

稳定表达靶向 BVDV shRNA 细胞系的建立及其对 BVDV 复制的影响

范璐¹, 王丽¹, 史西保^{1,2}, 樊剑鸣³, 王爱萍⁴, 张改平^{1,5*}

(1. 河南省农业科学院 农业部动物免疫学重点开放实验室/河南省动物免疫学重点实验室, 河南 郑州 450002;

2. 河南师范大学 生命科学学院, 河南 新乡 453007; 3. 郑州大学 公共卫生学院, 河南 郑州 450001;

4. 郑州大学 生物工程系, 河南 郑州 450001; 5. 河南农业大学 牧医工程学院, 河南 郑州 450002)

摘要: 为研究靶向牛病毒性腹泻病毒(BVDV)的 shRNA 对 BVDV 复制的影响, 利用脂质体介导法将 BVDV shRNA 真核表达质粒 pSGH1-sh1083 和 pSGH1-sh8235 及对照质粒 pSGH1 转染 MDBK 细胞, 通过 G418 抗性以及有限稀释法筛选获得 BVDV shRNA 单克隆细胞系 subclonepSGH1-1083 和 subclonepSGH1-8235 及对照细胞系 subclonepshmock。通过观察其细胞病变效应(CPE)、测定 TCID₅₀ 及 RT-PCR、流式细胞术检测 BVDV shRNA 细胞系对 BVDV 复制的影响。结果表明, 与阴性对照组相比, 单克隆细胞系 subclonepSGH1-1083 和 subclonepSGH1-8235 的细胞在感染 BVDV 72 h 后 CPE 不明显, 其 TCID₅₀ 低于阴性对照组; RT-PCR 结果显示, 单克隆细胞系 subclonepSGH1-1083 和 subclonepSGH1-8235 的细胞在感染 BVDV 后病毒 E2 基因的表达减弱; 流式细胞术检测不同细胞系接毒 24 h 后的结合率, 单克隆细胞系 subclonepSGH1-1083 和 subclonepSGH1-8235 与病毒结合率分别为 11.37% 和 11.51%, 与对照组(20.25%)相比有所降低。综上, 稳定转染 BVDV shRNA 的单克隆细胞系 subclonepSGH1-1083 和 subclonepSGH1-8235 对 BVDV 的复制具有抑制作用。

关键词: RNA 干扰; 牛病毒性腹泻病毒; 短发夹 RNA; 单克隆细胞系; 复制

中图分类号: S855.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-3268(2014)12-0134-06

Establishment of Stable Cell Line Expressing shRNA Targeting BVDV and Its Effect on the Replication of BVDV

FAN Lu¹, WANG Li¹, SHI Xi-bao^{1,2}, FAN Jian-ming³, WANG Ai-ping⁴,
ZHANG Gai-ping^{1,5*}

(1. Key Laboratory of Animal Immunology of the Ministry of Agriculture/Henan Provincial Key Laboratory of Animal Immunology, Henan Academy of Agricultural Sciences, Zhengzhou 450002, China;

2. College of Life Sciences, Henan Normal University, Xinxiang 453007, China;

3. School of Public Health, Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, China;

4. Department of Bioengineering, Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, China;

5. College of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China)

Abstract: In order to study the effects of shRNA targeting BVDV on BVDV replication, the pSGH1-sh1083, pSGH1-sh8235 and the control vector were transfected into MDBK cell by

收稿日期: 2014-07-12

基金项目: 国家自然科学基金项目(31302073); 河南省农业科学院自主创新专项基金项目(2013zz48)

