

靶向山羊痘病毒DNA聚合酶基因shRNA质粒表达载体的构建及筛选

王安涛^{1,3} 陈创夫^{1*} 乔军^{1*} 张辉² 张娜¹ 胡圣伟²

(¹石河子大学生命科学学院, 石河子 832003; ²石河子大学动物科技学院, 石河子 832003; ³新疆民族与地方高发病教育部重点实验室, 石河子 832003)

摘要 本研究针对山羊痘病毒基因组高度保守的DNA聚合酶区段, 选取了5个干扰靶位点。根据RNAi技术原理, 构建了包括对照在内的6个shRNA重组表达质粒, 转染细胞后接种病毒, 通过细胞毒液的TCID₅₀测定和用实时荧光定量PCR检测siRNA重组质粒对羊痘病毒DNA聚合酶基因表达的抑制作用。结果显示, 重组表达质粒组的抑制率在63%以上, 其中以pSI-W2最为明显, 抑制率为93.8%。该研究应用RNAi技术在细胞水平筛选出了能够高效抑制山羊痘病毒增殖的干扰片段, 为抗山羊痘病毒转基因羊的研究奠定了基础。

关键词 RNAi; 山羊痘病毒; BHK-21; 抑制

羊痘是由羊痘病毒引起的一种急性、热性、接触性传染病。其特征是发热、无毛或少毛部位皮肤黏膜发生丘疹和疱疹。羊痘是所有动物痘病中最为严重的一种, 经常引起羔羊的死亡, 致死率可达100%, 成年易感绵羊的死亡率也在50%左右。因此被世界动物卫生组织(OIE)列为A类重大传染病, 我国将其列为一类动物疾病^[1]。该病不仅给养羊业带来巨大的经济损失, 还严重影响国际贸易, 阻碍了养羊业的快速发展^[2], 因此目前迫切需要研究防控该病的新途径。

自从RNAi发现后^[3], RNAi技术已被广泛应用于基因功能、遗传规律、生长发育、信号转导、抗肿瘤和抗病毒等领域, 在抗病毒研究中充分显示出其巨大的应用潜力, 有望成为防控病毒性疫病的一种新手段^[4,5]。山羊痘病毒DNA聚合酶是痘病毒在复制过程中的核心酶, 其主要活性是催化DNA的合成及其相辅的活性。本研究针对山羊痘病毒DNA聚合酶基因设计RNA干扰片段, 构建山羊痘病毒小分子siRNA质粒载体转染细胞, 从而沉默羊痘病毒DNA聚合酶基因的表达, 进而抑制病毒基因和蛋白的合成, 最终降低病毒基因的复制效率, 为抗山羊痘病毒转基因羊及相关的科学研究奠定了一定的基础。

杆菌DH5 α 由本室保存; BHK-21乳仓鼠肾细胞系, 常规培养传代; 毒株山羊痘病毒疫苗弱毒株为新疆天康畜牧生物技术股份有限公司制药事业部保存; RNAi表达载体RNAi-Ready pSIREN-RetroQ ZsGreen Vector(图1)试剂盒购自美国BD Bioscience Clontech公司。

