

siRNA干扰对鲤疱疹病毒II型ORF57基因表达的影响

金李萍 潘晓艺 蔺凌云 姚嘉赞 曹铮 尹文林 赖迎迢 陶家发 刘忆瀚 沈锦玉

INFLUENCE OF siRNA TARGETING CYHV-2 ORF57 GENE ON REPLICATION OF CYHV-2 IN CSC CELLS

JIN Li-Ping, PAN Xiao-Yi, LIN Ling-Yun, YAO Jia-Yun, CAO Zheng, YIN Wen-Lin, LAI Ying-Tiao, TAO Jia-Fa, LIU Yi-Han, SHEN Jin-Yu

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.7541/2021.2020.296>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

鳗鲡肾脏细胞系的建立及其对鳗鲡疱疹病毒的敏感性

THE ESTABLISHED KIDNEY CELL LINE FROM EUROPEAN EEL *ANGUILLA ANGUILLA* AND ITS SUSCEPTIBILITY TO *ANGUILLID HERPESVIRUS*

水生生物学报. 2020, 44(2): 237-244 <https://doi.org/10.7541/2020.028>

在患CyHV-2病的异育银鲫肠道黏膜中胆固醇、胆汁酸代谢通路基因的差异表达

GENE DIFFERENCE EXPRESSION OF CHOLESTEROL AND BILE ACID METABOLISM PATHWAY IN INTESTINAL MUCOSA WITH THE CYHV-2 DISEASE *CARASSIUS AURATUS GIBELIO*

水生生物学报. 2017, 41(5): 956-962 <https://doi.org/10.7541/2017.119>

一种可高效转染的青肌肉细胞系的建立与应用

ESTABLISHMENT AND APPLICATION OF A CELL LINE FROM MEDAKA (*ORYZIAS LATIPES*) MUSCLE WITH HIGHER TRANSFECTION EFFICIENCY

水生生物学报. 2019, 43(2): 322-329 <https://doi.org/10.7541/2019.040>

兴国红鲤ER基因克隆表达及EE2暴露对肝中ER表达的影响

CLONE AND EXPRESSION OF *ER* GENES IN XINGGUO RED CARP AND THEIR EXPRESSION IN LIVER UPON EE2 EXPOSURE IN JUVENILES

水生生物学报. 2017, 41(1): 26-32 <https://doi.org/10.7541/2017.4>

RNAi在甲壳动物中的研究进展

RESEARCH PROGRESS OF RNA INTERFERENCE IN CRUSTACEANS

水生生物学报. 2017, 41(2): 460-472 <https://doi.org/10.7541/2017.58>

长江江豚脐带永生化成纤维细胞系建立及细胞生长特性研究

IMMORTALIZATION OF YANGTZE FINLESS PORPOISE FIBROBLAST CELL AND PRELIMINARY STUDY ON THE GROWTH CHARACTERISTICS

水生生物学报. 2021, 45(1): 39-47 <https://doi.org/10.7541/2021.2019.077>



doi: 10.7541/2021.2020.296

siRNA干扰对鲤疱疹病毒II型ORF57基因表达的影响

金李萍¹ 潘晓艺² 蔺凌云² 姚嘉赞² 曹铮² 尹文林² 赖迎迢³
陶家发³ 刘忆瀚² 沈锦玉^{1,2,3}

(1. 上海海洋大学水产与生命学院, 上海 201200; 2. 浙江省淡水水产研究所, 农业农村部淡水渔业健康养殖重点实验室, 浙江省鱼类健康与营养重点实验室, 湖州 313001; 3. 中国水产科学研究院珠江水产研究所, 农业农村部渔用药物创制重点实验室, 广州 510380)

摘要: 研究通过在异育银鲫脊髓细胞系(Spinal cord tissue cell lines of *Carassius auratus gibelio*, CSC)中对鲤疱疹病毒II型(Cyprinid herpesvirus 2, CyHV-2) ORF57进行RNA干扰, 以探究其对CyHV-2病毒复制的影响。首先, 以FAM标记的异育银鲫 β -actin的siRNA进行CSC细胞转染条件的优化, 再将针对CyHV-2 ORF57基因设计的3条siRNA, 转染CSC细胞, 并进行病毒感染, 评估siRNA对病毒复制和致细胞病变的影响。转染条件优化结果显示, 在siRNA浓度为80 nmol/L, 转染液维持24h后更换维持液, β -actin基因表达量最低且观察到的荧光点数量最多。而ORF57-siRNAs干扰结果显示, ORF57-siRNA-2组表现出了较强的抑制效果, 在接毒48h时, ORF57-siRNA-2处理组的ORF57基因表达量降到相对于Mock组的33.55% ($P < 0.01$), 并且各ORF57-siRNA组都表现出了延缓CyHV-2致细胞病变的时间和强度, 抑制时间可达120h。TCID₅₀结果显示, 不同组的ORF57-siRNAs均能降低病毒滴度, 其中ORF57-siRNA-2将病毒原液TCID₅₀ $10^{8.487}$ /mL下降至 $10^{6.776}$ /mL。研究结果表明, 干扰ORF57的表达可大大降低CyHV-2的致细胞病变力和复制率, ORF57在CyHV-2复制与致细胞病变中起重要作用。本研究为CyHV-2基于siRNA技术的抗病毒治疗和弱毒株的改造提供了借鉴。

关键词: 鲤疱疹病毒II型; RNA干扰; ORF57; 小干扰RNA; 异育银鲫脊髓细胞系; TCID₅₀

中图分类号: S943 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3207(2022)04-0537-08



鲤疱疹病毒II型(Cyprinid herpesvirus 2, CyHV-2)是一种能够感染金鱼和鲫及鲫变种的双链DNA病毒, 是鲤科鱼类中发现的第二种疱疹病毒, 其属于疱疹病毒目(Herpesvirales)异源疱疹病毒科(Alloherpesviridae)鲤疱疹病毒属(*Cyprinivirus*)^[1]。该病毒感染鲫可引起鲫造血器官坏死病(Crucian carp hematopoietic necrosis)^[2], 患病鲫表现为食欲下降, 离群独游, 呼吸速率增加, 体表和鳍条基部出血, 眼球突出, 鳃丝肿胀, 充血或出血; 脾和肾肿大、充血等症状。该病病程发展迅速, 死亡率高达90%—100%, 已成为影响中国鲫鱼养殖最为严重的疫病之一^[3-5]。

