

# 质粒介导的核衣壳蛋白 siRNA 干扰 A 型流感病毒复制的研究\*

黄娟,姜平\*\*,顾小雪,许家荣,李玉峰

(南京农业大学农业部动物疫病诊断与免疫重点开放实验室,江苏南京,210095)

## Inhibition of Influenza A Virus Replication by Short Hairpin RNA Expression Plasmid

HUANG Juan, JIANG Ping, GU Xiao-xue, XU Jia-rong, LI Yufeng

(Key Laboratory of Animal Diseases Diagnostic and Immunology, Ministry of Agriculture, College of Veterinary Medicine, Nanjing Agriculture University, Nanjing 210095, China)

**Abstract:** Influenza A virus is a widespread pathogen, but current vaccines and drug therapy are of limited value. RNAi may provide a novel route to control it since RNAi can inhibit gene expression high-efficiently and specifically. A recombinant plasmid with a short hairpin RNA (shRNA) targeting at the nuclear protein gene of the virus was constructed and identified by enzyme digestion and sequence analysis. The hemagglutination (HA) titre and TCID<sub>50</sub> of the virus in chicken embryo fibroblastic (CEF) cells transfected with the plasmid was lower than that nontransfected with the plasmid. It showed that the plasmid could specifically inhibit the virus production in CEF cells.

**Key words:** Influenza virus; Nuclear protein gene; RNA interfering

关键词: A 型流感病毒; 核衣壳蛋白基因; RNA 干扰

中图分类号: R 511 文献标识码: A 文章编号: 1003-5125(2005)03-0326-03

A 型流感病毒 (Influenza virus) 属于正粘病毒科流感病毒属, 可引起鸟类、多种禽类、人类和低等哺乳动物的严重疾病<sup>[1]</sup>, 该病毒基因组为负链单股 RNA 病毒, 分 8 个节段, 容易引起抗原漂移和抗原变异, 现有的疫苗和药物不能有效的控制该病毒感染。

RNA 干扰是由双链 RNA (dsRNA) 引发的信使 RNA (mRNA) 序列特异性消减现象, 是一种保守的抗病毒机制, 已发现于线虫、植物和哺乳动物中<sup>[2]</sup>。自然发生的 RNAi 是由一种 dsRNA 特异的核酸内切酶 Dicer/RDE-1 引发的, 它将 dsRNA 切割成 21~23nt 的小分子干扰 RNA 片断 (small interference RNA, siRNA), siRNA 再与某些蛋白质结合形成复合物, 识别和降解 mRNA。研究表明<sup>[3]</sup>将 21nt 的 siRNA 导入哺乳动物细胞, 能引发 RNAi, 而不需要 Dicer/RDE-1 对长链的 dsRNA 的加工过程, 而且 21nt 的 siRNA 不会引起哺乳动物

细胞的非特异性翻译阻抑, 能够高效、稳定、特异的抑制基因表达。siRNA 的获得方法有化学合成法、体外转录法、载体表达法及“鸡尾酒”法, 其中, 质粒表达法具有不需要直接操作 RNA、抑制目的基因表达时间更长、siRNA 制备成本低等优点, 倍受研究者青睐, 为病毒的基因治疗开辟了新途径。

本文以 A 型流感病毒的保守基因核衣壳蛋白基因为靶基因, 选择了一段 21nt 的保守序列, 构建了小发夹 RNA (short hairpin RNA, shRNA) 的表达载体, 并转染 CEF, 通过血凝试验和 TCID<sub>50</sub> 测定, 发现该 shRNA 表达质粒能抑制流感病毒的复制, 从而为下一步探索流感病毒致病机理、开发基因治疗的新方法以及转基因动物研究奠定了基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

收稿日期: 2004-11-26, 修回日期: 2005-03-07

\* 基金项目: 国家自然科学基金资助 (30471288)

作者简介: 黄娟 (1977-), 女, 河南省籍, 博士研究生, 研究方向为动物传染病防制。

\*\* 通讯作者: 姜平 (1964-), 男, 江苏省籍, 教授, 研究方向为动物分子病毒学与免疫学。

Corresponding author. Tel: 025-84395504, E-mail: jiangp2000@njau.edu.cn

载体 pSUPER 和大肠杆菌 DH5 由本实验室保存;CEF 细胞按常规方法<sup>[4]</sup>制备;A 型流感病毒 H<sub>5</sub>N<sub>1</sub> 株由本实验室保存,TCID<sub>50</sub> 为 10<sup>-5.625</sup>/0.1 mL;限制性内切酶 *Xho*、*Bgl*、*EcoR*、*Kpn*, T4DNA 连接酶均为 Takara 公司产品;核酸分子量标准、酚/氯仿购自上海生工公司;质粒纯化试剂盒购自 Qiagen 公司、柱离心式胶回收试剂盒购自上海华舜公司;脂质体转染试剂盒购自 promega 公司。

