, CHEN Weizao, NI Zheng, et al. Cross-inhibition to heterologous foot-and-mouth disease virus infection induced by RNA interference targeting the conserved regions of viral genome[J]. Virology, 2005, 336 (1): 51-59.
- [3] DE LOS SANTOS T, WU Qiaohua, DE AVILA BOTTON S, et al. 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 (2): 222-231.
- [4] MOHAPATRA J K, SANYAL A, HEMADRI D, et al. Evaluation of *in vitro* inhibitory potential of small interfering RNAs directed against various regions of foot-and-mouth disease virus genome[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2005, 329 (3): 1133-1138.
- [5] DAS A T, BRUMMELKAMP T R, WESTERHOUT E M, et al. Human immunodeficiency virus type 1 escapes from RNA interference-mediated inhibition[J]. J Virol, 2004, 78 (5): 2601-2605.
- [6] GITLIN L, STONE J K, ANDINO R. Poliovirus escape from RNA interference: Short interfering RNA-target recognition and implications for therapeutic approaches[J]. J Virol, 2005, 79 (2): 1027-1035.
- [7] CHANG L J, LIU X, HE J. Lentiviral siRNAs targeting multiple highly conserved RNA sequences of human immunodeficiency virus type 1[J]. Gene Ther, 2005, 12 (14): 1133-1144.
- [8] DAVE R S, POMERANTZ R J. Antiviral effects of human immunodeficiency virus type 1-specific small interfering RNAs against targets conserved in select neurotropic viral strains[J]. J Virol, 2004, 78 (24): 13687-13696.
- [9] GEISBERT T W, HENSLEY L E, KAGAN E, et al. Post-exposure protection of guinea pigs against a lethal ebola virus challenge is conferred by RNA interference[J]. J Infect Dis, 2006, 193 (12): 1650-1657.
- [10] SONG Erwei, LEE S K, WANG Jie, et al. RNA interference targeting fas protects mice from fulminant hepatitis[J]. Nat Med, 2003, 9 (3): 347-351.
- [11] TER BRAKE O, 'T HOOFT K, LIU Y P, et al. Lentiviral vector design for multiple shRNA expression and durable HIV-1 inhibition[J]. Mol Ther, 2008, 16 (3): 557-564.
- [12] SHAW A E, REID S M, EBERT K, et al. Implementation of a one-step real-time RT-PCR protocol for diagnosis of foot-and-mouth disease[J]. J Virol Methods, 2007, 143 (1): 81-85.
- [13] LU Zengjun, CAO Yimei, GUO Jianhong, et al. Development and validation of a 3ABC indirect ELISA for differentiation of foot-and-mouth disease virus infected from vaccinated animals[J]. Vet Microbiol, 2007, 125 (1/2): 157-169.
- [14] BAYRY J, TOUGH D F. Is RNA interference feasible for the control of foot-and-mouth disease outbreaks? [J]. Trends Immunol, 2005, 26 (5): 238-241.
- [15] CHEN W, YAN Weiyao, DU Qingyun, et al. RNA interference targeting VP1 inhibits foot-and-mouth disease virus replication in BHK-21 cells and suckling mice[J]. J Virol, 2004, 78 (13): 6900-6907.
- [16] LUO Jihuai, DU Junzheng, GAO Shandian, et al. Lentiviral-mediated RNAi to inhibit target gene expression of the porcine integrin alphav subunit, the FMDV receptor, and against FMDV infection in PK-15 cells [J]. Virol J, 2011, 8: 428.
- [17] CHEN Weizao, LIU Mingqiu, JIAO Ye, et al. Adenovirus-mediated RNA interference against foot-and-mouth disease virus infection both *in vitro* and *in vivo* [J]. J Virol, 2006, 80 (7): 3559-3566.
- [18] WANG Pengyan, REN Yan, GUO Zhiru, et al. Inhibition of foot-and-mouth disease virus replication *in vitro* and *in vivo* by small interfering RNA [J]. Virol J, 2008, 5: 86.

【责任编辑 柴 焰】