RNAi(RNA interference, RNA干扰)^[6,7]指通过

双链RNA(dsRNA)的介导, 特异性降解对应序列的mRNA, 从而特异性抑制相对应基因的表达。目前RNAi技术已广泛运用于植物、线虫和果蝇等模式生物的基因表达、调控与功能的研究中, 在水生动物抗病毒研究中, RNA干扰技术也被广泛应用, 如用于对白斑综合症病毒、黄头病毒、草鱼出血病病毒和神经坏死病毒的抗病毒感染研究^[8]。黄桂菊等^[9]通过对融合了绿色荧光蛋白(EGFP)基因的石斑鱼神经坏死病毒(Nervous necrosis virus, NNV)衣壳蛋白(Major capsid protein, MCP)基因进行siRNA干扰试验, 表明不同剂量的siRNA均能干扰绿色荧光蛋白的表达。

本实验针对CyHV-2 ORF57设计3组siRNA, 通

收稿日期: 2021-01-07; 修订日期: 2021-06-24

基金项目: 国家重点研发计划(2019YFD0900103); 浙江省重点研发计划(2019C02058)资助 [Supported by National Key R & D Program of China (2019YFD0900103); Key R & D Program Projects of Zhejiang Province (2019C02058)]

作者简介: 金李萍(1995—), 女, 硕士研究生; 主要从事水生动物病害研究。E-mail: 874660321@qq.com 潘晓艺, 副研究员; 主要从事水产动物病原生物学与免疫预防研究。E-mail: panxiaoyi@163.com *共同第一作者

通信作者: 沈锦玉, 研究员, E-mail: sjinyu@126.com

过转染异育银鲫脊髓组织细胞系(Spinal cord tissue cell lines of *Carassius auratus gibelio*, CSC)后,进行CyHV-2感染,通过对细胞病变和病毒含量的测定评估各组siRNA对病毒复制的抑制效率,为分析CyHV-2的功能因子,及通过RNA干扰技术防治CyHV-2提供研究基础。

1 材料与方法

1.1 材料

异育银鲫脊髓组织细胞系CSC^[10]、CyHV-2病毒株CNTB2015由浙江省淡水水产研究所鱼病室保存。脂质体Lipofectamine 2000购自Invitrogen公司;L-15培养基、双抗、胰蛋白酶-EDTA、Opti-MEM I购自Gibco公司;新生牛血清,购自金源康公司;培养细胞总RNA提取试剂盒(DP430)、FastKing cDNA第一链合成试剂盒、SuperReal荧光定量预混试剂购自天根生化科技(北京)有限公司。

1.2 siRNA的合成及引物设计

根据CyHV-2病毒株CNTB2015基因组(GenBank: MN201961)的ORF57基因片段设计3条siRNA,并设一组阴性siRNA(siRNA-control);针对异育银鲫 β -actin基因设计一条FAM修饰的siRNA,同时设计合成针对各条siRNA作用位点的检测用引物,由生工生物工程(上海)公司合成,序列信息如表1。

1.3 细胞的培养

CSC细胞用含10%新生牛血清和1%双抗的L-15培养基于24℃条件下培养。生长至单层后用0.25%胰酶-EDTA消化,并按 2×10^5 cell/mL 100和500 μ L分别接种于96孔板和24孔板中,于24℃条件下培养。

1.4 病毒的培养及TCID₅₀测定

取保存的CyHV-2 CNTB2015病毒液200 μ L接种至CSC细胞生长良好的T25细胞瓶中,孵育30min,然后加入5 mL维持液(含2%新生牛血清和1%双抗的L-15培养基),置于24℃培养。细胞病变达到70%左右,吹落细胞制成病毒液,冻融1次后,12000 r/min离心5min后取上清液,作为感染用病毒液备用。

将制备的病毒液作连续10倍梯度稀释,获得8个稀释度 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} 、 10^{-8} 、 10^{-9} 、 10^{-10} 、 10^{-11} 和 10^{-12} 的病毒液,并设置空白对照组,每组8个重复。在长满单层CSC细胞的96孔板中每孔接种各稀释度的病毒液100 μ L,孵育30min后弃去,再加入100 μ L维持液,置于24℃培养箱中培养,逐日观察细胞病变,并记录细胞病变孔数。按Reed-Muench法^[12]计算病毒滴度TCID₅₀值。

表1 siRNA和PCR引物序列信息
Tab. 1 Sequences of siRNA and primers

组别Group		序列Sequence (5'—3')
ORF57-siRNA-1	Sense	GCAAGAAGUCGUUCGAUAATT
	Antisense	UUAUCGAACGACUUCUUGCTT
ORF57-siRNA-2	Sense	GGUACUUCCAACGGCCAATT
	Antisense	UUGGCCGUUGGAAAGUACCTT
ORF57-siRNA-3	Sense	GGAGCCACUGGAACAUAATT
	Antisense	UUGAUGUCCAGUGGCUCCTT
FAM- β -actin-siRNA	Sense	FAM-GGAUGACAUGGAGAAGAUTT
	Antisense	AUCUUCUCCAUGUCAUCCCTT
siRNA-control ^[11]	Sense	UUCUCCGAACGUGUCACGUTT
	Antisense	ACGUGACACGUUCGGAGAATT
ORF57-1	Sense	ATCATGGCAGAGTTTTTTACTG AGGAC
	Antisense	GACGACATCGGTCTTTTTCTCT GC
ORF57-2	Sense	GCCCGCCGACTGGATAGAC
	Antisense	AGGAACGCGAGGCTGTT
ORF57-3	Sense	AAGCCCAAGCGACTCACC
	Antisense	TGGAGCTTTGGGTTTAGCGC
β -actin	Sense	TCACCTCCCTTGCTCCTTCCAC
	Antisense	CTCCTGCTTGCTGATCCACATC TG

