

表达短 *lef-1* dsRNA 的转化细胞 对家蚕核型多角体病毒的抗性*

鲁银松 薛仁宇 曹广力 张鹏杰 刘 波 贡成良**

(苏州大学基础医学与生物科学学院, 苏州 215123)

摘要 为了探讨 RNAi 抑制家蚕核型多角体病毒(BmNPV)增殖的效果, 用带有 *lef-1* dsRNA 表达盒的转基因载体 pigA3-LEF-Neo 转染家蚕 BmN 培养细胞, 通过 G418(750~800 mg/L)筛选, 获得了稳定转化细胞系。病毒感染试验显示, 稳定转化细胞的病毒感染率比正常细胞低 53%、转化细胞形成的多角体数量为普通细胞中的 2/3、细胞培养上清中的游离病毒减少了 90% 以上, 表明病毒在转化细胞中的增殖受到明显抑制; 半定量 RT-PCR 结果显示, 转化细胞中病毒 *lef-1* 的转录水平仅为正常细胞的 2/5~3/5, 表明转化细胞表达的 *lef-1* dsRNA 抑制了病毒 *lef-1* 基因的表达。通过反向 PCR 分析外源 DNA 片段插入基因组位点, 结果表明, 在转化细胞中外源 DNA 可通过随机整合或按照 *piggyBac* 特定的转座位点 TTAA 插入细胞基因组。

关键词 RNA 干扰, 家蚕核型多角体病毒, 培养细胞, *piggyBac* 转座子

学科分类号 Q756

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2009.00050

家蚕核多角体病毒 (*Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus, BmNPV) 属于杆状病毒科包涵体亚科, 多角体病毒属, 单粒包埋型亚属。BmNPV 是昆虫中首先被发现的病毒, 由它引起的家蚕核型多角体病毒病是养蚕业四大病毒病中危害较为严重的一种。该病毒传染性极强, 难以控制, 频繁暴发, 并造成巨大的经济损失^[1]。因此, 如何有效地防治家蚕核多角体病毒病是一个急需解决的重要问题。

在宿主昆虫细胞内, 病毒 DNA 的复制及病毒基因的表达是一种有序发生的级联事件。BmNPV 的感染过程依赖于其基因的阶段性调节和依次表达。病毒基因转录的阶段性特征以及基因表达的级联调控主要是在转录水平上进行, 即前一阶段的基因产物直接或间接的反式作用于下一阶段的基因转录^[2]。*lef* 基因是一类晚期表达因子基因, 但实际上属于病毒的早期基因。由于它们对许多晚期基因和极晚期基因的表达有着重要作用, 因而称为晚期表达因子基因(late expression factor, *lef*)^[3]。如果抑制和破坏了 *lef* 基因的表达, 理论上就能抑制 BmNPV 的增殖。

RNAi 在生物体中普遍存在, 原虫、线虫、真菌、昆虫以及哺乳类动物中都已发现 RNAi 现象。

Fire 等^[4]在 1998 年就发现少量的 dsRNA 即可导致线虫大量靶基因 mRNA 降解。RNAi 介导的基因沉默是抑制病毒复制的一种强有力手段, 通过化学合成、体外转录制备的小分子抑制 RNA (short interfering RNAs, siRNAs) 以及通过 RNA 表达载体在细胞中转录产生的 siRNA 已成功地抑制了多种病毒的增殖复制^[5,6], 因此, RNAi 技术为抑制 BmNPV 在家蚕体内增殖复制、提高家蚕对 BmNPV 的抵抗力提供了可能。

Valdes 等^[7]最早应用 RNAi 技术进行抑制杆状病毒增殖复制的研究, 体外转录分别与病毒复制必需基因 *ie-1* 和 *gp64* 互补的 dsRNA, 转染 sf 细胞, 发现这两种 dsRNA 对苜蓿银纹夜蛾核型多角体病毒(*Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus, AcMNPV)在细胞内的增殖复制有强烈抑制作用, 注射上述 dsRNA 的黄粉甲(*Tenebrio molitor*)幼虫有 95% 免于 AcMNPV 感染, 对 AcMNPV 表现出明显

* 国家自然科学基金(30571404), 江苏省教育厅自然科学基金(05KJD230181), 苏州市人才项目基金(2005-03)和国家重点基础研究发展计划(973)(2005CB121000)资助项目。

