

伪狂犬病毒立即早期基因 5 端特异性反义 RNA 对病毒增殖的影响

方六荣, 肖少波, 余晓岚, 徐建祥, 陈焕春**

(华中农业大学动物医学院, 湖北武汉 430070)

Inhibition of Viral Replication by the Antisense RNA Targeting the 5' Regions of Immediate-early Gene of Pseudorabies Virus

FANG Liu-rong, XIAO Shao-bo, YU Xiao-lan, XU Jian-xiang, CHEN Huan-chun**

(College of Veterinary Medicine, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

Abstract: A 0.5 kb antisense RNA fragment was designed targeting the 5' non-coding region (NCR), translation initiation site and potential transcriptional active region of the sole immediate early gene (IE180) of *Pseudorabies virus* (PRV). The antisense RNA fragment was amplified by PCR and inserted into the downstream of hCMV IE promoter/enhancer of the eukaryotic expression vector pCF-neo. The resulting antisense RNA expression plasmid (pCF0.5) was transfected into PK-15 cells and the transfected cells were selected by G418. The expression of antisense RNA was confirmed by RT-PCR. In order to assess the antiviral potency of the cell lines expressing the antisense RNA, the antisense RNA cell lines and the control cell lines were infected with 0.1 pfu of PRV strain Ea per cell. The infected supernatant were collected at different time points post-infection (p.i.) and the TCID₅₀ were further determined. The data showed that the cell lines expressing the antisense RNA could markedly inhibit the replication of PRV. The viral titers in cells expressing the antisense RNA was 156-fold less than control cells at 40 hp i.

Key words: Pseudorabies virus (PRV); Immediate-early gene; Antisense RNA; Inhibition

关键词: 伪狂犬病毒; 立即早期基因; 反义 RNA; 抑制

中图分类号: R373.9 文献标识码: A 文章编号: 1003-5125(2005)01-0089-03

伪狂犬病毒 (*Pseudorabies virus*, PRV) 属疱疹病毒科 - 疱疹病毒亚科, 基因组为线状双链 DNA, 长约 150 kb, 至少可编码 70 ~ 100 种蛋白质。根据伪狂犬病毒感染细胞后 DNA 转录、表达时间的先后可将 PRV 基因分为立即早期基因 (Immediate-early gene), 早期基因 (Early gene) 和晚期基因 (Late gene), 这三类基因依此以级联方式调节^[1]。第一个被转录的基因是立即早期基因, 它的转录即使在细胞蛋白质合成被放线菌酮 (Cycloheximide) 抑制的情况下也能进行。目前的研究已证实: PRV

基因组中仅含有唯一一个立即早期基因 IE180, 功能性的 IE180 蛋白具有连续转录激活早期和晚期基因的作用, 并且是病毒增殖绝对必需的, 也就是说, IE180 在病毒的整个复制过程中具有重要作用, 如果该基因被彻底关闭, 则整个病毒的复制过程不能进行^[2]。根据 PRV IE180 的上述特性, 我们设想, 设计针对 IE180 功能区的反义 RNA, 有望获得抗伪狂犬病毒的特异性反义 RNA。这样, 一方面为今后培育抗伪狂犬病毒的转基因动物提供理论依据, 另一方面也为深入研究 PRV IE180 基因不同区段

收稿日期: 2004-08-12, 修回日期: 2004-09-22

* 基金项目: 国际科学基金 (IFS, B/3092-1); 湖北省自然科学基金 (2000J100)

作者简介: 方六荣 (1969-), 女, 博士, 副教授。研究方向为动物病毒分子生物学与基因工程疫苗。

** 通讯作者。Corresponding author. Tel: 027-87282608, E-mail: hzauvet@public.wh.hb.cn

的功能提供了一种新的思路。为了验证这一设想,本研究首先构建了靶向 PRV IE180 基因 5'端非编码区、翻译起始区及转录激活区的反义 RNA,并对其体外抑制病毒增殖的作用进行了研究。

1 材料和方法

1.1 病毒、菌株、细胞与质粒

伪狂犬病毒 Ea 株由本实验室分离鉴定并保存^[3]。PK-15 细胞由中国典型物培中心(武汉)提供。真核表达载体 pCFneo,购自 Promega 公司。质粒 pSKIE,含 PRV Ea 株 IE180 基因(启动子和完整编码区),由作者构建^[4]并保存。

1.2 反义 RNA 设计

根据已测定的 PRV Ea 株 IE180 全基因序列(GenBank AF218842),参考 Yamaha 等^[5]对 PRV S 株 IE180 几个潜在功能区的预测分析,设计一对可扩增 PRV Ea 株 IE180 基因 -236 - +272 位核苷酸的引物,扩增片段长 508bps,包含 IE180 基因 5'端非编码区、翻译起始区和潜在激活区。上下游引物两端分别设计 XbaI 和 EcoRI 位点,由上海生物工程公司合成。

P₁: 5'-TTTCTCTAGA GCGCGGACTCTGAA G-3'

P₂: 5'-TAA GAATTC GCCGAA GGA GGACGGG-3'

