

siRNA 抑制口蹄疫病毒在 BHK-21 细胞中复制的研究

王伟利, 陈立军, 赵明秋, 琚春梅, 陈金顶

(华南农业大学 兽医学院, 广东 广州 510642)

摘要:选取口蹄疫病毒(FMDV)的 VP1、IRES、2B、3D 和 L 基因保守序列,设计、合成 siRNA,并成功构建表达 siRNA 的穿梭载体,通过脂质体 2000 在 BHK-21 细胞上转染 6 个重组 siRNA 表达质粒,观察其对 FMDV S72 毒株复制的抑制效果. 结果发现:病毒对照和空载体对照细胞死亡脱落,脂质体 2000 对照和细胞对照细胞状态良好; 6 个 siRNA 转染孔细胞状态明显优于病毒对照孔,表明 6 个重组质粒转染后均可以显著抑制 FMDV S72 毒株的复制,其中靶向 IRES1 基因的 siRNA 对 FMDV 的复制抑制最为明显.

关键词:口蹄疫病毒; RNA 干扰; siRNA; BHK-21 细胞

中图分类号:S852.65

文献标识码:A

文章编号:1001-411X(2009)04-0116-03

Study on Inhibition of Replication of FMDV in BHK-21 Cell by siRNA

WANG Wei-li, CHEN Li-jun, ZHAO Ming-qiu, JU Chun-mei, CHEN Jin-ding

(College of Veterinary Medicine, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: The antiviral potential of 6 siRNAs which targeting VP1, IRES, 2B, 3D and L genes of foot-and-mouth disease virus (FMDV) were designed and evaluated in this study. Results showed that all of the 6 recombinant siRNA expression plasmids had dramatically inhibition effect on FMDV S72 in BHK-21 cell, and the plasmid Shuttle-IRES1 had the most distinct effect.

Key words: foot-and-mouth disease virus; RNAi; siRNA; BHK-21 cell

口蹄疫(Foot-and-mouth disease, FMD)是由口蹄疫病毒(Foot-and-mouth disease virus, FMDV)引起的一种主要侵害偶蹄动物的烈性传染病^[1]. FMDV 由于易感动物繁多、感染剂量较低,感染后排毒量高,传播距离远,病毒复制周期短等特点,常暴发流行. 常采用的防控策略是疫苗免疫和扑杀. 疫苗免疫通常要在接种后 15 d 才能产生有效的保护抗体,而 FMDV 传播迅速,感染后的猪能够在 24 h 内释放出足够感染 3 000 头牛的气溶胶^[2]. 单独的扑杀策略也并不足以清除病毒. 由于缺乏有效的防控手段,口蹄疫每年造成巨大的经济损失,急需探索新的防控策略. RNA 干扰可能是抗病毒感染的有效措施. RNA 干扰(RNA interference, RNAi)是由小干扰 RNA (small interfering RNA, siRNA)介导的、序列特异的、基因表达沉默的抗病毒机制. FMDV 属于小 RNA 病

毒科、口蹄疫病毒属,为单股正链 RNA 病毒,适于进行 RNAi 的研究^[3]. 本研究针对 FMDV 病毒基因组的保守区域选取多个靶序列同时进行干扰,结果显示,本研究设计合成的 siRNA 能够快速而特异地抑制 FMDV 在 BHK-21 细胞中的复制.

1 材料与方法

1.1 材料

仓鼠肾细胞(BHK-21 cell)由华南农业大学兽医学院微生物与免疫学教研室保存. siRNA 重组质粒 Shuttle-IRES1、Shuttle-IRES2、Shuttle-L、Shuttle-VP1、Shuttle-2B 和 Shuttle-3D 由华南农业大学兽医学院微生物与免疫学教研室陈立军设计合成. D6950-01 去内毒素的质粒抽提试剂盒为 OMEGA 公司产品; Lipofectamine 2000 为 Invitrogen 公司产品.

