SiRNA 干扰 HSV-1 即刻早期基因 α22 效应的初步分析 *

普 燕 , 刘龙丁 , 马绍辉 , 寸 伟 , 郭宏雄 , 李琦涵 **

(中国医学科学院中国协和医科大学医学生物学研究所 ,云南昆明 650118)

Analysis of siRNA Interfering in the α22 Immediate-early Gene of HSV-1

PU Yan , LIU Long-ding , MA Shao-hui , CUN Wei , GUO Hong-xiong , LI Qi-han **

(Institute of Medical Biology , Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College , Kunming 650118 , China)

Abstract : In this study , α22 , an immediate-early gene of HSV-1 was analyzed with RNAi technology. Two sequences of siRNAs (siRNA-1 and siRNA-2) were prepared by *in vitro* transcription , and transfected into the Hep-2 and KMB17 cells. The cells were subsequently inoculated with HSV-1. The results demonstrated that there was no differences between the transfected Hep-2 and the untransfected cells. Meanwhile , KMB-17 , a kind of restricted cell , which was transfected respectively or co-transfected with siRNA-1 and siRNA-2 , showed delayed cytopathic effects with the peak titre of offspring virus appearing later. The results suggested the two siRNAs can interfere with the expression of ICP22 and further effect on the replication of HSV-1.

Key words : RNAi ; Small interfering RNA (siRNA) ; Herpes simplex virus I (HSVI) ; α2

摘要 : 以 HSV1 即刻早期基因 α2 为靶点 ,应用 T7 RNA 聚合酶体外合成 siRNA-1 和 siRNA-2 序列 ,脂质体转染法将其导入 Hep-2 或 KMB17 细胞 ,再接种 HSV1 病毒 ,通过细胞形态和病毒滴度的测定 ,初步探索了 siRNA 干扰 α2 基因的的效应。结果表明 ,在 Hep-2 中 ,转染 siRNA 的实验组与对照组的细胞病变时间相同 ,子代病毒的生长曲线也没有显著差异 ;而分别转染或共同转染 siRNA-1 和 siRNA-2 于"限制"性细胞 KMB-17 中 ,接种病毒后 , ICP22 特异的 siRNA 对 HSV1 的复制则表现了相应的干扰作用 ,细胞病变慢 ,子代病毒的最高滴度峰值出现较晚。

关键词 : RNA 干扰 ; siRNA ; 单纯疱疹病毒 1 型 (HSV1) ; α2

中图分类号 : Q7 **文献标识码** : A **文章编号** : 1003-5125 (2005) 03-0221-04

RNA 干扰 (RNA interference , RNAi) 是由短片段双链 RNA 介导的同源 mRNA 分子降解 ,进而抑制相关基因表达的一种现象。大量的研究发现 , RNAi 作为一种古老的防御机制广泛存在于线虫、真菌、植物、动物等多种生物体内 ,通过特异性分解入侵的外源核苷酸序列 ,起到"细胞内免疫"的作用[1,2] ;另外 ,RNAi 也是细胞分化的调控机制之一 ,在不同的发育阶段能对基因的表达起到不同的调控作用。目前 ,RNAi 技术已经在抑制病毒的复制和传播 ,功能基因组的高通量分析、肿瘤的治疗 ,以及各种基因表达异常增高引起的疾病等多个研究领域取得了相应的进展[3] 。在针对作为嗜神经病毒的单纯疱疹病毒 1 型 (Herpes simplex virus I , HSV1) 即刻早期基因的研究中 ,RNAi 技术具有重要意义 ,其可以作为特异"敲除"某一基因的手段 ,使分析 HSV1 即刻早期基因的特定功能成为可能。早先的实验已经表明 , HSV1 的各种即刻早期基因产物在病毒的复制过程中常常因其所存在的宿主细胞环境的不同而表现不同的功能[4] 。ICP22 作为 HSV 即刻早期基因之一 ,即具有此类特性。因此 ,利用 RNAi 技术 ,对 HSV1 在细胞内的复制过程中 , ICP22 所具有的功能意义的分析 ,将有可能为 ICP22 的研究提供一种新的技术手段[4,5] 。

1 材料与方法

1.1 材料

收稿日期 :2004-10-25 ,修回日期 :2005-02-28
* 基金项目 :国家自然科学基金 (30270070)
作者简介 :普 燕 (1978 -) ,女 ,新疆籍 ,硕士 ,主要从事病毒免疫学研究
** 通迅作者. Corresponding author. Tel :0871-8335905 , E-mail :qihanli @21cn. com

© 1995-2006 Tsinghua Tongfang Optical Disc Co., Ltd. All rights reserved.