1.1.2 主要试剂 DMEM培养基、PBS、胰酶和胎牛血清为GIBCO产品, 反转录酶 M-MLV、限

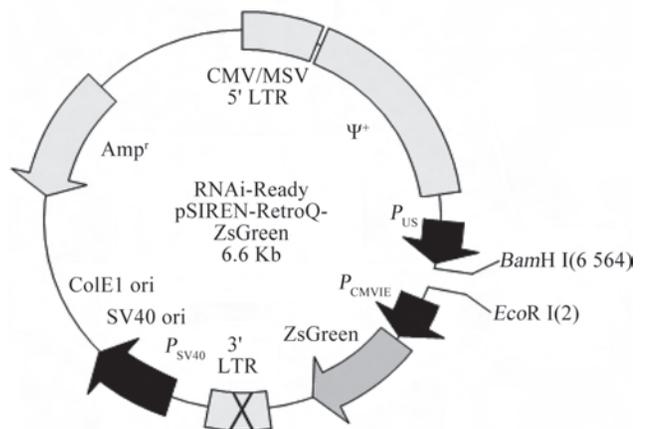


图1 pSI载体图谱

Fig.1 Map of RNAi-ready pSIREN-RetroQ ZsGreen vector

收稿日期: 2010-11-23 接受日期: 2011-02-21

转基因生物新品种培育国家重大专项(No.2009ZX08005-003B)资助项目

*通讯作者。Tel: 0993-2058002, E-mail: ccf-xb@163.com; E-mail: qj710625@yahoo.com.cn

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株、毒株、细胞株和载体 菌株大肠

制性内切酶购自大连TaKaRa公司, TurboFectTM *in vitro* Transfection Reagent脂质体转染试剂盒和Trizol均购自Invitrogen公司, 荧光定量PCR试剂盒购自大连TaKaRa公司, 常用分子生物学试剂购自上海生工生物工程有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 siRNA分子的设计

根据siRNA设计的原则, 通过Ambion在线辅助设计工具, 分别设计包含目的基因siRNA序列的正义链和反义链寡核苷酸序列, 在正义链和反义链序列间加入间隔序列TTC AAG AGA, 使其能形成发夹结构, 在反义链的3'端加入RNA polymerase的终止序列TTT TTT, 后再加上BamH I和EcoR I酶切位点适配序列。在本研究中设计5对阳性siRNA (靶位点为: 1 065~1 085, 1 074~1 094, 1 204~1 224, 2 374~2 394, 3 005~3 025)和一对阴性siRNA, 分别命名为pSI-W1, pSI-W2, pSI-W3, pSI-W4, pSI-W5, 阴性对照siRNA命名为pSI-W0, 且不与其它基因同源, 根据载体特性, 合成发卡结构shRNA对应的DNA序列(表1)。序列合成由上海生工生物工程技术公司完成。

1.2.2 RNAi山羊痘病毒DNA聚合酶基因的绿色荧光蛋白重组表达质粒的构建

按照RNAi-Ready pSIREN-RetroQ ZsGreen Vector试剂盒说明书进行, 将合成的正义链DNA片段, 以去离子水溶解, 终浓度为100 $\mu\text{mol/L}$, 各取10 μl 后PCR仪上退火形成双链。冰上放置后-20 $^{\circ}\text{C}$ 储存备用; RNAi-Ready pSIREN-RetroQ ZsGreen Vector质粒载体经BamH I和EcoR I双酶切后胶回收纯化; 将退火双链小片段与载体混合连接, 分别命名为pSI-W1、pSI-W2、pSI-W3、pSI-W4、pSI-W5、pSI-W0; 连接产物转化感受态大肠杆菌DH5 α , 筛选阳性菌落, 送上海生工生物工程技术服务有限公司测序, 鉴定插入序列是否正确。

1.2.3 细胞的培养与重组质粒转染后接毒

BHK-21细胞用含10%小牛血清DMEM培养基(100 U青霉素/mL、100 U链霉素/mL)培养, 细胞生长为对数时期时, 将细胞转入6孔板中, 置于37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO₂的培养箱中培养, 待细胞生长稳定后用TurboFectTM *in vitro* Transfection Reagent脂质体转染, 转染6 h后, 每孔以 $1 \times 10^{5.7}$ TCID₅₀/孔的山羊痘病毒感染细胞, 继续

