

• 技术与方法 •

表达登革病毒 *prM* 基因小干扰 RNA 的 Vero 细胞系的建立

李磊^{1) 2)}, 吴新伟²⁾*, 伍业健²⁾, 罗兰¹⁾, 蒋力云²⁾, 杨霞¹⁾

(¹⁾ 中山大学中山医学院生物化学教研室 广州 510080; ²⁾ 广州市疾病预防控制中心 广州 510080)

摘要 *prM* 蛋白是登革病毒膜蛋白 M 的前体,膜蛋白 M 对病毒的组装与成熟有重要作用,针对 *prM* 基因设计的小干扰 RNA (siRNA) 可短期抑制登革病毒复制. 为了达到长期抑制登革病毒的效果,本研究构建了插入 *prM* siRNA 序列的重组慢病毒,利用流式细胞术分选以及杀稻瘟霉素抗性,筛选出稳定表达 *prM* siRNA 的非洲绿猴肾细胞 (Vero 细胞) 系. 经逆转录 PCR 及测序验证 siRNA 序列表达正确. Vero 细胞中 *prM* siRNA 的表达率约为 97.6%. 当受到登革病毒攻击时,表达 *prM* siRNA 的 Vero 细胞能够明显抑制登革病毒 *prM* 基因的表达,并抑制登革病毒在 Vero 细胞中的复制. 建立的 Vero 细胞系可用于 RNA 干扰防治登革病毒感染的进一步应用研究.

关键词 慢病毒; 登革病毒; 膜蛋白 M 前体; RNA 干扰; Vero 细胞

中图分类号 R373.3

Establishment of Vero Cell Lines with Expression of Small Interfering RNA Targeting Dengue Virus *prM* Gene

LI Lei^{1) 2)}, WU Xin-Wei²⁾*, WU Ye-Jian²⁾, LUO Lan¹⁾, JIANG Li-Yun²⁾, YANG Xia¹⁾

(¹⁾ Department of Biochemistry, Zhongshan Medical School, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China;

²⁾ Guangzhou Center for Disease Control and Prevention, Guangzhou 510080, China)

Abstract PrM is the precursor of a membrane protein M that plays an important role in the assembling and maturation of dengue virus. Small interfering RNA (siRNA) targeted to *prM* gene can transiently inhibit the replication of dengue viruses. In order to establish persistent inhibitory effect, recombinant lentiviruses with *prM* siRNA sequence were constructed and produced in 293FT cells, then transfected into African green monkey kidney cells (Vero cells). Vero cells stably expressing of *prM* siRNA were selected by blasticidin resistance and fluorescence activating cell sorter (FACS) sorting. The sequence of expressed siRNA was confirmed by reverse transcript PCR and DNA sequencing. The *prM* siRNA expression was detected in about 97.6% of the obtained Vero cells. When exposed to dengue viruses, *prM* siRNA expression Vero cells showed significant suppression on prM protein expression, and inhibition on the replication of dengue viruses. These cell lines can be used for future studies of RNA interference on the protection of dengue virus infection.

Key words lentivirus; dengue virus; prM; RNA interference; Vero cell

登革病毒可引发登革热 (dengue fever, DF), 严重类型可导致登革出血热 (dengue hemorrhagic fever, DHF)、登革休克综合征 (dengue shock syndrome, DSS). 登革热流行于热带和亚热带地区, 是分布最广、发病人数最多、危害较大的一种虫媒病毒性疾病, 已成为一个世界性的严重公共卫生问题. 目前, 登革热的发病机制尚未阐明, 仍无有效的疫苗或治疗药物^[1, 2].

RNA 干扰 (RNA interference, RNAi) 是 21 ~ 23 个核苷酸的小分子干扰 RNA (small interfering RNA,

收稿日期: 2011-08-21; 接受日期: 2011-10-10

广东省科技计划项目 (No. 2008B030303041); 广州市科技计划项目 (No. 2006J1-C0141, No. 2008J1-C191, No. 2008Z1-E231); 广州市医学科学技术研究重点项目 (No. 2006-ZDi-10, No. 2008-ZDi-12)

* 联系人 Tel: 020-36545125; E-mail: tom.wu@tom.com

Received: August 21, 2011; Accepted: October 10, 2011

Supported by Guangdong Provincial Science and Technology Project (No. 2008B030303041); Guangzhou Municipal Science and Technology Project (No. 2006J1-C0141, No. 2008J1-C191, No. 2008Z1-E231); and Guangzhou Medical Science and Technology Key Research Project (No. 2006-ZDi-10, No. 2008-ZDi-12)

* Corresponding author Tel: 020-36545125; E-mail: tom.wu@tom.com

siRNA). 诱导细胞同源基因 mRNA 降解, 从而特异性抑制基因表达的过程^[3-5]. 作为宿主细胞抑制病毒复制、清除病毒的一种胞内机制, RNAi 已广泛应用于抗病毒感染研究领域^[6-9]. 本研究针对 I 型登革病毒的膜蛋白 M 的前体 (prM) 基因合成多段 siRNA, 筛选出其中最有效的 siRNA 片段. 按此设计能够表达发卡状 shRNA 的 DNA 序列, 利用慢病毒将该片段整合入宿主细胞的基因组中, shRNA 在细胞中被 Dicer 酶切割后能产生具有抑制功能的 siRNA, 利用细胞抗性筛选出含有 prM 小干扰 RNA 的纯合细胞系, 为研究 RNA 干扰长效抑制登革病毒的复制奠定基础.