作者简介: 范璐(1986-), 女, 上海崇明人, 在读硕士研究生, 研究方向: 动物病毒分子致病机制。E-mail: 632038636@qq.com

* 通讯作者: 张改平(1960-), 男, 河南内黄人, 研究员, 中国工程院院士, 博士, 主要从事动物免疫学与动物疫病快速诊断研究。
E-mail: zhanggaiping2003@163.com

lipofectamin. The transfectants, BVDV shRNA monoclonal cell lines subclonepSGH1-1083, subclonepSGH1-8235 and the control monoclonal cell line subclonepshmock, were obtained by the selection of G418 and the limited dilution. CPE, TCID₅₀, RT-PCR and FCM analysis were used to detect the effect of BVDV shRNA cell lines on BVDV replication. The BVDV cytopathic effect of cells expressing pSGH1-sh1083 or pSGH1-sh8235 at 72 h post-infection was less than that of the negative control group, and the expressions of the BVDV E2 gene in monoclonal cell lines subclonepSGH1-1083, subclonepSGH1-8235 were lower than that in the negative control group. The binding rate to BVDV was 11.37% and 11.51% in monoclonal cell lines subclonepSGH1-1083 and subclonepSGH1-8235 respectively, which were lower than the binding rate in the negative control group (20.25%). In conclusion, this study demonstrated that the shRNAs specific for BVDV could significantly inhibit the replication of the virus.

Key words: RNA interference; bovine viral diarrhea virus (BVDV); shRNA; monoclonal cell lines; replication

牛病毒性腹泻病毒(BVDV)是牛病毒性腹泻病(BVD)[又称牛病毒性腹泻-黏膜病(BVD-MD)]的病原。牛病毒性腹泻病在多个国家和地区普遍存在且分布广泛,除会使牛发生腹泻、高热、黏膜病变坏死、出血性综合征急性感染等症状外,还会在怀孕母牛体内通过胎盘传染给幼仔,引起流产或使得仔牛出生携带病毒,成为持续的感染源,影响生产和效益,极大冲击着养牛业。由于 BVDV 感染情况较为复杂,且抗原易变异造成免疫逃逸,使得一般控制此病的方法具有极大局限性。

RNA 干扰(RNAi)是一种由双链 RNA 诱发的转录后水平的基因沉默现象,是近几年发展起来的基因表达调节新机制。RNAi 技术作为新兴的基因阻断技术具有明显优势,已经被广泛应用于基因功能研究、抗肿瘤和抗病毒等热门领域^[1]。

运用 RNAi 技术,针对病毒基因组的保守序列设计 siRNA 或 shRNA,在体外导入动物细胞可有效抑制病毒复制,后期通过注入体内产生长效 RNAi 效应,可成为一种较传统方法更为可行的控制动物疫病的新策略^[2]。Lambeth 等根据 BVDV 的 NADL 链设计合成了针对 BVDV 不同区域的 siRNA,转染牛肾细胞(MDBK)16 h 后,再感染感染系数(MOI)为 15 的 BVDV,48 h 后的间接免疫荧光(IFA)试验结果表明,不同片段对 BVDV 抗原表达的抑制效果存在差异,最高可抑制 90% BVDV 的抗原表达^[3-4]。Ni 等^[5]设计合成了针对 BVDV 保守序列的可同时表达 2 个 shRNA 的双表达系统,对 BVDV 的抑制可达 96%。这种通过质粒介导靶向病毒基因保守序列的 shRNA 通过脂质体转染方法导入细胞系虽然可产生快速有效的 RNAi,但所产生的 RNAi 只能实现瞬时基因沉默,维持短暂的时间,其效果会随着细胞的传代而消失,多数是因为

在传代过程中 siRNA 被不断稀释使沉默效果无法延续。而设计在哺乳动物细胞内表达的载体引导细胞内 siRNA 的合成,最终形成稳定表达 siRNA 的体系,则能解决以上的问题。

目前,有关稳定表达 shRNA 的细胞系对 BVDV 复制的影响研究较少。为此,构建了靶向 BVDV 的 shRNA 重组干扰载体,以建立稳定表达 RNAi 的单克隆细胞系,研究细胞系对 BVDV 复制产生的影响,旨在为控制 BVDV 提供新的理论依据。