表1 合成的shRNA对应DNA序列

Table 1 Synthesized DNA sequence correlated to shRNA

shRNA名称	shRNA序列(5'-3')
The name of shRNA	The sequences of shRNA(5'-3')
pSI-W1 P1 :	GAT CCA AAG TGC ATA AAC TGG TTC GAT TCA AGA GAT CGA ACC AGT TTA TGC ACT TTT TTT TTA CGC GTG
pSI-W2 P1 :	GAT CCA AAG ACG CTA CGT TGA AAG GAT TCA AGA GAT CCT TTC AAC GTA GCG TCT TTT TTT TTA CGC GTG
pSI-W3 P1 :	GAT CCA ATC CAT TGT GAA CCT AGA TGT TCA AGA GAC ATC TAG GTT CAC AAT GGA TTT TTT TTA CGC GTG
pSI-W4 P1 :	GAT CCA AAG AAG CAA CGG TTT CGA CTT TCA AGA GAA GTC GAA ACC GTT GCT TCT TTT TTT TTA CGC GTG
pSI-W5 P1 :	GAT CCA ACG GTT TCG ACT GAC AAA TCT TCA AGA GAG ATT TGT CAG TCG AAA CCG TTT TTT TTA CGC GTG
pSI-W0 P1 :	GAT CCA ATG CGA ACA ACA GTA GAG TCT TCA AGA GAG ACT CTA CTG TTG TTC GCA TTT TTT TTA CGC GTG

培养至48 h后, 收集细胞毒液-80 $^{\circ}\text{C}$ 储存备用。

1.2.4 总RNA的提取

从-80 $^{\circ}\text{C}$ 取出BHK-21细胞, 室温溶解后加入1 ml的TRIZOL试剂, 用0.2 ml氯仿和0.5 ml的异丙醇除去杂质并进行水相分离和RNA沉淀, 用无RNase的75%的乙醇除去盐离子并沉淀, 在超净工作台内风干后加入适量的RNase-free ddH₂O溶解RNA沉淀。取5 μl DNase I 处理的RNA, 用试剂盒进行常规的反转录反应使RNA逆转录成为cDNA, 所得cDNA-20 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

1.2.5 目标基因和内参基因实时定量引物的设计

在GenBank中查找羊痘病毒DNA聚合酶基因序列和内参基因序列, 根据Primer 3.0在线生物软件分别设计

了目标基因和内参基因的引物P1和P2、P3和P4, 扩增预期长度分别为301 bp和134 bp。由上海生工生物工程技术服务有限公司合成(表2)。

1.2.6 Real-time PCR检测细胞内目标基因mRNA的表达

以内参基因对目标基因的表达情况检测进

表2 实时定量PCR引物设计

Table2 Primers sequences for real-time PCR

基因名称	引物	引物序列(5'-3')
Gene	Primers	The sequences of primers(5'-3')
DNA Polymerase	P1	TAC ACC ACC AAC GCC TTT ATG A
	P2	GAA AGA CGC TAC GTT GAA AGG AT
β -actin	P3	ATT GTC ACC AAC TGG GAC AAT A
	P4	TCT GGG TCA TCT TTT CAC GGT T

行校正,制作目标基因的实时定量PCR标准曲线,并对每个样本进行检测,获得逆转录产物后,对目标基因表达实施定量PCR检测。

2 结果

2.1

将合成的正反义链DNA在PCR仪上退火合成双链(图2),由图2可以看出电泳条带为单一的条带,dsRNA合成成功。

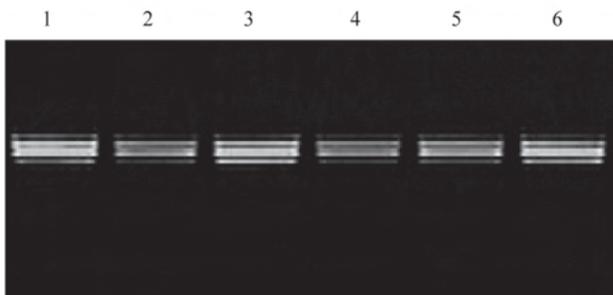


图2 siRNA合链结果电泳图

Lane 1-6: siRNA。

Fig.2 dsDNA of siRNA fragments

Lane 1-6: siRNA。

2.2 RNAi重组表达质粒的构建结果

连接转化后,提取转化菌质粒DNA,经测序结果表明每一种质粒都得到了插入序列完全正确的克隆,分别命名为pSI-W1、pSI-W2、pSI-W3、pSI-W4、pSI-W5、pSI-W0。

2.3 目标基因和内参基因的克隆结果

以克隆正确的DNA聚合酶和 β -actin质粒为模

板,用引物P1、P2和P3、P4对重组质粒进行扩增检测,可得到约301bp(图3A)和134bp(图3B)的DNA片段,与预期片段大小一致,表明已得到了阳性重组子。

