

密级：

论文编号：

中国农业科学院

博士学位论文

应用 RNAi 技术抑制猪繁殖与呼吸综合征病毒 复制的研究

**Inhibition of porcine reproductive and respiratory syndrome virus
replication by RNA interference technology**

博士研究生：贺云霞

指导教师：童光志 研究员

申请学位类别：农学博士

专 业：预防兽医学

研究方向：动物病毒分子生物学

培养单位：研究生院

哈尔滨兽医研究所

提交日期 2006 年 6 月

Secrecy: No.

Chinese Academy of Agricultural Sciences
Ph.D Dissertation

**Inhibition of porcine reproductive and respiratory syndrome
virus replication by RNA interference technology**

Ph.D Candidate: He Yun-xia

Advisor: Prof. Tong Guang-zhi

Major: Preventive Veterinary Medicine

Specialty: Molecular Biology of Animal Viruses

Chinese Academy of Agricultural Sciences

June 2006

独 创 性 声 明

本人声明所呈交的论文是我个人在导师指导下进行的研究工作及取得的研究成果。尽我所知，除了文中特别加以标注和致谢的地方外，论文中不包含其他人已经发表或撰写过的研究成果，也不包含为获得中国农业科学院或其它教育机构的学位或证书而使用过的材料。与我一同工作的同志对本研究所做的任何贡献均已在论文中作了明确的说明并表示了谢意。

研究生签名：

时间： 年 月 日

关于论文使用授权的声明

本人完全了解中国农业科学院有关保留、使用学位论文的规定，即：中国农业科学院有权保留送交论文的复印件和磁盘，允许论文被查阅和借阅，可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存、汇编学位论文。同意中国农业科学院可以用不同方式在不同媒体上发表、传播学位论文的全部或部分内容。

（保密的学位论文在解密后应遵守此协议）

论文作者签名：

时间： 年 月 日

导师签名：

时间： 年 月 日

论文评阅人、答辩委员名单

论文题目	应用 RNAi 技术抑制猪繁殖与呼吸综合征病毒复制的研究				
论文作者	贺云霞	指导教师	童光志	培养单位	哈尔滨兽医研究所

	姓名	职称职务	导师类别	单位	专业
评 阅 人	周继勇	教授	博导	浙江大学动物科学学院	
	钱爱东	教授	博导	吉林农业大学动物医学院	
	吴东来	研究员	博导	哈尔滨兽医研究所	
答辩主席	崔玉东	教授	博导	八一农垦大学动物医学院	
答 辩 委 员	崔玉东	教授	博导	八一农垦大学动物医学院	
	王君伟	教授	博导	东北农业大学动物医学院	
	李一经	教授	博导	东北农业大学动物医学院	
	刘长明	研究员	博导	哈尔滨兽医研究所	
	周建华	研究员	博导	哈尔滨兽医研究所	
	仇华吉	研究员	博导	哈尔滨兽医研究所	
	陈洪岩	研究员	博导	哈尔滨兽医研究所	
答辩时间与地址	2006 年 6 月 16 日 哈尔滨兽医研究所学术报告厅				
记录人员	周艳君				

摘要

猪繁殖与呼吸综合征 (porcine reproductive and respiratory syndrome, PRRS) 是以母猪繁殖障碍和仔猪呼吸困难为特征的、严重危害养猪业的主要传染性疾病之一，给世界范围的养猪业造成巨大经济损失。PRRS 病毒 (PRRSV) 对宿主淋巴细胞有严格嗜性，其 RNA 基因组易变异，常规的疫苗设计策略难以产生理想的免疫效果，因此，探索防治该病的新方法有重要意义。RNA 干扰 (RNA interference, RNAi) 作为新的有效抗病毒工具，其机制与建立在病毒蛋白基础上的传统的疫苗免疫机制不同，是转录后 mRNA 水平上的基因沉默机制，通过双链 RNA (double-stranded RNA, dsRNA) 分子阻断或者降低同源基因的表达而达到抗病毒复制的效果。在哺乳动物细胞中，21~23nt 的小干扰 dsRNA (small interfering RNA, siRNA) 可以诱导同源基因特异表达抑制，为探索抗病毒研究提供了新思路。

本研究首先针对 PRRSV 中含量最高、相对保守的核衣壳蛋白 (N) 编码序列 ORF7 基因，使用 <http://www.ambion.com> 的靶位点筛选和设计工具，选取 4 个特异 siRNA 序列 (siRNA95、siRNA179、siRNA218 和 siRNA294)，同时设计一个无相关序列 (siRNA-C) 对照，利用一步 PCR 法产生包含鼠 U6 启动子的发夹 RNA (short hairpin RNA, shRNA) 表达盒 (shRNA95-PCR、shRNA179-PCR、shRNA218-PCR、shRNA294-PCR 和 shRNA-C-PCR)，带 shRNA 表达盒的 PCR 产物分别与表达 N 蛋白的重组质粒 pEGFP-ORF7 共转染 293T 细胞，荧光显微镜下检测表达绿色荧光蛋白 (Green fluorescent protein, GFP) 细胞比例，快速筛选有效 siRNA 片段。筛选 N-EGFP 融合蛋白稳定表达 293T 细胞系，验证了筛选片段的基因沉默效果，在 PRRSV 感染的 MARC-145 细胞中证明筛选的 siRNA 片段可以明显减轻 PRRSV 引起的特异性细胞病变。

为了使 shRNA 获得长久表达并适合于大量制备，将 PCR 法制备 shRNA 表达盒插入到 pEGFP-N1 质粒载体，构建 shRNA 表达载体 (pEN95-shRNA、pEN179-shRNA、pEN218-shRNA、pEN294-shRNA、pEC-shRNA)，转染 MARC-145 细胞，在 mRNA 水平及蛋白质水平检测 shRNA 表达载体对 PRRSV 复制的抑制。结果证明 pEN179-shRNA 可以明显减轻 PRRSV 引起的特异性细胞病变；在间接免疫荧光分析 (indirect immunofluorescent assay, IFA) 和 Western blot 检测中，pEN179-shRNA 处理细胞的 PRRSV N 蛋白阳性细胞及 N 蛋白表达量比对照的明显减少；荧光定量 PCR (fluerescence quantitative PCR, FQ-PCR) 和病毒滴定检测发现 pEN179-shRNA 处理细胞中 N 蛋白的 mRNA 比对照减少了 96%，病毒滴度比对照减少了 681 倍。此外，pEN179-shRNA 抑制效应在一定范围内呈明显的剂量依赖性。在检测 pEN179-shRNA 抑制 PRRSV ORF7 mRNA 的同时，对次要结构蛋白的 mRNA 表达水平的变化进行检测，结果表明，次要结构蛋白 GP2、GP3、GP4 的 mRNA 表达水平分别比对照减少了 60%、30%、55%，证明 PRRSV 的复制受到了抑制，而且 pEN179-shRNA 的抑制作用是特异的。

为了了解次要结构蛋白 GP2、GP3、GP4 在病毒复制中的作用，针对各基因分别选取 4 个 siRNA 位点，构建相应的 shRNA 表达载体 (21、22、23、24、31、32、33、34、41、42、43、44)。FQ-PCR 筛选可以减少 PRRSV 感染 MARC-145 细胞中 ORF2、ORF3、ORF4 相应 mRNA 含量的特异 shRNA 表达载体，病毒效价滴定表明这些 shRNA 表达载体 (23、24、31、34、41) 处理细胞培养上清中的病毒滴度比对照低 4.65~184 倍，但 IFA 检测中没有发现明显差异，推测次要结构蛋白在病毒感染中有重要作用。

本研究为 RNAi 技术应用于抗 PRRSV 感染研究奠定了基础并为研究病毒蛋白功能提供了新途径。

关键词 猪繁殖与呼吸综合征病毒, RNA 干扰, 干扰性小 RNA, 短发夹 RNA

Abstract

Porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) is characterized by a massive reproductive disorder of pregnant sows and respiratory distress of piglets. It is one of the most important causes of economic loss to swine industry worldwide. The causative agent PRRS virus (PRRSV) has restricted tropism for macrophages and its RNA genome is variable. The traditional vaccine strategies developed to control the disease are often unsuccessful. As a new effective antiviral tool, RNA interference (RNAi) has a different mechanism from classic vaccine which is based on the immunogenicity of proteins. It is a post-transcriptional mechanism of sequence-specific gene silencing that initiated by double-stranded RNA (dsRNA). In mammalian cells, short interfering RNA (siRNA) (21-25nt) can specifically silence the expression of the corresponding gene. It provides a new method in anti-virus research fields.

In this study, four (siRNA95, siRNA179, siRNA218 and siRNA294) directed against a well-conserved region of PRRSV ORF7 gene were selected. A non-specific siRNA sequence (siRNA-C) was designed as non-specific control. Sense and antisense siRNAs encoding sequences separated by a hairpin loop sequence were designed as short hairpin RNA (shRNA) expression cassettes driven by mouse U6 promoter. The shRNA expression cassettes (shRNA95-PCR, shRNA179-PCR, shRNA218-PCR, shRNA294-PCR and shRNA-C-PCR) were amplified by one-step PCR. Products of shRNA-PCR and N-EGFP fusion protein expression plamid pEN-ORF7 were co-transfected into 293T cells. Enhanced green fluorescent protein (EGFP) fluorescence intensity of transfected cells was monitored on an inverted fluorescent microscope. The effective siRNAs were selected rapidly. In addition, an N-EGFP stably expressing 293T cell line was selected and the inhibitory effect of the selected siRNA was demonstrated on it. In MARC-145 cell infected with PRRSV, the cytopathic effects (CPEs) induced by PRRSV was remarkably reduced in cells treated with shRNA179-PCR.

In order to make shRNA long-lasting express and easily prepared, shRNA expression cassettes were inserted into pEGFP-N1 vector and shRNA expression vectors were constructed (pEN95-shRNA, pEN179-shRNA, pEN218-shRNA, pEN294-shRNA and pEC-shRNA). MARC-145 cells were transfected with shRNA expression vectors. The inhibitory effect was detected both at mRNA and protein expression levels. It was found pEN179-shRNA had the most effect in reducing PRRSV-induced CPEs. In indirect immunofluorescent assay (IFA) and Western blot, the cells treated with pEN179-shRNA had obviously less N protein positive cells and less N protein expression compared with controls. In fluorescence quantitative PCR (FQ-PCR) and virus titration, it was demonstred that the mRNA level of ORF7 was reduced by 96% and the titre of the virus titration was reduce 681-fold compared with controls. The inhibitory effect of pEN179-shRNA was dose-dependent in a certain dosage range. In the same time, the mRNA levels of the minor proteins were detected. It was found that the mRNA levels of these proteins (GP2, GP3 and GP4)were reduced by 60%, 30% and 55%, respectively. It suggested that the replication of PRRSV was inhibited and the inhibitory effect of pEN179-shRNA was specific.

In order to investigate the role of GP2, GP3 and GP4 in the viral replication, siRNAs directed to

ORF2, ORF3 and ORF4 were selected and shRNA expression vectors were constructed (21, 22, 23, 24, 31, 32, 33, 34, 41, 42, 43 and 44). Cells treated with shRNA expression vectors were infected by PRRSV. The effective shRNA expression vectors were selected by FQ-PCR. The virus titer of supernatant of the cells treated with effective shRNA expression vectors (23, 24, 31, 34 and 41) were reduced by 184 to 4.65 folds compared with that of controls. There was no obvious difference among shRNA expression vectors in IFA. It was suggested that the minor proteins played important roles in PRRSV infection.

This study provided a primary material for anti-PRRSV infection by RNAi and provided a new approach to study of the function of viral proteins in PRRSV infection.

Keywords: PRRSV, RNAi, siRNA, shRNA

目 录

第一章 绪论	1
1.1 PRRSV 研究进展	1
1.1.1 PRRS 和 PRRSV	1
1.1.2 PRRSV 感染的细胞生物学	2
1.1.3 PRRSV 的复制、转录和翻译	3
1.1.4 PRRSV 的复制酶蛋白	4
1.1.5 PRRSV 的主要结构蛋白	6
1.1.6 PRRSV 的次要结构蛋白	8
1.1.7 PRRSV 的免疫抑制和持续性感染	10
1.1.8 细胞凋亡与 PRRSV 致病的关系	11
1.1.9 准种、异常 RNA 与 PRRSV 致病的关系	12
1.1.10 PRRSV 的防制策略	14
1.2 RNAi 研究进展	14
1.2.1 RNAi 概述	14
1.2.2 RNAi 的分子机制	15
1.2.3 哺乳动物细胞中特殊的 RNAi 现象	19
1.2.4 RNAi 的应用	20
1.2.5 RNAi 的局限性及应用前景	22
1.3 本研究的目的和意义	24
第二章 基于 PCR 扩增的 shRNA 表达盒快速筛选 PRRSV N 蛋白特异的有效 siRNA 序列	25
2.1 材料与方法	26
2.1.1 质粒、细胞和病毒	26
2.1.2 试剂、抗体	26
2.1.3 主要仪器	26
2.1.4 siRNA 的筛选和 shRNA 表达盒的设计	27
2.1.5 shRNA 表达盒的扩增和纯化	27
2.1.6 表达 N-EGFP 融合蛋白载体的构建	28
2.1.7 病毒 CCID ₅₀ 的测定	29
2.1.8 用 shRNA-PCR 转染 293T 细胞	30
2.1.9 N-EGFP 融合蛋白稳定表达 293T 细胞系的筛选	30
2.1.10 PCR-shRNA 转染 MARC-145 及 PRRSV 的感染	30
2.1.11 间接免疫荧光法检测 shRNA-PCR 对 PRRSV 的抑制	30
2.2 结果	31
2.2.1 一步 PCR 法扩增 shRNA 表达盒	31
2.2.2 Karber 法计算病毒滴度	31
2.2.3 pEGFP-ORF7 重组质粒的鉴定	32
2.2.4 shRNA-PCR 抑制 N-EGFP 融合蛋白的表达	32
2.2.5 shRNA179-PCR 在 N-EGFP 稳定表达细胞系上的效果	33
2.2.6 shRNA179-PCR 抑制了 PRRSV 特异性细胞病变的产生	33
2.2.7 shRNA179-PCR 减少 PRRSV 感染细胞中的 N 蛋白阳性细胞	34
2.3 讨论	35
第三章 基于载体表达的 shRNA 在 MARC-145 细胞上对 PRRSV 复制抑	

制的研究	38
3.1 材料与方法	38
3.1.1 质粒、细胞和病毒	38
3.1.2 试剂、抗体	38
3.1.3 主要仪器	39
3.1.4 引物探针设计	39
3.1.5 shRNA 表达载体的构建	40
3.1.6 shRNA 表达载体的纯化	40
3.1.7 shRNA 表达载体的转染	40
3.1.8 IFA 检测 shRNA 表达载体对 PRRSV 复制的抑制	40
3.1.9 Western-blot 检测 N 蛋白表达变化及抑制作用的剂量依赖性	40
3.1.10 荧光定量 PCR 检测抑制效果	41
3.1.11 毒价滴定检测抑制效果	44
3.2 结果	44
3.2.1 shRNA 表达盒的扩增和 shRNA 表达载体的构建	44
3.2.2 shRNA 表达载体抑制 PRRSV 引起的特异性细胞病变	45
3.2.3 shRNA 表达载体减少 PRRSV 阳性细胞	46
3.2.4 shRNA 表达载体在蛋白水平减少 N 蛋白表达	47
3.2.5 shRNA 表达载体在 RNA 水平减少 N 蛋白表达	47
3.2.6 shRNA 表达载体对病毒毒价的影响	51
3.3 讨论	51
第四章 PRRSV ORF2~4 特异 siRNA 的筛选及其抑制效果的研究	56
4.1 材料与方法	57
4.1.1 质粒、细胞和病毒	57
4.1.2 试剂	57
4.1.3 仪器	57
4.1.4 ORF2、ORF3、ORF4 的扩增及克隆载体的构建	57
4.1.5 Taqman 探针及引物的设计	58
4.1.6 siRNA 筛选及 shRNA 表达盒设计	58
4.1.7 shRNA 表达载体的构建	59
4.1.8 shRNA 表达载体的转染及病毒的感染	60
4.1.9 荧光定量 PCR 检测抑制效果	60
4.1.10 病毒毒价滴定检测抑制效果	60
4.2 结果	60
4.2.1 shRNA 的扩增及表达载体的构建	60
4.2.2 ORF2、ORF3、ORF4 的扩增及重组质粒的鉴定	61
4.2.3 shRNA 表达载体抑制 PRRSV 特异性细胞病变	62
4.2.4 荧光定量 PCR 检测 ORF2、ORF3 和 ORF4 mRNA 的表达变化	62
4.2.5 病毒毒价滴定结果	64
4.3 讨论	65
第五章 结论	68
参考文献	69
致 谢	85
作者简历	86

图表清单

图 1-1 PRRSV 基因组结构及亚基因组	4
图 1-2 PRRSV 的非结构蛋白剪切方案	6
图 1-3 PRRSV 及其它动脉炎病毒的 ORF2b 在基因组中的相应位置	10
图 1-4 siRNA 的特征及 RNAi 的作用机制	16
图 1-5 RNAi 的放大机制	18
图 1-6 miRNA 的作用途径	19
图 1-7 长 dsRNA 引起非特异性基因沉默的途径	20
图 2-1 shRNA 表达盒 PCR 扩增方案	27
图 2-2 shRNA 表达盒的扩增	31
图 2-3 ORF7 基因的扩增及 pEGFP-ORF7 重组质粒的酶切鉴定	32
图 2-4 shRNA-PCR 对 N-EGFP 融合蛋白的表达抑制	33
图 2-5 shRNA179-PCR 在 N-EGFP 稳定表达细胞系上对 N 蛋白表达的抑制	33
图 2-6 shRNA179-PCR 在 MARC-145 细胞上对 PRRSV 引起的细胞病变的抑制作用	34
图 2-7 IFA 检测 shRNA179-PCR 对 PRRSV 的抑制作用	34
图 2-8 Pol III 启动子结构	35
图 2-9 siRNA 表达盒设计方案	36
图 3-1 shRNA 表达盒的扩增	44
图 3-2 T-shRNA 表达载体的 EcoO109I 酶切鉴定	44
图 3-3 pEN-shRNA 表达载体的 EcoO109I 酶切鉴定	45
图 3-4 N 蛋白特异 shRNA 表达载体在 MARC-145 细胞中抑制 PRRSV 引起的细胞病变	45
图 3-5 IFA 法检测 shRNA 表达载体在 MARC-145 细胞中对 PRRSV 复制的抑制作用	46
图 3-6 Western-blot 检测 shRNA 表达载体对 PRRSV N 蛋白的表达抑制	47
图 3-7 ORF7 基因的标准曲线	48
图 3-8 GFP 基因的标准曲线	48
图 3-9 β-actin 基因的标准曲线	48
图 3-10 mRNA 水平检测 shRNA 表达载体的抑制效果	50
图 3-11 mRNA 水平检测 pEN179-shRNA 抑制作用的剂量依赖性(0.005MOI)	50
图 3-12 mRNA 水平检测 pEN179-shRNA 抑制作用的剂量依赖性(0.01MOI)	50
图 3-13 mRNA 水平检测 pEN179-shRNA 抑制作用的剂量依赖性(0.1MOI)	50
图 3-14 shRNA 表达载体对 MARC-145 细胞上 PRRSV 毒价的影响	51
图 4-1 shRNA 表达盒的扩增	61
图 4-2 ORF2、ORF3、ORF4 的扩增	61
图 4-3 pEGFP-ORF2、pEGFP-ORF3、pEGFP-ORF4 重组质粒的 BamHI 和 HindIII 双酶切鉴定	61
图 4-4 shRNA 表达载体在 MARC-145 细胞中抑制 PRRSV 引起的细胞病变	62
图 4-5 mRNA 水平检测 ORF2 特异 shRNA 表达载体的抑制作用	63
图 4-6 mRNA 水平检测 ORF3 特异 shRNA 表达载体的抑制作用	63
图 4-7 mRNA 水平检测 ORF4 特异 shRNA 表达载体的抑制作用	64
图 4-8 pEN179-shRNA 表达载体对 ORF2-4 mRNA 的抑制	64
图 4-9 shRNA 表达载体对 MARC-145 细胞上 PRRSV 毒价的影响	65
表 1-1 培养组织中 RNAi 介导的哺乳动物病毒复制抑制	21
表 1-2 病毒感染动物模型体内 RNAi 的应用	22
表 2-1 shRNA 表达盒的扩增引物	28

表 2-2 各稀释度细胞病变孔数	31
表 3-1 引物和探针的序列	39
表 3-2 反转录反应混和液	42
表 3-3 引物及探针的稀释	43
表 3-4 25 μ l 体系双标记 TaqMan 探针法 PCR 反应混和液	43
表 3-5 不同 shRNA 表达载体转染后 MARC-145 细胞后 ORF7 mRNA 的拷贝数	49
表 3-6 不同 shRNA 表达载体转染后 MARC-145 细胞后 GFP mRNA 拷贝数	49
表 3-7 shRNA 表达载体转染后 β -actin mRNA 拷贝数	49
表 4-1 扩增 ORF2、ORF3、ORF4 所用引物	58
表 4-2 ORF2、ORF3、ORF4 的 Taqman 探针和引物	58
表 4-3 ORF2、ORF3、ORF4 特异 siRNA 及相应表达盒的下游引物	59

英文缩略表

英文缩写	英文全称	中文名称
ADE	antibody-dependent enhancement	抗体依赖增强作用
CCID ₅₀ /ml	50% cell culture infectious dose	50%细胞培养物感染剂量
CPE	cytopathic effect	细胞病变
dsRNA	double-stranded RNA	双链 RNA
EAV	equine arteritis virus	马动脉炎病毒
EGFP	enhanced green fluorescent protein	增强型绿色荧光蛋白
FITC	fluorescein isothiocyanate	异硫氰酸荧光素
FQ-PCR	fluerenscence quantatitive PCR	荧光定量 PCR
GAPDH	glyseraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	甘油醛-3-磷酸脱氢酶
IFA	indirect immunofluorescent assay	间接免疫荧光分析
LDV	lactate dehydrogenase elevating virus	乳酸脱氢酶增高症病毒
MOI	multiplicity of infection	感染复数
NLS	nuclear localization signal	核定位信号
ORF	open reading frame	开放读码框
PAM	porcine alveolar macrophages	猪肺泡巨噬细胞
PRRS	porcine reproductive and espiratory syndrome	猪繁殖与呼吸综合征
PRRSV	porcine reproductive and respiratory syndrome virus	猪繁殖与呼吸综合征病毒
PTGS	post transcriptional gene silencing	转录后基因沉默
RdRP	RNA dependent RNA polymerase	RNA 依赖的 RNA 聚合酶
RISC	RNA induced silencing complex	RNA 诱导的沉默复合体
RNAi	RNA interference	RNA 干扰
RT-PCR	reverse transcriptase PCR;	反转录 PCR
SHFV	simian hemorrhagic fever virus	猴出血热病毒
shRNA	short hairpin RNA	短发夹 RNA
siRNA	small interfering RNA	小干扰 RNA
stRNA	small temporal RNA	小分子瞬时 RNA
TRS	transcriptional regulatory sequence	转录调节序列

第一章 绪论

猪繁殖与呼吸综合征 (porcine reproductive and respiratory syndrome, PRRS) 是猪的重要传染性疾病。该病有许多明显的临床症状, 以母猪流产和各年龄段猪呼吸困难最为典型。1992 年国际兽疫局 (OIE) 将该病列为 B 类传染病, 将该病病原体命名为猪繁殖与呼吸综合征病毒 (porcine reproductive and respiratory syndrome virus, PRRSV), 归为尼多病毒目、动脉炎病毒科、动脉炎病毒属成员, 该属还包括马动脉炎病毒 (equine arteritis virus, EAV)、猴出血热病毒 (simian hemorrhagic fever virus, SHFV) 和乳酸脱氢酶增高症病毒 (lactate dehydrogenase elevating virus, LDV) (Cavanagh, 1997)。

由于 PRRSV 具有抗原变异性、嗜巨噬细胞性、抗体依赖性增强作用 (Yoon *et al*, 1996) 等特征, 临幊上常引起免疫应答较差、持续感染性、混合感染 (许立华 等, 2004; 陈义祥 等, 2005)。而且该病的致病机理和免疫机理尚不清楚, 至今仍无确实有效的防制措施, 给养猪业造成了巨大经济损失。

RNA 干扰 (RNA interfering, RNAi) 是一种序列特异性的转录后基因沉默 (post transcriptional gene silencing, PTGS) 机制。在抗病毒感染领域, RNAi 技术可以防止病毒入侵、抑制病毒复制、减少病毒 RNA 数量、阻断病毒蛋白的表达, 在各种疾病的基因治疗研究中, 发挥出了巨大的潜力和独特的效果。随着 RNAi 机理的逐步阐明, RNAi 技术得以迅速发展, 各种载体和转移系统的开发, 为 RNAi 的深入研究和应用提供了前提。

下面就近些年在 PRRSV 分子生物学和 RNAi 技术进展等方面的一些研究作一简要概述。

1.1 PRRSV 研究进展

1.1.1 PRRS 和 PRRSV

1987 年美国发生了以母猪流产和各年龄段猪呼吸困难为主要症状的“猪神秘病” (mystery swine disease, MSD), 很快该病广泛流行于欧洲、美洲等养猪国家和地区。该病在临幊上还表现为耳部皮肤发绀, 故又称“蓝耳病”。1991 年, 荷兰的 Wensvoort 等从发生“猪神秘病”的猪体内分离到该病病原体, 称之为 Lelystad 病毒 (Wensvoort *et al*, 1991)。1992 年美国也分离到该病的病原体 (Collins *et al*, 1992), 称为猪不育与呼吸综合征病毒 (swine infertility and respiratory syndrome virus, SIRSV), 目前通称为 PRRSV。尽管所有 PRRSV 分离株在形态学和理化特性上相似, 但在抗原性和核酸序列上明显属于两个不同的亚群, 根据病毒最初的分离地称为欧洲型和北美洲型 (Meulenberg, 2000)。同动脉炎病毒其它成员一样, PRRSV 有明显的宿主特异性, 但据报道野鸭也可以感染并可能传播 PRRSV (Zimmerman *et al*, 1997)。

PRRSV 为球形, 有囊膜, 直径为 45~80nm, 核衣壳大约有 25~35nm。自然条件下, PRRSV

主要通过呼吸道感染，不同毒株致病性不同，不同年龄和品种的猪产生的症状也不同（Vincent *et al*, 2005）。PRRSV 的一个重要特征是可以在公猪睾丸细胞中复制（Sur *et al*, 1997），在精液中持续存在，通过生殖途径传播。郭宝清等从国内某疑似 PRRS 暴发的猪场流产胎儿中离到 4 株 PRRS 病毒（CH-1a、CH-1b、CH-1c、CH-1d）（郭宝清 等, 1996）。随后该病在我国各地均有报道。尽管赵耘等分离的 B (13) 株可能属于欧洲型（赵耘 等, 2001），但国内分离到的毒株多数属于北美洲型（仇华吉 等, 1998；姜平 等, 1999；仇华吉 等, 2000；杨汉春 等, 2001；方六荣 等, 2002；高显明 等, 2005）。

1.1.2 PRRSV 感染的细胞生物学

在细胞培养中，动脉炎病毒具有严格的宿主细胞嗜性。如 LDV 仅在鼠原代巨噬细胞培养物中生长；SHFV 和 PRRSV 对宿主单核巨噬细胞有嗜性，在体外，还可以在非洲绿猴肾细胞系（MA-104）及其衍生细胞系（CL2621 或 MARC-145）中复制。北美洲型 PRRSV 对猪肺泡巨噬细胞（porcine alveolar lung macrophages, PAM）比 CL2621 更敏感，但某些北美洲型 PRRSV 毒株只能在 CL2621 细胞上复制。欧洲型 PRRSV 通过多次传代才可以适应 CL2621 细胞。相比之下 EAV 具有较宽的宿主细胞谱，可以在宿主动物原代巨噬细胞和肾细胞以及幼仓鼠肾细胞（baby hamster kidney cells, BHK-21）、兔肾细胞（Rabbit kidney, RK-13）和非洲绿猴肾细胞（African green monkey kidney, VERO）等细胞上有效复制（Snijder *et al*, 1998）。

转染到非允许细胞系中的 PRRSV 基因组 RNA 可以复制（Meulenberg *et al*, 1998），表明细胞表面受体是决定病毒嗜性的因素之一。PRRSV 与细胞表面一个或多个受体结合，在细胞表面形成小囊泡，以微丝依赖的内吞机制侵入细胞，在低 pH 值条件下脱衣壳，基因组 RNA 进入胞浆。感染后 3~6 小时，在电镜下就可以观察到病毒粒子出现在网格蛋白覆盖的小囊泡中，核衣壳在向滑面内质网腔或（和）高尔基体区出芽时进行组装，出芽后聚集在囊泡中，移动到细胞质膜，和细胞质膜发生融合，然后通过胞吐作用释放（Kreutz *et al*, 1996）。产生含不同核衣壳结构和基因组长度病毒粒子，感染细胞后 6h（MARC-145 和 PAM）至 20h（CL2621）可检出病毒多肽，病毒滴度可达 $10^5\sim10^7$ TCID₅₀/ml，细胞病变特征为细胞变圆和脱落（Dea *et al*, 2000）。

目前在 PAM 上鉴定的受体有两种，一种是硫酸乙酰肝素（heparan sulfate, HS），在病毒吸附过程中发挥主要作用（Delputte *et al*, 2005）。Delputte 等（2002）用肝素亲和层析和 SDS-PAGE 证明 PRRSV 的 M-GP5 异二聚体与 PAM 上的硫酸乙酰肝素受体结合，虽然 N 蛋白二聚体也可以与之结合，但由于 N 蛋白位于病毒粒子内部，所以是 M-GP5 异二聚体参与 PRRSV 与 PAM 表面硫酸乙酰肝素受体的吸附（Delputte *et al*, 2002）；另一种是唾液酸粘附素（sialoadhesin, Sn），Sn 是存在 PAM 上的约 210kD 的蛋白，命名为 p210，主要介导 PRRSV 的内吞，p210 可特异性识别糖脂的寡糖末端唾液酸序列（NeuAca2-3Gal）（Vanderheijden *et al*, 2003），GP2、GP3、GP4 和 GP5 都是糖基化蛋白，都可能带有唾液酸序列。尽管抗 p210 的抗体可以完全阻断 PRRSV 的感染，但是转染编码 Sn 的 cDNA 到猫肾细胞（Crandall Rees feline kidney, CRFK），不能使 CRFK 感染 PRRSV。利用全长 cDNA，用 LDV 的相应区替换 EAV GP5 的胞外区，没有改变嵌合病毒的细胞嗜性，同样用其它动脉炎病毒的相应区替换 PRRSV M 蛋白的胞外区也没有改变病毒嗜性，表明 GP5-M 异二聚体在动脉炎病毒靶向和侵入中可能不是发挥主要作用，而是次要蛋白发挥此

功能,因为次要蛋白以异多聚体形式存在,可形成一定的病毒表面结构介导病毒与主要受体结合(Wissink *et al*, 2005)。PRRSV 与唾液酸黏附素结合后,网格蛋白介导病毒粒子进入内吞体。内吞体内 PH 值下降对 PRRSV 的复制是必要的(Kreutz *et al*, 1996)。在其它病毒如副黏病毒和甲病毒中已经证实偏酸的 pH 值可以引起融合蛋白构象变化导致病毒和内吞体膜的融合使得核衣壳释放到细胞浆中。如果动脉炎病毒的次要蛋白复合体确实与融合过程有关,其独特的性质和组成将提出一个与一型融合蛋白(副粘病毒的 F 蛋白、HIV 和 SIV 的 gp160、反转录病毒的 Env 蛋白、埃博拉病毒的 Gp 蛋白、流感的血凝素蛋白等含 3~4 个七肽重复序列的融合肽和跨膜域,以同源三聚体形式参与细胞融合)和二型融合蛋白(甲病毒融合蛋白、黄病毒融合蛋白等具有内化融合序列,与其它的膜蛋白以异源二聚体形式)不同的融合机制(Wissink *et al*, 2005)。

Kim 等用单克隆抗体在 MARC-145 细胞表面鉴定一种波形蛋白(中间丝蛋白的一种),可以结合 PRRSV 的 N 蛋白,抗波形蛋白抗体可以阻断 PRRSV 感染。细胞中的波形蛋白需要经过多种翻译后修饰,其中主要是磷酸化,而且各种细胞中的波形蛋白磷酸化程度不同,试验表明 PRRSV 允许细胞系 MARC-145 和非允许细胞系 Vero 细胞的波形蛋白电泳迁移谱相似,因此波形蛋白的磷酸化可能与细胞嗜性有关。猴波形蛋白还可以使 BHK-21 和 CRFK 细胞对 PRRSV 易感,证明波形蛋白是 PRRSV 受体复合体的一部分,通过与中间丝其它成份形成复合体在病毒复制和转运中发挥作用(Kim *et al*, 2006)。

动脉炎病毒复制的典型特征是对称膜及双膜囊泡的形成,这些膜结构与病毒的组装无关,是否参与 RNA 合成还不清楚。在 EAV 中,包含推定 RNA 聚合酶和解旋酶的复制酶复合体是膜相关的,位于核周区,生化和免疫荧光分析表明有些复制酶亚单位锚定在细胞内膜上(Snijder *et al*, 1998)。

1.1.3 PRRSV 的复制、转录和翻译

PRRSV 基因组为单股正链不分节段 RNA,长约 15kb,基因组 3' 末端有 Poly (A) 尾序列,5' 末端有帽状引导序列。5' 端帽状结构在感染性分子克隆体外感染性 cDNA 是必要的(Meulenbergh *et al*, 1998)。基因组含有 9 个相互重叠的开放读码框(open reading frame, ORF),从 5' 端到 3' 端依次是: ORF1a、ORF1b、ORF2a、ORF2b 和 ORF3-7, ORF1a 和 ORF1b 编码病毒的 RNA 复制酶和聚合酶,占基因组全长的 80% 左右; ORF2a、ORF2b、ORF3、ORF4、ORF5、ORF6 和 ORF7 分别编码 GP2a、E、GP3、GP4、GP5、基质蛋白 M 和核衣壳蛋白 N(Dea *et al*, 2000; Wu *et al*, 2001; Wu *et al*, 2005) (图 1-1)。

正链 RNA 病毒基因组具有储存和表达遗传信息的双重功能。PRRSV 的复制周期起始于进入细胞的病毒基因组复制酶基因的表达,ORF1a 和 ORF1b 编码病毒的 RNA 复制酶和聚合酶由基因组 RNA 表达,在 ORF1a 翻译终止前核糖体发生移码,然后翻译 ORF1b, ORF1a 和 ORF1b 重叠区有两个促进核糖体移码的推定信号,称为“slippery”序列,紧接下游的是 RNA 拟节结构,在移码序列和 ORF1a 终止密码子之间还有一个密码子,基因组复制所需要的 RNA 序列还不清楚,在紧靠 Poly (A) 尾序列上游有一个短的、在动脉炎病毒中保守序列基序(Snijder *et al*, 1998)。

PRRSV 的基因表达模式与其亲源较近的冠状病毒类似。病毒复制酶复合体将基因组 RNA 复制为负链中间体，作为产生子代基因组 RNA 的模板，同时还产生一系列负链亚基因组 RNA (sgRNAs) (图 1-1)，作为产生编码 ORF2-7 结构蛋白正链 sgRNAs 的模板 (Meulenberg *et al*, 1997)。这也是 *Nidovirales* (*Nido-*, 嵌套) 名称的来历。sgRNAs 通过不连续转录机制产生，这一过程受靠近每个 ORF 起始端和引导链 3' 端的核心转录调控序列 (transcriptional regulatory sequence, TRS) 所调控 (Snijder *et al*, 1998)。sgRNAs 的 5' 端都有一个从病毒基因组的 5' 衍生出来的长度约 200 个核苷酸的帽状引导序列。各转录本的大小分别是 mRNA1 (即病毒基因组) 15kb、mRNA2 3.3kb、mRNA3 2.7kb、mRNA4 2.2kb、mRNA5 1.7kb、mRNA6 1.1kb 和 mRNA7 0.7kb。Meng 等报道有些毒株在表达 7 个亚基因组 mRNA 之外，还有一个额外的 mRNA，它来自于 ORF3 与 ORF4 之间的 ORF，称为 mRNA3.1 (Meng *et al*, 1996)。只有 sgRNAs 的 5' 端的 ORF 被翻译成蛋白。Northern 印迹杂交证实了 PRRSV 的 RNA2~7 与 ORF2~7 的相关性。转录调节序列 (transcriptional regulatory sequence, TRS) 位于引导序列与 5' 端 ORF 的起始密码子之间，长度 9~83 个核苷酸不等，该序列在各动脉炎病毒中是特异的，在 EAV 中为 UCAACU，PRRSV 中为 UUAACC，动脉炎病毒中的 TRS 与普通基因启动子的功能类似，是控制结构蛋白表达的关键控制元件。此外，尽管北美洲型和欧洲型的 TRS 很保守，但已发现差异序列，TRS 与下游 ORF 之间的距离差异很大 (Conzelmann *et al*, 1993)。

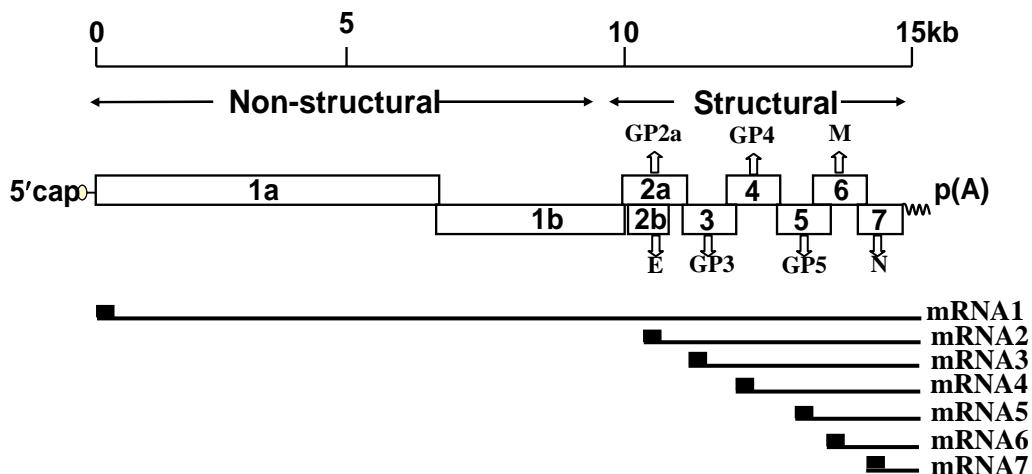


图 1-1 PRRSV 基因组结构及亚基因组

Fig. 1-1 Genome organization of PRRSV and 3' nested set of subgenomic mRNAs of PRRSV

Meulenberg, 2000

1.1.4 PRRSV 的复制酶蛋白

PRRSV 的 ORF1a 和 ORF1b 编码的病毒的复制酶蛋白，翻译产物为多聚蛋白。根据 EAV 多聚蛋白水解过程的资料，推测 PRRSV 的 ORF1 编码的多聚蛋白可水解为 13 个非结构蛋白，即 Nsp1 α ，Nsp1 β 及 Nsp2-12 (图 1-2)，这些蛋白产物仅在病毒感染的细胞中存在，病毒粒子中不存在，因此称为非结构蛋白 (nonstructural proteins, Nsp)。ORF1a 中的 Nsp1 α 和 Nsp1 β 包含两

个类木瓜蛋白酶的半胱氨酸蛋白酶区，可从 1a 和 1ab 多聚蛋白上自动切割下来，Nsp2（半胱氨酸蛋白酶）和 Nsp4（丝氨酸蛋白酶）发挥剪切功能，Nsp9 和 Nsp10 具有复制酶功能，Nsp9 中含有依赖 RNA 的 RNA 聚合酶（RNA dependent RNA polymerase, RdRp）基序，Nsp10 中含三磷酸核苷结合/RNA 融合酶基序和金属结合域（Van *et al*, 2006）。

欧、美型毒株的序列比较显示，ORF1 序列同源率约为 60%，其中 ORF1a 是 PRRSV 的 9 个 ORF 中变异最大的一个。美洲型毒株间的 ORF1 差异虽然比较小，但 ORF1a 的变异也相对较大。VR2332 与 RespPRRS/Repro 疫苗株同 16244B 相比，ORF1a 中推测的非保守氨基酸的改变主要集中在 Nsp1 β 和 Nsp2，但都不在特定的催化或切割位点处，进一步比较发现，Nsp1 β 中的 331 位氨基酸，Nsp2 中的 668 位及 952 位氨基酸很可能和该病毒的毒力相关，RespPRRS/Repro 疫苗株在这三个位置处的氨基酸分别为 Phe、Phe 和 Lys，16244B 这三个位置处的氨基酸则分别为 Ser、Ser 及 Glu (Allende *et al*, 2000)。Henriette 等从丹麦暴发 PRRS 的猪场分离到若干有或怀疑有致病性的毒株，PCR 及单克隆抗体鉴定表明它们由 IngelvacPRRS 疫苗株突变而来，经序列比较发现 331 位 Phe 到 Ser 的回复突变，但没发现 668 位和 952 位氨基酸的突变。Nsp1 β 中 331 位的氨基酸距离其催化位点仅 8 个氨基酸，此突变很可能会影响到切割位点的催化效率，从而影响病毒的复制。北美洲型 Nsp2 比欧洲型的长 102 个氨基酸，氨基酸序列同源性仅 32%，Nsp2 的 N 端较保守，含有推测催化残基 Cys^{1a437} 和 His^{1a506}，中间及 C 端有三个高区。SP 疫苗株(来源于 VR2332)同 VR2332 16244B 相比，其 Nsp2 靠近 C 末端的高变区有 36 个氨基酸的插入，此外还有 158 个氨基酸的置换。Han 等通过使用 VR-2332 的感染性分子克隆 pVR-FLV7 的 Nsp2 进行缺失，发现 333nt 缺失株的生长动力学和亲本毒基本相同，进一步的缺失以及在缺失部位插入绿色荧光蛋白 (GFP) 基因都会严重影响复制，而且插入的 GFP 不稳定 (Han *et al*, 2005)。Kwon 等通过感染性分子克隆构建 PRRSV 强弱毒嵌合毒，发现 Nsp3~8 在决定病毒毒性中发挥重要作用，而 Nsp1~3、Nsp10~12 仅发挥较小的作用，Nsp2 与毒性无关 (Kwon *et al*, 2005)。CH-1a 株 ORF1 全长 11882nt，其中 ORF1a 长 7512nt、ORF1b 长 4374nt。它们与 VR2332 株的核苷酸同源性分别为 89% 和 92%；与 LV 株的核苷酸同源性分别为 54% 和 63.3%。ORF1 编码两个聚合蛋白，其中 ORF1a 编码的聚合蛋白经裂解后产生 6 个成熟的非结构蛋白 (Nsp1 α 、Nsp1 β 、Nsp2-5)，以 Nsp2 的变异性最为显著，它与 LV 株的氨基酸同源性为 41%。ORF1b 编码的聚合蛋白经裂解后，产生 4 个成熟的非结构蛋白 (RdRp、CP2-4)，其中 RdRp 为病毒的复制酶，CP4 表现出较大的变异性，与 LV 株的氨基酸同源性为 48%。在 ORF1a-ORF1b 的衔接区有保守的庚核苷酸滑动序列和拟节结构，它们是核糖体移码翻译所必需的结构。在基因组末端存在非编码区，其中 5' NCR 长 190nt，比 LV 5' NCR 短 31nt，其核苷酸同源性为 61%。3' NCR 长 151nt，比 LV 株 3' NCR 长 37nt，保守性稍高，其与 VR2332 株和 LV 株的核苷酸同源性分别为 95.4% 和 78.2%。在 3' NCR 末端有一个 poly (A) 尾巴，长 20nt。在 Poly (A) 尾上游有保守的八核苷酸序列，是复制酶识别并结合的区域 (刘光清 等, 2002)。

ORF1b 不含翻译起始密码子，所以产生 1a/1b 融合蛋白。ORF1a 和 ORF1b 重叠 16 个核苷酸，在重叠区有一庚核苷酸结构 (UUUAAAC) 和一个可能形成 RNA 拟节 (pseudoknot) 的序列，这两种结构均是 RNA 聚合酶翻译过程中核糖体移码所必需的，据此推测 ORF1b 的表达涉及核糖体移码 (Meulenbergh, 2000)。

Kim 等根据 EAV 中 Nsp 蛋白的切割位点，表达 PRRSV 各 Nsp-EGFP 融合蛋白，通过共聚焦

显微镜观察发现 Nsp2、3、9、12 位于细胞核周区，Nsp1 位于细胞核，这与 EAV 中报道的一致，有趣的是，Nsp3、4、7、10、11 的 EGFP 融合蛋白聚集在细胞核（Kim *et al*, 2005）。

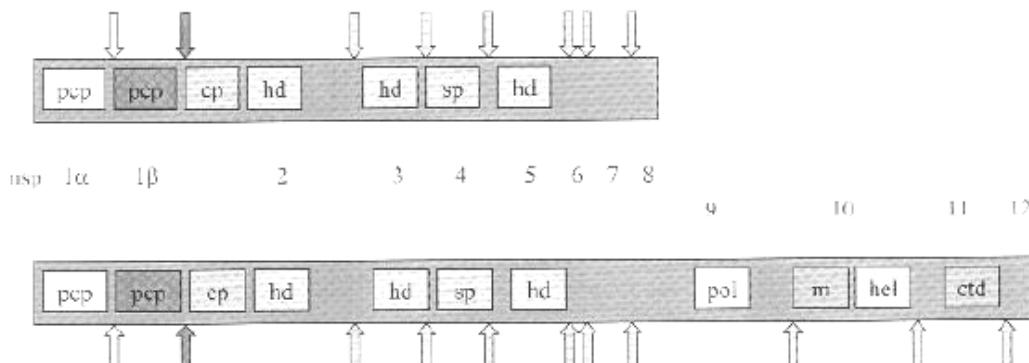


图 1-2 PRRSV 的非结构蛋白剪切方案

Fig. 1-2 Putative processing scheme of the polyprotein encoded by ORF1a/ORF1ab.

