

doi: 10.3969/j.issn.1008-0589.2013.01.02

靶向 O 型口蹄疫病毒 shRNA 转基因猪体细胞抗病毒活性研究

蔡扩军^{1*}, 马锦委^{1*}, 乔 军^{1*}, 孟庆玲^{1*}, 陈创夫¹, 黄 炯², 张再超¹, 杨海波¹

(1. 石河子大学 动物科技学院, 新疆 石河子 832003; 2. 新疆畜牧科学院 兽医研究所, 新疆 乌鲁木齐 830000)

摘 要: 为研究靶向 O 型口蹄疫病毒(FMDV)VP1 基因 shRNA 转基因猪体细胞的抗病毒活性, 本实验在成功培育转基因克隆猪的基础上, 通过分离与培养转基因猪体细胞, 对其 shRNA 进行 PCR 和 Southern blot 检测, 并将 FMDV 感染体细胞中, 通过细胞病变(CPE)、间接免疫荧光试验(IFA)和实时荧光定量 PCR (Real-time PCR)分析转基因猪体细胞抗 FMDV 活性。结果表明, 转基因猪体细胞基因组 DNA 中携带有靶向 FMDV VP1 基因的 shRNA 基因片段。与非转基因猪体细胞相比, 接种 FMDV 转基因猪体细胞其出现 CPE 的时间延迟, 细胞内病毒含量显著降低, 细胞感染病毒 36 h 时, 对细胞中 FMDV VP1 基因抑制效率为 53.6 %。表明该靶向 FMDV shRNA 转基因克隆猪体细胞在体外具有良好的抗病毒活性。本研究为进一步在体内评价转基因动物的抗病毒活性奠定了基础。

关键词: shRNA; 转基因克隆猪; 体细胞; 抗病毒活性

中图分类号: S852.65

文献标识码: A

文章编号: 1008-0589(2013)05-0005-05

Anti-viral activity of cells from foot-and-mouth disease virus shRNA transgenic pig

CAI Kuo-jun^{1*}, MA Shi-wei^{1*}, QIAO Jun^{1*}, MENG Qing-ling^{1*}, CHEN Chuang-fu¹, HUANG Jiong²,
ZHANG Zai-chao¹, YANG Hai-bo¹

(1. College of Animal Science and Technology, Shihezi University, Shihezi 832003, China;

2. Veterinary Research Institute, Xinjiang Academy of Animal Sciences, Urumqi 830000, China)

Abstract: To investigate the antiviral activity of cells from O type foot-and-mouth disease virus (FMDV) VP1 shRNA transgenic pig, the porcine somatic cells was isolated from the transgenic cloned pigs and cultured *in vivo* for the shRNA identification by PCR and southern blot, and the detection of FMDV replication inoculated in the cells by cytopathic effect (CPE) observation, indirect immunofluorescence assay and real-time PCR. The results indicated that shRNA was stably integrated into genomic DNA of transgenic pig, and showed the anti-virus activities by delaying the presence of CPE, and significantly decreasing the virus VP1 mRNA expression by 53.6% than non-transferred transgenic pig at 36 hours post infection of FMDV, which provided the evidences that integrated shRNA in somatic cells of transgenic pig possessed antiviral activity *in vivo*. This study laid a foundation for further evaluation of the antiviral activity of transgenic animal *in vivo*.

Key words: shRNA; transgenic cloned pig; somatic cell; antiviral activity

口蹄疫(Foot-and-mouth disease, FMD)是由 FMD 病毒(FMDV)引起的牛、羊、猪等偶蹄类动物的一

种急性、热性、高度接触传染性动物疫病^[1]。该病传播速度快, 宿主范围广, 传播途径多, 发病率

*Corresponding author; Equal contributors

收稿日期: 2012-05-27

基金项目: 国家转基因重大专项(2009ZX08006-003B)

共同第一作者: 蔡扩军(1985-), 男, 河南商丘人, 硕士研究生, 主要从事动物病毒学研究;

马锦委(1982-), 男, 河南平顶山人, 博士研究生, 主要从事免疫遗传与抗病育种研究。

* 通信作者: E-mail: qj710625@yahoo.com.cn

高,对偶蹄类动物的危害严重。OIE 将其列为必须实时通报动物疫病之一;我国将其列为一类动物传染病^[2]。国内主要采用灭活疫苗免疫和扑杀相结合的防控措施,但该病仍然时有发生。因此,采取更有效的措施控制 FMD 疫情的发生和蔓延,已成为目前亟待研究的重要课题。

