

## 载体表达的 siRNA 分子对猪圆环病毒 2 型复制的抑制作用

王海燕, 刘文博, 高崧\*, 刘秀梵

(扬州大学农业部畜禽传染病学重点开放实验室, 扬州 225009)

**摘要:**【目的】寻找一种基于 RNA 干扰技术的猪圆环病毒 2 型感染的防控方法。【方法】根据猪圆环病毒 2 型毒株基因组核苷酸序列, 设计了 3 条特异性小干扰 RNA (short interfering RNA, siRNA) 分子, 其中 2 条针对猪圆环病毒 1 型和 2 型复制酶基因 (*rep*), 1 条针对猪圆环病毒 2 型核衣壳蛋白基因 (*cap*), 将合成的 DNA 片段退火形成双链, 分别连接到 RNAi-Ready pSIREN-RetroQ ZsGreen 载体鼠源 U6 启动子下游, 转化大肠杆菌得到阳性克隆, 测序鉴定后分别命名为 Retro-SH1, Retro-SH4, Retro-SH6。用上述质粒转染 PCV2 感染前、后的 Dulac 细胞及肌肉注射 PCV2 感染前、后的 BALB/c 小鼠, 应用实时定量 PCR 试验评价其对病毒在细胞及小鼠体内复制的抑制作用, 免疫组化法检测脾脏中病毒的存在。【结果】感染 PCV2 前或后转染 500 ng Retro-SH1, Retro-SH4, Retro-SH6 质粒能有效抑制 PCV2 在 Dulac 细胞上的复制, 抑制率最高可达 99% 以上, 对 10 株不同来源的临床分离株在细胞中复制的抑制作用同样明显, 且不同毒株间差异不大。动物试验中, 肌肉注射 10  $\mu$ g 上述不同 siRNA 分子对小鼠体内 PCV2 的复制有一定的抑制作用, 其抑制率在 26% 至 99% 之间。【结论】载体表达的 siRNA 分子可能成为防控猪圆环病毒 2 型感染的一种新工具。

**关键词:** RNA 干扰; 猪圆环病毒 2 型; 复制; 抑制

中图分类号: R392 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2008) 11-1507-07

猪圆环病毒 2 型 (porcine circovirus 2, PCV2) 是当前严重危害世界养猪业的重要病原之一。PCV2 不仅能引起断奶仔猪多系统衰竭综合征、猪皮炎和肾病综合征等诸多类型的疾病<sup>[1]</sup>, 而且感染该病毒能导致免疫抑制, 造成继发感染<sup>[2]</sup>, 给养猪业造成了巨大威胁。目前世界上很多国家都有该病的发生。PCV2 与其它病原体混合感染的报道也越来越多, 野猪群中也存在着 PCV2 感染和疾病的发生<sup>[3]</sup>。目前对该病还没有理想的防控措施, 人们一直在寻求预防、治疗 PCV2 感染的新方法, 但由于 PCV2 在细胞中增殖不引起细胞病变, 感染后会引起免疫抑制, 疫苗研究至今没有根本性突破, 因此探索预防和治疗 PCV2 感染的新方法显得尤为迫切。

PCV2 基因组为一单股环状 DNA, 全长约 1767

或 1768 个核苷酸, 含有 2 个主要的开放阅读框 (open reading frame, ORF), 其中 ORF1 编码病毒与复制有关的两种蛋白 *Rep* 和 *Rep'*, 这两种蛋白均为 PCV2 病毒复制所必需, 将 *Rep* 和 *Rep'* 蛋白进行突变, 可降低病毒 DNA 的复制, 同时使病毒蛋白的合成减少 90% 以上。ORF2 基因编码病毒的衣壳蛋白, 是主要的结构蛋白, 也是主要的免疫原性蛋白<sup>[4]</sup>。这两种蛋白的编码基因均可作为沉默的靶基因。

RNA 干扰 (RNAi) 是由双链 RNA 介导的在转录后水平特异地降解有同源序列基因产物的现象, 故又被称为转录后基因沉默现象<sup>[5]</sup>, 是研究基因功能、肿瘤治疗、抗病毒感染的新工具<sup>[6]</sup>。目前, RNAi 技术在艾滋病病毒 (HIV)、乙肝病毒 (HBV)、丙肝病毒

基金项目: 教育部高等学校博士学科点专项科研基金 (2004111705); 江苏省农业三项工程项目 [SX(2007)080]

\*通讯作者。Tel: +86-514-87991448; Fax: +86-514-87972218; E-mail: gsong@yzu.edu.cn

作者简介: 王海燕 (1976-), 女, 内蒙古海拉尔人, 在职博士研究生, 主要从事动物传染病和人兽共患病的控制和流行病学研究。E-mail: wanghyyz@hotmail.com