箭头代表推定的剪切位点，pcp，木瓜蛋白酶样半胱氨酸蛋白酶（papainlike cysteine proteases）；cp，半胱氨酸蛋白酶（cysteine protease）；sp，丝氨酸蛋白酶（serine protease domains）；hd，疏水域（hydrophobic domains）；pol，RNA 依赖的 RNA 聚合酶（RNA-dependent RNA polymerase motif）；hel，核苷三磷酸结合基序/RNA 聚合酶基序（nucleoside triphosphate-binding/RNA helicase motif）；m，金属结合域（metal binding domain,） ctd，保守的 3' 末端域（conserved 3'terminal domain）

Meulenberg, 2000

1.1.5 PRRSV 的主要结构蛋白

核衣壳蛋白（N）由 ORF7 编码，约 15kDa，等电点 10.4，在病毒蛋白中含量最高，占整个病毒粒子蛋白含量的 20~40%，以同源二聚体（28kDa）形式存在病毒粒子中（Wootton *et al*, 2003），丝氨酸磷酸化，可能参与调节 N 蛋白的 RNA 结合活性（Wootton *et al*, 2002）。在感染细胞中，主要分布在感染细胞的核周区。N 蛋白具有多功能性和高免疫原性：作为结构蛋白，通过与病毒 RNA 相互作用形成核衣壳；Rowland 等在细胞核和核仁中发现有 N 蛋白（Rowland *et al*, 1999），第 41~47 位氨基酸是核定位信号序列（nuclear localization signal, NLS）（Rowland *et al*, 2003），细胞核内的 N 蛋白可以与核仁纤维蛋白（与细胞小核仁 RNA 相关）相互作用参与核糖体的生物合成（Yoo *et al*, 2003），调节宿主细胞功能（Yoo, 2005）。Lee 等通过感染性分子克隆突变 N 蛋白的 NLS，发现病毒仍然可以感染，但滴度比野毒低 100 倍，NLS 突变株接种猪表现病毒血症持续期缩短、病毒滴度下降，但中和抗体和 ELISA 抗体比野毒高，扁桃体分离毒的突变集中在 NLS 区，表明 NLS 对于病毒体外复制是非必需的，但在 PRRSV 体内病理学上发挥重要作用（Lee *et al*, 2006）。Rowland 等研究了 N 蛋白的核输出机制，加入 LMB（核输出穿梭蛋白抑制因子），CRM1（RNA 聚合酶 I 抑制物）和 antinonycinD（RNA 聚合酶 II 抑制物）可以阻断核输出。N 蛋白 C 末端第 90~123 位氨基酸可以作为 EIAV ERev 蛋白核输出信号的替代物，当与 EGFP 偶联时被滞留在细胞质中，但是替换 XLX 样基序中的两个疏水残基不能阻断核输出，表明 PRRSV N 蛋

白的 C 末端区有一个 CRM1 依赖的核输出机制,但是其核输出序列与 HIV Rev 及其它病毒蛋白的核输出信号序列不同。此外,高浓度的 antinonycin D 可以抑制核输出,表明 N 蛋白的核输出依赖于新的细胞核 rRNA 的合成 (Rowland *et al*, 2003)。

当 N 蛋白在细胞质中被翻译后,以非共价键形式相互作用,当被转运至内质网和高尔基体时,这里的氧化环境促进病毒粒子的成熟,N 蛋白之间的非共价键相互作用转变为二硫键连接同源二聚体,然后被组装进病毒衣壳。北美洲型 PRRSV 的 N 蛋白含有 3 个半胱氨酸(分别位于 23、75 和 90),其中第 23 位半胱氨酸参与同源二聚体的形成 (Wootton *et al*, 2003)。N 蛋白的半胱氨酸在动脉炎病毒中并不保守,LDV 和欧洲型 PRRSV 中仅含 2 个, EAV 和 SHFV 的 N 蛋白中不存在半胱氨酸,突变北美洲型 PRRSV P129 分离株的感染性分子克隆中 N 蛋白的第 23 位半胱氨酸,形成的病毒粒子失去感染性 (Lee *et al*, 2005)。

N 蛋白的高免疫原性表现为:通过 PRRSV 病毒免疫小鼠制备的单克隆抗体多数是针对 N 蛋白的,而且 PRRSV 感染后首先产生针对 N 蛋白的抗体,证明 N 蛋白是主要的免疫原性蛋白,其主要抗原表位集中于 N 蛋白的中央部分 N 蛋白 C 端对于维持整个蛋白的构象发挥关键作用 (Wootton *et al*, 1998)。

N 蛋白基因非常保守,北美毒株间 N 蛋白推导氨基酸序列的同源率在 96%~100% 之间,而欧洲型毒株间同源率在 94%~99% 之间,但将美洲型毒株与欧洲原型毒株 LV 比较时 ORF7 的核酸序列与推导氨基酸同源率分别为 63% 和 59%,此差异是由大量核苷酸的置换、插入和缺失造成的,美洲型毒株的 N 蛋白的推导氨基酸比 LV 毒株少 5 个,而且欧洲型毒株 N 蛋白的 N 端和 C 端有两个氨基酸延伸区 (STAPM 和 SQGAS),美洲型毒株缺少这样的序列 (Dea *et al*, 2000)。

M 蛋白由 ORF6 编码,分子量大约是 18~19KD。美洲型和欧洲型的 PRRSV 都有一个 N-糖基化位点,但该位点不与寡聚糖相结合,因为无论是体外翻译的还是天然的蛋白用内切糖基化酶消化,其分子量都不减少。M 蛋白是 PRRSV 中最保守的蛋白,结构同冠状病毒 M 蛋白相似,通过 N 末端的跨膜区跨膜 3 次,形成 Nexo-Cendo 构象,仅有 16 个氨基酸暴露在病毒表面,可能与病毒的聚集和结合有关。其中一个跨膜片段可能是信号序列,M 蛋白的功能还不清楚,可能与冠状病毒 M 蛋白功能类似,在维持病毒形态、病毒组装和出芽中发挥作用。M 蛋白在内质网中聚集,与 25kD 的主要糖蛋白 GP5 形成异源二聚体(分子量分别约 40 和 87kDa) (Snijder *et al*, 2003),在感染细胞中,检测到了二硫键结合的 M 蛋白同源二聚体,不组装进病毒粒子,但破坏分子间二硫键,病毒的感染率降低。欧、美型毒株间 M 蛋白的推导氨基酸序列最为保守,同源率在 78%~81% 之间。而同型毒株 M 蛋白推导氨基酸的同源率大于 96%。但用针对 M 蛋白的特异性单克隆抗体仍可以鉴定出各型毒株间的抗原变异。此外,美洲型毒株 ORF6 第 16 位的 Asp 突变为 Asn 可能与疫苗株的毒力致弱有关 (Allende *et al*, 2000)。

GP5 由 ORF5 编码,分子量为 24.5~26KD。尽管北美洲株和 LV 株间 ORF5 基因的差异明显,但它们编码蛋白的疏水性十分相似。2 个推定的跨膜区位于 65~170 和 170~190 氨基酸残基之间。GP5 含有一个可被剪切的信号序列,剪切后的蛋白含有一个推定的 30 个氨基酸组成的短胞外区 (De *et al*, 1995),欧洲型和北美洲型分离株在该区分别含 2 和 3 个 N 糖基化位点。Quebec 参考株 IAF-Klop 的 3 个潜在的糖基化位点在 31~33、44~46、51~53 氨基酸处;美国 ATCC-2332 株与 IAF-Klop 相似,LV 的 GP5 的后两个糖基化位点是保守的。已证实 3 潜在的糖基化位点均被寡聚糖残基所占 (Ansari *et al*, 2006),LV 的 GP5 含有 N-乙酰半乳糖苷,与 EAV ORF5 编码的 GL 蛋

白不同 (Meulenber *et al*, 1995) , 内部疏水区跨膜 3 次, 紧接一个 70 个氨基酸组成的内部域。GP5 抗体具有中和活性, 能中和病毒感染, 这与 LDV、EAV 相同, 含有至少有两种类型的中和表位。单克隆抗体与病毒糖基化的和非糖基化的膜蛋白都发生反应, 这表明糖基化与中和表位无必然联系。ORF5 的基因和杆状病毒表达的 GP5 蛋白免疫鼠和猪都能产生抗 GP5 的特异性中和抗体, 但用大肠杆菌表达的重组 GP5 蛋白不产生抗 GP5 特异性中和抗体或不明显, 这表明 ORF5 蛋白内在构象是很重要的, 具体情况仍不清楚。根据 ORF5 蛋白缺失突变以及与该蛋白 3 个亲水区合成肽的免疫反应, ORF5 蛋白至少有 2 个抗原性重要的区域, 一个位于胞外域 (27~41aa), 另一个是 C-末端 (180~197aa), C-末端在维持蛋白基本构象上起着重要作用。Ansari 等 (2006) 对 GP5 的 3 个糖基化位点 (N34、N44、N51) 进行突变, 发现 N44 对病毒的感染性是必要的, N34、N51、N34/N51 突变体的滴度比野毒的滴度低, 在 MARC-145 细胞上的病变减轻, 对中和抗体敏感性增强, 同时突变病毒产生的中和抗体滴度明显升高, 表明去掉 GP5 胞外区糖基化位点增强了病毒对中和抗体的敏感性, 同时也提高了附近中和表位的免疫原性 (Ansari *et al*, 2006) 。

另据报道, 欧洲型 PRRSV 的 GP5 能诱导细胞凋亡, 但不能被 Bcl-2 阻止。迄今为止, PRRSV ORF5 蛋白在体内诱导的细胞凋亡具体情况仍不清楚。GP5 和 M 蛋白分别通过第 50 位和第 8 位半胱氨酸残基形成二硫键, 突变其中任何一个都完全阻断病毒粒子的形成 (Verheij *et al*, 2002) 。表明 GP5 和 M 蛋白之间的共价作用对于组装是必要的, GP5 和 M 蛋白是病毒粒子形成所必需的 (Wissink *et al*, 2005)。在 EAV 中 GP5 和 M 蛋白对于病毒粒子的形成也是必要的 (Wieringa *et al*, 2004) , 同样通过突变半胱氨酸残基证明二硫键在 GP5 和 M 蛋白二聚体形成中是必要的 (Snijder *et al*, 2003) 。

同型毒株 GP5 推导氨基酸的同源率在 88%~99% 之间。而欧、美型毒株 GP5 推导氨基酸的同源率在 52%~55% 之间, 此差异已相当于它们与 LDV 的差异。序列比较显示, 美洲型毒株 13 位的 Arg 突变为 Asn 及 151 位的 Arg 突变为 Gly 可能与疫苗株毒力致弱有关。13 位的突变属保守突变, 位于 GP5 推测的信号肽序列中, 而 151 位的氨基酸位于糖蛋白的疏水区 (Allende *et al*, 2000)。Hernandez 等对 16 株墨西哥 PRRSV 分离株的 ORF5 进行序列分析, 证明墨西哥 PRRSV 分离株存在高度遗传和生物学变异 (Hernández *et al*, 2005) 。

1.1.6 PRRSV 的次要结构蛋白

GP2 (29~30kDa) 和 GP4 (31~35kDa) 组成病毒粒子次要囊膜蛋白, 都是典型的 I 型膜蛋白, 含 5' 信号序列, C 末端跨膜区和一个胞外区, 在组装进病毒粒子时胞外区进行复杂型 N 糖基化。Yoo 等认为 GP4 在信号转导和介导脂质双层漂移中发挥作用 (Yoo, 2005) 。

GP3 在动脉炎病毒糖蛋白中占有特殊的位置, 它的膜拓扑结构还处于推测中 (Hedges *et al*, 1999; Wieringa *et al*, 2002) , 它在病毒粒子中的结构特征还有争议。在 LDV 中, GP3 证明是非结构可溶性糖蛋白, 可以从感染细胞中分泌出去 (Faaberg *et al*, 1997) ; 在 EAV 中, GP3 被清楚证明组装进病毒粒子 (Wieringa *et al*, 2002) 。对于 PRRSV, GP3 (45~50kDa) 是否存在病毒粒子中在欧洲型和北美洲型分离株有不同报道。van Nieuwstadt 等在纯化的 LV 分离株 PRRSV 病毒粒子中检测到 GP3 (Van *et al*, 1996) , 但加拿大的 IAF-klop 分离株中未检测到 (Gonin *et al*, 1998; Mardassi *et al*, 1998) , 在感染 IAF-klop 的细胞裂解液中检测到了 GP3, GP3 的核心 N 联寡糖没

有被处理为复杂 N 糖基，滞留在内质网中，在培养上清中检测到少量的可溶性 GP3 (sGP3)，与 GP3 不同的是，sGP3 通过二硫键形成二聚体，其 N 联寡糖获得高尔基体特异性修饰。Wissink 等 (2005) 证明用甲病毒载体表达的 LV 分离株的 GP3 很大一部分独立分泌，GP3 的这种两面性与其它病毒的糖蛋白如 α 疱疹病毒的糖蛋白 G (gG) 和 BVDV 的糖蛋白 E^{rns} 相似。在 α 疱疹病毒的病毒囊膜中发现有糖蛋白 G，有些经蛋白酶水解后分泌，最近报道表明这种分泌型的 gG 有趋化因子结合活性，在体外可以抑制这些趋化因子的活性。BVDV 的 E^{rns} 蛋白除了是病毒粒子组成蛋白外，也可以从感染细胞中分泌到细胞外环境，这种分泌形式最近证明可以阻断 dsRNA 介导的干扰素信号 (Wissink *et al*, 2005)。PRRSV 的分泌型 GP3 是否也有相似的生理关联性还不清楚。

在 EAV 中 GP2、GP3、GP4 通过共价键形成异源三聚体，这些糖蛋白的组装以及 E 蛋白组装进 EAV 病毒粒子是相互作用的。在 PRRSV 中，次要结构蛋白 GP2a、GP3、GP4 和 E 相互作用，以异源多聚体的形式组装进 PRRSV 颗粒，它们对形成感染性病毒颗粒是必要的，不表达 GP2a、E、GP3 或 GP4 蛋白的基因敲除载体仍然能够组装成病毒粒子，但不具感染性 (Wissink *et al*, 2005)。用缺失 ORF2a 或者 ORF2b 的体外转录本和表达 GP2a 或 E 蛋白的质粒分别共转染 BHK-21 细胞，24h 后用 MAb122.17 检测到了 N 蛋白的表达。用单独转染转录本的 BHK-21 细胞的上清接种 PAM 后，没有检测到病毒阳性细胞；用质粒和转录本共转染的 BHK-21 细胞的上清接种 PAM 后，检测有阳性细胞，表明基因敲除突变产生的非感染性病毒是由相应基因缺失引起的，第二代接种后，没有发现病毒复制，更加确定了只有在辅助质粒存在下，才能形成病毒颗粒。这与 Welch 等的数据一致，表明缺失 ORF2、ORF4 的 PRRSV 能够在提供相应缺失蛋白的细胞系中得到拯救 (Welch *et al*, 2004)。

E 蛋白是 sgRNA2 的产物，大小约 10kDa，是新鉴定的小的非糖基化疏水性囊膜蛋白，存在于所有动脉炎病毒粒子中 (Snijder *et al*, 1999)。有一个潜在的 N 末端 N 豆蔻酰化位点和一个酪氨酸激酶 II 磷酸化酶位点、一个中心疏水域和一个富含碱性残基的亲水 C 末端，EAV 的 E 蛋白由 ORF2a 编码，其翻译起始密码子位于 ORF2b 上游 72 碱基处，突变 E 蛋白的翻译起始密码子，导致 EAV 感染性分子克隆感染性丧失。PRRSV 的 E 蛋白由 ORF2b 编码，其翻译起始密码子位于 ORF2a 下游 6 碱基处，Wu 等证明 PRRSV 的 E 蛋白存在于病毒粒子中 (Wu *et al*, 2005) (图 1-3)。Lee 等通过突变 E 蛋白的翻译起始密码子证明 E 蛋白对于病毒复制是必要的，将突变的病毒基因组转染细胞，在培养上清中可以检测到含基因组的病毒粒子，表明 E 蛋白对于病毒组装是非必需的，电镜观察表明突变病毒与野毒病毒粒子的组装相似，链特异性 RT-PCR 表明突变后的非感染性病毒粒子可以进入细胞但不能进行复制，表明脱衣壳过程被阻断了，E 蛋白在细胞中不形成半胱氨酸连接的多聚体，但通过非共价相互作用形成寡聚物，研究表明 E 蛋白可能在病毒囊膜上形成孔隙，使病毒粒子易于脱衣壳然后释放到细胞质中 (Lee *et al*, 2005)

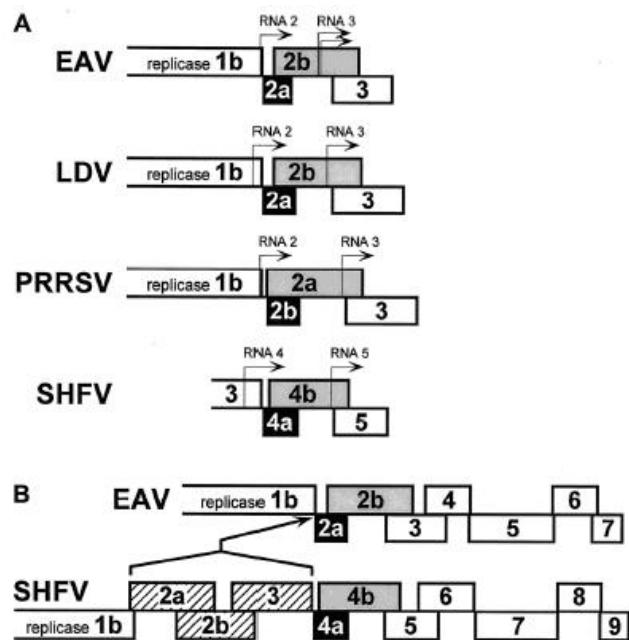


图 1-3 PRRSV 的 ORF2b 及其在其它动脉炎病毒基因组中的相应位置

Fig. 1-3 ORF2b of PRRSV and its correspondent position in other arteriviruses

Snijder *et al.* 1999

北美洲型毒株之间 GP2a 蛋白的推导氨基酸序列的同源性为 91%~99%、GP3 为 86%~98%，GP4 为 92%~99%。GP3 是 PRRSV 各毒株间保守性最差的蛋白之一，在欧、北美洲型毒株间推导氨基酸的同源率为 54%~60%，而且多数变异发生在 N 末端，以信号肽区为主。但考虑到成熟的蛋白中，信号肽被切除，因此同源性会较前面推倒的稍高些，尽管如此，GP3 N 端潜在的糖基化位点及疏水性是保守的。同 LV 相比，北美洲型毒株的 GP3 中 C 端的推导氨基酸有 12 个残基的缺失。ORF3 和 ORF4 的重叠区有一疏水的高变区，即这个高变区存在于 GP4 的 N 端。据报道，LV 的这个高变区含有一个推测的中和位点，其中由 9 个氨基酸构成的基元（59~67）构成了此中和位点的核心，此处的突变可造成 GP4 蛋白的抗原性发生改变（Meulenbergh *et al.*, 1997）。此外，美洲型毒株 ORF2a 第 1 位的 Leu 突变为 Phe 与 ORF3 第 83 位的 Gly 突变为 Glu 可能与疫苗株的毒力致弱有关。

1.1.7 PRRSV 的免疫抑制和持续性感染

最初人们将在患病猪分离到的细菌或病毒单独或联合使用都不能复制出该病，而且从发生 PRRS 的患病猪中也不能持续地分离到一种特定病原，这是因为 PRRSV 主要侵害猪体内的巨噬细胞系统，特别是肺泡巨噬细胞，使感染猪的免疫力降低，引发细菌感染是 PRRSV 感染的一大特征。

一般说来，在 PRRS 爆发过后，发病猪群可获得一定的保护力，新生仔猪也可通过母乳获得母源性抗体。但是，在康复猪体内仍然有病毒血症的存在，其持续时间长短不一，主要随感染猪

群的年龄和感染剂量而不同。有研究表明, PRRS 病毒血症在猪群中的存在可以持续 6~7 周, 甚至可长达 16 个月 (Bilodeau *et al*, 1994)。康复猪群的抗体水平也参差不齐, 在一些应激因素的影响下, 有的猪仍具有一定的排毒能力, 即使是新生仔猪, 其被动免疫期也是十分有限的, 在 4 周龄时抗体水平开始下降, 8 周龄左右降至最低点, 此时的仔猪就会变成易感猪。另外, 据报道在爆发 PRRS 后不久, 母猪的主动免疫力也在逐渐丧失, 6 个月后其体内的抗体水平已经相当低下, 此时极易爆发该病。因为其体内仍有病毒血症存在, 不仅有向外界排毒的可能, 而且在怀孕后, 有可能再次感染胎儿并产下病毒血症的仔猪, 从而感染其它健康猪, 导致 PRRS 的循环传播, 这是 PRRSV 持续性感染的重要原因之一。

体液免疫虽然能提供一定的保护力, 但是其作用是有限的, 而且抗体水平在体内有一个消长的过程, 当抗体的水平降至较低水平时, 可导致病毒在体内的持续性存在, 造成病毒血症。PRRSV 持续感染可能还与病毒的抗体依赖性有关, 其原因是 PRRSV 与抗体形成免疫复合物后, 借助细胞表面的 Fc 受体而与肺泡巨噬细胞结合, 从而促进病毒进入细胞。有实验证明, 在用 PRRSV 接种 PAM 的同时, 加入特异抗血清, 可使培养的病毒滴度增加 10~100 倍。在体内, 病毒与阳性血清一起注射到怀孕中期的胎儿, 这时的病毒复制较单独注射病毒时明显增强 (Yoon *et al*, 1996)。

由于 PRRSV 主要侵害猪的免疫细胞, 如肺泡巨噬细胞, 单核巨噬细胞, 上皮细胞等, 使得猪的细胞免疫应答水平较低, 这也是造成 PRRSV 持续性感染的原因之一。猪群爆发 PRRS 一段时间后, 其临床症状虽然消失, 但是猪群仍呈现亚临床感染。Bilodeau 等实验表明, 在 PRRS 临床症状消失后 4 个月, 向该猪舍引入 SPF 猪, 可导致 SPF 猪感染 (Bilodeau *et al*, 1994)。

1.1.8 细胞凋亡与 PRRSV 致病的关系

有关 PRRSV 感染和凋亡的研究已有很多报道, 但在 PRRSV 是直接还是间接诱导感染细胞凋亡的证据和观点上还存在矛盾, 但无论是在培养的组织细胞中还是动物体内凋亡是引起病变的因素, 这一点是肯定的。Suarez 等首次报道病毒载体表达 PRRSV 的 GP5 能引起细胞凋亡, 而且证明 PRRSV 可以引起培养细胞和猪巨噬细胞的凋亡, 但是 GP5 诱导的凋亡在稳定表达 Bcl-2 蛋白的细胞中不被抑制 (Suarez *et al*, 1996), 作者据此推测 PRRSV 诱导的特异性凋亡发生在凋亡级联反应中 Bcl-2 的下游或者通过一种未知途径诱导凋亡。Fernandez 等通过瞬时表达带有萤光素酶或 CAT 报告基因的 GP5 基因, 证明引起细胞凋亡的是 GP5 氨基酸位于 N 末端 119 个氨基酸 (Fernandez *et al*, 2002)。Gagnon 等通过腺病毒表达系统表达 GP5, 在转染的细胞培养物中检测到 caspase3 活性上升, 此外还检测到 DNA 片段 (Gagnon *et al*, 2003)。总之, 这些试验证明病毒载体表达的 GP5 在单层细胞中可以诱导凋亡, 但机制还没有阐明。

PRRSV 感染猪体中凋亡细胞广泛分布于各感染组织 (包括肺、睾丸和淋巴结), Sur 等发现急性感染公猪睾丸中精细胞明显减少, 通过 DNA 片段原位末端标记技术 (TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling, 原位 TUNEL) 测定表明精细胞通过凋亡发生死亡 (Sur *et al*, 1997), 1998 年他们为了验证 PRRSV 诱导的凋亡是否为病毒感染的直接结果, PRRSV 感染青年猪, 通过免疫组化、TUNEL、DNA 凝胶电泳、电镜观察发现肺和淋巴结中凋亡广泛存在, 但多数凋亡的细胞并未感染 PRRSV (Sur *et al*, 1998)。Sirinarumitr 等在超微结构形态学和原位 TUNEL 的基础上证明凋亡的存在, 双标记试验结果表明主要凋亡细胞并未感染 PRRSV (Sirinarumitr *et al*, 1998)。

Labarque 等利用双标记方法发现感染猪肺灌洗液中收集的凋亡细胞多数并未感染 PRRSV (Labarque *et al*, 2003)。Choi 等用双标记法和原位 TUNEL 测定证明主要标记细胞或感染 PRRSV 或发生凋亡, 但感染和凋亡细胞不同时存在, 同样在 TNF- α 和原位 TUNEL 分析的双标记试验中, 证明细胞或者凋亡或者 TNF- α 阳性, 但不能同时存在, 因此推测 PRRSV 感染后巨噬细胞释放的 TNF- α 可能诱导邻近未感染细胞的凋亡 (Choi *et al*, 2001)。Oleksiewicz 和 Nielsen 证明 PRRSV 可以使体外培养的猪肺泡巨噬细胞 48h 后减少 40%, 通过流式检测到细胞大小缩小, DNA 含量减少, 但由于坏死同样可以导致细胞大小和 DNA 含量的变化, 因此这种方法不能区分坏死和凋亡 (Oleksiewicz *et al*, 1999)。Feng 等用 TUNEL 法证明 PRRSV 感染猪的 T 细胞凋亡数目增加两倍, 没有检测凋亡细胞中病毒复制 (Feng *et al*, 2002)。

除体内感染外, 体外感染细胞的凋亡也有报道 (Sirinarumitr *et al*, 1998; Kim *et al*, 2002), Kim 等认为 PRRSV 感染的 MARC-145 细胞以非典型形式发生凋亡, 感染后 3d, 细胞发生脱落, 凋亡, 证据是核浓缩、核小体间 DNA 断裂, 在这些细胞中 PRRSV 抗原和具缺口的 DNA 末端协同定位是 PRRSV 直接引起凋亡的有力证据, 但是该研究没有排除坏死细胞, 但也可能是通过 AIF 依赖途径发生非特异性凋亡。Sirinarumitr 等通过电镜、TUNEL 和双标记法证明, PRRSV 感染 CRL11171 (一种猴肾细胞系) 导致细胞凋亡。与 Kim 的报道不同, 该研究证明凋亡的细胞主要是未感染的邻近细胞, 所使用技术仅适用于贴壁细胞, 不适用于悬浮细胞, 可能是两者结论不同的原因所在。

Miller 和 Fox 用微阵列和半定量 PCR 对 26 个凋亡相关基因进行分析, 表明 PRRSV 感染 24h 后在感染细胞中未检测到凋亡。而且随着感染剂量提高, 细胞坏死比凋亡程度要高。报道表明, I 型干扰素和凋亡产生途径是一致的, IFN- α/β 可能是凋亡的介导者或者潜在介导者。诱导 I 型 IFN 和凋亡途径的两个关键酶是 PKR 和 2'、5' -寡腺核苷合成酶, 在 PRRSV 感染的 MARC-145 细胞中这两种酶的转录水平没有变化。表明在感染的 MARC-145 细胞出现在凋亡级联反应早期阶段 dsRNA 被抑制了, 先天免疫被阻断了。PRRSV 感染间接引起凋亡停止。感染 MARC-145 中基因表达变化最大的是 ATF-3 和 Hsp70, 感染后 24h 分别增长 13.8 和 11.7 倍。ATF-3 (抑制 P53 转录) 和 Hsp70 (可干扰 Apaf-1 和细胞色素 c 的二聚化, 这种二聚体是 AIF 凋亡途径的拮抗物) 的激活因素是抑制凋亡的潜在因素。ATF-3 和 Hsp70 表达上调完全阻断内源凋亡的发生, 从而使得先天免疫受到抑制, 使得 PRRSV 能够在 MARC-145 细胞中复制, 这可以解释 PRRSV 感染猪免疫应答滞后的原因 (Miller *et al*, 2004)。

1.1.9 准种、异常 RNA 与 PRRSV 致病的关系

PRRSV 是以准种 (或病毒亚群) 的形式存在, 在选择压力改变时, 即会将优势变异株选择出来 (Rowland *et al*, 1999)。Schommer 使用感染性分子克隆分析 PRRSV 体外进化, 表明在不引起基因组其它部位碱基变化的条件下, 制备一个点突变病毒株是非常困难的 (Schommer *et al*, 2005)。“准种”是小 RNA 病毒的存在特性 (Domingo *et al*, 1998; Domingo *et al*, 2005)。这是 RNA 病毒为逃避宿主免疫、产生新临床表型的一种适应性进化 (Domingo 等, 1997)。这在人免疫缺陷病毒 (human immunodeficiency virus, HIV) (Essajee *et al*, 2000; Paolucci *et al*, 2001; Nowak *et al*, 2002)、丙型肝炎病毒 (hepatitis C virus, HCV) (Farci *et al*, 2000; Pawlotsky, 2003) 中均

有证明。这种特性可能是使用传统疫苗途径控制 PRRSV 失败的原因之一。通过分析猪场中不同猪个体和同一猪个体中分离 PRRSV 序列, 证明自然感染的猪场及个体内可以同时存在多种 PRRSV 变异株, 核苷酸和氨基酸水平都有变异发生, 在所有动物体内都有多种核苷酸和氨基酸变异的 PRRSV 变异株, 在结构区已知表位和其它位置变异和替换(有义和无义替换)无差异。猪场之间, 猪场内、个体内分子变异率分别是 92.94、3.84 和 3.22%, PRRSV 在自然感染中以基因型相关的准种形式存在, 免疫逃避的阳性自然选择不支持这种多样性。这种现象的发生可能是病毒在动物体内发生突变, 或者动物感染了其它毒株。

很多文献报道 PRRSV 的亚基因组 mRNA 具有异质性 (Meulenber *et al*, 1993; Morozov *et al*, 1995; Meng *et al*, 1996; Faaberg *et al*, 1998; Snijder *et al*, 1998; Nelsen *et al*, 1999; Goldberg *et al*, 2000; Lin *et al*, 2002), 即除 6 个亚基因组 mRNA 外, PRRSV 中还存在额外的 mRNA 种类或使用不同的引导-主体连接区的转录 mRNA。Yuan 等用蚀斑纯化的 PRRSV 感染动物, 发现异质 RNA 依然存在 (Yuan *et al*, 2000)。异质 RNA 可以组装进病毒粒子, 数量可达 17 种, 多数由 PRRSV 的 5' 末端或 3' 末端形成, 带有 2~7 个碱基的共有序列 (Yuan *et al*, 2004)。异质 RNA 和基因组 RNA 共同包装进病毒粒子, 也可分别包装。蔗糖密度梯度离心可产生 3 条密度带 (1.18、1.20 和 1.22g/cm³), 电镜观察表明 1.18g/cm³ 密度所在带以空衣壳和不完整病毒粒子形式存在, 将 1.20 和 1.22g/cm³ 密度所在带病毒接种 MARC-145 发现均可以产生 CPE, 尽管发现 1.22g/cm³ 所在密度带病毒含有不完整基因组 RNA。异质 RNA 可以与 PRRSV 正常 mRNA 不同的方式翻译, 所表达蛋白在调解病变效果中发挥作用 (Huang *et al*, 1999)。病毒 RNA 的壳体化由包装信号指导, 是组装子代病毒粒子的关键步骤, PRRSV 的包装信号位于 ORF1a 的前 283 个碱基。包装的异质 RNA 可以作为同源重组的供体, 还可以促进脱衣壳时特定基因的表达, 或过量表达对病毒有利的某些部分 (Fu *et al*, 1994; Agranovsky, 1996)。尼多病毒转录和翻译的核心是亚基因组的合成, RNA 的合成是不连续转录机制 (Sawicki *et al*, 1995; Lai *et al*, 1997; Sawicki *et al*, 1998; Van *et al*, 1999; Yuan *et al*, 2000; Van *et al*, 2005), 复制酶驱动的模板转换模型认为, 不完整的 RNA:RdRp 复合体离开模板在另一个模板或同一模板的另外一个位置继续合成 (Lai, 1992; Nagy *et al*, 1997; Miller *et al*, 2000), 不连续转录至少导致两种重组: 同源重组和异源重组 (导致缺失、插入、重複序列出现)。在尼多病毒中这两种重组很难区分, 因为同源重组可以发生在相似毒株之间, PRRSV 中异质 RNA 持续产生, 可变序列的短相似区发生异常 RNA 重组。PRRSV 的异质 RNA 既可以存在感染细胞也可以存在病毒粒子中, 可能在病毒复制周期中发挥重要作用, 尤其是在持续感染中, 异质 RNA 产生的异常蛋白可能被感染的 B 细胞和 T 细胞的识别, 导致 PRRSV 感染中免疫应答无效。

但是, 在 Chang 等的研究中, 他们将 VR-2332 的同源病毒 CC-01 在 MARC-145 细胞上经过 3 轮蚀斑纯化, 接种 3 只猪, 分别隔离饲养 120d, 取组织匀浆物接种 2 周龄猪, 发现 3 只中有 1 只的组织匀浆物感染了 2 周龄猪, 序列分析表明 ORF5 的变异率最高, 其中第 151 位的甘氨酸在病毒体外复制过程中变成了精氨酸, 推测甘氨酸可能是病毒适应细胞培养物的一个标志。研究表明, 尽管存在变异, 但通过单克隆抗体和血清中和抗体分析未检测到表型变化, 说明没有免疫逃避突变发生, 因此病毒变异在 PRRSV 持续性感染中的作用受到质疑 (Chang *et al*, 2005)。

1.1.10 PRRSV 的防制策略

目前使用的防制方法主要有：（1）从不发病国家和地区引进猪及其产品；（2）进行血清学监测，对发病地区进行封锁或限制猪及其产品的任意流动；（3）对患病动物实行扑杀、销毁，以控制疫病蔓延；（4）使用疫苗。

疫苗在控制本病中发挥了重要作用。灭活苗和弱毒苗在一些国家已经推广应用，目前，在美国可用的弱毒苗有 Ingelvac®PRRS MLV 和 Ingelvac®PRRS ATP (Boehringer-Ingelheim Animal Health, Inc., St. Joseph Missouri) 等。多联苗也已上市包括 PRRSV+嗜血杆菌、PRRSV+嗜血杆菌+猪瘟、PRRSV+细小病毒+钩端螺旋体。上市的灭活苗有 Ingelvac®PRRS KV (Boehringer-Ingelheim Animal Health, Inc., St. Joseph Missouri)、PRRomis (Bayer Corporation) 等。还可以使用现地分离的 PRRSV 进行灭活，免疫病毒分离地猪群。此外，亚单位苗、重组苗、感染性分子克隆苗等基因工程苗正在研究之中。

疫苗接种在减轻疾病症状、缩短病毒血症和排毒时间、降低感染率等方面发挥了重要作用 (Christopher-hennings *et al*, 1997; Lager *et al*, 1997; Nielsen *et al*, 1997; Dee *et al*, 1998; Van *et al*, 1998a; Mengeling *et al*, 1999; Alexopoulos *et al*, 2005)。但弱毒苗存在排毒、散毒危险 (Mengeling *et al*, 2003; Kwon *et al*, 2005)，灭活苗的免疫保护稳定性还存在争议 (Nielsen *et al*, 1997; Nilubol *et al*, 2004)。新型的基因工程苗正在研制开发之中 (Yoo *et al*, 2004)，使用感染性分子克隆作为疫苗载体还需进一步研究 (薛强 等, 2003; Yoo *et al*, 2004)，正在尝试提高基因工程苗免疫保护能力的方法包括密码子优化 (Kheyar *et al*, 2005)、在中和表位和诱饵表位之间加入辅助 T 细胞表位 (Fang *et al*, 2006)、改进佐剂 (Charerntantanakul *et al*, 2006) 等，这些措施在一定程度上改善了基因工程苗的免疫效果，但探索新的抗 PRRSV 感染的方法对 PRRSV 的彻底控制有重要意义。

1.2 RNAi 研究进展

1.2.1 RNAi 概述

RNA 干扰 (RNA interference, RNAi) 是由双链 RNA (double-stranded RNA, dsRNA) 分子在 mRNA 水平关闭相应序列基因表达或使其沉默的过程，也被称为基因敲除 (knock-down) 或基因沉默 (gene silencing)，是普遍存在生物体的一种古老、保守而又极其重要的遗传行为 (Downward, 2004)。

