

反义 RNA 抑制猪传染性胃肠炎病毒复制的研究

于晓龙, 唐丽杰, 李一经**

(东北农业大学动物医学院, 黑龙江哈尔滨 150030)

Study on Inhibition of TGEV Replication by Antisense RNA

YU Xiao-long, TANG Li-jie, LI Yi-jing

(Animal medicine College of Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

Abstract: In the study, we designed an antisense RNA targeting at the highly conserved sequence (26880-27184nt) of *Transmissible gastroenteritis virus* of swine, (TGEV). The fragment cloned by PCR was recombined with retrovirus expression vector, pLXSN, and transfected into packaging cell line PA317 with Lipofectamine. The viral supernatants of the clones selected with G418 (500 $\mu\text{g}/\text{mL}$) were detected by murine fibroblast NIH3T3. The highest viral titer pseudovirus was used to infect IBRS₂ cell. PCR and RT-PCR analysis indicated that the pLXSN-N5' had inserted into the genome of IBRS₂ cell. The examination of cytopathic effect (CPE) showed that the antisense RNA could inhibit TGEV replication effectively.

Key words: TGEV; Antisense RNA; Retrovirus vector; Cytopathic effect (CPE)

摘要: 根据反义 RNA 作用原理, 设计一条互补猪传染性胃肠炎病毒基因 (26888-27184) 区的反义 RNA 序列。将该序列与逆转录病毒表达载体构建成质粒 PLXSN-N5', 并与脂质体共转染 PA317 细胞, 经 G418 (500 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 筛选出稳定的产毒细胞克隆。取其上清液感染小鼠成纤维细胞 NIH3T3, 测定细胞克隆产生的假病毒滴度, 用高滴度假病毒感染 IBRS₂ 细胞。提取被感染的 IBRS₂ 细胞总 DNA 和 RNA, 通过 PCR 和 RT-PCR 证明 PLXSN-N5' 整合到 IBRS₂ 细胞基因组。病毒感染细胞病变表明, 反义 RNA 有明显抑制 TGEV 复制的作用。

关键词: 猪传染性胃肠炎病毒; 反义 RNA; 逆转录病毒载体; 细胞病变

中图分类号: S852.65

文献标识码: A

文章编号 1003-5152(2004)03-0268-03

猪传染性胃肠炎病毒 (*Transmissible gastroenteritis virus* of swine, TGEV) 属于冠状病毒科冠状病毒属^[1], 是不分节的单链正股 RNA 病毒, 基因组大小为 28.5 kb^[2]。猪传染性胃肠炎病毒主要引起新生仔猪致死的腹泻病——猪传染性胃肠炎^[3]。该病是一种造成我国及世界各养猪国家的仔猪早期死亡的重要疫病之一, 目前尚无较好的防治方法。本文通过构建反义 RNA 逆转录病毒载体和体外转基因, 研究反义 RNA 抑制猪传染性胃肠炎病毒复制的作用, 为防治猪传染性胃肠炎探索新的途径。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

PCR 产物胶回收试剂盒购自上海华瞬公司; Taq 酶, DNA Marker, T4 连接酶, 限制酶购自 TaKaRa 公司; 脂质体 LipofectAMINE, 细胞培养基 DMEM 和抗生素 G418 购自 GIBCOL 公司。polybrene 购自 Sigma 公司; 血清购自 Heclon 公司。pLXSN 质粒、包装细胞株 PA317 和小鼠成纤维细胞 NIH3T3 均由中国农业科学院哈尔滨兽医研究所孟庆文博士惠赠。IBRS₂ 细胞由本实验室保存。TGEV (TH98 株) 由本室分离保存。

1.2 反义 RNA 的设计

根据反义 RNA 作用原理, 选取 TGEV 基因组 (26888-27184bp) 区为靶标 (含 N 基因调控序列及部分 N 基因), 长度为 297bp。

收稿日期: 2003-12-08, 修回日期: 2004-02-24

作者简介: 于晓龙 (1965-), 男, 黑龙江籍, 在读博士, 研究方向为病毒分子生物学

* 通讯作者: 李一经 (1960-), 男, 教授, 博士生导师, Corresponding Author. Tel: 0451-55190385, Email: yijingli@yahoo.cn.

