

## 利用 RNA 干扰机制抑制猪繁殖与呼吸综合征病毒的增殖

高晓飞, 包晶晶, 陈勇军, 陈溥言\*\*

(南京农业大学动物医学院, 江苏南京 210095)

### RNA Interference Inhibits Replication of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus

GAO Xiao-fei, BAO Jing-jing, CHEN Yong-jun, CHEN Pu-yan\*\*

(College of Animal Veterinary Medicine, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

**Abstract:** RNA interference (RNAi) was performed to study the inhibition of *Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus* (PRRSV) replication. Two short interfering RNAs (siRNA) specific for *N* gene of PRRSV were designed using an online software. The siRNA was shown to inhibit PRRSV replication in cell lines. Two siRNA from PRRSV *N* gene expressed by vectors were shown to have a clear RNAi effect on PRRSV replication in MARC-145 cells. TCID<sub>50</sub> of progeny virus at different time, the occurrence time of CPE and IFA results in each group gave the evidence that the antiviral effects could extend to 120h. This report successfully revealed RNAi phenomenon of PRRSV replication procedure in MARC-145 cells and showed that vector-based RNAi technology would give a new vaccine design in PRRSV therapy.

**Key words:** *Porcine reproductive and respiratory syndrome* (PRRS); TCID<sub>50</sub>; *N* gene; CPE;

**摘要:** 本文探讨依靠RNAi技术对猪繁殖与呼吸综合征病毒(PRRSV)增殖的干扰作用。筛选到针对编码PRRS病毒核衣壳蛋白的*N*基因的两处靶序列作为候选片段,在MARC-145细胞上进行基因干扰实验研究。成功观测到由载体表达的小干扰RNA(siRNA)在MARC-145细胞中对PRRS病毒增殖的抑制现象。通过选取不同时间段对病毒进行TCID<sub>50</sub>检测,以及对CPE出现时间进行观察和免疫荧光技术,得到RNA干扰对PRRS病毒增殖抑制作用的动态数据。证实在真核细胞水平上, RNA干扰机制可以抑制PRRS病毒的增殖。实验结果表明, 依靠载体表达的RNA干扰技术将会对今后针对PRRS病毒的新型疫苗开发提供一个新思路。

**关键词:** 猪繁殖与呼吸综合征; TCID<sub>50</sub>; *N* 基因; CPE;

中图分类号: S852.65

文献标识码: A

文章编号: 1003-5125(2006)03-226-05

猪繁殖与呼吸综合征 (PRRS) 自 1987 年发现至今, 已在世界各主要养猪国家和地区普遍存在。本病可引起妊娠母猪的流产、早产、死胎、木乃伊胎及产弱仔猪, 幼龄猪主要表现为咳嗽、呼吸困难等症状<sup>[1]</sup>。猪繁殖与呼吸综合征病毒 (*Porcine reproductive and respiratory syndrome virus*, PRRSV) 属于套式病毒目 (*Nidovirales*) 动脉炎病毒科动脉炎病毒属成员<sup>[2]</sup>。根据病毒基因组

核苷酸序列的不同, 将其划分为两个基因型, 即北美洲型和欧洲型。在两个基因型中编码病毒核衣壳蛋白, 对病毒粒子完整形成起到关键作用, 因此在本病的分子生物学研究上具有重要意义。近十年, PRRSV 强毒毒株和更多的非典型性病症继续出现。因此, 对 PRRSV 需要更全面深入的研究。

本实验旨在利用 RNA 干扰机制, 通过干扰

收稿日期: 2005-09-12, 修回日期: 2005-11-30

作者简介: 高晓飞 (1981-), 男, 硕士研究生, 研究方向为动物分子病毒学及免疫学

\*\* 通讯作者. Corresponding author. Tel: 025-84396028, Fax: 025-84396028, E-mail: aid@nha.edu.com