HEp-2 细胞, KMB-17 细胞和单纯疱疹病毒 1 型(HSV1)株为医学生物所保存; T7 RNA 聚合酶、DNase Ⅰ、Taq Ex DNA 聚合酶购于大连宝生物公司;脂质体 Lipofectamine™2000 购于 Invitrogen 公司;DMEM 细胞培养基购于 SIGMA 公司;其余为本所提供。

1.2 T7siRNA 的合成[6]

在 HSV1α22 的外显子序列中选出两条符合条件(即在一个 G 后的第 19 位或第 20 位是 C)的序列,确定其与 HSV1 中的其它基因及 Hep-2 和 KMB-17 细胞基因组序列无同源性;分别合成包括上述序列正义链或反义链,以及包括 T7 启动子序列在内的 siRNA 正义链模板和反义链模板,利用 PCR 条件使单链互补配对形成含 T7 启动子序列的双链 DNA 片段,以 T7 RNA 聚合酶转录产生 siRNA 的正义链和反义链,退火后可得到双链的 siRNA。

用于 siRNA-T7-1 合成序列:

正义链:5′-TggCCgACATTTCCCCAggCgCCTATAgTgAgTCgTATTA-3′

反义链:5′-AAgCgCCTggggAAATgTCggCCTATAgTgAgTCgTATTA-3′

用于 siRNA-T7-2 合成序列:

正义链:5′-ggggAATgTCgTCATAAgACCCTATAgTgAgTCgTATTA-3′

反义链:5′-CTggTCTTATgACgACATTCCCTATAgTgAgTCgTATTA-3′

T7 启动子 DNA 单链: 5′-TAATACgACTCACTATAgg-3′

双链的 siRNA 制备:合并上面步骤转录合成的 siRNA-1 和 siRNA-2,正义链和反义链 RNA 各取 40μL,混合,95 ℃5min 后 37 ℃1h 形成 dsRNA。经酚:氯仿、氯仿抽提后,再经 3mol/L NaAc(pH 5.2)、2.5 倍无水乙醇沉淀,12 000g 离心 20min,再用 70 % 乙醇洗涤,干燥,重悬于 50μL DEPC 处理的水中, -20 ℃保存待用。

1.3 细胞培养与转染

将 Hep-2 细胞或 KMB-17 细胞在 6 孔板中培养,长至单层时,用 PBS 洗细胞 2 次;取 4.0μg siRNA、10uL 的 Lipofectamine™ 2000 加入到 250μL 转染液中,混匀室温 5min。每孔加入 100μL 的 dsRNA-Lipofectamine™2000 复合体,对照组加入 100μL DMEM,37 ℃5 %CO_2 培养 12～16h。

1.4 接种病毒

转染后的细胞用转染液洗去 dsRNA-Lipofectamine™2000 的复合体,加入含 4 %小牛血清正常细胞培养液, 37 ℃5 %CO_2培养 24h 后,将培养液吸出。然后将 0.5M.O.I 的 HSV1 接种于每孔, 37 ℃5 %CO_2 30～60min 后,再每孔补入病毒维持液至 1mL, 37 ℃5 %CO_2 培养,定时观察并取样。

1.5 子代病毒的生长曲线的绘制

每隔 12h 取样一次,直待细胞完全病变,收获的病毒液 - 70 ℃保存;在 96 孔板中加入连续 10 倍稀释的病毒液 0.1mL/孔,每个稀释度加 4 孔,然后每孔加入 3×10^4/0.1mL 的 KMB-17 细胞悬液; 37 ℃ 5 %CO_2 培养 7d,观察并记录细胞病变的情况(50 % 以上细胞病变为阳性),计算病毒的滴度。重复三次同样测定根据所测得的病毒滴度,绘制病毒一步生长曲线。