### 1.2 siRNA 设计:

根据 Ge Q 等<sup>[5]</sup>报道的流感病毒 NP 基因 siRNA 序列,以及载体 pSUPER 的要求,设计一对寡核苷酸,序列如下(正义链带有 *Bgl* 的粘性末端,反义链带有 *Xho* 的粘性末端,如下划线所示)  
 正义链:5-GA TCCCGGA TCTTA TTTCTTCGG  
 A GTTCAA GA GACTCCGAA GAAA TAA GA TCC  
 TTTTTGGAAA-3  
 反义链:5-TCTG TTTCCAAAAA GGA TCTTA T  
 TTCTTCGG GTCTCTTGA ACTCCGAA GAAAT  
 AA GA TCCGGG-3

两条单链寡核苷酸由上海生化所合成

### 1.3 重组质粒的构建与鉴定

用退火缓冲液分别溶解 2 个 DNA 单链片段,并按等摩尔数混合,加热至 68-10min,然后缓慢冷却到室温,即为双链 DNA。将载体 pSUPER 用 *Xho* / *Bgl* 双酶切后,用胶回收试剂盒回收,与双链 DNA 进行连接,转入大肠杆菌 DH5。将重组质粒 pSUPER-NP 和空质粒 pSUPER 分别用 *EcoR* / *Kpn* 进行双酶切。酶切鉴定后送大连宝生物公司测序。

### 1.4 重组质粒的纯化和转染细胞

用 Qiagen 质粒提取试剂盒纯化阳性质粒,测定核酸含量,按 promega 公司的脂质体转染试剂盒说明进行转染 24 孔板鸡胚成纤维细胞单层。并以 pSUPER 作为载体对照。

### 1.5 A 型流感病毒感染与病毒滴度测定

pSUPER-NP 转染细胞 48h 后,用 Hank's 液洗涤,加入 10<sup>3</sup> TCID<sub>50</sub> 的病毒,100μL/孔,37 吸附 1h,用 Hank's 液洗 1 次,加入维持液,200μL/孔,37 培养 40h,将 24 孔板细胞培养物冻融两次,取出病毒液,按常规方法<sup>[4]</sup>进行血凝试验和 TCID<sub>50</sub> 测定。

## 2 结果与讨论

用 *EcoR* / *Kpn* 将重组质粒和空质粒分别进行双酶切,pSUPER 质粒双酶切后产生一个 2913bp 的大片段和一个 263bp 的小片段,重组质粒经双酶

切后产生一个 2849bp 的大片段和一个 327bp 的小片段(图 1)。将该重组质粒送大连宝生物公司测序(引物为 T7),测序结果与设计的目的序列相同,表明该重组质粒含有正确的目的序列,可进一步用于 RNA 干扰试验,将其命名为 pSUPER-NP。

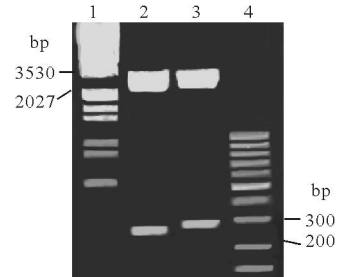


图 1 重组质粒 pSUPER-NP 的酶切鉴定

Fig. 1 Recombinant plasmid pSUPER-NP digested with *EcoR* I and *Kpn* I

1, DNA/ *EcoR* + *Hind* I; 2, pSUPER/ *EcoR* + *Kpn* I; 3, pSUPER-NP/ *EcoR* + *Kpn* I; 4, 100bp ladder

