

A 型流感病毒 NP 基因小干扰 RNA 表达载体的构建^{*}

操 胜,杨增岐

(西北农林科技大学 动物科技学院,陕西杨凌 712100)

[摘 要] 以 A 型流感病毒 NP 基因为靶标,设计并合成了 3 对编码发夹状 siRNA 寡聚核苷酸。将合成的序列互补的寡聚核苷酸退火形成双链,克隆至 pSilencer 1.0-U6 载体中,并转化 DH5a 菌株,氨苄抗性筛选阳性菌落,扩大培养后,提取质粒进行酶切鉴定,并进行测序分析。结果显示,酶切后得到预期长度的 DNA 片段;插入序列插入的位置与设计完全一致,无碱基缺失或突变。表明 A 型流感病毒 NP 基因小干扰 RNA 表达载体构建成功。

[关键词] RNA 干扰;流感病毒;NP 基因

[中图分类号] S852.65⁺9.6

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2007)05-0043-04

Cloning of the recombinant plasmid targeting avian influenza virus gene by RNA interfering

CAO Sheng, YANG Zeng-qi

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

Abstract: Here three pairs of DNA sequences which can encode short hairpin RNAs (shRNA) targeting at the NP gene of the avian influenza virus were designed and synthesized. The complement form was obtained by annealing and inserted into vector pSilencer1.0-U6. The recombinant plasmid was transformed into DH5a strains. The plasmid identified by restriction enzyme was used for sequence analysis. Results showed that the recombinant plasmids were successfully constructed, which provided a base for the further searching new therapy method and studying gene functions of influenza A virus.

key word: RNA interfering; influenza virus; NP gene

A 型流感病毒(Influenza virus)属于正粘病毒科流感病毒属成员,能引起鸟类、多种禽类、人类和低等哺乳动物的流行性感[1]。流感病毒血清型众多,不同血清型间交叉保护性差,且基因组抗原漂移和变异频繁,所以现有的疫苗和药物不能有效控制感染的发生。

RNA 干扰(RNA interference, RNAi)是一种双链 RNA(dsRNA)介导的序列特异性 mRNA 降解的过程,也是体内基因组抵御外在感染和内部转座的一种保护机制。RNAi 广泛存在于植物、真菌、

线虫、后生动物及哺乳动物等各种生物体中^[2]。自然发生的 RNAi 的作用机制是:外源性(如病毒)或内源性的 dsRNA 在细胞内被 Dicer 酶切割成 21~23 nt 短双链 RNA(即 siRNA),这些 siRNA 与某些酶形成的 RNA 诱导沉默复合物(RNA-induced silencing complex, RISC),能特异性识别和降解 mRNA,从而抑制靶基因的表达。在哺乳动物细胞内导入 21~23 nt 的 siRNA 可引发 RNA 干扰,由于小于 30 nt 的 siRNA 不会引发细胞内的干扰素效应,因而避免了出现非特异性抑制靶基因表达的现象^[3]。

^{*} [收稿日期] 2006-04-10

[作者简介] 操 胜(1977-),男,安徽怀宁人,在读硕士,主要从事分子病毒学研究。

[通讯作者] 杨增岐(1963-),男,陕西岐山人,教授,博士生导师,主要从事动物传染病研究。

为了从细胞水平筛选到高效的抑制流感病毒复制的靶位点,本试验以 A 型流感病毒 NP 基因为靶标,在该基因序列高度保守区设计并合成了 3 对编码发夹状 siRNA 寡聚核苷酸,将合成的序列互补的 2 条寡聚核苷酸单链退火形成双链,克隆至 pSilencer1.0-U6 载体中,构建 A 型流感病毒 NP 基因小干涉 RNA 表达载体,并对其进行酶切鉴定和测序分析,以期为 A 型流感病毒基因功能研究和新型药物的开发奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒和细胞株 含 U6 启动子的转录载体 pSilencer 1.0-U6 购自 Ambion 公司,大肠杆菌 DH5 α 由西北农林科技大学禽病研究室保存。

1.1.2 试剂 限制性内切酶 *EcoR* I、*Apa* I、*Hind* III 和 *Kpn* I 为大连宝泰克生物技术公司产品;T4 DNA 连接酶为 TaKaRa 公司产品;柱离心式质粒抽提试剂盒和柱离心式胶回收试剂盒均购自上海华舜公司。