收稿日期: 2008-04-24; 修回日期: 2008-06-11

(HCV)和流感病毒 (IV) 等抗病毒感染方面的成功尝试, 为预防和治疗病毒感染提供了新的工具<sup>[7-9]</sup>。

本研究拟以 PCV2 复制酶基因 (*rep*) 和衣壳蛋白基因 (*cap*) 为靶基因, 设计合成 siRNA 并构建相应表达载体, 在细胞中和小鼠体内评价不同 siRNA 分子对病毒复制的抑制作用, 为应用 RNAi 技术控制 PCV2 感染奠定基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌株、病毒和载体:** RNAi 表达载体 RNAi-Ready pSIREN-RetroQ ZsGreen Vector 试剂盒购自美国 BD Bioscience Clontech 公司; 大肠杆菌 DH5 $\alpha$  购自美国 Invitrogen 公司; 猪圆环病毒 2 型分离株 XSC 株 (GenBank 登录号为 DQ104422) 由南京农业大学陈溥言教授馈赠, 10 株猪圆环病毒 2 型分离株由本室分离、鉴定和保存, PCV2 分离株 XSC 和 10 个 PCV2 分离株的鉴定方法参照文献[10]进行; 无 PCV1 污染的猪肾传代细胞系 Dulac 购自中国兽药监察所;

BALB/c 小鼠购自扬州大学比较医学中心。

**1.1.2 主要试剂:** TaqMan Universal PCR Master Mix 购自美国应用生物系统公司; 转染试剂梭华-Sofast<sup>TM</sup> 购自厦门太阳马生物工程有限公司; 限制性内切酶 *EcoR* 和 *BamH* 购自大连宝生物工程有限公司; 其他试剂为国产分析纯产品。

### 1.2 siRNA 分子的设计

将猪圆环病毒 2 型毒株 XSC 基因序列提交到 Ambion 公司提供的 siRNA 查找网站 [http://www.ambion.com/techlib/misc/siRNA\\_finder.html](http://www.ambion.com/techlib/misc/siRNA_finder.html), 产生了候选 siRNA 片段, 结合已发表文献<sup>[11]</sup>中的 siRNA 片段序列确定了 3 条 siRNA 片段, 其中 2 条针对猪圆环病毒 1 型和 2 型复制酶基因 (*rep*), 1 条针对猪圆环病毒 2 型衣壳蛋白基因 (*cap*), RNAi 表达载体 RNAi-Ready pSIREN-RetroQ ZsGreen Vector 试剂盒中提供了萤火虫荧光素酶 (Luciferase, Luc) 特异性 siRNA 和与其它物种基因序列均无同源性的阴性对照序列 (Retro-Negative control), 根据载体特性, 合成发夹结构 shRNA 对应的 DNA 序列如表 1。

表 1 合成的 shRNA 对应 DNA 序列  
Table 1 Synthesized DNA Sequence correlated to shRNA(5'-3')

Primer	Sequence (5' 3')
SH1-1	GATCCGCATGCCAGCAAGAAGAATTCAAGAGAATCTCTTGCTGGGCATGCTTTTTTCTAGAG
SH1-2	AATTCTCTAGAAAAAAGCATGCCAGCAAGAAGAATTCTTGAAATCTCTTGCTGGGCATGCG
SH4-1	GATCCGACCACATACTGGAAACCACTTCAAGAGAGTGGTTCCAGTATGGTCTTTTTTCTAGAG
SH4-2	AATTCTCTAGAAAAAAGACCACATACTGGAAACCACTCTTGAAGTGGTTCCAGTATGGTCTG
SH6-1	GATCCGACTACTCTCCCGCCATTCTTCAAGAGAGAATGGCGGGAGGAGTAGTCTTTTTTCTAGAG
SH6-2	AATTCTCTAGAAAAAAGACTACTCTCCCGCCATTCTCTTGAAGAATGGCGGGAGGAGTAGTCG
Luc-1	GATCCGTGCGTTGCTAGTACCAACTTCAAGAGAGTTGGTACTAGCAACGCACTTTTTTACGCGTG
Luc-2	AATTCACGCGTAAAAAAGTGGTTGCTAGTACCAACTCTTGAAGTTGGTACTAGCAACGCACG
Control-1	CATCCGTGCGTTGCTAGTACCAACTTCAAGAGATTTTTTACGCGTG
Control-2	AATTCACGCGTAAAAAATCTCTTGAAGTTGGTACTAGCAACGCACG