1 材料与方法

1.1 材料

I 型登革病毒流行株 GZ02-218、Vero 细胞株、CHO 细胞株、293FT 细胞株由广州市疾病预防控制中心病毒免疫科保存; 表达质粒构建试剂盒 BLOCK-iT™ Pol II miR RNAi Expression Vector Kit with EmGFP、慢病毒系统试剂盒、慢病毒包装试剂盒购自 Invitrogen 公司; DNA oligo 由 Ambion 公司用化学方法合成; MEM 培养基、胎牛血清和 0.25% Trypsin-EDTA 购自 GIBCO 公司.

1.2 Vero 细胞培养与病毒扩增

Vero 细胞使用 10% 胎牛血清的 MEM 培养基, 于 37 °C、5% CO₂ 细胞培养箱中培养. 含有干扰片段的 prM siRNA-Vero 细胞株使用含 10% 胎牛血清、10 μg/mL 杀稻瘟霉素 (blasticidin) 的 MEM 培养基, 于 37 °C、5% CO₂ 细胞培养箱中培养.

按 100 倍 TCID₅₀ (50% tissue culture infective dose) 的剂量稀释登革病毒原液, Vero 细胞去培养液, 加入稀释后的病毒液, 33 °C、3% CO₂ 吸附 1 h. 吸去病毒液, 加入含 2% 胎牛血清的 MEM 维持液, 置于 33 °C、3% CO₂ 培养箱中继续培养 4~6 d, 取上

清分装, -80 °C 保存.

1.3 siRNA 序列的设计与合成

根据前期研究^[10], 筛选得到针对 prM 基因的有效 siRNA 片段序列: 5'-AGUCAACGUCAUCUGGU UCCG-3'. 按照表达质粒构建试剂盒说明书要求, 设计能够转录发卡状 shRNA (Fig. 1) 的 DNA oligo 序列, 正义链序列为: 5'-TGCTGAGTCAACGTCATCT GGTTCGGTTTTGGCCACTGACTGACCGGAACCATG ACGTTGACT-3'. 反义链序列: 5'-CCTGAGTCAACG TCATGGTTCCGGTCAGTCAGTGGCCAAAACCGGAA CCAGATGACGTTGACTC-3'. 阴性对照为 Invitrogen 公司统一制备, 能够切割形成成熟 siRNA, 但是不对细胞内任何已知基因. 正义链序列 5'-TGCTGAAATGTACTGCGCGTGGAGACGTTTTGGCCA CTGACTGACGTCTCCACGCAGTA CATT-3', 反义链序列: 5'-CCTGAAATGTACTGCGTGGAGACGTCAG TGGCCAAAACGTCTCCACGCAGTACATTTC-3'.

1.4 慢病毒表达质粒的构建

将上述 DNA oligo 的正义链和反义链退火成双链, 将双链的 DNA 插入到线性 pcDNA 6.2-GW/EmGFP-miR 质粒中, CaCl₂ 法转染 One Shot Top10 感受态 *E. coli* 细胞中, 筛选阳性菌落, 培养并提取质粒, 测序以确定插入序列及方向正确. pcDNA6.2-GW/EmGFP-prM siRNA 重组质粒不仅能够转录 shRNA, 而且能够同时表达 GFP 以及杀稻瘟霉素抗性.

根据 QIAGEN 公司转染说明书, 将重组质粒瞬时转染 CHO 细胞. 在 24 孔板中接种 2~8 × 10⁴ CHO 细胞, 转染时约 40%~80% 长满, 将 0.4 μg 重组质粒稀释至 60 μL, 加入 1.5 μL attactene 试剂, 室温孵育 10~15 min 后逐滴加入 24 孔板中, 48 h 后荧光显微镜下观察 GFP 表达效果. 按照慢病毒系统试剂盒说明书, 利用 Gateway 重组技术, 将 pcDNA6.2-GW/EmGFP-prM siRNA 重组质粒分别与质粒

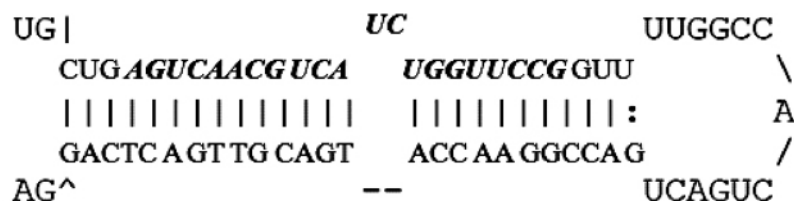


Fig. 1 Hairpin structure schematic diagram of siRNA precursor According to effective siRNA sequence, DNA oligos were designed and synthesized to transcript proper shRNA. After transcription in host cells through plasmid or lentivirus, the RNA could form hairpin structure on the basis of the transcription complementary principle, and transform into mature siRNA by the processing of dicer enzyme (prM targeting sequence in bold)

pDONR221 和慢病毒骨架质粒 pLenti6/V5-DEST 发生 BP/LP 重组,构建可表达 *prM* siRNA 慢病毒表达质粒,转化到 One Shot Stbl3 感受态细胞,挑选阳性克隆并测序,测序结果正确,大量扩增慢病毒表达质粒以备。