1 材料和方法

1.1 质粒、毒株及细胞株

重组干扰质粒 pSGH1-sh1083、pSGH1-sh8235 及阴性对照质粒 pSGH1 和 MDBK 细胞株均由河南省动物免疫学重点实验室保存;BVDV AV69 毒株购自中国兽药监察所。

1.2 试剂

DMEM 培养基购自美国 GIBCO 公司;G418 购自美国 Invitrogen 公司;Xfect 细胞转染试剂购自美国 CloneTech 公司;羊抗小鼠二抗、胰蛋白酶购自华美生物工程有限公司;特异性 BVDV 单克隆抗体(BVDV348)购自美国 VMRD 公司。

1.3 建立稳定表达 BVDV shRNA 的细胞系

MDBK 细胞在含 10% 小牛血清的 DMEM 培养基中,于 37℃、5% CO₂ 的饱和湿度下培养。当细胞融合度达 80% 时,按照 Xfect 细胞转染操作说明书进行空质粒 pSGH1 和重组表达载体 pSGH1-sh1083 及 pSGH1-sh8235 的转染。转染 48 h 后以胰蛋白酶消化细胞,在含有 800 μg/mL G418 的选择性培养基中筛选 6 周,利用有限稀释法挑选稳定转染并经过 G418 筛选表达绿色荧光蛋白的细胞单克隆,扩增培养即为稳定表达 BVDV shRNA 的单克

隆细胞系,分别命名为 subclonpshmock、subclonpSGH1-1083、subclonpSGH1-8235。稳定转染细胞克隆的筛选所用培养基配比为:50%的 MDBK 细胞全培养基(10% FBS 的 DMEM)+50%的条件培养基(培养过细胞含有生长因子的培养基)+G418(维持浓度为 300 $\mu\text{g/mL}$)。

1.4 BVDV 的培养与收集

将 BVDV AV69 毒株接种于已长成单层的 MDBK 细胞上,于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中培养,培养基为含 10% 小牛血清的 DMEM。接毒 24~96 h 内观察细胞生长情况。将培养 96 h 的细胞于 -80 $^{\circ}\text{C}$ 反复冻融 3 次,4 $^{\circ}\text{C}$ 、5 000 r/min 离心 10 min,上清 -80 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

1.5 BVDV 感染稳定表达 shRNA 单克隆细胞系的致细胞病变效应(CPE)观察

subclonpSGH1-1083、subclonpSGH1-8235 和 subclonpshmock 细胞以及未转染质粒的 MDBK 细胞在长势良好且融合度达到 70% 时,弃去培养基,接入 BVDV,置 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱孵育 1 h 后,加入含 2% FBS 的 DMEM 培养基继续以相同条件培养,72 h 后观察病毒对各细胞系的 CPE。

1.6 BVDV 感染稳定表达 shRNA 单克隆细胞系的 TCID₅₀ 测定

MDBK 细胞及 subclonpSGH1-1083、subclonpSGH1-8235、subclonpshmock 细胞系感染 BVDV 的 TCID₅₀ 测定按照 Reed-Muench 法进行^[6]。

1.7 RT-PCR 检测 E2 和 GAPDH 基因

收集感染 BVDV 的 MDBK、subclonpSGH1-1083、subclonpSGH1-8235 以及 subclonpshmock 细胞,用 Trizol 提取总 RNA。用 oligo d(T)₁₅ 反转录获得 cDNA,RT-PCR 鉴定 E2 和 GAPDH 基因,所用引物如表 1。

表 1 试验所用引物

基因名称	引物序列
GAPDH	F:5'-GGTCACCAGGGCTGCTTT-3' R:5'-CTGTGCCGTTGAACCTTGC-3'
E2	F:5'-ACGGGACAGAAGGGATACAACGGG-3' R:5'-CTCTTGGTGGTTGGCCCTCAGT-3'

PCR 反应条件为 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,55 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min,共 30 个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 5 min 延伸。