1.3 反义 RNA 表达质粒的构建

以 pSKIE 为模板,用 P₁、P₂ 对目的片段进行 PCR 扩增。纯化的 PCR 产物经 XbaI 和 EcoRI 酶切,回收目的片段,将其反向插入 pCFneo 中,阳性重组质粒经酶切与 PCR 鉴定,命名为 pCF0.5。

1.4 转基因细胞系的建立

接种 PK-15 细胞于 24 孔板,待细胞长至 80% 左右融合时,取 pCF0.5 和 pCFneo 各 1μg,采用脂质体 Lipofectin 2000 转染试剂盒进行转染,具体操作按试剂盒说明书进行。转染后 48h,1-2 传代,并按文献^[6]所述方法用 600μg/mL 的 G418 筛选阳性转染细胞,待未转染细胞在 G418 选择压力下全部死亡时,扩大培养阳性克隆。

1.5 反义 RNA 表达检测

接种扩大培养的阳性细胞,待长到单层后,收获细胞,提取总 RNA,用 DNA 酶消化可能残留的痕量 DNA。以 P₁、P₂ 为引物进行 RT-PCR。RT-PCR 反应条件为:50 反转录 30min;94 2min 灭活反转录酶;94 变性 1min;50 退火 1min;72 延伸 1.5min,40 个循环后 72 延伸 10min。

1.6 表达反义 RNA 细胞系对病毒增殖的影响

以 0.1pfu/细胞的剂量分别接种伪狂犬病毒 Ea

株野毒于表达反义 RNA 的细胞系 (cell^{-0.5}) 和空白载体转染后的细胞系 (cell^{Con}),接种后每隔 8h 收集上清,待对照细胞系完全病变后,收集最后 1 次上清,同时测定不同时间收集样品的 TCID₅₀。重复实验 3 次。

2 结果

2.1 反义 RNA 表达质粒 pCF0.5 的构建与鉴定

PCR 产物经电泳观察,能很好地扩增到 0.5kb 的特异性条带(图略)。将纯化的扩增产物酶切后反向插入 pCFneo 中,获得反义 RNA 表达质粒 pCF0.5,经酶切和 PCR 鉴定证实构建正确(图 1)。

2.2 表达反义 RNA 的转基因细胞系的建立

pCF0.5 和 pCFneo 转染细胞经过 600μg/mL G418 作用后 2 周(每隔 3d 换液),可见多个阳性克隆。为了从整体上评价反义 RNA 的作用效果,没有分离单个阳性克隆,而是让阳性克隆在 200μg/mL G418 维持浓度下长成单层。提取扩大培养的转基因细胞系总 RNA 进行 RT-PCR,如图 2 所示:

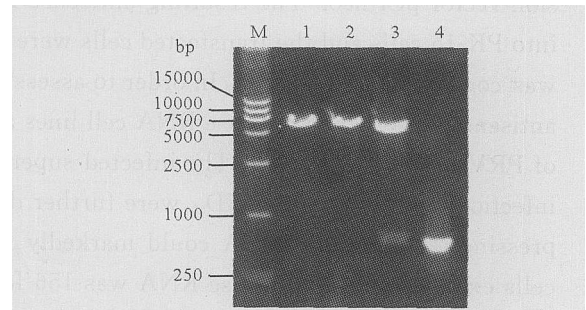


图 1 pCF0.5 的酶切与 PCR 鉴定

Fig. 1 Identification of pCF0.5 by digestion and PCR. M, DNA marker; 1, pCF0.5/XbaI; 2, pCF0.5/EcoRI; 3, pCF0.5/EcoRI + XbaI; 4, The result of PCR.

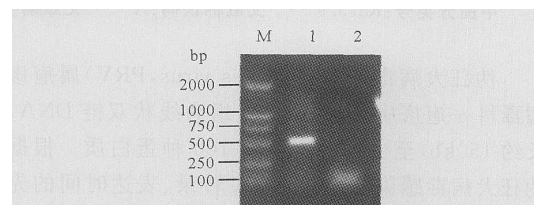


图 2 RT-PCR 检测反义 RNA 的表达

Fig. 2 Detection of the expression of antisense RNA by RT-PCR. M, DNA marker; 1, The result of RT-PCR (with AMV); 2, The result of RT-PCR (without AMV).

pCF0.5 转基因细胞系能特异性扩增到 0.5kb 阳性条带,说明建立的细胞系表达反义 RNA,而在无反转录酶的反应体系中,未能扩增到阳性条带,证实特异性条带不是 DNA 污染所致。

2.3 pCF0.5 转基因细胞系对病毒增殖的抑制作用

PRV Ea 株野毒以 0.1pfu/细胞接种稳定表达

反义 RNA 的细胞系 ($cell^{-0.5}$) 和空白载体对照细胞系 ($cell^{Con}$), 分别测定感染后 0h、8h、16h、24h、32h、40h、48h、56h 病毒液上清的 $TCID_{50}$, 重复 3 次后取平均值绘制增殖曲线。结果表明 (图 3): 在感染早期, 两种细胞系感染液上清的 $TCID_{50}$ 无明显差异; 而在感染后 24h, 差异显著; 感染后 40h, 空白载体细胞系的 $TCID_{50}$ 达到表达反义 RNA 转基因细胞系的 156 倍, 说明表达反义 RNA 的细胞系能有效抑制病毒的增殖。