1990 年，Jorgensen 等为了加深牵牛花的紫色，将一个紫色色素基因置于一个强启动子后，结果没看到期待中的深紫色花朵，反而出现了杂色，甚至是白色，Jorgensen 等把这种现象叫共抑制 (co-suppression) (Jorgensen, 1990)，即导入的基因和同源的内源基因同时被抑制了。Cogoni 等 (1994) 发现将合成类胡萝卜素所需的基因导入粗糙红色链孢霉菌，引起约 30% 的细胞自身基因失活，并将其称之为基因压制 (quelling) (Cogoni *et al*, 1994)。1995 年，康乃尔大学的 Guo 等把 *par-1* 基因的反义 RNA 注射进秀丽新小杆线虫性腺的合胞体细胞中后，在受注射的亲本及其

子一代的体细胞中，产生了 *par-1* 基因功能缺失型或基因敲除型的表型。意外发现仅注射 *par-1* 基因的正义 RNA 链后，*par-1* 基因表达也同样受抑制。该研究小组未能给出合理解释 (Guo *et al*, 1995)。1998 年 2 月，华盛顿卡耐基研究院的 Andrew Fire 和马萨诸塞大学癌症中心的 Craig Mello 证实，Guo 博士发现的正义 RNA 抑制基因表达的现象是由于体外转录的 RNA 中污染了微量 dsRNA 而引起，并发现 dsRNA (正义链和反义链的混合物) 具有比正义链或反义链都要强得多的基因沉默效应，当他们将体外转录得到的单链 RNA 纯化后注射线虫，基因抑制效应变得十分微弱，而经过纯化的 dsRNA 却正好相反，能够高效特异性阻断相应基因的表达。该小组将这一现象称为 RNA 干扰 (RNA interference, RNAi) (Fire *et al*, 1998)。

此后 dsRNA 介导的 RNAi 现象陆续发现于真菌、果蝇、拟南芥、锥虫、水螅、涡虫、斑马鱼等多种真核生物中，并逐渐证实植物中的转录后基因沉默 (post-transcriptional gene silencing, PTGS)、共抑制 (co-suppression) 及 RNA 介导的病毒抗性、真菌的基因压制 (quelling) 现象均属于 RNAi 在不同物种的表现形式。

Hamilton 等在 PTGS 植株中鉴定出一些在没有 PTGS 植株中并不存在的大约 25 个碱基大小的 RNA，这些 RNA 分别与沉默基因的正义和反义链互补。这成为揭示 RNAi 秘密的第一条关键线索 (Hamilton *et al*, 1999)。2000 年，Zamore 等使用体外培养的果蝇细胞进行研究发现，外源性 dsRNA 通过耗能过程降解成 21~23nt 的小干扰 RNA (small interfering RNA, siRNA) 引发 RNAi (Zamore *et al*, 2000)。2001 年，Bernstein 等人在果蝇中确定了降解 dsRNA 的关键酶，并命名为 Dicer，此酶属于 RNaseIII 家族，并在进化上保守 (Bernstein *et al*, 2001)。Wianny 等在小鼠胚胎中 (Wianny *et al*, 2000)，Svoboda 等 (Svoboda *et al*, 2000) 在小鼠的卵母细胞中分别证实 dsRNA 能引发 RNAi 效应。Elbashir 等证实 21nt 的 siRNA 可在避免激活 dsRNA 依赖的蛋白激酶 (dsRNA-dependent protein kinase, PKR) 和 2'、5' -寡聚腺苷酸合成酶 (2'、5' -oligoadenylate synthetase, 2'、5' -OAS) 信号转导途径的同时，有效抑制人胚肾 293 细胞、Hela 细胞等哺乳动物细胞中目的基因的表达 (Elbashir *et al*, 2001)。Brummelkamp 等首次使用小鼠 H1 启动子构建了小发卡 RNA (small hairpin RNA, shRNA) 表达载体 pSUPER，并证实转染该载体可有效、特异地抑制哺乳动物细胞内目的基因的表达 (Brummelkamp *et al*, 2002)，为利用 RNAi 技术进行基因治疗研究奠定了基础。至此 RNAi 技术作为基因沉默的有力工具，在医药开发、基因治疗和功能基因组研究等方面的应用得到飞速发展 (Dykxhoorn *et al*, 2003)。

1.2.2 RNAi 的分子机制

RNA 干扰包括起始阶段和效应阶段 (initiation and effector steps)。在起始阶段，加入的小分子 RNA 被切割为 21~23 核苷酸长的 siRNA。在 RNAi 效应阶段，siRNA 双链结合一个核酶复合物从而形成 RNA 诱导的沉默复合体 (RNA-induced silencing complex, RISC)。在 ATP 存在时，依赖于 ATP 的解旋酶解开 siRNA 的双链，通过碱基互补原则反义 siRNA 链识别靶 mRNA，然后由活化的 RISC，在互补区距离 siRNA 反义链 3'末端约 12 个碱基的位置切割 mRNA (Hutvagner *et al*, 2002) (图 1-4)。

第一步中 siRNA 产生的关键酶是 Dicer，属于 RNaseIII 家族中特异识别 dsRNA 的一员，它能以一种 ATP 依赖的方式逐步切割由外源导入或者由转基因、病毒感染等各种方式引入的 dsRNA

切割为 19~21bp 的 dsRNAs (siRNAs), Dicer 具有两个催化结构域、一个解旋酶 (helicase) 结构域和一个 PAZ (Piwi/Argonaute/Zwille) 结构域, 在催化过程中以二聚体的形式出现, 其催化结构域在 dsRNA 上反向平行, 形成四个活性位点, 只有两侧的两个位点有内切核酸酶活性, 这两个位点在相距约 22bp 的距离切断 dsRNA。siRNA 的 5' 端被磷酸化 (这是必要的), 3' 为羟基末端且有两个不配对的核苷酸, 此结构可能对 siRNA 进入蛋白复合体是必须的。不同的 siRNA 长度可能反应了物种之间 Dicer 同源蛋白的空间和结构的不同。在多种生物中都有 Dicer 的同源蛋白, 比如线虫中的 DCR-1、拟南芥的 CARPEL FACTORY (CAF/SIN-1) 等。

在效应阶段, siRNA 与一系列特异性蛋白结合首先形成无活性 RISC 前体, 分子量约 250kD, 加入 ATP 后形成 100kD 的活性 RISC 复合体。线虫中的 QDE-1、果蝇的 Ago-2、人的 eIF2C 等 Argonaute 蛋白家族成员均是相应的 RISC 组成成份, 该蛋白家族均含有 PAZ 和 PIWI 域。siRNA 两条链中的一条易于进入复合体中, 而另一条链则较难, 可能是 siRNA 链序列的热力学性质决定的 (Tijsterman *et al*, 2004; Hutvagner, 2005; Maniataki *et al*, 2005; Leuschner *et al*, 2006)。王晓东等证明与 siRNA 正链会被 Ago-2 切割, 这对于 RISC 的激活是非常重要的 (Rand *et al*, 2005)。

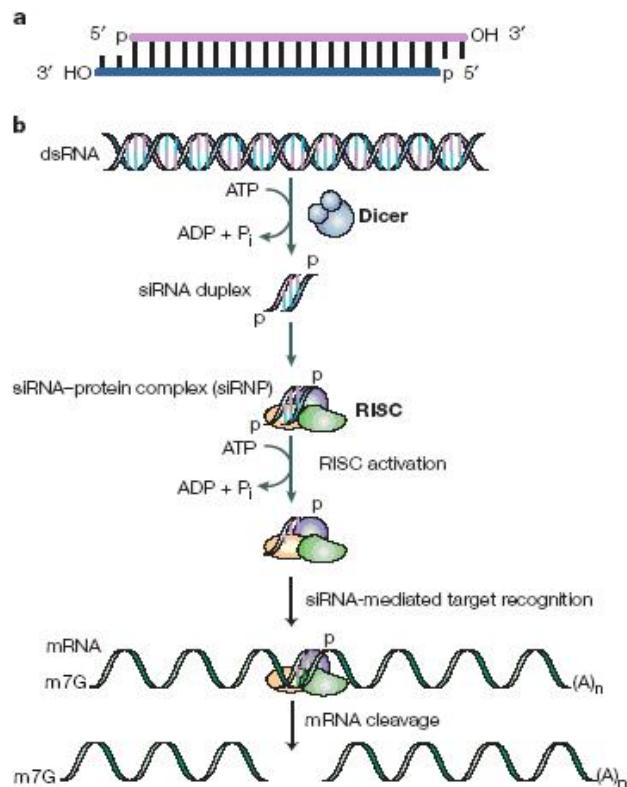


图 1-4 siRNA 的特征及 RNAi 的作用机制

Fig. 1-4 Molecular hallmarks of a siRNA and the pathway of siRNA

Dykxhoorn *et al*, 2003

在线虫中, 每个细胞含几个 dsRNA 分子就可产生整体的 RNAi 效应, 而且 RNAi 效应还可以传递到下一代。这说明 RNAi 可能有放大作用。

从 21~23 个核苷酸的 siRNA 到几百核苷酸的双链 RNA 都能诱发 RNAi, 长的双链 RNA 阻断基因的效果要明显强于短的双链 RNA 即 siRNA, 可能机制是长的 dsRNA 被 Dicer 酶裂解成 siRNAs

(初级 siRNA)，每个 siRNA 分子都具有结合同源 mRNA 的能力，故放大水平取决于 dsRNA 的长度，此步放大效应约 10~20 倍；研究显示 RNAi 过程中有新的 dsRNA 分子的合成，因此提出了一个随机降解的 PCR (random degradative PCR) 模型 (Lipardi *et al*, 2001)，即当 siRNA 反义链识别并结合靶 mRNA 后，siRNA 反义链可作为引物，以靶 mRNA 为模板在 RdRP 催化下合成新的 dsRNA，然后由 Dicer 切割产生新的 siRNA (次级 siRNA)，新 siRNA 再去识别 mRNA，又产生新的 siRNA，经过若干次合成切割循环，沉默信号就会不断放大 (图 1-5)。RdRP 存在的另一个证据是线虫、植物和果蝇胚胎提取物中 RNAi 的 transitive 现象：引入一段 siRNA，其切割作用可以远离靶 RNA 上的互补序列，基因沉默信号可以沿着基因移动 (Klahre *et al*, 2002; Mccaffrey *et al*, 2003; Vanitharani *et al*, 2003)。在线虫中还发现了 RNAi 的扩散 (spreading) 现象，即 RNAi 可以从一个组织扩散到全身，其中的关键蛋白为 SID-1 (Klahre *et al*, 2002; Winston *et al*, 2002)。目前，在人和果蝇成虫中均未能发现 RdRP 或其同源蛋白，以及 transitive 和 spreading 现象，故认为人和果蝇的 RNAi 并没有采取这种模式，其高效性可能是因为活性 RISC 可以重复催化多轮剪切反应 (Chi *et al*, 2003)。

在真菌和植物中发现 dsRNA 可以通过诱导基因组的甲基化产生基因沉默 (Volpe *et al*, 2002; Martienssen *et al*, 2004; Ronemus *et al*, 2005)。甲基化诱发染色体结构的变化，从而使目的基因不能正常转录而导致了基因的沉默 (Vaistij *et al*, 2002)，也可能是目的基因被甲基化后，甲基化向周围扩散导致转录的障碍，从而发生基因沉默 (Van *et al*, 2003)。Volpe 等发现整合入裂殖酵母着丝粒区的转基因表达总被抑制，他们称此现象为“着丝粒沉默” (centromeric silencing)，随后发现着丝粒沉默是由于此区域核小体组蛋白 H3 的 Lys29 甲基化后引起染色质凝集所致，并证明与 RNAi 相关的基因突变可使组蛋白 H3 甲基化消失，同时使着丝粒沉默现象消除 (Volpe *et al*, 2002)。由此可知，RNAi 机制可通过组蛋白甲基化改变染色质结构造成着丝粒区域基因沉默。与此同时 Bartel 等从裂殖酵母中分离出了一种与着丝粒区序列同源的小 RNA 分子，将其命名为异染色质 siRNA，并推测着丝粒沉默是由 siRNA 造成的序列同源区组蛋白甲基化所致，即在着丝粒区域，DNA 一条链连续表达，而另一条链间断表达，两条链的转录本互补形成 dsRNA，然后通过 RNAi 机制形成 siRNA，siRNA 引导甲基转移酶到序列同源的着丝粒区，使组蛋白甲基化，最终导致染色质结构改变，从而调节基因活性 (Bartel, 2004)。

在链孢霉中，*qde-1* 基因编码的 QDE-1 蛋白是 RdRP 的同源物，在网柱原虫中发现了 3 个 RdRP 的同源物，其中两个由 *rrpA* 和 *rrpB* 基因编码，但只有 *rrpA* 编码的酶参与 RNAi 过程。在线虫中 *ego-1* 基因编码 RdRP 的同源物。另外研究者还发现 *smg-2*、*smg-5*、*smg-6* 基因与 RNAi 效应的维持相关，*smg-2* 编码一种依赖于 ATP 的 RNA 解旋酶，可能参与 RNAi 过程中 siRNA 双链的解开。在拟南芥中，*sde-3* 基因编码一个与线虫 SMG-2 相似的 RNA 解旋酶，参与 PTGS 过程。

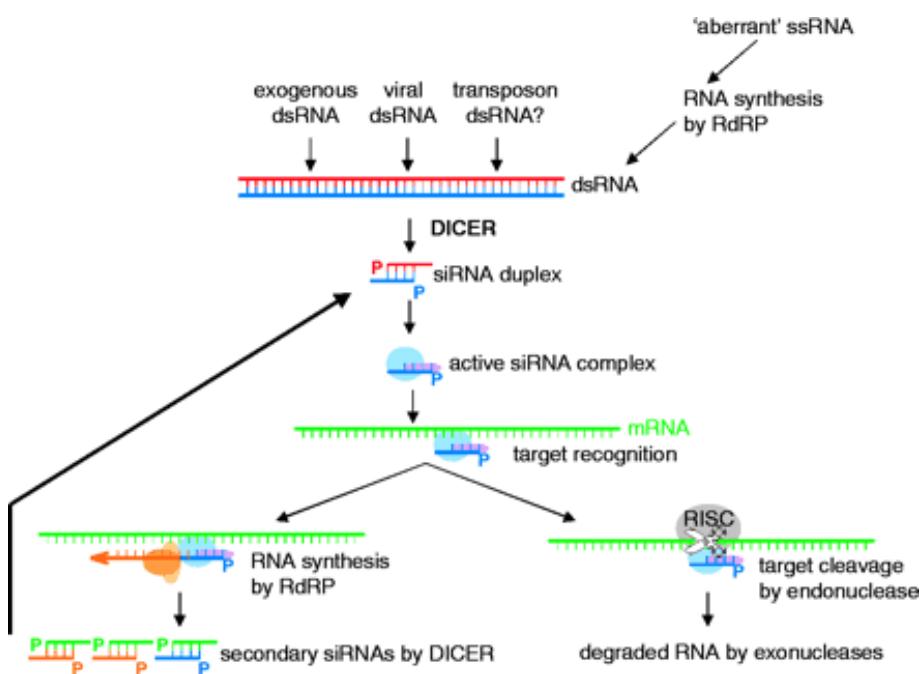


图 1-5 RNAi 的放大机制

Fig. 1-5 siRNA amplification in RNAi

Plasterks *et al*, 2002

Ketting 等发现单个 Dicer 基因 *dcr-1* 发生突变的线虫表现出的发育时序改变与 *let-7* 和 *lin-4* 突变体相似 (Ketting *et al*, 2001)。后来证明 *let-7* 和 *lin-4* 编码的小分子 RNA 在体内首先合成约 70nt 长的 RNA 前体, 然后在 Dicer 作用下生成约 22nt 的小分子 RNA, 称为小分子瞬时 RNA (small temporal RNA, stRNA), 这些 stRNA 在线虫的发育过程中参与对 mRNA 翻译的调节, 是特定基因的负调控因子, 但并不介导 mRNA 的降解, 而是结合于 mRNA 3' 端非翻译区, 阻止核糖体与 mRNA 有效结合, 从而抑制翻译的进行 (Ambros, 2004) (图 1-6)。stRNA 和 siRNA 关系密切, 除了都由 Dicer 加工成熟之外, RNAi 必需的 Argonaute (*alg-1*, *alg-2*) 家族的基因也是两种 RNA 行使生物功能所必需。研究者认为在 RNAi 过程中形成的 RISC 复合物既含有 siRNA 又含有 stRNA, 此复合物可根据不同情况产生不同效应, 它可利用 siRNA 与靶 mRNA 互补介导 mRNA 降解, 但若 siRNA 与靶序列不能严格配对 (如有单个碱基错配), 则 PTGS 即无法进行, 此时复合物又可转而利用 stRNA 抑制核糖体在 mRNA 上延伸从而在翻译水平阻断基因表达, 这类 stRNA 命名为 microRNA (miRNA), 其特点是由茎环样的单链前体剪切而来, 其中的关键蛋白也是 Dicer, 并且也形成蛋白复合体 miRNP, 现在公认的 miRNA 的功能也是 PTGS, 它们在生物体的发育, 生长分化, 凋亡等方面可能都起着关键的作用。它与 siRNA 的区别首先在于 miRNA 是内源性的, 其次在功能机制上, miRNA 与靶 RNA 不完全互补, 不能介导靶 RNA 的降解, 只能阻抑蛋白的翻译。人工的 siRNA 在体内也能产生类似 miRNA 的功能, 而内源的 miRNA 也能剪切完全互补的靶 RNA, 推测它们可能具有基本相同的途径 (Hutvagner *et al*, 2002; Lee *et al*, 2003; Lewis *et al*, 2003; Denli *et al*, 2004; Meister *et al*, 2004; Du *et al*, 2005; Giraldez *et al*, 2005; Lecellier *et al*, 2005)。

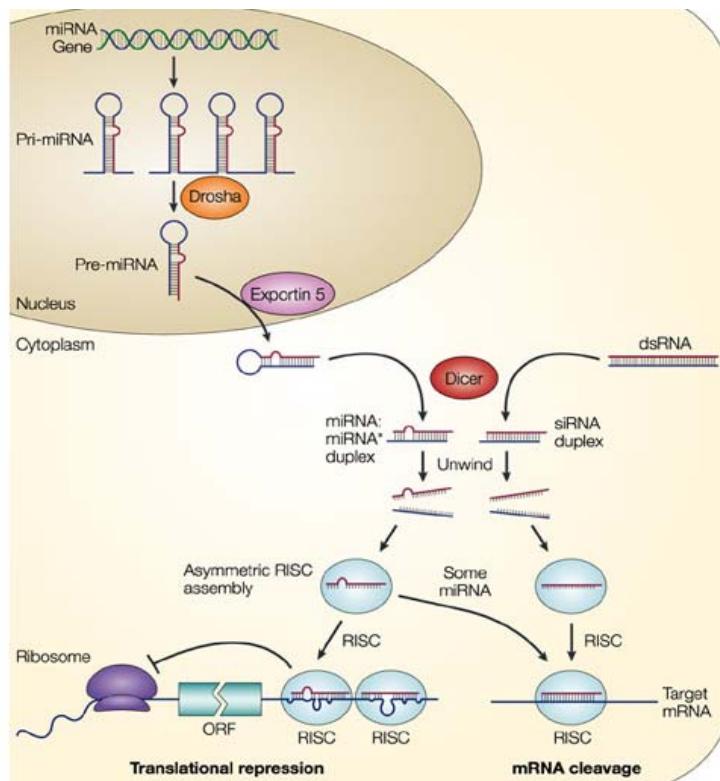


图 1-6 miRNA 的作用途径

Fig. 1-6 The pathway of micro (mi) RNA

He and Hannon, 2004

1.2.3 哺乳动物细胞中特殊的 RNAi 现象

将超过 30 个碱基对 dsRNA 转染几种特定脊椎动物细胞系统如小鼠的早期胚胎中, 斑马鱼和中华地鼠卵巢细胞中, 能够诱发细胞内的 RNAi 现象 (Billy *et al*, 2001; Yang *et al*, 2001), 而在大部分脊椎动物的成体细胞中不存在类似于 RNAi 的机制, 只能引起非特异的基因表达抑制。这种抑制可能是激活了细胞的病毒防御机制, 导致细胞内干扰素产生增多的缘故。而在未分化的胚胎细胞中, 这种防御病毒的机制存在缺陷。

这种非特异基因表达抑制通过以下两种途径产生 (Sledz *et al*, 2003) (图 1-7): 1) dsRNA 激活 PKR, 约 80nt 的 dsRNA 可以完全激活 PKR。激活的 PKR 使翻译起始因子 eIF-2a 磷酸化而失活, 导致翻译抑制, 进而所有蛋白质的合成受到抑制; 2) 长链 dsRNA 激活 2'、5'-寡腺苷酸聚合酶, 2'、5'-寡腺苷酸聚合酶活化细胞中处于潜伏状态的 RNaseL, 使之能够非特异切割 mRNA。以上两个结果最终导致细胞凋亡。

最近有些报道表明, siRNA 同样可以激活干扰素中的某些成分, 潜在影响基因表达 (Bridge *et al*, 2003; Sledz *et al*, 2003; Kim *et al*, 2004), 其它研究也在关注 RNAi 的非特异效果, 包含与 siRNA 部分同源序列的基因是否被沉默 (Persengiev *et al*, 2004)。

德国马克斯·普朗克生物物理化学研究所的 Tuschl 将 21nt 大小的 dsRNA 转染进细胞, 发现

有效降低靶 mRNA 和蛋白质水平的同时并没有激活细胞内的非特异性基因表达抑制途径，而且哺乳动物细胞内的 siRNA 的序列具有很高的特异性，与靶 mRNA 之间一个碱基错配都会显著削弱基因沉默的效果 (Elbashir *et al*, 2001)。

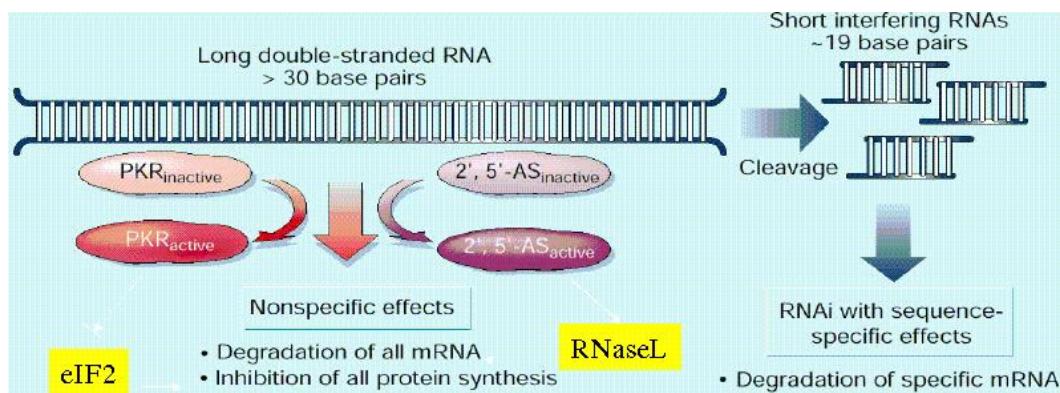


图 1-7 长 dsRNA 引起非特异性基因沉默的途径

Fig. 1-7 Non-specific gene silencing pathway induced by dsRNA longer than 30bp

Bass *et al*, 2001

1.2.4 RNAi 的应用

1) 功能基因组的研究

RNAi 技术具有高效、特异、低毒性、周期短、操作简单等特点，是传统的基因敲除技术和反义技术所无法比拟的，因此可以作为功能基因组研究的一种强有力的工具。根据基因组测序结果或 EST 文库构建的 dsRNA 文库可以用于大规模的基因组筛选 (Berns *et al*, 2004; Paddison *et al*, 2004)。根据 DNA 芯片原理，将微电子技术与 RNAi 技术结合，构建 RNAi 芯片，让细胞生长在多种 siRNA 片段组成的点阵芯片上，产生各种基因功能失活表型库，可得到相应的 mRNA-表型对应关系 (Silva *et al*, 2005)。联合应用 DNA 芯片技术还可能得到各个基因间相互影响的网络关系 (Janitz *et al*, 2006)。通过 cDNA 酶切并克隆到载体的方法人工构建随机 RNAi 文库 (random RNAi library)，可以构成抑制任何基因表达的干扰文库，克服已知基因 RNAi 文库细胞基因覆盖面窄的缺陷 (Luo *et al*, 2004; Sen *et al*, 2004; Shirane *et al*, 2004)，该文库为不同 siRNA 载体的混合物，易于保存，显著地减少了筛选的工作量。

2) 在其它基础研究领域

在信号传递途径中，根据 RNAi 产生的功能丧失表型，可以很容易的从某一信号传递途径被打断的所有表型中鉴定出被降解的 mRNA，从而鉴定出参与了信号传递通路的信号分子。还有可能通过打靶某一信号分子 mRNA 明辨其与其它信号分子在传递通路中的关系 (Berns *et al*, 2004; Naka *et al*, 2006)。在发育研究中，已经发现许多 miRNA 可能参与其中的基因调节，例如在线虫中，let-7 和 lin-4 对幼虫发育起着关键作用；而在拟南芥中，miRNA-172 参与花发育的调节 (Abbott *et al*, 2005; Li *et al*, 2005)。

3) 疾病治疗

RNAi 作为一种高效的序列特异性基因敲除技术在传染性疾病和恶性肿瘤基因治疗领域发展

极为迅速。将抑制序列选择在特定的位点，可对部分有明确基因突变的恶性肿瘤细胞如含有BCL/ABL或AML1/MTG8融合基因的白血病细胞产生凋亡诱导作用。此外通过使用肿瘤特异性启动子如hTERT启动子、survivin启动子或组织特异性启动子如酪氨酸酶启动子、骨钙素启动子引导针对某些癌基因或抗凋亡分子的siRNA或shRNA表达，从而达到特异性杀伤肿瘤细胞的目的。在治疗病毒性疾病的研究中，可以设计针对病毒基因组RNA的siRNA或针对宿主细胞病毒受体的siRNA来抗病毒。哈佛大学医学院的Lieberman教授与siRNA的发现者、1993年诺贝尔医学奖的得主、麻省理工学院肿瘤研究主席Philip A Sharp教授合作，首次把该技术应用于HIV病毒基因，抑制HIV感染，目前针对乙型肝炎病毒(HBV)、丙型肝炎病毒(HCV)、呼吸道合胞病毒(RSV)、流感病毒(influenza virus)、脊髓灰质炎病毒(poliovirus)、SARS等均取得了体外病毒抑制作用(表1-1)。

表1-1 培养组织中RNAi介导的哺乳动物病毒复制抑制

Table 1-1 RNAi-mediated suppression of mammalian virus replication in tissue culture

van Rij *et al*, 2006

Virus family	Genome*	Virus	si/shRNA	Refs
RNA viruses				
<i>Coronaviridae</i>	(+) ssRNA	SARS-associated CoV	siRNA	[68]
<i>Flaviviridae</i>	(+) ssRNA	Hepatitis C virus	siRNA; shRNA	[55, 56, 69]
<i>Picornaviridae</i>	(+) ssRNA	West Nile virus	shRNA	[70]
		Coxsackievirus B3	siRNA	[38]
		Foot-and-mouth disease virus	shRNA	[71]
		Hepatitis A virus	siRNA	[72]
		Human rhinovirus 16	siRNA	[73]
		Poliiovirus	siRNA	[51]
<i>Paramyxoviridae</i>	(-) ssRNA	Respiratory syncytial virus	siRNA	[35]
		Human parainfluenza virus-3	siRNA	[74]
<i>Rhabdoviridae</i>	(-) ssRNA	Vesicular stomatitis virus	siRNA	[74]
<i>Orthomyxoviridae</i>	Segmented; (-) ssRNA	Influenza A virus	siRNA; shRNA	[33, 70]
<i>Deltavirus</i>	Circular; (-) ssRNA	Hepatitis delta virus	siRNA	[34]
<i>Reoviridae</i>	Segmented; dsRNA	Rotavirus	siRNA	[75]
Reverse-transcribing RNA and DNA viruses				
<i>Retroviridae</i>	ssRNA	Human immune deficiency virus-1	siRNA; shRNA	[57]
<i>Hepadnaviridae</i>	Circular; partially dsDNA	Hepatitis B virus	siRNA; shRNA	[76]
DNA viruses				
<i>Herpesviridae</i>	dsDNA	Herpes simplex virus-1 (HHV1)	siRNA	[77]
		Human cytomegalovirus (HHV5)	siRNA	[78]
		Epstein Bar virus (HHV4)	shRNA	[79]
		Human herpes virus 6B	siRNA	[80]
		Murine herpesvirus 68	SiRNA	[81]
<i>Papovaviridae</i>	Circular; dsDNA	Human papiloma virus 18	SiRNA	[82]
		JC virus	SiRNA	[83]

* (+), positive stranded; (-) negative stranded; ss, single stranded; ds, double stranded.

RNAi的体内试验也取得重要进展，一般方法是动物感染病毒前，用siRNA预处理。但在流感病毒和RSV中感染后2~3d用siRNA处理也观察到了抗病毒效果(Ge *et al.*, 2004)。重组腺病毒表达HBV特异shRNA处理的HBV转基因鼠在处理后26d即检测不到病毒复制(Uprichard *et al.*, 2005)。尽管RNAi应用于临床还需若干年，这些研究为新型RNAi基础上的急慢性病毒感染治疗方案提供了基础。

表 1-2 病毒感染动物模型体内 RNAi 的应用

Table 1-2 Use of RNAi in in vivo animal models of virus infections

van Rij *et al*, 2006

Virus family	Virus	shRNA/siRNA formulation	Method of delivery	Main outcome	Refs
<i>Coronaviridae</i>	SARS-associated CoV*	siRNA in D-glucose/water carrier	Intratracheal administration	Reduced viral RNA and lung pathology	[84]
<i>Flaviviridae</i>	West Nile virus	siRNA	Hydrodynamic injection	Reduced viral load, partial protection from lethal infection	[85]
<i>Picornaviridae</i>	Foot-and-mouth disease virus	shRNA plasmid	Subcutaneous injection in neck	Protection from lethal infection	[71]
<i>Paramyxoviridae</i>	Respiratory syncytial virus	Naked siRNA or siRNA complexed with lipofection agent	Intranasal delivery	Reduced lung titers and pulmonary pathology	[41]
	Respiratory syncytial virus	shRNA plasmid complexed with chitosan nanoparticle	Intranasal delivery	Reduced lung titers and pulmonary pathology	[40]
	Parainfluenza virus	siRNA complexed to lipofection agent	Intranasal delivery	Reduced lung titers	[41]
<i>Orthomyxoviridae</i>	Influenza A virus	siRNA or shRNA plasmid complexed with cationic polymer polyethyleneimine	Intravenous injection	Reduced lung titers	[39]
	Influenza A virus	Naked siRNA and siRNA complexed to lipofection agent	Combination of hydrodynamic injection and intranasal delivery	Reduced lung titers and protection from lethal infection	[86]
<i>Hepadnaviridae</i>	Hepatitis B virus	shRNA plasmid	Hydrodynamic injection	Reduced virus replication and viral antigen	[46]
	Hepatitis B virus	siRNA	Hydrodynamic injection	Reduced virus replication and viral antigen	[47]
	Hepatitis B virus	shRNA expressed by recombinant Adenovirus	Intravenous injection	Reduced virus replication and viral antigen, clearance of viral RNA in ongoing infection	[42]
	Hepatitis B virus	Chemically modified siRNA in liposome	Intravenous injection	Reduced virus replication and viral antigen	[49]

*This study was performed in Rhesus macaques (*Macaca mulatta*) all other studies were performed in small rodent models.

1.2.5 RNAi 的局限性及应用前景

1) siRNA 的导入问题

siRNA 带负电，不能轻易通过细胞膜。如何将 siRNA 导入病毒复制部位是阻碍其临床应用的主要障碍。已有多种载体被用于体内转运 siRNA，包括质粒 (McCaffrey *et al*, 2003)、逆转录病毒 (Li *et al*, 2002; Chen *et al*, 2004; Li *et al*, 2005)、腺病毒 (Hosono *et al*, 2005; Li *et al*, 2005)、腺病毒相关病毒 (Boden *et al*, 2004; Pinkenburg *et al*, 2004)、慢病毒属 (Rubinson *et al*, 2003) 等。应用病毒载体转运 siRNA 易于到达靶器官，并且具有干扰效应长的优点，但是，使用这些载体存在安全性、毒性、免疫原性等问题 (Thomas *et al*, 2003)。

非病毒载体导入技术 (电穿孔、阳离子脂质体) 比病毒载体少一些安全性担忧，但转染效率较差。细胞转导肽 (Transduction peptide) 协助途径近来作为一种新的基因导入系统受到了研究人员的关注。如 HIV 的 TAT 蛋白、单纯疱疹病毒 (HSV) 的 VP22、果蝇转录因子 Antp、HBV 的前 S 抗原等的特定结构域 (一般 10~30 个氨基酸) 对其进入细胞发挥主要作用。将这一结构域与其它的蛋白、多肽、寡核苷酸等化合物结合或融合表达，可以使这些生物大分子以非受体依赖方式进入细胞 (Scherr *et al*, 2004)。

壳聚糖 (Chitosan) 是将来自于自然界中广泛存在的甲壳类动物中的甲壳质 (chitin) 进行脱乙酰化后得到的多糖类物质。壳聚糖/DNA 复合物可以形成纳米颗粒，在体内和体外将质粒 DNA 导入细胞内或体内组织，其最大特点是安全性好，通过鼻内途径将 siRNA 的天然壳聚糖复合物导入肺部 (Bitko *et al*, 2005; Zhang *et al*, 2005) 获得成功，但导入效率尚有待提高。

由于 HIV-1 具有 T 细胞、单核巨噬细胞嗜性，因此人们已经提出通过体外转导表达 HIV 特

异 siRNA 的慢病毒载体到造血干细胞, 制备 HIV-1 抗性细胞系的方案, 很并且快将进入临床试验 (Hannon *et al*, 2004)。宋尔卫博士报道了一种靶向特异细胞型的导入方法, 是将核酸结合蛋白 protamin 和抗体 Fab 片段偶联, 用 HIV-1 囊膜特异抗体的 Fab 片段将 HIV-1 特异的 siRNA 靶向初级 T 细胞, 抑制 HIV-1 的产生 (Song *et al*, 2005), 解决了把 RNA 干扰药物特异性导入体内细胞的难题。

对于组织嗜性很强的急性病毒感染采用局部导入就可以获得较好效果, 比如 RSV、流感、副粘病毒和其他呼吸道病毒。大体积注射法将 siRNA 导入肝脏已用于肝炎病毒治疗 (Giladi *et al*, 2003; Mccaffrey *et al*, 2003)。最近发现小体积肾静脉注射 Fas 特异 siRNA 在肾缺血再灌注损伤疾病模型中可以取得与大体积注射一样的治疗效果 (Hamar *et al*, 2004)。

在 siRNA 末端偶联上脂溶性物质可能会促进细胞对其摄取, 如在 siRNA 的 5'-端连接上胆固醇、石胆酸、十二烷酸或长链烷基后能增加肝细胞膜对 siRNA 的通透性, Soutschek 等发现经胆固醇修饰后的 siRNA 能抑制小鼠载脂蛋白 B 基因表达 apoB, 并降低血浆中 apoB 水平以及降低总胆固醇水平 (Soutschek *et al*, 2004)。聚乙烯亚胺 (Urban-klein *et al*, 2005)、端胶原 (atelocollagen) 与 siRNA 结合后也能增强其稳定性并促进 siRNA 在体内的运输 (Minakuchi *et al*, 2004)。不少研究也显示出类脂介导的 siRNA 转运技术也有较高的应用价值 (Ge *et al*, 2004; Sioud *et al*, 2004; Zhang *et al*, 2004)。Lorenz 等利用亚磷酸键在 siRNA5'-端共价结合上亲脂性的胆固醇、石胆酸、十二烷酸衍生物, 经修饰后的 siRNA 能抑制 LacZ 活性 (Lorenz *et al*, 2004)。Massaro 等发现肺泡表面活性物质能作为一种载体有效地将 siRNA 转运至小鼠的肺泡 (Massaro *et al*, 2004)。

2) 病毒逃避问题

RNA 病毒在不同基因型间变异很大, 通过突变、重组, 基因组片段间重组等, 有快速的准种进化, 此外, 病毒基因组 RNA 中多数高级结构部分和非翻译区对 PTGS 有抗性, 少数 siRNA 甚至有促进而不是沉默作用, 有些有非特异性作用从而引起错误的基因沉默。siRNA 可以引起相似序列的交叉反应。当用单一的病毒特异性 siRNA 处理细胞时出现了逃避性突变, 尤其是用高 MOI 感染病毒时 (Boden *et al*, 2003; Das *et al*, 2004)。慢病毒载体产生的 shRNA 引起了 IFN 反应, 但化学合成的 siRNA 没有。然而有些化学合成的 siRNA 确实引起 IFN 反应 (Sledz *et al*, 2003) 在 HSV-1 急性感染 keratinocytes 中 siRNA 通过 Toll 样受体 3 诱导 I 型 IFN 和序列依赖性 mRNA 降解。因此建议使用低剂量的 siRNA 或 siRNA 编码载体 (Bridge *et al*, 2003; Kariko *et al*, 2004)。

在植物和动物病毒中已经鉴定出了 PTGS 抑制蛋白, 尽管沉默的分子机制知道的还很少, 罗达病毒科的 FHV 编码的 B2 蛋白在转基因植物中表现出潜在的沉默抑制活性 (Li *et al*, 2002) 已证明 FHV 激发强的 RNA 病毒沉默, 同样的病毒用有效的沉默抑制子装备, 能够抑制 PTGS 介导的抗病毒防治, 这些沉默抑制子证明是 dsRNA 的结合蛋白, 如呼肠孤外壳蛋白 sigma3 (Lichner 等, 2003)。牛痘病毒和人流感病毒都编码一个在果蝇细胞中的抑制 RNA 沉默基础上的抗病毒反应的必要蛋白, 各自的抑制蛋白是 E3L 和 NS1, 它们都是 dsRNA 结合蛋白, 抑制干扰素调节的内在抗病毒反应 (Li *et al*, 2004)。在腺病毒中发现了两个非编码病毒 RNA 可以抑制 RNAi 途径, 在感染中 160nt 的腺病毒相关 (VA) I 型和 II 型 RNA 高水平表达, 阻断 PKR 的活化, VA RNA 抑制 shRNA 和 miRNA 介导的干扰, 但对 siRNA 无效, 在这种情况下, 抑制作用是通过与核输出因子 (Exportin5 和 Dicer) 结合介导的 (Lu *et al*, 2004; Andersson *et al*, 2005), VA RNA 是 Dicer 的底物, VA I 型和 II 型茎部来源的 siRNA 在感染细胞内聚集, 并组装进 RISC, 目前, 还不清楚

病毒如何从这种相互作用中获益 (Andersson *et al*, 2005)。VA RNA 基因与病毒编码基因不重叠, 因此含有 VA-siRNA 的 RISC 不影响病毒特异性 mRNA, 可能因为 VA RNAs 中和了 RNAi 机制, 阻断 Dicer 和 RISC 靶向编码序列, 另一种可能是病毒通过 RNAi 机制以 miRNA 方式阻断宿主基因表达。

此外 HIV 的 tat 蛋白在体外可以抑制 Dicer 活性 (Bennasser *et al*, 2005), 这为病毒在活性 Dicer 环境中复制提供了可能, 至于病毒为何是依赖抑制 Dicer 而不是突变靶序列还不清楚, 不同分离株的这一区域高度保守, 表明这一双链区在进化中获得选择, 其精确功能还不清楚。无论如何, RNAi 抑制因子在 RNA 病毒中的活性以及细胞中病毒来源的 siRNA 的存在支持 RNAi 的抗病毒活性, 但是这些相互作用在病毒致病中的相关功能还不清楚。

3) RNAi 应用前景

我们对于 PTGS 方面的知识大多来自植物、线虫和果蝇的研究, 在哺乳动物中, PTGS 的机制和组织特异性特征还需进一步详细研究, PTGS 在哺乳动物细胞中作为天然的抗病毒反应的作用还没有确定, 干扰作用在细胞间传递的机理还需进一步研究, 在哺乳动物细胞中鉴定病毒蛋白作为 PTGS 抑制子的研究刚刚开始 (Li *et al*, 2004), 在细胞中病毒在 PTGS 中的各种作用还需研究, 然而, PTGS 在已经广泛用于研究细胞蛋白在许多病毒周期中的作用以及作为病毒功能基因组研究的新方法。局部沉默的可能性使得细胞存活所需蛋白的研究成为可能, 由于 siRNA 在预防和治疗方面的作用, 对于增强一些涉及 PTGS 的细胞途径是很有用的, 在动物中, 用病毒特异性 siRNA 可以阻断疾病的发生。在人类, 有治疗特性的 siRNA 将在预防应用之前发展, 对于目前还没有疫苗及有效的治疗方法时, siRNA 技术, 尽管有些局限性, 针对病毒或者细胞基因, 很有希望发展成为治疗疾病的方法。