1.3 目的基因制备

设计两条引物: 上游引物 P1: 5'-ATTACATATG GTATAACTAACTTC-3'; 下游引物 P2, 5'-TCAGA ATTCCACCTTTCAGGAAGCTCT-3'。提取 TGEV 的核酸, 以下游引物进行反转录, 以反转录产物为模板作 PCR 扩增, 胶回收纯化 PCR 产物, 连接 pMD18-T 载体, 筛选 pMD18-T-NL 阳性重组质粒后, 酶切鉴定及测序。实验操作参照文献^[4], 测序由上海生工完成。

1.4 重组逆转录病毒载体 pLXSN-N5'的构建

设计两条引物, 上游引物 P3: 5'-TCCGGATCC ATTACATAGGTATAACT-3'(含有 *Bam*HI 酶切位点), 下游引物 P4: 5'-GGAATTCGAAAGAGTGAT TAAGTAA-3'(含有 *Eco*RI 位点)。以质粒 pMD18-T-NL 为模板, PCR 扩增目的片段, PCR 产物胶回收后, 连接由 *Eco*RI 和 *Bam*HI 酶切的 pLXSN 载体上, 转化, 提质粒, 酶切 pLXSN-N5'质粒鉴定及测序。实验操作参照文献^[4], 测序由上海生工完成。

1.5 重组逆转录病毒载体 pLXSN-N5'产毒细胞系的建立及病毒滴度的测定

用脂质体介导的基因转移的方法将 pLXSN-N5'质粒转染至包装细胞 PA317 中, 具体操作方法参照 lipofectAMINE 说明书。经 G418 (500 μ g/mL) 进行筛选, 挑取细胞克隆扩大培养。收集含假病毒颗粒的细胞培养上清, 用 0.45 μ m 的滤器过滤, 保存于 -70 $^{\circ}$ C 冰箱。利用 NIH3T3 细胞测定逆转录病毒的滴度^[5]。

1.6 假病毒颗粒感染 IBRS₂ 细胞

感染前一天将 IBRS₂ 细胞 1:10 传代。感染时移去靶细胞的培养液, 加入适量的高滴度假病毒颗粒上清液, 同时加 800 μ g/mL polybrene 至终浓度 8 μ g/mL, 37 $^{\circ}$ C 孵育 3h, 经 G418 (500 μ g/mL) 进行筛选, 可获得具有抗性的 I-N5' 细胞^[5]。

1.7 外源基因整合的检测

参照小量组织/细胞基因组 DNA 试剂盒说明(上海华舜公司)提取 I-N5' 细胞系基因组 DNA。设计两条引物, 上游引物 P5: 5'-CGCTTGGGTGGAGAG GCTATTCG-3', 下游引物为 P6: 5'-CCATTTTCCA TGATATTCGG-3', 以 I-N5' 细胞系基因组 DNA 为模板, PCR 扩增 I-N5' 细胞系基因组 DNA 的 Neo^R 序列。

参照小量组织/细胞基因组 RNA 试剂盒说明(上海华舜公司)提取 I-N5' 细胞总 RNA, 具体操作按说明进行。RT-PCR 扩增引物为 P3 和 P4。

1.8 反义 RNA 对 TGEV 抑制效果的检测

将 TGEV 分别感染 IBRS₂ 细胞和具有抗性的

I-N5' 细胞, 测定猪传染性胃肠炎病毒滴度(TCID₅₀)。参照文献^[6]计算病毒抑制率。

2 结果与分析

2.1 重组质粒 pMD18-T-NL 的酶切鉴定结果

参照 pMD18-T 载体酶切图谱和基因片段上酶切位点, 用 *Sal*I 和 *Eco*R I 对重组质粒双酶切, 产生大小约 1,290 bp 的酶切片段, 与预期结果相符。酶切鉴定结果见图 1。序列分析正确。