以上 shRNA 分子相应双链 DNA 由上海生工生物工程技术有限公司合成。

### 1.3 表达特异性 shRNA 载体的构建与鉴定

按照载体试剂盒说明书进行。将合成的正义链 DNA 片段稀释到 100  $\mu\text{mol/L}$ , 按照摩尔比 1:1 混合后 PCR 仪上合成双链 (95  $^{\circ}\text{C}$  30 s, 72  $^{\circ}\text{C}$  2 min, 37  $^{\circ}\text{C}$  2 min, 25  $^{\circ}\text{C}$  2 min), 置于冰上, 稀释至 0.5  $\mu\text{mol/L}$ , 与载体连接后转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$ 。挑取转化菌培养后提取质粒, *BamH* 和 *EcoR* 双酶切, 1% 琼脂糖凝胶电泳进行鉴定。挑取阳性克隆送上海生工生物工程技术有限公司测序, 鉴定插入序列是否正确。将鉴定正确的克隆大量制备质粒备用。

### 1.4 细胞感染猪圆环病毒 2 型 XSC 株前转染质粒对病毒复制的抑制作用

将对数生长期 Dulac 细胞置于 24 孔细胞板中, 0.5 mL/孔 ( $2.0 \times 10^5$  个细胞), 5%  $\text{CO}_2$ , 37  $^{\circ}\text{C}$  条件下培养, 6 h 后加入梭华-Sofast<sup>TM</sup> 基因转染试剂与 0.6  $\mu\text{g}$  各种 siRNA 表达质粒、混合质粒及对照质粒的复合物 (每个质粒设 3 个平行孔), 24 h 后加入 0.1 mL 的  $10^5$  TCID<sub>50</sub> PCV2 XSC 株感染上述细胞, 于感染后 24、36、48、60、72、84、96、120 h 收集上清和细胞, 应用 TaqMan 探针 Real-time PCR 法对 PCV2 病毒拷贝数进行检测。以公式: 抑制率=

$$\frac{\text{攻毒对照组病毒平均拷贝数} - \text{转染质粒组病毒平均拷贝数}}{\text{攻毒对照组病毒平均拷贝数}} \times 100\%$$

来计算质粒表达的 shRNA 对病毒复制产生的抑制率。

### 1.5 不同浓度的质粒对猪圆环病毒 2 型 XSC 株在 Dulac 细胞中复制的抑制作用

方法同 1.4, 将 50、100、500、1000、1500、2500 ng 质粒进行转染, 12、24 h 后分别进行荧光观察。24 h 后加入 0.1 mL 的  $10^5$  TCID<sub>50</sub> PCV2 XSC 株感染上述细胞, 感染后 60 h 收集上清和细胞, 用 Real-time PCR 方法进行检测。

### 1.6 细胞感染猪圆环病毒 2 型 XSC 株后转染质粒对病毒复制的抑制作用

$10^5$  TCID<sub>50</sub> PCV2 XSC 株感染 Dulac 细胞, 感染后 12、24、36、48、60 h 加入转染试剂及 500 ng 的 siRNA 表达质粒、混合质粒及对照质粒复合物, 转染后 84 h 收集上清和细胞, 检测方法同 1.4。

### 1.7 对 10 株 PCV2 分离毒株在 Dulac 细胞内复制的抑制

按步骤 1.4 的方法, siRNA 表达质粒转染 Dulac 细胞 24 h 后加入  $10^5$  TCID<sub>50</sub> 的 10 株不同来源的 PCV2 分离株细胞毒, 这 10 个 PCV2 分离株名称及 GenBank 登录号分别是: ChangZhou0511 (EU503031)、DaFeng0609 (EU503032)、GaoYou0707 (EU503033)、HuaiAn0609 (EU503034)、JiangYan\_boar0710 (EU503035)、SuZhou0511 (EU503036)、Taizhou0512 (EU503037)、TianChang0603 (EU503038)、YangZhou0608 (EU503039)、YangZhou0705 (EU503040), 每株病毒作 3 个平行孔。感染 60 h 后收集样品, 用 Real-time PCR 方法进行检测。

### 1.8 流式细胞术检测

按步骤 1.4 的方法, 收集感染后 60 h 的细胞并在 2% 的多聚甲醛溶液中固定 30 min; 然后加入皂角苷进行破膜; 用含 1% 新生牛血清 (NCS) 的 PBS 液洗 5 次, 悬浮后与工作浓度的猪抗 PCV2 抗体在室温下共同孵育 30 min; PBS (1% NCS) 洗 5 次, 然后加入 1:100 稀释的罗丹明标记的兔抗猪荧光二抗室温下共同孵育 30 min; 洗涤并悬浮, 应用 FACS Aria 流式细胞仪 (美国 BD 公司) 检测。