2 结果

2.1 T7 siRNA 的合成

在 HSV1α22 基因(GrnBank 登录号: NC_001806)的外显子序列中选出两条符合条件的序列,即所转录的序列,要求以 G 开始,C 结束,中间 18-19 个核苷酸。用 BLAST 进行比对后,确认与 HSV-1 中的其它基因、Hep-2 和 KMB-17 细胞基因组序列没有同源性。体外转录方法合成 2 条 T7 siRNA,经纯化后用于转染。

2.2 siRNA-1 对 HSV1 复制的影响

在接种病毒后 12、24、36、48、60、72h 观察 Hep-2 细胞病变,显示实验组与对照组的细胞在形态上没有明显差异。病毒一步生长曲线显示,在具有 siRNA-1 的情况下,HSV-1 感染细胞的 12～72h 期间,各时间点的病毒滴度,以及病毒增殖的曲线趋势来看,二者没有显著差异(图 1)。

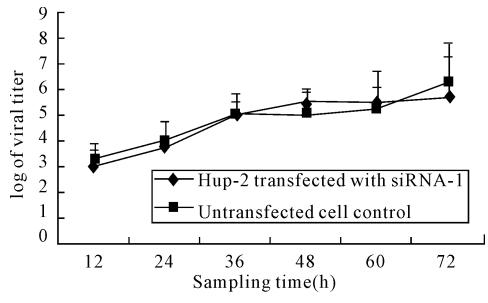

图 1 转染 siRNA-1 的 Hep-2 细胞接种 HSV1 后子代病毒的生长曲线

Fig.1 Growth kinetic of HSV1 virus in Hep-2 cell transfected with siRNA-1

2.3 siRNA-1 和 siRNAi-2 对 α22 基因干扰的对比分析

© 1995-2006 Tsinghua Tongfang Optical Disc Co., Ltd. All rights reserved.

在接种病毒后相同时间观察 KMB-17 细胞的病变,发现实验组细胞病变较对照组慢约 48h,当对照组细胞已经完全病变,正常细胞消耗殆尽之时,实验组细胞方出现明显的病变特征。从三组实验组与对照组的子代病毒一步生长曲线来看,在 12～24h期间,实验组病毒增殖均较慢,siRNA-1、siRNA-1/ siRNA-2 组达到滴度的最高峰值比对照组晚;siRNA-2 组与对照组在同一时间达到滴度的最高峰值,但下降曲线较对照组缓慢(图 2)。说明用 siRNA 干扰 α22 的转录对病毒的复制具有相应的抑制效应,即导致病毒的增殖减慢。之后,实验组病毒滴度的下降也比对照组缓慢。这也许是因为对照组的病毒增殖较快,迅速感染了大量正常的细胞,并使其死亡。而在实验组中,病毒增殖速度因 siRNA 的干扰而下降,正常细胞病变过程延缓,子代病毒产生速度变慢,从而允许一些未感染病毒的细胞出现增殖。

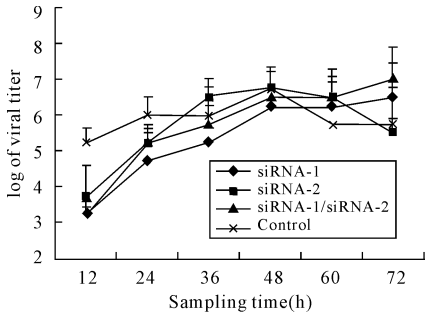

图 2　两个不同的 siRNA 片段及二者共同使用对 α22 基因进行干扰对 HSV-1 增殖的影响

Fig. 2　Growth kinetic of HSV1 virus in KMB-17 cell transfected with two different siRNAs respectively or co-transfected interfering α22 gene

3　讨论

HSV1 的基因组至少编码 84 个不同蛋白[4],这些蛋白的合成有相应的先后顺序。立即早期基因α产物产生最早,能够激活调控β、γ 基因的表达[7,8],所以,探索α基因的功能为研究病毒的复制、潜伏、致病机理等方面均有重要的意义。在 HSV1 病毒的复制过程中,对α基因产物 ICP22 的研究至今尚无明确的结论,但一些实验表明 HSV1 感染 Vero、Hep-2 细胞时,ICP22 的表达是非必需的,即其突变或缺失不影响病毒的感染复制,而在某些细胞,如啮齿动物、兔和人的一些细胞中,其突变或缺失会明显影响病毒在细胞中的复制。