1.5 siRNA转染量和转染液维持时间优化

siRNA采用脂质体(Lipofectamine 2000)包裹的方式转染,其使用浓度为说明书的推荐浓度,转染使用的培养基为Opti-MEM I,将FAM- β -actin-siRNA初始浓度配置成20 μ mol/L。各取一定量FAM- β -actin-siRNA与Opti-MEM I培养基配置成不同浓度(转染终浓度分别为40、80和120 nmol/L)的siRNA复合物50 μ L,将脂质体Lipofectamine 2000和Opti-MEM I培养基配置成Lipofectamine 2000复合物50 μ L,分别混合静置5min,再将siRNA复合物加入Lipofectamine 2000复合物中,轻轻混匀,避光静置25min,然后加入400 μ L Opti-MEM I培养基,轻轻混匀,获得500 μ L的FAM- β -actin-siRNA-脂质体复合物溶液,配制比例见表2。

在CSC细胞长至80%时进行siRNA的转染。首先,弃尽24孔板中培养液,再将上述siRNA-脂质体复合物加入24孔板中,共5组:3个不同浓度的siRNA组、阴性siRNA对照组和Mock对照组;每组设6重复。在转染6h后每组选3个重复孔弃尽转染液,换成含10%新生牛血清和1%双抗的L-15继续培养。在转染24h后,将所有孔中的培养液吸弃,并用维持液清洗一次,再加入维持液后,在荧光显微镜下拍照观察荧光信号。并在优化的转染条件下转染,在不同时间(24h、48h、72h和120h)进行转染

效果的观察。每组选取3张荧光照片通过软件Image J计算图片中荧光点数量, 首先将图像转为8-bit, 调整阈值后, 进行自动分析和颗粒计数(Image-Adjust-Threshold-Analyze-Analyze Particles), 可选步骤: 填补细胞核的空隙(Process-Binary-Fill Holes)打断细胞核的重叠部分(Process-Binary-Watershed), 计算各组荧光点平均值; 同时提取各组细胞RNA, 以标定基因拷贝数浓度的 β -actin基因PCR纯化产物为参考, 通过荧光定量PCR测定各组 β -actin基因表达量, 选择转染抑制效果最优组的转染条件作为后期试验转染条件。

1.6 CyHV-2 ORF57 siRNA对CyHV-2病毒的抑制作用

按1.5中优化后的条件, siRNA浓度80 nmol/L、转染液维持24h, 转染三组CyHV-2 ORF57的siRNA (ORF57-siRNA-1、ORF57-siRNA-2、ORF57-siRNA-3), 同时设置阴性对照组(阴性siRNA)、阳性对照组(β -actin siRNA)、MOCK对照组和空白对照组。每组设立3个重复孔。

在siRNA转染液维持24h后, 洗去转染液, 加入200 μ L CyHV-2病毒液($TCID_{50}$ 为 $10^{8.325}$ /mL), 孵育30min后, 吸弃病毒液, 加入维持液, 于24 $^{\circ}$ C培养, 分别第24h、48h、72h和120h进行细胞状态观察, 并采集样品提取RNA用于转录基因的定量检测, 对其中维持至第120h的细胞样品进行 $TCID_{50}$ 测定(方法同1.4), 分组情况如表3所示。

1.7 总RNA的提取及ORF57转录检测

对1.6中采集的细胞样品按试剂盒说明书进行总RNA的提取, 取80 ng RNA进行cDNA合成(FastKing cDNA 第一链合成试剂盒)。按表2中的

表2 加样配比表
Tab. 2 Sampling ratio table

分组 Group	浓度组1 Concentration group 1 (μ L)	浓度组2 Concentration group 2 (μ L)	浓度组3 Concentration group 3 (μ L)	阴性siRNA 对照组 siRNA- negative control group (μ L)	Mock 对照 Mock control group (μ L)
siRNA复合物 siRNA complexes					
FAM- β - actin- siRNA	1	2	3	2	0
Opti- MEM I	49	48	47	48	50
Lipofectamine 复合物 Lipofectamine complexes					
Lipofecta mine	1	1	1	1	1
Opti- MEM I	49	49	49	49	49
Opti- MEM I	400	400	400	400	400

引物进行荧光定量PCR, 每组共3个平行样品, 每个样品设立2个重复, qPCR采用SuperReal PreMix Plus (SYBR Green)试剂盒, 据说明书的25 μ L反应体系进行配制, 反应程序为: 95 $^{\circ}$ C 15min; 95 $^{\circ}$ C 10s、60 $^{\circ}$ C 32s, 40个循环。选择 β -actin作为内参基因进行校准, 采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算ORF57的相对表达量, $\Delta\Delta Ct = (Ct_{target} - Ct_{\beta-actin})_{待测样本} - (Ct_{target} - Ct_{\beta-actin})_{校准样本}$ 。

1.8 数据分析

实验数据均以平均值 \pm 标准差表示。其中, ORF57在不同组的相对表达量采用T检验分析, 统计学显著性水平设定 $P < 0.05$ 表示差异显著。

2 结果

2.1 病毒培养及病毒滴度的测定

CyHV-2病毒接种至CSC细胞中培养, 至第5天出现80%的细胞病变(图1), 收获病毒液。于长满至80%单层的CSC细胞的96孔板中进行 $TCID_{50}$ 测定, 记录每个稀释度的细胞病变孔数(表4), 按Reed-Muench法计算, 获得 $TCID_{50}$ 为 $10^{8.325}$ /mL。

2.2 siRNA 转染条件优化

采用针对 β -actin基因的FAM-siRNA在24孔板培养的CSC细胞上进行转染条件优化。采用荧光显微镜在相同放大倍数和相同发射光强度下, 采集各组别的荧光图片(图2), 通过图片处理软件Image J分析各组3张图片的荧光点数量。各组荧光点平均值见表5。结果显示: 转染液体维持6h后, 荧光信号与siRNA终浓度呈正相关; 而维持24h后, 80 nmol/L转染浓度组荧光点数最高, 平均1366个, 40 nmol/L浓度组平均荧光点数700个。

提取各组样品RNA, 通过荧光定量PCR检测各组 β -actin基因拷贝数, 结果显示, 当转染浓度为80 nmol/L, 转染时间为24h时, β -actin基因表达量最低(表6), 表明该组转染后, siRNA的干扰效果相对较好。