1.8 流式细胞术检测 shRNA 对 BVDV 结合细胞的抑制效果

BVDV 病毒侵染 subclonpSGH1-1083、subclonpSGH1-8235、subclonpshmock 细胞系 24 h 时消化细胞,1 000 r/min 离心 10 min 收集细胞,用 PBS 悬浮,计数后分装于 EP 管中。对细胞进行清洗,共重复 3 次,每次加入 1 mL PBS 将细胞悬浮后轻轻吹打,4 $^{\circ}\text{C}$ 、4 000 r/min 离心 5 min。未接毒 MDBK 细胞(阴性对照)按上述方法同步进行处理。4 组细胞清洗完毕后加入 100 μL 的特异性 BVDV 单克隆抗体(BVDV348),其质量浓度为 100 mg/mL,使用时按照 1:100 稀释抗体,放在冰上作用 1 h。弃去一抗,以同样方法用 PBS 洗 3 次后加入 100 μL 的羊抗小鼠二抗(1:500 稀释),二抗用藻红蛋白(PE)标记,可对细胞进行荧光染色,冰上作用 1 h,同样以 PBS 洗 3 次后用 500 μL PBS 重悬细胞,用孔径为 37 μm 的尼龙网过滤细胞到流式细胞仪专用玻璃管中,除去杂质,冰上放置待过流式细胞仪,同时设置空白对照。

2 结果与分析

2.1 稳定转染 BVDV shRNA 细胞系的建立

2.1.1 G418 筛选浓度的确定 观察细胞生长状态(图 1),选择能使细胞死亡的最低质量浓度,最终确定 G418 的工作终浓度为 800 $\mu\text{g/mL}$ 。

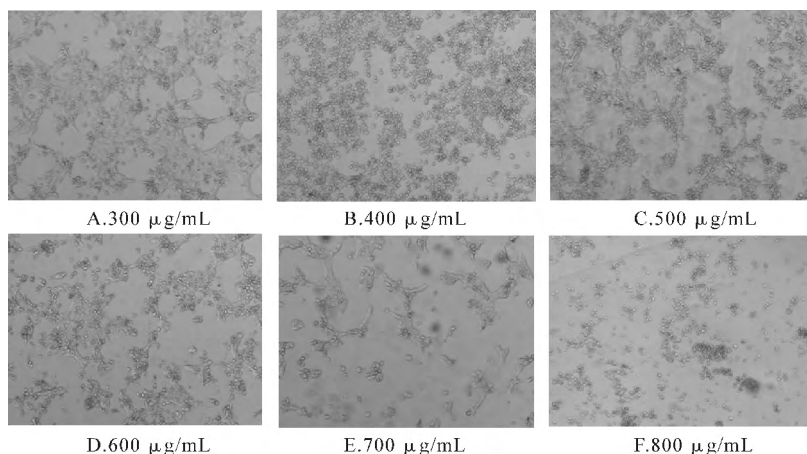
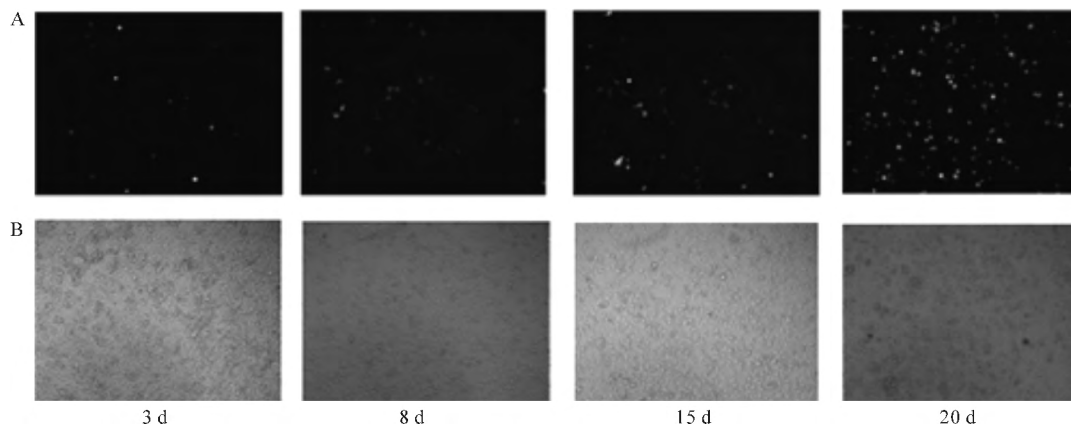