** 通讯联系人。

Tel: 0512-65880183, E-mail: gongcl@suda.edu.cn

收稿日期: 2009-01-19, 接受日期: 2009-09-03

的抵抗性, 表明病毒复制必需基因的 dsRNA 在培养细胞和虫体内都表现出对杆状病毒复制的强烈抑制. 不同基因的 dsRNAs 对杆状病毒复制的抑制效果不同, 与 *ie-1* 同源的 dsRNA 抑制杆状病毒复制的效果优于 *gp64* 的 dsRNA 的效果. Flores-Jasso 等^[8]研究表明, RNAi 抑制 AcMNPV 在 sf 细胞内的增殖复制的效果与 siRNA 的转染效率成正相关, 长的干扰 RNA(700 nt)与小分子的干扰 RNA(25 nt)在起始 RNAi 阶段具有同样的效果, 在效应阶段, 二者对 AcMNPV 的抑制能力也无明显区别, 但在 sf 细胞内, 长的 dsRNA 转为 siRNA 的能力欠佳. 徐颖等^[9]将体外转录的与 DNA 解旋酶基因和 DNA 聚合酶基因相对应的长片段 dsRNA 转染到家蚕培养细胞 BmN 中, 较好地抑制了 BmNPV 的复制; 夏定国等^[9]用体外转录的 *ie-1* 和 *gp64* 对应的 dsRNA 转染家蚕培养细胞 BmN, 结果发现实验组与对照组病毒滴度差值最高达 $10^{4.30}$, 显示明显的病毒增殖抑制效果; Isobe 等^[10]的结果显示, 转染能瞬时表达长片段 *lef-1* dsRNA 的组成型表达质粒 pIS-IRlef1 的 BmN 细胞对 BmNPV 表现出抵抗性; Kanginakudru 等^[11]选择 BmNPV 的 *ie-1* 基因作为靶基因进行 RNAi 抑制病毒增殖的研究, 结果显示, 在感染早期(36~48 h)病毒的增殖被强烈抑制, 在转化细胞中出芽型病毒的滴度下降了 86%, 但 120 h 后由于病毒恢复增殖导致 RNAi 的效果被掩盖. 我们曾通过稳定转化 BmN 细胞研究了 RNAi 抑制 BmNPV 增殖的效果, 结果显示: 在分别表达长片段(>325 nt) *ie-1* dsRNA^[12]、短片段(21 nt) *ie-1* dsRNA^[13]、短片段(21 nt) *lef-1* dsRNA^[14]的转化细胞中, 修饰型 BmNPV 中 *Lac Z* 基因的表达水平明显下降, 表明表达 dsRNA 的转化细胞对 BmNPV 的增殖有抑制效果. 为了实现通过 RNAi 赋予家蚕对 BmNPV 抗性的目标, 本论文以 BmNPV 复制中具有关键作用的晚期表达因子 *lef-1* 为靶基因, 从稳定转化细胞的病毒感染率、游离病毒和多角体数量、病毒 *lef-1* 的转录水平等方面研究其 dsRNA 对 BmNPV 增殖的抑制作用, 希望为进一步通过转基因技术提高家蚕对 BmNPV 的抗性奠定基础.

1 材料与方法

1.1 材料和试剂

家蚕细胞 BmN、野生型家蚕核型多角体病毒(BmNPV)、*E. coli* TG1 菌株、修饰型杆状病毒(Bm-BacPAK6)由苏州大学基础医学与生物科学学

院分子生物学实验室保存; 带有家蚕杆状病毒 *ie-1* 启动子控制新霉素抗性基因(*neo*)表达盒的 pIE-Neo 载体为本实验室构建^[15]; 载体 pRNAT-CMV3.2-Neo 为金斯特科技(南京)有限责任公司产品; 基于 *piggyBac* 的转基因载体 pigA3GFP 为日本农林小产省田村俊树博士馈赠, 本实验室保存; 脂质体、胎牛血清、昆虫细胞培养基 TC-100 分别为 Invitrogen、GIBCO 和 SIGMA 公司产品; 限制性内切酶、总 RNA 提取试剂盒、PCR 相关试剂、凝胶回收 kit、X-gal、IPTG、G418 购自上海生物工程有限公司; T4 DNA 连接酶为 Takara 公司产品; PCR 引物由上海生物工程有限公司合成.

1.2 方法

1.2.1 pigA3-LEF-Neo 的构建. 转基因载体 pigA3-LEF-Neo 参考文献[14]构建, 根据 BmNPV 的 *lef-1* 基因序列(GenBank 登录号, L33180.1)合成以下序列: agatcttgcgcgttaccatataatggtgacaaaaactgagtcagccgcgattggtggaaaaacaaactggagccgatactgtgtaaattgtgataacggtctctttatatagtttatcctcagcagtcggttctcatttactaagggtgtcgcgaacagtcgcattcgcattctacgtactgtcacttatttaataatactggatccgcaccgtacagctataattattcaagagataattatagctgtacgggtcttttaaggcttggtgttgcgttaggatttttttgaagtttttagattattatgaatatataataaatatacgttaataataatataatataataacacacacggcttttcatttggtgatgatcaatcttattgttcttctaattgattttttgtacaataaagatgtatccagtttccagataaagaatttagttgttatttcgtgtacctcgag, 其中黑体部分示 A3 启动子核心序列(GenBank 登录号, AF422795), 阴影部分为 *lef-1* 的 sence 序列, 方框部分 *lef-1* 的反义序列, 斜体部分示丝素轻链基因 ployA 加尾信号区域序列(GenBank 登录号, EF216676), 单下划线、双下划线、着重号分别为 *Bgl* II、*Kpn* I、*Xho* I 的酶切位点. 用 *Bgl* II 和 *Xho* I 双酶切后, 克隆到用 *Bam*H I 和 *Xho* I 双酶切的 pRNAT-CMV3.2-Neo 中, 获 pRNAT-A3-LEF 载体. 以 pRNAT-A3-LEF 为模板, 通过引物 P1 (5' ccgctcgcagtcgcgcgttaccatataatg 3', 下划线为 *Xho* I 酶切位点)和 P2(5' gcgcctcgcaggtaccagaaataacaaac 3', 下划线为 *Xho* I 酶切位点)扩增 A3-*lef* 表达盒, 回收片段, 经 *Xho* I 酶切后克隆进同样酶切处理的 pigA3GFP 中, 获得 pigA3-LEF 重组质粒. 用 *Eco*R I 酶切质粒 pIE-Neo, 回收 *ie-1* 启动子控制新霉素抗性基因(*neo*)表达盒片段, 克隆进 pigA3-LEF 的 *Eco*R I 位点, 获得转基因载体 pigA3-LEF-Neo (图 1). 该载体通过酶切鉴定后, 再进行测序确认^[14].