结合荧光照片荧光点数量和 β -actin基因表达量

表3 siRNA抑制试验分组
Tab. 3 Grouping of transfection inhibition test

组别 Group	转染试剂 Transfection reagent	siRNA	CyHV-2	取样时间 Sampling time
Blank group	-	-	+	/
Mock group	+	-	+	24h、48h、 72h和120h
Negative siRNA	+	+	+	24h、48h、 72h和120h
β -actin siRNA	+	+	+	24h、48h、 72h和120h
ORF57-siRNA	+	+	+	24h、48h、 72h和120h

注: +, 含; -, 不含

Note: + means added; - means not added

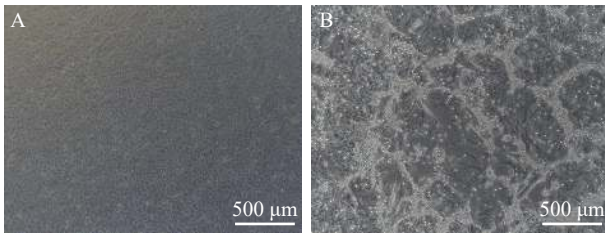


图1 正常细胞与病变细胞状态图

Fig. 1 Normal cells and pathological cells

A. 正常细胞; B. 病变后细胞。标尺为500 μm

A. normal cells; B. the cells with CPE. The bar in figure represent 500 μm

表4 TCID₅₀病毒滴度测定Tab. 4 Detection of TCID₅₀ in different virus dilutions

组别 Group	稀释梯度 Gradient dilution							
	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	10 ⁻⁹	10 ⁻¹⁰	10 ⁻¹¹	10 ⁻¹²
病变孔数 Number of wells with CPE	7	7	6	1	1	0	0	0
未病变孔数 Number of wells without CPE	1	1	2	7	7	8	8	8

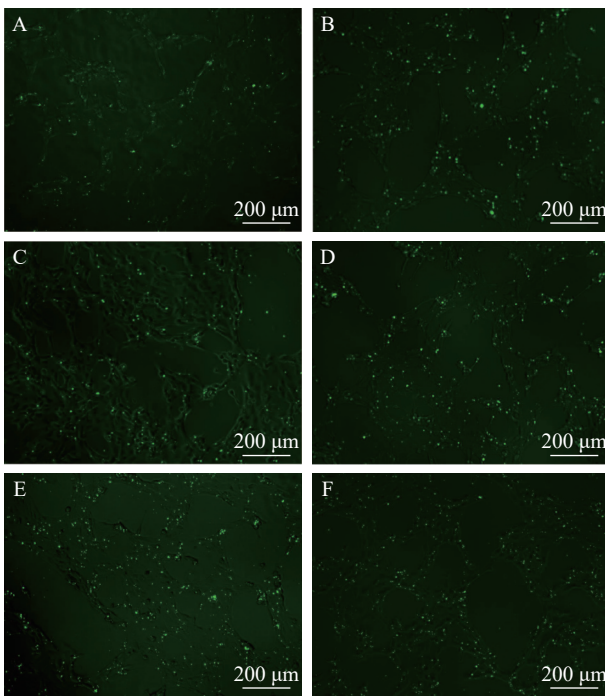


图2 在不同条件下FAM-β-actin-siRNA转染效果

Fig. 2 Effect of different concentrations of FAM-β-actin-siRNA transfection

A和B转染浓度是40 nmol/L, C和D转染浓度是80 nmol/L, E和F转染浓度是120 nmol/L; A、C、E为转染6h后换液, B、D、F为转染24h后换液。标尺为200 μm

The transfection concentrations of A and B are 40 nmol/L, C and D are 80 nmol/L, E and F are 120 nmol/L; A, C and E are 6h after transfection, the fluid changed, while B, D and F are 24h after transfection, the fluid changed. The bar in figure represent 200 μm

的分析结果,以80 nmol/L浓度的FAM-β-actin-siRNA转染CSC细胞,转染后维持时间为24h时,siRNA的抑制效率最高。因此,选择以80 nmol/L浓度的siRNA转染CSC细胞后维持24h作为后期转染试验方案。

在优化后的条件下转染FAM-β-actin-siRNA后,吸弃转染液,加入维持液,在第24、第48、第72和第120h在荧光倒置显微镜(Leica DMI 3000B)下进行荧光信号观察(图3)。结果表明,在24—72h内荧光信号数量无显著差异;在第120h时,观察到荧光点的数量和细胞数量都显著减少。通过荧光定量PCR检测各组β-actin基因转录拷贝数,结果显示(表7),FAM-β-actin-siRNA在120h内对细胞β-actin基因转录的抑制效果存在小幅波动,在第72h时抑制效率最高,第24和第120h两个时间点抑制效率无显著差异。

2.3 ORF57-siRNA对CyHV-2病毒致细胞病变的抑制作用

对转染不同ORF57-siRNA的CSC细胞进行病毒感染,并对感染病毒后的细胞进行观察,结果显示:在感染病毒后第24和第48h,各组无明显细胞病变,第72h各组细胞出现部分聚集,在第120h各组观察到明显的细胞病变(图4)。在第120h时,相较于对照组,ORF57-siRNA-2组细胞病变最少,ORF57-siRNA-3组次之,ORF57-siRNA-1组略轻于对照组,表明在3组siRNA中ORF57-siRNA-2抑制病毒致细胞病变效果最好。

2.4 ORF57-siRNA对CyHV-2 ORF57转录的抑制效率测定

ORF57-siRNA处理后的CSC细胞感染病毒后,提取总RNA进行逆转录,以β-actin为内参基因,进行ORF57表达差异相对定量分析。结果显示:在

表5 Image J统计荧光点数量

Tab. 5 Number of fluorescent spots counted by Image J

siRNA终浓度 Final concentration of siRNA (nmol/L)	转染后维持6h Transfection after 6h	转染后维持24h Transfection after 24h
40	618±18	700±26
80	1063±101	1366±136
120	1266±111	1031±46