干扰 RNA(RNA interference, RNAi)是通过一段短双链 RNA 分子引起具有相同序列的 mRNA 发生降解来关闭相应的基因表达的过程^[34]。RNAi 效应具有快速和高度特异性的特征。目前已知在昆虫和植物细胞中 RNAi 是其主要的抗病毒机制,但哺乳动物细胞感染病毒后几乎没有发现能自发诱导有效的抗病毒 RNAi 反应^[5]。因此,人们一直在探索能够利用人工方法在哺乳动物细胞中建立有效的抗病毒 RNAi 防御策略。本实验室已通过转基因克隆相关技术培育了靶向 FMDV 的 VP1 基因的 shRNA 转基因猪。本实验对基因猪的体细胞水平进行抗病毒活性检测,评价其抗病毒活性,为进一步在动物个体水平上抗病毒活性的检测奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 实验材料 靶向 O 型 FMDV 转基因克隆猪(大白)由本项目组培育;O 型 FMDV OS/99 株、猪抗 O 型 FMDV 的阳性血清由新疆畜牧科学院兽医研究所提供;细胞基因组提取试剂盒、RNA 提取试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司;MicroRNA 检测试剂盒购自 Gene Copoeia 公司;SYBR Green I 购自 TaKaRa 公司;TRIzol 和 DMEM 培养基购自 Invitrogen 公司;DNA 酶 I、反转录试剂盒 Revert Aid™ First Strand cDNA Synthesis Kit 购自 Fermentas 公司;标记和检测系统 DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit 购自 Roche 公司;FITC 标记的 Protein A protein (FITC-SPA)购自 Abcam 公司。

1.2 引物设计及合成 采用分子生物学软件 Primer 5.0 设计 siRNA、仔猪的内参基因 HMBS[®](DQ845174)和 O 型 FMDV VP1 基因(HQ116289)特异性引物。siRNA 上游引物:5'-GCCAAGAGGACAAAGCGCTG-3';通用下游引物由 GeneCopoeia 公司提供。HMBS 上游引物:5'-AGGATGGGCAACTCTACCTG-3';下游引物 5'-GATGGTGGCCTGCATAGTCT-3'。VP1 上游引物:5'-TCAAGCCAAAGGAACAAGT-3';下游

引物:5'-TAGACGGTCGCTAAGACAC-3'。外源基因鉴定上游引物:5'-GAAGATCTCCAGTGGAAG-3';下游引物 5'-CGGAATTCTTGGAAGGCTACAGATCACC-3',由华大生物科技有限公司合成。

1.3 转基因猪体细胞的制备及基因组 DNA 的 PCR 及 southern blot 鉴定 取同一品种、同为 1 日龄的转基因猪(4 头)和非转基因猪(1 头)耳尖,按照组织块消化法制备体细胞进行细胞培养。按照细胞基因组提取试剂盒操作说明书分别提取转基因猪和非转基因猪体细胞的基因组 DNA。采用外源基因鉴定引物进行 PCR 扩增,产物经 2.0% 琼脂糖凝胶电泳分析,将目的片段从凝胶中回收纯化并由华大基因公司进行测序。采用 *EcoR* 和 *Kpn* 消化约 25 μg 基因组 DNA,酶切产物经 0.8% 琼脂糖凝胶电泳分离后转移至 Hybond+ 尼龙膜,利用外源基因鉴定引物 PCR 扩增回收片段为探针,按 ECL 直接核酸标记及检测系统说明书进行 southern blot 鉴定。阳性、阴性对照分别为同时用 *EcoR*、*Kpn* 双酶切的 shRNA 重组质粒和非转基因猪体细胞的基因组。

1.4 病毒感染试验 分别将制备的 4 头转基因和 1 头非转基因猪的体细胞培养于 6 孔细胞培养板,在 P3 实验室进行病毒感染试验。以 10 TCID₅₀ FMDV 感染细胞 16 h 后,以猪抗 O 型 FMDV 阳性血清为一抗、FITC-SPA 为二抗,参照文献[7]的方法进行间接免疫荧光试验(IFA)。