图 1 不同质量浓度 G418 下的细胞状态

2.1.2 BVDV shRNA 稳定表达的 MDBK 细胞系的筛选 当干扰质粒在 MDBK 细胞中的转染率达到顶峰时加入 G418 开始筛选,24 h 后细胞出现极少量死亡,48 h 后细胞呈现明显皱缩状态,部分细胞死亡,随着筛选天数的增加细胞死亡量增加,约

16 d 细胞板内仅存少量荧光表达量较高的活细胞。筛选期间每隔 3 d 更换一次培养基,同时补加相应的 G418,使 G418 终质量浓度保持在 $800 \mu\text{g/mL}$ 。20 d 后得到了 shRNA 稳定表达的 MDBK 细胞系。以 pSGH1-1083 细胞克隆为例,过程记录如图 2 所示。



A. 荧光显微镜下的结果; B. 普通显微镜下的结果

图 2 稳定表达 BVDV shRNA 细胞系的筛选

2.1.3 BVDV shRNA 稳定表达的 MDBK 细胞系的建立 使用有限稀释法进行细胞亚克隆筛选,制备新鲜的条件培养基,将阳性孔细胞计数,稀释细胞数在 1×10^3 个/mL,取约 130 个细胞放入 6.5 mL 条件培养基中,即 20 个/mL,100 μL /孔加 A、B、C 3 排,每孔约 2 个细胞。余下 2.9 mL 细胞悬液补加 2.9 mL 条件培养基,细胞数为 10 个/mL,100 μL /孔加 D、E、F 3 排,每孔为 1 个细胞。余下

2.2 mL 细胞悬液补加 2.2 mL 条件培养基,细胞数为 5 个/mL,100 μL /孔加 G、H 2 排,每孔 0.5 个细胞。培养 4~5 d 后,在倒置显微镜下可观察到成团的带有绿色荧光的细胞克隆,补加条件培养基 200 μL /孔。经过有限稀释法 2 次亚克隆筛选后,最终建立了 subclonepSGH1-1083、subclonepSGH1-8235 和 subclonepshmock 单克隆细胞系,其荧光表达量见图 3。