表6 在各转染方案下β-actin基因拷贝数

Tab. 6 Copy number of β-actin gene under each transfection scheme(copies/ng)

siRNA终浓度 Final concentration of siRNA (nmol/L)	转染后维持6h Transfection after 6h	转染后维持24h Transfection after 24h
40	8.423×10 ⁴	1.258×10 ⁴
80	1.147×10 ⁴	3.375×10 ³
120	4.985×10 ⁴	4.685×10 ⁴

48h内,各siRNA组对病毒ORF57基因表达都有一定的抑制作用;与MOCK组相比,ORF57-siRNA-2抑制效率最高,表达量降低至33.55%($P<0.01$),ORF57-siRNA-1组降低至50.59%($P<0.05$),ORF57-siRNA-3组降低至70.72%($P<0.05$;图5)。ORF57-siRNA-2组,第48h时处于最低的33.55%,之后缓慢升高,至120h表达量上升至41.61%($P<0.05$),而阴性siRNA组的表达量接近于Mock对照组(图6)。结果表明,ORF57-siRNA-2对CyHV-2 ORF57转录具有较强的、较持久的抑制作用。

2.5 ORF57-siRNA对CyHV-2 TCID₅₀的影响

取1.6收集的各组维持至第120h的病毒培养液,分别接种于长满至80%单层的CSC细胞的96孔板中进行TCID₅₀测定,按Reed-Muench法计算CyHV-2-ORF57-1组、CyHV-2-ORF57-2组、CyHV-2-ORF57-3组、阴性siRNA组和Mock组的TCID₅₀。TCID₅₀测定结果表明(表8),ORF57-siRNAs对CyHV-2的复制具有一定的减弱作用,其中CyHV-2-ORF57-2组的抑制作用最强,与Mock相比TCID₅₀降

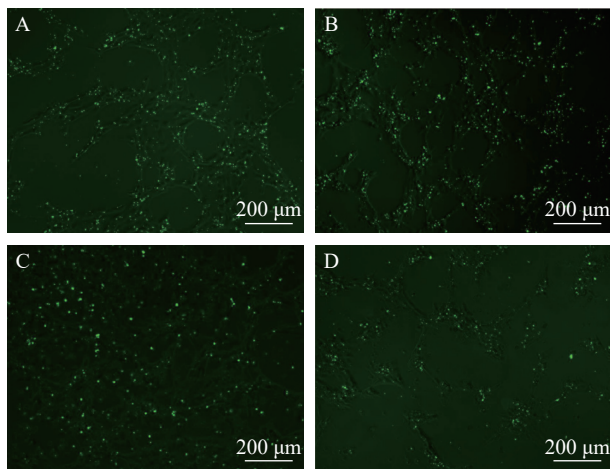


图3 转染后24h、48h、72h和120h荧光信号

Fig. 3 Observation of fluorescence effect at 24h, 48h, 72h and 120h

A—D分别为24h、48h、72h和120h观察结果(标尺为200 μm)
A—D are the observation results at 24h, 48h, 72h and 120h respectively (the bar in figure represent 200 μm)

表7 转染后24h、48h、72h和120h β-actin基因表达情况

Tab. 7 Expression of β-actin gene at 24h, 48h, 72h and 120h after transfection (copies/ng)

转染siRNA 后时间 Times after transfection (h)	β-actin基因拷贝数 Copy number of β-actin gene
24	3.403×10^3
48	3.315×10^3
72	1.900×10^3
120	3.001×10^3

低了94%,与阴性siRNA组相比降低了98.1%。

3 讨论

3.1 siRNA对病毒复制的抑制作用

siRNA作为RNA干扰方式之一,已被广泛用于抑制水生动物病毒复制方面的研究^[13]。陈芸^[14]通过将针对草鱼出血病病毒(Grass carp reovirus, GCRV)VP7的siRNA注射稀有鮕鲫,降低了实验组的死亡率,并延缓了病程;马杰等^[15]设计并构建了同时靶向GCRV JX09-01(GCRV I型)及GCRV

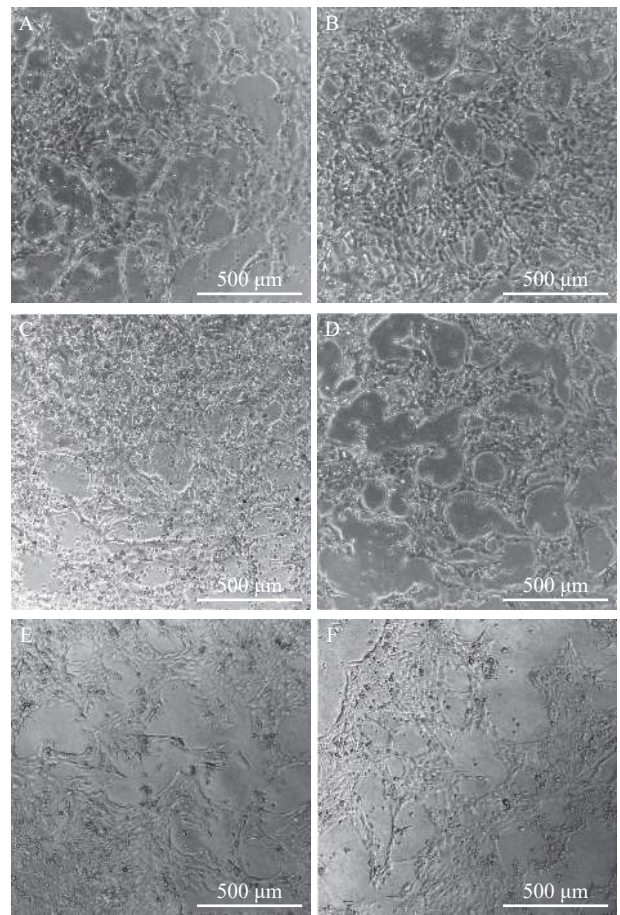


图4 ORF57-siRNAs在120h干扰CyHV-2致CSC细胞病变效果
Fig. 4 Effect of ORF57-siRNAs on CyHV-2-induced CSC CPE at 120h