1.1.3 siRNA 的设计与寡聚核苷酸的合成 以 A 型流感病毒 A/duck/Nanchang/1904/1992 (H7N1) 株 NP 基因为靶基因,在该亚型流感病毒基因序列高度保守区,利用 Ambion 公司在线 siRNA Designer 软件,结合小干涉 RNA 设计原则,设计 3 对编码发夹状 siRNA 的 DNA 序列。使用 NCBI 上 Blast 软件分析设计的序列与 GeneBank 已提交基因序列的同源性,未发现与其高度同源的其他基因。序列 1:正义链 5'-AGCAGAAATCCTGGAAATGTCAAGAGACATTTCCAGGATTCTGCTTTTTT-3';

反义链 5'-AATTAAAAAAGCAGAAATCCTGGAAATGTCTCTTGAAATTTCCAGGATTCTGCTGGCC-3'。

序列 2:正义链 5'-CAAGAGTGGTTCCAGAGGTTCAGAGACCTCTTGGAACCACTCTTGTTTTT-3';

反义链 5'-AATTAAAAAACAAGAGTGGTTCAGAGGTCTCTTGAACTCTTGGAACCACTCTTGCC-3'。

序列 3:正义链 5'-TGCAAGGAGTATGACAATCAAGAGAAATGTCATACTCCTCTGCATTTTTT-3';

反义链 5'-AATTAAAAATGCAAGGAGTATGA-

CAAT TCTCTTGAAATTGTCATACTCCTCTGCA GGCC-3'。

序列中斜体部分为间隔序列,可使体内转录的 RNA 形成发夹结构;下画线的 AATT 和 GGCC 分别为限制性酶 *Apa* I 和 *EcoR* I 的粘性末端序列,有利于克隆到载体上;正义链 3 端的 TTTTTT 为聚合酶终止序列,起终止转录作用。所有寡聚核苷酸均由上海生物工程公司合成。

1.2 重组质粒 pNP-1、pNP-2 和 pNP-3 的构建

1.2.1 退火 用退火缓冲液分别溶解合成的 DNA 单链片段,将序列互补的两条单链 DNA 片段等摩尔数混合,在 90 °C 孵育 3 min,然后在 37 °C 放置 1 h,形成双链 DNA 片段,用乙醇脱盐纯化。

1.2.2 酶切 将载体 pSilencer 1.0-U6 用限制性内切酶 *Apa* I 和 *EcoR* I 双酶切,然后用胶回收试剂盒回收酶切产物。

1.2.3 连接 将酶切后的载体和退火产物按摩尔比 1 : 3 的比例进行混合,在 T4 连接酶的作用下,16 °C 连接过夜。将用序列 1、2 和 3 构建的重组质粒分别命名为 pNP-1、pNP-2 和 pNP-3。重组质粒 pNP-1、pNP-2 和 pNP-3 的构建策略见图 1。

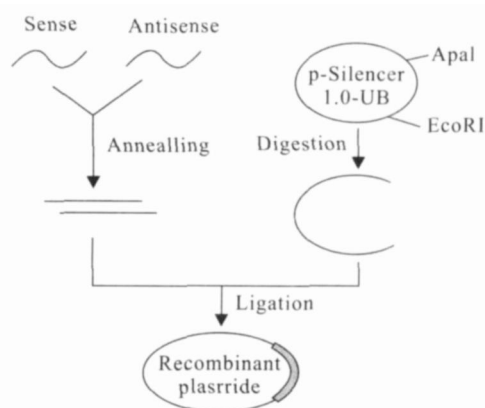


图 1 重组质粒 pNP-1、pNP-2 和 pNP-3 的构建策略

Fig. 1 Strategy of cloning the recombinant plasmids pNP-1, pNP-2 and pNP-3

1.3 重组质粒 pNP-1、pNP-2 和 pNP-3 的筛选

采用氯化钙法制备感受态细胞 DH5 α ,将重组质粒 pNP-1、pNP-2 和 pNP-3 分别转入该感受态细胞中。将转化的大肠杆菌培养在含 100 μ g/mL 氨苄青霉素等的 LB 固体琼脂平板上,挑出阳性菌落继续增菌,提取质粒。

1.4 重组质粒 pNP-1、pNP-2 和 pNP-3 的鉴定

1.4.1 酶切鉴定 用限制性内切酶 *Hind* III 和 *Kpn* I 分别对提取的重组质粒和空质粒 pSilencer

1.0-U6 进行双酶切,酶切产物用 100 g/L 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.4.2 测序鉴定 将酶切鉴定正确的重组质粒,送交上海生物工程公司测序鉴定。测序引物 T3 序列为:5'-AATTAACCTCACTAAA GGG-3'。

