

靶向猪瘟病毒 NS3 基因 shRNA 干扰载体的构建与鉴定*

冶贵生, 张彦明, 徐 浩, 郭抗抗

(西北农林科技大学 动物科技学院, 陕西 杨凌 712100)

[摘 要] 利用 RNA 干扰在线生物学软件分析猪瘟病毒 NS3 基因, 设计针对 NS3 基因不同位置的小发卡 RNA (short hairpin RNA, shRNA) 干扰序列(其结构特征为正链(19nt)-环(9nt)-负链(19nt))。化学合成这些序列, 并退火连接为双链干扰片段, 将双链干扰片段定向克隆到干扰载体中, 构建重组载体 pGene-NS3-1, pGene-NS3-2 和 pGene-NS3-3, 转化 DH5 α 大肠杆菌感受态细胞, 对转化产物进行 kan⁺ 筛选, 碱裂解法提取重组质粒, 将酶切鉴定为阳性的质粒测序。结果显示, 双链干扰片段克隆方向正确, 序列中未出现核苷酸的插入, 缺失等突变现象。表明靶向猪瘟病毒 NS3 基因 shRNA 干扰载体构建成功。

[关键词] 猪瘟病毒; NS3 基因; RNA 干扰; 小发卡 RNA

[中图分类号] S852.65⁺.1

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2007)03-0007-04

Construction and identification of recombinant shRNA interference plasmids targeting to NS3 gene of classic swine fever virus

YE Gui-sheng, ZHANG Yan-ming, XU Hao, GUO Kang-kang

(College of Animal Science and Veterinary Medicine, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: 19nt interfering sequences for selecting different positions of NS3 gene were designed for Sense-Loop-Antisense by using biology software after analysing NS3 gene of classic swine fever virus. Then, these sequences of chemical synthesis were annealed for double strands interference segment, which was made directional cloning to interfering plasmid to construct recombinant plasmids pGene-NS3-1, pGene-NS3-2 and pGene-NS3. The results indicated that segments were cloned rightly and there wasn't nucleotide insertion and nucleotide deletion, and recombinant shRNA interference plasmids targeting to NS3 gene of CSFV was successfully constructed, which was basic for researching NS gene.

Key words: classical swine fever virus; NS3 gene; RNA interference; small hairpin RNA

猪瘟(Classical Swine Fever, CSF)是由猪瘟病毒(CSFV)引起的猪的一种高度接触性传染病。该病流行广泛,发病率高,危害极大,被OIE列为A类动物疾病。CSFV是黄病毒科瘟病毒属成员,基因组为单股正链RNA,全长约12 kb,含有一个大的开放阅读框(ORF)。CSFV ORF编码一条由结构蛋白和非结构蛋白组成的多聚蛋白,此多聚蛋白含3898个

氨基酸残基,可进一步被蛋白酶加工成病毒所需的各种功能蛋白。CSFV基因组结构从5'到3'依次为5'-非翻译区、N^{pro}、C、E^{ns}(E0)、E1、E2、P7、NS2-3、NS4A、NS4B、NS5A、NS5B和3'-非翻译区,5'-端无帽子结构,3'-端无poly(A)尾巴。其中,NS2-3基因编码的蛋白被加工后形成的p80蛋白在病毒的生命活动中起着重要的作用。

* [收稿日期] 2006-02-17

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30270988);西北农林科技大学研究生教育创新计划项目(05Ych019)

[作者简介] 冶贵生(1977-),男,新疆米泉人,在读博士,主要从事分子病原学与免疫学研究。

[通讯作者] 张彦明(1956-),男,陕西南郑人,教授,博士生导师,主要从事分子病原学与免疫学研究。E-mail: ylzhangym@sohu.com; zhangym@nwuaf.edu.cn

RNA 干扰(RNA interference, RNA i)是由双链RNA介导的,能在转录后水平特异性降解生物体的mRNA,从而使基因的表达发生沉默的一种新技术,是生物体一种古老的防御机制^[1]。由U6启动子转录的小发卡RNA(short hairpin RNA, shRNA)在细胞内会自动被加工成siRNA分子,从而引发靶基因的沉默。RNA i自1998年Fire等^[2]首次在线虫中发现并证实后,经过几年的不断发展,逐渐显示出其在基因功能研究方面的巨大潜力。CSFV正链RNA病毒基因组兼具病毒mRNA和复制模板的作用,其核酸类型完全符合RNA i对靶基因的要求。为了研究NS3基因在CSFV复制与增殖中的作用,本研究针对NS3基因设计3个不同位置的特异性干扰序列,构建重组干扰载体,并对其进行了鉴定,以期NS3基因的功能研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 载体、毒株和菌株 pGenesil-1载体购自武