1.5 慢病毒的包装

按照慢病毒系统试剂盒说明书,取状态良好、处于对数生长期的 293FT 细胞,按照 6×10^6 接种于 10 cm^2 培养皿中, $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 、 $5\% \text{ CO}_2$ 的培养箱中培养过夜;第 2 d 转染前移去培养液,换 5 mL Opti-MEM 培养液。取 9 μg Packaging Mix(含包装质粒 pLP1, pLP2, pLP/VSVG) 和 3 μg 慢病毒表达质粒加入到 1.5 mL Opti-MEM 中,轻轻混匀,另取 36 μL Lipofectamine 2000 加入 1.5 mL Opti-MEM 中,轻轻混匀,室温放置 5 min;轻轻将质粒溶液和 Lipofectamine 2000 稀释液混合,室温放置 20 min;将 3 mL 质粒脂质体复合物小心加入到细胞培养皿中,轻轻混匀, $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 、 $5\% \text{ CO}_2$ 培养箱中孵育 6 h,更换完全培养液 DMEM + 10% 胎牛血清;48 h 后收集细胞培养上清, 3 000 r/min 离心 10 min,去除细胞和碎片,并用 0.45 μm 滤器过滤;将病毒原液在 50 000 g 超速离心 2 h,去除上清,重悬于 2 mL DMEM 培养液中, $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ 保存备用。

1.6 慢病毒滴度测定

将 293FT 细胞培养至对数生长期,转染前 1 d,按照每孔 8 000 个细胞接种 96 孔板, $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 、 $5\% \text{ CO}_2$ 培养过夜,感染时细胞长至 30% ~ 50% 融合密度;转染当天,用含有 6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 多聚胺(polybrene) 和 2% 胎牛血清的细胞稀释液对病毒液进行 10^{-1} ~ 10^{-10} 梯度稀释。小心吸去 96 孔板中的培养基,轻轻混匀各管慢病毒稀释液,各取 100 μL 加入每孔细胞中,每个稀释度做 2 个复孔,放入 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 、 $5\% \text{ CO}_2$ 的细胞培养箱中过夜培养。24 h 后,去除含慢病毒的培养基,加入 100 μL 的完全培养基,观察荧光表达情况;转染 96 h,在荧光显微镜下观察各孔中荧光细胞数量,病毒滴度为表达荧光的细胞数乘以相应稀释倍数。

1.7 RT-PCR 检测 siRNA 的表达

两步法 RT-PCR 扩增目的基因:按照 CWBIO 公司 RNA 提取试剂盒说明书,从慢病毒感染的 293FT 细胞中提取总 RNA;之后按照 TaKaRa 公司 PrimeScript II 1st Strand cDNA Synthesis Kit 说明书,利用特异性引物: 5'-CTATATCACCGCCGACAAGC-3' 先将总 RNA 反转录成 cDNA,然后以 cDNA 为模

板做 PCR 反应。PCR 试剂为 TaKaRa 公司的 Premix Ex Taq (version 2.0) 试剂盒。上游引物: 5'-GGCC ATTTGTTCCATGTGAG-3'。下游引物: 5'-CTATAT CACCGCCGACAAGC-3'。PCR 反应条件: $98 \text{ }^\circ\text{C}$ 10 s, $60 \text{ }^\circ\text{C}$ 30 s, $72 \text{ }^\circ\text{C}$ 30 s, 共 30 个循环。PCR 产物测序验证 siRNA 的表达。

1.8 含有 *prM* siRNA 的 Vero 纯合细胞系的建立

将 Vero 细胞接种 6 孔板, $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 、 $5\% \text{ CO}_2$ 培养箱中培养过夜。接种 18 h 后,细胞密度约为 70%,用含 2% 胎牛血清、6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 多聚胺的 MEM 培养液稀释慢病毒原液,按不同感染复数(Multiplicity of Infection, MOI) 接种细胞。转染 24 h,换完全培养液。转染 48 h、72 h、96 h,分别取细胞做流式分析以及荧光照相,记录荧光表达含量,确定最适 MOI 值。在最适 MOI 值下感染 Vero 细胞,流式细胞仪(FACS) 分选出 GFP⁺ 细胞群,培养于含 10% 胎牛血清、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 杀稻瘟毒素的 MEM 选择培养基中, $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 、 $5\% \text{ CO}_2$ 培养并传代。取流式细胞分选后第 1、4、7 代细胞,在荧光显微镜下观察 GFP 表达情况,并通过流式细胞术分析,确定表达 *prM* siRNA 的 Vero 细胞含量。

1.9 Western 印迹检测 *prM* siRNA 对 *prM* 基因的抑制作用

将 Vero、*prM* siRNA-Vero 以及 neg siRNA-Vero 纯合细胞系同时接种 6 孔板,12 h 后按 1.2 所述的方法接种登革病毒, $33 \text{ }^\circ\text{C}$ 、 $3\% \text{ CO}_2$ 培养箱中继续培养 5 d,加入 80 μL SDS 裂解液,收集后 $100 \text{ }^\circ\text{C}$ 煮沸 30 min。12% SDS-PAGE 分离蛋白,300 mA 2.5 h 恒电流转至硝酸纤维素膜,10% 脱脂牛奶封闭 1 h,按 1:1 000 稀释比例加入 *prM* 抗体或 β -Actin 抗体, $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 孵育过夜,次日按 1:2 000 稀释比例加入辣根过氧化物酶(HRP) 交联的二抗, $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 孵育 4 h, X 光片于暗室曝光。