2.4 细胞转染效率观察

经TurboFect™ *in vitro* transfection reagent脂质体转染法转染构建的重组表达质粒(携带有绿色荧光蛋白基因),约48 h后用荧光显微镜观察BHK-21中的绿色荧光表达蛋白,经计算质粒的转染效率约等于100%(图4)。

2.5 Real-time PCR检测结果分析

2.5.1 实时定量标准曲线的制作 以克隆正确的DNA聚合酶和 β -actin质粒为模板,分别建立6个100倍梯度稀释,绘制标准曲线。

DNA聚合酶基因标准曲线方程为: $Y = -3.483 \times \text{LOG}(X) + 39.82$, 相关系数为0.999(图5A); β -actin的标准曲线方程为: $Y = -3.285 \times \text{LOG}(X) + 43.53$, 相关系数为1.000(图5B)。每个点都在一条直线上,说明线性关系好,准确性高。

2.5.2 shRNA质粒干扰效果的检测 (1)瞬时转染细胞接种山羊痘病毒后不同时间TCID₅₀测定结果(表3): 转染pSi-shRNAs表达质粒的BHK-21细胞培养20 h, 分别于接毒后24 h、36 h、48 h收集三个时间段的细胞毒液以测定TCID₅₀。结果显示,干扰质粒与病毒共转染BHK-21后,干扰质粒组(pSI-W1~pSI-W5)毒液的TCID₅₀有所下降,其中pSI-W2的变化最为明显,从 $1 \times 10^{5.7}$ 下降到 $1 \times 10^{3.8}$,对照组pSI-W0基本无变化,该结果说明pSI-W2重组质粒抑制

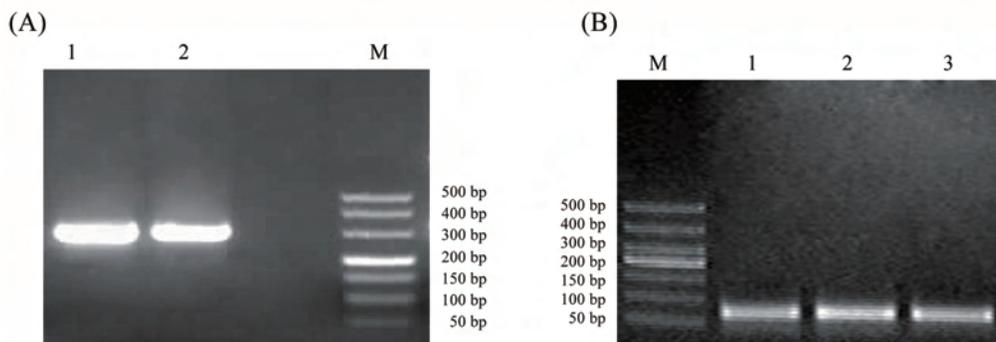


图3 目标基因和内参基因的克隆结果

A: 山羊痘病毒DNA聚合酶基因的扩增; Lane 1,2: 山羊痘病毒DNA聚合酶基因; M: DL500 marker; B: β -actin基因的扩增; Lane 1~3: β -actin基因; M: DL500 marker。

Fig.3 The results of target gene and reference gene cloning

A: PCR amplification of DNA polymerase of Goatpox virus; Lane 1,2: DNA polymerase of Goatpox virus gene; M: DL500 maker; B: PCR amplification of β -actin; Lane 1~3: β -actin gene; M: DL500 marker。