pGene-NS3-1-Sense: 5'-GATCCGAGATAGGGAGGCATAAGATTCAAGAGATCTTATGCCTCCCT
ATCTCTTTTTGAATTCA-3'
pGene-NS3-1-Antisense: 5'-AGCTTGAATTCAAAAAAGAGATAGGGAGGCATAAGATCTCTTG
AATCTTATGCCTCCCTATCTCG-3'
pGene-NS3-2-Sense: 5'-GATCCGACTTAGGCTCAGAGTACTTTCAAGAGAAGTACTCTGAGCC
TAAGTCTTTTTGAATTCA-3'
pGene-NS3-2-Antisense: 5'-AGCTTGAATTCAAAAAAGACTTAGGCTCAGAGTACTTCTCTTG
AAAGTACTCTGAGCCTAAGTCG-3'
pGene-NS3-3-Sense: 5'-GATCCGGTTACAACCTCAGGCTACTTCAAGAGAGTAGCCTGAGTT
GTAACCCTTTTTGAATTCA-3'
pGene-NS3-3-Antisense: 5'-AGCTTGAATTCAAAAAAGGGTTACAACCTCAGGCTACTTCTCTTG
AAGTAGCCTGAGTTGTAACCCG-3'

图1 CSFV NS3基因不同位置的shRNA干扰序列

Fig. 1 shRNA sequence of CSFV NS3 gene

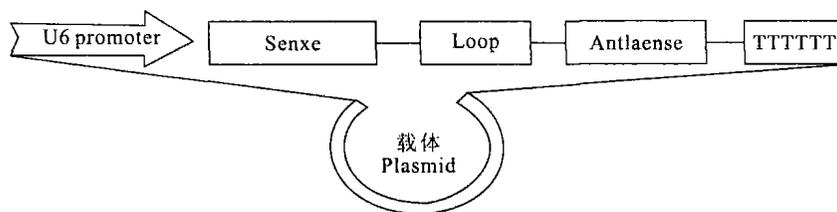


图2 CSFV NS3基因重组干扰载体示意图

Fig. 2 Map of CSFV NS3 gene recombinant interfering plasmid

1.3 CSFV NS3基因干扰序列的退火连接

连接体系为30 μL ,其中pGene-NS3-1-Sense 2 μL , pGene-NS3-1-Antisense 2 μL ,退火缓冲液6

汉晶赛生物工程技术有限公司;猪瘟病毒石门株购自中国兽医药品监察所;DH5 α 菌株为西北农林科技大学动物科技学院重大动物疫病防治与畜产品安全研究室保存。

1.1.2 试剂 *Bam*H I、*Hind*III和 *Eco*R I 购自宝生物(大连)有限公司;凝胶纯化回收试剂盒、质粒纯化试剂盒购自安徽优晶生物工程有限公司。

1.2 CSFV NS3基因特异性干扰序列的设计

根据干扰序列设计原则,利用生物软件设计CSFV NS3基因3个位置的小发卡RNA(short hairpin RNA, shRNA),其结构为:正链(19 nt)-环(9 nt)-负链(19 nt),序列上游含 *Bam*H I酶切位点,下游含 *Hind*III酶切位点,负链与转录终止信号之间设计了一个 *Eco*R I酶切位点(图1)。设计完成的干扰序列经与GenBank基因库比对后,排除了非CSFV NS3基因被沉默的可能性。本研究干扰序列的转录是以重组干扰载体(图2)中的U6启动子所启动,干扰序列转录起始碱基为G,以连续的T作为转录终止信号。

μL ,灭菌水20 μL 。混匀后,90 $^{\circ}\text{C}$ 孵育3 min,然后缓慢降至室温。其他干扰序列的退火连接反应同上。

1.4 重组质粒 pGene-NS3-1 的构建、转化及转化产物的筛选

取上述连接产物 2 μL 与经 *Bam*H I、*Hind*III 双酶切并纯化回收的线性干扰载体 pGenesil-1 1 μL , 在 1 μL T4 DNA 连接酶的作用下 16 连接 3 h, 构建重组质粒 pGene-NS3-1, 加入到按常规法制备的 DH5 α 感受态细胞中, 并涂布于 Kan⁺ 的平板中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 12~15 h。重组质粒 pGene-NS3-2 和 pGene-NS3-3 的构建、转化及筛选方法同上。

1.5 重组质粒 pGene-NS3-1 的提取与鉴定

挑取上述 Kan⁺ 平板中的单菌落, 碱裂解法提取质粒。取 1 μL *Eco*R I 限制性内切酶, 3 μL 质粒, 1 μL 酶切缓冲液, 5 μL 灭菌水组成 10 μL 的反应体系, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 3 h。反应结束后以 Marker DL 2000