2 结果与分析

2.1 载体酶切鉴定

琼脂糖凝胶电泳检测结果(图 2)显示,环状质粒已被切开,大片段长度约为 3 254 bp,小片段长度约为 38 bp(不能检测出来),与预期结果相符。

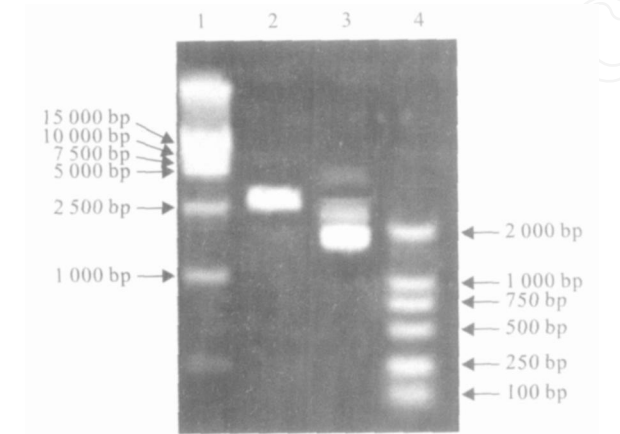


图 2 载体 pSilencer 1.0-U6 的 *Apa* I 和 *Eco*R I 双酶切电泳图
1. 15 000 bp DNA 标样;2. 空载体 pSilencer1.0-U6 双酶切结果;
3. 空载体 pSilencer1.0-U6;4. 2 000 bp DNA 标样
Fig.1 Restriction analysis of pSilencer plasmid by *Apa* I and *Eco*R I
1. DL15 000 DNA marker 2. Restriction analysis of pSilencer plasmid 3. Control of pSilencer plasmid 4:DL2 000 DNA marker

2.2 重组质粒 pNP-1、pNP-2 和 pNP-3 双酶切鉴定结果

用限制性内切酶 *Hind* III 和 *Kpn* I 分别对重组质粒 pNP-1、pNP-2、pNP-3 和空质粒进行双酶切鉴定,空质粒酶切后产生一个 2 929 bp 的大片段和一个 363 bp 的小片段;重组质粒由于在克隆时切除了一个 *Hind* III 酶切位点,故只能产生一个 3 315 bp 线性化的片段(图 3),与预期结果完全一致。

2.3 重组质粒 pNP-1、pNP-2 和 pNP-3 测序鉴定结果

将重组质粒 pNP-1、pNP-2 和 pNP-3 送交上海生物工程公司测序,测序结果均与目的序列完全相同,说明 A 型流感病毒的小干涉 RNA 质粒表达载体已构建成功。

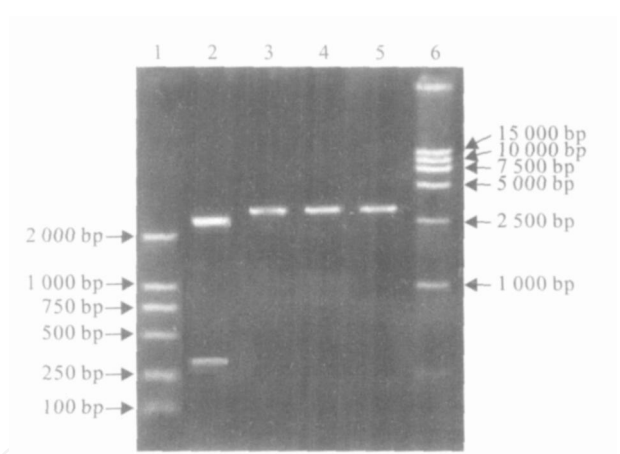


图 3 重组质粒 pNP-1、pNP-2 和 pNP-3 的 *Hind* III 和 *Kpn* I 双酶切鉴定结果
1. 2 000 bp DNA 标样;2. 空载体 pSilencer 1.0-U6 双酶切结果;
3~5. 分别为 pNP-1、pNP-2 和 pNP-3 双酶切结果;
6. 15 000 bp DNA 标样
Fig.3 Restriction analysis of recombinant plasmids pNP-1, pNP-2 and pNP-3 by *Hind* III and *Kpn* I
1. DL2 000 DNA marker 2. Restriction analysis of pSilencer plasmid
3 - 5. Restriction analysis of recombinant plasmids pNP-1, pNP-2 and pNP-3 6. DL15 000 DNA marker