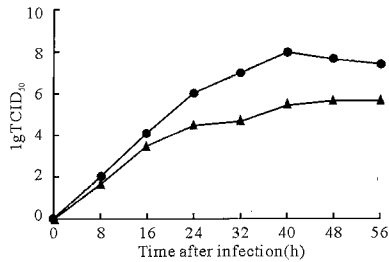


图 3 PRV Ea 株在两种细胞系中的增殖曲线

Fig. 3 The growth curve of PRV Ea strain in $cell^{-0.5}$ () and $cell^{Con}$ ()

3 讨论

反义 RNA 技术以其独特的“特异性封闭”成功应用于抗病毒药物筛选、基因表达调控研究以及动植物抗病新品种培育^[7]。由于 -疱疹病毒独特的级联调节方式, 立即早期基因的表达产物在病毒的复制与增殖中具有决定性作用, 早期和晚期基因的表达均依赖于立即早期基因表达产物的激活。从理论上讲, 针对 -疱疹病毒立即早期基因的反义 RNA 能有效抑制病毒的增殖。更重要的是, 与其它 -疱疹病毒不同, 伪狂犬病毒仅编码唯一一个立即早期蛋白 (IE180), 因此, 针对 PRV IE180 基因设计特异性反义 RNA 可能具有很好的抑制效果并可作为研究 -疱疹病毒立即早期蛋白功能的良好模型。本研究对针对 PRV IE180 基因的反义 RNA 进行了初步研究, 证实表达该反义 RNA 的细胞系能有效抑制病毒的增殖, 与我们最初的设想相符。

Ono 等^[8]曾通过构建缺失 PRV IE180 酸性转录激活区的突变体, 发现可有效干扰多个早期和晚期基因的转录, 从而导致 PRV 复制的抑制, 由此推测酸性转录激活区可能是 IE180 的重要功能区。

同时, 考虑到 IE180 基因 5 端具有复杂的二级结构并参考其他学者在乙肝等病毒中设计反义 RNA 的一些策略^[9], 本研究首先设计了针对 PRV IE180 基因 5 端非编码区 - 翻译起始区和潜在转录激活区的反义 RNA, 从实验结果看, 所设计的反义 RNA 具有很好的抑制病毒增殖的效果。目前, 通过对 IE180 基因不同区域进行显性等位突变研究, 除了酸性转录激活区 (AA1-34) 外, IE180 的其它潜在功能区也初步确定, 主要有: DNA 结合区 (AA454-696); 磷酸化区 (AA390-406); 核定位信号序列 (AA464-469; 930-935); 自我调控区 (AA454-1081) 等^[5]。下一步, 我们将针对不同功能区、多功能区组合、甚至全基因设计反义 RNA, 比较不同反义 RNA 对病毒增殖的影响, 筛选到最佳抗病毒的反义 RNA 片段, 为今后培育抗伪狂犬病毒的转基因动物以及研究 IE180 不同片段在病毒增殖中的作用奠定基础。

参考文献

- [1] Mettenleiter T C. Pseudorabies (Aujeszky's disease) virus: State of the art[J]. Vet Res, 2000, 33: 99-115.
- [2] Cheung A K. DNA nucleotide sequence analysis of the immediate-early gene of pseudorabies virus[J]. Nucleic Acid Res, 1989, 17: 4 637-4 646.
- [3] 陈焕春, 方六荣, 何启盖, 等. 猪伪狂犬病毒鄂 A 株的分离鉴定[J]. 畜牧兽医学报, 1998, 29(2): 156-161.
- [4] 肖少波, 方六荣, 陈焕春, 等. 伪狂犬病毒 IE180 基因的克隆及其在大肠杆菌中的表达[J]. 中国兽医学报, 2003, 23: 249-251.
- [5] Taharaguchi S, Inoue H, Ono E, et al. Mapping of transcriptional regulation domains of pseudorabies virus immediate-early protein[J]. Arch Virol, 1994, 137: 289-302.
- [6] 肖少波, 方六荣, 陈焕春, 等. 伪狂犬病毒 gI 基因的克隆表达及其对病毒增殖的影响[J]. 微生物学报, 2002, 42: 197-203.
- [7] Erickson R P. Antisense transgenics in animals[J]. Method: A Companion to Methods in Enzymology, 1999, 18: 304-310.
- [8] Ono E, Taharaguchi S, Watanabe J, et al. Suppression of pseudorabies virus replication by a mutant form of immediate-early protein IE180 repressing the virus gene transcription[J]. Vet Microbio, 1998, 60: 107-117.
- [9] Wu J W, Gerber M A. The inhibitory effects of antusense RNA on hepatitis B virus surface antigen synthesis[J]. J Gen Virol, 1997, 78: 641-647.