1.3 本研究的目的和意义

在 PRRS 的防制中, PRRSV 灭活苗和 PRRS 弱毒疫苗发挥了重要作用。但是 PRRSV 灭活苗和 PRRS 弱毒疫苗效果不稳定。由于 PRRSV 遗传变异较快, 疫苗对异源毒株攻击的保护作用有限 (Van *et al*, 1998b; Meng, 2000; Labarque *et al*, 2004), 在选择性压力的作用下, 弱毒疫苗毒株会发生返祖现象, 变为强毒株 (Opriessnig *et al*, 2002), 从而造成 PRRS 的再度爆发 (Botner *et al*, 1999; Nielsen *et al*, 2002), 与弱毒相比, 灭活苗的安全性很好, 但免疫效果不令人满意 (Plana-duran *et al*, 1997; Nilubol *et al*, 2004), 新一代的基因工程苗的免疫效力还有待提高 (Bastos *et al*, 2004; Qiu *et al*, 2005; Fang *et al*, 2006), 因此, 开发更加安全有效的防治措施对 PRRS 的控制有重要意义 (Verheijen *et al*, 2003), RNAi 是抗病毒研究领域的新工具, 在病毒感染性疾病治疗方面表现出巨大潜力。

RNAi 作为有效的抗病毒研究工具, 与建立在病毒蛋白基础上的传统的疫苗防治机制不同, 是转录后的基因沉默机制, 为探索抗 PRRSV 研究提供了新思路。本研究通过 RNAi 技术抑制 PRRSV 在细胞上的复制, 为 RNAi 技术应用于抗 PRRSV 感染奠定基础。

第二章 基于 PCR 扩增的 shRNA 表达盒快速筛选 PRRSV N

蛋白特异的有效 siRNA 序列

摘要：RNAi 已被广泛应用于肿瘤、病毒性疾病的防治研究中，但在有效 siRNA 筛选上还是经验性的，高效 siRNA 的筛选是 RNAi 研究中的关键点之一。PCR 扩增 shRNA 表达盒法可廉价、简单、快速地筛选特异性基因表达抑制的 siRNA。本研究选取猪繁殖与呼吸综合征病毒 (PRRSV) 中含量最高、相对保守的核衣壳蛋白 (N) 作为靶基因，使用 <http://www.ambion.com> 的靶位点筛选和设计工具，选取 4 个 siRNA 序列 (siRNA95、siRNA179、siRNA218 和 siRNA294)，利用一步 PCR 法产生包含 U6 启动子的短发夹 RNA 表达盒技术快速筛选高效 siRNA，PCR 法制备的 shRNA 表达盒 (shRNA95-PCR、shRNA179-PCR、shRNA218-PCR 和 shRNA294-PCR) 分别与表达 N-EGFP 融合蛋白的重组质粒 pEGFP-ORF7 共转染至 293T 细胞，荧光显微镜下检测细胞 EGFP 阳性率，筛选有效 siRNA 片段。在 N 蛋白稳定表达 293T 细胞系和 PRRSV 感染的 MARC-145 细胞中证明筛选的 siRNA 片段可以明显减少 N 蛋白的表达及减轻 PRRSV 引起的特异性细胞病变。

关键词：RNAi, siRNA, shRNA, PCR, PRRSV

猪繁殖与呼吸综合征病毒 (porcine reproductive and respiratory syndrome virus, PRRSV) 是以引起母猪繁殖障碍和仔猪呼吸困难为特征的传染性疾病的病原，给世界范围的养猪业造成巨大经济损失。PRRSV 属于单股正链 RNA 病毒，基因组大约 15kb，含有 9 个开放阅读框 (ORF1a、ORF1b、ORF2a、ORF2b 和 ORF3~7)，ORF1 基因编码 RNA 复制酶和聚合酶，ORF2a、ORF2b 和 ORF3~7 依次编码病毒结构蛋白 GP2a、E、GP3、GP4、GP5、M 和核衣壳蛋白 N (Meulenberg *et al*, 1993; Snijder *et al*, 1999; Wu *et al*, 2005)。N 蛋白基因非常保守，北美毒株间 N 蛋白推导氨基酸序列的同源率为 96%~100%，而欧洲型毒株间同源率为 94%~99%。在感染 PRRSV 的细胞中 N 蛋白表达量约占病毒蛋白总量的 20~40%，在病毒组装和释放中发挥重要作用 (Nelson *et al*, 1993; Mardassi *et al*, 1994; Bautista *et al*, 1996; Verheij *et al*, 2002)。由于 PRRSV 侵害免疫系统而且容易发生变异，常规的疫苗策略难以产生理想的效果，因此探索防治该病的新方法具有重要的意义。

RNA 干扰是指 dsRNA 分子阻断或者降低同源基因表达的现象。RNAi 的核心机制是两步酶反应机制 (Hutvagner, 2005)：第一步是起始阶段，导入的 dsRNA 被 RNaseIII 家族中的 Dicer 核酸酶降解成 21~23nt 小干扰片段，这一步需要 ATP 参与，小干扰片段叫 siRNA (small interfering RNA)，每一个 siRNA 分子 3' 末端带 2 个悬挂的核苷酸 (Bernstein *et al*, 2001)，第二步是效应阶段，siRNA 同核酸酶复合物结合组成 RNA 诱导沉默复合体 (RNA induced silencing complex, RISC)，ATP 存在时 RISC 被激活，被激活的 RISC 通过碱基配对导向同源的转录产物 mRNA，把 mRNA 裂解成 21nt RNA 片段 (Nykanen *et al*, 2001)。Elbashir 等证明人工合成的、3' 末端带有

2个突出核苷酸的21nt dsRNA导入到人胚胎肾细胞和HeLa细胞，产生了特异性的RNAi，证明dsRNA在哺乳动物中也能诱导产生特异性的基因沉默(Elbashir *et al*, 2001)。为了在细胞和动物体内获得持久的干扰效果，开发了表达siRNA的DNA载体和病毒载体(Brummelkamp *et al*, 2002b; Miyagishi *et al*, 2002; Paddison *et al*, 2002; Xia *et al*, 2003; Sui *et al*, 2005)，但是不是所有siRNA序列都可以介导基因沉默，siRNA的效率依赖于特定靶位点的鉴定，目前尽管有一些siRNA的选择法则，但还是经验性的，一般来讲，一个基因要设计若干个siRNA以获得有效的siRNA，Gou等报道了一种PCR基础上的shRNA表达方案，通过两步PCR获得带U6启动子的shRNA表达盒，直接转染细胞后可有效抑制内源外源基因的表达(Gou *et al*, 2003)。本研究采用一步PCR扩增法制备PRRSV N蛋白特异shRNA表达盒，筛选有效siRNA序列，为应用RNAi技术抗PRRSV研究奠定基础。

2.1 材料与方法

2.1.1 质粒、细胞和病毒

含鼠U6启动子的质粒载体pBS-U6由美国哈佛医学院Guangchao Sui博士惠赠(Sui *et al*, 2002)，pEGFP-N1购于Biosciences Clontech。

293T细胞(人胚胎肾细胞293细胞的衍生细胞系，可表达SV40大T抗原)，在含10%FBS、青霉素100IU/ml、链霉素100 μ g/ml、pH7.2的DMEM中培养。该细胞系生长快，贴壁疏松，通常倍增时间不到一天，按1:10~1:20传代，胰蛋白酶-EDTA消化时间不可过长；5%CO₂条件下培养；MARC-145细胞(非洲绿猴肾细胞MA-104的衍生细胞系)用含10%FBS、青霉素100IU/ml、链霉素100 μ g/ml、pH7.2的DMEM培养。

PRRSV CH-1a(属于北美洲型)分离株由本室保存(郭宝清等, 1996)。

2.1.2 试剂、抗体

TRIZOL[®]REAGENT购于Invitrogen，T4 DNA连接酶、AMV反转录酶、Taq酶、dNTP购于(大连)宝生物工程有限公司，PCR产物纯化试剂盒购于上海华舜生物工程有限公司；Wizard PurefectionTM质粒DNA纯化试剂盒购于Promega，lipofectaminTM2000、Opti-MEM[®]I低血清培养基购于Invitrogen，G418购于Roche。

PRRSV N蛋白特异性单克隆抗体本室周艳君博士提供(周艳君等, 2005)，异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate, FITC)标记羊抗鼠IgG购于北京中杉金桥生物技术有限公司。

2.1.3 主要仪器

Nikon TS100倒置显微镜(Nikon)、LEICA-HC荧光显微镜(Leica)、生物安全柜(Forma-scientific)、CO₂培养箱(Forma-scientific)、HZQ-C空气浴振荡摇床(哈尔滨东联电子

技术有限公司)、PCR 仪 (Takara)、Beckman Coulter 离心机 (Beckman)、XW-80A 旋涡混合器 (上海精科实业有限公司)、eppendorf BioPhotometer 核酸浓度测定仪 (Eppendorf)。

2.1.4 siRNA 的筛选和 shRNA 表达盒的设计

根据 PRRSV CH-1a 分离株 (GenBank 登录号 AY032626) 核衣壳蛋白 (N) 编码基因 ORF7 序列, 使用 <http://www.ambion.com> 的靶位点筛选和设计工具, 选取 4 个 siRNA 序列 (siRNA95、siRNA179、siRNA218 和 siRNA294), Blast 确认其特异性, 同时设定无相关 siRNA 序列对照 (表 2-1)。以含鼠 U6 启动子的质粒 pBS-U6 为模板, 上游引物与 U6 启动子 5' 端互补, 下游引物含与鼠 U6 启动子 3' 端互补序列、编码 siRNA 正义链、9nt 的 loop 序列、siRNA 反义链和 5 个连续 T 为终止信号的序列, 此外还可以根据需要加入酶切位点。PCR 扩增得到的产物为带鼠 U6 启动子的 shRNA 表达盒: shRNA-PCR (shRNA95-PCR、shRNA179-PCR、shRNA218-PCR、shRNA294-PCR 和 shRNA-C-PCR) (图 2-1)。引物由上海生物工程有限公司合成。

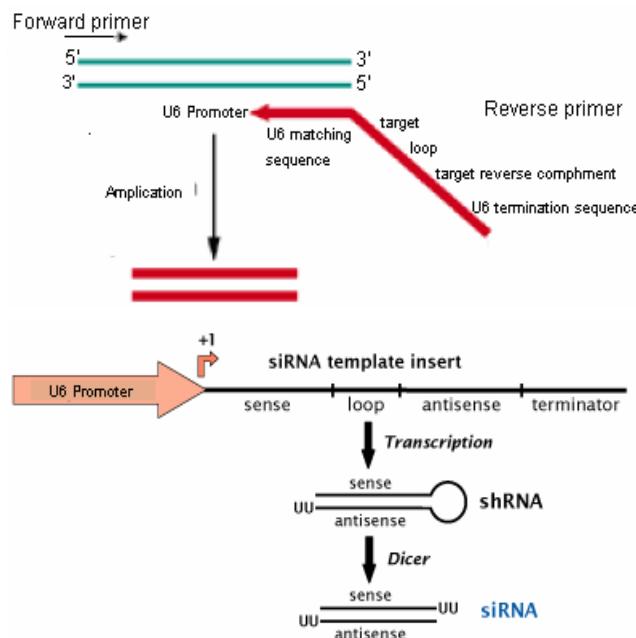


图 2-1 shRNA 表达盒 PCR 扩增方案

Fig. 2-1 Polymerase chain reaction (PCR)-based strategy for short hairpin RNA (shRNA) expression cassettes

2.1.5 shRNA 表达盒的扩增和纯化

上游引物 U6P1, 下游引物 U6P2-N95、U6P2-N179、U6P2-N218、U6P2-N294、U6P2-C (control) (见表 2-1); 25μl PCR 反应体系: Taq 酶 0.5μl, 上下游引物 (50pmol/μl) 各 0.5μl, dNTP (2.5mmol/L) 2μl, 10×buffer 2.5μl, 含鼠 U6 启动子的质粒 pBS-U6 0.5μl, 无菌去离子水 16μl。PCR 反应条件: 94℃ 变性 5min; 30×循环 (95℃ 1min, 60℃ 30sec, 72℃ 30sec); 72℃ 延伸 10min。1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定 PCR 扩增结果, 使用 Takara 公司 PCR 产物纯化试剂盒纯化目的片段, eppendorf BioPhotometer 测定浓度后保存备用。

表 2-1 shRNA 表达盒的扩增引物
Table 2-1 Primes of shRNA expression cassettes

引物名称	引物序列
U6P1	5'-AGTGGATCCGACGCCGCCATCTCTA-3'
U6P2-N95	3'-AACCTTTTCGAAACAAAGTTTGGTCAGGTCTCCGT <u>aagtctct</u> ACGGAGACCTGACCAAAAC <u>AAAAAA</u> CCTAGGCGT-5'
U6P2-N179	3'-AACCTTTTCGAAACAAACTACTGCAGTCCGTAGTGA <u>aagtctct</u> TCACTACGGACTGCAGTAG <u>AAAAAA</u> CCTAGGCGT-5'
U6P2-N218	3'-AACCTTTTCGAAACAAAACACAGACAGCAGCTAGG <u>aagtctct</u> CCTAGCTGCTGTCTGTGTT <u>AAAAAA</u> CCTAGGCGT-5'
U6P2-N294	3'-AACCTTTTCGAAACAAACAAATGTGACACCTCAAAT <u>Caagtctct</u> GATTGAGGTGTCACATTG <u>AAAAAA</u> CCTAGGCGT-5'
U6P2-C	3'-AACCTTTTCGGAACAAACCGATGCAGGTCCCTCGCGTGG <u>aagtctct</u> CCACCGCGAGGACCTGCATCGG <u>AAAAAA</u> CCTAGGCGT-5'

注：下游引物中下划线部分为 *Bam*HI 酶切位点部分，加粗部分为 siRNA 反义链，斜体为 siRNA 的逆序正义链，小写字体为 loop 环序列，方框内序列为 5 个连续 T 终止信号互补序列，紧靠 3' 端的无标记序列为 U6 启动子 3' 端的互补序列，紧靠 5' 端的 3nt 无标记序列为引物保护性碱基。上游引物中，下划线部分为 *Bam*HI 酶切位点部分，紧靠 3' 端的无标记序列为 U6 启动子 5' 端的相应序列。紧靠 5' 端的 3nt 无标记序列为引物保护性碱基

2.1.6 表达 N-EGFP 融合蛋白载体的构建

首先提取 PRRSV RNA 基因组，通过 RT-PCR 扩增 N 蛋白编码基因 ORF7，特异性上游引物：
TTGAAGCTTATGCCAATAACAAACGGCAA，划线部分为 *Hind*III 酶切位点；下游引物：
ACCGGATCCTGCTGAGGGTGATGCTG，划线部分为 *Bam*HI 酶切位点。

1) PRRSV 基因组的提取

Trizol 法提 PRRSV 基因组具体步骤：(所使用离心管和 tip 头均经过 DEPC 水处理和灭菌)

- ①. 取 MARC-145 细胞培养病毒液 250 μ l 于 1.5ml 离心管中；
- ②. 加入 750 μ l Trizol，混匀，室温放置约 5min，待透亮后，加入 250 μ l 的氯仿，盖紧离心管，剧烈摇荡混匀，12 000rpm 室温离心 15min；
- ③. 取上层水相于一新的离心管，加等体积异丙醇，室温放置 20min，12 000rpm 离心 15min；
- ④. 弃去上清液，吸去残留液，加入 1ml 75% 乙醇，颠倒离心管数次，可以不离心直接倒掉上清（确保沉淀仍然在管内）；
- ⑤. 重复第④步一遍；
- ⑥. 室温放置 5~10min，直到乙醇挥发干净，注意不要过分干燥，否则会影响 RNA 的溶解；
- ⑦. 加入 30 μ l DEPC 处理的去离子水溶解 RNA，放置 10min；
- ⑧. 所得 RNA 可以直接用于反转录反应，也可以-70℃ 保存备用。

2) 目的基因 RT-PCR 扩增及表达载体的构建

因为 PRRSV 病毒 mRNA 带有 poly (A)，以 oligo (dT₁₅) 为引物合成 cDNA。AMV 反转录

酶有强的聚合酶活性和 RNA 酶 H 活性，最适作用温度为 42℃。

30μl 反转录体系: 5×buffer 6μl, RNase 抑制剂 0.5μl, 2.5mmol/L dNTP mix 2μl, 20pmol/μl oligo (dT₁₅) 1μl, RNA 模板 20μl, AMV 反转录酶 0.5μl。42℃水浴 1h。

30μl PCR 扩增体系: 10×buffer 3μl, Taq 酶 0.5μl, 2.5mmol/L dNTP mix 2μl, 20pmol/μl 上游引物 1μl, 20pmol/μl 下游引物 1μl, cDNA 模板 4μl, 无菌去离子水 18.5μl。PCR 反应条件: 94℃ 变性 5min, 30×循环 (95℃ 1min, 55℃ 1min, 72℃ 1min), 72℃ 延伸 10min。ORF7 基因 PCR 产物及 pEGFP-N1 载体分别用 *Hind*III 和 *Bam*HI 进行双酶切, 目的片段与载体连接、连接产物转化、酶切鉴定重组质粒 pEGFP-ORF7, 对阳性质粒进行测序, 用 Wizard PurefectionTM 质粒 DNA 纯化试剂盒 (Promega) 纯化序列正确的阳性重组质粒, 测定浓度, -20℃ 保存备用。

3) pEGFP-ORF7 重组质粒的纯化步骤

- (1) 用含阳性质粒的菌种进行划线培养, 挑取单菌落接种到 5ml 的 LB 中 (这一步很关键, 否则质粒的回收率很低), 培养 12~16h。
- (2) 将培养物按 1%~5% 的量接种 25ml 新鲜 LB, 37℃ 摆菌 6~8h, 离心收集菌体。
- (3) 加 1.25ml 细胞悬浮液, 彻底混匀。
- (4) 加 1.25ml 细胞裂解液, 反复倒置混合, 但不能用涡旋振荡, 细胞裂解完全时, 溶液会变清。
- (5) 加 1.75ml 中和溶液, 立即反复离颠倒离心管数次, 使之混匀。
- (6) 14 000rpm, 22~25℃ 离心 10min (BECMAN JA20)。
- (7) 小心地将上清液吸出并移至一个新离心管中, 如果还有絮状物, 需重新离心。
- (8) 在上清中加 0.25ml 内毒素吸附树脂, 混匀, 孵育 10min。
- (9) 将离心管放在磁力棒上澄清 30sec。
- (10) 将上清转移至新离心管。
- (11) 加 0.75ml 的核酸吸附磁珠, 剧烈震荡混匀, 室温孵育 2~3min。
- (12) 将离心管在磁力棒上澄清 30sec, 弃上清, 在磁力棒上静置 2~3min, 弃残余液。
- (13) 加 1ml 洗涤液, 混匀 10sec (目的是去蛋白)。
- (14) 将离心管放在磁力棒上, 澄清, 弃上清, 再静置, 弃残余液。
- (15) 加 2.5ml 80% 乙醇, 混匀 10sec, 放在磁力棒上澄清, 弃上清。
- (16) 重复第 (14) 步两遍, 共洗涤 3 次。
- (17) 最后一次洗涤后, 将磁珠在室温放置 10min, 挥发乙醇。
- (18) 加入 1.2ml 超纯水, 混匀, 室温孵育 3min, 放在磁力棒上澄清, 取上清于 1.5ml 灭菌离心管中, 12 000rpm 离心 1min, 取上清于 15ml 离心管中。
- (19) 加入 0.5 倍体积的 7.5mol/L 醋酸铵, 2.5 倍体积的 95% 乙醇, 混匀, -20℃ 放置 20min, 14 000rpm 离心 18min, 小心弃上清, 加入 70% 乙醇洗涤一遍, 室温干燥。
- (20) 用 200μl 去离子水悬浮, -20℃ 保存备用。

2.1.7 病毒 CCID₅₀ 的测定

用胰酶-EDTA 消化 MARC-145 细胞, 按 5×10⁴ 细胞/孔接入 96 孔细胞培养板, 12h 后, 即可

用于病毒 50% 细胞培养物感染剂量 (50% cell culture infectious dose, CCID₅₀) 滴定。用无血清 DMEM 将细胞洗一遍, 于各孔中加 90 μ l DMEM, 再于排头孔添加病毒液 10 μ l, 将混合液充分混匀; 换 tip 头, 吸取 10 μ l 移于第 2 列, 混合; 连续如此操作至第 10 列, 使病毒稀释度依次为 1 \times 10¹、1 \times 10²、1 \times 10³、1 \times 10⁴、1 \times 10⁵、1 \times 10⁶、1 \times 10⁷、1 \times 10⁸、1 \times 10⁹、1 \times 10¹⁰, 每个稀释度 8 孔, 第 11 列和 12 列为对照。37℃ 感作 1h, 吸出病毒液, 加入含 4% FBS 的 DMEM, 于 5% CO₂ 培养箱内培养。在倒置显微镜下观察细胞病变 (cytopathic effects, CPEs)。每天观察一次, 并记录观察结果, 直至出现 CPE 终点 (即看到能够引起病毒增殖的病毒最高稀释度, 一般观察 5d)。对照细胞应始终保持良好形态和特征。用 Karber 法计算病毒 CCID₅₀/ml。

2.1.8 用 shRNA-PCR 转染 293T 细胞

293T 细胞的转染: 用不含抗生素的 DMEM 营养液将 293T 细胞接到 12 孔细胞培养板, 长满 60% 左右进行转染; 用不含血清的 Opti-MEM[®] I 低血清培养基 (或无血清 DMEM) 稀释 shRNA-PCR 产物, 轻轻混匀; 同样方法稀释 lipofectaminTM2000 (使用前轻轻混合), 室温下孵育 5min。将稀释的 shRNA-PCR 和 lipofectaminTM2000 混合, 室温下孵育 20min, 以形成复合物 (孵育时间不超过 30min, 否则可能会降低活性); 将 shRNA-PCR-lipofectaminTM2000 复合物加入细胞中, 轻轻混匀, 37℃, CO₂ 培养箱孵育 4h, 用含双抗 (青霉素 100IU/ml、链霉素 100 μ g/ml) 和 4% 血清的 DMEM 换液。重组质粒 pEGFP-ORF7 (1.2 μ g)、shRNA-PCR (0.6 μ g) 和转染试剂按 2:1:6 进行混合, 以 shRNA-C-PCR 转染 293T 细胞作为对照组, 24h 后在荧光显微镜下观察。

2.1.9 N-EGFP 融合蛋白稳定表达 293T 细胞系的筛选

按 2.1.8 方法将脂质体 lipofectaminTM2000 与质粒 pEGFP-ORF7 溶液混合, 转染 293T 细胞, 4h 后换液时, 在培养基中加入 G418 至终浓度 800 μ g/ml, 经 G418 筛选 2~3 周, 采用有限稀释法将 G418 抗性细胞单克隆化, 挑选 N-EGFP 融合蛋白表达阳性细胞, 扩大培养获得能稳定表达 N-EGFP 融合蛋白阳性 293T 细胞。

2.1.10 PCR-shRNA 转染 MARC-145 及 PRRSV 的感染

MARC-145 细胞的转染和感染: 转染前一天将 MARC-145 细胞接到 6 孔细胞培养板, shRNA-PCR (3 μ g) 和 lipofectamin 2000TM 转染试剂按 1:2 进行混合, 按 2.1.8 转染法进行操作, 转染后 6h 后接入 0.01MOI (感染复数, multiplicity of infection, MOI) 的 PRRSV, 感作 1h 后, 吸去病毒液, 用含 4% 血清的 DMEM 换液, 逐日观察病变。

2.1.11 间接免疫荧光法检测 shRNA-PCR 对 PRRSV 的抑制

消化用于检测的 MARC-145 细胞, 800rpm 离心收集细胞, 用 0.01mol/L pH7.4 的 PBS 洗涤 3 遍后; 取适量滴在载玻片上, 冷丙酮固定 15min; PBS 洗涤 3 遍, 滴加加 N 蛋白特异性单克隆抗

体, 37℃湿盒内作用 1h, PBS 洗 2 次, 5min/次, 用吸水吸去或吹干残余液体, 滴加 1:200 稀释的 FITC 标记的羊抗鼠 IgG 荧光二抗(用含 0.02% 的伊文斯蓝 PBS 缓冲液稀释), 37℃湿盒内作用 1h, 再用 PBS 洗涤 2 次, 5min/次, 再用蒸馏水洗 1min, 除去盐结晶。用 30% 缓冲 (0.5mol/L 碳酸盐缓冲液 pH9.0~9.5) 甘油封片、荧光显微镜下观察, 并拍照保存。

2.2 结果

2.2.1 一步 PCR 法扩增 shRNA 表达盒

按 2.1.5 的 PCR 程序扩增 shRNA 表达盒。PCR 扩增片段包含 315bp 的鼠 U6 启动子、19bp 的 siRNA 正义链、9bp 的 loop 环、19bp 的 siRNA 反义链、5bp 的终止信号 T, 以及两端的酶切位点序列, 共 400bp 左右。分别命名为 shRNA95-PCR、shRNA179-PCR、shRNA218-PCR、shRNA294-PCR、shRNA-C-PCR, 产物大小与预期结果相符 (图 2-2)。

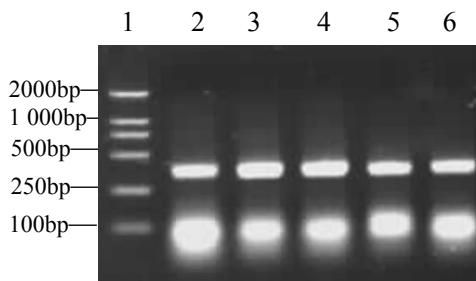


图 2-2 shRNA 表达盒的扩增

Fig. 2-2 Amplification of shRNA expression cassettes

1. DNA 分子量标准 DL2000, 2~6. 依次为 shRNA95-PCR、shRNA179-PCR、shRNA218-PCR、shRNA294-PCR、shRNA-C-PCR

2.2.2 Karber 法计算病毒滴度

接毒后连续观察 5d 后, 发现没有新病变细胞出现, 对照细胞始终保持良好形态和特征。各稀释度细胞病变孔数见 (表 2-2)。根据 Karber 公式计算: $\log CCID_{50} = L - D (S - 0.5)$ 。L 为病毒滴定所用的最低稀释度, 表中为 10^{-1} (-1)。D 为稀释系数, 即组距, 本实验中为-1。S 为细胞病变比值之和 $8/8 + 8/8 + 8/8 + 8/8 + 8/8 + 3/8 + 1/8 = 5.5$ 。代入公式计算, 等于-6, 查反对数: $CCID_{50} = 10^6 / 0.1 \text{ml}$, $CCID_{50} / \text{ml} = 10^7$ 。

表 2-2 各稀释度细胞病变孔数

Table 2-2 the number of wells with CPE in different dilution

病毒稀释度	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-9}	10^{-10}
病毒稀释度 lg 值	-1	-2	-3	-4	-5	-6	-7	-8	-9	-10
细胞病变比值	8/8	8/8	8/8	8/8	8/8	3/8	1/8	—	—	—

2.2.3 pEGFP-ORF7 重组质粒的鉴定

RT-PCR 扩增片段包含除终止密码子外的 ORF7 阅读框的全部序列及加入的酶切位点序列，长约 380bp。PCR 扩增片段大小与预期相符（图 2-3A）；用 *Bam*HI 和 *Hind*III 双酶切鉴定重组质粒 pEGFP-ORF7（图 2-3B），得到约 4.7kb 和 380bp 的两个片段，与预期相符；将阳性的重组质粒进行测序，序列比较表明所得片段与已知的 CH-1a 的相应序列相一致。

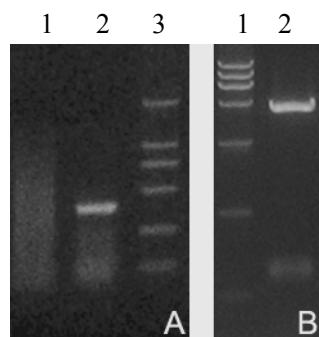


图 2-3 ORF7 基因的扩增及 pEGFP-ORF7 重组质粒的酶切鉴定

Fig. 2-3 Amplification of ORF7 gene and identification of recombinant plasmid pEGFP-ORF7

- A. ORF7 基因扩增结果（1. H_2O 对照，2. cDNA 模板扩增 ORF7：约 0.38kb，3. DNA 分子量标准 DL2000）
- B. 重组质粒 pEGFP-ORF7 双酶切鉴定（1. 分子量标准 DL15 000，2. *Bam*HI 和 *Hind*III 双酶切片段：4.7kb+0.38kb）

2.2.4 shRNA-PCR 抑制 N-EGFP 融合蛋白的表达

pEGFP-ORF7 质粒与 shRNA95-PCR、shRNA179-PCR、shRNA218-PCR、shRNA294-PCR、shRNA-C-PCR 和 PBS 分别共转染 293T 细胞，48h 后荧光显微镜观察。结果显示 shRNA179-PCR 和 pEGFP-ORF7 质粒共转染的 293T 细胞孔中的荧光细胞数比其它孔中的荧光细胞数明显要少，而 shRNA95-PCR、shRNA218-PCR、shRNA294-PCR 转染细胞孔中荧光细胞数与 shRNA-C-PCR 和 PBS 对照转染细胞孔中的相比变化不明显（图 2-4）。

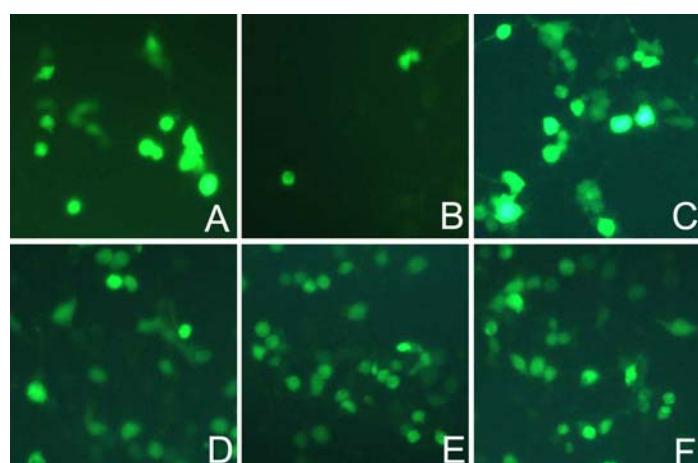


图 2-4 shRNA-PCR 对 N-EGFP 融合蛋白的表达抑制

Fig. 2-4 Inhibition of N-EGFP fusion protein expression by shRNA-PCR

pEGFP-ORF7 与 A、B、C、D、E、F（A. shRNA95-PCR, B. shRNA179-PCR, C. shRNA218-PCR, D. shRNA294-PCR, E. shRNA-C-PCR, F. PBS）分别共转染 293T 细胞。48h 后的荧光照片。

2.2.5 shRNA179-PCR 在 N-EGFP 稳定表达细胞系上的效果

为了减少 pEGFP-ORF7 转染差异引起的误差，筛选稳定表达 N-EGFP 融合蛋白的 293T 细胞系，对 shRNA179-PCR 的抑制效果进行进一步检测。转染后 60h，发现 shRNA179-PCR 转染细胞中荧光细胞数目和荧光强度（图 2-5D）比 shRNA-C-PCR 转染细胞的明显下降（图 2-5B）。

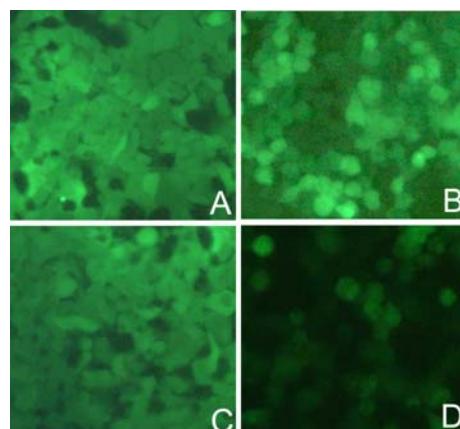


图 2-5 shRNA179-PCR 在 N-EGFP 稳定表达 293T 细胞系上对 N 蛋白表达的抑制

Fig. 2-5 Inhibitory effect of shRNA179-PCR in 293T cell line stably expressing N-EGFP fusion protein

A.shRNA-C-PCR 转染后 12h, B.shRNA-C-PCR 转染后 60h,

C.shRNA179-PCR 转染后 12h, D.shRNA179-PCR 转染后 60h

2.2.6 shRNA179-PCR 抑制了 PRRSV 特异性细胞病变的产生

为了检测 shRNA179-PCR 对 PRRSV 的抑制作用，用 shRNA179-PCR 转染 MARC-145 细胞，然后接入 0.01MOI 的 PRRSV，倒置显微镜下观察细胞病变。感染后 60h，shRNA-C-PCR 转染细胞（图 2-6B）和未转染的接毒细胞（图 2-6C）出现了细胞聚团、隆起、变圆，进而脱落等 PRRSV 特异性细胞病变，shRNA179-PCR 转染细胞仅出现轻微病变症状（图 2-6A）。

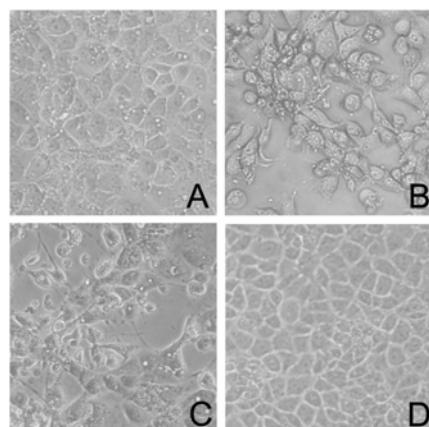


图 2-6 shRNA179-PCR 在 MARC-145 细胞上对 PRRSV 引起的细胞病变的抑制作用

Fig. 2-6 Inhibition effect of shRNA179-PCR on PRRSV induced cytopathic effect (CPE)

A.shRNA179-PCR 转染细胞接毒后 60h, B. shRNA-C-PCR 转染细胞接毒后 60h

C.未转染的接毒细胞, D.正常 MARC-145 细胞

2.2.7 shRNA179-PCR 减少 PRRSV 感染细胞中的 N 蛋白阳性细胞

shRNA-PCR179 转染 MARC-145 细胞, PRRSV 感染后 60h, 用 N 蛋白单克隆抗体进行间接免疫荧光分析 (indirect immunofluorescent assay, IFA), shRNA-PCR179 转染细胞 (图 2-7A) 中的 N 蛋白阳性细胞数明显比 shRNA-C-PCR 转染细胞 (图 2-7B) 中的少, shRNA-C-PCR 转染细胞中的 N 蛋白阳性细胞数和未转染接毒对照细胞相比, 变化不明显 (图 2-7C)。

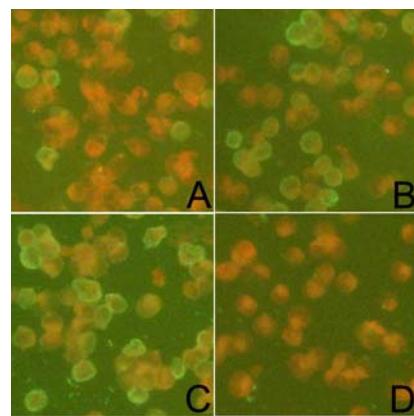


图 2-7 IFA 检测 shRNA179-PCR 对 PRRSV 的抑制作用

Fig. 2-7 Inhibition effect of shRNA-PCR on PRRSV detected by indirect immunofluorescence assay

A.shRNA179-PCR 转染细胞接毒后 60h, B. shRNA-C-PCR 转染细胞接毒后 60h, C.未处理的接毒细胞, D.正常 MARC-145 细胞。一抗为 N 蛋白特异性单克隆抗体; 二抗为 FITC 标记的羊抗鼠 IgG, 二抗用含 0.02% 伊文思蓝的 PBS 按 1: 200 稀释。荧光显微镜观察, 红色为 N 蛋白阴性细胞, 绿色为 N 蛋白阳性细胞。PRRSV (0.01MOI)。

2.3 讨论

本研究设计的 siRNA 表达盒 (siRNA expression cassettes, SECs) 包含鼠 U6 启动子、发夹结构的 siRNA 模板 (hairpin siRNA template) 和转录终止序列 (图 2-1)。将 PCR 产物转染到细胞后, 发夹结构的 siRNA 模板被转录, 得到的 shRNA 在体内被加工并诱导特异的基因表达沉默, 这一技术将繁琐的 RNA 水平操作转变为简单的 DNA 水平操作。目前使用的 shRNA 表达盒大多采用 Pol III 启动子 (图 2-8), 其中主要以人源或鼠源的 U6 和 H1 启动子为主, 这是因为 RNA 聚合酶 III 有明确的起始和终止序列, 当遇到连续 5 个胸腺嘧啶时, 它指导的转录就会终止, 并且转录产物在第二个尿嘧啶处被切下来, 而且合成出的 RNA 不会带有 5' 帽结构和 3' polyA 尾巴。



图 2-8 Pol III 启动子结构

Fig. 2-8 Structure of RNA Pol III Promoters

三型 Pol III 启动子由近端序列元件 (proximal sequence element, PSE) 和其下游的 TATA 盒组成, 二者之间距离相对恒定。U6 启动子的 PSE 上游还存在远端序列元件 (distal sequence element, DSE)。TATA 盒, 可以使 Pol III 精确起始转录; PSE 元件是 snRNA 激活因子蛋白复合物的结合位点; DSE 具有激活和增强启动子转录的能力; 启动子下游存在的连续 TTTTT 序列为 Pol III 提供转录终止信号。

不同 siRNA 引起的基因沉默效果差异很大, 目前还没有阐明高效 siRNA 的设计标准, 有效 siRNA 的筛选多是经验性的, Tuschl 等根据试验经验发表了 siRNA 靶位点的筛选规则: (1) 从转录本 (mRNA) 的 AUG 起始密码开始, 寻找“AA”二连序列, 并记下其 3' 端的 19 个碱基序列, 作为潜在的 siRNA 靶位点; (2) 选取 GC 含量在 45%~55% 左右的 siRNA, 避免可能形成二级结构的区域; (3) 避免含有连续三个以上嘌呤或连续三个以上嘧啶的碱基 (因为这会造成 U6 聚合酶提前终止); (4) 使用 BLAST 将潜在的序列和相应的基因组数据库 (人, 或者小鼠, 大鼠等等) 进行比较, 排除那些和其他编码序列同源的序列。按 siRNA 筛选的基本原则, 组成有效基因沉默

的 siRNA 序列有: AAN₁₉TT, NAN₁₉NN, NARN₁₇YNN, 和 NANN₁₇YNN (N 代表任何核苷酸, R 代表嘌呤, Y 代表嘧啶) (Martinez *et al*, 2002)。每个基因通常需要选定若干 siRNA 片段, 通过转染选择效果最好的序列。

由于化学合成价格昂贵, 研究者开发了多种制备 siRNA 的方法, Donze 等利用 T7 RNA 聚合酶体外转录进行合成 dsRNA, 具体方法是在 siRNA 的模板 DNA 序列 3' 端分别加上 18bp 左右与 T7 启动子序列互补的序列, 在 3' 端加上 2 个 A, 以转录为 UU (Donze *et al*, 2002)。如果是分别转录合成短序列特异性的正义及反义链 RNA, 则需通过退火形成 siRNA 双链; 也可以用 T7 RNA 聚合酶合成顺式相连的 siRNA, 形成具有发夹结构的 siRNA 双链 (图 2-9), 再转入细胞, 但体外操作 RNA 比较繁琐, 而且 Kim 等证明 T3、T7 和 SP6 体外转录制备的 ssRNA 可诱导 α 和 β 干扰素反应 (Kim *et al*, 2004), 限制了这种方法在哺乳动物细胞中的应用。

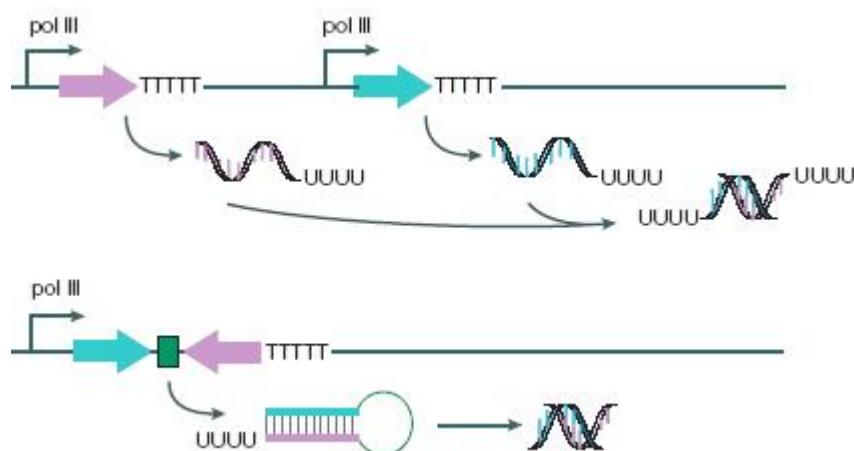


图 2-9 siRNA 表达盒设计方案

Fig. 2-9 Designation of siRNA expression cassettes

Dykxhoorn, 2003

Yang 等设计长为 500bp 左右的 dsRNA, 通过 T7 聚合酶体外转录合成, 用纯化的 RNaseIII(或 Dicer) 在体外酶解成各种不同的 siRNA 片段, 再经纯化步骤去除未消化的长 dsRNA 片段, 所获的多种 siRNAs 用于转染细胞, 这种方法最大的优点在于可省略 siRNAs 序列的选择步骤, 从而节约大量的时间与费用, 但由于有可能引起非特异性基因沉默效应, 其应用范围同样受到限制 (Yang *et al*, 2001)。