1.10 实时荧光 RT-PCR 检测 *prM* siRNA 对登革病毒复制的抑制作用

将 Vero、*prM* siRNA-Vero 以及 neg siRNA-Vero 纯合细胞系同时接种 6 孔板,12 h 后按 1.2 所述的方法接种登革病毒,转染第 1 ~ 6 d 分别收集细胞上清,各取 100 μL 样品,采用 QIAGEN 公司 QIAamp Viral RNA 提取试剂盒提取总 RNA,用深圳太太基因有限公司登革 I 型病毒实时荧光 RT-PCR 试剂盒检测病毒 RNA 含量。PCR 反应条件: $42 \text{ }^\circ\text{C}$ 5 min, $95 \text{ }^\circ\text{C}$ 10 s, 1 个循环; $95 \text{ }^\circ\text{C}$ 5 s, $60 \text{ }^\circ\text{C}$ 30 s, 共 40 个循环。根据标准曲线,算出 *Ct* 值所对应的登革病毒

RNA 初始拷贝数.

2 结果

2.1 质粒构建

ds oligo 与 pcDNA 6.2-GW/EmGFP-miR 合成重组干扰质粒, 经过比对, 重组干扰质粒中插入片段序列与设计的 oligo 序列完全一致. 瞬时转染 siRNA 重组干扰质粒到靶细胞 CHO 中, 转染 24 h, 荧光显微镜下观察细胞有 GFP 荧光表达, siRNA 干扰质粒成功转入 CHO 细胞中(Fig. 2, 见第 1077 彩页). 与质粒 pDONR221 和慢病毒骨架质粒 pLenti6/V5-DEST 一起构建可表达 siRNA 的慢病毒表达质粒, 测序验证插入序列无误.

2.2 慢病毒包装以及滴度测定

293FT 细胞包装慢病毒, 转染 48 h 后, 在荧光显微镜下观察细胞内荧光表达情况, 可见大量 GFP 荧光表达, 表明慢病毒载体转染成功(Fig. 3, 见第 1077 彩页). 慢病毒滴度测定中, 转染后 96 h 荧光显微镜下观察 2×10^{-7} 稀释组中, 表达绿色荧光的细胞数目分别为 25 个 26 个. 慢病毒滴度约为 25.5

TU/ (2×10^{-7}) mL, 即 1.275×10^8 TU/mL(Fig. 4, 见第 1077 彩页). 阴性对照慢病毒滴度为 1×10^8 TU/mL.

2.3 RT-PCR 产物测序结果

提取慢病毒转染的 293FT 细胞总 RNA, RT-PCR 扩增后, 所得产物测序并与设计的 DNA oligo 序列比对, PCR 产物序列与设计的 DNA oligo 序列完全相符(结果未列出). 表明慢病毒载体能在 293FT 细胞中转录目的基因并合成 siRNA.

2.4 慢病毒转染 Vero 细胞的最适 MOI 值

按 MOI 25、50、100、200 稀释慢病毒原液, MOI 200 稀释 negative 慢病毒原液, 转染 Vero 细胞, 分别转染 48 h、72 h、96 h, 以正常 Vero 细胞作为对照, 分别做流式分析. 结果显示, MOI 值越大, GFP⁺ 细胞越多, 最高可达约 98%. 但是, 当 MOI = 200 时, GFP⁺ 细胞的比例在感染后逐渐减少, 表明高浓度的慢病毒对 Vero 细胞有一定毒性. 而当 MOI = 100 时, GFP⁺ 细胞含量稳定, 在 48 h、72 h、96 h 时间点分别为 68.9%、71.6%、68.8% (Fig. 5). 因此选择 MOI 100 为最适转染浓度.

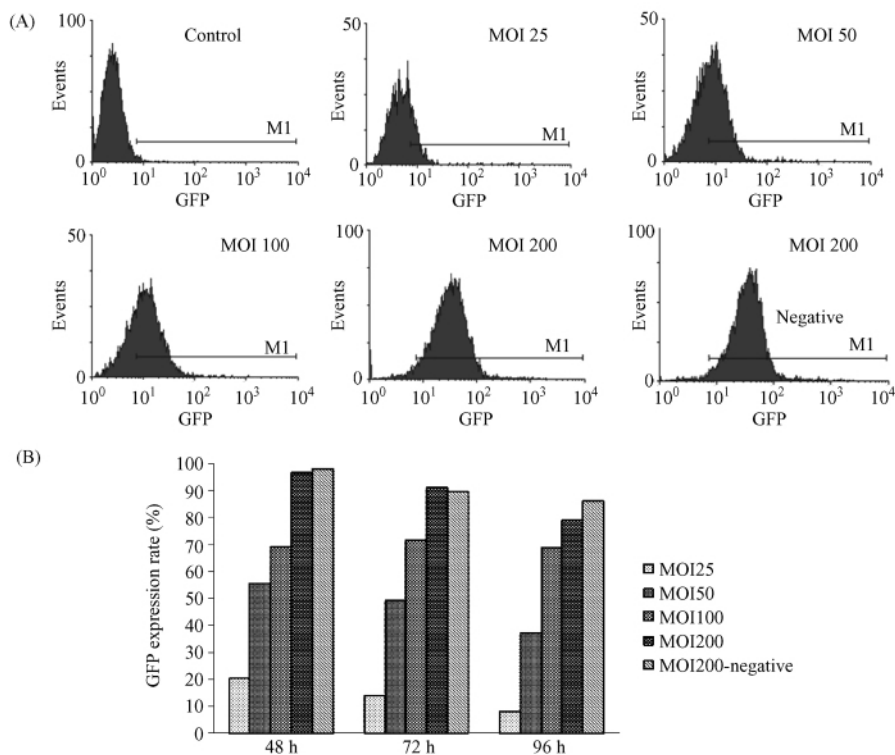


Fig. 5 The flow cytometry assay results of Vero cells transfected with different MOI lentiviruses 2×10^5 Vero cells were seeded into 6-well tissue culture plates and incubated overnight. Lentivirus was diluted into different MOI with medium containing 6 (g/mL polybrene and 2% FBS, then added onto the cells. Flow cytometry assay was proceeded at 48, 72, 96 hours post transfection. (A) The result of flow cytometry assay at 48 hours post transfection; (B) The GFP⁺ cell rates in different MOI groups

