

RNA 干扰技术抑制 SGIV ICP18 绿色荧光融合蛋白表达的研究*

夏立群^{1,2}, 张红莲^{1,2}, 梁海鹰¹, 秦启伟³

- (1. 广东海洋大学水产学院, 广东 湛江 524025;
2. 中山大学生命科学学院//有害生物控制与资源利用国家重点实验室, 广东 广州 510275;
3. 中国科学院南海海洋研究所//海洋生物资源可持续利用重点实验室, 广东 广州 510301)

摘要: 将含有新加坡石斑鱼虹彩病毒 (Singapore grouper iridovirus, SGIV) ICP18 基因的真核表达载体 pEGFP-ICP18 转染到胖头鲤细胞 (Fathead minnow cells, FHM) 中进行融合表达, 用荧光显微镜观察到 ICP18-GFP 融合蛋白呈点状分布于 FHM 细胞的细胞质中。根据 SGIV ICP18 的序列, 设计并体外化学合成了特异性干扰 SGIV ICP18 的 siRNA (siRNA-ICP18), 与 pEGFP-ICP18 共转染到 FHM 细胞中, 通过荧光显微镜观察不同时间点的荧光强度变化。与序列非特异性 siRNA (siRNA-negative) 阴性对照相比, 转染后 24 ~ 48 h, 共转染 siRNA-ICP18 和 pEGFP-ICP18 的实验细胞中发荧光的细胞数量较阴性对照少 60% ~ 80% 左右, 说明体外化学合成的 siRNA-ICP18 可有效抑制 FHM 细胞中外源导入 SGIV ICP18 基因的表达。

关键词: RNA 干扰; 绿色荧光蛋白; 石斑鱼虹彩病毒 SGIV; ICP18

中图分类号: Q78 **文献标志码:** A **文章编号:** 0529-6579 (2011) 01-0110-05

The Inhibition of Expression of SGIV ICP18-GFP in FHM Cell by RNA Interferencing

XIA Liqun^{1,2}, ZHANG Honglian^{1,2}, LIANG Haiying¹, QIN Qiwei³

- (1. College of Fishery, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524025, China;
2. State Key Laboratory of Biocontrol, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China;
3. South China Sea Institute of Oceanology, Guangzhou 510301, China)

Abstract: Singapore grouper iridovirus (SGIV) is a major pathogen resulting in heavy economic losses to grouper aquaculture. In this study, recombinant eukaryotic vector pEGFP-ICP18 which inserted with SGIV ICP18 gene was transfected into Fathead minnow (FHM) cells, and ICP18-GFP fusion protein was successfully expressed in FHM cells with a finely punctate cytoplasmic pattern. Candidate siRNA targeting SGIV ICP18 gene (siRNA-ICP18) was designed and chemically synthesized. To investigate the inhibition effect of siRNA-ICP18, pEGFP-ICP18 and siRNA were co-transfected into FHM cells, and the green fluorescence was observed by fluorescence microscope after transfection. The green fluorescence in FHM cells co-transfected with pEGFP-ICP18 and siRNA-ICP18 were 60% ~ 80% fewer than that of negative control, which show the siRNA-ICP18 can effectively silence the extrinsic SGIV ICP18 gene in FHM cells during 24 ~ 48 h after transfection.

Key words: RNA interference; green fluorescent protein; singapore grouper iridovirus (SGIV); ICP18

* 收稿日期: 2009-11-01

基金项目: 国家 863 计划资助项目 (2006AA09Z411、2006AA100306); 国家自然科学基金资助项目 (30930070); 广东省科技攻关资助项目 (2006B50104003)

作者简介: 夏立群 (1976 年生), 女, 博士, 讲师; 通讯作者: 秦启伟; E-mail: qinqw@scsio.ac.cn

新加坡石斑鱼虹彩病毒 (Singapore grouper iridovirus, SGIV) 是近年来分离自养殖石斑鱼 (*Epinephelus tauvina*) 的一种新型致病性虹彩病毒, 该病毒可导致石斑鱼死亡率达 90% 以上, 鱼类感染后的主要症状为脾肿大、出血^[1-2]。目前 SGIV 的全基因组测序、体内外感染的转录图谱、蛋白质组学等相关基础研究已经完成, 对 SGIV 重要功能基因的研究正陆续展开^[3-5]。