1.5 感染 FMDV 猪体细胞中病毒载量的检测 构建 pMD-VP1 和 pMD-HMBS 重组质粒,并将 pMD-VP1 和 pMD-HMBS 按 1:10 梯度稀释,各建立 6 个梯度,利用拷贝数和 CT 值做标准曲线。以 10 TCID₅₀ FMDV 感染细胞 12 h、24 h、36 h、48 h 后,将孔内的感染细胞及培养液反复冻融 3 次,分别用 TRIzol 提取各孔病毒细胞液的总 RNA,按照反转录试剂盒说明书进行反转录反应。按照 SYBR Green I 荧光定量 PCR 试剂盒说明书进行荧光定量 PCR 检测。PCR 反应体积为 25 μL。扩增条件为:95 ℃ 30 s;95 ℃ 10 s、59 ℃ 30 s、72 ℃ 30 s,40 个循环;72 ℃ 10 s。在延伸阶段检测荧光强度,收集信号。在相同条件下与待测样品同时进行荧光定量 PCR 反应,同时扩增 HMBS 内参基因,根据 HMBS 拷贝数值采用最大二阶导数法(2-ΔΔCt)进行统计学分析^[6]。同时应用 SPSS17.0 统计学分析软件进行 *t* 检验。

2 结 果

2.1 转基因猪体细胞的制备及基因组 DNA 的 PCR 及 southern blot 鉴定 制备的体细胞形态正常, 生长状况良好(图 1)。1、2、4、9 号转基因克隆仔猪耳组织基因组 DNA PCR 扩增出 402 bp 的目的条带, 而同日龄的非转基因猪体细胞基因组 DNA 没有扩增出目的条带(图 2), 同时测序结果和 Southern blot 试验结果也证明转基因克隆仔猪基因组 DNA 中携带有靶向 FMDV VP1 基因的 shRNA 基因片段(图 3)。

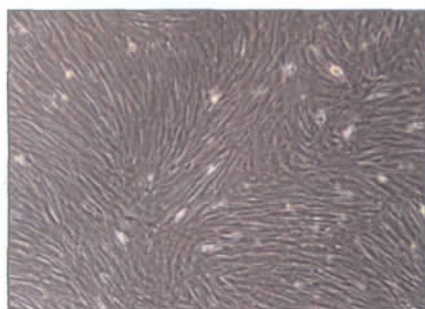
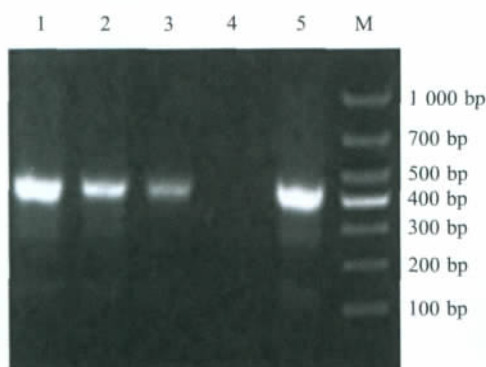
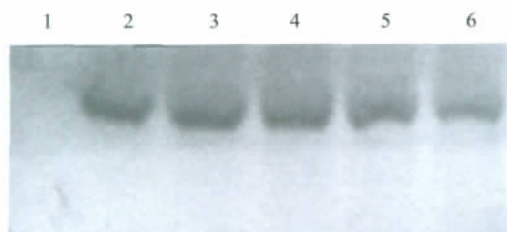


图 1 转基因克隆猪体细胞
Fig.1 Transgenic pig somatic cells



M: DL1000 Marker; 1-3, 5: PCR products from 1, 2, 4, 9 transgenic pig somatic cells; 4: PCR products from non-transgenic pig somatic cells

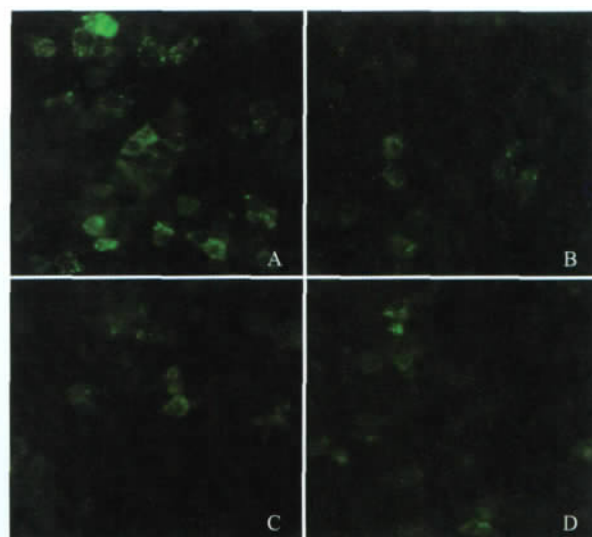
图 2 转基因克隆猪体细胞的 PCR 鉴定
Fig.2 Identification of Transgenic pig somatic cells by PCR



1: Negative control; 2: Positive control;
3-6: Positive transgenic pig by PCR

图 3 转基因猪基因组 DNA Southern blot 分析
Fig.3 Southern blot of genomic DNA from transgenic pig