### 1.9 载体表达的 shRNA 分子对小鼠体内 PCV2 复制的抑制作用

将 72 只 8 周龄 BALB/c 小鼠随机分成 12 组, 每组 6 只, 第 1~4 组每只分别肌肉注射 10  $\mu$ g Retro-SH1, Retro-SH4, Retro-SH6, Retro-Nc 质粒, 第 5 组肌肉注射 10  $\mu$ g 前三者混合质粒, 24 h 后每只按  $10^5$  TCID<sub>50</sub> 的量口服及腹腔注射 0.1 mL 的 PCV2 XSC 株。第 6-10 组先用  $10^5$  TCID<sub>50</sub> PCV2 XSC 株感染小

鼠, 24 h 后每只分别肌肉注射 10  $\mu$ g Retro-SH1, Retro-SH4, Retro-SH6 质粒、混合质粒或 Retro-Nc。第 11 组为攻毒对照组, 第 12 组为健康对照组。分别于感染后第 5 天及第 11 天进行扑杀采样, 每次采集 3 只小鼠血清及脾脏, Real-time PCR 法检测血清样品中病毒拷贝数, 脾脏进行免疫组化试验。

## 2 结果

### 2.1 表达特异性干扰分子 RNAi 载体的构建结果

连接转化后, 提取转化菌质粒 DNA, BamH I 和 EcoR 双酶切, 1% 琼脂糖凝胶电泳结果显示均为 6600 bp 左右的条带。测序结果表明每一种质粒都得到了插入序列完全正确的克隆, 分别命名为 Retro-SH1, Retro-SH4, Retro-SH6, Retro-Luc, Retro-NC。

### 2.2 对 PCV2 XSC 株在细胞内复制的抑制

荧光观察发现, 细胞在转染后 12 h 开始出现绿色荧光, 表明 siRNA 分子已经表达 (图 1-A)。转染表达质粒的 Dulac 细胞感染 PCV2 XSC 株后, 不同时间收集细胞进行测定, 结果表明, 感染后 60 h 载体表达的 PCV2 特异性 siRNA 分子对 PCV2 复制表现出很强的抑制作用, 可持续到感染后 96 h 以后 (图 2-A)。定量 PCR 结果表明不同浓度的质粒对 PCV2 XSC 株的复制均有干扰作用, 且 500~2500 ng 浓度的质粒其干扰作用无明显差别, 而表达质粒 Retro-Luc 和阴性对照质粒对 PCV2 XSC 株病毒均无抑制作用 (图 2-B)。

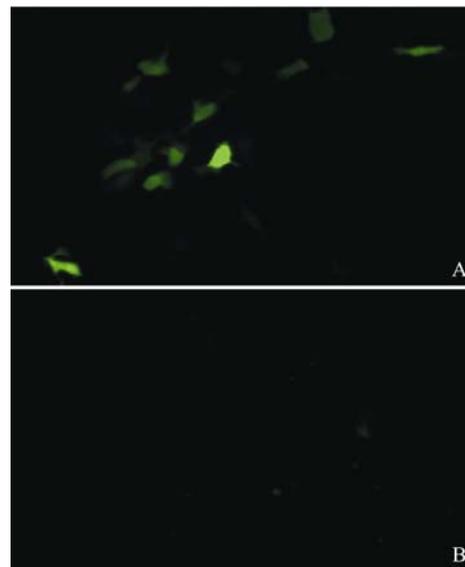


图 1 Dulac 细胞转染 siRNA 表达质粒 12 h 后的荧光照片  
Fig. 1 The fluorescence of Dulac cells transfected with siRNA expression plasmids. A: 12 h; B: control cells.

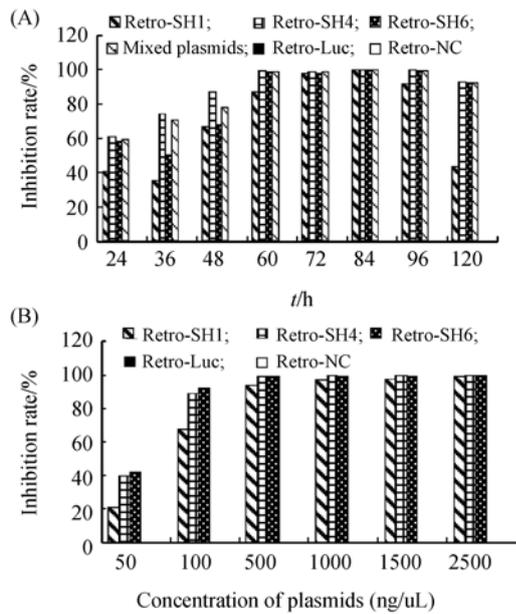


图 2 (A) siRNA 表达质粒抑制 PCV2 复制的结果; (B) 不同浓度的 siRNA 对 PCV2 复制的抑制作用

Fig. 2 Inhibition of PCV2 replication by plasmids expressed siRNA in Dulac cells. A: time; B: concentration.