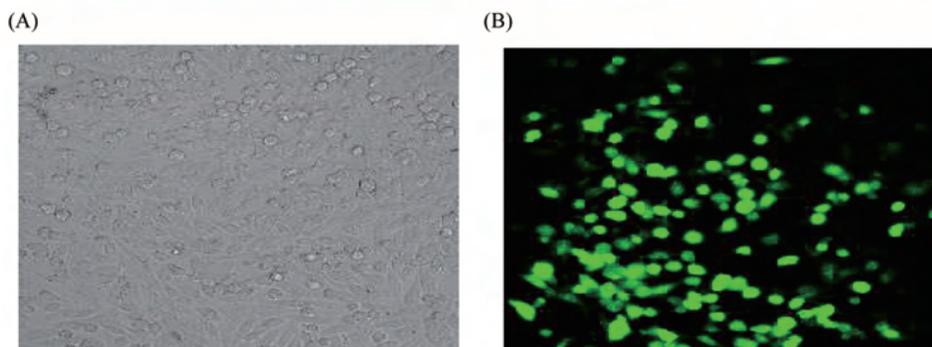


图4 BHK-21细胞转染siRNA表达质粒48 h的荧光照片

A: 对照细胞; B: 48小时。

Fig.4 The fluorescence of BHK-21 cells transfected with shRNA expression plasmids

A: control cells; B: 48 h.

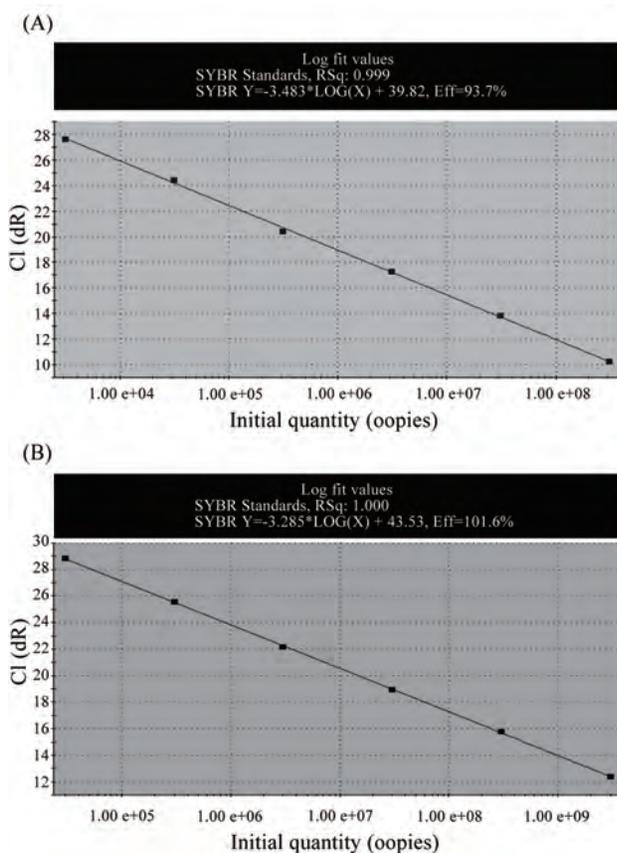


图5 实时定量标准曲线的制作

A: 山羊痘病毒DNA聚合酶标准曲线; B: β -actin标准曲线。

Fig.5 The curve of real-time quantitative standards

A: standard of DNA polymerase of Goatpox virus; B: standard curve of β -actin.

病毒复制的效果最好。(2)荧光定量PCR检测shRNA质粒抑制病毒复制效果: 以pSI-W1、pSI-W2、pSI-W3、pSI-W4、pSI-W5为干扰载体, 在细胞水平对山

表3 不同时间山羊痘病毒TCID₅₀的变化

Table 3 TCID₅₀ of GPV at different time

	24 h	36 h	48 h
pSI-W1	$1 \times 10^{5.8}$	$1 \times 10^{5.1}$	$1 \times 10^{4.4}$
pSI-W2	$1 \times 10^{5.7}$	$1 \times 10^{4.5}$	$1 \times 10^{3.8}$
pSI-W3	$1 \times 10^{5.8}$	$1 \times 10^{4.7}$	$1 \times 10^{4.1}$
pSI-W4	$1 \times 10^{5.9}$	$1 \times 10^{5.2}$	$1 \times 10^{4.3}$
pSI-W5	$1 \times 10^{5.5}$	$1 \times 10^{4.6}$	$1 \times 10^{4.2}$
pSI-W0	$1 \times 10^{5.6}$	$1 \times 10^{5.4}$	$1 \times 10^{5.8}$