2.2 FMDV 的细胞感染试验 非转基因猪体细胞在攻毒后约 8 h 开始病变, 而转基因猪体细胞在攻毒后约 12 h 开始病变。攻毒后 36 h 观察 CPE, 转基因猪体细胞和非转基因猪体细胞 CPE 出现明显的差异。在攻毒后 48 h, 两者 80%~90% 的细胞均变圆, 部分细胞脱落, 差异不明显。IFA 试验结果显示, 转基因猪体细胞的荧光强度比非转基因猪体细胞的荧光弱, 表明 FMDV 在转基因猪体细胞内的增殖量比在非转基因猪体细胞要少(图 4)。CPE 观察结果和 IFA 结果均表明转基因克隆仔猪体细胞具有一定抑制 FMDV 复制的能力。



A: Non-transgenic pig somatic cells;
B, C, D: Transgenic pig somatic cells

图 4 转基因和非转基因猪体细胞攻毒 36 h 后的 IFA 检测结果(400×)

Fig.4 The detection of transgenic and non-transgenic pig somatic cells infected with FMDV 36 h post inoculation by IFA (400×)

2.3 感染 FMDV 体细胞 VP1 基因 RNA 相对拷贝数的检测结果 经 Roche Light Cycle@480 软件分析, pMD-VP1 和 pMD-HMBS 的扩增其 Error 值趋于 0, 扩增结果具有良好的线性关系, 检测数据具有高度的相关性, 其中 VP1 和 HMBS 的扩增效率接近 2。经数据分析表明, 各组 VP1 基因的初始拷贝数, 经内参基因校正, 根据 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算出各个样本的 VP1 基因 RNA 相对拷贝数, 应用 SPSS17.0 统计软件 t 检验。结果显示: 攻毒后, shRNA 转基因猪体细胞对 VP1 基因的复制具有不同程度的抑制作用, 4 头转基因猪之间差异不显著($p>0.05$)。其中攻毒 12 h、24 h、48 h 实验组分别与对照组比较差异不显著, 攻毒后 36 h 实验组与对照组比较, 4 头转基

因猪的平均抑制效率为 53.6%，差异显著($p < 0.05$)。表明体细胞在攻毒 48 h 内可以抑制 VP1 基因的表达，其中以攻毒后 36 h 的抑制效果尤为显著(图 5)。

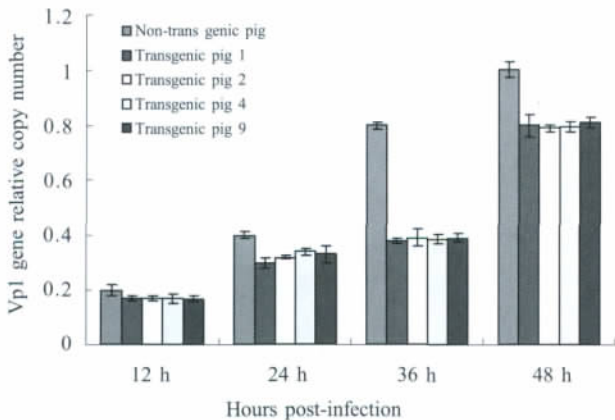


图 5 攻毒不同时间后 FMDV VP1 核酸相对拷贝数
Fig.5 The FMDV VP1 gene relative copy number at different times post infection

3 讨论

FMDV 属于小 RNA 病毒科、口蹄疫病毒属，为单股正链 RNA 病毒，全长约 8.5 kb，可直接作为信使 RNA，是理想的 siRNA 靶标，适于进行 RNAi 的研究^[9]。研究表明，RNAi 是一种抑制 FMDV 的有效手段^[10-13]。将 siRNA 技术和转基因技术相结合产生的 RNAi 转基因动物具有的稳定性、可传递性、高效性等优势，突破了 RNAi 只在细胞水平发挥作用的局限，提高动物群体的整体抗病毒能力，具有应用前景的防控手段。

目前，转基因动物主要分别从 DNA、转录、翻译和整体表型的水平进行检测和评价^[14-16]。其中 DNA 水平的检测包括 PCR 技术检测、Southern blot 检测、DNA 拷贝数的检测、整合位点的检测；RNA 水平的检测主要包括 northern 印迹杂交、逆转录 PCR 和 RNA 斑点杂交等；翻译水平的检测包括 western blot 和酶联免疫吸附法；整体水平的观察对转基因动物而言主要遵从实质等同性原则，即转基因动物除表现出外源基因表达蛋白的性状外，其他生物学特性都要与受体动物相同。但目前为止，国内外对通过 RNAi 术产生的转基因动物的检测手段研究有限，未形成统一的标准。