SGIV ORF086R 是一个立即早期基因^[5-6], 作为病毒感染宿主后在细胞中最早表达的一类基因, 立即早期基因在病毒感染复制、宿主细胞生长调控和免疫逃避等方面具有重要功能^[7-9]。生物信息学分析发现, SGIV ORF086R 编码一个感染细胞多肽 ICP18 (infected cell polypeptides 18) 的同源类似物。ICP18 是虹彩病毒科蛙病毒属特有的核心基因之一, 并可能在蛙病毒属的生命周期中具有重要作用, 但目前 ICP 18 家族的功能尚不明确。

RNA 干扰 (RNA interfering, RNAi) 是短双链 RNA 即小干扰 RNA (small interfering RNA, siRNA) 介导的对同源基因转录后水平的抑制作用, 是细胞发育基因水平的重要调节方式和宿主抵抗病毒感染的一种重要手段^[10-11]。目前, RNAi 技术已广泛应用于基因功能、抗病毒感染和基因治疗等的研究。绿色荧光蛋白 (Green fluorescent protein, GFP) 对细胞无毒性, 其表达可用荧光显微镜直接观察, 因此作为报告基因广泛应用于基因工程实验中^[12]。本实验将 SGIV ICP18 和 GFP 基因融合表达, 对 SGIV ICP18 在 FHM 细胞中的表达进行了研究, 并对利用 GFP 作为报告分子筛选能有效抑制 SGIV ICP18 基因表达的 siRNA。对 RNA 干扰技术抑制 SGIV ICP18 绿色荧光融合蛋白表达的研究为进一步开展 SGIV ICP18 的功能和抗 SGIV 病毒感染的研究奠定了基础。

1 材料与方 法

1.1 病毒、细胞和质粒

新加坡石斑鱼虹彩病毒、FHM 细胞、质粒 pEGFP-N3、受体菌 DH5 α 由中山大学有害生物控制及资源利用国家重点实验室保存提供。病毒的分离和 SGIV 总 DNA 的提取参照秦启伟等的方法^[2]。

1.2 工具酶和试剂

PrimeSTAR DNA 聚合酶, 限制性核酸内切酶 *EcoRI*, *XhoI*, T4 连接酶, DNA 片段纯化试剂盒购自 TaKaRa 公司; 质粒微量提取试剂盒购自 U-gene 公司; M199 培养基, 胰酶 (含 EDTA) 购自 Gibco

公司; 提取无内毒素质粒试剂盒 (Endo-Free plasmid mini kit) 购自 Omega 公司; 转染试剂 Lipofectamine 2000 购自 Invitrogen 公司; 其它试剂均为国产分析纯。

1.3 ICP18-GFP 融合表达载体的构建

根据 SGIV (accession number: AY521625) ICP18 (nucleotide position: 80591-81055) 的序列和质粒 pEGFP-N3 酶切位点设计引物:

P1: 5' -GCGTCTCGAGCACTACCAAACACCATG-3' (*XhoI*)

P2: 5' -CCTCGAATTCTTGTAACCCCTTGGATG-3' (*EcoRI*)

用 PrimeSTAR DNA 聚合酶高保真扩增目的片段, 反应条件为: 95 °C 预变性 5 min; 94 °C 30 s, 58 °C 30 s, 72 °C 40 s, 共 30 个循环, 再 72 °C 延伸 8 min。PCR 产物经 DNA 片段纯化试剂盒纯化, 酶切后以摩尔数比 1:3 (质粒/插入片段) 的比例克隆入质粒 pEGFP-N3, 菌落 PCR 和双酶切鉴定后, 阳性克隆送上海英骏生物技术有限公司测序。

1.4 去内毒素质粒的提取和转染

按 Omega 公司《Endo-Free plasmid mini kit》说明书提取无内毒素 pEGFP-ICP18 和 pEGFP-N3 质粒。将 FHM 细胞传代至 24 孔细胞培养板中, 于 25 °C 恒温培养箱中培养, 待细胞长满单层的 90% ~95% 开始转染。每孔转染需 1 μ g 质粒, 2 μ L 转染试剂 (Lipofectamin 2000)。将质粒和转染试剂分别用 Opti-MEM 培养基稀释至 50 μ L, 两者混匀后静置 20 min。在静置期间, 吸走培养板孔中的培养液, 加入 300 μ L Opti-MEM 培养基洗涤 1 次, 吸走洗涤液。加入质粒和 Lipofectamin 2000 的混合液, 轻摇培养板以使混合液与细胞充分接触。25 °C 恒温培养箱中培养 4 h 后, 吸走混合液, 加入 500 μ L 含有 $w = 10\%$ 胎牛血清的 M199 培养液, 转染完成。