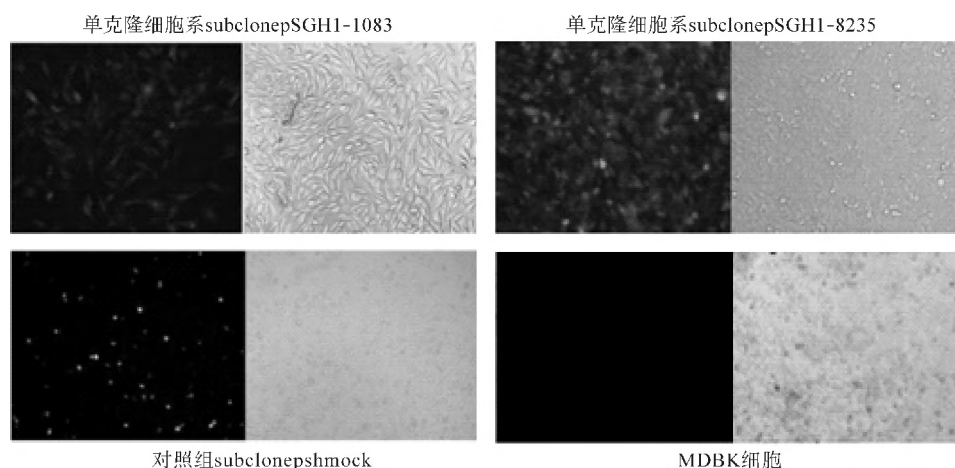


图 3 筛选后得到的细胞亚克隆荧光表达量

2.2 BVDV 感染单克隆细胞系后的 CPE

将 subclonepSGH1-1083、subclonepSGH1-8235、subclonepshmock、MDBK 4 种细胞系接毒 72 h 后,作为对照组的 MDBK 细胞系和 subclonepshmock 单克隆细胞系的细胞出现明显的 CPE;细

胞状态变差,形态变圆、皱缩甚至死亡,脱离瓶壁;而稳定转染了干扰质粒的 subclonepSGH1-1083 和 subclonepSGH1-8235 单克隆细胞系的细胞形态略有变化或无变化,说明 BVDV 在稳定表达 shRNA 的单克隆细胞系中的复制受到了抑制(图 4)。

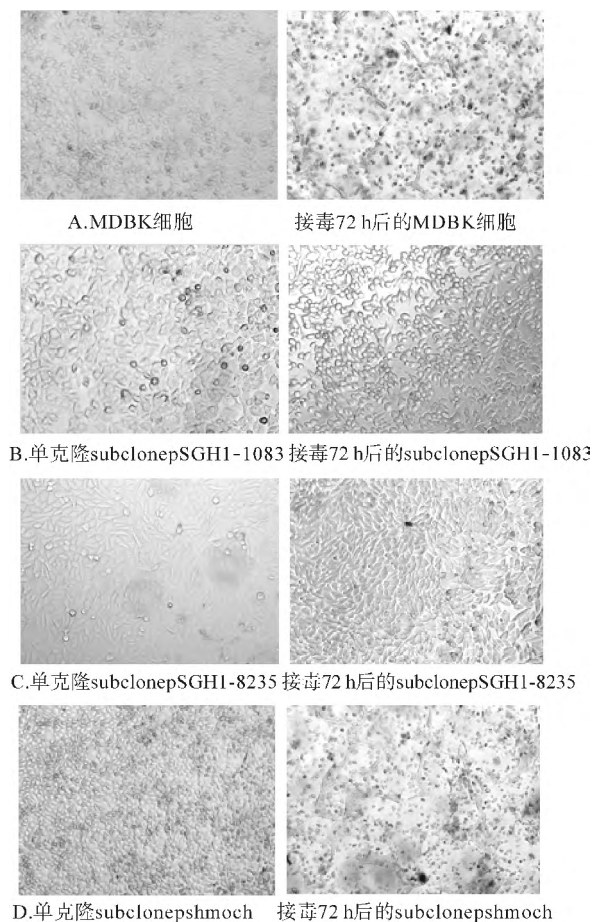


图 4 BVDV 对稳定表达干扰片段单克隆细胞系的 CPE

2.3 BVDV 感染 shRNA 单克隆细胞系的 TCID₅₀

对 3 次重复试验得到的数据进行分析表明, MDBK 细胞系和 subclonepshmock 单克隆细胞系的 lgTCID₅₀/0.1 mL 分别为 8.1 和 7.9, 与之相比, subclonepSGH1-1083 和 subclonepSGH1-8235 单克隆细胞系接毒 48 h 后的 lgTCID₅₀/0.1 mL 分别为 2.4 和 3.2, 明显降低(图 5)。