本研究在成功培育转基因克隆猪的基础上，选

择了合适的检测方法对靶向 O 型 FMDV shRNA 转基因猪体细胞进行抗病毒活性的检测和评价。首先制备并培养了转基因猪体细胞，对细胞的基因组 DNA 进行了 PCR 和 Southern blot 鉴定，然后进行了 FMDV 感染细胞试验，观察不同时间点的 CPE，IFA 检测了 FMDV 在转基因和非转基因猪细胞内的含量，并通过荧光定量 PCR 检测了 FMDV 在转基因猪体细胞的复制水平。结果表明：与非转基因猪体细胞相比，转基因猪体细胞在攻毒后出现 CPE 的时间延迟，病变减轻，荧光量明显的减少，在攻毒后 36 h 时，细胞中 FMDV 基因组 RNA 相对拷贝数显著降低，表明 FMDV 在转基因猪体细胞内的增殖水平要低于非转基因猪体细胞，显示转基因猪体细胞具有一定的抗 FMDV 的活性。

尽管 shRNA 转基因动物体细胞抗病毒能力有限，但可以提供早期对病毒复制的抑制作用。体外抗病毒活性在一定程度上可初步反映机体抗病毒能力，但体外与体内还存在一定的差别，为了解转基因猪抵抗 FMDV 能力还要进一步对猪进行攻毒试验，以便在动物个体上评价靶向 FMDV shRNA 转基因猪体抗病毒活性。

参考文献：

- [1] Brown F. The history of research in foot-and-mouth disease virus [J]. Virus Res, 2003, 913-917.
- [2] Logan D, Abu-Ghazaleh R, Blakemore W, et al. Structure of a major immunogenic site on foot-and-mouth disease virus [J]. Nature, 1993, 362(6420): 566-568.
- [3] Gitlin L, Karelsky S, Andino R. Short interfering RNA confers intracellular antiviral immunity in human [J]. Nature, 2002, 418 (6896): 430-434.
- [4] Dautry F, Ribet C. RNA interference: towards a functional genomics in mammalian cells [J]. Med Sci, 2004, 829 (20): 815-819.
- [5] 陈启伟, 王永录. RNA 干扰及其抗口蹄疫病毒复制的研究进展[J]. 中国畜牧兽医, 2009, 36(7): 28-31.
- [6] 台玉磊, 韩立强, 杨国庆, 等. 仔猪组织基因表达中实时定量 PCR 内参基因的选择[J]. 农业生物技术学报, 2010, 18 (4): 732-736.
- [7] 蔡扩军, 乔军, 孟庆玲, 等. O 型口蹄疫病毒间接免疫荧光检测方法的建立[J]. 西北农业学报, 2012, 21(6): 13-16.
- [8] Kenneth J L, Thomas D S. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method[J].

- Methods, 2001, 25(4): 402-408.
- [9] Sharp P A. RNA interference-2001 [J]. Genes Dev, 2001, 15 (5): 485-490.
- [10] 谢庆阁. 口蹄疫[M]. 北京: 中国农业出版社, 2004: 1-2.
- [11] Wang Peng-yan, Ren Yan, Guo Zhi-ru, et al. Inhibition of foot-and-mouth disease virus replication in vitro and in vivo by small interfering RNA [J]. Virol J, 2008(5): 86.
- [12] 金虹, 丛薇, 刘明秋, 等. 多个发夹 RNA 的混合使用抑制 O 型和 Asia 型口蹄疫病毒的复制[J]. 复旦学报, 2008, 47(5): 545-552.
- [13] Kim S M, Lee K N, Park J Y, et al. Therapeutic application of RNA interference against foot-and-mouth disease virus in vitro and in vivo [J]. Antiviral Res, 2008, 80: 178-184.
- [14] Haurio K, Bach J M, Lieubeau B. Easy and rapid method of zygosity determination in transgenic mice by SYBR Green real-time quantitative PCR with a simple data analysis [J]. Transgenic Res, 2007, 16(1): 127-131.
- [15] Pillai M M, Venkataraman G M, Kosak S, et al. Integration site analysis in transgenic mice by thermal asymmetric interlaced (TAIL)-PCR; segregating multiple-integrant founder lines and determining zygosity [J]. Transgenic Res, 2008, 17(4): 749-754.
- [16] Huang Y J, Huang Y, Baldassarre H, et al. Recombinant human butyrylcholinesterase from milk of transgenic animals to protect against organophosphate poisoning [J]. PNAS, 2007, 104 (34): 13603-13608.

(本文编辑: 赵晓岩)