本文的研究结果提示,在特异针对 ICP22 的 siRNA 转染 Hep2 细胞后,该细胞在进一步的 HSV1 感染过程中,无论是从细胞的病变情况,还是从子代病毒的生长曲线来看,转染 siRNA 的细胞与对照组均没有显著的差异。这与许多其它实验使用 α22⁻ 病毒缺陷株所得到的结论一致,HSV1 在这些不受α22⁻ 影响复制的细胞称为"允许"细胞(permissive cell)中,能够完整复制的原因可能是因为在"允许"细胞中具备某些蛋白,其能够代替α22 基因产物的作用,或是 HSV1 在这些细胞体内的复制机制与在"限制"细胞体内复制机制有微小的差别,从而可以免去α22 基因产物的作用。

而在称为"限制"性细胞(restricted cell)的 KMB-17 细胞中,ICP22 特异的 siRNA 对 HSV1 的复制则表现了相应的干扰作用,siRNA-1 和 siRNA-2 分别转染或共同转染,均得到基本相似的结果。从三组转染组和对照组的细胞病变情况来看,转染组的细胞均较对照组的细胞病变过程慢,从病毒的一步生长曲线来看,转染组细胞子代病毒最高滴度峰值出现较晚,在 12～24h 这段期间,其滴度均低于对照组,说明在转染组中,病毒的增值过程受到抑制。究其机理,siRNA 除通过活化基因沉默复合体(RISC,RNA-induced silencing complex)对具有同源序列的基因转录体进行切割而导致基因沉默效应,还可能存在是如下因素:1. siRNA-1 的作用位点处在转录起始下游,此处的序列结构方便于结合核糖体,当其与 siRNA 结合后易于形成一种结构阻滞作用;2. 而 siRNA-2 的作用位点处在第二个转录起始位点的上游,此处可能结合有某些细胞蛋白,以某种方式调控 US1.5 的翻译,而 siRNA 对 mRNA 的结合,则同样可以通过结构阻滞作用导致病毒增殖的延缓。当然,这些推测均有待于进一步证实。

在本研究中利用 siRNA 干扰 HSV1 即刻早期基因α22 效应的初步分析结果与其它利用 HSV1 α22 的突变或缺陷型病毒株得到的实验结果类似这一现象进一步提示了 RNAi 技术用于 HSV1 病毒的基因功能研究是可行的,而且它是较突变或缺陷型病毒研究基因功能的一个较为简单易行的方法。

参考文献

[1] Winston W M, Molodowitch C, Hunter C P. Systemic RNAi in C. elegans requires the putative transmembrane protein SID-1[J]. Science, 2002, 295, 2456-2459.

[2] Hannon G J. RNA interference[J]. Nature, 2002; 418: 244-250.

[3] Waterhouse P M, Wang M B, Lough T. Gene silencing as an adaptive defence against viruses[J]. Nature, 2002, 411: 834-842.

© 1995-2006 Tsinghua Tongfang Optical Disc Co., Ltd. All rights reserved.

[4] Bruni R, Fineschi B, Ogle W O, *et al*. A novel cellular protein, p60, interacting with both herpes simplex virus 1regulatory protein ICP22 and ICP0 is modified in a cell-type-specific manner and in recruited to the nucleus after infection [J]. J Virol, 1999, 73(5): 3810-3817.

[5] Carter KL, Roizman B. The promoter and transcriptional unit of a novel herpes simplex virus 1 α gene are contained in, and encode a protein in frame of the α22 gene[J]. J Virol, 1996, 70(1): 172-178.

[6] Donze O, Picard D. RNA interference in mammalian cells using siRNAs synthesized with T7 RNA polymerase[J]. Nucl Acids Res, 2002, 30(10 e46).

[7] 董长垣. 现代分子病毒学[M]. 武汉:武汉大学出版社, 1996. 85-104.

[8] 殷 震, 刘景华. 动物病毒学[M]. 第二版, 北京:科学出版社, 1997. 988-998.

© 1995-2006 Tsinghua Tongfang Optical Disc Co., Ltd. All rights reserved.