PRRSV 的 *N* 基因表达, 在细胞水平上抑制 PRRSV 的增殖。为日后针对 PRRSV 的新型疫苗设计打下一定的理论基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验材料

pBS/U6-1.0 载体(Ambion 公司)由北京协和医科大学蔡丛利博士惠赠。*DH5 $\alpha$*  宿主菌和 MARC-145 细胞均由南京农业大学传染病教研室保存。猪繁殖与呼吸综合征病毒 *VR2332 resp* 株为本室保存毒株。转染试剂为 Invitrogen 公司的 Lipofectamin Plus 试剂。羊抗兔荧光抗体来自 Sigma 公司, 培养细胞用 RPMI1640 为 GIBCO 公司出品。Tripure 细胞裂解液购自罗氏诊断试剂公司; 饱和平衡酚 (pH8.0)、TEMED (四甲基乙烯二胺) 购自南京生工公司。

### 1.2 PRRSV VR2332 Resp 株 *N* 基因靶位点的选择

根据 Ambion 公司 pBS/U6-1.0 载体的要求, 利用 Ambion 公司筛选 siRNA 序列的网站 ([www.ambion.com/techlib/misc/siRNA\\_finder.html](http://www.ambion.com/techlib/misc/siRNA_finder.html)) 以及相关文章[17], 设计出两对针对 *N* 基因高度特异的干扰片段和一对阴性对照干扰片段, 提交 NCBI BLAST 软件分析无非特异性。将两个 RNA 干扰载体分别命名为 pBS/U6-60 与 BS/U6-260, 阴性对照载体命名为 pBS/U6-Neg。单链寡核苷酸均由上海博亚生物公司合成。

用于 pBS/U6-60 合成序列:

正义链: UCAGCUGUGCCAGAUGCUG

反义链: CAGCAUCUGGCACAGCUGA

用于 pBS/U6-260 合成序列:

正义链: GGCGCUGGGACUUGCACCC

反义链: GGGUGCAAGUCCCAGCGCC

用于 pBS/U6-Neg 合成序列:

正义链: CACGACGGAUCAGCGCUAC

反义链: GUAGGGCUCAUCGGUCCUG

### 1.3 转染 MARC-145 细胞

转染前 18~24h, 细胞用胰酶消化, 以  $10^5$ /mL 密度接种于 24 孔细胞培养板(不加抗生素), 按 Lipofectamine Plus 转染试剂的操作步骤将一定体积的终浓度为  $1.0\mu\text{g}/\mu\text{L}$  的荧光质粒 pEGFP-N1 转染入 MARC-145 细胞中, 24h 后观察结果。

### 1.4 转染 RNA 干扰载体

按 Lipofectamine Plus 转染试剂的操作步骤将一定体积的终浓度为  $1.0\mu\text{g}/\mu\text{L}$  的 RNA 干扰载体转染进入 MARC-145 细胞中。于 24h, 48h, 72h, 96h,

120 h 分别观察干扰效果。

### 1.5 测定病毒 TCID<sub>50</sub>

将不同接种时间段的病毒上清收获, 4℃ 以 4000r/min 离心 15min, 收获上清。将上述病毒悬液作 10 倍稀释 ( $10^{-1}\sim 10^{-8}$ ), 将各稀释度的病毒液接种于 96 孔板中已长成单层的 MARC-145 细胞。按 Reed 与 Muench 氏法<sup>[6]</sup>计算病毒的 TCID<sub>50</sub>。

### 1.6 间接免疫荧光试验

加入阳性的兔源 PRRS VR2332 resp 株病毒核衣壳蛋白抗体于 24 孔板中, 37℃ 作用 1h 后用 PBS 液洗涤; 滴加按 1: 3000 稀释的羊抗兔荧光二抗, 37℃ 作用 45min, 洗涤后用荧光显微镜观察。

## 2 结果

### 2.1 RNA 干扰载体的构建和鉴定

分别将两条单链退火形成 cDNA 双链, 克隆进 pBS/U6-1.0 载体中, 用缺失酶切位点方法鉴定。由于插入片段是含 *Apa*I 与 *Eco*RI 两个酶切位点, 根据载体图谱(Ambion 公司), 片段成功插入后, *Xho*I 位点将被切除。用 *Apa*I 与 *Eco*RI 双酶切载体, 并用 *Xho*I 单酶切鉴定, 以未经酶切的质粒作为对照组, 经琼脂糖电泳证明载体构建成功。将 RNA 干扰载体命名为 pBS/U6-60, pBS/U6-260, 阴性对照为 pBS/U6-Neg。由于插入片段存在高能量的发夹结构, 不能也没有必要通过测序<sup>[19]</sup>。