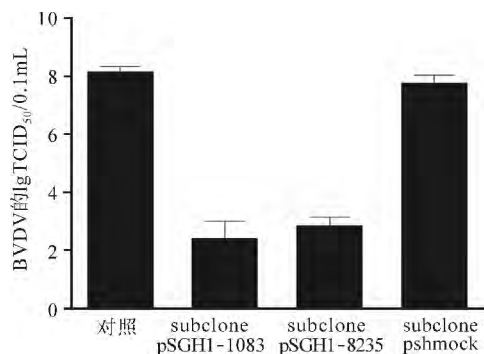
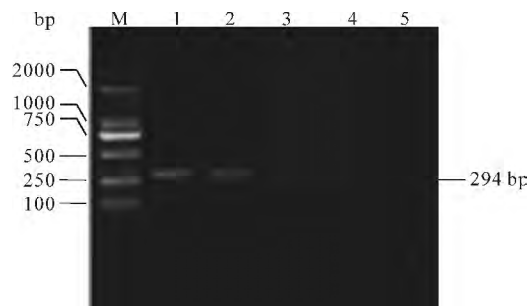


图 5 稳定表达干扰片段单克隆细胞系接毒后的 TCID₅₀

2.4 RT-PCR 检测 shRNA 对 BVDV 复制的抑制效果

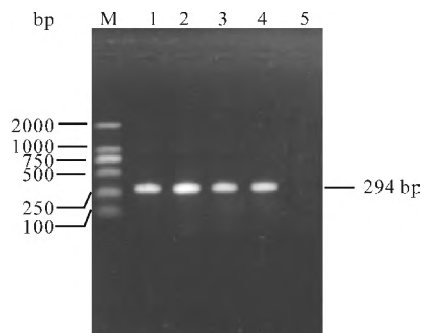
各种细胞系接毒 48 h 后, 病毒的 E2 基因经 RT-PCR 扩增和琼脂糖凝胶电泳(图 6), 结果显示, 与从

BVDV 感染的 MDBK 和 subclonepshmock 单克隆中扩增的 E2 基因相比, subclonepSGH1-1083、subclonepSGH1-8235 单克隆细胞系中 E2 基因的电泳条带明显减弱, 扩增条带大小为 294 bp, 阴性对照 MDBK 细胞的 cDNA 中无法扩增出 E2 基因; 而扩增的 GAPDH 基因图片显示, 4 种细胞系均可以扩增出内源性 GAPDH 基因(图 7)。



M. DL2000; 1. MDBK + BVDV; 2. subclonepshmock + BVDV; 3. subclonepSGH1-1083 + BVDV; 4. subclonepSGH1-8235 + BVDV; 5. MDBK

图 6 RT-PCR 扩增不同细胞系中 E2 基因



M. DL2000; 1. MDBK + BVDV; 2. subclonepSGH1-1083 + BVDV; 3. subclonepSGH1-8235 + BVDV; 4. Subclonepshmock + BVDV; 5. BVDV