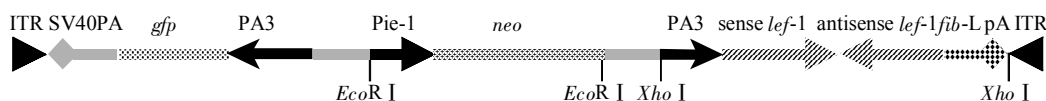


Fig. 1 The map of transgenic vector pigA3-LEF-Neo

ITR: Inverted terminal repeat; SV40 PA: PolyA signal of SV40; *gfp*: Green fluorescent protein; PA3: A3 promoter of silkworm actin; Pie-1: Promoter of immediate-early gene of silkworm baculovirus; *neo*: Neomycin resistance gene; *lef-1*: Later expression factor I gene of silkworm baculovirus; *fib-L*: PA: PolyA signal sequence of fibroin light chain.

1.2.2 BmN 细胞的培养、转染与筛选.

家蚕细胞 BmN 采用 TC-100 培养液(含 10% FBS)在 26℃ 条件下贴壁培养.

根据转染试剂说明, 将构建好的转基因 RNAi 载体 pigA3-LEF-Neo 5 μ l, 辅助质粒 5 μ l, 无血清 TC-100 40 μ l, 混匀后, 加入到稀释后的共转染试剂中(脂质体 10 μ l、TC-100 40 μ l), 进一步混匀后室温静置 30 min 待用. 将家蚕 BmN 细胞铺于 35 mm 的小培养皿(细胞密度为 1×10^6)中, 26℃ 培养 12 h 使细胞完全贴壁. 用无血清 TC-100 洗两次, 再加入 900 μ l TC-100, 滴入上述的混合液 100 μ l, 轻摇使混合液均匀分布. 26℃ 培养 6 h 以后, 补加 1 ml TC-100 和 200 μ l FBS.

转染 3 天后, 荧光显微镜下观察细胞发光情况, 并开始添加 G418 至终浓度为 750~800 mg/L 后, 进行筛选.

1.2.3 病毒 LD₅₀ 的测定. 细胞经血球计数板计数后, 在 96 孔板中加入正常 BmN 细胞或稳定转化 BmN 细胞(每孔 5×10^4 左右), 用培养基补足到 180 μ l, 培养 12 h, 使细胞贴壁. 然后每孔加 20 μ l 各级稀释度的线性化修饰杆状病毒 Bm-BacPAK6, 每个稀释度设 4 个重复. 84 h 后, 加 1 μ l 2% X-gal 低温显色, 过夜观察颜色变化. 用 Karber 法^[13]计算 LD₅₀^[16].

1.2.4 荧光显微镜观察. 将 5.85×10^5 个正常 BmN 细胞与 5.85×10^5 个稳定转化细胞混合加入培养板中, 用培养基补足至 2 ml, 培养 12 h, 分别用 10 μ l 稀释度为 10^{-9} 和 10^{-10} 的野生型 BmNPV(病毒原液的滴度为 2.77×10^{12} pfu/mL)感染, 每个稀释度作 2 个重复. 感染 84 h 后用荧光显微镜(TE2000-U, Nikon)观察, 分别测定正常 BmN 细胞和转基因细胞的感染比例.

1.2.5 病毒多角体的计数. 取稳定转化 BmN 细胞加入 96 孔板中, 每孔为 5×10^4 个(200 μ l), 重复 3 次, 同设正常 BmN 细胞对照. 培养 12 h 后, 加

10 μ l 稀释度为 10^{-7} 的野生型 BmNPV 病毒(病毒原液的滴度为 2.77×10^{12} pfu/ml). 每隔 24 h, 取 3 个重复孔用血球计数板分别计数多角体数量求平均值(多角体数量 /ml).

1.2.6 病毒的增殖曲线. 分别取 2×10^6 个左右的正常 BmN 细胞和转化细胞加入 6 孔板中, 用培养基补足到 2 ml, 后接种 10 μ l 稀释度为 10^{-2} 的 Bm-BacPAK6(原液的滴度为 0.51×10^6 pfu/ml). 每隔 24 h 取上清 20 μ l, 测定病毒的滴度, 重复 3 次.

1.2.7 半定量 RT-PCR. 分别取 1×10^6 个左右的 BmN 细胞和转基因细胞加入 6 孔板中, 用培养基补足到 1 ml, 接种 10 μ l 稀释度为 10^{-9} 和 10^{-10} 的野生型 BmNPV(病毒原液的滴度为 2.77×10^{12} pfu/ml), 84 h 后, 用总 RNA 提取试剂盒按产品说明书提取细胞总 RNA, 溶解于 20 μ l H₂O 中, 取 1.5 μ l RNA, 用 oligo dT 反转录成 cDNA. 以 cDNA 为模板, LEF1F (CGCAAGTACGCGTTCATGAC) 和 LEF1R (CAATTGTGCGGCGGTATCAAAATAT) 为引物, 扩增 *lef-1* 基因的部分片段. 扩增条件为: 94℃ 预变性 2 min, 94℃ 变性 1 min, 53℃ 复性 1 min, 72℃ 延伸 15 s, 扩增 35 循环后, 72℃ 延伸 5 min. 同设 actin 对照. 所用引物对为 Actin-3P1 (AACACCCCGTCCTGCTCACTG) 和 Actin-3 P2 (GGGCGAGACGTGTGATTTCCT).