1.5 荧光显微镜观察

转染后 48 h, 将转染的细胞消化后传到置于 6 孔板中的无菌盖玻片上, 继续培养 12 ~24 h 后, 吸去培养基, PBS 漂洗一次, 然后用 $\varphi = 4\%$ 多聚甲醛 (Paraformaldehyde, PFA) 室温固定 15 min; PBS 漂洗 3 次后用抗荧光淬灭封片剂封片, 用荧光显微镜 (ZEISS) 观察。

1.6 siRNA 序列的设计

根据 SGIV ICP18 的序列信息分析结果和 siRNA 序列的设计原则, 设计了特异性干扰 SGIV ICP18 的 siRNA-ICP18, 序列如下:

正义链 (5' \rightarrow 3'): 5'-CGAUCGACUUGGUAUUUU

dTdT-3'

反义链 (3'→5'): 3'-dTdT GCUAGCUGAAC-CAUUUAAA-5'

正义链和反义链 siRNA 都为 19 bp, 为了提高 siRNA 的稳定性, 保护 siRNA 不受 Rnase 降解, 两端各加 2 个脱氧核酸悬垂。siRNA-ICP18 由广州市锐博生物科技有限公司体外化学合成。实验所用阴性对照 siRNA (siRNA-negative) 购自广州市锐博生物科技有限公司。

1.7 真核质粒和 siRNA 共转染

将 FHM 细胞传代至 24 孔细胞培养板中, 于 25 °C 恒温培养箱中培养, 等细胞长满单层的 70%~80%, 用 Lipofectamine 2000 将 2 μL 重组质粒 pEGF-ICP18 分别和 2.5 μL (20 μmol/L) siRNA-ICP18 或 siRNA-negative 共转染 FHM 细胞。转染后 24、36、48、60 和 72 h, 用荧光显微镜观察 siRNA 对外源导入细胞的 SGIV ICP18 基因的干扰效果, 照相时随机选取视野, 在 GFP 激发光下拍摄绿色荧光, 拍摄放大倍数为 10×40, 曝光时间统一为 600 ms。

2 结果

2.1 SGIV ICP18 基因的高保真 PCR 扩增

SGIV ICP18 基因的高保真 PCR 扩增产物, 用 $w = 1\%$ 的琼脂糖凝胶作电泳分析, 结果如图 1。得到大小约为 500 bp 的目标带, 与理论结果相符合。

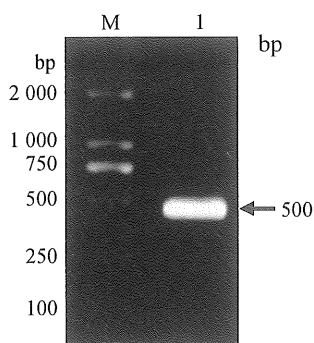


图 1 SGIV ICP18 基因高保真 PCR 扩增电泳结果

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of PCR product of SGIV ICP18 gene

M: DL 2000 DNA 相对分子质量标准; 1: SGIV ICP18 基因

2.2 ICP18-GFP 融合表达载体的构建

将 ICP18 基因 PCR 产物与 pEGFP-N3 载体连接后, 转化大肠杆菌 DH5 α 细胞, 挑取转化平板上生长的单菌落进行菌落 PCR (图 2) 及双酶切鉴定 (图 3)。pEGFP-N3 载体长 4.7 kb, 重组质粒经 *Xho*I 和 *Eco*RI 双酶切后, 得到预期结果一致的大

小约为 500 bp 和 4.7 kb 的两个片断, 表明 SGIV ICP18 基因已正确克隆到了 pEGFP-N3 载体上。经测序证实了连接和克隆的正确性, 将成功构建的重组质粒命名为 pEGFP-ICP18。