### 2.2 转染 MARC-145 细胞

按照 Invitrogen 公司 Lipofectamin2000 和 Lipofectamin Plus 转染试剂操作手册, 将  $2\mu\text{L}$  终浓度为  $1.0\mu\text{g}/\mu\text{L}$  的重组荧光质粒 pEGFP-N1 转染入 MARC-145 细胞内。通过比较发现, Lipofectamin Plus 转染效率可达到 40% 左右 (图 1), 相对于 Lipofectamin 2000 试剂有明显提高, 并且完全能满足 RNA 干扰载体执行生物功能的要求。

### 2.3 RNAi 抑制 PRRSV 的增殖

转染 RNA 干扰载体 24h 后, 接种  $10^2$ TCID<sub>50</sub>

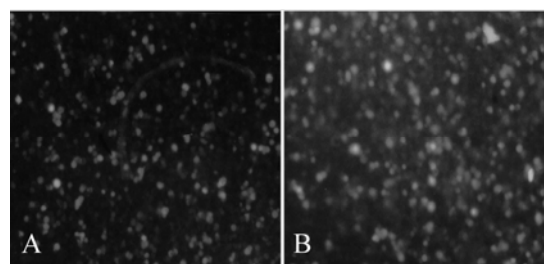


图 1 MARC-145 细胞转染条件的优化

Fig. 1 Optimize the efficiency of transfection in MARC-145  
A: MARC-145 cells transfected with pEGFP-N1 by Lipofectamine 2000;  
B: MARC-145 cells transfected with pEGFP-N1 by Lipofectamine Plus

单位的 PRRSV 于 24 孔细胞板中。分别在不同时间段取病毒上清做 TCID<sub>50</sub> 检测。在 72h 内, 转染 RNA 干扰载体的两组中, 病毒滴度明显低于对照组 (图 2), 说明 PRRSV 的增殖受到显著抑制。在 120h, 转染 RNA 干扰载体组的病毒滴度与对照组差异不显著, 表明干扰作用结束。

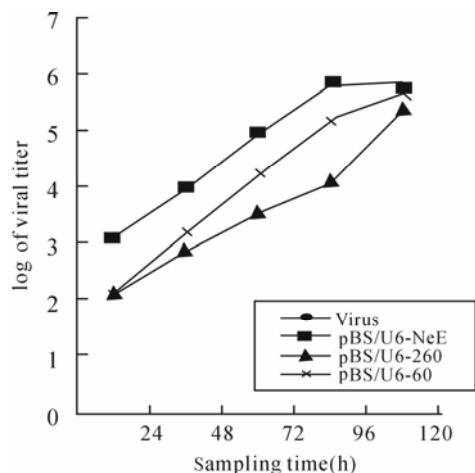


图 2 转染 RNA 干扰载体的 MARC-145 细胞接种 PRRSV 后的子代病毒生长曲线

Fig. 2 Growth kinetic of PRRSV in MARC-145 cell transfected with RNAi vectors 24h before PRRSV inoculation

接种  $10^2$ TCID<sub>50</sub> 单位的 PRRSV VR2332 resp 株病毒于 24 孔板, 12h 后转染, 不同时间段取病毒上清液做 TCID<sub>50</sub> 检测。在 72h 内, 转染 RNA 干扰载体的两组中的病毒滴度同样明显低于对照组 (图 3)。在 120h, 转染 RNA 干扰载体两组中的病毒滴度与对照组无明显差异, 表明干扰作用的结束。