1.2.8 插入位点的分析. 为了检测外源 DNA 插入到 BmN 细胞基因组的位置, 根据 piggyA3GFP 的序列, 设计了 Inv1 (ATCAGTGACACTTTACCGC-ATTGACA)、Inv2 (TGACGAGCTTGTTGGTGAG-GATTCT)、Inv3 (TACGCATGATTATCTTTAACG-TA)、Inv4 (GGGGTCCGTCA AAACAAAACATC) 4 条引物^[17]. 抽提的细胞基因组 DNA 经 *Sau*3A I 酶切后, 用连接酶环化, 以连接产物为模板, 分别以 Inv1/Inv2(插入序列的 5')和 Inv3/Inv4(插入序列的 3')为引物, 参照文献[15]进行反向 PCR, 回收 PCR 产物, 克隆进 pUCm-T 载体后进行序列测定.

2 结 果

2.1 稳定转化细胞的筛选

在 TC-100 培养基中, 添加终浓度分别 500、600、800、900 以及 1000 mg/L 的 G418, 观察 G418 的浓度对正常 BmN 细胞生长的影响, 以确定筛选转化细胞时所用的 G418 浓度. 结果显示, G418 终浓度在 500~600 mg/L 时, 细胞的生长正常, 几乎不受 G418 的影响, 当 G418 的浓度达到 700 mg/L 时, 细胞在第 3 天表现出明显的繁殖抑制, 细胞状态明显变差, 到第 4 天细胞生长几乎完全被抑制, 可见细胞大量死亡, 当培养基中 G418 的浓度达到 800~1000 mg/L 时, 在第 3 天细胞破裂, 在显微镜下只能观察到极少状态不佳的细胞. 因此, BmN 细胞转染 pigA3-LEF-Neo 3 天后, 用终浓度为 750~800 mg/L 的 G418 筛选, 随着筛选时间的延长, 荧光细胞比例明显上升, 筛选 2 个月后, 荧光细胞比例达 80% 以上(图 2), 不同细胞间荧光强度有明显区别. 但继续筛选, 荧光细胞的比例未见明显上升. 不同细胞间荧光强度有明显区别.

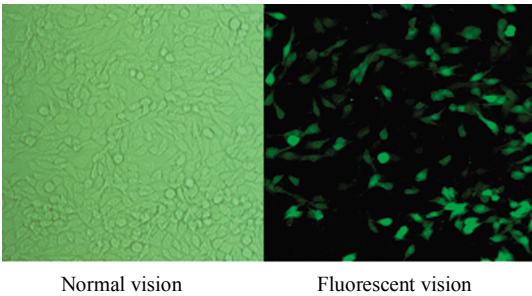


Fig. 2 BmN cells transfected with pigA3-LEF-Neo (magnification 10×10)

2.2 稳定转化细胞对家蚕杆状病毒增殖的抑制作用

取 G418 连续筛选 2 个月以上的转化细胞, 与正常 BmN 细胞混合, 接种野生型的 BmNPV, 感染 84 h 后用荧光显微镜观察, 结果如图 3 所示, 正常的 BmN 细胞(非荧光细胞)因病毒感染表现出明显的病理变化, 大多数细胞呈裂解状态, 而绝大多数转化细胞(荧光细胞)的状态正常, 表明通过 pigA3-LEF-Neo 介导的转化细胞对 BmNPV 表现出明显的抗性. 随机选择 5 个视野, 分别观测 BmN 细胞和转化细胞的病毒感染比例, 结果如表 1 所示. 不论是感染稀释度为 10^{-9} 还是 10^{-10} 的病毒(病

毒原液滴度为 2.77×10^{12} pfu/ml), 转化细胞的病毒感染率比未处理的正常细胞低 53% 左右, 表明通过转基因载体 pigA3-LEF-Neo 的介导, 提高了转化细胞对 BmNPV 的抵抗性.

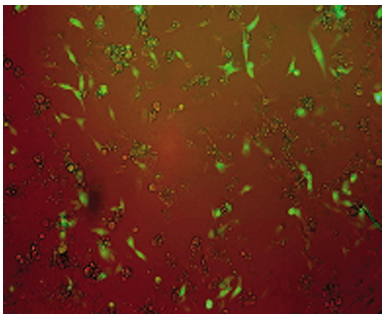


Fig. 3 Normal and transfected cells infected with BmNPV The original viral titer was 2.77×10^{12} pfu/ml. Inoculating with virus at the concentration of being 10^{-10} diluted, green fluorescence presented transformation cells, non-fluorescence presented normal BmN cells.

Table 1 Infection ratio of BmNPV between normal cells and transformation cells

Dilution of virus	Kinds of cell	Virus' infection ratio/%
10^{-9}	BmN cell	89.18
	Transformation cells	36.12
10^{-10}	BmN cell	77.86
	Transformation cells	24.72

The original viral titer was 2.77×10^{12} pfu/ml.

为了进一步测定稳定转化细胞对家蚕杆状病毒的抗性, 用不同滴度的病毒接种转化细胞, 调查细胞发病情况, 结果如表 2 所示. 根据 Karber 法计算^[16], 病毒对转化细胞的 LD_{50} 为 $10^{-3.5}$, 对正常 BmN 细胞的 LD_{50} 为 $10^{-4.25}$, 与正常细胞相比, 转化细胞对病毒的抗性提高了 5.6 倍.