作为核酸分子量标准, 进行 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳分析。重组质粒 pGene-NS3-2 和 pGene-NS3-3 的提取鉴定方法同上。将鉴定出的阳性重组质粒送上海生工有限公司测定序列。

2 结果与分析

2.1 重组质粒的质量

重组质粒电泳结果表明, 质粒条带清晰, 含量大(图 3), 适合作为酶切鉴定的模板。

2.2 重组质粒的酶切鉴定结果

将 NS3 基因特异性干扰片段与 pGenesil-1 载体连接后的转化子用 *Eco*R I 酶切, 电泳结果表明, 在约 400 bp 处出现预期的目的片段(图 4), 表明干扰序列与干扰载体重组成功。

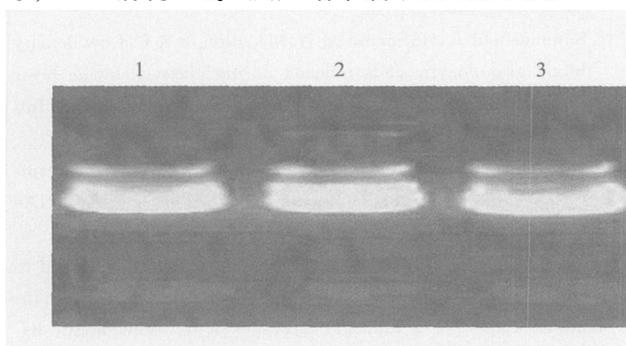


图3 重组质粒电泳结果

1. pGene-NS3-1; 2. pGene-NS3-2; 3. pGene-NS3-3

Fig. 3 Agarose gel electrophoresis of recombinant plasmid

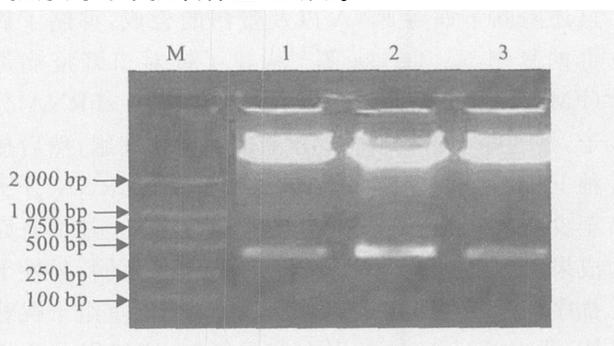


图4 重组质粒的 *Eco*R I 酶切鉴定结果

M. Marker DL 2000; 1. pGene-NS3-1;

2. pGene-NS3-2; 3. pGene-NS3-3

Fig. 4 *Eco*R I restriction analysis of recombinant plasmid

2.3 重组质粒的序列测定结果

结果表明, 干扰序列克隆正确, 其中不存在核苷酸的缺失、插入等突变现象, 说明靶向 NS3 基因的 shRNA 重组干扰载体构建成功。

3 讨论

本研究之所以采用构建靶向 CSFV NS3 基因重组干扰载体的方法产生 siRNA 分子, 是因为载体中的 U6 启动子具有确切的转录起始位点, 而且以 4~6 个连续的胸腺嘧啶为转录终止信号, 转录生成的 shRNA 分子在细胞内稳定, 能被自动加工成为 siRNA 分子。这些 siRNA 分子与核酶复合物结合形成诱导沉默复合物(RNA induced silencing complex, RISC)。RISC 可将双链 siRNA 分子解链并释放掉其中的一条链, 形成含有单链干扰分子的沉默复合物, 该复合物通过碱基互补配对的原则与靶 mRNA 分子结合, 并在距离 siRNA 5' 端大约 10 个碱基处切割靶基因^[3], 且 siRNA 分子呈逐级放大的

增长^[4], 从而实现 NS3 基因的沉默。而且, 以载体法产生 shRNA 分子具有简便、易操作的特点, 避免了化学合成 siRNA 所需费用较高和体外转录法生成的 siRNA 分子易被 RNase 降解的问题。

为了方便对重组干扰载体进行鉴定, 本研究在设计干扰序列时在转录终止信号“TTTTTT”与 *Hind*III 酶切位点之间加了一个 *Eco*R I 酶切位点, 这样可以利用载体自身含有的 *Eco*R I 酶切位点, 切出一个含有 U6 启动子和干扰序列的片段, 进而通过琼脂糖凝胶电泳方便的鉴定重组载体的重组效果, 避免了通过聚丙烯酰胺电泳分析经 *Bam*H I 与 *Hind*III 酶切小片段带来的繁琐步骤。本试验所用的真核干扰表达载体 pGenesil-1, 是以 pEGFP-C1 质粒为骨架改造获得的, pGenesil-1 载体中的 neo 真核细胞抗性基因为靶基因在哺乳动物细胞中的长期基因沉默研究提供了前提条件; 而且此载体含有 EGFP 绿色荧光蛋白报道基因, 可以方便的在荧光显微镜下观察转染效果。