收稿日期:2008-09-18

作者简介:王伟利(1978—),男,硕士;通讯作者:赵明秋(1965—),女,助理研究员,E-mail:zmingqiu@21cn.com

基金项目:广州市科技计划项目(2008Z1-E011);教育部“长江学者和创新团队发展计划”创新团队项目(TRT0723);广东省自然科学基金创新团队项目(5200638);广东省自然科学基金(020995,06025827)

1.2 方法

1.2.1 pSIREN-siRNA 重组质粒的引物设计 为了鉴定重组质粒中是否含有目的 siRNA, 根据 pSIREN-Shuttle 载体序列, 用 Primer Premier 5.0 软件设计了 1 对引物, P1: 5'-GGTCCTAAGGTAGCGAAAG-3' 和 P2: 5'-GCACCCGACATAGATGAA-3', 引物由上海生物工程有限公司合成。

1.2.2 菌液 PCR 取 -20 °C 保存的 6 种含 siRNA 重组质粒的菌液划线接种于含 50 μg/mL 卡那霉素 (Kan) 平板, 过夜培养; 用灭菌牙签挑取菌落于含 50 μg/mL Kan 的 3 mL LB 液体培养基中, 37 °C 振荡培养 4~6 h, 取菌液进行 PCR 鉴定, 反应条件为: 94 °C 2 min, 94 °C 30 s, 48.5 °C 45 s, 72 °C 1 min, 30 个循环, 最后 72 °C 延伸 10 min. PCR 产物进行 0.015 g/mL 琼脂糖凝胶 (含 0.5 μg/μL E. B.) 电泳检测。

1.2.3 siRNA 重组质粒的制备 挑选 PCR 鉴定阳性菌液, 按体积分数 1% 的比例接种至 50 mL 含 50 μg/mL Kan 抗性 LB 液体培养基中, 37 °C 180 r/min 培养 6~8 h; OMEGA D6950-01 去内毒素的质粒抽提试剂盒抽提质粒. -20 °C 保存备用。

1.2.4 siRNA 对 FMDV 复制的抑制试验 将适量 BHK-21 细胞接种 24 孔细胞培养板, 待细胞发生 90% 融合时, 按 1 μg 重组质粒加入 3 μL 脂质体的比例分别转染 0.7 μg 各重组 siRNA 表达质粒, 具体操作参照 Lipofectamine™ 2000 转染试剂说明书进行. 每组 3 个重复, 同时设立细胞对照、病毒对照、Lipofectamine 2000 毒性对照和空载体对照. 转染 12 h 后接种 100 TCID₅₀ FMDV, 接毒 24 h 后倒置显微镜下观察细胞病变情况。