A. ORF57-siRNA-1组; B. ORF57-siRNA-2组; C. ORF57-siRNA-3组; D. 阴性siRNA组; E. Mock对照组; F. 空白组(标尺500 μm)

A.the emergence of CPE of CyHV-2-ORF57-1-siRNA group at 120h after infection; B.the emergence of CPE of CyHV-2-ORF57-2-siRNA group at 120h after infection; C.the emergence of CPE of CyHV-2-ORF57-3-siRNA group at 120h after infection; D.the emergence of CPE of Negative siRNA control group at 120h after infection; E.the emergence of CPE of Mock group at 120h after infection; F.the emergence of CPE of Blank group at 120h after infection. (the bar in figure represent 500 μm)

104(GCRVIII型)VP2蛋白基因的双siRNA表达载体,转染CIK细胞后,可以同时抑制GCRV JX09-01和GCRV 104的复制,说明多条siRNA可同时作用,抑制多种病毒的复制。此外,siRNA还被用于包括白斑综合征病毒^[16]、鲤春病毒血症病毒^[17]、条石鲷虹彩病毒^[18]和大鲵蛙病毒^[19]等病毒的干扰研究。本研究针对DNA病毒CyHV-2的*ORF57*设计了3组

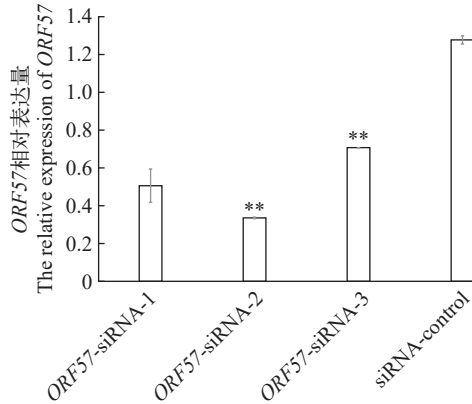


图5 *ORF57*-siRNAs处理后48h *ORF57*相对表达量

Fig. 5 Relative expression of *ORF57* at 48h after treatment with *ORF57*-siRNAs

*表示差异显著, $P < 0.05$; **表示差异极显著, $P < 0.01$; 下同
*the difference is significant, $P < 0.05$; **the difference is extremely significant, $P < 0.01$. The same applies below

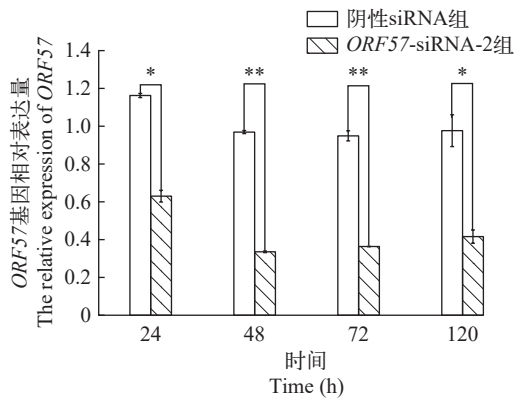


图6 不同时间点*ORF57*-siRNA-2对*ORF57*转录的抑制作用

Fig. 6 Inhibitory effect of *ORF57*-siRNA-2 on transcription of *ORF57* at different times

表8 *ORF57*-siRNAs对CyHV-2 $TCID_{50}$ 的影响

Tab. 8 Effect of *ORF57*-siRNA on CyHV-2 $TCID_{50}$

组别Group	$TCID_{50}$ (mL)
<i>ORF57</i> -siRNA-1	$10^{7.432}$
<i>ORF57</i> -siRNA -2	$10^{6.776}$
<i>ORF57</i> -siRNA -3	$10^{7.353}$
Negative siRNA	$10^{8.487}$
Mock	10^8

siRNA,通过脂质体转染CSC细胞后,评估siRNA对CyHV-2病毒复制的干扰作用。结果也显示了siRNA在mRNA水平上抑制了CyHV-2 *ORF57*的表达,将*ORF57* mRNA拷贝数下降为33.55%,进而延缓或减少细胞病变。以上研究结果表明,利用siRNA抑制病毒的结构蛋白和非结构蛋白的表达都可以有效抑制病毒的复制,这为水产动物病毒病的控制与治疗提供了有力工具。

3.2 *ORF57*的转录对CyHV-2复制的影响

鲤疱疹病毒包括鲤疱疹病毒I型(CyHV-1)、鲤疱疹病毒II型(CyHV-2)和鲤疱疹病毒III型(CyHV-3),3种类型鲤疱疹病毒*ORF57*编码的氨基酸序列之间的相似性在50.61%—54.1%,表明该基因鲤疱疹病毒属中较为保守。在鳊疱疹病毒1(AngHV-1)和遗传关系更远的鳄痘病毒(CRV)中也存在*ORF57*的同源基因,表明该基因可能存在相同的祖先^[20,21],但其具体功能还未有报道。Boutier等^[22]构建缺失*ORF57*基因的CyHV-3,通过攻毒试验,表明缺失*ORF57*的CyHV-3失去了对锦鲤的致病力,并且*ORF57*蛋白在CyHV-3病毒粒子中含量最丰富的蛋白之一^[23]。作为在中国新发的病原CyHV-2,其同源基因*ORF57*的编码蛋白是其八大主要免疫原蛋白之一^[24],作为早期基因在感染细胞2—4h后被转录^[25]。但其对CyHV-2毒力的影响,未有人报道。本研究通过*ORF57* siRNA的干扰,将*ORF57*的转录拷贝数下降50%以上,相对于未干扰组,siRNA干扰后的病毒 $TCID_{50}$ 从 $10^{8.487}$ /mL降低至 $10^{6.776}$ /mL,这表明,*ORF57*的转录影响着CyHV-2的复制。通常体内病毒滴度的高低与病毒致病性存在着较大相关性,因此,*ORF57*对CyHV-2在体内致病力的表现具有潜在的影响作用。