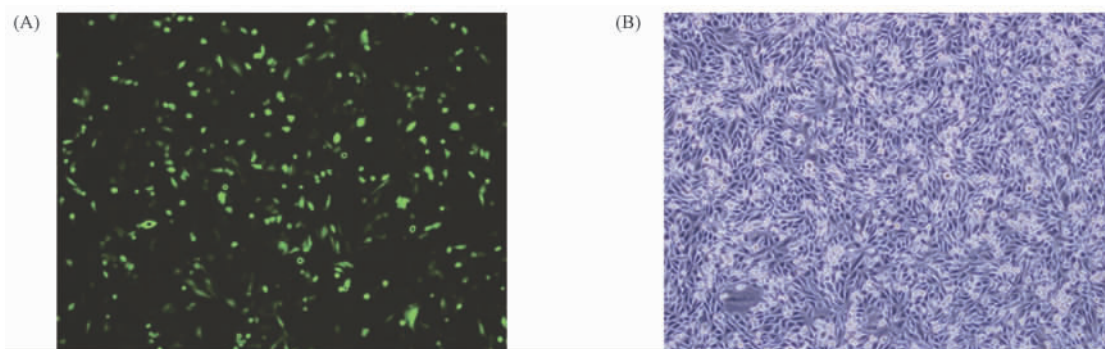


Fig. 2 Transfection of pcDNA 6.2-GW/EmGFP-prM siRNA into CHO cells (100 ×) $2 \sim 8 \times 10^4$ CHO cells were seeded into 24-well tissue culture plates. On the day of transfection, 0.4 μg plasmid DNA was diluted to 60 μL , 1.5 μL attactene reagent was added. The mixture was incubated for 10 ~ 15 minutes at room temperature, then dropped into a well. The fluorescence of expressed GFP in cells was observed after 48 hours incubation. (A) fluorescence field; (B) bright field

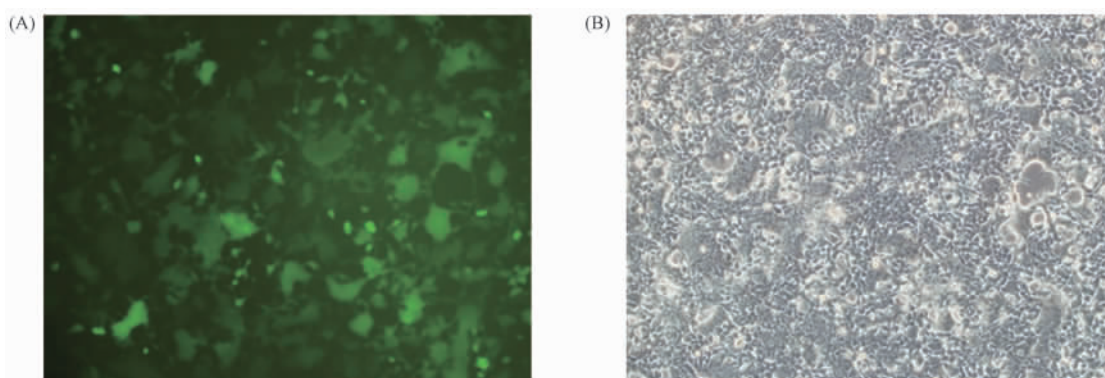


Fig. 3 The GFP expression of lentiviruses in 293FT cells (100 ×) 6×10^6 293FT cells were seeded into 10 cm^2 dish and cultured overnight. Two reagents, one with 9 (g Packaging Mix and 3 (g lentiviral expression plasmid DNA in 1.5 mL Opti-MEM, another with 36 (L Lipofectamine 2000 in 1.5 mL Opti-MEM, were gently mixed together and incubated at room temperature for 20 minutes. The mixture was carefully added to the cell culture dish and incubated for 6 hours, then replaced into complete medium. After 48 hours, cell culture supernatant was collected and fluorescence in 293FT cells was observed. (A) fluorescence field; (B) bright field