### 2.3 Dulac 细胞感染 PCV2 XSC 株后质粒对病毒复制的抑制作用

细胞感染 PCV2 XSC 株后于 12、24、36、48 和 60 h 分别转染表达 siRNA 质粒, 经 TaqMan 探针 Real-time PCR 方法检测, 发现细胞感染 12 h 后转染表达 PCV2 特异的 siRNA 质粒对 PCV2 毒株的复制有很强的抑制作用, 细胞感染 PCV2 后 36 h 转染质粒抑制作用降低, 而质粒混合组对 PCV2 病毒的干扰作用与单独作用最好的处理组的干扰作用没有明显差异, 并未显示协同作用, Retro-Luc 和对照质粒组则对病

毒的复制没有抑制作用, 结果见图 3。对 10 个不同 PCV2 分离株的抑制结果表明, 3 种 siRNA 分子对不同 PCV2 分离株在细胞中的复制均有一定抑制作用, 不同的 siRNA 分子作用有差异, 但对不同毒株的作用间没有明显差异。

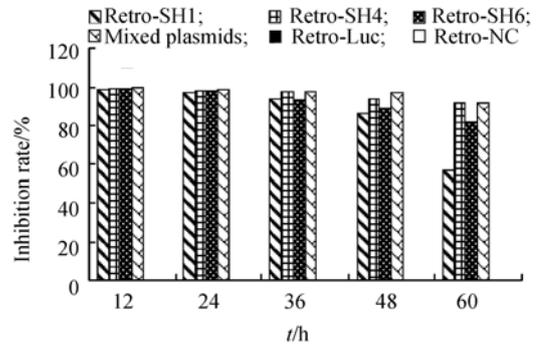


图 3 PCV2 感染后转染 siRNA 表达质粒对病毒复制抑制 Fig. 3 Inhibition of virus replication by siRNA expressed by plasmids in Dulac cells Pre-infected by PCV2.

### 2.4 流式细胞术检测结果

转染了 siRNA 表达质粒 Retro-SH1, Retro-SH4, Retro-SH6 的 Dulac 细胞在 PCV2 感染 60 h 后收集细胞在流式细胞仪上进行细胞分筛和检测, 发现转染质粒后含病毒的 Dulac 细胞比率明显减少, 说明表达的 siRNA 质粒对 PCV2 病毒的干扰作用很强, 质粒 Retro-SH4 的抑制作用最强 (图 4), 与定量 PCR 检测的结果一致。

### 2.5 对小鼠体内 PCV2 复制的抑制作用

10  $\mu$ g siRNA 表达质粒对 PCV2 XSC 株在小鼠体

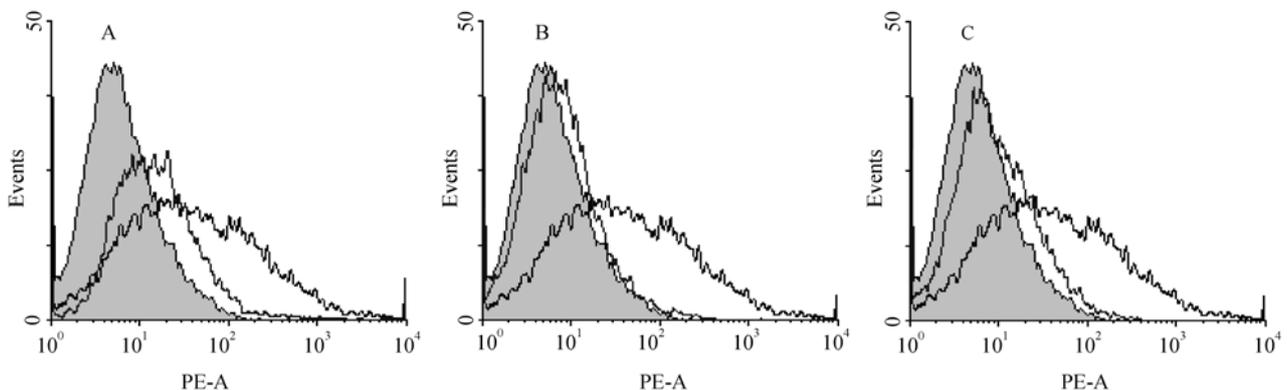


图 4 siRNA 表达质粒对 PCV2 在 Dulac 细胞中复制的抑制作用的流式细胞术检测

Fig. 4 The inhibition of replication by the siRNA expressed plasmids in Dulac cells detected by FACS. A: Retro-SH1; B: Retro-SH4; C: Retro-SH6. Graphic key: gray (filled), mock-infected control; blue (line): shRNA transfection; black (line): PCV2 infection without shRNA transfection.