3.3 转染时机对siRNA转染效率的影响

阳离子脂质体转染法已广泛被用于细胞DNA/RNA的转染,但也存在有细胞毒性的缺陷^[26]。本研究在使用高浓度Lipofectamine 2000及转染高浓度siRNA(120 nmol/L)时,转染后都出现细胞脱落以及细胞状态不佳的情况。根据荧光强度,siRNA转染终浓度为80 nmol/L、维持24h时,荧光信号最强,高于40和120 nmol/L两组;测定鲫 β -actin基因表达量,转染终浓度为80 nmol/L时,在第72h时抑制效率达到最大值。本研究选择80 nmol/L浓度的siRNA进行转染,既能保证一定的转染效率,也能让细胞处在良好的实验状态。转染后120h内CSC细胞在siRNA作用下能够被稳定的抑制基因的表达,在siRNA转染后的第72h表现出最佳的转染抑制效果,这与转染24h接种病毒后第48h抑制效果最佳的结

果相符。在细胞生长旺盛阶段进行 siRNA 的转染能够提高转染效率, 在实际操作中, 常选择铺满程度为 80% 的细胞用于转染。在研究过程中, 病毒感染时机的选择上, 不同学者采取的方法各异, 杨光等^[27]就比较了感染病毒与转染 siRNA 的顺序对病毒干扰结果的影响, 结果表明, 先感染病毒后进行 siRNA 干扰组的细胞存活率要优于先转染 siRNA 后感染病毒组。而李兵^[28]研究的 RNA 干扰抑制草鱼呼肠孤病毒复制的细胞模型实验中, 则是选择了先转染 siRNA, 再进行病毒感染的程序, 对病毒的抑制率达到 80% 以上。本研究选择了先转染 siRNA, 后感染病毒的程序进行 siRNA 的研究。

4 结论

在本研究中, 利用 RNA 干扰技术针对 CyHV-2 重要基因 ORF57 进行干扰, 在 CSC 细胞上对病毒复制获得了较好的抑制效果, 对病毒 mRNA 转录的抑制率最高达 66.45%, 对病毒滴度最高降低 98.1%。该结果表明, ORF57 在 CyHV-2 的毒力表现中起到重要作用, 其具体生物学功能有待进一步研究。这为 CyHV-2 毒力相关基因研究提供借鉴, 也为 CyHV-2 弱毒株的改造和基于 siRNA 技术的抗 CyHV-2 防治提供思路。

参考文献:

- [1] Doszpoly A, Benko M, Csaba G, *et al.* Introduction of the family Alloherpesviridae: The first molecular detection of herpesviruses of cyprinid fish in Hungary [J]. *Magyar Allatorvosok Lapja*, 2011, **133**(3): 174-181.
- [2] Wang L. The research on isolation and identification of pathogeny from the hemorrhage disease of prussian carp (*Carassius gibelio*) in Jiangsu China and its detection method [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2012: 61. [王璐. 江苏地区鲫出血病病原的分离、鉴定及检测方法研究 [D]. 南京: 南京农业大学, 2012: 61.]
- [3] Yuan X M, Pan X Y, Hao G J, *et al.* Analysis of pathogen in an explosive hemorrhage disease of *Carassius auratus gibelio* [J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2019, **50**(4): 913-920. [袁雪梅, 潘晓艺, 郝贵杰, 等. 一例异育银鲫(*Carassius auratus gibelio*)暴发性出血病病原分析 [J]. 海洋与湖沼, 2019, **50**(4): 913-920.]
- [4] Thangaraj R S, Nithianantham S R, Dharmaratnam A, *et al.* Cyprinid herpesvirus-2 (CyHV-2): a comprehensive review [J]. *Reviews in Aquaculture*, 2020(13): 796-821.
- [5] Zhang Q Y. An overview on several large DNA viruses in freshwater ecosystems [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2020, **44**(5): 961-975. [张奇亚. 淡水生态系统中几种大 DNA 病毒研究概述 [J]. *水生生物学报*, 2020, **44**(5): 961-975.]
- [6] Napoli C, Lemieux C, Jorgensen R. Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into petunia results in reversible co-suppression of homologous genes in trans [J]. *Plant Cell*, 1990, **2**(4): 279-289.
- [7] Fire A. RNA-triggered gene silencing [J]. *Trends in Genetics*, 1999, **15**(9): 358-363.
- [8] Song H L, Sun X Y, Kong X H, *et al.* Application of RNA interference technology in antiviral and antiparasitic research of aquatic animals [J]. *Biotechnology Bulletin*, 2020, **36**(2): 193-205. [宋华丽, 孙效迎, 孔祥会, 等. RNA 干扰技术在水产动物抗病毒和抗寄生虫研究中的应用研究进展 [J]. *生物技术通报*, 2020, **36**(2): 193-205.]
- [9] Huang G J, Yu D H, Liu M, *et al.* Preliminary study on RNA interference against red-spotted grouper nervous necrosis virus-optimization of transfection condition and comparison of interference effect based on FHM cell [J]. *Journal of South China Agricultural University*, 2011, **32**(2): 93-98. [黄桂菊, 喻达辉, 柳明, 等. 石斑鱼神经坏死病毒 RNA 干扰的转染条件优化与效果分析 [J]. *华南农业大学学报*, 2011, **32**(2): 93-98.]
- [10] Wei Y J, Pan X Y, Lin L Y, *et al.* Establishment of spinal cord cell line of *Carassius auratus gibelio* and its sensitivity to CyHV-2 [J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2020, **51**(5): 1232-1238. [魏钰娟, 潘晓艺, 蔺凌云, 等. 异育银鲫(*Carassius auratus gibelio*)脊髓组织细胞系的建立及对 CyHV-2 的敏感性 [J]. *海洋与湖沼*, 2020, **51**(5): 1232-1238.]
- [11] Wang C, Li N, Liu X, *et al.* A novel endogenous human CaMKII inhibitory protein suppresses tumor growth by inducing cell cycle arrest via p27 stabilization [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2008, **283**(17): 11565-11574.
- [12] Reed L J, Muench H. A simple method of estimating fifty percent endpoints [J]. *American Journal of Epidemiology*, 1938, **27**(3): 493-497.
- [13] Chen Y, Zhu Z Y. Application of RNA interference (RNAi) in virus resistance [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2006, **30**(3): 356-359. [陈芸, 朱作言. RNA 干扰在抗病毒研究中的应用 [J]. *水生生物学报*, 2006, **30**(3): 356-359.]
- [14] Chen Y. Study of disease resistant on grass carp reovirus by RNA interference (RNAi) [D]. Wuhan: Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, 2005: 106. [陈芸. 用 RNA 干扰 (RNAi) 抗草鱼出血病病毒的初步研究 [D]. 武汉: 中国科学院水生生物研究所, 2005: 106.]
- [15] Ma J. Study on the inhibition of replication of grass carp reovirus by RNA interference [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2013: 94-95. [马杰. RNA 基因干扰技术抑制草鱼呼肠孤病毒复制的研究 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2013: 94-95.]
- [16] Wu Y, Lü L, Yang L S, *et al.* Inhibition of white spot syndrome virus in *Litopenaeus vannamei* shrimp by se-