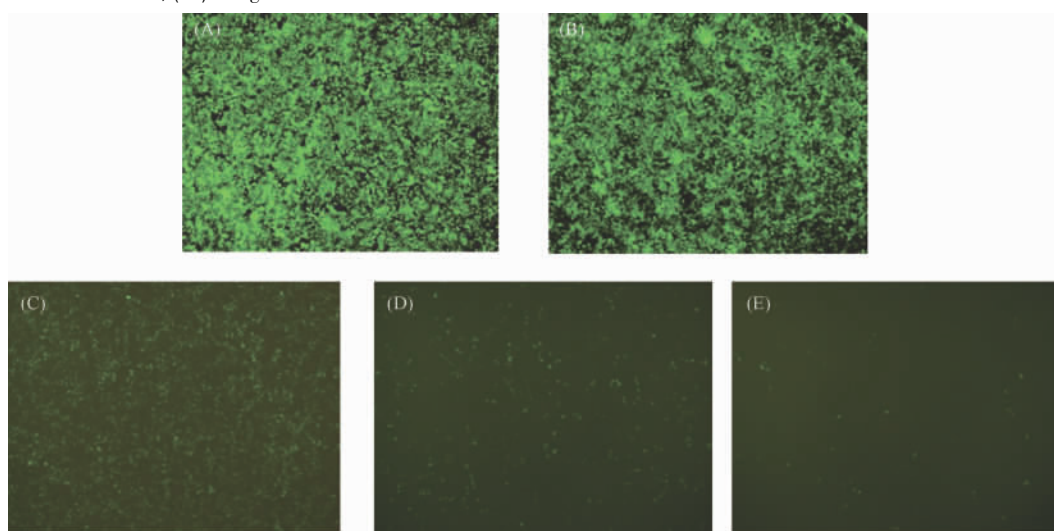


Fig. 4 Fluorescence expression in virus titer test (×40) 8×10^3 293FT cells were seeded into 96-well tissue culture plates and incubated overnight. 100 μL of lentiviruses diluted with medium containing 6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ polybrene and 2% FBS were added. The fluorescence was observed at 96 hours post infection. A ~ E: 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , and 10^{-7} dilution group

2.5 siRNA-Vero 纯合细胞系的筛选

按 MOI 100 稀释慢病毒原液,转染 Vero 细胞,转染后不进行流式细胞分选,分别取第 1、4、7 代细胞,荧光显微镜观察荧光表达分别约为 80%、30%、15%。结果表明,不加筛选,随着传代次数的增加,含有 siRNA 的阳性细胞逐渐减少。如果进行流式细胞

分选,并加入含有杀稻瘟霉素的筛选培养液加压筛选,分别取分选后第 1、4、7 代细胞,荧光显微镜下观察荧光表达几乎都为 100%,传代次数不会对细胞荧光表达产生影响。以正常 Vero 细胞作为对照,第 10 代细胞中约 97.6% 都为 GFP 阳性细胞 (Fig. 6),即为表达 *prM* siRNA 的 Vero 纯合细胞系。

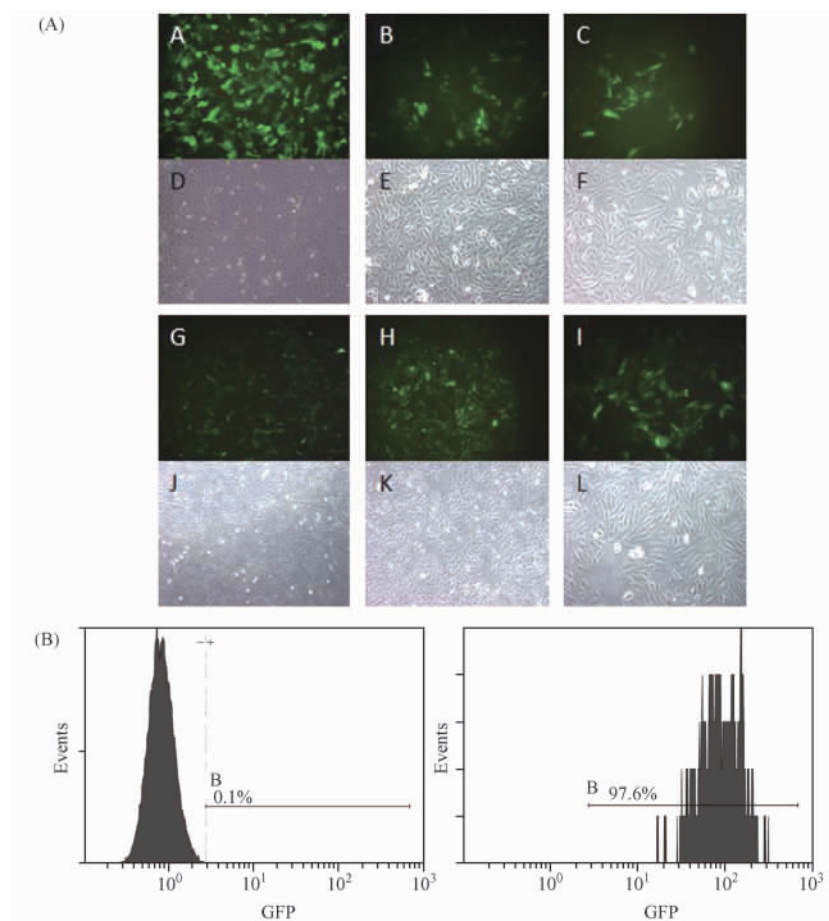


Fig. 6 The selection of *prM* siRNA Vero cell lines (A) Vero cells were transfected with lentiviruses in MOI 100. Then GFP + Vero cells were sorted by FACS, and cultivated in MEM containing 10% FBS and 10 (g/mL) Blasticidin. Fluorescence of GFP in the 1st, 4th, 7th generation cells was observed by fluorescence microscope. A-C: the fluorescence field of the 1st, 4th, 7th generation cells without selection. D-F: the bright field of the 1st, 4th, 7th generation cells without selection. G-I: the fluorescence field of the 1st, 4th, 7th generation cells with selection. J-K: the bright field of the 1st, 4th, 7th generation cells with selection. (B) Flow cytometry assay were proceeded to calculate the GFP⁺ cell rate in Vero cell lines. left: normal Vero cells; right: the 10th generation cells with selection