制率有差异。不同的 siRNA 表达质粒混合组与单独作用最好的处理组的抑制率之间没有明显差异,并未显示协同作用,具体结果见图 5。而对已感染 PCV2 XSC 株的 BALB/c 小鼠,载体表达的猪圆环病毒 2 型

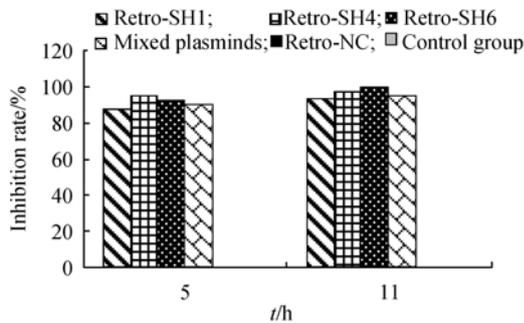


图 5 质粒表达的 siRNA 在小鼠体内对 PCV2 复制的抑制  
Fig. 5 Inhibition of PCV2 replication by plasmids expressed siRNA in mice.

特异性的 siRNA 分子对小鼠体内 PCV2 的复制也有一定的抑制作用,结果见图 6。

免疫组织化学检测:结果表明在攻毒组小鼠脾脏内病毒含量较高,而 siRNA 预防和治疗组的小鼠脾脏内病毒含量明显减少,健康对照组小鼠脾内未见到病毒特异性着色,结果见图 7。

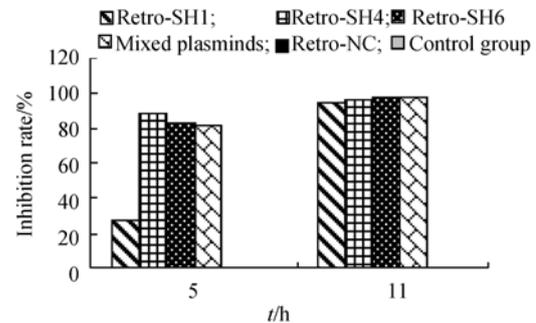


图 6 感染 PCV2 的小鼠注射 siRNA 表达质粒对病毒复制的抑制

Fig. 6 Inhibition of virus replication by plasmids expressed siRNA in mice pre-infected by PCV2.

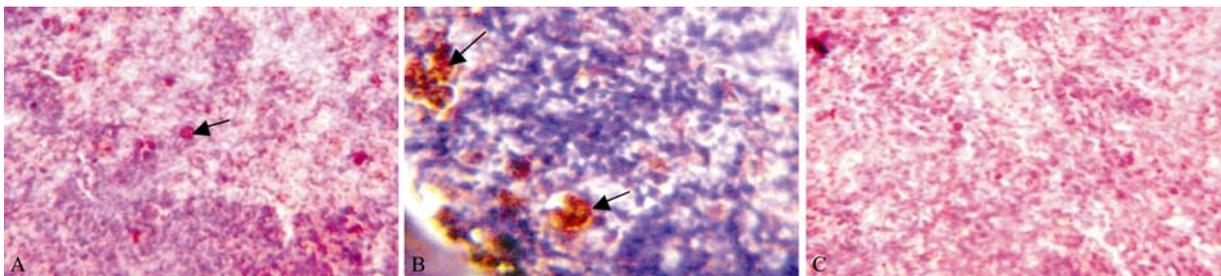


图 7 攻毒后第 5 天小鼠免疫组织化学检查

Fig. 7 Immunohistochemical examination of mice spleens five days post-challenged. A: spleen from mice with plasmids transfected then PCV2 inoculated(400 $\times$ ); B: spleen from mice with PCV2 inoculated(1000 $\times$ ); C: spleen from healthy mice(400 $\times$ ). Arrow: sites where PCV2 antigens were specifically stained.