Table 2 Tolerance of normal and transformation cells to BmNPV

Dilution of virus	Incidence rate	
	Normal cell	Transformation cell
10^0	4/4	4/4
10^{-1}	4/4	4/4
10^{-2}	4/4	3/4
10^{-3}	4/4	3/4
10^{-4}	3/4	2/4
10^{-5}	0/4	0/4
10^{-6}	0/4	0/4
10^{-7}	0/4	0/4
10^{-8}	0/4	0/4

The original viral titer was 0.51×10^6 pfu/ml. The cell density was 5×10^4 (180 μ l/well) where 20 μ l virus in different dilution was added into.

2.3 家蚕杆状病毒在转化细胞和非转化细胞中的增殖比较

转化细胞接种野生型 BmNPV 后, 在感染后的不同时间段, 调查形成的多角体数量, 结果如图 4 所示, 随着病毒的增殖多角体的数量明显增加, 但与非转化细胞相比, 在各个调查时间点, 转化细胞形成的多角体数量明显减少, 说明病毒在转化细胞中的增殖受到明显的抑制, 在病毒感染 96~120 h 间, 在转化细胞中形成的多角体数量大约为普通细胞中的 2/3.

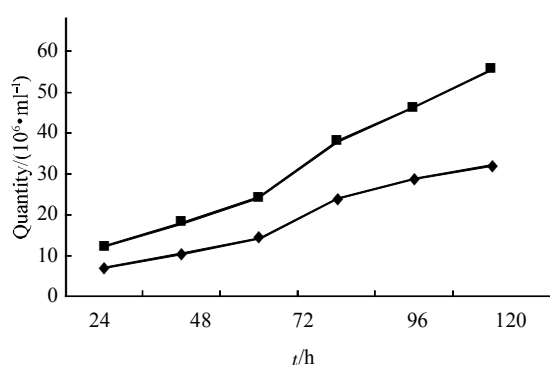


Fig. 4 Quantitative comparison of the polyhedron from normal cells with that from transformation cells infected with virus

◆—◆: Transgenic cell; ■—■: BmN cell.

细胞接种病毒后, 取不同时间段的细胞培养上清, 测定病毒的滴度, 结果如图 5 所示. 随着病毒感染进程的推进, 从细胞中释放出的游离病毒增多, 但转化细胞培养上清中的病毒数量明显少于正常细胞上清的数量, 总体上看, 二者间的病毒数量相差 10~20 倍.

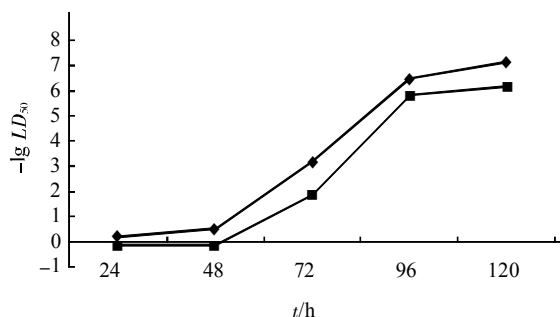


Fig. 5 Proliferation curve of BmNPV in normal BmN cells and transformation cells

■—■: Transgenic cell; ◆—◆: BmN cell.

2.4 半定量 RT-PCR

以稀释度为 10^{-9} 和 10^{-10} 的野生型 BmNPV 病毒(病毒原液滴度为 2.77×10^{12} pfu/ml)感染正常细胞和转化细胞后提取总 RNA, 然后反转录成 cDNA, 以各自的 cDNA 为模板分别对 *actin* 和 *lef-1* 基因进行 PCR, 结果如图 6 所示. 病毒 *lef-1* 基因的转录在转化细胞中受到明显抑制. 电泳条带的灰度分析结果显示, 在病毒稀释度为 10^{-9} 区, 转化细胞中 *lef-1* 的转录水平仅为正常细胞的 57%, 在病毒稀释度为 10^{-10} 区, 转化细胞中 *lef-1* 的转录水平仅为正常细胞的 42%.

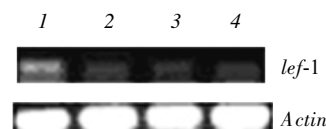


Fig. 6 Transcription analysis of *lef-1* by semi-quantitative RT-PCR

1: Normal cells were infected by virus with 10^{-9} dilution; 2: Transformation cells were infected by virus with 10^{-9} dilution; 3: Normal cells were infected by virus with 10^{-10} dilution; 4: Transformation cells were infected by virus with 10^{-10} dilution.