本试验之所以选择 NS3 基因作为靶基因,是因为瘟病毒 NS3 蛋白具有丝氨酸蛋白酶 NTPase、解螺旋酶活性^[5]。CSFV 与同属的牛病毒性腹泻病毒(BVDV)基因组序列具有高度同源性,BVDV NS3 蛋白的产生一般与病毒的致细胞病变效应(CPE)密切相关^[6]。p80 蛋白通过水解 NTP 获得能量使结合在模板链上的 RNA 或 DNA 解脱下来,从而使新合成的 RNA 链与模板链分离。因此,瘟病毒 p80 蛋白在病毒的复制及病毒与宿主细胞的相互关系中起着极为重要的作用^[7]。

国外学者为了研究病毒非结构蛋白基因的生物学功能,将 RNA 干扰技术应用于病毒基因沉默的研究中。靶向 SARS 病毒 RNA 聚合酶的 siRNA 分子,阻断了病毒对 Vero 细胞的致细胞病变效应,并且还阻断了病毒 RNA 以及蛋白的合成,抑制了病毒的复制^[8]。Teresa 等^[9]构建了针对口蹄疫病毒(FMDV)非结构蛋白 2B 基因编码区的 shRNA 分子,将这些小干扰 RNA 分子转染猪体细胞,然后接种 FMDV,结果表明针对 2B 基因的 shRNA 分子至少能沉默 4 种血清型的 FMDV。基于上述的研究成果,本试验设计针对 CSFV NS3 基因的特异性干扰序列,并成功构建了靶向 NS3 基因的重组干扰载体,为 CSFV NS3 基因在病毒复制、增值以及致细胞病变中的生物学功能的研究奠定了基础。

[参考文献]

- [1] Zamoer P D. RNA interference: listen to the sound of silence [J]. *Nature Structural Biology*, 2001, 8(9): 46-51.
- [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] Dykxhoo D M, Novina C D, Sharp P A. Killing the messenger: short RNAs that silence gene expression [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2003, 4(6): 457-467.
- [4] Palauqui J C, Emayan, Pollien J M, et al. Systemic acquired silencing: transgene-specific post-transcriptional silencing is transmitted by grafting from silenced stocks to nonsilenced scions [J]. *EMBO*, 1997, 6(15): 738-745.
- [5] Wiskerchen M M, Collett M S. Pestivirus gene expression: p80 of the bovine viral diarrhoea virus is a proteinase involved in polyprotein processing [J]. *Virology*, 1991, 184: 341-350.
- [6] Meyers G, Thie H J. Molecular characterization of pestivirus [J]. *Adv Virus Res*, 1996, 47: 53-118.
- [7] Summerfield A, Hofmann M A, McCullough K C. Low density blood granulocytic cells induced during classical swine fever are targets for virus infection [J]. *Vet Immunol Immunopathol*, 1998, 63(3): 289-301.
- [8] Wang Z, Ren L, Zhao X, et al. Inhibition of severe acute respiratory syndrome virus replication by small interfering RNA in mammalian cells [J]. *J Virol*, 2004, 78: 7523-7527.
- [9] Teresa S, Wu Q H, Sonia A B. Short hairpin RNA targeted to the highly conserved 2B nonstructural protein coding region inhibits replication of multiple serotypes of foot-and-mouth disease virus [J]. *Virology*, 2005, 335: 222-231.

(上接第 6 页)

- [33] Xu C, Jiang J, Sottile V, et al. Immortalized fibroblast-like cells derived from human embryonic stem cells support undifferentiated cell growth [J]. *Stem Cells*, 2004, 22: 972-980.
- [34] Taranger C K, Noer A, Anita L, et al. Induction of dedifferentiation, genome-wide transcriptional programming, and epigenetic reprogramming by extracts of carcinoma and embryonic stem cells [J]. *Mol Biol Cell*, 2005, 16: 5719-5735.
- [35] Guan L K, Nayernia K, Maier L S, et al. Pluripotency of spermatogonial stem cells from adult mouse testis [J]. *Nature*, 2006, 440: 1199-1203.
- [36] Li L, Baroja M L, Majumdar A, et al. Human embryonic stem cells possess immune-privileged properties [J]. *Stem Cell*, 2004, 22: 448-456.