2.6 *prM* siRNA 对 *prM* 基因的干扰效果

Western 印迹结果显示,登革病毒感染 5 d 后,*prM* siRNA-Vero 纯合细胞系与普通 Vero 细胞相比,能够明显抑制登革病毒 *prM* 基因的表达,细胞中几乎检测不到 *prM* 蛋白 (Fig. 7)。

2.7 *prM* siRNA 对登革病毒复制的抑制作用

实时荧光 RT-PCR 结果显示,登革病毒感染后,

正常 Vero 细胞和表达 *neg* siRNA 的 Vero 细胞中登革病毒可以正常复制,感染后 7 d 登革病毒 RNA 拷贝数分别可达到 10^{7.4} 和 10^{6.9} 个,而表达 *prM* siRNA 的 Vero 纯合细胞系却能够明显抑制登革病毒的复制,感染后 7 d 登革病毒 RNA 拷贝数只有 10^{4.0},与 *neg* siRNA 组相比,两者差异具有统计学意义 ($P < 0.05$) (Fig. 8)。

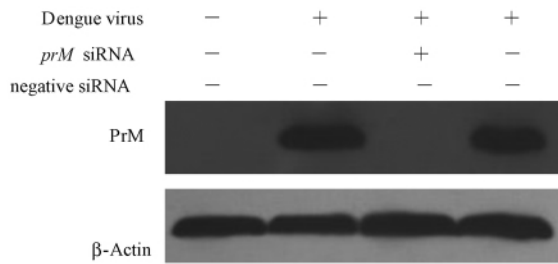


Fig. 7 Suppressing effect of *prM* siRNA on *prM* gene expression

Vero, *prM* siRNA-Vero and neg siRNA-Vero cells were infected with 100 TCID₅₀ dengue virus. The cells were lysed by 1 × SDS after 5 days. Cell lysates were separated by 12% SDS-PAGE, then transferred into PVDF membrane, and subjected to Western blotting analysis. β-Actin was used as the internal standard

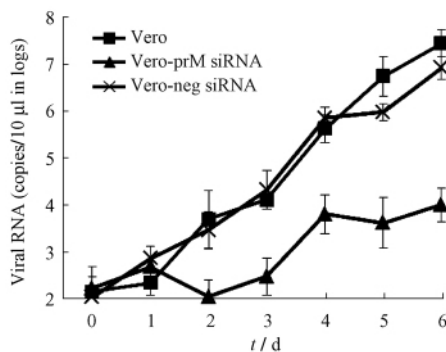


Fig. 8 Inhibition effect of *prM* siRNA on dengue virus replication

Vero, *prM* siRNA-Vero and neg siRNA-Vero cells were infected with 100 TCID₅₀ dengue virus. Cell culture supernatants were collected at day 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 post infection. Total RNA of 100 (L supernatant were extracted and viral RNA copies were detected by real time RT-PCR

3 讨论

登革病毒基因组是正单链 RNA, 其 RNA 基因组不仅是复制子代病毒的模板, 而且具有 mRNA 的功能, 可直接翻译出病毒的结构蛋白和非结构蛋白. 结构蛋白是组成病毒颗粒的主要成分, 包括衣壳蛋白 C (C 蛋白)、膜蛋白 M (M 蛋白) 和包膜蛋白 E (E 蛋白). 其中 M 蛋白是由 *prM* 蛋白裂解而来. 所以, 针对 *prM* RNA 设计的 siRNA, 不仅能够阻断 M 蛋白的合成, 破坏病毒结构, 而且可以导致登革病毒的 RNA 基因组降解, 使之在病毒复制的早期就丧失病毒模板的作用, 同时丧失 RNA 复制所必需的 RNA

聚合酶等早期蛋白和结构蛋白的能力.

由于单独的 siRNA 在体内很容易被 RNA 酶降解, 且随着细胞的分裂增殖, siRNA 不能随之复制, 其干扰效果会随时间不断减弱, 所以选择慢病毒作为 siRNA 的载体. 慢病毒载体是在 HIV-I 病毒基础上改造成的病毒载体系统, 能高效地将目的基因 (或 RNAi) 导入动物和人的原代细胞或细胞系. 慢病毒介导的基因表达或 RNAi 干扰作用持续且稳定, 目的基因可整合到宿主细胞基因组中, 随细胞基因组的分裂而分裂, 并能有效感染并整合到非分裂细胞中. 与其他病毒载体如不整合的腺病毒载体、整合率低的腺相关病毒载体、只整合分裂细胞的传统逆转录病毒载体相比, 慢病毒可将目的基因整合至靶细胞基因组长期表达, 同时扩大了载体感染细胞的范围, 适于体内基因治疗. 将其作为 siRNA 的携带者, 不但具备使特异性基因表达沉默的能力, 还可以充分发挥病毒载体自身所具备的优势, 为研究基因功能提供了更强有力的工具^[11-13].