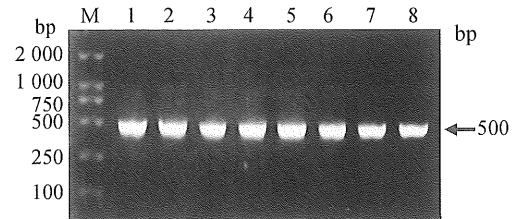


图 2 重组质粒 pEGFP-ICP18 菌落 PCR 鉴定图

Fig. 2 Identification of the Recombinant Vector pEGFP-ICP18 by Clony PCR

M: DL 2000 DNA 相对分子质量标准; 1-8: 阳性克隆

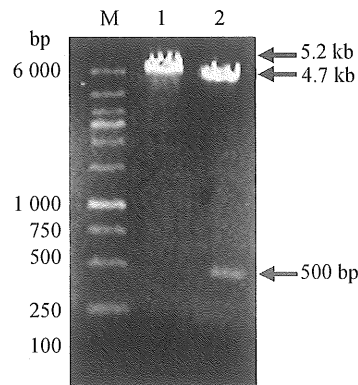


图 3 重组质粒 pEGFP-ICP18 酶切鉴定

Fig. 3 Restriction analysis of recombinant plasmid pEGFP-ICP18

M: DL 6000 DNA 相对分子质量标准; 1: pEGFP-ICP18;

2: pEGFP-ICP18 / *Xho*I + *Eco*RI

2.3 ICP18-GFP 融合蛋白在 FHM 细胞中的表达

将真核表达重组质粒 pEGFP-ICP18 转染到真核细胞后, 该质粒能在自身携带的 SV40 早期启动子的作用下中表达一个羧基末端带有增强型绿色荧光蛋白标签的 ICP18-GFP 融合蛋白, 可以通过绿色荧光蛋白来研究 ICP18 蛋白的表达。实验以空载体 pEGFP-N3 和未转染质粒的 FHM 细胞为对照, 转染后在倒置荧光显微镜 GFP 滤镜下观察。

荧光显微镜观察结果显示, 未转染质粒的 FHM 细胞中没有荧光出现; pEGFP-N3 转染的 FHM 细胞所表达的 GFP 在细胞核和细胞质中都存在, 细胞核中的绿色荧光较强; 而 pEGFP-ICP18 转染 FHM 细胞后所表达的 ICP18-GFP 则主要以点状分布于细胞质中, 可以初步推断 SGIV ICP18 蛋白定位于 FHM 细胞的细胞质中, 且呈现点状分布特点 (图 4)。

2.4 siRNA 与质粒 pEGFP-ICP18 共转染后对 ICP18 抑制效果的检测

将 siRNA-ICP18 和 siRNA-negative 分别与质粒 pEGFP-ICP18 共转染 FHM 细胞, 在转染后 24、36、48、60 和 72 h 利用荧光倒置显微镜观察拍照。结果显示: 转染后 24 ~ 72 h, 阴性对照细胞 (共转染 siRNA-negative 和 pEGFP-ICP18) 有较强的荧光, 且发荧光的细胞数目随时间而不断增多; 而转染后 24 ~ 48 h, 实验细胞 (共转染 siRNA-ICP18 和 pEGFP-ICP18) 中的荧光微弱, 发荧光的细胞数量较阴性对照少 60% ~ 80% 左右 (图 5 上排, 中

排), 但转染后 60 h, 实验细胞的荧光强度开始增强, 在转染后 72 h 其与阴性对照组已差别不大 (图 5 下排)。这表明从转染后 24 h 起, siRNA-ICP18 就能有效的抑制外源导入 ICP18 的表达, 抑制效果可以持续到 48 h。这些结果说明, 针对 ICP18 基因专门设计的 siRNA-ICP18 能有效抑制 FHM 细胞中外源导入 ICP18 基因的表达。