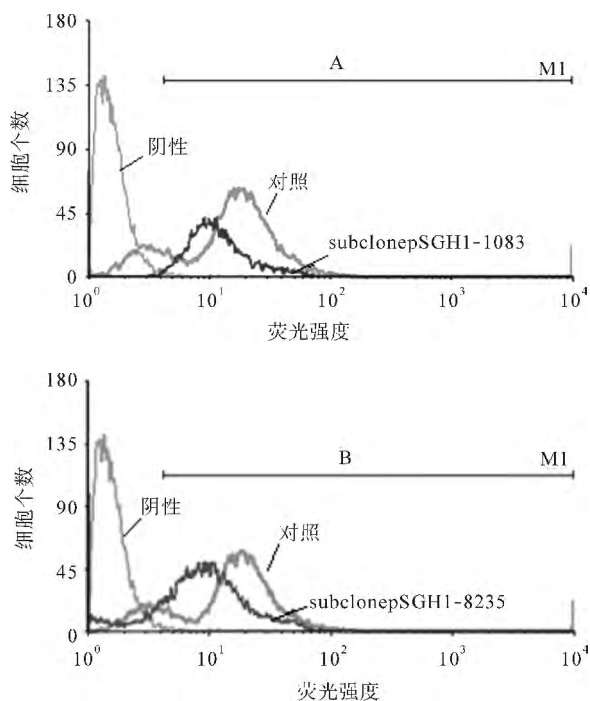
图 7 RT-PCR 扩增不同细胞系中 GAPDH 基因

2.5 流式细胞术检测 shRNA 对 BVDV 结合细胞的抑制效果

图 8 所示为稳定表达 shRNA 的 subclonepSGH1-1083、subclonepSGH1-8235 单克隆细胞系在接毒 24 h 后与病毒的结合情况。结果显示, 单克隆细胞系 subclonepSGH1-1083 和 subclonepSGH1-8235 与病毒的结合率分别为 11.37% 和 11.51%, 与对照组 (subclonepshmock) 20.25% 相比有所降低。

3 结论与讨论

设计在哺乳动物细胞内表达的重组载体引导细胞内 siRNA 的合成, 最终可形成稳定表达 siRNA 的体系^[7]。这些重组载体通常带有选择标记可用于转染后细胞的筛选, 最终选出可稳定表达 RNAi 的细



A. subclonepSGH1-1083 及其对照 subclonepshmock 的单幅流式细胞图和叠加分析图; B. subclonepSGH1-8235 及其对照 subclonepshmock 的单幅流式细胞图和叠加分析图;
M1 区表示 BVDV 阳性细胞

图 8 流式细胞术对 BVDV 在各细胞系中表达的直方图分析

胞系^[8]。本研究选用的 pSGH1 载体有增强型绿色荧光蛋白报告基因和新霉素抗性基因,使得重组表达载体在转录 shRNA 的同时以及在细胞中表达时可以被直接观察、追踪和进行 G418 抗性压力筛选,挑选出阳性细胞克隆直至筛选出稳定表达 BVDV shRNA 的单克隆细胞系。后期当 RNAi 重组载体在 MDBK 细胞内表达时,其中的 shRNA 双链结构被切割成若干 siRNA, siRNA 的反义链可引导 RISC 识别互补的 BVDV mRNA,替换掉其正义链,与其配对后对病毒进行特异性降解,当 BVDV 侵入细胞时,重组载体发挥干扰效应,对 BVDV 的复制

产生抑制。相同信号通路重复循环使沉默信号不断扩大,最终可形成整个生物体内针对 BVDV 的特异性沉默。

本研究成功建立了稳定转染牛 BVDV shRNA 载体的单克隆细胞系,该细胞系对 BVDV 的复制具有抑制作用,为进一步利用 RNAi 技术研究牛 BVDV 的基因治疗打下了较好的基础。

参考文献:

- [1] 周红建,黄松,王宏伟. RNAi 技术研究新进展[J]. 生物技术通报,2010(12):84-87.
- [2] Song E, Lee S K, Wang J, *et al.* RNA interference targeting fas protects mice from fulminant hepatitis[J]. Nature Medicine, 2003, 9: 347-351.
- [3] Lambeth L S, Moore R J, Muralitharan M S, *et al.* Suppression of bovine viral diarrhea virus replication by small interfering RNA and short hairpin RNA-mediated RNA interference [J]. Veterinary Microbiology, 2007, 119(2): 132-143.
- [4] Lambeth L, Wise T, Moore R, *et al.* Comparison of bovine RNA polymerase III promoters for short hairpin RNA expression [J]. Animal Genetics, 2006, 37 (4): 369-372.
- [5] Ni W, Hu S, Qiao J, *et al.* Suppression of bovine viral diarrhea virus replication by single and dual short hairpin RNA-mediated RNA interference [J]. Research in Veterinary Science, 2012, 93(1): 544-548.
- [6] 殷震,刘景华. 动物病毒学 [M]. 2 版. 北京: 科学出版社, 1997: 323-340.
- [7] Sijen T, Fleenor J, Simmer F, *et al.* On the role of RNA amplification in dsRNA-triggered gene silencing [J]. Cell, 2001, 107(4): 465-476.
- [8] Brummelkamp T R, Bernards R, Agami R. A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells [J]. Science, 2002, 296 (5567): 550-553.