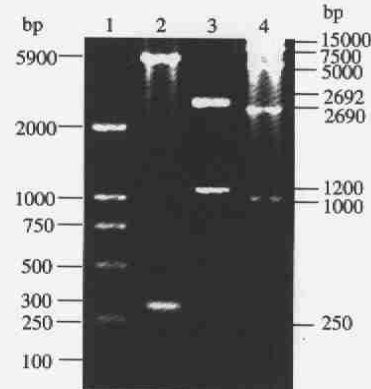


图 1 重组质粒酶切鉴定

Fig.1 Restriction analysis of recombinant plasmid

1, DL2 000 Marker; 2, PLXS-N5' / *Bam*HI + *Eco*RI; 3, pMD18-T-NL / *Sal*I + *Eco*RI; 4, DL15 000 Marker.

2.2 重组逆转录病毒载体 pLXSN-N5'的构建和包装

用 *Eco*R I 和 *Bam*H I 双酶切分析可见到 5900bp 和 303bp 的两条阳性条带, 与预期结果相符。该质粒酶切鉴定结果见图 1。序列分析结果表明构建质粒插入的片段正确。

质粒 pLXSN-N5' 转染 PA317 细胞后, 经 G418 筛选得到抗性细胞克隆。挑抗性细胞克隆, 依次在 24 孔、6 孔培养板中扩大培养。当细胞长满至 50%~90% 时, 换半量新鲜不含 G418 的完全营养液培养 24h, 收培养液上清为病毒原液。测得最高的病毒滴度为 2.3×10^5 。

2.3 外源基因整合的检测

2.3.1 PCR 检测 Neo^R 的整合: pLXSN 载体中含有 Neo^R 基因, 而哺乳动物细胞不存在此基因。通过以 I-N5' 细胞系基因组 DNA 为模板, PCR 扩增, 得到约 560bp 大小 Neo^R 片段, 与预期相符, 证明 pLXSN-N5' 质粒整合到 I-N5' 细胞系基因组。PCR 鉴定结果见图 2。

2.3.2 RT-PCR 检测: 以 I-N5' 细胞总 RNA 为模板, 进行 RT-PCR 扩增, 得到 315bp 大小片段, 与预期相符, 证明 pLXSN-N5' 质粒整合到 I-N5' 细胞系基

因组且具有表达的活性。PCR 鉴定结果见图 2。

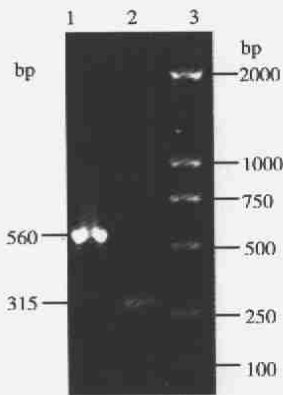


图 2 PCR 和 RT-PCR 鉴定

Fig.2 Identification of PCR and RT-PCR

1, PCR products of Neo^R gene from I-N5' cell; 2, RT-PCR products of target gene from I-N5' cell; 3, DL 2 000Marker.

2.4 反义 RNA 对 TGEV 抑制效果的检测

细胞病变观察表明, 本实验的反义 RNA 具有明显抑制 TGEV 复制的作用。结果见表 1。

表 1 抗性细胞对 TGEV 复制的抑制率

Table 1 Effect of anti-cell lines on the inhibition against TGEV infected

Cell	TCID ₅₀ (-lg10 ⁶)			\bar{x}	Inhibition rateeffect
	1	2	3		
IBRS ₂	3.33	3.67	3.59	3.53	3.530%
I-N5'	2.77	3.23	2.88	2.96	74%