3 讨论

有关 ICP18 的报道最早见于 20 世纪 80 年代对蛙病毒属 *Ranavirus* 代表种蛙病毒 3 型 (frog virus 3,

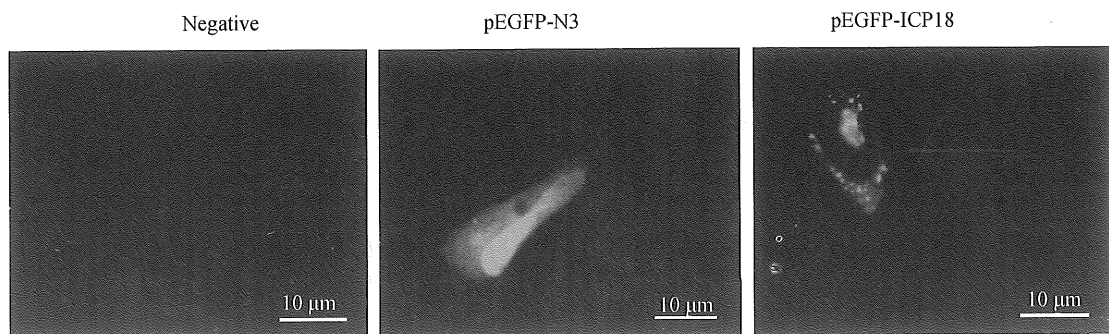


图 4 带 GFP 标签的 SGIV ICP18 融合蛋白在 FHM 细胞中的表达

Fig. 4 SGIV ICP18 fusion protein expressed by pEGFP-ICP18 in FHM cells

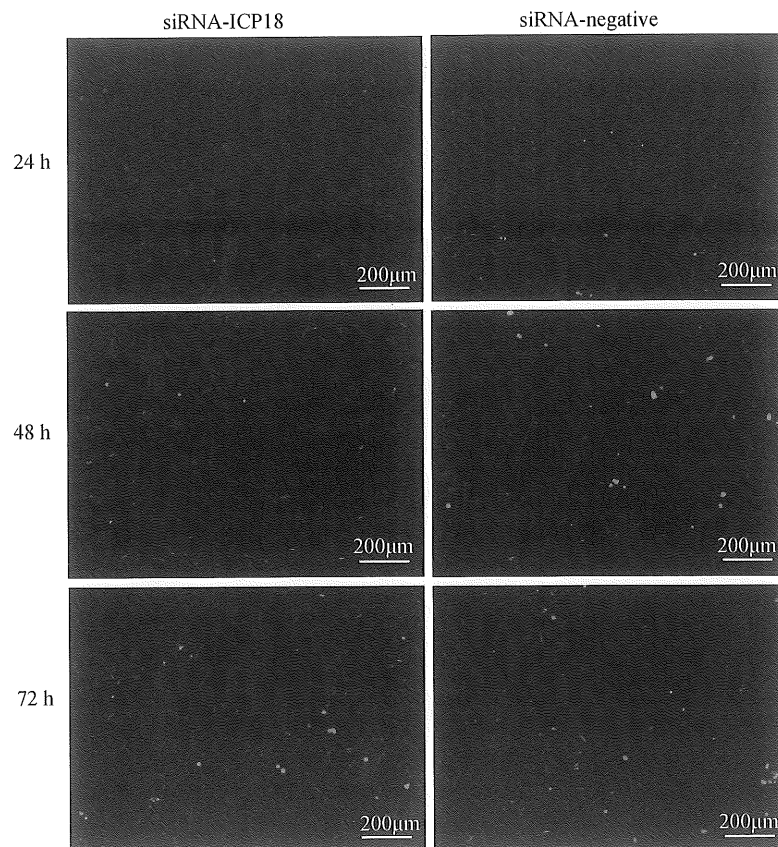


图 5 siRNA 与 pEGFP-ICP18 共转染 FHM 细胞后的荧光变化

Fig. 5 Green fluorescence detection in FHM cells after co-transfection with siRNA and pEGFP-ICP18

FV-3)的研究^[13]。其后在其他蛙病毒属病毒中也陆续发现了ICP18同源类似物的存在。同源搜索表明ICP18同源类似物只出现在蛙病毒属病毒,是蛙病毒特有的核心基因之一,推测其可能在蛙病毒属的生命周期中具有重要作用。对ICP18同源类似物的报道主要集中在基因结构和启动子分析方面^[14]。我们对SGIV ICP18的过量表达进行了研究,表明该基因的过量表达能促进宿主细胞生长,并有利于SGIV的复制^[6]。

RNAi技术作为一种全新的抑制基因表达的技术,在基因功能研究和抗病毒感染等方面展现出非常诱人的前景。近年来,RNAi抗病毒的研究更是突飞猛进。利用基因沉默机制,减少或消除病毒侵袭、增殖必需的关键基因的表达,抑制病毒的复制和侵染,对由病毒感染引起的疾病的基因治疗提供了一种非常有希望的全新的手段,也为反向遗传学和功能基因组学的研究提供了有价值的、经济快捷的工具^[10-11]。

本文构建了与GFP基因以同一编码读框共表达的ICP18-GFP表达载体,与siRNA-ICP18共转染FHM细胞。由于ICP18-GFP表达载体拥有同一翻译起始序列、翻译起始密码子ATG和一致编码读框,如果ICP18 mRNA被降解,ICP18-GFP就不能表达,使GFP成为反映ICP18表达的报告分子。以GFP为报告分子,通过荧光显微镜来观察siRNA-ICP18对细胞中外源导入ICP18基因的表达的抑制效果,结果显示siRNA-ICP18能在转染后24~48 h有效抑制外源ICP18基因的表达,说明实验设计的siRNA靶点是有效的,这为今后进一步研究SGIV ICP18的功能奠定了基础。