羊痘DNA聚合酶进行沉默(48 h), 以相应的DNA聚合酶基因检测值/ β -actin的检测值作为校正值, 进行各个shRNA载体干扰效果的检测比较。目标基因和内参基因样品各做三次重复, 取Ct值的平均数, 以公式: 表达率(%)=(目标基因/内参基因) \times 100%, 得出样品的表达量, 所得值越小病毒的表达量就越少, 说明干扰片段抗病毒能力强。结果表明在细胞水平山羊痘DNA聚合酶基因的5个shRNA干扰片段都具有干扰效果, 其中pSI-W2的质粒干扰效果较好, 基因表达抑制率为93.8%; 与阴性对照相比, 干扰质粒组基因表达抑制率为63%至93.8%之间(图6)。

3 讨论

山羊痘病毒(GPV)属于痘病毒科(poxiridae)、脊椎动物痘病毒亚科(chordopoxviridae)、羊痘病毒属(Capripoxvirus)^[6]。现在主要分布于非洲、西南亚及中东的一些国家及地区。该病首先发生于个别羊只, 以后逐渐蔓延全群, 羔羊较老龄羊敏感, 发病率达50%~80%, 死亡率达20%~75%, 继发或并发感染死亡率可达100%。对于羊痘的治疗, 目前尚无特

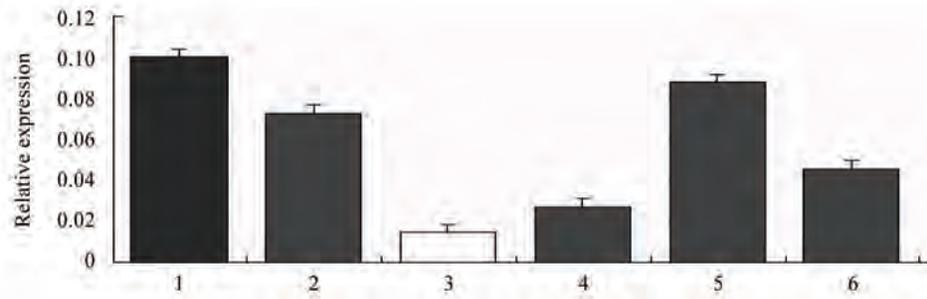


图6 siRNA干扰载体转染BHK-21细胞和 β -actin mRNA表达的Real-time PCR结果

Lane 1: 阴性对照; Lane 2~6: pSI-W1~pSI-W5。

Fig.6 Real-time PCR results of β -actin mRNA expressed in the BHK-21 cells after transfected by the siRNA interference vector

Lane 1: negative control; Lane 2~6: pSI-W1~pSI-W5.

异的治疗方法, 本病的防治主要依靠疫苗免疫接种为主。现用的羊痘疫苗有灭活疫苗和弱毒疫苗(山羊痘病毒基因缺失转移载体及基因缺失突变毒株的构建, 东北农业大学博士学位论文)两类。灭活疫苗免疫维持期短, 免疫能力弱, 最多只能提供短暂的保护, 且使用剂量较大不能广泛使用。弱毒苗激活细胞介导免疫反应的能力弱, 只能提供短暂的免疫保护, 且毒力较强, 因此目前迫切需要研究防控该病的新途径。RNAi技术是一种效率高、特异性高的基因沉默技术, 随着质粒重组、dsRNA合成以及导入方式的改进, 已经快速成为抗病毒治疗强有力的工具^[7]。

山羊痘病毒DNA聚合酶是痘病毒在复制过程中的核心酶, 其主要活性是催化DNA的合成及其相辅的活性。本研究设计5条针对山羊痘病毒DNA聚合酶基因的siRNA载体作为研究对象, 分别命名为pSI-W1、pSI-W2、pSI-W3、pSI-W4、pSI-W5、pSI-W0, 构建山羊痘病毒小分子siRNA质粒表达载体转染细胞, 在胞内通过沉默病毒聚合酶基因的表达, 从而抑制病毒基因和蛋白的合成, 最终降低病毒复制效率。分析结果表明, 细胞在转染48 h后siRNA分子开始表达, 在细胞水平实验中证明了构建的针对山羊痘病毒DNA聚合酶基因的siRNA质粒表达载体能特异性抑制目的基因的表达, 不同的siRNA分子对靶基因表达的抑制作用有一定差异, 5个