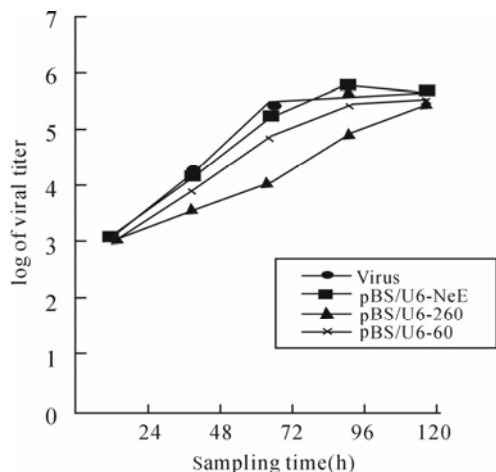


图 3 接种 PRRSV 的 MARC-145 细胞转染 RNA 干扰载体的子代病毒生长曲线

Fig. 3 Growth kinetic of PRRSV in MARC-145 cell transfected with RNAi vectors 12h after PRRSV inoculation

## 2.4 RNAi 抑制 PRRSV 产生病变

转染 RNA 干扰载体 2 h 后, 接种  $10^3$ TCID<sub>50</sub> 单位的 PRRSV 于 24 孔板中, 选取 48h、72h、120h 时间段观察病变 CPE (cytopathic effect) 发生情况 (图 4)。与病毒对照和阴性干扰载体组相比, 转染 RNA 干扰载体 pBS/U6-60 与 pBS/U6-260 的 MARC-145 细胞显著抑制 PRRSV 病毒的增殖, 推迟 CPE 的发生时间。并且转染 pBS/U6-60 干扰载体的细胞可以维持接近 120h 不出现 CPE。

## 2.5 间接免疫荧光检测 RNAi 的效果

转染 RNA 干扰载体 24 h 后, 接种  $10^3$ TCID<sub>50</sub> 单位的 PRRSV 于 24 孔板中, 48h 进行间接免疫荧光试验 (图 5)。转染 RNA 干扰载体 pBS/U6-60 与 pBS/U6-260 的两组荧光数量明显少于病毒以及阴性干扰载体对照组。说明 RNA 干扰作用显著抑制 PRRSV 的增殖。

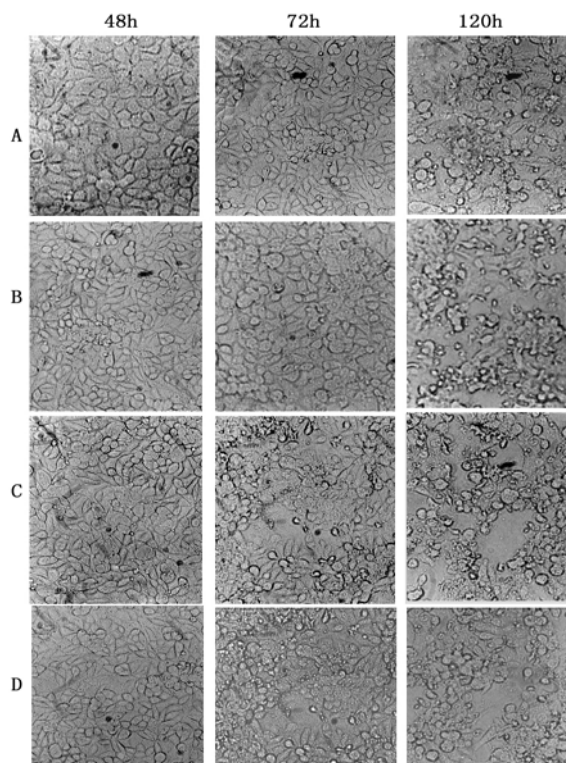


图 4 RNA 干扰作用可以在 120 h 内显著推迟 PRRSV 在 MARC-145 细胞上出现病变的时间

Fig. 4 RNAi could delay the time of PRRSV CPE occurrence on MARC-145 cell

A: Cells transfected with pBS/U6-60; B: Cells transfected with pBS/U6-260; C: Virus control; D: Cells transfected with pBS/U6-Neg.