2.5 插入位点分析

以前的结果表明, 由 *piggyBac* 转座子介导的转座发生在基因组的 TTAA 位点^[17]. 为了分析外源 DNA 片段在转化细胞基因组中的插入位点, 转化细胞基因组 DNA 经 *Sau3A I* 酶切、连接酶环化后作为模板, 分别以 *Inv1/Inv2* 和 *Inv3/Inv4* 为引物, 进行反向 PCR, 回收 PCR 产物, 克隆进 pUCm-T 载体后进行序列测定. 以 *Inv1/Inv2* 扩增的特异性片段, 大小 300 bp 左右. 挑取 2 个克隆进行序列测定, 表现出 *piggyBac* 转座子转座所具有的典型特征插入位点(TTAA). *Inv3/Inv4* 为引物可分别扩增出约 300~350 bp 的片段. 挑取 3 个克隆进行序列测定, 发现其中 2 个序列为转基因载体本身序列, 未发现细胞基因组序列, 与文献[13, 15]报道的结果一致. 另一个克隆的测序结果如图 7 所示: 发现一段 124 bp 的非载体序列, Blast 搜寻结果显示, 该序列与家蚕基因组第 20 号染色体的微卫星 S2015-R 序列(GenBank 登录号: DQ243670)的第 553~639 nt 区域具 82% 一致性, 但未发现 *piggyBac* 转座子所介导的插入位点特征序列 TTAA.

```

ggggccgtcaacaacatc gatgttccactggcctgggcgactgttttcagtactccgtatctcgcgtttgttgatccagcaagactactatccaggttaga
ctccgtgagttcacctactcgcagggcgaatctagtataacccctcaggtgactagattggtaggataaaaaagagcctagttataaaaaaaggatcaaacgc
aaatcgacgaaaatgtgtcggacaatatcaagtcgatgagcgaataaaaaaggctagaatacgcacacagcgttgagatatacgttattcacgac
agcaggctgaataataaaaaattagaactattatttaaccctagaaagataatcatattgtgacgtacgttaagataatcatcgta

```

Fig. 7 Inverse PCR strategy to identify the genomic sequences flanking the insertion sites in transformed cells

Underline showed primer sequence, frame showed genome sequence, bold showed *Sau*3A I site.

3 讨 论

家蚕血液型脓病(核型多角体病或杆状病毒病)是生产中经常发生的一种重要的传染性蚕病,是蚕茧产量歉收的重要原因之一。该病是由家蚕核型多角体病毒(*Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus, BmNPV)感染引起。饲养抗病品种是防治传染性蚕病传染与发生的关键措施,国内外已有许多研究人员在家蚕抗病品种选育方面做了很多有益的探索。一般认为,家蚕对 BmNPV 的抗性属水平抗性,通过常规方法进行抗 BmNPV 品种选育定向性差、周期长、育种效率低。因此,有必要探索提高家蚕品种对 BmNPV 抵抗性的新方法。RNAi 介导的基因沉默是抑制病毒复制的一种强有力手段, RNAi 技术和转基因技术的结合定向提高家蚕对 BmNPV 的抵抗力提供了可能。

Isobe 等^[10]利用 *piggyBac* 转座子,通过转基因使家蚕表达 *lef-1* 的长片段 dsRNA(430 bp),赋予家蚕对 BmNPV 呈中度抗性,尽管病毒在转基因家蚕中的增殖受到明显抑制,但接种病毒的转基因家蚕最终仍未逃脱因病毒感染而导致的死亡; Kanginakudru 等^[11]的研究结果显示,表达 *ie-1* 的长片段 dsRNA(470 bp)的转基因接种病毒后,其发病率比对照组降低了 40%。尽管通过转基因 RNAi 提高了家蚕对 BmNPV 的抗性,但总体而言提高的幅度并不是很大。一般认为 RNAi 的效果与 dsRNA 的长短、序列特异性、细胞内 dsRNA 的水平以及细胞中 Dicer 酶的活性等多种因素有关。因此继续开展相关基础研究,将为最终获得对 BmNPV 呈高度抗性的转基因家蚕提供有价值的参考。

在线虫和果蝇中,长的 dsRNA 与短的 dsRNA 具有同样的 RNAi 效果,但在哺乳类细胞中,一般认为只有 21~23 nt 的 dsRNA 才能发挥作用^[18]。Valdes 等^[7]的研究显示,与 *ie-1* 基因同源的长 dsRNA 也能强烈抑制 AcNPV 在细胞中的复制; Flores-Jasso 等在研究 RNAi 抑制 AcMNPV 在 sf 细

胞内的增殖效果时发现,长的干扰 RNA(700 nt)与小分子的干扰 RNA (25 nt)对 AcMNPV 的抑制能力也无明显区别,但在 sf 细胞内,长的 dsRNA 转为 siRNA 的能力欠佳^[9]。我们先前的研究结果也证实,由 DNA 载体在培养 BmN 细胞内转录形成的与 *ie-1* 基因同源的发夹状长 dsRNA(>325 bp)也能很好抑制 BmNPV 在细胞内的增殖^[12, 14],与短的 *ie-1* dsRNA(21 bp)抑制病毒增殖的效果^[13]相比,二者之间也没有表现出明显的差异,因此可以推测 BmN 细胞将长的 dsRNA 转为 siRNA 的能力也不佳。不同基因的 dsRNAs 对杆状病毒复制的抑制效果不同,与 *ie-1* 同源的 dsRNA 抑制病毒增殖的效果优于 *gp64* 的 dsRNA 的效果。在本研究中,我们探讨了组成型表达的短(21 nt)的 *lef-1* dsRNA 对 BmNPV 的增殖抑制效果,结果显示转化细胞的病毒感染率比未处理的正常细胞低 53%(表 1),形成多角体的数量明显减少(图 4),细胞培养上清中的游离病毒减少了 90%以上,表明病毒在转化细胞中的增殖受到明显抑制,病毒增殖的抑制水平与短 *ie-1* dsRNA 转化细胞所表现出的病毒增殖抑制水平相当^[13]。半定量 RT-PCR 结果显示,转化细胞中病毒 *lef-1* 的转录水平仅为正常细胞的 2/5~3/5,表明转化细胞表达的 *lef-1* dsRNA 抑制了病毒 *lef-1* 基因的表达。