2002 年 Castanotto 等报道了在 PCR 基础上合成 shRNA 表达盒的方法, 采用两步 PCR 法获得带 U6 启动子的 shRNA 表达盒, 转染哺乳动物细胞后可以特异抑制 GFP 报告基因的表达 (Castanotto *et al*, 2002), 后来他们采用该方法筛选 HIV 特异性 siRNA 也获得成功 (Scherer *et al*, 2004)。此体系不需要载体克隆、测序等颇为费时的步骤, 可以直接由 PCR 得到, 因此成为筛选 siRNA 的有效工具, 甚至可以用来筛选在特定的研究体系中启动子和 siRNA 的最适搭配, 如果在 PCR 两端添加酶切位点, 那么由此筛选出的 siRNA 可以直接克隆到载体中构建 siRNA 表达载体, 构建好的载体可稳定表达 siRNA 并用于长效基因抑制研究 (Castanotto *et al*, 2004; Castanotto *et al*, 2005)。Gou 等也采用两步 PCR 法制备 shRNA 表达盒, 证明 PCR 法制备的 shRNA 表达盒

能够特异性抑制内源和外源基因表达,而且CMV启动子表达的shRNA能获得与U6启动子表达shRNA对内源外源基因表达同样的抑制效果(Gou *et al.*, 2003)。Wu等通过PCR扩增特异siRNA表达盒,在哺乳动物细胞中有效抑制了HBV病毒复制和基因表达。通过筛选,鉴定出两个siRNA表达盒,在Bel-7402细胞中分别以81.9%和87.3%抑制HBV pre-c/c基因表达,同时在HepG2 2.2.15细胞中可使HBV的DNA水平分别降低83.5%和85.2%。所有这些试验证明PCR扩增法制备的shRNA表达盒是筛选高效siRNA序列的理想方法(Wu *et al.*, 2005)。

理论上,用含有发夹状二级结构的长片段引物进行PCR扩增较困难,目前制备shRNA表达盒多倾向采用两步PCR法,即设计两条较短的、分别针对siRNA正义链-环和环-反义链的反向引物,通过两步PCR反应扩增获得shRNA表达盒产物。但该方法不足之处是由于多次PCR反应会增加siRNA序列发生突变的可能性,且在扩增预期长度产物时常会伴随产生另外一条较短的(约10~20bp)条带。本研究采用一步法PCR制备带U6启动子的shRNA表达盒(图2-1),证明带发夹状二级结构的长片段引物对PCR扩增并没有影响。倪勤等(2005)通过一步PCR法分别制备了包含U6+1、H1和tRNA Val在内的三种shRNA表达盒,转染细胞后均有效地抑制了相应基因的表达,Castanotto等报道,对上、下游引物进行5'端磷酸化稳定修饰可提高PCR产物在转染细胞内的稳定性、延长RNAi效应。但倪勤等(2005)研究表明表达盒磷酸化修饰似乎并未增强瞬时表达体系中的基因沉默效果,本研究未对上、下游引物进行5'端磷酸化等稳定修饰。

本研究构建的pEGFPORF7载体,可以通过荧光显微镜直接检测N蛋白的表达,因为N蛋白编码基因ORF7基因位于CMV立即早期启动子和绿色荧光蛋白编码基因EGFP序列之间,以N-EGFP融合蛋白的形式表达。由于该载体可以在表达SV40大T抗原的细胞(293T、COS-1、COS-7等)中复制(因为载体带有SV40复制起始点与启动子),并且带有G418抗性基因,可以用来筛选稳定表达细胞系,本研究利用这一特征,筛选了稳定表达N-EGFP融合蛋白的293T细胞系,将带有shRNA表达盒的PCR产物转染该稳定细胞系,验证了shRNA179-PCR的干扰效果(图2-5),为筛选更多抑制N蛋白表达的siRNA研究提供了有利条件。

本研究采用一步PCR获得shRNA表达盒,简化了siRNA制备过程,筛选了在293T细胞和MARC-145细胞上均可有效特异抑制PRRSV N蛋白表达的siRNA序列,为进一步研究奠定了基础。

第三章 基于载体表达的 shRNA 在 MARC-145 细胞上对 PRRSV 复制抑制的研究

摘要：为了获得 shRNA 的长效表达，将 PCR 法制备 shRNA 表达盒插入到 pEGFP-N1 质粒载体，构建 PRRSV N 蛋白特异的四个 shRNA 表达载体，转染 MARC-145 细胞，在 mRNA 及蛋白表达水平检测 shRNA 表达载体对 PRRSV 复制的抑制。通过 CPE、IFA、Western blot、FQ-PCR 和病毒滴定等检测方法证明 shRNA 表达载体 pEN179-shRNA 可以有效抑制 PRRSV 的复制，抑制效应在一定范围内具有明显的剂量依赖性。

关键词：RNA 干扰，shRNA，PRRSV，复制

猪繁殖与呼吸综合征（porcine reproductive and respiratory syndrome, PRRS）是由 PRRSV 引起的以母猪繁殖障碍和仔猪呼吸困难为主要特征的传染性疾病。目前，在 PRRS 的防制中，疫苗接种在控制同源毒株引起的疾病症状上发挥了重要作用，但对异源毒株的攻击，其保护作用较差，而且病毒可以在淋巴组织中可以持续复制，持续感染猪排毒给 PRRS 的消除计划带来困难。持续感染的具体机制还不清楚，探索新的预防措施有重要意义。

在前面的研究中，我们用 PCR 法制备 shRNA 表达盒，将带 shRNA 表达盒的 RNA 产物直接转染 293T 细胞和 MARC-145 细胞后，筛选了有效的 siRNA 靶位点，但 PCR 法不适合于大量制备，转染后效果维持时间较短，所以在本研究中，我们将 PCR 法制备 shRNA 表达盒插入到 pEGFP-N1 质粒载体中，获得长效 shRNA 的表达载体，shRNA 表达载体在 MARC-145 细胞上对 PRRSV 复制抑制进行检测。

3.1 材料与方法

3.1.1 质粒、细胞和病毒

含鼠 U6 启动子的质粒载体 pBS-U6 由美国哈佛医学院 Guangchao Sui 博士惠赠（Sui *et al*, 2002），pEGFP-N1 购于 Biosciences Clontech。

MARC-145 细胞（非洲绿猴肾细胞 MA-104 的衍生细胞系）用含 10% FBS、青霉素 100IU/ml、链霉素 100μg/ml、pH7.2 的 DMEM、5% CO₂ 条件下培养。

PRRSV CH-1a（属于北美洲型）分离株由本室保存（郭宝清 等, 1996）。

3.1.2 试剂、抗体

*Eco*O109I (Takara)，质粒纯化试剂盒 (Promega)，RNA 提取试剂盒 (Qiagen)，lipofectamin

2000TM (Invitrogen)、Opti-MEM[®]I 低血清培养基、DMEM (Gibco); PRRSV ORF7 特异 siRNA 的 shRNA 表达盒 PCR 产物 (第二章所述方法制备), 禽源反转录酶 (AMV)、EX-taq 酶为 Takara 公司产品, SuperSignal West Pico 化学发光底物 (Pierce), 柯达 X 光胶片、D72 显影粉和 D72 定影粉 (Applygen Technologies)。

PRRSV N 蛋白特异性单克隆抗体本教研室周艳君博士提供 (周艳君 等, 2005), GAPDH 特异性单克隆抗体购于上海康成生物技术有限公司、FITC 标记羊抗鼠 IgG 购于北京中杉金桥生物技术有限公司。

3.1.3 主要仪器

Roter-gene3000 荧光定量 PCR 仪 (Corbett research), DYY-III-8B 电泳仪 (北京市六一仪器厂), Mini PROTEANTMII 电泳槽、半干电转印仪 (BIO-RAD), eppendorf Biophotometer 核酸浓度测定仪 (Eppendorf), Nikon TS100 倒置显微镜 (Nikon), LEICA HC 荧光显微镜 (Leica), 生物安全柜 (Forma Scientific), CO₂ 培养箱 (Forma Scientific), HZQ-C 空气浴振荡摇床 (哈尔滨东联电子技术有限公司)、PCR 仪 (Takara)。

3.1.4 引物和探针设计

根据 PRRSV CH-1a ORF7 序列 (GenBank 登录号 AY032626)、EGFP 序列参考 pEGFP-N1 载体中的 EGFP 序列、 β -actin 序列 (GenBank 登录号 AB004047) 设计 Taqman 探针和引物, 序列见表 3-1, 由 Takara 公司设计合成。

表 3-1 引物和探针的序列

Table 3-1 Sequences of primers and probes

基因名称	序列	引物长度	基因长度	位置	Tm [°] C	GC%	产物长度
actin-F	5'-TGACTGACTACCTCATGAAGATCC-3'	24		627	58.3	45.8	
actin-R	5'-TCTCCTTAATGTCACGCACGATT-3'	23	1793	716	59.1	43.5	90 bp
actin-probe	5' (FAM) -CGGCTACAGCT TCACCACCACGGC- (Eclipse) 3'	24		661	68.9	66.7	
ORF7-F	5'-CCTCTAGCGACCGAAGATGAC-3'	21		166	58.3	57.1	
ORF7-R	5'-CCCTGGTTAAAGGCAGTCTGG-3'	21	372	257	58.9	57.1	92 bp
ORF7-prob	5' (ROX) -GACGACAGAC ACAATTGCCGCTCA (Eclipse) 3'	25		234	66.9	56	
GFP-F	5'-AAGATCCGCCACAACATCGAG-3'	21		499	59	52.4	
GFP-R	5'-GGACTGGGTGCTCAGGTAGT-3'	20	720	618	58.9	60	120 bp
GFP-probe	5' (ROX) -TGCAGCTCGC CGACCACTACCAG- (Eclipse) 3'	23		530	67.5	65.2	

3.1.5 shRNA 表达载体的构建

根据 shRNA 表达盒序列设计含 *Eco*O109I 位点的引物, PCR 扩增 shRNA 表达盒, 上游引物: 5'-TATGGGACCCAGTGGATCCGACGCCGATCTCTA-3' , 下游引物: 5'-GACAGGACCTTGCAGATCCAAAAA-3', 扩增产物连接入 T 载体, *Eco*O109I 酶切鉴定后测序, 测序正确后用 *Eco*O109I 酶切处理, 回收目的片段, 同时 pEGFP-N1 也用 *Eco*O109I 酶切处理, 胶回收纯化线性化的 pEGFP-N1 载体, 小牛碱性磷酸酶 (CIAP) 去磷酸化, 将去磷酸化处理的 pEGFP-N1 载体与目的片段用 T4 DNA 连接酶连接, 连接产物转化 DH5 α 感受态细胞, LB 平板氨苄青霉素 (100 μ g/ μ l) 筛选。小量提取质粒, 随后用 *Eco*O109 I 酶切鉴定, 1% 琼脂糖电泳观察结果。

3.1.6 shRNA 表达载体的纯化

按 Wizard PurefectionTM 小量质粒 DNA 纯化试剂盒纯化鉴定表达 shRNA 的阳性重组质粒。

3.1.7 shRNA 表达载体的转染

按 2.1.1 所述方法培养 MARC-145 细胞, 并于 12 孔细胞培养板中培养成单层, 按 lipofectamin2000TM (invitrogen) 说明操作。转染 1 μ g pEGFP-N1, 24h 后, 消化细胞, 倒置荧光显微镜下观察, 计算绿色荧光蛋白阳性细胞的比例, 方法是每孔随机计数 100 个细胞, 共计数 6 个孔, 表达绿色荧光蛋白细胞占总计数细胞的百分比即代表该细胞株的转染效率。预试并确定 lipofectamin2000TM/DNA 的比例, shRNA 表达载体按 0.4、0.8、1.0、1.5、2.0 μ g 的量加入, 转染后 6h 接种 0.01MOI 的 PRRSV, 观察细胞病变, 并收获细胞或培养上清进行下一步检测。

3.1.8 IFA 检测 shRNA 表达载体对 PRRSV 复制的抑制

按 2.1.11 中所述 IFA 法进行检测。

3.1.9 Western-blot 检测 N 蛋白表达变化及抑制作用的剂量依赖性

收获预检测细胞, PBS 洗 2 次, 适量 PBS 悬浮, 加入 2 \times SDS 上样缓冲液, 沸水浴作用 5min。制备 12% SDS-聚丙烯酰胺凝胶 (PAGE), 按 15 μ l/孔点样, 并 100V/1.5h 条件下电泳。电泳结束后, 在半干电转印仪上 3v/2.0h 条件下将蛋白充分转移至硝酸纤维膜上。转移完成以后, 在免疫检测程序之前将 NC 膜完全干燥 (干燥可提高蛋白吸附到 NC 聚合物上的能力, 有助于降低随后分析过程中的解吸)。蛋白转移后干燥的 NC 膜可长时间保存 (4 $^{\circ}$ C 可保存 2 周, -20 $^{\circ}$ C 可保存 2 个月, -70 $^{\circ}$ C 可保存更长时间), 1 \times PBS 洗膜 5min, 5% 脱脂乳 4 $^{\circ}$ C 封闭过夜, 一抗 [N 蛋白特异性单克隆抗体和 GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH, 甘油醛-3-磷酸脱氢酶) 单克隆抗体的混合物] 37 $^{\circ}$ C 孵育 1h, PBS 洗膜 5min/3 次, 加入 HRP 偶联的二抗 (羊抗鼠 IgG),

37℃下孵育 1h, PBS 洗膜 5min/3 次。此后依据化学发光法常规显影、定影并检测膜上印迹的蛋白。显影的配制: 准备约 700ml 50℃的蒸馏水, 加入可配制 1L 的显影剂, 充分溶解, 定容到 1L; 定影液的配制: 准备约 600~650ml 50℃的蒸馏水, 加入可配制 1L 定影液的定影剂充分溶解, 定容到 1L, 混匀后即可使用。显影和定影液也可以配置成 4 倍储存液, 4℃保存备用。将 Peirce 化学发光剂按 1:1 混匀, 均匀滴加到二抗孵育后的 NC 膜上, 装入透明塑料袋。在暗室内把 X 光片放在装 NC 膜的塑料袋上, 在暗盒内曝光, 根据荧光强度调整曝光时间。将曝光的 X 光片完全浸没在显影液内, 显影 10sec 至 2min, 具体显影时间要根据显影情况而定, 可以在红灯下观察, 当发现目的条带清晰时, 即可在自来水中冲洗 2~3min 以停止显影, 然后浸入定影液内, 定影 3min 左右, 在自来水中冲洗 2min, 充分洗去各种残留溶液和试剂。

3.1.10 荧光定量 PCR 检测抑制效果

1) RNA 提取

使用 RNeasy mini handbook 中的“从动物细胞中分离细胞质 RNA 方案”提取 RNA。在操作之前配制 RLN 缓冲液[50 mmol/L Tris·Cl, pH 8.0, 140 mmol/L NaCl, 1.5 mmol/L MgCl₂ 0.5% (v/v) Nonidet P-40 (1.06 g/ml)], 临用前可加入 1000U/ml RNase inhibitor (optional), 1mmol/L DTT (optional), 4℃保存。具体步骤如下:

- (1) 胰酶消化收获细胞, 不超过 1×10^7 个;
- (2) 加 175 μ l RLN (4℃) 缓冲液, 冰浴 5min;
- (3) 300 \times g 4℃ 离心 2min, 收集上清到新离心管中;
- (4) 加入 600 μ l RLT (使用前每毫升 RLT buffer 加 10 μ l β -巯基乙醇/ β -ME, 此时可稳定保存 1 个月, Bufer RLT 在保存时可形成沉淀, 必要时加热溶解, 室温保存), 剧烈混匀;
- (5) 加入 430 μ l 无水乙醇, 混匀;
- (6) 分两次加入吸附柱, 700 μ l/次, 8 000 \times g 离心 15sec, 以下第 (7) ~ (9) 步是为了去除可能存在的微量 DNA (试剂盒中的 silica-membrane 技术可有效去除 DNA。然而, 在对 DNA 敏感的 RNA 应用中应该进一步去除 DNA, 例如 TaqMan RT-PCR 分析, 这时可使用 RNasefree 的 Dnase 试剂盒; 或者在分离出 RAN 后用 DNase 处理。如果使用试剂盒, 使用前请准备 DNase1 保存液);
- (7) 加 350 μ l RW1, 8 000 \times g 离心 15sec;
- (8) 加 80 μ l DNA 去除酶 (10 μ l DNase I 保存液加到 70 μ l 的 RDD 缓冲液中, 轻轻混匀, 不要剧烈震荡,) 到吸附柱中, 20~30℃ 孵育 15min;
- (9) 加 350 μ l RW1, 8 000 \times g 离心 15sec;
- (10) 加 500 μ l 的 RPE (Buffer RPE 使用前加 4 倍体积的无水乙醇, 瓶上有说明) 到吸附柱中, 8 000 \times g 离心 15sec;
- (11) 加 500 μ l 的 RPE 到吸附柱中, 8 000 \times g 离心 2min;
- (12) 将吸附柱放入新收集管中, 离心 1min;
- (13) 将吸附柱放入新收集管中, 加 30 μ l 无 RNA 酶的去离子水洗脱, 8 000 \times g 离心 1min;

- (14) 所有步骤在室温进行, 操作要快;
 (15) 所有离心在 20~25℃, 确保转子温度不低于 20℃。

2) 反转录反应

按表 3-2 配制反转录反应混和液, 42℃作用 1h。若有多份 RT 反应, 可预先配制多份反应液的各种试剂混合液 (Master Mix), 然后再分装至反应管中。

表 3-2 反转录反应混和液

Table 3-2 Mixture of reverse transfection

试剂	使用量 μl
5×AMV Buffer	6.0
dNTP Mixture (各 2.5mmol/L)	2.0
Oligo dT Primer (50 $\mu\text{mol/L}$)	1.0
AMV RTase (RNase H free, 200U/ μl)	0.5
RNase Inhibitor (40U/ μl)	0.5
RNA	20~30ng
RNase Free ddH ₂ O	补足 30 μl

也可以按 Takara RT-PCR 试剂盒 (Perfect Real Time) 进行, 具体配方按试剂盒说明进行。

3) 标准品的制备与稀释

β -actin 标准品的制备: 以 MARC-145 细胞 cDNA 为模板, 表 3-1 中的引物扩增 β -actin 片段, 胶回收 PCR 产物, 克隆到 pMD18-T 载体中, 构建 pMD18-T-actin 载体, 测序鉴定, 纯化, 测定浓度, -20℃保存备用。重组质粒 pEGFP-ORF7 中既含有 GFP 基因又含有 ORF7 基因, 以此作为扩增 GFP 基因和 ORF7 基因的标准品。

标准品的稀释液可以是 TE (pH7.4) 也可以是去离子水, 按公式: 拷贝数 = (质量 \div 分子量) $\times 6.0 \times 10^{23}$ 计算拷贝数。因为 pEGFP-ORF7 质粒分别设定 1.2×10^9 拷贝/ml、 1.2×10^8 拷贝/ml、 1.2×10^7 拷贝/ml、 1.2×10^6 拷贝/ml、 1.2×10^5 拷贝/ml 等 5 个不同浓度; 内参照 β -actin 的标准品 pMD18-T-actin 分别设定 2.0×10^9 拷贝/ml、 2.0×10^8 拷贝/ml、 2.0×10^7 拷贝/ml、 2.0×10^6 拷贝/ml、 2.0×10^5 拷贝/ml 等几个稀释度。

4) 引物及探针的稀释

引物及探针按表 3-3 中浓度稀释, -20℃保存, 探针应该注意避光保存。

表 3-3 引物及探针的稀释

Table 3-3 Dilution of primers and probes

名称	每管中含量 nmol	加入水 μ l	浓度 pmol/ μ l	25 μ l 体系终浓度 pmol/ μ l
GFP-F	4.8	480	10	0.4
GFP-R	5.0	500	10	0.4
GFP-probe	4.3	860	5	0.2
ORF7-F	4.8	480	10	0.4
ORF7-R	4.8	480	10	0.4
ORF7-probe	4.0	1333	3	0.12
β -actin-F	4.2	420	10	0.4
β -actin-R	4.3	430	10	0.4
β -actin-probe	4.2	840	5	0.2

注：表中 F 代表上游引物，R 代表下游引物，probe 代表探针

5) 25 μ l 体系双标记 TaqMan 探针法 PCR 反应

按以下配方配制反应混和液，因为 GFP 和 ORF7 的探针使用 ROX 标记， β -actin 使用 FAM 标记，定量时 GFP 和 β -actin 可在同一管中扩增，ORF7 和 β -actin 可在同一管中扩增。cDNA 用量：1~100ng RNA 反转录所得 cDNA 取 1 μ l。

表 3-4 25 μ l 体系双标记 TaqMan 探针法 PCR 反应混和液

Table 3-4 PCR reaction mixture of double labeled Taqman probes

试剂	用量 μ l	GFP 反应管浓度	ORF7 反应管浓度
10×Buffer (含 15mmol/L MgCl ₂)	2.5	[Mg ²⁺]1.5mmol/L	[Mg ²⁺]1.5mmol/L
dNTP (2.5mmol/L)	2.0	200nmol/L	200nmol/L
Ex-Taq 酶 (5U/ μ l)	0.4	2.0U	2.0U
MgCl ₂ (25mmol/L)	1.5	[Mg ²⁺]1.5mmol/L	[Mg ²⁺]1.5mmol/L
GFP/ ORF7 上游引物	1.0	0.40	0.24
GFP/ ORF7 下游引物	1.0	0.40	0.24
GFP/ ORF7TaqMan 探针	1.0	0.20	0.12
β -actin-F	1.0	0.40	0.40
β -actin-R	1.0	0.40	0.40
β -actin-probe	1.0	0.20	0.20
ddH ₂ O	补足 25		

也可直接使用 Takara RT-PCR 试剂盒 (Perfect Real Time)。具体配方按试剂盒说明进行。

6) 两步 Real Time RT-PCR 条件。

95°C 变性 5min, 40×循环 (95°C 15sec, 60°C 45sec)。

3.1.11 毒价滴定检测抑制效果

转染接毒后 60h 收获细胞培养上清，按 2.1.7 方法对待检样品进行病毒毒价滴定。

3.2 结果

3.2.1 shRNA 表达盒的扩增和 shRNA 表达载体的构建

在 pEGFP-N1 载体的 3896 位处有一个 *Eco*O109I 位点，该位点不受载体中 CMV 或 SV40 启动子影响，所以选择该位点插入 shRNA 表达盒。设计的上下游引物中带有 *Eco*O109I 位点，以第二章中带 shRNA 表达盒的 PCR 产物为模板，进行 PCR 扩增，所得产物大小约 400bp（图 3-1），将所得 PCR 产物纯化后，连入 pMD18-T 载体中，*Eco*O109I 酶切鉴定（图 3-2），测序，阳性质粒分别命名为 T-shRNA95、T-shRNA179、T-shRNA218、T-shRNA294、T-shRNA-C。序列完全正确的重组质粒用 *Eco*O109I 酶切，回收目的片段，连入 pEGFP-N1 载体的 *Eco*O109I 位点，*Eco*O109I 酶切鉴定阳性质粒（图 3-3），分别命名为 pEN95-shRNA、pEN179-shRNA、pEN218-shRNA、pEN294-shRNA、pEC-shRNA，Promega 试剂盒纯化转染用质粒，测定浓度，-20℃保存备用。

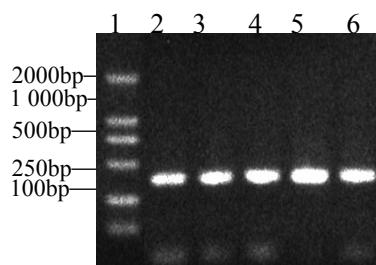


图 3-1 shRNA 表达盒的扩增

Fig. 3-1 Amplification of shRNA expression cassettes

1. DNA 分子量标准 DL2000, 2. shRNA95, 3. shRNA179, 4. shRNA218, 5. shRNA294, 6. shRNA-C

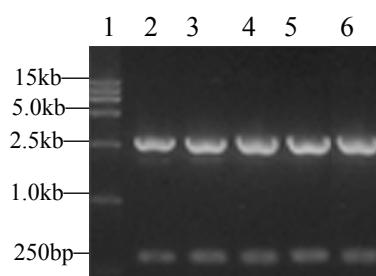


图 3-2 T-shRNA 表达载体的 *Eco*O109I 酶切鉴定

Fig. 3-2 Identification of T-shRNA expression vectors with *Eco*O109I

1. DNA 分子量标准 DL2000, 2. T-shRNA95, 3. T-shRNA179, 4. T-shRNA218, 5. T-shRNA294, 6. T-shRNA-C

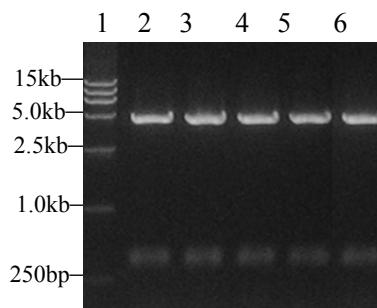


图 3-3 pEN-shRNA 表达载体的 *Eco*O109I 酶切鉴定

Fig. 3-3 Identification of pEN-shRNA expression vector with *Eco*O109I

1. DNA 分子量标准DL2000, 2-6. pEN95-shRNA、pEN179-shRNA、pEN218-shRNA、pEN294-shRNA、pEC-shRNA

3.2.2 shRNA 表达载体抑制 PRRSV 引起的特异性细胞病变

为了检测 shRNA 表达载体的抗病毒活性, 先用 shRNA 表达载体转染 MARC-145, 同时设定非特异性序列质粒 (pEC-shRNA) 对照和空载体质粒 (pEGFP-N1) 对照, 6h 以后, 以 0.01MOI 的 PRRSV CH-1a 接毒。60h 后, 除 pEN179-shRNA 处理细胞外, pEN95-shRNA、pEN218-shRNA、pEN294-shRNA、pEC-shRNA (图 3-4E) 和 pEGFP-N1 (图 3-4F) 处理细胞中都产生了同接毒对照 (图 3-4G) 一样的 PRRSV 引起的特异性细胞病变, 而未处理细胞的形态正常。pEN179-shRNA 处理细胞表现的异常形态部分是由转染过程中转染剂造成的细胞损伤, 该处理细胞可以存活一周以上。当增大接毒剂量, 如大于 1.0MOI 时, pEN179-shRNA 转染孔细胞也会出现病变脱落。

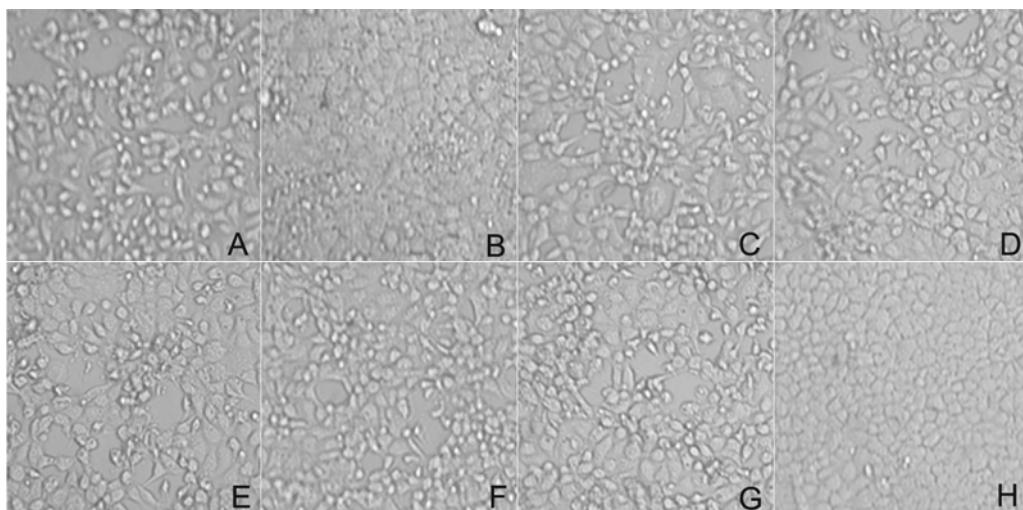


图 3-4 N 蛋白特异 shRNA 表达载体在 MARC-145 细胞中抑制 PRRSV 引起的细胞病变

Fig. 3-4 Inhibitory effect of N protein specific shRNA expression vectors to PRRSV induced CPE in MARC-145 cells
 图中为 12 孔细胞培养板按 1 μ g 质粒/孔转染, 接毒 0.01MOI 的结果。A、B、C、D、E、F 分别代表 pEN95-shRNA、pEN179-shRNA、pEN218-shRNA、pEN294-shRNA、pEC-shRNA、pEGFP-N1 处理孔, G 为接毒对照细胞, H 为未处理正常细胞。

3.2.3 shRNA 表达载体减少 PRRSV 阳性细胞

为了检测 shRNA 表达载体处理 MARC-145 细胞中 N 蛋白阳性细胞变化情况，将待检细胞用含 EDTA 的胰酶消化后进行 IFA 检测。由图 3-5 可以看出，除 pEN179-shRNA 处理细胞外，其它质粒转染处理的细胞之间的荧光细胞数目差异不明显。其中 pEC-shRNA 为非特异序列载体对照、empty vector 为 pEGFP-N1 空载体对照、mock-transfected 为 PBS 转染对照、infected only 为不转染的接毒对照、not infected 为空载体转染不接毒对照。红色细胞为 N 蛋白阴性细胞，绿色细胞为 N 蛋白阳性细胞。

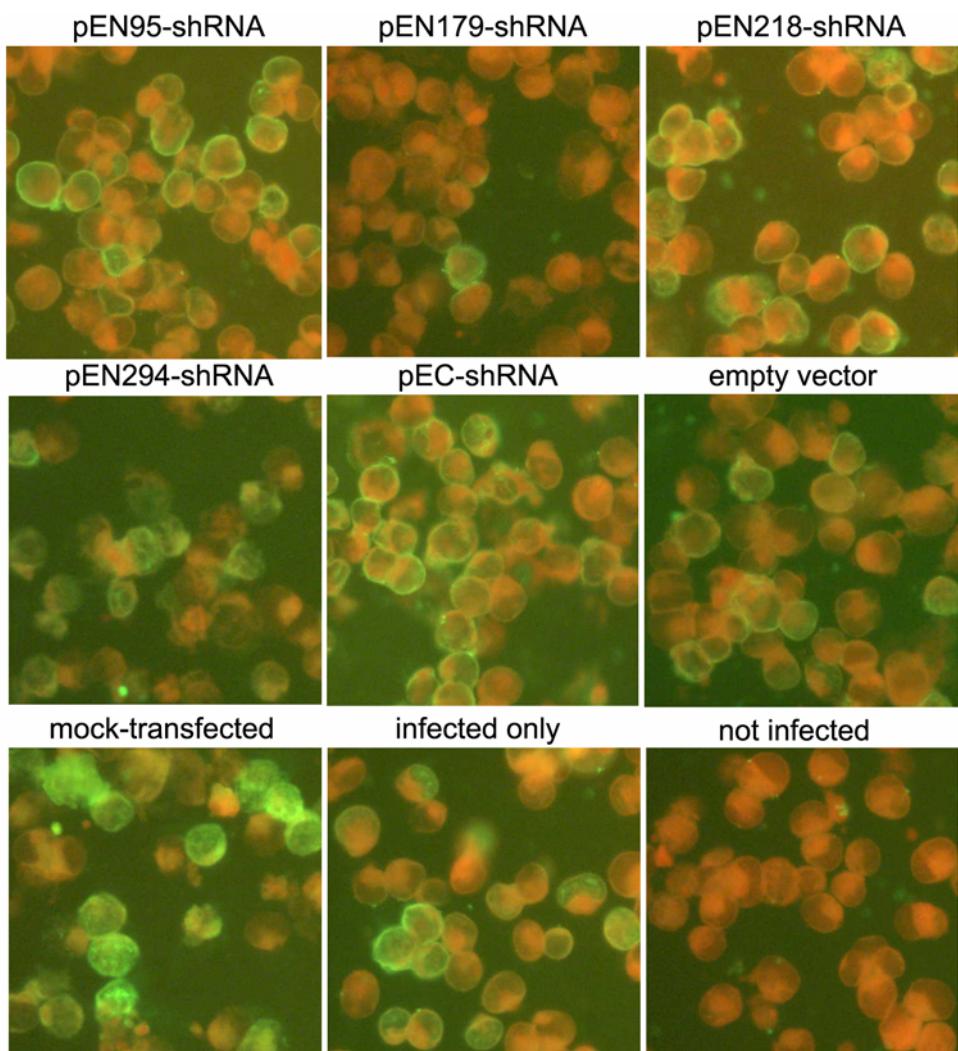


图 3-5 IFA 法检测 shRNA 表达载体在 MARC-145 细胞中对 PRRSV 复制的抑制作用

Fig. 3-5 Indirect fluorescence assay of inhibitory effect of shRNA expression vectors on PRRSV replication in MARC-145 cells

3.2.4 shRNA 表达载体在蛋白水平减少 N 蛋白表达

N 蛋白是 PRRSV 中含量最高的蛋白, 占病毒总蛋白含量的 20%~40%, 是 PRRSV 检测的最优选择。为了检测 pEN179-shRNA 表达载体处理 MARC-145 细胞中的 N 蛋白表达情况, 进行了 western-blot 检测。同时以 GAPDH 为内参照。从图 3-6A 可以看出, 在所有接毒的细胞中都出现了 N 蛋白特异条带, 但 pEN179-shRNA 处理细胞中的 N 蛋白的表达水平明显下降, pEC-shRNA (非特异序列载体对照)、infected only (不转染的接毒对照) 处理细胞中的 N 蛋白表达水平基本一致; not infected (空载体转染不接毒对照) 处理细胞没有出现 N 蛋白特异条带。为了检测 pEN179-shRNA 对 N 蛋白的抑制作用是否具有剂量依赖性, 分别以 0.4 μ g、0.8 μ g、1.5 μ g、2.0 μ g pEN179-shRNA 质粒转染 MARC-145 细胞, 细胞出现病变时 (约接毒后 60h) 收获细胞进行 western-blot 检测, 结果表明在 0.01MOI 接毒剂量时, 不同剂量的 pEN179-shRNA 对 PRRSV N 蛋白的表达抑制呈现剂量依赖性 (图 3-6B)。

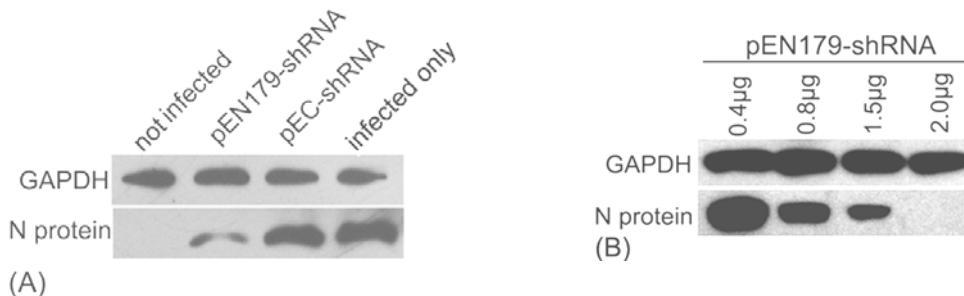


图 3-6 Western-blot 检测 shRNA 表达载体对 PRRSV N 蛋白的表达抑制

Fig. 3-6 Inhibitory effect of shRNA expression vectors on protein level

3.2.5 shRNA 表达载体在 RNA 水平减少 N 蛋白表达

为了检测 shRNA 表达载体在 RNA 水平对 N 蛋白的抑制作用, 用 Taqman 探针对 ORF7 mRNA 进行了定量检测, 同时设定 β -actin 内参照。此外, 为了消除转染水平带来的差异, 还设计了针对 GFP 的特异性探针。首先确定各基因的标准曲线 (图 3-7、图 3-8、图 3-9), 测定各处理细胞中 ORF7、GFP 与 β -actin RNA 的拷贝数 (表 3-5、表 3-6、表 3-7), 根据内参照 GFP 与 β -actin RNA 的拷贝数确定 shRNA 表达载体对 ORF7 mRNA 的抑制程度, 结果如图 3-10。pEN95-shRNA、pEN179-shRNA、pEN218-shRNA 和 pEN294-shRNA 处理细胞中 ORF7 RNA 水平与无转染接毒对照的相比分别下降 49%, 96%, 42% 和 51%, 与未用载体处理的接毒细胞相比, 非特异性对照载体 pEN-shRNA 和空载体 pEGFP-N1 处理细胞中的 ORF7 mRNA 水平也有一定程度的降低。为了检测 pEN179-shRNA 的抑制作用在 RNA 水平是否具有剂量依赖性, 以 0.4 μ g、0.8 μ g、1.5 μ g、2.0 μ g 的 pEN179-shRNA 质粒转染 MARC-145 细胞, 0.005MOI、0.01MOI、0.5MOI 等不同剂量接毒, 结果表明在 0.005-0.1MOI 接毒范围内 (图 3-11、图 3-12、图 3-13) pEN179-shRNA 对 PRRSV 复制的抑制作用呈现明显的剂量依赖性, 当接种剂量达到 1.0MOI 时, 抑制效果不明显 (数据未提

供)。

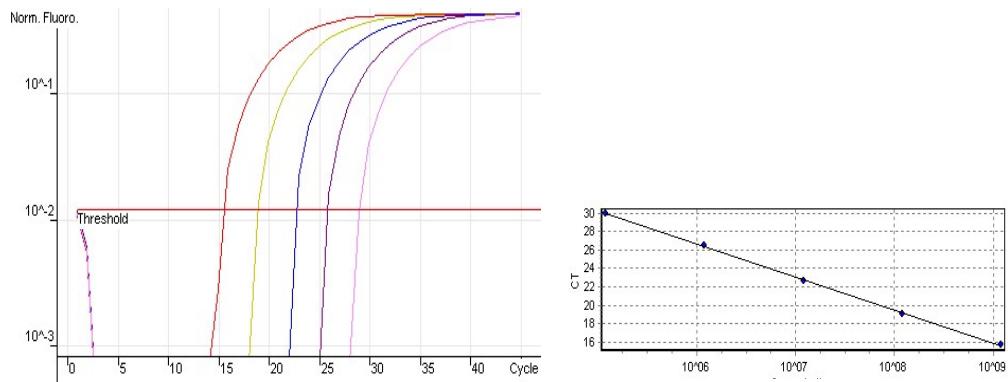


图 3-7 ORF7 基因的标准曲线

Fig. 3-7 Standard curve of ORF7 gene

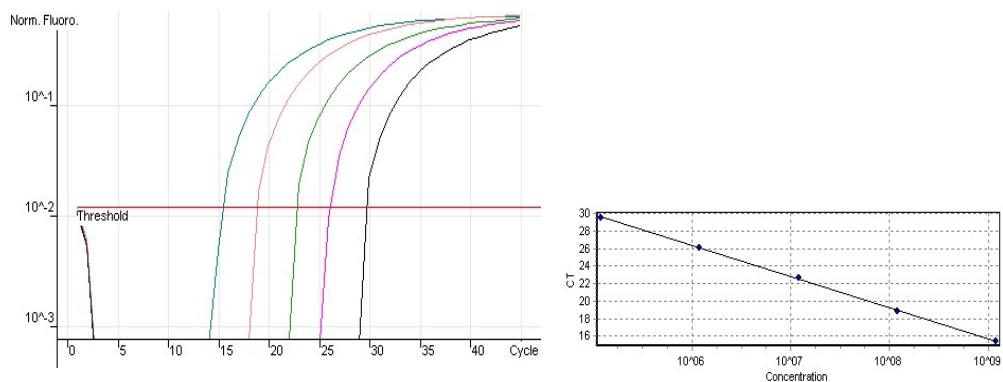


图 3-8 GFP 基因的标准曲线

Fig. 3-8 Standard curve of GFP gene

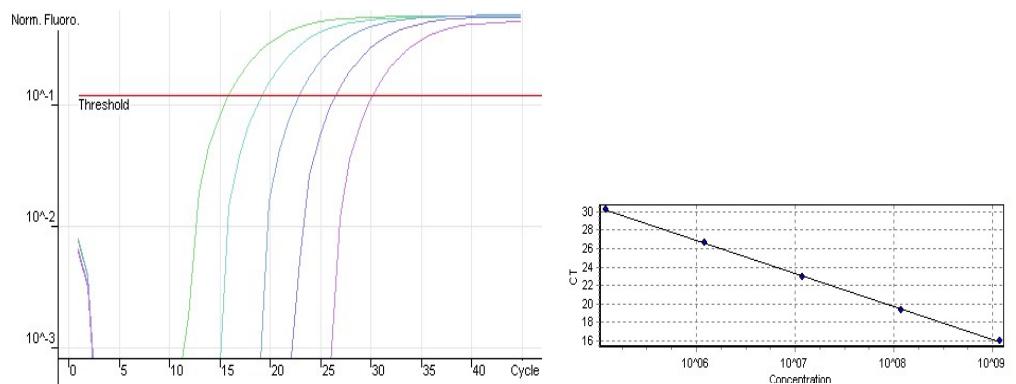


图 3-9 β -actin 基因的标准曲线

Fig. 3-9 Standard curve of β -actin gene

表 3-5 不同 shRNA 表达载体转染后 MARC-145 细胞后 ORF7 mRNA 的拷贝数

Table 3-5 mRNA copies of ORF7 in MARC-145 cells treated by different shRNA expression vectors