## 3 讨论

在本实验研究中通过 RNA 干扰技术, 成功在 MARC-145 细胞上抑制了 PRRSV VR2332 resp 株病毒的增殖。针对 PRRSV N 基因的 2 个 RNA 干扰

载体不仅能预防 *PRRS* 病毒感染增殖, 而且在 *PRRSV* 感染细胞后, 再转染 RNA 干扰载体, 仍能抑制病毒增殖, 表明 RNA 干扰对 *PRRSV* 感染有治疗作用。

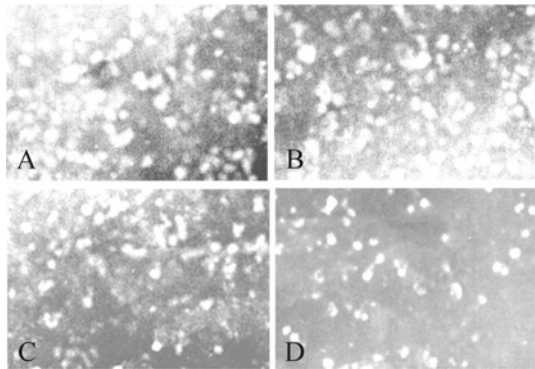


图5 转染 RNA 干扰载体的 MARC-145 细胞在 48 h 可以显著抑制 *PRRSV* 的增殖

Fig. 5 RNAi could inhibit the replication of *PRRS* virus replication on MARC-145 cell in 48h

A: virus control; B: cells transfected with pBS/U6-Neg; C: cells transfected with pBS/U6-260; D: cells transfected with pBS/U6-60

最新的研究表明, *PRRSV* 与很多猪病在宿主体内存在有明显的区别<sup>[7]</sup>。 *PRRSV* 核衣壳蛋白是一种多功能蛋白质, 北美株和欧洲株的核衣壳蛋白分别由 123 和 128 个氨基酸构成。抗原决定簇主要位于蛋白的中央。国外有学者利用反向遗传技术构建成功将 *N* 基因突变和修饰的感染性核酸, 同样也发现 *N* 基因上的某些位点对 *PRRSV* 的复制起到关键性作用<sup>[9]</sup>。由于 *N* 基因编码的是 *PRRSV* 的核衣壳蛋白, 如果阻止其表达, 整个 *PRRSV* 粒子将不能够包装成功<sup>[9]</sup>, 所以有效的阻止 *N* 基因的表达也就能有效的抑制 *PRRSV* 的增殖。

本实验结果表明特异性的 siRNA (small interfering RNA) 可以在细胞水平上显著抑制 *PRRSV* VR2332 resp 株病毒的增殖。众所周知在植物中存在天然的 RNA 干扰机制能够抵御病毒感染, 特别是针对 RNA 病毒<sup>[10]</sup>。在哺乳动物细胞中被普遍认为不能进行 RNA 沉默机制, 取而代之的是非特异性的, 由干扰素调节的抗病毒应答<sup>[11]</sup>。近年来对 RNAi 机制的研究表明在哺乳动物细胞中, RNA 沉默机制是存在的<sup>[12,13]</sup>。在某些情况下, 长链 dsRNA 可以成功的被剪切加工成特异性的 siRNA, 并且不诱导蛋白激酶 R (PKR) 的磷酸化——一种由干扰素调节的对哺乳动物最初防御系统起作用的启动信号<sup>[14,15]</sup>。而且近年来, HIV 和 B 型肝炎都被报道可通过 RNA 干扰技术进行治疗<sup>[16,17]</sup>。因此, 科学家预计 siRNA 在转录后能够快速切断目的 mRNA, 阻

止 mRNA 进入翻译阶段。在我们的实验中, 通过设立一组阴性干扰载体作为对照, 证明所选两对 siRNA 是高特异性的, 具有良好的干扰功能。

通过对 *PRRSV* VR2332 resp 株病毒 *N* 基因的两处靶位点进行干扰作用, 成功的抑制了病毒的增殖, 说明这两处序列中可能存在对 *PRRSV* 繁殖起关键作用的位点。以前的研究表明, 如果病毒的 mRNA 持续存在, siRNA 效果就会被延长<sup>[18]</sup>。也就是说 siRNA 的存在和降解很大程度上是由目的 mRNA 决定的。曾有科学家预测, 类似于哺乳动物以蛋白质为免疫系统的基础, 在生命发生早期则是存在以核酸为基础的免疫系统。如果真是这样, 在哺乳动物中, 一种以识别外源核酸为基础的获得性免疫系统也将会产生记忆性应答。因此, 我们可以设想一种转基因载体, 如果能够产生与 siRNA 十分类似的 mRNA, 也应该能够像哺乳动物体内的记忆性免疫应答一样产生记忆效应。同时, 众所周知 *PRRSV* 在动物体内长期潜伏, 而且用传统方法难以彻底根除。因此, 本实验结果表明, 依靠载体表达的 RNA 干扰技术今后必将会对 *PRRSV* 新型疫苗的开发提供一个新思路。