本实验采用化学合成siRNA进行RNA干扰,这种方法具有操作简便,起效快的优点,但非修饰的siRNA在细胞培养过程中很容易降解,因此其干扰效果是有一定时效性的,我们的研究发现siRNA-ICP18在转染后72 h干扰效果基本消失,这个结果与在哺乳动物细胞中获得的结果类似^[15-16]。为了获得更为稳定长效的的干扰效果,使其在抗SGIV病毒感染中具有实际应用的价值,今后可以考虑通过构建RNA干扰载体体内表达,或使用经过修饰的siRNA来进一步开展研究。

致谢:真诚感谢广东省水产经济动物病原生物学及流行病学重点实验室吴灶和研究员、简纪常教授在实验上对本文工作给予的帮助和支持。

参考文献:

- [1] QIN Qiwei, LAM T J, SIN Y M, et al. Electron microscopic observations of a marine fish iridovirus isolated from brown-spotted grouper, *Epinephelus tauvina* [J]. *J Virol Methods*, 2001, 98(1): 17-24.
- [2] QIN Qiwei, CHANG S F, NGO H G, et al. Characterization of a novel ranavirus isolated from brown-spotted grouper, *Epinephelus tauvina* [J]. *Dis Aquat Organ*, 2003, 53(1): 1-9.
- [3] SONG W J, QIN Qiwei, QIU J, et al. Functional genomics analysis of Singapore grouper iridovirus: complete sequence determination and proteomic analysis [J]. *J Virol*, 2004, 78(22): 12576-12590.
- [4] SONG W, LIN Q, JOSHI S B, et al. Proteomic Studies of the Singapore Grouper Iridovirus [J]. *Mol Cell Proteomics*, 2006, 5(2): 256-264.
- [5] TENG Yong, HOU Zhiwei, GONG Jie, et al. Whole-genome transcriptional profiles of a novel marine fish iridovirus, Singapore grouper iridovirus (SGIV) in virus-infected grouper spleen cell cultures and in orange-spotted grouper, *Epinephelus coioides* [J]. *Virology*, 2008, 377(1): 39-48.
- [6] XIA Liqun, CAO Jianhao, HUANG Xiaohong, et al. Characterization of the Singapore grouper iridovirus (SGIV) ORF086R, a putative homolog of ICP18 involved in cell growth control and virus replication [J]. *Arch Virol*, 2009, 154(9): 1409-1416.
- [7] MOSS B, SHISLER J L. Immunology 101 at poxvirus U: immune evasion genes [J]. *Semin Immunol*, 2001, 13(1): 59-66.
- [8] HOBBS W E, DELUCA N A. Perturbation of cell cycle progression and cellular gene expression as a function of herpes simplex virus ICP0 [J]. *J Virol*, 1999, 73(10): 8245-8255.
- [9] KINCHINGTON P R, FITE K, SEMAN A, et al. Virion Association of IE62, the varicella-zoster virus (VZV) major transcriptional regulatory protein, requires expression of the VZV open reading frame 66 protein kinase [J]. *J Virol*, 2001, 75(19): 9106-9113.
- [10] MATZKE M, MATZKE A J, KOOTER J M. RNA: guiding gene silencing [J]. *Science*, 2001, 293(5532): 1080-1083.
- [11] CARMICHAEL G G. Silencing viruses with RNA [J]. *Nature*, 2002, 418(6896): 379-380.
- [12] 单志新, 林秋雄, 符永恒, 等. 用绿色荧光蛋白(GFP)作为报告分子筛选有效的siRNA [J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2007, 23(3): 231-235.
- [13] WILLIS D, FOGLESONG D, GRANOFF A. Nucleotide sequence of an immediate-early frog virus 3 gene [J]. *J Virol*, 1984, 53(3): 905-912.
- [14] PALLISTER J, GOLDIE S, COUPAR B, et al. Promoter activity in the 5' flanking regions of the Bohle iridovirus ICP18, ICP46 and major capsid protein genes [J]. *Arch Virol*, 2005, 150(8): 1911-1919.
- [15] MITTAL V. Improving the efficiency of RNA interference in mammals [J]. *Nat Rev Genet*, 2004, 5(5): 355-65.
- [16] 沈剑虹, 罗其中, 包映晖, 等. siRNA抑制神经元NgR mRNA的时效关系和毒性研究 [J]. *中华神经外科杂志*, 2006, 22(11): 695-698.