将 pSUPER-NP 以每孔 0.5μg、1μg、1.5μg 不同剂量转染细胞,pSUPER-NP 与脂质体的比例为 1/1,转染 48h 后以不同的病毒量感染细胞,40h 后测定病毒 HA 效价。同时转染 pSUPER 作为对照,结果如表 1 所示,表明当 pSUPER-NP 转染量为 1μg 时,基因转染效果最好,有效抑制病毒的增殖。由于 siRNA 是通过表达载体进入细胞内表达的,如何有效的将载体转入细胞是成功抑制基因表达的关键步骤。Le Hung 等<sup>[6]</sup>认为 siRNA 的 RNA 干扰效果有剂量依赖性,转染进细胞的载体越多,RNA 干扰的效果越明显。由于 siRNA 非病毒表达载体在细胞内实现瞬时表达,siRNA 在细胞内表达持续的时间有限,感染病毒的时机也很重要,许多研究者<sup>[7]</sup>证实表达载体转染细胞后 2~3d 感染病毒, RNA 干扰的效果最佳;Carlos F 等<sup>[8]</sup>认为虽然在转染后 1~7d 内感染病毒,依然有 RNA 抑制作用,但转染后 5d,对照孔细胞亦有损伤。本研究采用转染后 2d 感染病毒,可以得到预期效果。为进一步证实该表达质粒体内抑制病毒复制作用,本研究曾进行鸡胚胚体的体内试验,进一步证实该质粒抑制病毒的复制作用,但实验结果不尽一致,这可能与 siRNA 在体内的表达量、定位、持续时间有关。病毒在鸡胚胚体的复制速度过快,也可能导致 siRNA 的表达量不足以抑制病毒的复制,具体原因有待于进一步研究证实。本研究采用 pSUPER 质粒来获得 siRNA,采用质粒的优点在于:不需要直接操作 RNA;由于质粒可以复制扩增,能够显著降低制备 siRNA 的成本。此外,带有抗生素标记的 siRNA

表达载体,通过抗性辅助筛选,可以在细胞中持续抑制靶基因的表达数星期甚至更久<sup>[9]</sup>,可用于 RNA 干扰的长期研究。

表1 pSUPER-NP 转染量及病毒感染量的选择

Table 1 The HA titre of influenza virus in CEF transfected by different dose of pSUPER-NP followed by different dose of virus

Virus dose (TCID <sub>50</sub> )	HA titre (log <sub>2</sub> )				
	pSUPER-NP			pSUPER	Virus control
	0.5μg	1μg	1.5μg	1μg	
10 <sup>4</sup>	3	3	4	8	7
10 <sup>3</sup>	7	0	4	8	8
10 <sup>2</sup>	7	0	5	6	6
10	7	0	6	6	6

将 pSUPER-NP 及 pSUPER 分别以 1μg/孔转染细胞,转染 48h 后以 10<sup>3</sup> TCID<sub>50</sub> 的病毒感染。观察感染 40h 后细胞病变,病毒对照孔及转染 pSUPER 孔细胞变圆、脱落,而转染 pSUPER-NP 孔的细胞无明显病变。分别测定各孔病毒的 TCID<sub>50</sub> 及 HA 效价,病毒对照孔、pSUPER 转染孔及 pSUPER-NP 转染孔的 TCID<sub>50</sub> 分别为 10<sup>-6.00</sup>/0.1mL、10<sup>-5.83</sup>/0.1mL 和 10<sup>-2.686</sup>/0.1mL; HA 效价分别为 132、116 和 12,重复 3 次,均获得相似结果,表明 pSUPER-NP 质粒能抑制流感病毒的复制。

综上所述,本研究成功设计、构建了流感病毒 NP 基因 siRNA 表达质粒,该质粒转染 CEF 后,通过观察细胞病变、血凝试验和 TCID<sub>50</sub> 测定,初步证实该 siRNA 能抑制流感病毒复制,从而为流感病毒

的防制和基因治疗提供了方法,同时,也证实了该质粒可用于 RNA 干扰研究。

## 参考文献

- [1] David E. Swayne. Avian influenza : The virus and the disease [J]. World Poultry ,2000 ,Special :4-6.
- [2] Fire A, Xu S, Montgomery M K, *et al.* Potent and specific genetic interference by double - stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*[J]. Nature , 1998 , 391(6669) :806-811.
- [3] Elbashir S, M, Harborth J, Lendeckel W, *et al.* Duplex of 21 nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells[J]. Nature , 2001 , 411:494-498.
- [4] 殷 震. 动物病毒学[M]. 第 2 版,北京:科学出版社,1997, 343-348.
- [5] Ge Q, Michael T M, Tam N, *et al.* RNA interference of influenza virus production by directly targeting mRNA for degradation and indirectly inhibiting all viral RNA transcription[J]. PNAS100 , 2003 , 2718-2723.
- [6] Hung L, Kumar V. Specific inhibition of gene expression and transactivation functions of hepatitis B virus X protein and c-myc by small interfering RNAs[J]. FEBS Letters ,2004 , 560: 210-214.
- [7] Fabian C, Jasso F, Valdes V J, *et al.* Silencing structural and nonstructural genes in baculovirus by RNA interference [J]. Virus Research , 2004 ,02 :75-84.
- [8] Carlos F A, Miguel A D, Lorovento S, *et al.* RNA silencing of rotavirus gene expressing [J]. Virus Reseach , 2004 ,102: 43-51.
- [9] Kamp B, Bernards R, Agami R. A System for Stable Expression of Short Interfering RNAs in Mammalian Cells[J]. Science , 2002 , 296 :8-12.