siRNA载体抑制率在63%以上, 以pSI-W2的抑制率最高, 抑制率为93.8%。同时测定24 h、36 h、48 h三个时期细胞毒液TCID₅₀的变化, 结果显示pSI-W2组毒液的毒价下降最为明显, 说明pSI-W2重组质粒在细胞内抑制病毒复制的效率最高。本实验结果表明siRNA在细胞内抑制羊痘病毒增殖是可行的。实验结果显示, 虽然siRNA在我们检测的时间内没有完全抑制病毒, 但是很强烈地抑制了病毒的复制, 这表明siRNA在一定程度上可以有效抑制病毒的增殖。本研究为抗羊痘病毒转基因羊以及相关的科学研究提供了一定的科学依据, 从抗病育种方面为有效预防和控制羊痘病的发生提供一种新的手段。

参考文献(References)

- 1 Cran VM. Control of capripoxvirus infection. *Vaccine* 1993; 11(3): 1275-9.
- 2 王开功, 虞天德, 张大权, 田志敬, 阴正兴, 许乐仁, 等。动物医学进展 2003; 24(4): 116-8.
- 3 Downard J. RNA interference. *BMJ* 2004; 328(7450): 1245-8.
- 4 Caplen NJ, Zhang ZL, Falgout B, Morgan RA. Inhibition of viral gene expression and replication in mosquito cells by dsRNA-triggered RNA interference. *Mol Ther* 2002; 6(2): 243-51.
- 5 Kapadia SB, Andersen AB, Chisari FV. Interference of hepatitis C virus RNA replication by short interfering RNAs. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100(4): 2014-8.
- 6 殷震, 刘景华。动物病毒学。北京: 科学出版社, 1998。
- 7 康慧聪, 唐洲平。RNAi及其基因治疗研究进展。卒中与神经疾病。2005; 12(3): 1912-3.

Construction and Screening of Plasmid Expression Vectors Encoding the Short Hairpin RNA Targeting DNA Polymerase of Goatpox Virus

An-Tao Wang^{1,3}, Chuang-Fu Chen^{1*}, Jun Qiao^{1*}, Hui Zhang², Na Zhang¹, Sheng-Wei Hu²

(¹College of Life Science, Shihezi University, Shihezi 832003, China;

²College of Animal Science & Technology, Shihezi University, Shihezi 832003, China; ³Laboratory of Xinjiang Endemic and Ethnic Disease, Shihezi 832003, China)

Abstract According to the gene sequence of DNA polymerase of Goatpox virus, 5 specific siRNA were synthesized, annealed and cloned into RNAi-Ready pSIREN-RetroQ ZsGreen vector. The recombinant plasmids were transformed into *E.coli* DH5 α and identified by sequencing. The siRNAs were transfected into the BHK-21 cells. After infection experiment, siRNA vectors were extracted, and evaluated inhibiting effect of siRNA vectors on the gene of DNA polymerase of the Goatpox virus by real-time quantitative PCR (Q-RT PCR). The results showed that the genes of the DNA polymerase of the Goatpox virus could be inhibited by siRNA vectors with an inhibition rate of 63%~93.8%, as well as inhibition rate of pSI-W2 was the obvious highest and 93.8%. In this study, interference sequences, which were able to inhibit the multiplication of Goatpox virus *in vitro*, obviously, were screened from BHK-21 cells by RNAi technology, and can facilitate further study on the anti-Goatpox virus transgenic sheep.

Key words RNAi; Goatpox virus; BHK-21; inhibition

Received: November 23, 2010 Accepted: February 21, 2011

This work was supported by the Cultivation of Transgenic New Bio-breed Supported by the National Important Item (No.2009ZX08005-003B)

*Corresponding author. Tel: 86-993-2058002, E-mail: ccf-xb@163.com; E-mail: qj710625@yahoo.com.cn