3 讨论

反义 RNA 是与 mRNA 互补 RNA 分子。当两个 RNA 分子通过碱基配对形成双链 RNA 时, mRNA 的特异功能即被阻断^[7]。利用反义 RNA 技术抑制 VSV^[8]、HBV^[9]、HIV^[10]等病毒复制已取得显著的效果。猪传染性胃肠炎病毒的复制, 转录, 翻译过程中存在 RNA 阶段, 因此我们可以考虑运用反义 RNA 技术封闭或阻断其过程。猪传染性胃肠炎病毒基因组主要有四种结构基因, 即 S, N, M, SM^[11]。N 基因核苷酸序列保守性很强^[12], 并且该保守序列还在猪传染性胃肠炎病毒的复制, 转录过程中起着重要的调控作用^[13], 所以 N 基因成为抗猪传染性胃肠炎病毒反义 RNA 设计的重要的靶标。据猪传染性胃肠炎病毒 N 基因的功能以及目前反义 RNA 研究成果, 我们成功地构建了猪传染性胃肠炎病毒反义 RNA 逆转录病毒表达载体 PLXSN-N5', 目的是封闭 N 基因表达, 从而抑制病毒的复制。逆转录病毒载体一包装细胞系统是目前常用的真核细胞基因转

移系统。本实验用 PLXSN 逆转录病毒载体, 经 PA317 细胞包装后获得较高的病毒滴度, 为感染猪传染性胃肠炎病毒许可性细胞 IBRS₂ 细胞创造良好条件。猪传染性胃肠炎病毒的许可性细胞系有 ST, PK, IBRS₂ 等^[13], 被感染的细胞呈现变圆, 胞质回缩, 折光率增强, 直至脱落等一系列 CPE 现象。因而, 本实验通过 CPE 检测反义 RNA 对 TGEV 的抑制作用。

本研究首次应用反义 RNA 技术抑制 TGEV 复制, 得到了持续稳定表达反义 RNA 的抗性细胞, 其抑制病毒效果令人满意。此研究结果为防治猪传染性胃肠炎开辟了新途径, 进一步为转基因动物抗病育种奠定了基础。

参考文献

- [1] Cavanagh D, Horzinek M C. Genus Torovirus assigned to the Coronaviridae [J]. Arch Virol, 1993, 128(3-4): 395-396
- [2] Eleouet J F, Rasschaert D, Lambert P, *et al.* Complete sequence (20 kilobases) of the polyprotein-encoding gene 1 of transmissible gastroenteritis virus [J]. Virology, 1995, 206: 817-822
- [3] Enjuanes L, Sanchez C, Gebauer F, *et al.* Evolution and tropism of transmissible gastroenteritis coronavirus [J]. Adv Exp Med Biol 1993; 342:35-42.
- [4] 萨姆布克 J, 弗里奇 E F, 曼尼阿蒂斯 T. 分子克隆实验指南[M]. 金冬雁, 黎孟枫, 等译. 第 2 版, 北京: 科学出版社, 1993.
- [5] 奥斯伯 F. 精编分子生物学实验指南[M]. 颜子颖, 王海林, 译. 北京: 科学出版社, 1998.
- [6] 章金钢, 涂长春, 金扩世, 等: 体外培养细胞中特异反义 RNA 表达对猪瘟病毒增殖的抑制作用[J]. 中国兽医学报, 1995, 154-9.
- [7] Weiss B, Davidkova G, Zhou L W. *et al.* Antisense RNA gene therapy for studying and modulating biological processes [J]. Cell Mol Life Sci. 1999, 55:334-358.
- [8] Takacs A M, Banerjee A K. Inhibition of vesicular stomatitis virus in cells constitutively expressing an antisense RNA targeted against the virus RNA polymerase gene [J]. J Gen Virol. 1997, 78:125-9.
- [9] Moriyama K, Hayashida K, Shimada M, *et al.* Antisense RNAs transcribed from the upstream region of the precore/core promoter of hepatitis B virus [J]. J Gen Virol 2003, 84:1907-1913.
- [10] Statham S, Morgan R A. Gene therapy clinical trials for HIV [J]. Curr Opin Mol Ther, 1999, 1(4): 430-436.
- [11] Sturman L S, Holmes N V. The molecular biology of coronaviruses [J]. J Adv Virus Res, 1983, (28)35-112.
- [12] Kapke P A, Brian D A. Sequence analysis of the porcine transmissible gastroenteritis coronavirus nucleocapsid protein gene [J]. Virology, 1986, 59: 151:41-49.
- [13] 殷震, 李景华. 动物病毒学[M]. 北京: 科学出版社, 1985.