名称(copies/ml)	ORF7-95	ORF7-179	ORF7-218	ORF7-294	ORF7-EC	ORF7-EN	Infected only
1	4.31E+07	1.02E+06	2.65E+07	6.34E+07	4.37E+09	9.50E+07	5.27E+09
次数	2	3.79E+07	8.50E+06	4.37E+07	4.74E+07	1.60E+08	7.84E+07
	3	8.82E+07	5.0E+06	3.34E+07	7.28E+07	2.43E+08	1.59E+09
平均值		5.64E+07	4.91E+06	3.45E+07	6.12E+07	2.0E+09	4.61E+09

表 3-6 不同 shRNA 表达载体转染后 MARC-145 细胞后 GFP mRNA 拷贝数

Table 3-6 mRNA copies of GFP in MARC-145 cells treated by different shRNA expression vectors

名称(copies/ml)	GFP-95	GFP-179	GFP-218	GFP-294	GFP-EC	GFP-EN
1	1.74E+07	7.02E+06	2.65E+07	6.34E+06	4.37E+06	2.40E+07
次数	2	1.79E+07	9.50E+06	1.32E+07	5.72E+06	1.67E+07
	3	1.82E+07	1.99E+07	3.84E+07	1.24E+07	2.94E+06
平均值		1.78E+07	1.21E+07	2.60E+07	8.15E+06	2.34E+07

表 3-7 shRNA 表达载体转染后 β -actin mRNA 拷贝数Table 3-7 mRNA copies of β -actin in MARC-145 cells treated by different shRNA expression vectors

名称(copies/ml)	β -actin95	β -actin179	β -actin218	β -actin294	β -actinEC	β -actinEN	Infected only
1	1.09E+08	1.94E+08	8.50E+07	1.29E+08	7.43E+08	5.27E+09	7.52E+08
次数	2	1.54E+08	2.81E+08	2.18E+08	1.06E+08	6.04E+08	4.28E+09
	3	2.25E+08	9.60E+07	1.29E+08	9.98E+07	1.84E+08	4.28E+09
平均值		1.63E+08	1.90E+08	1.44E+08	1.12E+08	5.10E+08	7.00E+08

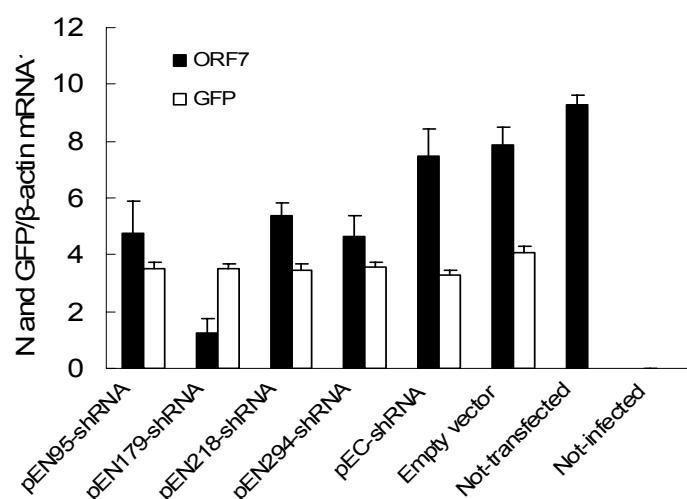


图 3-10 mRNA 水平检测 shRNA 表达载体的抑制效果

Fig. 3-10 Inhibitory effect of shRNA expression vectors on mRNA level of ORF7

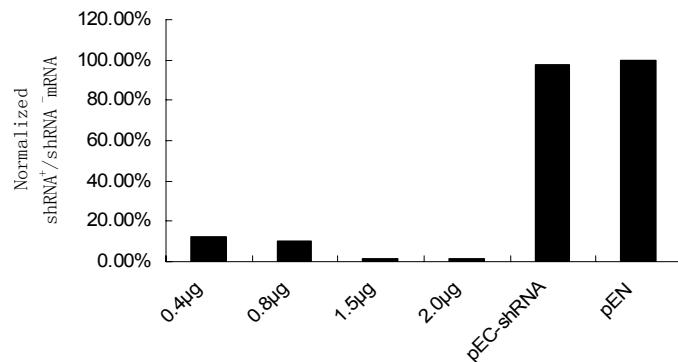
纵坐标表示 ORF7 RNA 拷贝数及 GFP 拷贝数经 β -actin 拷贝数校正后得到相应 RNA 的相对含量的平均值。

图 3-11 mRNA 水平检测 pEN179-shRNA 抑制作用的剂量依赖性 (0.005MOI)

Fig. 3-11 Detection of dose-dependant of pEN179-shRNA inhibitory effect on mRNA level when infected with

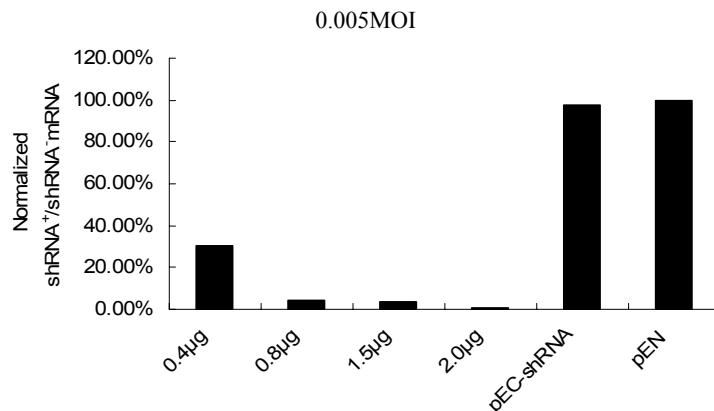


图 3-12 mRNA 水平检测 pEN179-shRNA 抑制作用的剂量依赖性 (0.01MOI)

Fig. 3-12 Detection of dose-dependant of pEN179-shRNA inhibitory effect on mRNA level when infected with 0.01 MOI

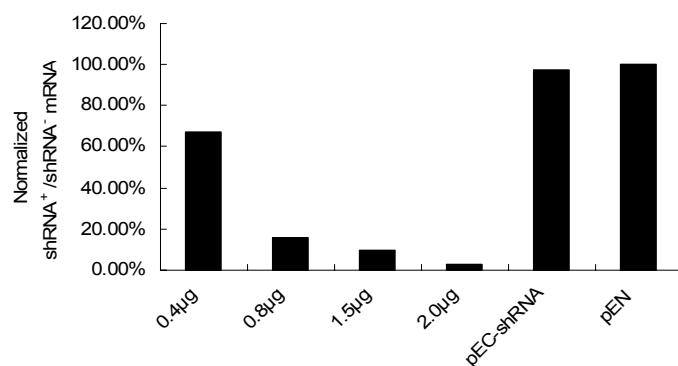


图 3-13 mRNA 水平检测 pEN179-shRNA 抑制作用的剂量依赖性 (0.1MOI)

Fig. 3-13 Detection of dose-dependant of pEN179-shRNA inhibitory effect on mRNA level when infected with 0.1 MOI

3.2.6 shRNA 表达载体对病毒毒价的影响

为了检测 shRNA 表达载体在 MARC-145 细胞上对 PRRSV 复制的抑制作用, 收集处理细胞的培养上清进行毒价滴定。结果表明 pEN179-shRNA 载体处理细胞的细胞上清毒价比空载体处理细胞上清毒价低 681 倍, pEN95-shRNA、pEN218-shRNA、pEN294-shRNA 处理细胞的细胞上清比空载体处理细胞上清毒价分别低 18、4 和 11 倍。纵坐标为 $CCID_{50}/mL$ 的对数刻度值。

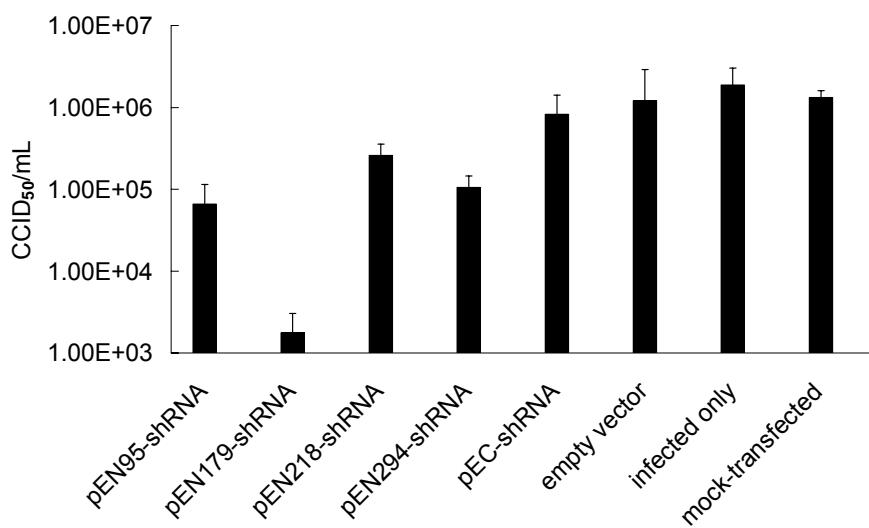


图 3-14 shRNA 表达载体对 MARC-145 细胞上 PRRSV 毒价的影响

Fig. 3-14 Effect of shRNA expression vectors to the titre of PRRSV on MARC-145 cells

3.3 讨论

RNAi 在体内外抑制病毒复制研究中已经取得很多成功, 有望成为抗病毒治疗的新工具。DNA 载体基础上的 RNAi 技术降低了研究成本, 延长了 RNAi 作用时间, 是体外研究的首选方法。本研究证明 shRNAs 表达载体可以有效抑制 PRRSV 在 MARC-145 细胞上的复制。

在本研究选择的四个 N 蛋白特异 RNAi 靶位点中, 发现 N179 位点对于 N 蛋白表达抑制效果最明显 (图 3-4、3-5、3-6)。因此靶位点的选择对干扰效果有很大影响。Reynolds 等对高效 siRNA 的特征进行总结, 证明高效 siRNA 的负链和正链 5' 端分别是 A/U 和 G/C, 无效 siRNA 则正好相反。推测末端碱基的不对称性对于决定解旋方向很重要, 可能有一个与解旋酶无关的蛋白或蛋白复合体通过与 siRNA 末端的 G/C 或 A/U 结合, 在 siRNA 解旋早期抑制或激活 siRNA 双链的解旋。siRNA 负链 5' 端的 G/C 及邻近富含 G/C 序列区可双重抑制解旋酶功能, 而 siRNA 正链 5' 端的 G/C 单碱基对就能抑制解旋酶的功能 (Reynolds *et al*, 2004)。根据 Reynolds 的解释, N218 和 N294 效果不明显可能是因为所选择序列不完全符合高效 siRNA 的特征, 而 N95 效果不明显可能是应为与 U6 启动子连接的+1 位碱基不是 G, 而+1 位的 G 对于 U6 启动子的正常转录是必要的 (Elbashir *et al*, 2002), 而 siRNA95 与 U6 启动子相连的第一个碱基不是 G, 可能影响了转录效

率, 从而影响了抑制效率。此外, siRNA 的干扰效率还受许多因素的影响。首先是 siRNA 序列本身方面的因素: 与 RNA 介导的沉默复合体 (RISC) 结合的稳定性、与 mRNA 配对特异性、内部热稳定性等; 其次是靶 mRNA 方面的因素: 靶 siRNA 结合的位置、mRNA 的二级和三级结构、与 mRNA 结合的蛋白所有这些因素都可能使 siRNA 干扰效率产生极大差异。

RNA 病毒在复制过程中能产生大量突变体, 这些突变体可帮助病毒逃避宿主免疫监视、抵抗药物, 同样也妨碍 siRNA 的识别, 因为在 RNAi 中即使有一个碱基不配对, 抑制效果都会明显减弱甚至消除。为了克服这些障碍, 在本研究中, 以 PRRSV 较保守的 N 蛋白为靶基因进行 RNA 干扰研究。因为在 PRRSV 的持续感染中, 结构基因一般变异较大, 但 N 蛋白基因遗传稳定 (Allende *et al*, 2000)。N 蛋白基因的这种遗传稳定性在持续感染 EAV 的马体中同样得到证实 (Hedges *et al*, 1999)。N 蛋白的遗传稳定性与 N 蛋白的多功能性有关: 首先 N 蛋白是组成病毒衣壳蛋白的唯一成分, 含量占总病毒蛋白的 40%, 通过共价键和非共价键相互作用, 为病毒衣壳组装提供基础, N 蛋白同时还和病毒基因组 RNA 结合 (Yoo *et al*, 2003); N 蛋白可以通过核定位信号依赖的核转运因子 a 和 h 途径进入细胞核, 和细胞的核纤维蛋白相互作用, 通过和细胞的 28S 和 18S 核糖体 RNA 结合, 抑制宿主细胞转录、破坏核-质运输途径、抗宿主抗病毒应答途径从而促进病毒复制。Lee 等突变北美洲型 PRRSV P129 分离株的感染性分子克隆中 N 蛋白的第 23 位半胱氨酸发现 N 蛋白的二聚化在 PRRSV 的感染性中是必要的 (Lee *et al*, 2005); 从 N 蛋白的 C 端开始对 N 蛋白进行截短, 发现缺失 6 个氨基酸时不会影响感染性病毒的产生 (Verheijen *et al*, 2001), 再多缺失一个氨基酸就不会产生感染性病毒粒子。对于 3' UTR, 可以缺失紧挨 ORF7 下游的 7 个氨基酸, 额外的缺失将是致死性的, 表明 3' UTR 对于病毒 RNA 的复制是必要的, 截短的 N 蛋白抑制病毒粒子的组装。N 蛋白的 C 末端形成强的 β 折叠, 对于整个蛋白的构象形成是必要的 (Wootton *et al*, 2001; Doan *et al*, 2003)。所有这些表明 N 蛋白在病毒组装复制和持续感染、逃避宿主免疫机制中发挥重要作用。

多数哺乳动物细胞对病毒 dsRNA 中间体具有潜在抗病毒反应, 长度大于 30nt 的 dsRNA 将诱导干扰素 (IFN) 生成, 并激活 STAT 途径参与 PKR (dsRNA 依赖性激酶) 的转录, 同时 dsRNA 本身也能激活 PKR, 继而使翻译起始因子 eIF2a 磷酸化而失活, 导致非特异的蛋白质停止, 另一方面, dsRNA 能诱导细胞产生多种抗病毒蛋白的 2'、5' -寡腺核苷合成酶, 生成的 2'、5' -腺苷可以激活非特异性的 RNA 酶 L, 发生 RNA 的非特异性降解, 进而导致细胞凋亡。但是在鼠胚胎中注射 dsRNA 不会引起 RNA 的非特异降解, 后来证明这种情况仅发生在胚胎细胞系中 (Billy *et al*, 2001; Yang *et al*, 2001; Paddison *et al*, 2002), Tuschl 等用化学合成的 Dicer 产物类似物在果蝇胚胎提取物中获得成功后 (Tuschl *et al*, 1999), Fire 等 (Caplen *et al*, 2001) 证明化学合成的 21nt 的 siRNA 在多数人和鼠细胞中能介导特异基因沉默, 使得 siRNA 的合成技术迅速发展, 成为哺乳动物基因沉默研究的工具。Watanabe 等用 U6 启动子表达正链上带有突变的长 dsRNA, 有效抑制了 HCV 的复制, 没有引起干扰素反应和 shRNA 引起的细胞死亡 (Watanabe *et al*, 2006)。在 Ge 等的体内 RNAi 抑制流感病毒的研究中证明载体表达的 shRNA 对病毒的抑制作用是特异的 (Ge *et al*, 2004), Wang 等对 6 个载体基础上的 siRNA 抑制 SARS-CoV 复制中的作用进行研究中也有报道, 他们发现有两个能有效阻断 SARS-CoV 在 Vero 细胞中的复制, 同时空载体和非特异 siRNA 表达载体在某种程度上对 SARS-CoV 也有抑制作用, 他们推测可能是产生的非特异 dsRNA 诱导干扰素产生抑制了病毒复制 (Wang *et al*, 2004), 但这种作用并未影响 RNAi 的特异

性。在本研究中, 从定量和毒价滴定结果可以看出, 与未处理细胞相比, 空载体和不相关序列载体, 对病毒的复制也有一定抑制效果, 但这种作用并不影响 pEN179-shRNA 的高效性和特异性, 这些载体是否产生诱导了干扰素效应还有待进一步检测。

与 PCR 方法制备的 shRNA 表达盒相比, 载体表达的 shRNA 对 PRRSV 的抑制中也是 N179 位点效率最高, 只是在抑制作用维持时间上有差异, 载体表达的 pEN179-shRNA 处理 MARC-145 细胞接毒后可维持正常生长一周以上。此外, 和 PCR 方法制备的 shRNA 表达盒相比, 表达的 shRNA 的载体可以很容易通过提质粒大量制备, 适合用于体内研究。shRNA 表达载体的构建是受 miRNA 发现的启发, miRNA 是一类非编码蛋白小分子 RNA, 其前体是约 70nt 的发夹结构, 由 RnaseIII 蛋白 Drosha 和 Dicer 共同酶解作用产生约 22nt 的有活性的 miRNA, 并由 Exportin-5 转运出核, 通过与 siRNA 相似的机制, 导致 mRNA 降解。此外, miRNA 还有可能与特定 mRNA 的 3' 端非翻译区结合, 阻止转录后翻译。Brummelkamp 等使用 H1 启动子构建一个表达发夹结构的载体, 含 19nt 的 stem 和短的 loop, 使用这一系统抑制 CDH1 和 p53 的表达, 效果与转染的 siRNA 一致 (Brummelkamp *et al*, 2002b)。用基于 let-7 前体的 RNA 结构, Paddison 等构建了表达含有针对荧光素酶 mRNA 上 32nt 的发夹, 转染果蝇 S2 细胞, 他们发现, 尽管 let-7 结构基础上的发夹能降解荧光素酶 mRNA, 但是含有简单的、与靶序列完全互补 stem 的发夹最有效, 为了在哺乳动物细胞中表达 siRNA, 他们构建了含有 U6 启动子的表达系统, 29nt 与荧光素酶基因完全互补的 stem 和 8nt 的 loop。Kswasaki 和 Taira 用 tRNA Val 启动子构建了一个表达系统, 此系统产生的发夹表现出强的细胞质定位, 可以被 Dicer 有效处理为 siRNA。Hutvagner 和 Zamore 发现将 100mmol/L 的发夹结构 pre-let7 RNA 放于 Hela 细胞质提取物中, 可得到 5nmol/L 的 Dicer 处理产物 (let7 miRNA), 和同一序列的 100nmol/L 的 let7 siRNA 干扰效果相同。这表明由 Dicer 切割产生的 RNA 分子比合成的 siRNA 更容易进入 RISC 介导的切割途径。

Ren 等用 shRNA 载体明显稳定抑制了 HBV 蛋白表达和复制, 抑制作用可持续 30 代 (Ren *et al*, 2005)。Li 等用流感病毒 siRNA 表达载体能够抑制流感病毒蛋白表达和复制 (Li *et al*, 2005)。Miyagishi 等比较了不同 siRNA 表达载体系统, 包括茎长、环的序列、茎序列中插入突变/泡对沉默效果及载体稳定性的影响 (Miyagishi *et al*, 2004)。发现带有 21nt 茎长的 U6 启动子驱动的发夹, 正义链中带有 3~4 个突变的, 来自 microRNA 的 9nt 环序列的 siRNA 表达载体最佳。此外还证明带有四环素调节型 U6 启动子的 siRNA 表达载体可以控制细胞内 RNAi。证明突变发夹 siRNA 及其编码载体遗传稳定, 可以用于基因敲除实验。

Kasim 等描述用 Cre-loxP 控制 U6 启动子表达 siRNA 的重组系统 “Cre-On” siRNA 表达载体 (Kasim *et al*, 2004), 通过在培养基中加入 Cre 重组酶催化启动删除, 通过报告基因检测干扰效率, 证明 TAT-NLS-Cre 发生了质粒重组, 产生了 siRNA 抑制了报告基因活性, 这个系统可以使实验和治疗在一定时间、空间、特异细胞、特异组织控制 RNAi 的方式和力度。

Boden 等报道了用重组腺病毒 2 (rAAV-2) 将 shRNA 表达盒转入人细胞, 在 H9 细胞和原代人淋巴细胞中靶向病毒反式激活蛋白 tat 的 shRNA 抑制该蛋白表达比对照少 95%, rAAV-2 稳定整合到宿主基因组, 使 tat 特异性 shRNA 长效表达 (Boden *et al*, 2004)。

Kumar 等 (2006) 使用表达 shRNA 的慢病毒载体或者化学合成的 siRNA, 选取在所有虫媒病毒中保守的病毒囊膜病毒蛋白结构域 II 中 cd 环编码序列, 用只在 JEV-或 WNV-中保守的 siRNA 仅能抵抗相应病毒, 使用 JEV-和 WNV 中都保守的 siRNA 能够抵抗两种病毒, 在攻毒之前一次

性颅内接种慢病毒介导的 shRNA 或脂质体包裹的 siRNA 或者在攻毒后使用 siRNA 都足以保护小鼠抵抗致死性脑炎(Kumar *et al*, 2006)。证明 RNAi 基础上的干扰作用完全可以保护小鼠抵抗 JEV 和 WNV-引起的脑炎。第一次证明 siRNA 可作为治疗多种病毒引起的脑炎的广谱抗病毒试剂。

在 western blot 中, 本研究使用 GAPDH (一种管家基因, 在同种细胞或者组织中的蛋白质表达量一般是恒定的) 校正在实验中可能存在总蛋白浓度确定; 或者蛋白质样品在电泳前上样时产生的样品间的操作误差。结果表明 pEN179-shRNA 可明显抑制 N 蛋白表达, 而且这种抑制是特异的, 因为 GAPDH 的表达量没有受到影响。

本研究使用 Taqman 探针的原因是该方法高度特异, 其核心是利用 Taq 酶的 3' -5' 外切核酸酶活性, 切断探针, 产生荧光信号。由于探针与模板是特异性结合, 所以荧光信号的强弱就代表了模板的数量。TaqMan 探针是一种寡核苷酸探针, 荧光基团连接在探针的 5' 末端, 而淬灭剂则在 3' 末端。当探针与靶序列配对时, 荧光基团发射的荧光因与 3' 端的淬灭剂接近而被淬灭。在进行延伸反应时, 聚合酶的 5' 外切酶活性将探针切断, 使得荧光基团与淬灭剂分离, 发射荧光。一分子的产物生成就伴随着一分子的荧光信号的产生。随着扩增循环数的增加, 释放出来的荧光基团不断积累。本研究使用探针 5' 端基团为 FAM (6-羧基荧光素) 或 ROX, 3' 端的 eclipse 为非荧光染料, 淬灭报告基团, 但自身不发射荧光, 因此, 探针荧光本底低, 信噪比更大, 检测灵敏度更高。

在引物探针设计中通常遵守如下原则: A、引物与模板的序列要紧密互补; B、引物与引物之间避免形成稳定的二聚体或发夹结构; C、引物不能在模板的非目的位点引发 DNA 聚合反应(即错配); D、引物长度通常在 20-25bp, Tm 值在 55~65°C, GC 含量在 40%~60%, 产物大小在 100 左右; E、引物的 3' 端避免使用碱基 A; 引物 3' 端避免出现 3 个以上连续相同的碱基; F、为避免基因组的扩增, 引物设计最好能跨两个外显子。探针设计通常遵守如下原则: A、探针位置尽可能地靠近上游引物; B、探针长度通常在 20~30bp, Tm 值在 65~70°C, 通常比引物高 5~10°C, GC 含量在 40%~70%; C、探针的 5' 端应避免使用碱基 G; D、探针碱基 C 的含量要明显高于 G 的含量。为确保引物探针的特异性, 将设计好的序列在 blast 中核实, 如果发现有非特异性互补区, 重新设计引物探针。

本研究采用使用相对定量法进行定量, 具体方法是用已知外参物做标准曲线, 在同等条件下目的基因测得的荧光信号量同标准曲线进行比较, 根据该标准曲线得到目的基因 (ORF7 或 GFP) 和管家基因 (β -actin) 的量, 再将目的基因同管家基因的比值作为定量的最后结果。相对定量可靠和准确, 存在于反应体系中的干扰因素, 如样本不纯、试剂影响等都可以通过数学处理而去除。使用标准品为纯化的质粒。

在实时定量 PCR 过程中, 从样本的准备到扩增, 再到定量的进行, 实验中的各个方面都与实验的重复性息息相关, 除了加样的准确性和实验所选用的仪器固定参数的限制之外, 影响结果重复性较为关键的因素还包括 (1) PCR 反应扩增的效率, 如果在反应体系中扩增效率不一致, 就会影响到目的基因在单位时间内的产量发生差异, 从而影响到结果的稳定, 本研究通过优化实验条件, 使反应体系达到了最佳扩增效率。(2) 目的基因的初始浓度, 初始拷贝数越低, 结果的重复性越差, 为了保证获得精确的结果, 应使用初始浓度具有较高数量级的样本, 如果待测样本中目的基因的量处于反应体系的检出限附近, 那么最好是使用重复孔以保证结果的可靠性。(3) 标准曲线的影响, 对于必须进行绝对定量的研究, 标准曲线是必不可少的, 虽然标准品和样本之

间的差异始终存在，但是制作一个好的标准曲线对定量结果至关重要，在制作标准曲线时，应至少选择 5 个稀释度的标准品，涵盖待测样本中目的基因量可能出现的全部浓度范围，理想的标准品应与样本具有高同源性，最好是选择纯化的质粒 DNA 或是体外合成、转录的 RNA（用于 RT-PCR）。

一般的实时定量 PCR 反应只须 25~30 个循环便可获得满意的结果，适当增加循环数可以提高反应的检出限，有文献报导当循环数从 25 增加到 34 个循环时，实时定量 PCR 的最低检出限可从 10^6 增加到 10^3 。但是并非循环数增加得越多，其敏感性就会越高，实际上，当循环数增加到某一值时，敏感性便不再升高，因为循环数并不是影响敏感性的唯一因素，而且在实验过程中，也不可能因为增加敏感性而无限制地增加循环数，因为随着循环数的增加，一方面，聚积的产物会抑制 Taq 酶的活性，另一方面，也会增加形成异源二聚体的可能性，这些都会影响到最终的定量结果。

在本研究中对 Mg^{2+} 的浓度和引物的浓度都进行了优化，因为 Mg^{2+} 的浓度将影响到实时定量 PCR 的敏感性，首先， Mg^{2+} 是影响 Taq 酶活性的关键因素，如果 Mg^{2+} 的浓度无法达到使 Taq 酶发挥最佳活性，将会影响到实时定量的敏感性；其次， Mg^{2+} 的浓度过高，会增加引物二聚体的形成，从而导致敏感性降低。所以在反应中选择合适的 Mg^{2+} 浓度条件，是相当重要的，本研究使用浓度为 3mmol/L。

引物的浓度是另一个影响 PCR 反应的关键因素，其浓度太低，会致使反应不完全，若引物太多，则发生错配以及产生非特异的产物的可能性会大大增加。在本研究中使用了 0.4mmol/L 这一浓度；此外在探针浓度摸索中，如果探针浓度太高，荧光初始值则太高，扩增曲线不理想，经过摸索确定引物探针浓度，直至达到满意的结果。

此外，PRRSV 的基因组同其它单股正链 RNA 病毒的基因组一样，即可以作为信使 RNA 又可作为复制模板，更有利于 RNAi 的研究。

第四章 PRRSV ORF2~4 特异 siRNA 的筛选及其抑制效果的研究

摘要：为了检测 pEN179-shRNA 在抑制 PRRSV ORF7 mRNA 的同时，次要结构蛋白 GP2、GP3、GP4 mRNA 表达水平的变化情况，设计了针对 ORF2、ORF3、ORF4 的 Taqman 探针和引物。结果表明，次要结构蛋白编码基因 ORF2、ORF3、ORF4 的 mRNA 分别减少 60%、30%、55%。为了了解次要结构蛋白 GP2、GP3、GP4 在病毒复制中的作用，针对 ORF2、ORF3、ORF4 分别选取 4 个 siRNA 位点（共 12 个），构建了相应的 shRNA 表达载体，转染 MARC-145 细胞后，通过荧光定量 PCR 和病毒滴度测定检测干扰效果。筛选了可以减少 GP2、GP3、GP4 相应基因 mRNA 含量的 ORF2、ORF3、ORF4 特异 shRNA 表达载体，病毒效价滴定表明可以减少 GP2、GP3、GP4 相应基因 mRNA 含量的 shRNA 表达载体处理细胞培养上清中的病毒滴度比对照低 184-4.65 倍。

关键词：RNAi, siRNA, shRNA, PRRSV, ORF2, ORF3, ORF4

在 PRRSV 中，次要结构蛋白 GP2a、GP3、GP4 和 E 相互作用，以异源多聚体的形式组装进 PRRSV 颗粒，它们对形成感染性病毒颗粒是必要的，不表达 GP2a、E、GP3 或 GP4 蛋白的基因敲除载体仍然能够组装成病毒粒子，但不具感染性 (Wissink *et al*, 2005)。Welch 等证明缺失 ORF2、ORF4 的 PRRSV 能够在提供相应缺失蛋白的细胞系中得到拯救 (Welch *et al*, 2004)。GP3 在动脉炎病毒糖蛋白中好像占有特殊的位置，它的膜拓扑结构没有确定 (Hedges *et al*, 1999; Wieringa *et al*, 2004)，是否存在病毒粒子中也还有争议。在 LDV 中，GP3 证明是非结构可溶性糖蛋白，可以从感染细胞中分泌出去 (Faaberg *et al*, 1997)；在 EAV 中，GP3 被证明以结构蛋白形式组装进病毒粒子 (Wieringa *et al*, 2002)。对于 PRRSV，两种情况都有，欧洲型 PRRSV LV 分离株的 GP3 被证明存在病毒粒子中，而北美分离株的 GP3 则被证明以分泌形式存在 (sGP3) (Gonin *et al*, 1998; Mardassi *et al*, 1998)。E 蛋白 sgRNA2 的产物，大小约 10 kDa，是新鉴定的小的非糖基化疏水性囊膜蛋白，有一个潜在的 N 末端 N 豆蔻酰化位点和一个络氨酸激酶 II 磷酸化酶位点、一个中心疏水域和一个富含碱性残基的亲水 C 末端，存在于所有动脉炎病毒粒子中 (Snijder *et al*, 1999)。据报道，突变 E 蛋白的翻译起始密码子，导致 EAV 感染性分子克隆感染性丧失。

这些研究都是建立在感染性分子克隆或体外表达基础上的，本研究通过 RNAi 技术抑制 ORF2、ORF3、ORF4 的表达，研究相应蛋白在病毒感染中的作用。

4.1 材料与方法

4.1.1 质粒、细胞和病毒

含鼠 U6 启动子的质粒载体 pBS-U6 由美国哈佛医学院 Guangchao Sui 博士惠赠 (Sui *et al*, 2002) , pEGFP-N1 购于 Biosciences Clontech, pMD18-T 为 Takara 公司产品。

MARC-145 细胞(非洲绿猴肾细胞 MA-104 的衍生细胞系)用含 10% FBS、青霉素 100IU/ml、链霉素 100 μ g/ml、pH7.2 的 DMEM、5% CO₂ 条件下培养。

PRRSV CH-1a (属于北美洲型) 分离株由本室保存 (郭宝清 等, 1996)。

4.1.2 试剂

试剂 EcoO109I(Takara), 质粒纯化试剂盒(Promega), RNA 提取试剂盒(Qiagen), lipofectamin 2000TM (Invitrogen)、Opti-MEM[®] I 低血清培养基、DMEM (Gibco); 禽源反转录酶(AMV)、EX-taq 酶为 Takara 公司产品。

PRRSV GP2、GP3、GP4 及 N 蛋白特异性单克隆抗体本教研室周艳君博士提供 (周艳君 等, 2005; Zhou *et al*, 2006), GAPDH 特异性单克隆抗体购于上海康成生物技术有限公司、FITC 标记羊抗鼠 IgG 购于北京中杉金桥生物技术有限公司。

4.1.3 仪器

Roter-gene3000 荧光定量 PCR 仪 (Corbett research), eppendorf Biophotometer 核酸浓度测定仪 (Eppendorf), Nikon TS100 倒置显微镜 (Nikon), LEICA HC 荧光显微镜 (Leica), 生物安全柜 (Forma Scientific), CO₂ 养箱 (Forma Scientific), HZQ-C 空气浴振荡摇床 (哈尔滨东联电子技术有限公司)、PCR 仪 (Takara) 等。

4.1.4 ORF2、ORF3、ORF4 的扩增及克隆载体的构建

ORF2、ORF3、ORF4 扩增所用引物序列见表 4-1 (北京三博远志生物技术有限公司合成)。将扩增所得 PCR 产物与 T 载体连接, 测序。测序正确的质粒经引物所带相应酶进行消化, 回收目的片段, 连入 pEGFP-N1 载体相应位点, 酶切鉴定, 鉴定正确的质粒用质粒纯化试剂盒(Promega) 纯化, 并测定浓度, -20°C 保存备用。

表 4-1 扩增 ORF2、ORF3 和 ORF4 所用引物
Table 4-1 Primers for ORF2, ORF3 and ORF4 amplification

引物名称	引物序列	引物长度	酶切位点	Tm°C
ORF2-P1	5'TTTGTGACCGCCACCATGGAATGGGTCTATGC3'	34	<i>Sal</i> I	70
ORF2-P2	5'CCCGGATCCCGTGAGTTCAAAAGAAAAAT3'	29	<i>Bam</i> HI	63
ORF3-P1	5'TTTAAGCTTGCCACCATGGCTAATAGCTGTAC3'	32	<i>Hind</i> III	64
ORF3-P2	5'TTTGGATCCGCCGTGCGGCACTGAGAG3'	28	<i>Bam</i> HI	70
ORF4-P1	5'TTTAAGCTTGCCACCATGGCTGCGCCCTTCTT3'	33	<i>Hind</i> III,	69
ORF4-P2	5'TTTGGATCCATTGCCAGTAGGATGGCAAA3'	29	<i>Bam</i> HI	63

4.1.5 Taqman 探针及引物的设计

根据 PRRSV CH-1a 的 ORF2、ORF3、ORF4 序列设计特异的 Taqman 探针和引物，探针 5' 标记 ROX，3' 标记 Eclipse（见表 4-2），由 Takara 公司合成，引物探针的稀释方法参考表 3-3。使用 β -actin 为内参，所用 Taqman 引物和探针同第三章。

表 4-2 ORF2、ORF3、ORF4 的 Taqman 探针和引物
Table 4-2 Taqman probes and primers of ORF2, ORF3 and ORF4

引物名称	引物序列	引物长度	位置	Tm°C	GC%
ORF2-F	5'AGTTGGATGTGGTGGCTCATT3'	22	421	59	45
ORF2R	5'CGCAGGTTGTGTAGCATGGG3'	20	518	59.7	60
ORF2P	5' (ROX) TGCCGCCATTGAAGCCGAGACCTG (Eclipse) 3'	24	453	68.5	62
ORF3F	5'CAATTCTGCGCCGTTCAC3'	21	424	59.1	52
ORF3R	5'TGCTGGTAGTAGGTCTGAAATACG3'	24	512	58.8	45
ORF3P	5' (ROX) AGAACGCCACCTTGCCTCGCCAT (Eclipse) 3'	23	452	67.9	60
ORF4F	5'TCCTCATGCTTCTTCTTGC3'	20	287	58.1	45
ORF4R	5'TGATACACACAGGCCACGATG3'	20	388	59.1	50
ORF4P	5' (ROX) TTGCCAACACCACTTGAATCCC (Eclipse) 3'	24	336	68.0	46

4.1.6 siRNA 筛选及 shRNA 表达盒设计

使用以下公司（Invivogen、GenScript、PROMEGA、Ambion、Dharmacon、QIAGEN、Stratagene）提供的 siRNA 设计工具，结合 Reynolds 高效 siRNA 法则筛选特异 siRNA 位点，为了保证干扰效果，每个基因依然选取 4 个位点，按一步 PCR 扩增 shRNA 表达盒方法设计下游引物（表 4-3），上游引物为：5'-AgTgAGGTCTgATCCgACgCCgCCATCTCTA-3'，由于在测序过程中发现带发夹结构的序列测序比较困难，因此在靠近发夹结构上游 120~141bp 处设计了测序引物：

5'-CTTAATGTGCGATAA AAGACAG-3'。由 invitrogen 公司（上海）合成。

表 4-3 ORF2、ORF3 和 ORF4 特异 siRNA 及相应表达盒的下游引物

Table 4-3 ORF2, ORF3 and ORF4 specific siRNAs and the reverse primers of correspondent shRNA expression cassettes

引物名称	siRNA序列及下游引物（81bp）
GP2-shRNA74	5'-GACAG'GACCT <u>AAAAA</u> GGTGTCCATTGTTGATATC tctcttgaa GATATCAACAATGGACACCAAACAAGGCTTTCTCAA-3'
GP2-shRNA96	5'-GACAG'GACCT <u>AAAAA</u> GGACATCAAGACCAACACT tctcttgaa AGTGTGGTCTTGATGTCAAACACAAGGCTTTCTCAA-3'
GP2-shRNA206	5'-GACAG'GACCT <u>AAAAA</u> GCAATTACAGAAGATCCTA tctcttgaa TAGGATCTTCTGTAATTGCAAACACAAGGCTTTCTCAA-3'
GP2-shRNA400	5'-GACAG'GACCT <u>AAAAA</u> GCTACACTGTCTCGCATT tctcttgaa TAATGCGAGACAGTGTAGCAAACACAAGGCTTTCTCAA-3'
GP3-shRNA145	5'-GACAG'GACCT <u>AAAAA</u> GTGAATTACACGGTGTGTC tctcttgaa GACACACCGTGTAAATTCAAACACAAGGCTTTCTCAA-3'
GP3-shRNA305	5'-GACAG'GACCT <u>AAAAA</u> GCCACTTGACCAGTGT tctcttgaa TAAACACTGGTCAAAGTGGCAAACACAAGGCTTTCTCAA-3'
GP3-shRNA418	5'-GACAG'GACCT <u>AAAAA</u> GCACCAATTCTGCGCC tctcttgaa GGCGCAGATGAATTGGTGCAAACACAAGGCTTTCTCAA-3'
GP3-shRNA534	5'-GACAG'GACCT <u>AAAAA</u> GTTCACCTAGAATGGCTG tctcttgaa CAGCCATTCTAGGTGAAACACAAGGCTTTCTCAA-3'
GP4-shRNA96	5'-GACAG'GACCT <u>AAAAA</u> GACATCAAGACCAACACTA tctcttgaa TAGTGTGGTCTTGATGTCAAACACAAGGCTTTCTCAA-3'
GP4-shRNA103	5'-GACAG'GACCT <u>AAAAA</u> GACCAACACTACCGCAGCA tctcttgaa TGCTCGGTAGTGTGGTCAAACACAAGGCTTTCTCAA-3'
GP4-shRNA398	5'-GACAG'GACCT <u>AAAAA</u> GCTACGTCAAACATGTCA tctcttgaa TTGACATGTTGGACGTAGCAAACACAAGGCTTTCTCAA-3'
GP4-shRNA453	5'-GACAG'GACCT <u>AAAAA</u> GCGACTGCTTCATTCATG tctcttgaa CATGAAATGAAGCAGTCGCAAACACAAGGCTTTCTCAA-3'
C-shRNA	5'-GACAG'GACCT <u>AAAAA</u> GACCTTGATCCGTCTTAC tctcttgaa GGTAAGACGGATCAAGGTCAAACACAAGGCTTTCTCAA-3'

注：表中下划线部分为 *Eco*O109I 酶切位点部分，加粗部分为 siRNA 正义和反义链，小写字体为 loop 环序列，方框内序列为 5 个连续 T

终止信号互补序列，紧靠 3' 端的无标记序列为 U6 启动子 3' 端的互补序列，紧靠 5' 端的 3nt 无标记序列为引物保护性碱基。

4.1.7 shRNA 表达载体的构建

以含鼠 U6 启动子的质粒 pBS-U6 为模板，采用一步 PCR 扩增法扩增带 U6 启动子的 shRNA 表达盒，连入 pMD18-T 载体测序，测序正确后用 *Eco*O109I 酶切处理回收目的片段，同时 pEGFP-N1

也用 *Eco*O109I 酶切处理, 胶回收纯化线性化 pEGFP-N1 载体, 小牛碱性磷酸酶 (CIAP) 去磷酸化, 将去磷酸化处理的 pEGFP-N1 载体与纯化回收的目的片段用 T4 DNA 连接酶连接, 连接产物转化 DH5 α 感受态细胞, LB 平板卡那霉素 (100 μ g/ μ l) 筛选。小量提取质粒, 随后用 *Eco*O109 I 酶切鉴定, 1% 琼脂糖电泳观察。鉴定正确的质粒, 用 Promega 质粒纯化试剂盒纯化, 测定浓度, -20°C 保存备用。

4.1.8 shRNA 表达载体的转染及病毒的感染

转染前一天将 MARC-145 细胞在 24 孔细胞培养板中铺成单层, 用不含抗生素的 DMEM(10% FBS) 培养。转染前用无血清 DMEM 洗涤细胞一遍, shRNA 表达载体 (1 μ g) 和 lipofectamin 2000TM 按 1:2 进行混合, 按 2.1.8 转染法进行操作, 转染后 6h 后接入 0.01MOI 的 PRRSV, 感作 1h 后, 吸去病毒液, 用含 4% 血清的 DMEM 换液, 逐日观察病变。