3 讨 论

A 型流感病毒中的禽流感病毒,是严重危害养禽业的病原微生物之一,通过呼吸道感染,传染性强,能感染人。禽流感病毒具有多个血清型,其中 H5、H7 亚型禽流感病毒能引发高致病性禽流感,对养禽业危害极大。变异的 H5、H7 亚型禽流感毒株还威胁人类健康,近年来已出现了多起 H5、H7 亚型 AIV 感染并致人死亡事件,具有重要的公共卫生学意义。但现有流感疫苗和药物防制效果有限。RNAi 为抗病毒治疗提供了一条新的思路。目前,通过诱导 RNAi 抑制病毒复制已有许多报道,如人类免疫缺陷病毒(HIV)^[4-5]、口蹄疫病毒(FMDV)^[6]、肝炎病毒^[7]等,其中在有些病毒中将 RNAi 技术应用于动物体内抗病毒研究。在流感病毒的 RNAi 研究方面,Ge 等^[8-9]利用化学合成 siRNA 的方法,在鸡胚和细胞水平筛选到 3 个 A 型流感病毒高效抑制靶位点,随后将其用于小鼠体内干扰 A 型流感病毒复制试验,能大幅降低组织中病毒滴度。Tompkins 等^[10]利用 Ge 筛选到的靶位点,比较了在小鼠体内 siRNA 对 H1、H5、H7 和 H9 4 种不同亚型流感病毒复制的抑制作用,结果显示,该靶位点对 H1 亚型流感病毒复制有高效抑制作用,H9 亚型流

感病毒次之,H7 和 H9 流感病毒最差。这说明同一靶位点对不同亚型病毒复制的抑制效率不同。另外, RNAi 能够高效抑制靶基因的表达,具有类似于基因敲除作用,已广泛应用于基因功能的研究^[11]。本研究以流感病毒 A/duck/Nanchang/1904/1992 (H7N1) 株 NP 基因为靶基因,在该亚型基因的高度保守区设计发夹状小干扰 RNA,构建转录载体,以期在细胞水平筛选到对 H7 亚型禽流感病毒复制有高效抑制作用,且对 A 型流感病毒中其他亚型病毒复制有广谱抑制作用的靶位点。本试验选择 NP 基因作为靶基因,是因为在流感病毒各个基因中, NP 基因最为保守,而且是核衣壳主要成分,还具有协同 RNP 来稳定 vRNA,使之免受 RNA 酶降解的作用,因此抑制 NP 基因的表达能够抑制流感病毒粒子在细胞内的组装。本试验采用的载体表达法进行 RNAi 试验,与其他方法(如化学合成法、体外转录法及鸡尾酒法)相比,具有不直接操作 RNA、抑制时间长、可长期用于研究等优势。

综上所述,本研究成功设计、构建了 A 型流感病毒发夹状 siRNA 表达载体,为流感病毒高效靶位点的筛选、新药物的开发以及该病毒基因功能的研究奠定了基础。

[参考文献]

- [1] 殷震. 动物病毒学[M]. 2 版,北京:科学出版社,1997:343-348.
- [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] Elbasir S M, Harborth J, Lendeckel W, et al. Duplexes of 21 nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells[J]. *Nature*, 2001, 411(6836): 494-498.
- [4] Martinez M A, Clotet B, Este J A. RNA interference of HIV replication[J]. *Trends Immunol*, 2002, 239(12): 559-561.
- [5] Wee S P, Naoko M K, Masaaki H, et al. Prevention of HIV-1 infection in human peripheral blood mononuclear cells by specific RNA interference[J]. *Nucleic Acids Research*, 2002, 30: 4830-4835.
- [6] Chen W, Yan W, Du Q, et al. RNA interference targeting VPI inhibits foot-and-mouth disease virus replication in BHK-21 cells and suckling mice[J]. *J Virol*, 2004, 78(13): 6900-6907.
- [7] Hamasaki K, Nakao K, Matsumoto K, et al. Short interfering RNA directed inhibition of hepatitis B virus replication[J]. *PEBS*, 2003, 543: 51-54.
- [8] Ge Q, McManus M T, Nguyen T, et al. RNA interference of influenza virus production by directly targeting mRNA for degradation and indirectly inhibition all virus RNA transcription[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100: 2718-2723.
- [9] Ge Q, Filip L, Bai A, et al. Inhibition of influenza virus production in virus-infected mice by RNA interference[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(23): 8676-8681.
- [10] Tompkins S M, Lo C Y, Tumpey T M, et al. Protection against lethal influenza virus challenge by RNA interference in vivo[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(23): 8682-8686.
- [11] 陈忠斌, 孟庆文, 仇华吉, 等. RNAi——基因沉默指南[M]. 1 版. 北京: 化学工业出版社, 2004.