siRNAs 在细胞内沉默基因有一定的时效性,基于 DNA 载体的 RNAi 技术可以在细胞内瞬时或稳定地产生 siRNA,从而可以较长时间地抑制同源基因的功能^[18, 19]。表达短 *lef-1* dsRNA 的转化细胞感染病毒试验表明,在病毒感染 72 h 时, RNAi 效果较为明显,但到病毒感染后期, RNAi 的效果因病毒重新恢复增殖而被掩盖,并没有显示持续的 RNA 干扰效果。其原因可能是,稳定转化细胞表达外源基因的水平不高^[15],产生的 dsRNA 的拷贝数不够。提示通过筛选合适的启动子提高 dsRNA 的表达水平有可能改善转化细胞对 BmNPV 的抑制作用。RNAi 具有严格的序列特异性,病毒有可能

通过突变对 RNAi 的产生逃逸^[20], 从而影响 RNAi 的效果, 提示通过双元或多元的 dsRNA 可以提高 dsRNA 对病毒增殖的抑制效果.

通过 G418 (750~800 mg/L) 筛选转染 pigA3-LEF-Neo 的 BmN 细胞 2 个月, 荧光细胞比率在 80% 以上, 但进一步筛选, 并未见荧光细胞比例有进一步提升, 表明 pigA3-LEF-Neo 载体可以随机整合进细胞基因组, 导致近 20% 的细胞对 G418 具有抗性, 但不表现出荧光. 这一结论与周文林等^[15]和张鹏杰等^[13]的结果一致, 通过 G418 筛选出的细胞尽管对 G418 具有抗性, 但并非所有的细胞都能有效转录出 *lef-1* dsRNA (仅有 80% 细胞具有荧光), 不能产生 dsRNA 的细胞因病毒的感染进而复制产生大量的病毒, 导致 RNAi 的效果被掩盖, 这也是稳定转化细胞没有显示持续的 RNA 干扰效果的原因之一. 在稳定转化细胞, 不同细胞所表现出荧光强弱有明显差异, 推测这与不同细胞中 *GFP* 基因的拷贝数不同有关, 也有可能与 *GFP* 基因插入细胞基因组的位置有关, 提示通过分选不同荧光强度的转化细胞, 分析 *GFP* 基因插入区域的基因组序列有可能捕捉到增强子或沉默子元件.

由研究结果中可以看到, *piggyBac* 转座子介导的转座发生在基因组的 TTAA 位点^[17]. 为了分析外源 DNA 片段在转化细胞基因组中的插入位点, 我们测定了 5 个反向 PCR 产物的序列, 其中 2 个显示载体序列与基因组间的边界序列为 TTAA, 表现为 *piggyBac* 转座子特异性插入序列, 另 2 个未检测到基因组序列, 表明 *piggyantiLE-Neo* 转染细胞后发生 2 种事件: 其一为外源片段通过 *piggyBac* 的转座作用整合进细胞的基因组; 另一个为随机整合事件. 另一个克隆虽然发现一段额外的 124 bp 的基因组序列, 但未发现 *piggyBac* 转座子所介导的插入位点特征序列 TTAA, 我们推测细胞基因组 DNA 经 *Sau3A I* 酶切后, 用连接酶连接时, 2 个片段连接后再环化从而导致出现一段额外的基因组.

已有的研究表明, 瞬时转染 BmNPV 复制必需基因对应 dsRNA 的家蚕培养细胞或表达其 dsRNA 的转化细胞均呈现出对 BmNPV 的抗性, 但总体而言抗性提高的幅度并不是很大, 因此, 今后有必要进一步筛选 RNAi 的靶基因、靶序列, 研究通过双元或多元的 dsRNA 提高 RNAi 对病毒增殖的抑制效果, 并在此基础上通过家蚕转基因 RNAi 研究, 最终获得对 BmNPV 呈高度抗性的转基因家蚕.