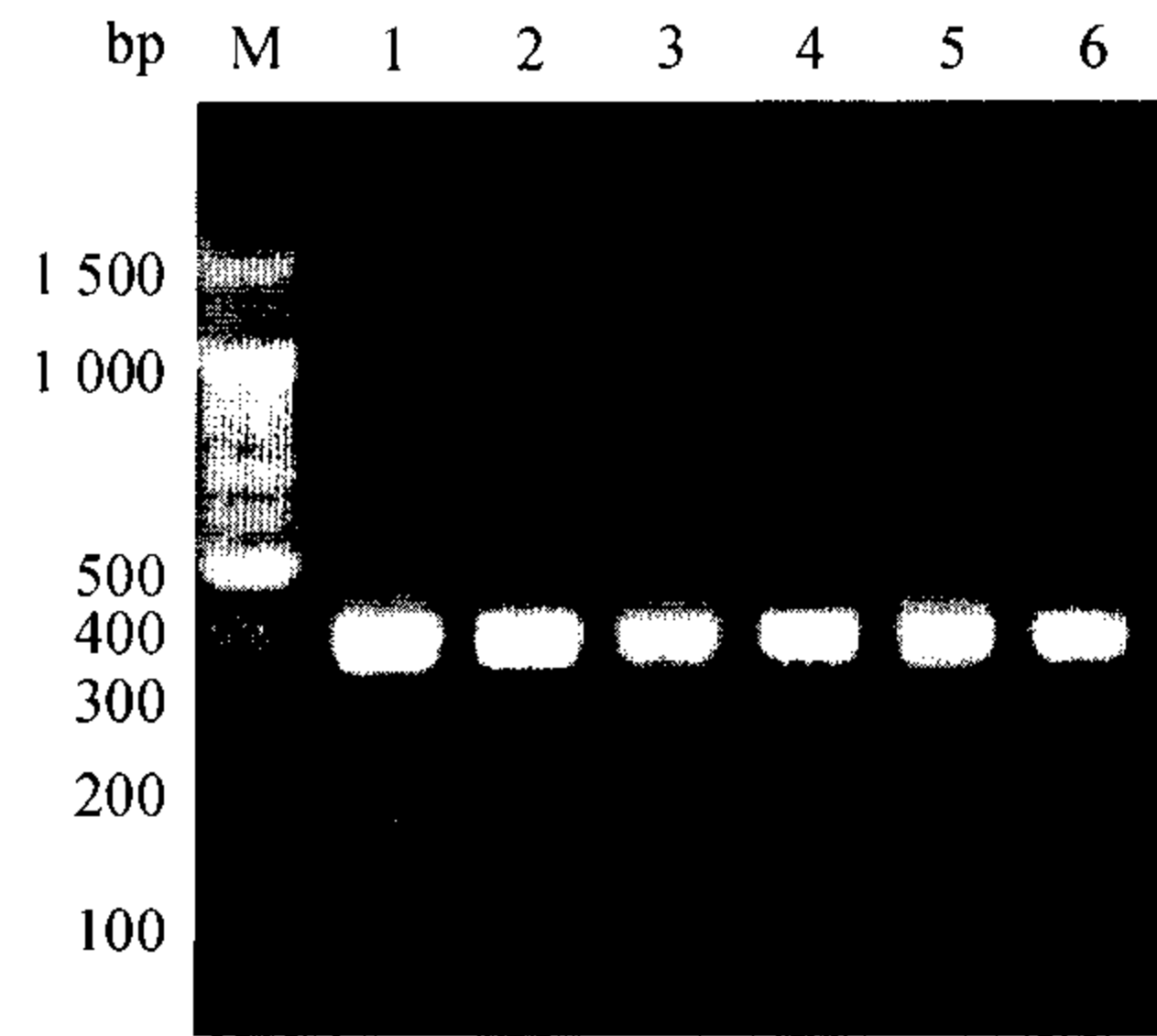
2 结果与分析

2.1 菌液 PCR 鉴定

对含有 6 种重组质粒的菌液进行 PCR 扩增, PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳检测, 结果如图 1 所示, 6 种菌液均能够扩增出 378 bp 左右的 DNA 片段, 与预期的大小相符, 表明 6 种质粒均含有 siRNA 片段。