4.1.9 荧光定量 PCR 检测抑制效果

根据测定的核酸浓度按公式计算标准品 pMD18-T-actin、pEGFP-ORF2、pEGFP-ORF3、pEGFP-ORF4 的拷贝数, 拷贝数 = (质量 \div 分子量) \times 6.0 \times 10²³。分别设定 1.2 \times 10⁹ 拷贝/ml、1.2 \times 10⁸ 拷贝/ml、1.2 \times 10⁷ 拷贝/ml、1.2 \times 10⁶ 拷贝/ml、1.2 \times 10⁵ 拷贝/ml、1.2 \times 10⁴ 拷贝/ml 等 6 个不同浓度。按 3.1.10 方法提取处理细胞的细胞质 RNA, 反转录后对目的基因进行定量分析, 同时使用 β -actin 作为内参, 用来校正在样品制备中可能产生的样品间的操作误差。检测最佳标准曲线范围, 进行 Real-Time PCR 扩增, 确定各基因的标准曲线。

4.1.10 病毒毒价滴定检测抑制效果

当细胞病变出现时, 收集各处理细胞的培养上清, 10 倍系列稀释, 共 7 个稀释度, 接种于预先在 96 孔板培养的 MARC-145 细胞中, 100 μ l/孔, 每个样品设 3 个重复。观察细胞病变, 直到没有细胞病变孔出现, 按 Karber 法计算 CCID₅₀/ml。

4.2 结果

4.2.1 shRNA 的扩增及表达载体的构建

在 shRNA 表达盒扩增的上、下游引物中都带有 *Eco*O109I 位点, 所有扩增片段大小约 400bp, 扩增的 PCR 产物电泳如图 4-1, 扩增片段大小与预期相符。将所得 PCR 产物纯化后, 连入 pMD18-T 载体中, 测序, 选取与设计序列一致的阳性质粒, 经 *Eco*O109I 酶切, 回收目的片段, 连入 pEGFP-N1 载体的 *Eco*O109I 位点, *Eco*O109I 酶切鉴定阳性质粒, ORF2、ORF3、ORF4 特异 shRNA 表达质粒分别命名为 21、22、23、24、31、32、33、34、41、42、43、44, 纯化鉴定为阳性的 shRNA

表达载体, 测定浓度, -20℃保存备用。

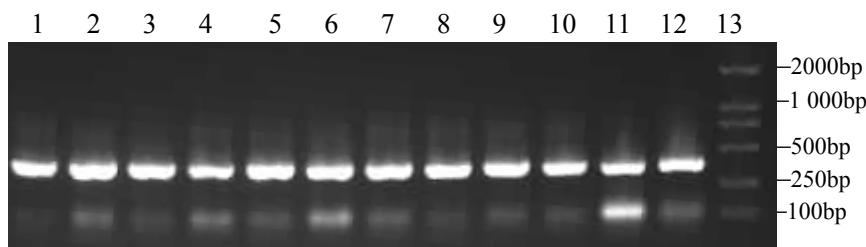


图 4-1 shRNA 表达盒的扩增

Fig. 4-1 Amplification of shRNA expression cassettes

1-12 分别为 21、22、23、24、31、32、33、34、41、42、43、44, 13.DNA 分子量标准 DL2000

4.2.2 ORF2、ORF3、ORF4 的扩增及重组质粒的鉴定

为了制备荧光定量 PCR 中 ORF2、ORF3、ORF4 的标准品, 扩增 ORF2、ORF3 和 ORF4 全基因 (图 4-2), 分别克隆到 pEGFP-N1 载体中, 构建 pEGFP-ORF2、pEGFP-ORF3、pEGFP-ORF4 重组质粒, 经 *Bam*HI 和 *Hind*III 酶切鉴定, 结果显示所获得片断与预期大小相一致, 如图 4-3。

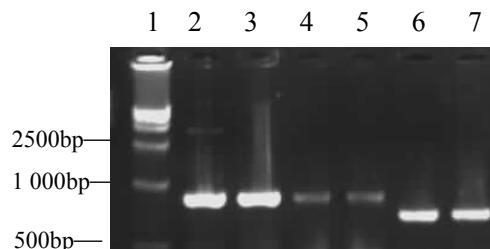


图 4-2 ORF2、ORF3 和 ORF4 的扩增

Fig. 4-2 Amplification of ORF2, ORF3 and ORF4

1.DNA 分子量标准 DL15 000, 2-3. ORF2 (771bp), 4-5. ORF3 (765bp), 6-7. ORF4 (537bp)

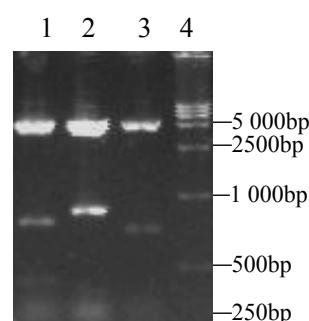


图 4-3 pEGFP-ORF2、pEGFP-ORF3 和 pEGFP-ORF4 重组质粒的 *Bam*HI 和 *Hind*III 双酶切鉴定

Fig. 4-3 Identification of recombinant plasmid pEGFP-ORF2, pEGFP-ORF3 and pEGFP-ORF4

1-3. 依次为 pEGFP-ORF2、pEGFP-ORF3、pEGFP-ORF4, 4.DNA 分子量标准 DL15 000

4.2.3 shRNA 表达载体抑制 PRRSV 特异性细胞病变

用 shRNA 表达载体转染 MARC-145，同时设定非特异性序列质粒对照和空载体质粒对照，6h 以后，用 0.01MOI 的 PRRSV CH-1a 接毒。60h 后，观察细胞病变结果显示，接毒细胞中 23、24、31、34、41 处理细胞的细胞病变比其它 shRNA 表达载体处理细胞的细胞病变轻微，而非特异性序列对照 pEC-shRNA 和空载体对照 pEGFP-N1 在单层感染细胞上都产生了 PRRSV 特异的细胞病变（图 4-4）。

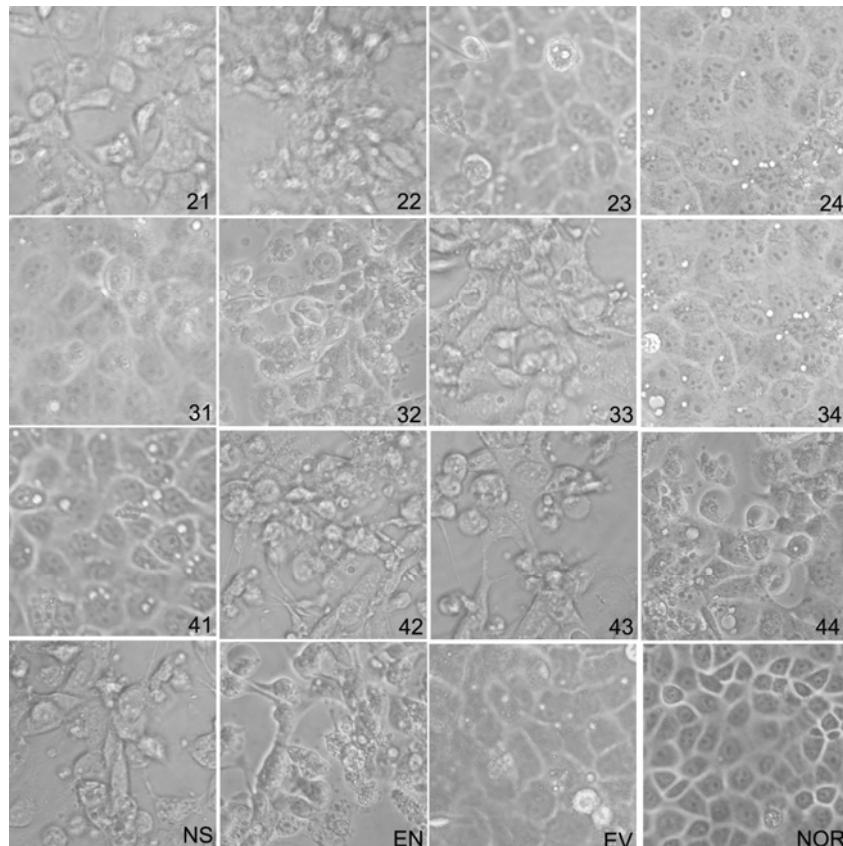


图 4-4 ORF2-4 特异 shRNA 表达载体在 MARC-145 细胞中抑制 PRRSV 引起的细胞病变

Fig. 4-4 The inhibitory effect of ORF2-4 specific shRNA expression vectors on PRRSV induced CPE in MARC-145 cells 图中为 24 孔细胞培养板按 1 μ g 质粒/孔转染，接毒 0.01MOI 的结果。21、22、23、24 分别代表 ORF2 特异的 shRNA 表达载体，31、32、33、34 分别代表 ORF3 特异的 shRNA 表达载体，41、42、43、44 分别代表 ORF4 特异的 shRNA 表达载体，NS 为非特异序列对照处理孔，EN 为 pEGFP-N1 空载体处理孔，EV 空载体处理未接毒细胞，NOR 为未处理正常细胞。

4.2.4 荧光定量 PCR 检测 ORF2、ORF3 和 ORF4 mRNA 的表达变化

为了检测 ORF2、ORF3、ORF4 基因特异 shRNA 表达载体对相应基因在 mRNA 水平的抑制作用，采用 FQ-PCR 法进行检测。分别以含相应基因的质粒为标准品，经 10 倍系列稀释，确定了 ORF2、ORF3、ORF4 基因的标准曲线，将 1 μ g shRNA 表达载体处理细胞中相应的 mRNA 经

β -actin 校正后, 与空载体相比, 并计算抑制率。结果显示 ORF2 特异的 shRNA 表达载体除 21 外, 22、23、24 的抑制率分别为: 28%、84% 和 79% (图 4-5)。ORF3 的特异 shRNA 表达载体除 33 外, 31、32、34 的抑制率分别为: 80%、47% 和 75% (图 4-6)。ORF4 的特异 shRNA 表达载体中只有 41 有较明显的抑制效率, 约 68% (图 4-7)。

为了检测 pEN179-shRNA 在抑制 PRRSV ORF7 mRNA 的同时, 次要结构蛋白 GP2、GP3、GP4 的 mRNA 变化情况, 对 1 μ g pEN179-shRNA 处理细胞中 PRRSV ORF2、ORF3、ORF4 基因 mRNA 的含量进行定量, 结果表明, ORF2、ORF3、ORF4 基因 mRNA 含量分别降低 60%、30%、55% (图 4-8)。

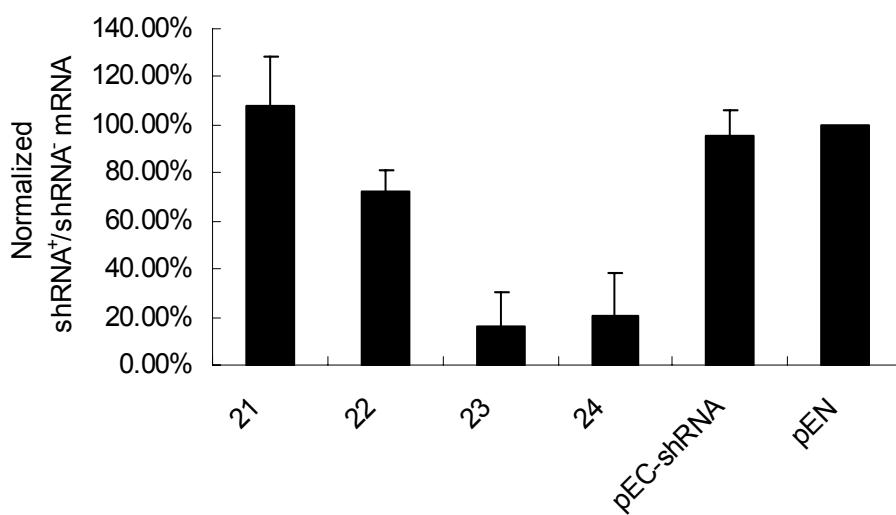


图 4-5 mRNA 水平检测 ORF2 特异 shRNA 表达载体的抑制作用

Fig. 4-5 Inhibitory effect of ORF2 specific shRNA expression vectors on mRNA levels
纵坐标表示 ORF2 RNA 拷贝数经 β -actin 校正后, 各样品与空载体进行比较所得结果

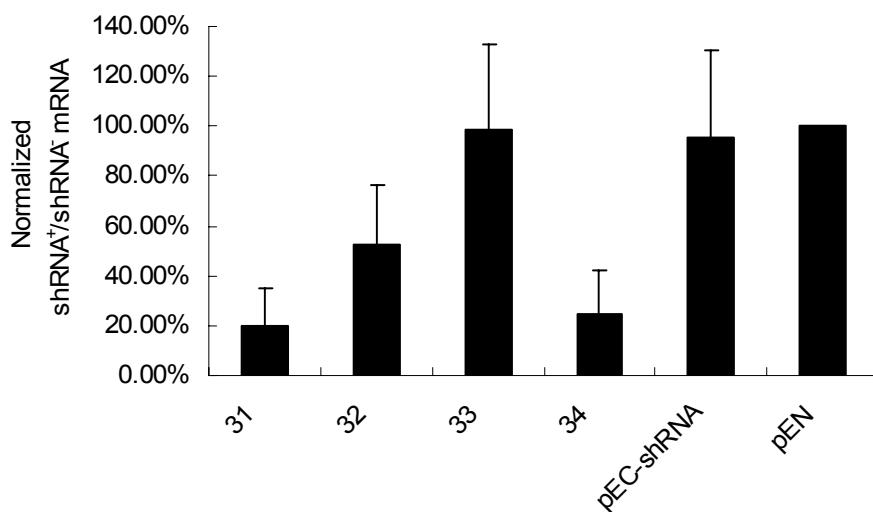


图 4-6 mRNA 水平检测 ORF3 特异 shRNA 表达载体的抑制作用

Fig. 4-6 Inhibitory effect of ORF3 specific shRNA expression vectors on mRNA level
纵坐标表示 ORF3 RNA 拷贝数经 β -actin 校正后, 各样品与空载体进行比较所得结果

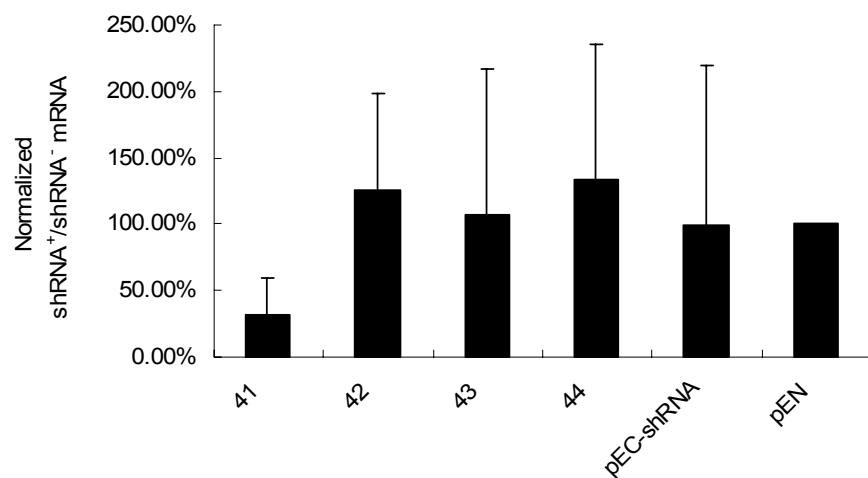


图 4-7 mRNA 水平检测 ORF4 特异 shRNA 表达载体的抑制作用

Fig. 4-7 Inhibitory effect of ORF4 specific shRNA expression vectors on mRNA level

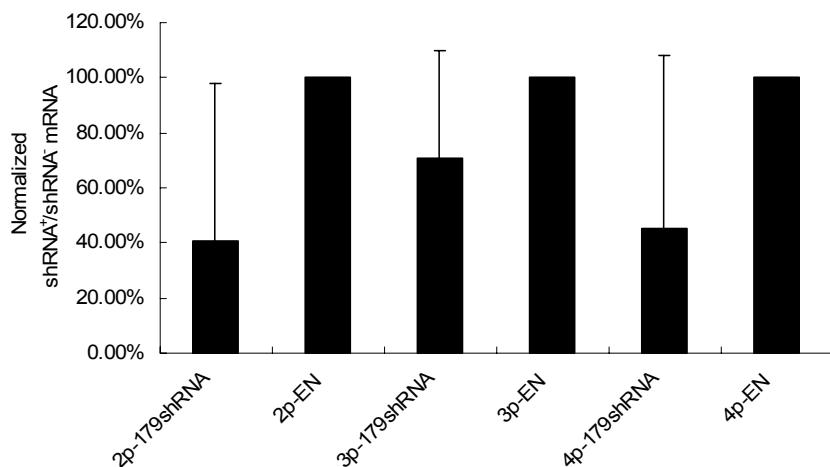
纵坐标表示 ORF4 RNA 拷贝数经 β -actin 校正, 然后各样品与空载体进行比较所得结果

图 4-8 pEN179-shRNA 表达载体对 ORF2-4 mRNA 的抑制

Fig. 4-8 mRNA level of ORF2-4 in cells treated by pEN179-shRNA expression vector

纵坐标表示各基因 mRNA 拷贝数经 β -actin 校正, 然后各样品与空载体进行比较的结果 60%、30%、55%。

2p-179shRNA、3p-179shRNA 和 4p-179shRNA 分别表示用 ORF2、ORF3 和 ORF4 探针检测 pEN179-shRNA 处理细胞中的相应基因的 mRNA。2p-EN、3p-EN 和 4p-EN 分别代表用 ORF2、ORF3 和 ORF4 探针检测 pEGFP-N1 处理细胞中的各基因相应 mRNA。

4.2.5 病毒毒价滴定结果

收集 ORF2、ORF3 和 ORF4 中抑制效果明显的 shRNA 表达载体处理细胞的培养上清进行毒

价滴定检测, 表明 23、24、31、34、41 处理细胞的细胞上清比空载体处理细胞上清毒价分别低 184、38.3、179、17.9 和 4.65 倍 (图 4-9)。

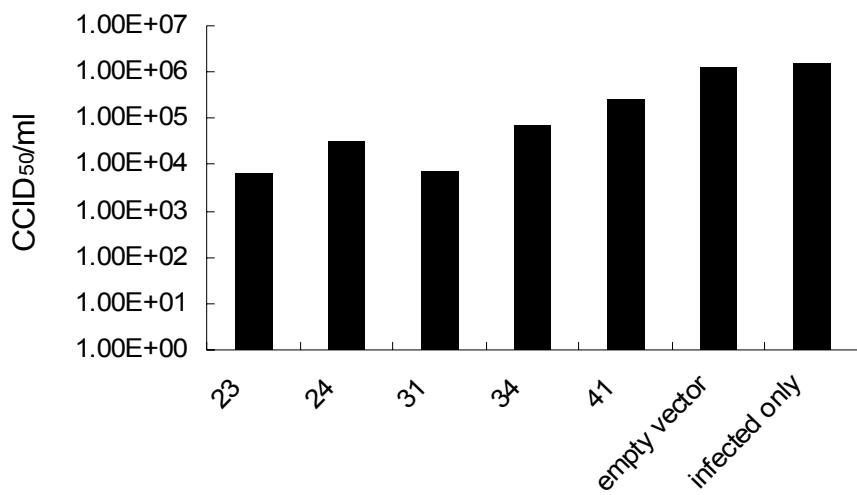


图 4-9 shRNA 表达载体对 MARC-145 细胞上 PRRSV 毒价的影响

Fig. 4-9 Effect of shRNA expression vector to the titre of PRRSV on MARC-145 cells

纵坐标为 CCID₅₀/ml 的对数刻度值。图示为两次检测中的平均值。

4.3 讨论

在前面的研究中证明 N 蛋白特异的 pEN179-shRNA 可以有效抑制 PRRSV 在 MARC-145 细胞上的复制, 但其中的 ORF2、ORF3 和 ORF4 基因 mRNA 含量变化还不清楚, 本研究证明 PRRSV 的 ORF7 mRNA 含量减小的同时 (96%) (图 3-10), ORF2、ORF3 和 ORF4 基因的 mRNA 分别减少 60%、30% 和 55% (图 4-8)。N 蛋白是组成病毒衣壳蛋白的唯一成分, 为病毒衣壳组装提供基础 (Yoo *et al*, 2003) ; N 蛋白可以通过核定位信号依赖的核转运因子 a 和 h 途径进入细胞核, 和细胞的核纤维蛋白相互作用, 通过和细胞的 28S 和 18S 核糖体 RNA 结合, 抑制宿主细胞转录、破坏核-质运输途径。病毒对 N 蛋白缺失的耐受能力很差, 缺失氨基酸个数多于 7 个时会影响感染性病毒的产生以及病毒 RNA 的复制 (Wootton *et al*, 2001; Doan *et al*, 2003) , 表明 N 蛋白在病毒组装复制中发挥重要作用。pEN179-shRNA 处理细胞中 PRRSV 的 ORF7、ORF2、ORF3 和 ORF4 基因的 mRNA 含量都有减少, 表明 PRRSV 的复制被抑制了, 因为 ORF2、ORF3 和 ORF4 mRNA 的减少要比 ORF7 基因 mRNA 的减少相对低, 说明抑制作用是特异的。

针对 ORF2、ORF3 和 ORF4 的 shRNA 中, 抑制作用较强的有 ORF2 的 23 和 24 (图 4-5), ORF3 的 31 和 34 (图 4-6), ORF4 的 41 (图 4-7)。毒价滴定表明, 这些 shRNAs 处理细胞的培养上清中的病毒滴度有所下降 (图 4-8), 但用 N 特异性抗体进行 IFA 检测时, 在 N 蛋白阳性细胞数上没有发现明显差异 (数据未提供)。在 Meulenberge 等 (2005) 对 PRRSV 的感染性分子克隆进行点突变, 通过破坏编码膜蛋白的基因研究影响 PRRSV 粒子形成和病毒粒子感染性的结构蛋白, 证明次要结构蛋白 GP2a、GP3、GP4 和 E 相互作用, 以异源多聚体的形式组装进 PRRSV, 它们对这些颗粒的感染性是必要的, 但 PRRSV 粒子的组装不依赖于次要蛋白。他们检测单基因

敲除载体的转染细胞培养上清中的病毒蛋白和 RNA, 发现除 E 外所有四个载体在培养上清中都产生了包含 RNA 的粒子。E 蛋白的缺失导致使得包含 RNA 的病毒粒子明显减少, 但病毒粒子的数量不比野生型载体获得的少。而且 4 个蛋白中任何一个缺失都影响其它 3 个的组装。因此, GP2a、E 或 GP4 表达的阻断, 在粒子中检测不到 GP3; GP2a、E、GP3 缺失时, 检测不到组装的 GP4。在 EAV 中得到了相似的结果 (Wieringa *et al*, 2004)。PRRSV 次要囊膜蛋白相互作用组装进病毒粒子表明这些蛋白在进入被感染细胞之前或进入过程中形成异多聚复合体。由于它们在病毒粒子中含量很低, 不能直接证明这种复合体。但是, 通过生物学特征、细胞内转运等间接证据表明了它们的相互作用。通过对 N 联寡聚糖的成熟情况分析表明次要囊膜蛋白在单独表达或其中两种共同表达时停留在细胞的内质网区, 当所有次要囊膜蛋白一起表达时它们获得转运能力, 可以通过高尔基复合体共同转运至细胞质甚至进入细胞外培养基。本研究的结果可能是因为细胞中的感染性病毒粒子减少了, 但病毒 ORF2、ORF3 或 ORF4 的减少并未明显影响病毒粒子的组装。

在本研究中, 尽管不能确定 GP3 是否组装进病毒粒子, 但减少 GP3 mRNA 能够影响感染细胞中的病毒滴度, 表明 GP3 在 PRRSV 复制或感染中有重要作用。在 α 疱疹病毒的病毒囊膜中有一种糖蛋白 G, 部分糖蛋白 G 可以经蛋白酶水解后分泌, 最近报道这种分泌型的 gG 有趋化因子结合活性, 在体外可以抑制这些趋化因子的活性。BVDV 的 E^{ms} 蛋白除了是病毒粒子组成蛋白外, 也可以从感染细胞中分泌到细胞外环境, 这种分泌形式最近证明可以阻断 dsRNA 介导的干扰素信号, PRRSV 的 GP3 是否也有相似的生理关联性还不清楚。

在使用不同网站的 siRNA 选择工具对目的序列的 siRNA 序列进行搜索时, 发现各网站给出的 siRNA 序列位置不完全相同, 可能是因为各公司使用了不同的规则进行 siRNA 筛选。尽可能选择各网站给出 siRNA 中的共有序列, 为了保险起见, 针对各基因仍然设计 4 个 siRNA, 在共有序列不足 4 个时, 根据 Ui.Tei 等发表的规则进行筛选 (Ui-tei *et al*, 2004), Ui.Tei 等认为同时满足以下四点的 siRNA 能够达到较高的基因沉默效果: ①antisense 的 5' 端为 A/U, ②sense 的 5' 端为 G/C, ③antisense 的 5' 端的 7 个碱基中至少有 5 个 A/U, ④siRNA 序列中没有连续 9 个以上的 GC 片段。尽管有些研究已经报道了相关筛选规则, 但个规则又有不同之处, 比如 Reynolds 等发表了 8 条与 siRNA 功能相关的原则 (Reynolds *et al*, 2004): ①GC 含量 30%~52%, ②正链的 15~19 碱基中至少含有 3 个 A/U, ③不含有反向重复序列, ④正链的第 19 碱基为 A, ⑤正链的第 3 碱基为 A, ⑥正链的第 10 碱基为 U, ⑦正链的第 19 碱基不是 G/C, ⑧正链的第 13 碱基不是 G; Amarzguioui 等分析得到 6 个与基因沉默功能相关的 siRNA 序列特点 (Amarzguioui *et al*, 2004): ①sense 链 5' 与 3' 端的 3 个碱基中 A/U 含量不对称, ②正链的第 1 个碱基为 G/C, ③正链的第 6 个碱基为 A, ④正链的第 19 个碱基为 A/U, ⑤正链的第 1 个碱基不是 U, ⑥正链的第 19 个碱基不是 G, 另外, GC 含量在 31.6%~57.9%, 文中指出, 明显有效的 siRNA 序列需要满足 3 端的 3 个碱基中 A/U 数量比 5 端的 3 个碱基中 A/U 数量至少多 1 个, 而且至少满足第 2、3、4 点中的两点。选择满足每一个规则的序列, 在 1000bp 的序列中可能只有一个, 或许没有。所以本研究采用了多个公司提供的 siRNA 设计工具进行 siRNA 筛选。根据 Reynolds 等对高效 siRNA 的特征的总结, 选择相应 siRNA 片段, 在各基因中筛选了不同程度抑制作用的 siRNA 位点。

本研究没有在 PAM 上检测 siRNA 序列的抑制作用, 但根据 Reynolds 等的实验验证, 认为相同 siRNA 序列在哺乳动物细胞中效果相似 (Reynolds *et al*, 2004)。推测我们筛选的 siRNA 在 PAM

中可以取得同样效果，并可用于体内抗 PRRSV 研究。

第五章 结论

5.1 针对 PRRSV 较保守的 N 蛋白选取 4 个 siRNA 序列, 通过一步 PCR 法制备 shRNA 表达盒, 转染 293T 细胞后, 发现 shRNA179-PCR 抑制效果最明显。

5.2 在稳定表达 N 蛋白的 293T 细胞系和感染 PRRSV 的 MARC-145 细胞上证明 shRNA 表达盒 shRNA179-PCR 可以有效抑制目的基因的表达, 表明利用 PCR 方法构建 shRNA 表达盒可用于有效 siRNA 片段的快速筛选。

5.3 将 PCR 法制备的 shRNA 表达盒克隆于 DNA 载体, 构建了 shRNA 表达载体, 试验证实 pEN179-shRNA 处理细胞中的 N 蛋白 mRNA 比对照减少了 96%, 细胞培养上清的病毒滴度比对照低 681 倍, 表明 pEN179-shRNA 表达载体可以用于抑制 PRRSV 复制的研究。

5.4 以不同剂量的 pEN179-shRNA 处理 MARC-145, 发现 pEN179-shRNA 的抑制作用在一定范围内是剂量依赖性的。

5.5 构建并筛选 ORF2、ORF3、ORF4 特异的 shRNA 表达载体, 转染 MARC-145 细胞, 抑制 PRRSV 相应基因表达, 证明 GP2、GP3、GP4 在病毒感染中发挥重要作用。

参考文献

1. 陈义祥, 胡丽萍, 刘翠权, 等. 广西猪繁殖与呼吸综合征病毒感染状况调查. 畜牧与兽医 2005, (12): 9~11.
2. 方六荣, 牛传双, 肖少波, 等. 猪繁殖与呼吸综合征病毒 YA 株 ORF5 基因的克隆与序列分析. 华中农业大学学报 2002, (06): 6-10.
3. 高显明, 高步先, 籍玉川, 等. 我国部分地区猪繁殖与呼吸综合征的调查与分析. 动物医学进展 2005, (06): 93-95.
4. 郭宝清, 陈章水, 刘文兴, 等. 从疑似 PRRS 流产胎儿分离 PRRSV 的研究. 中国预防兽医学报 1996, (02): 3~7.
5. 刘光清, 薛强, 仇华吉, 等. 猪繁殖与呼吸综合征病毒 CH-1a 株非结构基因的分子克隆及其基因特征的研究. 中国预防兽医学报 2002, (02): 2~8.
6. 仇华吉, 郭宝清, 童光志, 等. 猪繁殖-呼吸道综合征病毒(PRRSV)CH-1a 株基因型鉴定. 中国兽医学报 1998, (02): 15-18.
7. 仇华吉, 周彦君, 童光志. 猪生殖-呼吸综合征病毒蛋白的结构与功能. 动物医学进展 2000, (02): 53~59.
8. 姜平, 陈溥言, 蔡宝祥, 等. 我国猪繁殖和呼吸综合征病毒基因型鉴定. 中国兽医学报 1999, (02): 85~89.
9. 薛强, 周艳君, 刘光清, 等. 猪繁殖与呼吸综合征病毒 CH-1a 株基因组全长 cDNA 克隆的构建. 中国预防兽医学报 2003, (06): 2~8.
10. 许立华, 王玲, 芦银华, 等. 三种猪繁殖障碍性病毒混合感染的分子生物学调查. 中国兽医科技 2004, (07): 40~43.
11. 杨汉春, 黄芳芳, 郭鑫, 等. 猪繁殖与呼吸综合征病毒(PRRSV)BJ-4 株全基因组序列测定与分析. 农业生物技术学报 2001, (03): 212~218.
12. 赵耘, 罗长宝, 陈茹, 等. 猪生殖和呼吸综合征病毒 B_(13)株 ORF7 基因的克隆及在杆状病毒系统中的表达. 病毒学报 2001, (01): 79~84.
13. 周艳君, 薛强, 安同庆, 等. 猪繁殖与呼吸综合症病毒 CH-1a 株核衣壳蛋白单克隆抗体的制备. 中国预防兽医学报, 2005, 27 (6): 498~503.
14. Abbott AL, Alvarez-Saavedra E, Miska EA, et al. The let-7 MicroRNA family members mir-48, mir-84, and mir-241 function together to regulate developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. Dev Cell 2005, 9(3): 403~414.
15. Agranovsky AA. Principles of molecular organization, expression, and evolution of closteroviruses: over the barriers. Adv Virus Res 1996, 47: 119~158.
16. Alexopoulos C, Kritas SK, Kyriakis CS, et al. Sow performance in an endemically porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS)-infected farm after sow vaccination with an

- attenuated PRRS vaccine. *Vet Microbiol* 2005, 111(3-4): 151~157.
17. Allende R, Kutish GF, Laegreid W, *et al.* Mutations in the genome of porcine reproductive and respiratory syndrome virus responsible for the attenuation phenotype. *Arch Virol* 2000, 145(6): 1149~1161.
18. Amarzguioui M, Prydz H. An algorithm for selection of functional siRNA sequences. *Biochem Biophys Res Commun* 2004, 316(4): 1050~1058.
19. Ambros V. The functions of animal microRNAs. *Nature* 2004, 431(7006): 350~355.
20. Andersson MG, Haasnoot PC, Xu N, *et al.* Suppression of RNA interference by adenovirus virus-associated RNA. *J Virol* 2005, 79(15): 9556~9565.
21. Ansari IH, Kwon B, Osorio FA, *et al.* Influence of N-linked glycosylation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus GP5 on virus infectivity, antigenicity, and ability to induce neutralizing antibodies. *J Virol* 2006, 80(8): 3994~4004.
22. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 2004, 116(2): 281~297.
23. Bastos RG, Dellagostin OA, Barletta RG, *et al.* Immune response of pigs inoculated with *Mycobacterium bovis* BCG expressing a truncated form of GP5 and M protein of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vaccine* 2004, 22(3-4): 467~474.
24. Bautista EM, Meulenberg JJ, Choi CS, *et al.* Structural polypeptides of the American (VR-2332) strain of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Arch Virol* 1996, 141(7): 1357~1365.
25. Bennasser Y, Le SY, Benkirane M, *et al.* Evidence that HIV-1 encodes an siRNA and a suppressor of RNA silencing. *Immunity* 2005, 22(5): 607~619.
26. Berns K, Hijmans EM, Mullenders J, *et al.* A large-scale RNAi screen in human cells identifies new components of the p53 pathway. *Nature* 2004, 428(6981): 431~437.
27. Bernstein E, Caudy AA, Hammond SM, *et al.* Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* 2001, 409(6818): 363~366.
28. Bernstein E, Denli AM, Hannon GJ. The rest is silence. *RNA* 2001, 7(11): 1509~1521.
29. Billy E, Brondani V, Zhang H, *et al.* Specific interference with gene expression induced by long, double-stranded RNA in mouse embryonal teratocarcinoma cell lines. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001, 98(25): 14428~14433.
30. Bilodeau R, Archambault D, Vezina SA, *et al.* Persistence of porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in a swine operation. *Can J Vet Res* 1994, 58(4): 291~298.
31. Bitko V, Musiyenko A, Shulyayeva O, *et al.* Inhibition of respiratory viruses by nasally administered siRNA. *Nat Med* 2005, 11(1): 50~55.
32. Boden D, Pusch O, Lee F, *et al.* Efficient gene transfer of HIV-1-specific short hairpin RNA into human lymphocytic cells using recombinant adeno-associated virus vectors. *Mol Ther* 2004, 9(3): 396~402.
33. Boden D, Pusch O, Lee F, *et al.* Promoter choice affects the potency of HIV-1 specific RNA

- interference. *Nucleic Acids Res* 2003, 31(17): 5033~5038.
34. Botner A, Nielsen J, Oleksiewicz MB, *et al*. Heterologous challenge with porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) vaccine virus: no evidence of reactivation of previous European-type PRRS virus infection. *Vet Microbiol* 1999, 68(3-4): 187~195.
35. Bridge AJ, Pebernard S, Ducraux A, *et al*. Induction of an interferon response by RNAi vectors in mammalian cells. *Nat Genet* 2003, 34(3): 263~264.
36. Brummelkamp TR, Bernards R, Agami R. A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science* 2002a, 296(5567): 550~553.
37. Brummelkamp TR, Bernards R, Agami R. Stable suppression of tumorigenicity by virus-mediated RNA interference. *Cancer Cell* 2002b, 2(3): 243~247.
38. Caplen NJ, Parrish S, Imani F, *et al*. Specific inhibition of gene expression by small double-stranded RNAs in invertebrate and vertebrate systems. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001, 98(17): 9742~9747.
39. Castanotto D, Li H, Rossi JJ. Functional siRNA expression from transfected PCR products. *RNA* 2002, 8(11): 1454~1460.
40. Castanotto D, Rossi JJ. Construction and transfection of PCR products expressing siRNAs or shRNAs in mammalian cells. *Methods Mol Biol* 2004, 252: 509~514.
41. Castanotto D, Scherer L. Targeting cellular genes with PCR cassettes expressing short interfering RNAs. *Methods Enzymol* 2005, 392: 173~185.
42. Cavanagh D. Nidovirales: a new order comprising Coronaviridae and Arteriviridae. *Arch Virol* 1997, 142(3): 629~633.
43. Chang HW, Jeng CR, Liu JJ, *et al*. Reduction of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) infection in swine alveolar macrophages by porcine circovirus 2 (PCV2)-induced interferon-alpha. *Vet Microbiol* 2005, 108(3-4): 167~177.
44. Charerntantanakul W, Platt R, Johnson W, *et al*. Immune responses and protection by vaccine and various vaccine adjuvant candidates to virulent porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vet Immunol Immunopathol* 2006, 109(1-2): 99~115.
45. Chen J, Wall NR, Kocher K, *et al*. Stable expression of small interfering RNA sensitizes TEL-PDGFbetaR to inhibition with imatinib or rapamycin. *J Clin Invest* 2004, 113(12): 1784~1791.
46. Chi JT, Chang HY, Wang NN, *et al*. Genomewide view of gene silencing by small interfering RNAs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003, 100(11): 6343~6346.
47. Choi C, Chae C. Colocalization of porcine reproductive and respiratory syndrome virus and porcine circovirus 2 in porcine dermatitis and nephrology syndrome by double-labeling technique. *Vet Pathol* 2001, 38(4): 436~441.
48. Christopher-Hennings J, Nelson EA, Nelson JK, *et al*. Effects of a modified-live virus vaccine against porcine reproductive and respiratory syndrome in boars. *Am J Vet Res* 1997, 58(1): 40~45.
49. Cogoni C, Romano N, Macino G. Suppression of gene expression by homologous transgenes.

- Antonie Van Leeuwenhoek 1994, 65(3): 205~209.
50. Collins JE, Benfield DA, Christianson WT, *et al.* Isolation of swine infertility and respiratory syndrome virus (isolate ATCC VR-2332) in North America and experimental reproduction of the disease in gnotobiotic pigs. *J Vet Diagn Invest* 1992, 4(2): 117~126.
51. Conzelmann KK, Visser N, Van WP, *et al.* Molecular characterization of porcine reproductive and respiratory syndrome virus, a member of the arterivirus group. *Virology* 1993, 193(1): 329~339.
52. Das AT, Brummelkamp TR, Westerhout EM, *et al.* Human immunodeficiency virus type 1 escapes from RNA interference-mediated inhibition. *J Virol* 2004, 78(5): 2601~2605.
53. de VA, Post SM, Raamsman MJ, *et al.* The two major envelope proteins of equine arteritis virus associate into disulfide-linked heterodimers. *J Virol* 1995, 69(8): 4668~4674.
54. Dea S, Gagnon CA, Mardassi H, *et al.* Current knowledge on the structural proteins of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus: comparison of the North American and European isolates. *Arch Virol* 2000, 145(4): 659~688.
55. Dee SA, Molitor TW. Elimination of porcine reproductive and respiratory syndrome virus using a test and removal process. *Vet Rec* 1998, 143(17): 474~476.
56. Delputte PL, Costers S, Nauwynck HJ. Analysis of porcine reproductive and respiratory syndrome virus attachment and internalization: distinctive roles for heparan sulphate and sialoadhesin. *J Gen Virol* 2005, 86(Pt 5): 1441~1445.
57. Delputte PL, Vanderheijden N, Nauwynck HJ, *et al.* Involvement of the matrix protein in attachment of porcine reproductive and respiratory syndrome virus to a heparinlike receptor on porcine alveolar macrophages. *J Virol* 2002, 76(9): 4312~4320.
58. Denli AM, Tops BB, Plasterk RH, *et al.* Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. *Nature* 2004, 432(7014): 231~235.
59. Doan DN, Dokland T. Structure of the nucleocapsid protein of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Structure* 2003, 11(11): 1445~1451.
60. Domingo E, Baranowski E, Ruiz-Jarabo CM, *et al.* Quasispecies structure and persistence of RNA viruses. *Emerg Infect Dis* 1998, 4(4): 521~527.
61. Domingo E, Escarmis C, Lazaro E, *et al.* Quasispecies dynamics and RNA virus extinction. *Virus Res* 2005, 107(2): 129~139.
62. Donze O, Picard D. RNA interference in mammalian cells using siRNAs synthesized with T7 RNA polymerase. *Nucleic Acids Res* 2002, 30(10): e46.
63. Downward J. RNA interference. *BMJ* 2004, 328(7450): 1245~1248.
64. Du T, Zamore PD. microPrimer: the biogenesis and function of microRNA. *Development* 2005, 132(21): 4645~4652.
65. Dykxhoorn DM, Novina CD, Sharp PA. Killing the messenger: short RNAs that silence gene expression. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003, 4(6): 457~467.
66. Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, *et al.* Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 2001, 411(6836): 494~498.