本课题所用慢病毒载体, 将目的基因整合到宿主细胞基因组后, 以 CMV 作为启动子, 能够转录 *prM* siRNA 的前体 shRNA. shRNA 具有发夹结构, 是转录产物在细胞核内经过 Drosha 酶修饰形成的, 通过核转运受体 exportin-5, shRNA 被转运至细胞质中, 由 Dicer 酶切割成长度为 21nt 的 *prM* siRNA. *prM* siRNA 与其他组分装配形成 RNA 诱导的基因沉默复合体 (RNA-induced silencing complex, RISC), 切割与 *prM* siRNA 具有同源序列的转录体, 最终导致 *prM* 基因的沉默以及登革病毒 RNA 基因组的降解^[14,15]. 本研究也证实, 当受到登革病毒攻击时, 表达 *prM* siRNA 的 Vero 细胞能够明显抑制登革病毒 *prM* 基因的表达, 并抑制登革病毒在 Vero 细胞中的复制.

转染慢病毒的 Vero 细胞, 如果不进行筛选, 随着传代次数的增加, 表达 siRNA 的 Vero 细胞将逐渐减少, 到第 7 代时只占细胞总数的 15%. 可能与外源基因高表达时, 细胞代谢负荷较大, 无法与正常细胞竞争有关. 利用重组慢病毒表达的 GFP 蛋白以及杀稻瘟毒素抗性蛋白, 可以通过 FACS 分选, 并在含杀稻瘟毒素培养基中培养等方法, 以去除未被慢病毒转染的细胞, 筛选出表达 *prM* siRNA 的 Vero 纯合细胞系. 通过筛选培养, 第 7 代细胞中约 97.6% 均可表达 *prM* siRNA.

含有 *prM* siRNA 的慢病毒载体, 可用于多种原代细胞和细胞系的转染, 可以构建多种表达 *prM*

siRNA 的纯合细胞系. 预实验中, 选用对登革病毒敏感的埃及伊蚊细胞 (C6/36) 作为慢病毒转染细胞. 但是, 并没有观察到 GFP 蛋白的表达 (数据未列出), 这可能是由于 C6/36 细胞是一种节肢动物细胞, 慢病毒转录启动子 CMV 不能高效表达, 后续实验可以将启动子变为 Carboxy-peptidase 等在伊蚊中特有的启动子^[16]. 本实验中选用的非洲绿猴肾细胞 (Vero) 既可以高效表达目的基因, 又对登革病毒感染敏感, 筛选得到的 *prM* siRNA-Vero 细胞系为后续的 RNA 抑制登革病毒复制提供了极佳的研究模型.

参考文献 (References)

- [1] 张富春, 杨智聪. 登革热 [M]. 北京: 科学出版社 (Zhang Fu-Chun, Yang Zhi-Cong. Dengue fever [M]. Beijing: Science Press) 2008
- [2] 秦鄂德, 秦成峰, 姜涛. 登革病毒与登革病病毒 [M]. 北京: 科学出版社 (Qin E-De, Qin Cheng-Feng, Jiang Tao. Dengue virus and dengue fever. Beijing: Science Press) 2008
- [3] Ma Y, Chan C Y, He M L. RNA interference and antiviral therapy [J]. World J Gastroenterol, 2007, **13**(39): 5169-5179
- [4] 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
- [5] Paddison P J. RNA interference in mammalian cell systems [J]. Curr Top Microbiol Immunol, 2008, **320**: 1-19
- [6] 连冬生, 赵树进. RNAi 在抗病毒防治领域的应用 [J]. 中国生物化学与分子生物学报 (Lian Dong-Sheng, Zhao Shu-Jin. RNA interference in antiviral applications [J]. Chin J Biochem Mol Biol) 2009, **25**(12): 1069-1076
- [7] Sanchez-Vargas I, Travanty E A, Keene K M, *et al.* RNA interference, arthropod-borne virus, and mosquitoes [J]. Virus Res, 2004, **102**(1): 65-74
- [8] Morris K V, Rossi J J. Lentiviral-mediated delivery of siRNAs for antiviral therapy [J]. Gene Ther, 2006, **13**(6): 553-558
- [9] Sumimoto H, Kawakami Y. Lentiviral vector-mediated RNAi and its use for cancer research [J]. Future Oncol, 2007, **3**(6): 655-664
- [10] Wu X, Hong H, Yue J, *et al.* Inhibitory effect of small interfering RNA on dengue virus replication in mosquito cells [J]. Virol J, 2010, **7**: 270-277
- [11] Galimi F, Verma I M. Opportunities for the use of lentiviral vectors in human gene therapy [J]. Curr Top Microbiol Immunol, 2002, **261**: 245-254
- [12] Abbas-Terki T, Blanco-Bose W, Deglon N, *et al.* Lentiviral-mediated RNA interference [J]. Hum Gene Ther, 2002, **13**(18): 2197-2201
- [13] 张艳, 强冉, 唐晓燕, 等. 慢病毒介导的甲胎蛋白敲减表达抑制肝癌细胞 HepG2 的增殖 [J]. 中国生物化学与分子生物学报 (Zhang Yan, Qiang Ran, Tang Xiao-Yan, *et al.* Lentiviral mediated knock-down of alpha-fetoprotein inhibits HepG2 cell proliferation [J]. Chin J Biochem Mol Biol) 2010, **26**(1): 48-54
- [14] Montgomery M K, Xu S, Fire A. RNA as a target of double-stranded RNA-mediated genetic interference in *Caenorhabditis elegans* [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1998, **95**(26): 15502-15507
- [15] Sharp P A. RNA interference [J]. Genes Develop, 2001, **15**(5): 485-490
- [16] Travanty E A, Adelman Z N, Franz A W E, *et al.* Using RNA interference to develop dengue virus resistance in genetically modified *Aedes aegypti* [J]. Insect Biochem Mol Biol, 2004, **34**(7): 607-613