- quence-specific siRNA [J]. *Aquaculture*, 2007, **271**(1-4): 21-30.
- [17] Fouad A M, Soliman H, Abdallah E S H, *et al.* In-vitro inhibition of spring viremia of carp virus replication by RNA interference targeting the RNA-dependent RNA polymerase gene [J]. *Journal of Virological Methods*, 2018(263): 14-19.
- [18] Zenke K, Nam Y K, Kim K H. Development of siRNA expression vector utilizing rock bream β -actin promoter: a potential therapeutic tool against viral infection in fish [J]. *Applied Microbiology Biotechnology*, 2010, **85**(3): 679-690.
- [19] Mou W H, Zhou Y, Geng Y, *et al.* Effect on main functional genes expression and replication of Chinese giant Salamander ranavirus (CGSRV) by RNA interference [J]. *South China Fisheries Science*, 2017, **13**(4): 80-86. [牟维豪, 周燕, 耿毅, 等. RNA干扰对大鲵蛙病毒主要功能基因表达及其增殖的影响 [J]. *南方水产科学*, 2017, **13**(4): 80-86.]
- [20] van Beurden S J, Bossers A, Voorbergen-Laarman M H A, *et al.* Complete genome sequence and taxonomic position of anguillid herpesvirus 1 [J]. *Journal of General Virology*, 2010(91): 880-887.
- [21] Afonso C L, Tulman E R, Delhon G, *et al.* Genome of crocodilepox virus [J]. *Journal of Virology*, 2006(80): 4978-4991.
- [22] Boutier M, Gao Y, Vancsok C, *et al.* Identification of an essential virulence gene of cyprinid herpesvirus 3 [J]. *Antiviral Research*, 2017(145): 60-69.
- [23] Michel B, Leroy B, Stalin Raj V, *et al.* The genome of cyprinid herpesvirus 3 encodes 40 proteins incorporated in mature virions [J]. *Journal of General Virology*, 2010(91): 452-462.
- [24] Gao W, Wen H, Wang H, *et al.* Identification of structure proteins of cyprinid herpesvirus 2 [J]. *Aquaculture*, 2020(523): 735184.
- [25] Tang R, Lu L, Wang B, *et al.* Identification of the immediate-early genes of cyprinid herpesvirus 2 [J]. *Viruses*, 2020, **12**(9): 994.
- [26] Tseng Y C, Mozumdar S, Huang L. Lipid-based systemic delivery of siRNA [J]. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2009, **61**(9): 721-731.
- [27] Yang G, Cao G J, Li J, *et al.* Inhibition of SARS-CoV infection in Vero-E6 cells by siRNAs [J]. *Journal of Medical Molecular Biology*, 2004, **1**(5): 270-273. [杨光, 曹国军, 李洁, 等. siRNA抑制SARS冠状病毒感染Vero E6细胞 [J]. *医学分子生物学杂志*, 2004, **1**(5): 270-273.]
- [28] Li B. Cellular model for inhibition of grass carp reovirus replication mediated by RNA interference [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2009: 26-29. [李兵. RNA干扰抑制草鱼呼肠孤病毒复制的细胞模型 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2009: 26-29.]

INFLUENCE OF siRNA TARGETING CYHV-2 ORF57 GENE ON REPLICATION OF CYHV-2 IN CSC CELLS

JIN Li-Ping¹, PAN Xiao-Yi², LIN Ling-Yun², YAO Jia-Yun², CAO Zheng², YIN Wen-Lin², LAI Ying-Tiao³, TAO Jia-Fa³, LIU Yi-Han² and SHEN Jin-Yu^{1,2,3}

(1. School of Fisheries and Life, Shanghai Ocean University, Shanghai 201200, China; 2. Ministry of Agriculture and Rural Areas Key Laboratory of Healthy Freshwater Aquaculture, Key Laboratory of Fish Health and Nutrition of Zhejiang Province, Zhejiang Institute of Freshwater Fisheries, Huzhou 313001, China; 3. Key Laboratory of Fishery Drug Development, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Pearl River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510380, China)

Abstract: Cyprinid herpesvirus 2 (CyHV-2) is the pathogen of herpesviral hematopoietic necrosis of *Carassius auratus*. It is a double-stranded DNA virus that can infect goldfish, crucian carp and its varieties. This study investigated the effect of CyHV-2 ORF57 on viral replication in Spinal cord tissue cell lines of *Carassius auratus gibelio* (CSC). Lipofectamine 2000 was used to transfect siRNA. Three pairs of siRNAs of CyHV-2-ORF57 gene were transfected into CSC cells to evaluate the effect of ORF57 on viral replication and cytopathic effect (CPE). Real-time PCR analysis revealed that ORF57-siRNA-2 had the greatest suppression of ORF57 expression with a 33.55% ($P < 0.01$) reduction at 48h associated with the strongest inhibitory effect. All three ORF57-siRNAs delayed the time and intensity of CyHV-2 cytopathogenic effect, with the inhibition time up to 120h. The results of TCID₅₀ showed that ORF57-siRNAs reduced the titer of the virus, and ORF57-siRNA-2 decreased the virus stock solution TCID₅₀ 10^{8.487}/mL to 10^{6.776}/mL. This study show that ORF57 can mediate the CPE and replication rate of CyHV-2. This study provides a reference for the antiviral treatment based on siRNA technology and the construction of low virulent strain of CyHV-2.

Key words: Cyprinid herpesvirus 2; RNA interference; ORF57; siRNA; CSC cell line; TCID₅₀