67. Elbashir SM, Harborth J, Weber K, *et al.* Analysis of gene function in somatic mammalian cells using small interfering RNAs. *Methods* 2002, 26(2): 199~213.
68. Elbashir SM, Lendeckel W, Tuschl T. RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev* 2001, 15(2): 188~200.
69. Essajee SM, Pollack H, Rochford G, *et al.* Early changes in quasispecies repertoire in HIV-infected infants: correlation with disease progression. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2000, 16(18): 1949~1957.
70. Faaberg KS, Elam MR, Nelsen CJ, *et al.* Subgenomic RNA7 is transcribed with different leader-body junction sites in PRRSV (strain VR2332) infection of CL2621 cells. *Adv Exp Med Biol* 1998, 440: 275~279.
71. Faaberg KS, Plagemann PG. ORF 3 of lactate dehydrogenase-elevating virus encodes a soluble, nonstructural, highly glycosylated, and antigenic protein. *Virology* 1997a, 227(1): 245~251.
72. Fang L, Jiang Y, Xiao S, *et al.* Enhanced immunogenicity of the modified GP5 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Virus Genes* 2006, 32(1): 5~11.
73. Farci P, Purcell RH. Clinical significance of hepatitis C virus genotypes and quasispecies. *Semin Liver Dis* 2000, 20(1): 103~126.
74. Feng WH, Tompkins MB, Xu JS, *et al.* Thymocyte and peripheral blood T lymphocyte subpopulation changes in piglets following in utero infection with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Virology* 2002, 302(2): 363~372.
75. Fernandez A, Suarez P, Castro JM, *et al.* Characterization of regions in the GP5 protein of porcine reproductive and respiratory syndrome virus required to induce apoptotic cell death. *Virus Res* 2002, 83(1-2): 103~118.
76. Fire A, Xu S, Montgomery MK, *et al.* Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 1998, 391(6669): 806~811.
77. Fu K, Baric RS. Map locations of mouse hepatitis virus temperature-sensitive mutants: confirmation of variable rates of recombination. *J Virol* 1994, 68(11): 7458~7466.
78. Gagnon CA, Lachapelle G, Langelier Y, *et al.* Adenoviral-expressed GP5 of porcine respiratory and reproductive syndrome virus differs in its cellular maturation from the authentic viral protein but maintains known biological functions. *Arch Virol* 2003, 148(5): 951~972.
79. Ge Q, Filip L, Bai A, *et al.* Inhibition of influenza virus production in virus-infected mice by RNA interference. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004, 101(23): 8676~8681.
80. Giladi H, Ketzin-Gilad M, Rivkin L, *et al.* Small interfering RNA inhibits hepatitis B virus replication in mice. *Mol Ther* 2003, 8(5): 769~776.
81. Giraldez AJ, Cinalli RM, Glasner ME, *et al.* MicroRNAs regulate brain morphogenesis in zebrafish. *Science* 2005, 308(5723): 833~838.
82. Goldberg TL, Hahn EC, Weigel RM, *et al.* Genetic, geographical and temporal variation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in Illinois. *J Gen Virol* 2000, 81(Pt 1): 171~179.
83. Gonin P, Mardassi H, Gagnon CA, *et al.* A nonstructural and antigenic glycoprotein is encoded by

- ORF3 of the IAF-Klop strain of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Arch Virol* 1998, 143(10): 1927~1940.
84. Gou D, Jin N, Liu L. Gene silencing in mammalian cells by PCR-based short hairpin RNA. *FEBS Lett* 2003, 548(1-3): 113~118.
85. Guo S, Kemphues KJ. *par-1*, a gene required for establishing polarity in *C. elegans* embryos, encodes a putative Ser/Thr kinase that is asymmetrically distributed. *Cell* 1995, 81(4): 611~620.
86. Hamar P, Song E, Kokeny G, *et al.* Small interfering RNA targeting Fas protects mice against renal ischemia-reperfusion injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004, 101(41): 14883~14888.
87. Hamilton AJ, Baulcombe DC. A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science* 1999, 286(5441): 950~952.
88. Han J, Faaberg KS, Wang Y, *et al.* Nonstructural protein 2 mutations of PRRS virus strain VR2332 infectious clone based on deletions seen in RFLP184 isolates are viable. International PRRS Symposium. St. Louis, Missouri: 2005, 8
89. Hannon GJ, Rossi JJ. Unlocking the potential of the human genome with RNA interference. *Nature* 2004, 431(7006): 371~378.
90. Hedges JF, Balasuriya UB, MacLachlan NJ. The open reading frame 3 of equine arteritis virus encodes an immunogenic glycosylated, integral membrane protein. *Virology* 1999, 264(1): 92~98.
91. Hedges JF, Balasuriya UB, Timoney PJ, *et al.* Genetic divergence with emergence of novel phenotypic variants of equine arteritis virus during persistent infection of stallions. *J Virol* 1999, 73(5): 3672~3681.
92. Hernández J, Yepiz-Plascencia G, Osorio F, *et al.* Genetic analysis of PRRS virus in Mexico. International PRRS Symposium. St. Louis, Missouri: 2005, 10
93. Hosono T, Mizuguchi H, Katayama K, *et al.* RNA interference of PPARgamma using fiber-modified adenovirus vector efficiently suppresses preadipocyte-to-adipocyte differentiation in 3T3-L1 cells. *Gene* 2005, 348: 157~165.
94. Huang P, Lai MM. Polypyrimidine tract-binding protein binds to the complementary strand of the mouse hepatitis virus 3' untranslated region, thereby altering RNA conformation. *J Virol* 1999, 73(11): 9110~9116.
95. Hutvagner G. Small RNA asymmetry in RNAi: function in RISC assembly and gene regulation. *FEBS Lett* 2005, 579(26): 5850~5857.
96. Hutvagner G, Zamore PD. A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex. *Science* 2002, 297(5589): 2056~2060.
97. Janitz M, Vanhecke D, Lehrach H. High-throughput RNA interference in functional genomics. *Handb Exp Pharmacol* 2006, (173): 97~104.
98. Jorgensen R. Altered gene expression in plants due to trans interactions between homologous genes. *Trends Biotechnol* 1990, 8(12): 340~344.
99. Kariko K, Bhuyan P, Capodici J, *et al.* Exogenous siRNA mediates sequence-independent gene suppression by signaling through toll-like receptor 3. *Cells Tissues Organs* 2004, 177(3): 132~138.

100. Kasim V, Miyagishi M, Taira K. Control of siRNA expression using the Cre-loxP recombination system. *Nucleic Acids Res* 2004, 32(7): e66.
101. Ketting RF, Fischer SE, Bernstein E, *et al*. Dicer functions in RNA interference and in synthesis of small RNA involved in developmental timing in *C. elegans*. *Genes Dev* 2001, 15(20): 2654~2659.
102. Kheyar A, Jabrane A, Zhu C, *et al*. Alternative codon usage of PRRS virus ORF5 gene increases eucaryotic expression of GP(5) glycoprotein and improves immune response in challenged pigs. *Vaccine* 2005, 23(31): 4016~4022.
103. Kim DH, Longo M, Han Y, *et al*. Interferon induction by siRNAs and ssRNAs synthesized by phage polymerase. *Nat Biotechnol* 2004, 22(3): 321~325.
104. Kim DY, Kerrigan M, Schneider P, *et al*, Subcellular localization of the nonstructural proteins of PRRS virus. International PRRS Symposium. St. Louis, Missouri: 2005, 13
105. Kim JK, Fahad AM, Shanmukhappa K, *et al*. Defining the cellular target(s) of porcine reproductive and respiratory syndrome virus blocking monoclonal antibody 7G10. *J Virol* 2006, 80(2): 689~696.
106. Kim TS, Benfield DA, Rowland RR. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus-induced cell death exhibits features consistent with a nontypical form of apoptosis. *Virus Res* 2002, 85(2): 133~140.
107. Klahre U, Crete P, Leuenberger SA, *et al*. High molecular weight RNAs and small interfering RNAs induce systemic posttranscriptional gene silencing in plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002, 99(18): 11981~11986.
108. Kreutz LC, Ackermann MR. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus enters cells through a low pH-dependent endocytic pathway. *Virus Res* 1996, 42(1-2): 137~147.
109. Kumar P, Lee SK, Shankar P, *et al*. A Single siRNA Suppresses Fatal Encephalitis Induced by Two Different Flaviviruses. *PLoS Med* 2006, 3(4): e96.
110. Kwon BJ, Ansari IH, Osorio FA, *et al*, Generation of a PRRS virus infectious clone from an attenuated vaccine strain. International PRRS Symposium. St. Louis, Missouri: 2005, 14
111. Kwon BJ, Ansari IH, Pattnaik AK, *et al*, Significance of structural genes of PRRS virus for virulence and attenuation. International PRRS Symposium. St. Louis, Missouri: 2005, 15
112. Labarque G, Reeth KV, Nauwynck H, *et al*. Impact of genetic diversity of European-type porcine reproductive and respiratory syndrome virus strains on vaccine efficacy. *Vaccine* 2004, 22(31-32): 4183~4190.
113. Labarque G, Van GS, Nauwynck H, *et al*. Apoptosis in the lungs of pigs infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus and associations with the production of apoptogenic cytokines. *Vet Res* 2003, 34(3): 249~260.
114. Lager KM, Mengeling WL, Brockmeier SL. Homologous challenge of porcine reproductive and respiratory syndrome virus immunity in pregnant swine. *Vet Microbiol* 1997, 58(2-4): 113~125.
115. Lai MM. RNA recombination in animal and plant viruses. *Microbiol Rev* 1992, 56(1): 61~79.
116. Lai MM, Cavanagh D. The molecular biology of coronaviruses. *Adv Virus Res* 1997, 48: 1~100.
117. Lecellier CH, Dunoyer P, Arar K, *et al*. A cellular microRNA mediates antiviral defense in human

- cells. *Science* 2005, 308(5721): 557~560.
118. Lee C, Calvert JG, Welch SK, *et al.* A DNA-launched reverse genetics system for porcine reproductive and respiratory syndrome virus reveals that homodimerization of the nucleocapsid protein is essential for virus infectivity. *Virology* 2005, 331(1): 47~62.
119. Lee C, Hodgins D, Calvert JG, *et al.* Mutations within the nuclear localization signal of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus nucleocapsid protein attenuate virus replication. *Virology* 2006, 346(1): 238~250.
120. Lee C, Yoo D. Cysteine residues of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus small envelope protein are non-essential for virus infectivity. *J Gen Virol* 2005, 86(Pt 11): 3091~3096.
121. Lee Y, Ahn C, Han J, *et al.* The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature* 2003, 425(6956): 415~419.
122. Leuschner PJ, Ameres SL, Kueng S, *et al.* Cleavage of the siRNA passenger strand during RISC assembly in human cells. *EMBO Rep* 2006, 7(3): 314~320.
123. Lewis BP, Shih IH, Jones-Rhoades MW, *et al.* Prediction of mammalian microRNA targets. *Cell* 2003, 115(7): 787~798.
124. Li H, Fu X, Chen Y, *et al.* Use of adenovirus-delivered siRNA to target oncoprotein p28GANK in hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 2005, 128(7): 2029~2041.
125. Li H, Li WX, Ding SW. Induction and suppression of RNA silencing by an animal virus. *Science* 2002, 296(5571): 1319~1321.
126. Li M, Jones-Rhoades MW, Lau NC, *et al.* Regulatory mutations of mir-48, a *C. elegans* let-7 family MicroRNA, cause developmental timing defects. *Dev Cell* 2005, 9(3): 415~422.
127. Li M, Rossi JJ. Lentiviral vector delivery of siRNA and shRNA encoding genes into cultured and primary hematopoietic cells. *Methods Mol Biol* 2005, 309: 261~272.
128. Li WX, Li H, Lu R, *et al.* Interferon antagonist proteins of influenza and vaccinia viruses are suppressors of RNA silencing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004, 101(5): 1350~1355.
129. Li YC, Kong LH, Cheng BZ, *et al.* Construction of influenza virus siRNA expression vectors and their inhibitory effects on multiplication of influenza virus. *Avian Dis* 2005, 49(4): 562~573.
130. Lin YC, Chang RY, Chueh LL. Leader-body junction sequence of the viral subgenomic mRNAs of porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolated in Taiwan. *J Vet Med Sci* 2002, 64(11): 961~965.
131. Lipardi C, Wei Q, Paterson BM. RNAi as random degradative PCR: siRNA primers convert mRNA into dsRNAs that are degraded to generate new siRNAs. *Cell* 2001, 107(3): 297~307.
132. Lorenz C, Hadwiger P, John M, *et al.* Steroid and lipid conjugates of siRNAs to enhance cellular uptake and gene silencing in liver cells. *Bioorg Med Chem Lett* 2004, 14(19): 4975~4977.
133. Lu S, Cullen BR. Adenovirus VA1 noncoding RNA can inhibit small interfering RNA and MicroRNA biogenesis. *J Virol* 2004, 78(23): 12868~12876.
134. Luo B, Heard AD, Lodish HF. Small interfering RNA production by enzymatic engineering of DNA (SPEED). *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004, 101(15): 5494~5499.

135. Maniataki E, Mourelatos Z. A human, ATP-independent, RISC assembly machine fueled by pre-miRNA. *Genes Dev* 2005, 19(24): 2979~2990.
136. Mardassi H, Gonin P, Gagnon CA, *et al*. A subset of porcine reproductive and respiratory syndrome virus GP3 glycoprotein is released into the culture medium of cells as a non-virion-associated and membrane-free (soluble) form. *J Virol* 1998, 72(8): 6298~6306.
137. Mardassi H, Wilson L, Mounir S, *et al*. Detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus and efficient differentiation between Canadian and European strains by reverse transcription and PCR amplification. *J Clin Microbiol* 1994, 32(9): 2197~2203.
138. Martienssen R, Lippman Z, May B, *et al*. TraNsposons, tandem repeats, and the silencing of imprinted genes. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 2004, 69: 371~379.
139. Martinez J, Patkaniowska A, Urlaub H, *et al*. Single-stranded antisense siRNAs guide target RNA cleavage in RNAi. *Cell* 2002, 110(5): 563~574.
140. Massaro D, Massaro GD, Clerch LB. Noninvasive delivery of small inhibitory RNA and other reagents to pulmonary alveoli in mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2004, 287(5): 1066~1070.
141. McCaffrey AP, Nakai H, Pandey K, *et al*. Inhibition of hepatitis B virus in mice by RNA interference. *Nat Biotechnol* 2003, 21(6): 639~644.
142. Meister G, Landthaler M, Dorsett Y, *et al*. Sequence-specific inhibition of microRNA- and siRNA-induced RNA silencing. *RNA* 2004, 10(3): 544~550.
143. Meng XJ. Heterogeneity of porcine reproductive and respiratory syndrome virus: implications for current vaccine efficacy and future vaccine development. *Vet Microbiol* 2000, 74(4): 309~329.
144. Meng XJ, Paul PS, Morozov I, *et al*. A nested set of six or seven subgenomic mRNAs is formed in cells infected with different isolates of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J Gen Virol* 1996, 77 (Pt 6): 1265~1270.
145. Mengeling WL, Lager KM, Vorwald AC. Safety and efficacy of vaccination of pregnant gilts against porcine reproductive and respiratory syndrome. *Am J Vet Res* 1999, 60(7): 796~801.
146. Mengeling WL, Lager KM, Vorwald AC, *et al*. Comparative safety and efficacy of attenuated single-strain and multi-strain vaccines for porcine reproductive and respiratory syndrome. *Vet Microbiol* 2003, 93(1): 25~38.
147. Meulenberg JJ. PRRSV, the virus. *Vet Res* 2000, 31(1): 11~21.
148. Meulenberg JJ, Bos-de RJ, van GR, *et al*. Infectious transcripts from cloned genome-length cDNA of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J Virol* 1998, 72(1): 380~387.
149. Meulenberg JJ, Hulst MM, de ME, *et al*. Lelystad virus, the causative agent of porcine epidemic abortion and respiratory syndrome (PEARS), is related to LDV and EAV. *Virology* 1993, 192(1): 62~72.
150. Meulenberg JJ, Petersen BA, de KE, *et al*. Molecular characterization of Lelystad virus. *Vet Microbiol* 1997, 55(1-4): 197~202.
151. Meulenberg JJ, Petersen-den BA, de KE, *et al*. Characterization of structural proteins of Lelystad

- virus. *Adv Exp Med Biol* 1995, 380: 271~276.
152. Meulenbergen JJ, van NA, van EZ, *et al.* Posttranslational processing and identification of a neutralization domain of the GP4 protein encoded by ORF4 of Lelystad virus. *J Virol* 1997, 71(8): 6061~6067.
153. Miller LC, Fox JM. Apoptosis and porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vet Immunol Immunopathol* 2004, 102(3): 131~142.
154. Miller WA, Koev G. Synthesis of subgenomic RNAs by positive-strand RNA viruses. *Virology* 2000, 273(1): 1~8.
155. Minakuchi Y, Takeshita F, Kosaka N, *et al.* Atelocollagen-mediated synthetic small interfering RNA delivery for effective gene silencing in vitro and in vivo. *Nucleic Acids Res* 2004, 32(13): e109.
156. Miyagishi M, Sumimoto H, Miyoshi H, *et al.* Optimization of an siRNA-expression system with an improved hairpin and its significant suppressive effects in mammalian cells. *J Gene Med* 2004, 6(7): 715~723.
157. Miyagishi M, Taira K. Development and application of siRNA expression vector. *Nucleic Acids Res Suppl* 2002, (2): 113~114.
158. Morozov I, Meng XJ, Paul PS. Sequence analysis of open reading frames (ORFs) 2 to 4 of a U.S. isolate of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Arch Virol* 1995, 140(7): 1313~1319.
159. Nagy PD, Bujarski JJ. Engineering of homologous recombination hotspots with AU-rich sequences in brome mosaic virus. *J Virol* 1997, 71(5): 3799~3810.
160. Naka K, Dansako H, Kobayashi N, *et al.* Hepatitis C virus NS5B delays cell cycle progression by inducing interferon-beta via Toll-like receptor 3 signaling pathway without replicating viral genomes. *Virology* 2006, 346(2): 348~362.
161. Nelsen CJ, Murtaugh MP, Faaberg KS. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus comparison: divergent evolution on two continents. *J Virol* 1999, 73(1): 270~280.
162. Nelson EA, Christopher-Hennings J, Drew T, *et al.* Differentiation of U.S. and European isolates of porcine reproductive and respiratory syndrome virus by monoclonal antibodies. *J Clin Microbiol* 1993, 31(12): 3184~3189.
163. Nielsen J, Botner A. Hematological and immunological parameters of 4 1/2-month old pigs infected with PRRS virus. *Vet Microbiol* 1997, 55(1-4): 289~294.
164. Nielsen J, Botner A, Bille-Hansen V, *et al.* Experimental inoculation of late term pregnant sows with a field isolate of porcine reproductive and respiratory syndrome vaccine-derived virus. *Vet Microbiol* 2002, 84(1-2): 1~13.
165. Nielsen TL, Nielsen J, Have P, *et al.* Examination of virus shedding in semen from vaccinated and from previously infected boars after experimental challenge with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vet Microbiol* 1997, 54(2): 101~112.
166. Nilubol D, Platt KB, Halbur PG, *et al.* The effect of a killed porcine reproductive and respiratory

- syndrome virus (PRRSV) vaccine treatment on virus shedding in previously PRRSV infected pigs. *Vet Microbiol* 2004, 102(1-2): 11~18.
167. Nowak P, Karlsson AC, Naver L, *et al*. The selection and evolution of viral quasispecies in HIV-1 infected children. *HIV Med* 2002, 3(1): 1~11.
168. Nykanen A, Haley B, Zamore PD. ATP requirements and small interfering RNA structure in the RNA interference pathway. *Cell* 2001, 107(3): 309~321.
169. Oleksiewicz MB, Nielsen J. Effect of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) on alveolar lung macrophage survival and function. *Vet Microbiol* 1999, 66(1): 15~27.
170. Opriessnig T, Halbur PG, Yoon KJ, *et al*. Comparison of molecular and biological characteristics of a modified live porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) vaccine (ingelvac PRRS MLV), the parent strain of the vaccine (ATCC VR2332), ATCC VR2385, and two recent field isolates of PRRSV. *J Virol* 2002, 76(23): 11837~11844.
171. Paddison PJ, Caudy AA, Bernstein E, *et al*. Short hairpin RNAs (shRNAs) induce sequence-specific silencing in mammalian cells. *Genes Dev* 2002, 16(8): 948~958.
172. Paddison PJ, Silva JM, Conklin DS, *et al*. A resource for large-scale RNA-interference-based screens in mammals. *Nature* 2004, 428(6981): 427~431.
173. Paolucci S, Baldanti F, Campanini G, *et al*. Analysis of HIV drug-resistant quasispecies in plasma, peripheral blood mononuclear cells and viral isolates from treatment-naive and HAART patients. *J Med Virol* 2001, 65(2): 207~217.
174. Pawlotsky JM. Hepatitis C virus genetic variability: pathogenic and clinical implications. *Clin Liver Dis* 2003, 7(1): 45~66.
175. Persengiev SP, Zhu X, Green MR. Nonspecific, concentration-dependent stimulation and repression of mammalian gene expression by small interfering RNAs (siRNAs). *RNA* 2004, 10(1): 12~18.
176. Pinkenburg O, Platz J, Beisswenger C, *et al*. Inhibition of NF- κ B mediated inflammation by siRNA expressed by recombinant adeno-associated virus. *J Virol Methods* 2004, 120(1): 119~122.
177. Plana-Duran J, Bastons M, Urniza A, *et al*. Efficacy of an inactivated vaccine for prevention of reproductive failure induced by porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vet Microbiol* 1997, 55(1-4): 361~370.
178. Qiu HJ, Tian ZJ, Tong GZ, *et al*. Protective immunity induced by a recombinant pseudorabies virus expressing the GP5 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in piglets. *Vet Immunol Immunopathol* 2005, 106(3-4): 309~319.
179. Rand TA, Petersen S, Du F, *et al*. Argonaute2 cleaves the anti-guide strand of siRNA during RISC activation. *Cell* 2005, 123(4): 621~629.
180. Ren XR, Zhou LJ, Luo GB, *et al*. Inhibition of hepatitis B virus replication in 2.2.15 cells by expressed shRNA. *J Viral Hepat* 2005, 12(3): 236~242.
181. Reynolds A, Leake D, Boese Q, *et al*. Rational siRNA design for RNA interference. *Nat Biotechnol* 2004, 22(3): 326~330.

182. Ronemus M, Martienssen R. RNA interference: methylation mystery. *Nature* 2005, 433(7025): 472~473.
183. Rowland RR, Kervin R, Kuckleburg C, *et al.* The localization of porcine reproductive and respiratory syndrome virus nucleocapsid protein to the nucleolus of infected cells and identification of a potential nucleolar localization signal sequence. *Virus Res* 1999, 64(1): 1~12.
184. Rowland RR, Schneider P, Fang Y, *et al.* Peptide domains involved in the localization of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus nucleocapsid protein to the nucleolus. *Virology* 2003, 316(1): 135~145.
185. Rowland RR, Steffen M, Ackerman T, *et al.* The evolution of porcine reproductive and respiratory syndrome virus: quasispecies and emergence of a virus subpopulation during infection of pigs with VR-2332. *Virology* 1999, 259(2): 262~266.
186. Rowland RR, Yoo D. Nucleolar-cytoplasmic shuttling of PRRSV nucleocapsid protein: a simple case of molecular mimicry or the complex regulation by nuclear import, nucleolar localization and nuclear export signal sequences. *Virus Res* 2003, 95(1-2): 23~33.
187. Rubinson DA, Dillon CP, Kwiatkowski AV, *et al.* A lentivirus-based system to functionally silence genes in primary mammalian cells, stem cells and transgenic mice by RNA interference. *Nat Genet* 2003, 33(3): 401~406.
188. Sawicki SG, Sawicki DL. A new model for coronavirus transcription. *Adv Exp Med Biol* 1998, 440: 215~219.
189. Sawicki SG, Sawicki DL. Coronaviruses use discontinuous extension for synthesis of subgenome-length negative strands. *Adv Exp Med Biol* 1995, 380: 499~506.
190. Scherer LJ, Yildiz Y, Kim J, *et al.* Rapid assessment of anti-HIV siRNA efficacy using PCR-derived Pol III shRNA cassettes. *Mol Ther* 2004, 10(3): 597~603.
191. Scherr M, Eder M. RNAi in functional genomics. *Curr Opin Mol Ther* 2004, 6(2): 129~135.
192. Schommer SK, Kleiboeker SB, Use of a PRRS virus infectious clone to evaluate in vitro quasispecies evolution. International PRRS Symposium. St. Louis, Missouri: 2005, 20
193. Sen G, Wehrman TS, Myers JW, *et al.* Restriction enzyme-generated siRNA (REGS) vectors and libraries. *Nat Genet* 2004, 36(2): 183~189.
194. Shirane D, Sugao K, Namiki S, *et al.* Enzymatic production of RNAi libraries from cDNAs. *Nat Genet* 2004, 36(2): 190~196.
195. Silva JM, Li MZ, Chang K, *et al.* Second-generation shRNA libraries covering the mouse and human genomes. *Nat Genet* 2005, 37(11): 1281~1288.
196. Sioud M, Sorensen DR. Systemic delivery of synthetic siRNAs. *Methods Mol Biol* 2004, 252: 515~522.
197. Sirinarumitr T, Zhang Y, Kluge JP, *et al.* A pneumo-virulent United States isolate of porcine reproductive and respiratory syndrome virus induces apoptosis in bystander cells both in vitro and in vivo. *J Gen Virol* 1998, 79 (Pt 12): 2989~2995.
198. Sledz CA, Holko M, de VM, *et al.* Activation of the interferon system by short-interfering RNAs.

- Nat Cell Biol 2003, 5(9): 834~839.
199. Snijder EJ, Dobbe JC, Spaan WJ. Heterodimerization of the two major envelope proteins is essential for arterivirus infectivity. J Virol 2003, 77(1): 97~104.
200. Snijder EJ, Meulenberg JJ. The molecular biology of arteriviruses. J Gen Virol 1998, 79 (Pt 5): 961~979.
201. Snijder EJ, van TH, Pedersen KW, *et al*. Identification of a novel structural protein of arteriviruses. J Virol 1999, 73(8): 6335~6345.
202. Song E, Zhu P, Lee SK, *et al*. Antibody mediated in vivo delivery of small interfering RNAs via cell-surface receptors. Nat Biotechnol 2005, 23(6): 709~717.
203. Soutschek J, Akinc A, Bramlage B, *et al*. Therapeutic silencing of an endogenous gene by systemic administration of modified siRNAs. Nature 2004, 432(7014): 173~178.
204. Suarez P, Diaz-Guerra M, Prieto C, *et al*. Open reading frame 5 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus as a cause of virus-induced apoptosis. J Virol 1996, 70(5): 2876~2882.
205. Sui G, Shi Y. Gene silencing by a DNA vector-based RNAi technology. Methods Mol Biol 2005, 309: 205~218.
206. Sui G, Soohoo C, Affar B, *et al*. A DNA vector-based RNAi technology to suppress gene expression in mammalian cells. Proc Natl Acad Sci U S A 2002, 99(8): 5515~5520.
207. Sur JH, Doster AR, Christian JS, *et al*. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus replicates in testicular germ cells, alters spermatogenesis, and induces germ cell death by apoptosis. J Virol 1997, 71(12): 9170~9179.
208. Sur JH, Doster AR, Osorio FA. Apoptosis induced in vivo during acute infection by porcine reproductive and respiratory syndrome virus. Vet Pathol 1998, 35(6): 506~514.
209. Svoboda P, Stein P, Hayashi H, *et al*. Selective reduction of dormant maternal mRNAs in mouse oocytes by RNA interference. Development 2000, 127(19): 4147~4156.
210. Thomas CE, Ehrhardt A, Kay MA. Progress and problems with the use of viral vectors for gene therapy. Nat Rev Genet 2003, 4(5): 346~358.
211. Tijsterman M, Plasterk RH. Dicers at RISC; the mechanism of RNAi. Cell 2004, 117(1): 1~3.
212. Tuschl T, Zamore PD, Lehmann R, *et al*. Targeted mRNA degradation by double-stranded RNA in vitro. Genes Dev 1999, 13(24): 3191~3197.
213. Ui-Tei K, Naito Y, Takahashi F, *et al*. Guidelines for the selection of highly effective siRNA sequences for mammalian and chick RNA interference. Nucleic Acids Res 2004, 32(3): 936~948.
214. Urban-Klein B, Werth S, Abuharbeid S, *et al*. RNAi-mediated gene-targeting through systemic application of polyethylenimine (PEI)-complexed siRNA in vivo. Gene Ther 2005, 12(5): 461~466.
215. Vaistij FE, Jones L, Baulcombe DC. Spreading of RNA targeting and DNA methylation in RNA silencing requires transcription of the target gene and a putative RNA-dependent RNA polymerase. Plant Cell 2002, 14(4): 857~867.
216. van AD, Snijder EJ, Gorbatenya AE. Mutagenesis analysis of the Nsp4 main proteinase reveals determinants of arterivirus replicase polyprotein autoprocessing. J Virol 2006, 80(7): 3428~3437.

217. van BE, Posthuma CC, Gulyaev AP, *et al.* Discontinuous subgenomic RNA synthesis in arteriviruses is guided by an RNA hairpin structure located in the genomic leader region. *J Virol* 2005, 79(10): 6312~6324.
218. Van HH, Bleys A, Depicker A. RNA target sequences promote spreading of RNA silencing. *Plant Physiol* 2003, 131(1): 245~253.
219. van MG, Dobbe JC, Gulyaev AP, *et al.* Arterivirus discontinuous mRNA transcription is guided by base pairing between sense and antisense transcription-regulating sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999, 96(21): 12056~12061.
220. van NA, Meulenberg JJ, van EZ, *et al.* Proteins encoded by open reading frames 3 and 4 of the genome of Lelystad virus (Arteriviridae) are structural proteins of the virion. *J Virol* 1996, 70(7): 4767~4772.
221. van WP, Liefkens K, Demaret S. Effect on viraemia of an American and a European serotype PRRSV vaccine after challenge with European wild-type strains of the virus. *Vet Rec* 1998a, 142(19): 510~512.
222. van WP, Liefkens K, Demaret S. European serotype PRRSV vaccine protects against European serotype challenge whereas an American serotype vaccine does not. *Adv Exp Med Biol* 1998, 440: 713~718.
223. Vanderheijden N, Delputte PL, Favoreel HW, *et al.* Involvement of sialoadhesin in entry of porcine reproductive and respiratory syndrome virus into porcine alveolar macrophages. *J Virol* 2003, 77(15): 8207~8215.
224. Vanitharani R, Chellappan P, Fauquet CM. Short interfering RNA-mediated interference of gene expression and viral DNA accumulation in cultured plant cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003, 100(16): 9632~9636.
225. Verheije MH, Kroese MV, Rottier PJ, *et al.* Viable porcine arteriviruses with deletions proximal to the 3' end of the genome. *J Gen Virol* 2001, 82(Pt 11): 2607~2614.
226. Verheije MH, Kroese MV, van LI, *et al.* Safety and protective efficacy of porcine reproductive and respiratory syndrome recombinant virus vaccines in young pigs. *Vaccine* 2003, 21(19-20): 2556~2563.
227. Verheije MH, Olsthoorn RC, Kroese MV, *et al.* Kissing interaction between 3' noncoding and coding sequences is essential for porcine arterivirus RNA replication. *J Virol* 2002, 76(3): 1521~1526.
228. Verheije MH, Welting TJ, Jansen HT, *et al.* Chimeric arteriviruses generated by swapping of the M protein ectodomain rule out a role of this domain in viral targeting. *Virology* 2002, 303(2): 364~373.
229. Vincent AL, Thacker BJ, Halbur PG, *et al.* In vitro susceptibility of macrophages to porcine reproductive and respiratory syndrome virus varies between genetically diverse lines of pigs. *Viral Immunol* 2005, 18(3): 506~512.
230. Volpe TA, Kidner C, Hall IM, *et al.* Regulation of heterochromatic silencing and histone H3

- lysine-9 methylation by RNAi. *Science* 2002, 297(5588): 1833~1837.
231. Wang Z, Ren L, Zhao X, *et al*. Inhibition of severe acute respiratory syndrome virus replication by small interfering RNAs in mammalian cells. *J Virol* 2004, 78(14): 7523~7527.
232. Watanabe T, Sudoh M, Miyagishi M, *et al*. Intracellular-diced dsRNA has enhanced efficacy for silencing HCV RNA and overcomes variation in the viral genotype. *Gene Ther* 2006, :
233. Welch SK, Jolie R, Pearce DS, *et al*. Construction and evaluation of genetically engineered replication-defective porcine reproductive and respiratory syndrome virus vaccine candidates. *Vet Immunol Immunopathol* 2004, 102(3): 277~290.
234. Wensvoort G, Terpstra C, Pol JM, *et al*. Mystery swine disease in The Netherlands: the isolation of Lelystad virus. *Vet Q* 1991, 13(3): 121~130.
235. Wianny F, Zernicka-Goetz M. Specific interference with gene function by double-stranded RNA in early mouse development. *Nat Cell Biol* 2000, 2(2): 70~75.
236. Wieringa R, de VA, Raamsman MJ, *et al*. Characterization of two new structural glycoproteins, GP(3) and GP(4), of equine arteritis virus. *J Virol* 2002, 76(21): 10829~10840.
237. Wieringa R, de VA, van MJ, *et al*. Structural protein requirements in equine arteritis virus assembly. *J Virol* 2004, 78(23): 13019~13027.
238. Winston WM, Molodowitch C, Hunter CP. Systemic RNAi in *C. elegans* requires the putative transmembrane protein SID-1. *Science* 2002, 295(5564): 2456~2459.
239. Wissink EH, Kroese MV, van WH, *et al*. Envelope protein requirements for the assembly of infectious virions of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J Virol* 2005, 79(19): 12495~12506.
240. Wootton SK, Nelson EA, Yoo D. Antigenic structure of the nucleocapsid protein of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Clin Diagn Lab Immunol* 1998, 5(6): 773~779.
241. Wootton SK, Rowland RR, Yoo D. Phosphorylation of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus nucleocapsid protein. *J Virol* 2002, 76(20): 10569~10576.
242. Wootton SK, Yoo D. Homo-oligomerization of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus nucleocapsid protein and the role of disulfide linkages. *J Virol* 2003, 77(8): 4546~4557.
243. Wootton S, Koljesar G, Yang L, *et al*. Antigenic importance of the carboxy-terminal beta-strand of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus nucleocapsid protein. *Clin Diagn Lab Immunol* 2001, 8(3): 598~603.
244. Wu K, Gong Y, Zhang X, *et al*. Inhibition of hepatitis B virus replication by recombinant small interfering RNAs. *Acta Virol* 2005, 49(4): 235~241.
245. Wu WH, Fang Y, Farwell R, *et al*. A 10-kDa structural protein of porcine reproductive and respiratory syndrome virus encoded by ORF2b. *Virology* 2001, 287(1): 183~191.
246. Wu WH, Fang Y, Rowland RR, *et al*. The 2b protein as a minor structural component of PRRSV. *Virus Res* 2005a, 114(1-2): 177~181.
247. Xia XG, Zhou H, Ding H, *et al*. An enhanced U6 promoter for synthesis of short hairpin RNA. *Nucleic Acids Res* 2003, 31(17): e100.

248. Yang S, Tutton S, Pierce E, *et al.* Specific double-stranded RNA interference in undifferentiated mouse embryonic stem cells. *Mol Cell Biol* 2001, 21(22): 7807~7816.
249. Yoo D, The virus PRRS virus. International PRRS Symposium. St. Louis, Missouri: 2005, 23
250. Yoo D, Welch SK, Lee C, *et al.* Infectious cDNA clones of porcine reproductive and respiratory syndrome virus and their potential as vaccine vectors. *Vet Immunol Immunopathol* 2004, 102(3): 143~154.
251. Yoo D, Wootton SK, Li G, *et al.* Colocalization and interaction of the porcine arterivirus nucleocapsid protein with the small nucleolar RNA-associated protein fibrillarin. *J Virol* 2003, 77(22): 12173~12183.
252. Yoon KJ, Wu LL, Zimmerman JJ, *et al.* Antibody-dependent enhancement (ADE) of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) infection in pigs. *Viral Immunol* 1996, 9(1): 51~63.
253. Yuan S, Murtaugh MP, Faaberg KS. Heteroclitic subgenomic RNAs are produced in porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection. *Virology* 2000, 275(1): 158~169.
254. Yuan S, Murtaugh MP, Schumann FA, *et al.* Characterization of heteroclitic subgenomic RNAs associated with PRRSV infection. *Virus Res* 2004, 105(1): 75~87.
255. Zamore PD, Tuschl T, Sharp PA, *et al.* RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell* 2000, 101(1): 25~33.
256. Zhang W, Yang H, Kong X, *et al.* Inhibition of respiratory syncytial virus infection with intranasal siRNA nanoparticles targeting the viral NS1 gene. *Nat Med* 2005, 11(1): 56~62.
257. Zhang Y, Zhang YF, Bryant J, *et al.* Intravenous RNA interference gene therapy targeting the human epidermal growth factor receptor prolongs survival in intracranial brain cancer. *Clin Cancer Res* 2004, 10(11): 3667~3677.
258. Yan-Jun Zhou, Tong-Qing An, Yun-Xia He, *et al.* Antigenic structure analysis of glycosylated protein 3 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Virus Research* 2006, 118: 98~104.
259. Zimmerman JJ, Yoon KJ, Pirtle EC, *et al.* Studies of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus infection in avian species. *Vet Microbiol* 1997, 55(1-4): 329~336.

致 谢

本论文是在导师童光志研究员的精心指导和殷切关怀下完成的。值此论文完成之际，首先向导师致以崇高的敬意和由衷的感谢，感谢导师三年来对我的辛勤培育和不倦教诲。导师的渊博学识是我在知识海洋中前进的灯塔，导师严谨的治学态度和兢兢业业的工作精神是我将来学习的楷模，导师谦和的作风和睿智的思想是我人生的一面镜子，永远值得我学习。

在本论文的设计、完成和写作中，华荣虹博士、周艳君博士和安同庆博士提供了重要思路和实验材料，特别感谢他们对本研究所作的工作和给予指导。

感谢本研究室王云峰副研究员、仇华吉研究员、王玫老师、田志军老师、彭金美老师、石星明老师、姜红女士和赵和老师在生活中给予的亲切关怀和在工作中给予的大力支持，本研究的顺利完成是建立在他们的无私帮助和关怀之上的。

感谢侯绍华博士、周伦江博士、孙惠玲博士、刘燕博士、郑宝亮博士、周涛博士、张强博士、闫丽萍博士、侯艳红博士、李娜博士、李国新博士、杨春富硕士、侯强硕士、刘益民硕士、余斌硕士、王明杰硕士、赵建军硕士、徐灵龙硕士、何来硕士、崔红玉老师以及所有不能一一提名的、对本研究关心的同级的博士和硕士、已毕业的师兄和师姐以及还未毕业的师弟师妹们，感谢你们对本研究提出的中肯建议以及给予的大力支持和无私帮助，是你们的帮助使我克服了各种困难，是你们的建议和智慧使我不断进步，是你们使我的博士生活变得充实丰富。

感谢仪器室的徐哮老师、王岳老师在仪器使用中提供的方便和指导。

感谢流感中心的邓国华副研究员、病理室的吴东来研究员对本研究提供的良好环境和提出的有益建议。

感谢科研处的王笑梅研究员、孙百明老师、张晶老师在我博士期间给予的亲切关怀和热情帮助。

感谢中国农业科学院研究生院所有关心、爱护我的老师们在我博士期间给予的无私帮助和关怀。

感谢我的父母姐弟和爱人给予的至始至终的理解和支持。

最后，再次向所有关心、支持和帮助过我的老师、同学和朋友们表示衷心感谢！

本研究得到了“国家自然科学基金”（课题名称：“RNAi抑制猪繁殖与呼吸综合征病毒复制的研究”；课题编号：30470072）和“国家重点基础研究发展计划（973计划）”项目（项目名称：动物重大传染病病原变异与致病的分子机制；项目编号：2005CB523200）的资助，特此表示感谢。

作者简历

贺云霞,女,1976年2月生,汉族,中国共产党党员,山西晋城人。1996年~2000年在山西农业大学动物医学系兽医本科专业学习并取得学士学位。2000年9月~2003年1月在东北农业大学预防兽医学专业学习,取得硕士学位。2003年考取中国农业科学院研究生院预防兽医学专业博士研究生,在中国农业科学院哈尔滨兽医研究所兽医生物技术国家重点实验室进行博士课题研究工作,从事动物病毒分子生物学研究工作。

已发表主要论文

1. 贺云霞,华荣虹,周艳君,等. PCR 扩增 shRNA 表达盒快速筛选 PRRSV 高效 siRNA 序列. 中国兽医学报, 2006, (accept)
2. He YX, Hua RH, Zhou YJ, *et al.* Interference of porcine reproductive and respiratory syndrome virus replication on MARC-145 cells using DNA-based short interfering RNAs. *Antiviral Research*, 2006 (in press)
3. Zhou YJ, An TQ, He YX, *et al.* Antigenic structure analysis of glycosylated protein 3 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Virus Res* 2006, 118: 98~104.
4. 贺云霞,王君伟. 鹅卵黄 IgG 的纯化及兔抗鹅 IgG 酶标抗体的制备. 中国预防兽医学报, 2005, 27 (3) : 226-228.
5. 贺云霞,王君伟,王立群,等. 鹅细小病毒 VP2 基因在大肠杆菌中的表达及纯化[J].中国兽医学报, 2004, 24 (2) :126-128.
6. 贺云霞,王君伟,王立群. 鹅细小病毒 H1 株 VP2 基因的克隆和序列分析.中国预防兽医学报, 2003, 25 (5) :330-333.
7. 贺云霞,王君伟,马广鹏,等. 鹅细小病毒 VP2 基因原核及真核表达载体的构建.中国兽医科技, 2003, 33 (5) 30-33.