2.2 siRNA 重组质粒干扰效果

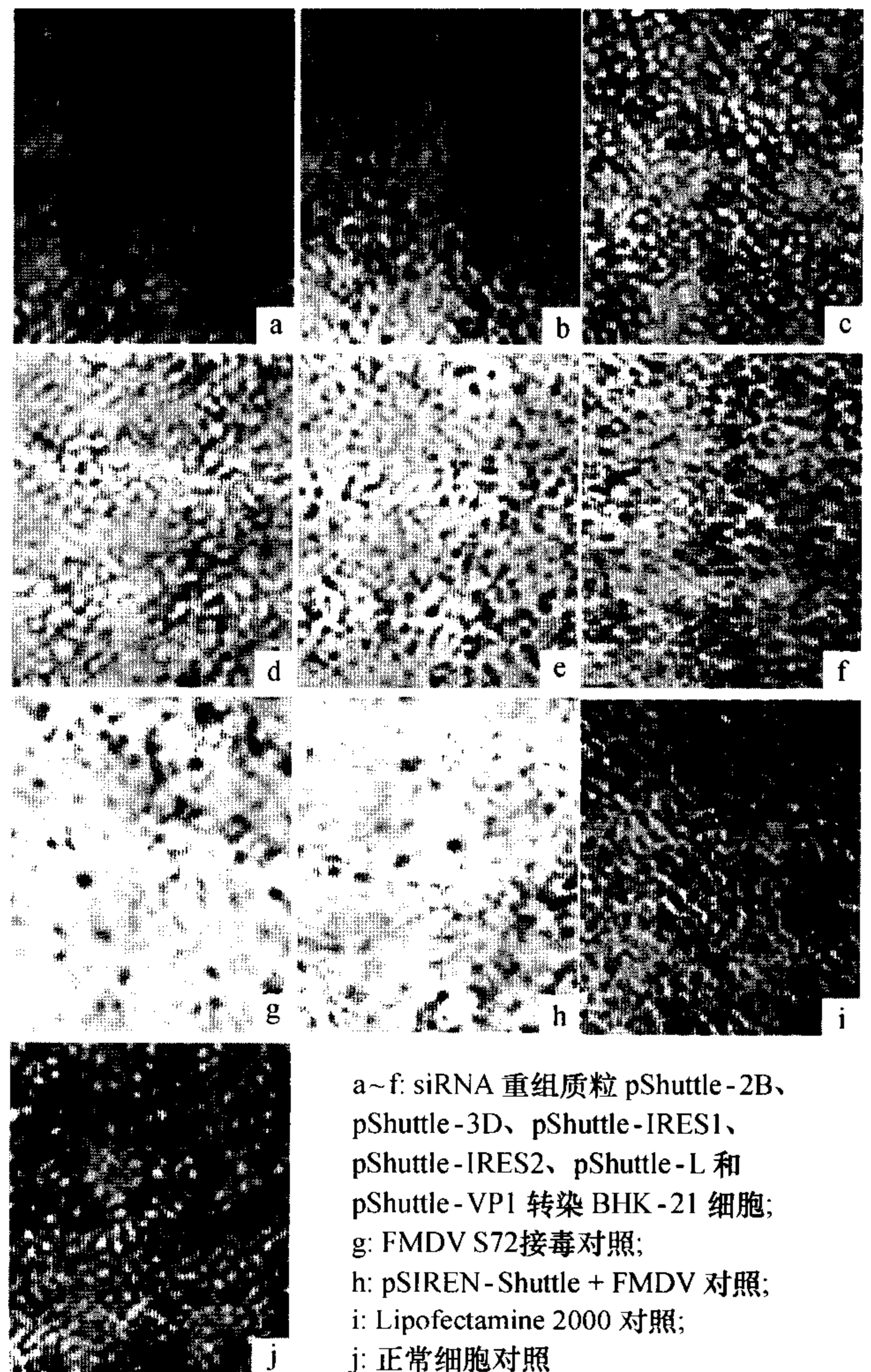
将抽提的不含内毒素的 siRNA 表达质粒转染 BHK-21 细胞, 同时设立相应对照. 12 h 后, 各孔分别加入 100 个 TCID₅₀ 的 S72 毒株病毒液, 24 h 后显微镜下观察细胞病变 (CPE) 出现情况. 发现: pSIREN-Shuttle 载体对照孔和接毒对照孔大部细胞死亡脱落, Lipofectamine2000 对照孔有少量细胞死亡, 细胞对照状态良好, 转染 6 个重组质粒孔的细胞状态明显优于病毒对照, 表明 6 个质粒对 FMDV S72 毒株的复制均有显著的抑制效果, 其中 Shuttle-IRES1 效果最为显著 (见图 2)。



M: 100 bp DNA Ladder marker; 1~6 分别为 Shuttle-IRES1、Shuttle-IRES2、Shuttle-L、Shuttle-VPI、Shuttle-2B 和 Shuttle-3D 的菌液 PCR 鉴定

图 1 菌液 PCR 鉴定

Fig. 1 Bacterial PCR detection



a~f: siRNA 重组质粒 pShuttle-2B、pShuttle-3D、pShuttle-IRES1、pShuttle-IRES2、pShuttle-L 和 pShuttle-VPI 转染 BHK-21 细胞; g: FMDV S72 接毒对照; h: pSIREN-Shuttle + FMDV 对照; i: Lipofectamine 2000 对照; j: 正常细胞对照

图 2 siRNA 重组表达质粒抑制 FMDV 在 BHK-21 细胞中的复制 (100 ×)

Fig. 2 Recombinant siRNA expression plasmids inhibit the replication of FMDV in BHK-21 cells (100 ×)

3 讨论

近年来, RNAi 已经发展成为一个下调细胞内生、外生或寄生表达的有效工具^[4-6]. 对于有效 siRNA 目

标区域内部或者周围的 RNA 结构,文献资料有不同的报道:在对脊髓灰质炎病毒的研究中表明 5'UTR 区域的 IRES 可能不适于作为 RNAi 靶点^[7];与之相反,在对于肝炎病毒的研究中,以 IRES 区域作为 RNAi 的靶标证明是成功有效的^[8].为了验证上述矛盾的研究结果,本研究针对 FMDV 的 IRES 区域设计、合成了 2 条 siRNA,并构建相应的重组质粒,结果显示,靶向 FMDV IRES 基因的 siRNA 重组表达质粒能够显著地抑制 FMDV 在 BHK-21 细胞中的复制.这可能是由于不同病毒的 IRES 区域有不同的高级结构所致,肝炎病毒和口蹄疫的 IRES 区域的高级结构相对更有利于 RNAi 沉默复合物进入并与其发生相互作用.