## References

- [1] Wensvoort G, Terpstra C, P O J M A, *et al*. Mystery swine disease in the Netherlands: isolation of lelystac virus [J]. *Vet Q*, 1991, 3: 121-130.
- [2] Collins J E, Benfield D A, Christianson W T, *et al*. Isolation of swine infertility and respiratory syndrome virus in virus in North America and experimental reproduction of the disease in gnotobiotic pigs [J]. *J Vet Diagn Invest*, 1992, 4: 117-126.
- [3] Denac H, Moser C, Tratschin J D, *et al*. An indirect ELISA for the Detection of antibodies against porcine reproductive and respiratory syndrome virus using recombinant nucleocapsid protein as antigen [J]. *J Virol Methods* 1997, 65, 169-181.
- [4] Dea S, I. Wilson D, Therien, *et al*. Competitive ELISA for detection of antibodies to porcine reproductive and respiratory syndrome virus using recombinant *E. coli* expressed nucleocapsid protein as antigen [J]. *J Virol Methods*, 2000, 87, 109-122.
- [5] Joseph Sambrook, Jin DY, (萨姆布鲁克, 金冬燕), *et al*. *Molecular Cloning: A laboratory Manual*, 2nd ed. (分子克隆实验指南, 第二版), Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- [6] Yin Z, Liu J H (殷震, 刘景华). *Animal Virology*, (动物病毒学,) [M]. 2nd ed Beijing: Science Press, 1997.
- [7] Michael P. Murtaugh. *PRRS immunology: what are we missing?* Presentation in Nanjing, 2005

- [8] Eric Devroe and Pamela A Silver. Retrovirus delivered siRNA. *BMC Biotechnology*, August 2002. 418 : 430-434.
- [9] Changhee lee, Jay G, Calvert, Siao-Kun W. Welch, Dongwan Yoo. A DNA-launched reverse genetics system for porcine reproductive and respiratory syndrome virus reveals that homodimerization of the nucleocapsid protein is essential for virus infectivity [J]. *Virology*, 2005, 331, 47-62.
- [10] Elbashir S M, Harborth J, lendeckel W *et at.* Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells [J]. *Nature*, 2001, 411 : 494-498.
- [11] Fire A. RNA-triggered gene silencing [J]. *Trends Genet*, 1999, 15 : 358-363.
- [12] Gitlin I, Andino R. Nucleic acid-based immune system: the antiviral potential of mammalian RNA silencing [J]. *J Virol*, 2003, 77 : 7159-7165.
- [13] Gitlin I, Karelsky S, Andino R. Short interfering RNA confers intracellular antiviral immunity in human cells [J]. *Nature*, 2002, 418 : 430-434.
- [14] Huang H, Yang Z, Xu Q, *et at.* Recombinant fusion protein and DNA vaccines against foot-and-mouth disease virus infection in guinea pigs and swine [J]. *Viral Immunol*, 1999, 12 : 1-8.
- [15] Jacque J M, Triques K, Stevenson M. Modulation of HIV-1 replication by RNA interference [J]. *Nature*, 2002, 418 : 435-438.
- [16] Rigden R C, Carrasco C P, Barnett P V, *et at.* Innate immune responses following emergency vaccination against foot-and-mouth disease virus in pigs [J]. *Vaccine*, 2003, 21: 1466-1477.
- [17] Shlomai A, Shaul Y. Inhibition of hepatitis B virus expression and replication by RNA interference [J]. *Hepatology*, 2003, 37 : 764-770.
- [18] Song E, lee S K, Dykxhoorn D M, Sustained small interfering RNA-mediated human immunodeficiency virus type 1 inhibition in primary macrophages [J]. *J Virol*, 2003, 77: 7174-7181.
- [19] Devroe E, Silver P A, Retrovirusdelivered siRNA, *BMC Biotechnology* 2002.