### 3 讨论

猪圆环病毒感染是近年来新发现的一种猪的传染病,该病的广泛流行和蔓延给世界各国的养猪业造成了严重的威胁和损失,目前仍没有有效的防控措施。一些新的技术应用于 PCV2 感染的防控正在研究中, RNA 干扰技术是其中之一。 RNA 干扰可以在转录后抑制基因的表达,因而成为下调细胞内源性和外源性基因表达的有效方法。国内外的研究证实 RNA 干扰可以在体内外抑制人和动物源病毒的复制,揭示该技术可应用于病毒性疾病的预防和治疗。早期的研究主要集中在 RNA 病毒,近年来开始应用于 DNA 病毒抑制的研究。国内外已有将该技术应用于 PCV2 感染的防控研究。研究结果表明,小 RNA 分子对该病毒的复制有一定的抑制作用<sup>[11,12]</sup>。 RNA 干扰技术最

核心的内容是小干扰 RNA 分子的设计和获取<sup>[13]</sup>,一般从转录序列中选取靶基因或 cDNA 序列 19~21 个连续碱基序列,选择两个腺嘌呤核苷酸(AA)作为起始核苷酸。 PCV2 的 2 个主要的开放阅读框(ORF)都是 RNA 沉默的良好靶基因,因而本文在 PCV2 的基因中选取了 ORF1 和 ORF2 基因作为靶基因。

在人工合成 siRNA 相应 DNA 片段的过程中,由于该片段具有发夹结构而在合成过程中易出现错误。我们在相关专业公司合成的 DNA 片段的错误率也很高,大部分只有一个碱基发生错误,个别有十几个碱基的错误。另外,由于该片段中存在二级结构,在序列测定鉴定时也会出现错误。因此,对于该重组质粒的鉴定需要多次测序。在 RNA 干扰实验中,对照 siRNA 是必不可少的,我们购买的试剂盒中提供了针对载体上萤火虫荧光素酶特异性 siRNA 片段以及与其它任何物种完全没有同源性的 siRNA 片段(46 nt),

由于载体本身携带萤火虫荧光素酶基因,在转染后一定时间出现荧光,而其所含 siRNA 片段会使萤火虫荧光素酶表达量降低,不仅可以作为阴性对照,而且可以得到 siRNA 片段可能发挥作用的信息。

本文确定了 3 条针对 PCV 基因的 siRNA 片段作为研究对象,其中 2 条针对 PCV1、PCV2 rep 基因,分别命名为 Retro-SH1 (S50-68)、Retro-SH4 (S624-642),1 条针对 PCV2 cap 基因,命名为 Retro-SH6 (R1307-1289)。人工合成相应 DNA 片段,退火形成双链,插入载体中鉴定后获得了序列完全正确的克隆,确定了在细胞中进行干扰试验的最适浓度为 500 ng,细胞在转染后 12 h 开始出现绿色荧光,siRNA 分子开始表达。不同的 siRNA 分子对病毒复制的抑制作用有一定差异,Retro-SH1 效果稍差,Retro-SH4,Retro-SH6 在病毒感染 60 h 后抑制率达到了 95%以上,84 h 达到最高,96 h 以后有所下降,达 80%左右。混合质粒的抑制效果与 Retro-SH4,Retro-SH6 没有明显差异。如先接种病毒再转染干扰质粒,则细胞感染 12 h 后转染表达 PCV2 特异的 siRNA 质粒对 PCV2 毒株的复制有很强的抑制作用,36 h 后转染抑制率开始下降,可能与病毒在细胞内的复制动力学相关。不同的 siRNA 表达质粒以及混合组的干扰作用都很强,没有明显差异,混合组并未显示出协同作用。

小鼠体内的干扰试验表明 10  $\mu$ g 载体表达的 siRNA 质粒对 PCV2 攻毒的小鼠体内 PCV2 的复制具有很好的抑制作用,但不同的 siRNA 分子干扰能力有一定差异。siRNA 表达质粒混合组与单独作用最好的处理组的干扰能力没有明显差异,并未显示协同作用。而对已感染 PCV2 的 BALB/c 小鼠的干扰试验表明,载体表达的 PCV2 特异性的 siRNA 分子对病毒的复制也有一定的干扰作用。这些结果与其他研究者的结果类似,而本文中所得到的抑制率明显高于其他研究者的结果,可能是因为本文中测定的是病毒基因组 DNA 的拷贝数,而其他研究者测定的大多是信使 RNA<sup>[11, 12]</sup>。测定信使 RNA 拷贝数能够了解转录后对信使 RNA 的降解程度,测定病毒基因组 DNA 的拷贝数是最终的结果,因此存在一定差异。