参 考 文 献

- 徐家萍, 刘明辉, 孙 帆. 家蚕核型多角体的抗性机制研究进展. 中国蚕业, 2006, **27**(2): 8~14
- Xu J P, Liu M H, Shun F. Chin Sericulture, 2006, **27**(2): 8~14
- 徐 颖, 朱成钢, 金勇丰, 等. dsRNA 对家蚕核多角体病毒 (BmNPV) 复制的抑制作用. 科学通报, 2004, **49**(11): 1073~1078
- Xu Y, Zhu C G, Jin Y F, *et al.* Chin Sci Bull, 2004, **49**(11): 1073~1078
- 刘德立, 齐义鹏. 杆状病毒 *lef* 基因家族及其功能. 病毒学报, 2001, **17**(2): 188~191
- Liu D L, Qi Y P. Chin J Virology, 2001, **17**(2): 188~191
- Fire A, Xu S Q, Montgomery M K, *et al.* Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. Nature, 1998, **391**(6669): 806~811
- Lopez T, Camacho M, Zayas M, *et al.* Silencing the morphogenesis of rotavirus. J Virol, 2005, **79**(1): 184~192
- Susan L, Uprichard, Bryan Boyd, *et al.* Clearance of hepatitis B virus from the liver of transgenic mice by short hairpin RNAs. Proc Natl Acad Sci USA, 2005, **102**(3): 773~778
- Valdes V J, Sampieri A, Sepulveda J, *et al.* Using double-stranded RNA to prevent *in vitro* and *vivo* viral infections by recombinant baculovirus. J Biol Chem, 2003, **278**(21): 19317~19324
- Flores-Jasso C F, Valdes V J, Sampieri A, *et al.* Silencing structural and nonstructural genes in baculovirus by RNA interference. Virus Research, **102** (2004): 75~84
- 夏定国, 张国政, 王文兵, 等. dsRNA 对家蚕核型多角体病毒复制增殖的抑制效果. 蚕业科学, 2006, **32**(2): 206~210
- Xia D G, Zhang G Z, Wang W B, *et al.* Acta Sericologica Sin, 2006, **32**(2): 206~210
- Isobe R, Kojima K, Matsuyama T, *et al.* Use of RNAi technology to confer enhanced resistance to BmNPV on transgenic silkworms. Arch Virol, 2004, **149**(10): 1931~1940
- Kanginakudru S, Royer C., Edupalli S. V, *et al.* Targeting *ie-1* gene by RNAi induces baculoviral resistance in lepidopteran cell lines and in transgenic silkworms. Insect Molecular Biology, 2007, **16**(5): 635~644
- 薛仁宇, 曹广力, 王崇龙, 等. 基于 DNA 载体的 RNAi 抑制家蚕核型多角体病毒复制. 蚕业科学, 2006, **32**(3): 362~367
- Xue R Y, Cao G L, Wang C L, *et al.* Acta Sericologica Sin, 2006, **32**(3): 362~367
- 张鹏杰, 薛仁宇, 曹广力, 等. 表达短 *ie-1* dsRNA 的转化细胞对家蚕核型多角体病毒的抑制作用. 蚕业科学, 2008, **34**(3): 459~465
- Zhang P J, Xue R Y, Cao G L, *et al.* Acta Sericologica Sin, 2008, **34**(3): 459~465
- 薛仁宇, 曹广力, 王崇龙, 等. *Ie-1* 和 *lef-1* 基因 dsRNA 表达元件转染及转化细胞对家蚕核型多角体病毒增殖的抑制. 蚕业科学, 2008, **34**(2): 052~052
- Xue R Y, Cao G L, Wang C L, *et al.* Acta Sericologica Sin, 2008, **34**(2): 052~052
- 周文林, 王崇龙, 刘 波, 等. PiggyBac 转座子介导的家蚕细胞转基因研究初探. 蚕业科学, 2007, **33**(1): 30~35

- Zhou W L, Wang C L, Liu B, *et al.* Acta Sericologica Sin, 2007, **33** (1): 30~35
- 16 刘世亨, 朱明生, 董 震. 彼得异蝎蝎毒的毒力测定. 大理学院学报, 2008, **4**(7): 7~8
- Liu S N, Zhu M S, Dong Z. J Dali University, 2008, **4**(7): 7~8
- 17 Tamura T, Thibert C, Royer C, *et al.* Germline transformation of the silkworm *Bombyx mori* L. using a piggyBac transposon-derived vector. Nature Biotechnology, 2000, **18**: 81~84
- 18 Hammond S M, Caudy A A, Hannon G J. Post-transcriptional gene silencing by double-stranded RNA. Nature Rev Gen, 2001, **2** (2): 110~119
- 19 Brummelkamp T R, Bernards R, Agami R. A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. Science, 2002, **296**(5567): 550~553
- 20 Leonard J N, Schaffer D V. Computational design of antiviral RNA interference strategies that resist human immunodeficiency virus escape. Virol, 2005, **79**(3): 1645~1654
- 18 Hammond S M, Caudy A A, Hannon G J. Post-transcriptional gene

Resistance to BmNPV of Transformation Cells Expressing Short *lef-1* dsRNA *

LU Yin-Song, XUE Ren-Yu, CAO Guang-Li, ZHANG Peng -Jie, LIU Bo, GONG Cheng-Liang**

(Pre-clinical Medical and Biological Science College, Soochow University, Suzhou 215123, China)

Abstract In order to investigate the inhibiting effect of RNAi on the proliferation of *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus (BmNPV), BmN cells were transfected with transgenic vector pigA3-LEF-Neo containing *lef-1* dsRNA expression cassette, to produce stable transformation cell line screened with G418(750~800 mg/L). Virus infection test showed that (1) the infection ratio of the stable transformation cells was lower than that of normal cells by 53%, (2) the quantity of polyhedron from transformation cells were 2/3 of that of normal cells and (3) the number of liberation virus from cell culture's supernatant decreased more than 90%, suggesting that the virus' proliferation in the transformation cells was depressed significantly. The result underlying the transcriptional level of the *lef-1* gene in the transformation cells was only 2/5~3/5 of that in the normal cells suggested that the transcribed *lef-1* dsRNA in transformation cells inhibited the expression of the *lef-1* gene. Inverse PCR was used to locate the site of exogenous DNA fragment insertion in genome, of which the result showed that in the transformation cells, exogenous DNA could be inserted into the cell genome randomly or at TTAA target sequence specifically for *piggyBac* element transposition.

Key words RNA interference, BmNPV, cell culture, piggyBac transposition

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2009.00050

*This work was supported by a grant from The National Natural Science Foundation of China(30571404), The Natural Science Foundation of Educational Commission of Jiangsu Province(05KJD230181), The Foundation for the Talent of Suzhou(2005-03) and National Basic Research Program of China(2005CB121000).

**Corresponding author.

Tel: 86-512-65880183, E-mail: gongcl@suda.edu.cn

Received: January 19, 2009 Accepted: September 3, 2009