FMDV 是一个极易变异的 RNA 病毒,能够通过改变其表面抗原位点的方式逃脱宿主免疫系统^[9-10],因此常规的疫苗免疫无法有效地控制 FMD 的传播,而常用的灭活疫苗也存在着灭活不完全的危险. RNAi 的出现为我们防治 FMD 提供了新的思路, RNAi 可对多种病毒的复制产生干扰作用,特别是对正链 RNA 病毒更为有效,因为正链 RNA 病毒的基因组既是 mRNA,又可作为病毒复制的模板^[11],口蹄疫病毒为单股正链 RNA 病毒,其基因组上存在大量 siRNA 潜在靶位点,是利用 RNAi 防制的理想对象. Chen 等^[12]针对 FMDV 的 VP1 设计的 siRNA 能够在 BHK-21 细胞上有效地抑制 FMDV 的复制,将含有此 siRNA 片段的质粒注射乳鼠,结果发现注射后的乳鼠对 FMDV 的攻击有相当的保护作用. Santos 等^[13]针对 FMDV 的基因特点设计了 5 个 siRNA,通过比较发现靶向 2B 基因的 2B-siRNA 对病毒的复制抑制作用最为有效,他们进一步研究发现,2B-siRNA 还可以抑制多个血清型 FMDV 的复制.本研究参考 GenBank 中公布的 FMDV 基因序列,通过多序列比对,选择 FMDV 基因组中相对保守的 IRES、L、VP1、2B 和 3D 区域设计、合成的 siRNA,这几个区域在病毒复制周期中均有着重要作用,任意基因的表达抑制,均会明显地抑制 FMDV 的增殖.

参考文献:

- [1] 殷震,刘景华.动物病毒学[M].2版.北京:科学出版社,1997:479-498.
- [2] SALT J S, BAMETT P V, DANII P, et al. Emergency vaccination of pigs against foot-and-mouth disease: Protection against disease and reduction in-contact transmission [J]. *Vaccine*, 1998, 16: 746-754.
- [3] KANDA T, KUSOV Y, YOKOSUKA O, et al. Interference of hepatitis A virus replication by small interfering RNAs [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, 318 (2): 341-345.
- [4] MCMANUS M T, SHARP P A. Gene silencing in mammals by small interfering RNAs [J]. *Nat Rev Genet*, 2002, 3: 737-747.
- [5] MORRIS K V, CHAN S, JACOBSEN S E, et al. Small interfering RNA-induced transcriptional gene silencing in human cells [J]. *Science*, 2004, 27: 1289-1292.
- [6] SALEH M C, VAN RIJL R P, ANDINO R. RNA silencing in viral infections: Insights from poliovirus [J]. *Virus Res*, 2004, 102(1): 11-17.
- [7] 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.
- [8] YOKOTA T, SAKAMOTO N, ENOMOTO N, et al. Small interfering RNA molecules as potential anti-human rhinovirus agents: *in vitro* potency, specificity, and mechanism [J]. *Antiviral Res*, 2004, 61: 49-55.
- [9] MASON P W, GRUBMAN M J, BAXT B. Molecular basis of pathogenesis of FMDV [J]. *Virus Res*, 2003, 91 (1): 9-32.
- [10] GITLIN L, ANDINO R. Nucleic acid-based immune system: The antiviral potential of mammalian RNA silencing [J]. *J Virol*, 2003, 77(13): 7159-7165.
- [11] KANDA T, KUSOV Y, YOKOSUKA O, et al. Interference of hepatitis A virus replication by small interfering RNAs [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, 318 (2): 341-345.
- [12] CHEN Wei-zao, YAN Wei-yao, DU Qing-yun, 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.
- [13] SANTOS T, WU Q, BOTTON S V, 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.

【责任编辑 柴 焰】