根据以上研究结果,本文所设计的 3 个质粒表达的 siRNA 片段均能有效地抑制 PCV2 在 Dulac 细胞

和小鼠体内的复制,在 PCV2 感染的防控中具有潜在的应用价值。

## 参 考 文 献

- [1] Straw BE, Zimmerman JJ, D'Allaire S, *et al.* Diseases of swine. 9th edition, Iowa: Blackwell publishing, 2006, 299-308.
- [2] Segalés J, Domingo M, Chianini F, *et al.* Immunosuppression in postweaning multisystemic wasting syndrome affected pigs. *Vet Microbiol*, 2004, 98(2): 151-158.
- [3] Lipej Z, Segales J, Jemersic L, *et al.* First description of postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in wild boar (*Sus scrofa*) in Croatia and phylogenetic analysis of partial PCV2 sequences. *Acta Vet Hung*, 2007, 55(3): 389-404.
- [4] Steinfeldt T, Finsterbusch T and Mankertz A. Rep and Rep' protein of porcine circovirus type 1 bind to the origin of replication *in vitro*. *Virology*, 2001, 291(1): 152-160.
- [5] Fire A, Xu S, Montgomery MK, *et al.* Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 1998, 391(6669): 808-811.
- [6] Tuschl T and Borkhardt A. Small interfering RNAs: a revolutionary tool for the analysis of gene function and gene therapy. *Mol Interv*, 2002, 2(3): 158-167.
- [7] Qin XF, An DS, Chen IS, *et al.* Inhibition HIV-1 infection in human T cells by lentiviral-mediated delivery of small interfering RNA against CCR5. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100(1): 183-188.
- [8] Radhakrishnan SK, Layden TJ, Carter AL, *et al.* RNA interference as a new strategy against viral hepatitis. *Virology*, 2004, 323(2): 173-181.
- [9] 刘文博, 张小荣, 曹永忠, 等. 表达禽流感病毒特异性 siRNA 分子减毒鼠伤寒沙门氏菌的构建. *病毒学报 (Chinese Journal of Virology)*, 2007, 23(2): 125-128.
- [10] An DJ, Roh IS, Song DS, *et al.* Phylogenetic characterization of porcine circovirus type 2 in PMWS and PDNS Korean pigs between 1999 and 2006. *Virus Res*, 2007, 129 (2): 115-122.
- [11] Liu J, Chen I, Chua H, *et al.* Inhibition of porcine circovirus type 2 replication in mice by RNA interference. *Virology*, 2006, 347(2): 422-433.
- [12] Feng Z, Jiang P, Wang X, *et al.* Adenovirus-mediated shRNA interference against porcine circovirus type 2 replication both *in vitro* and *in vivo*. *Antiviral Res*, 2008, 77(3): 186-194
- [13] 宋尔卫 主编. RNA 干扰的生物学原理与应用. 北京, 高等教育出版社. 2005, 47-48.

## Inhibition of porcine circovirus type 2 replication by the plasmid vector expressing siRNAs

Haiyan Wang, Wenbo Liu, Song Gao\*, Xiufan Liu

(Key Laboratory of Animal Infectious Diseases of Ministry of Agriculture, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China)

**Abstract:** [Objective] To develop siRNA as a potential tool for control of porcine circovirus 2 (PCV2) infection. [Methods] We designed two short interfering RNAs (siRNAs) related to the replicase (*rep*) gene of porcine circovirus and one related to capsid (*cap*) gene of PCV2 based on the genomic sequences of the viruses deposited in GenBank. The corresponding DNA fragments were synthesized, annealed and ligated into the downstream of the mouse originated U6 promoter of the RNAi-Ready pSIREN-RetroQ ZsGreen vector. As controls, the siRNAs specific to Luciferase contained in the vector kit and negative fragments with no similarities to any known species were also included. We transformed the recombinant plasmids into the host bacterium DH5 $\alpha$  and positive clones were selected. The positive clones were sequenced and five clones carried the correct inserts. They were designated as Retro-SH1, Retro-SH4, Retro-SH6, Retro-Luc and Retro-NC. To test whether the siRNAs specific to PCV expressed by the vector could inhibit the virus replication, we evaluated the inhibition effect on PCV2 replication both in Dulac cells and experimental mice using real-time PCR and immunohistochemistry. [Results] The results showed that the purified plasmids could strongly inhibit the replication of the PCV2 virus and the inhibition rate reached to 99% in cell culture. In the animal experiments, siRNAs expressed by the plasmids could inhibit the replication of the PCV2 virus and the inhibition rate varied from 26% to 99%. [Conclusion] The siRNAs specific to PCV2 expressed by vectors should be potential in the control of the diseases related to PCV2 infection.

**Keywords:** RNA interference; porcine circovirus type 2; replication; inhibition

Supported by the Foundation for PhD students training program, Ministry of Education (20041117005) and the Jiangsu agricultural three-area-focused program [SX (2007) 080]

\*Corresponding author. Tel: +86-514-87991448; +86-514-87972218; E-mail: gsong@yzu.edu.cn

Received: 24 April 2008/ Revised: 8 August 2008

(上接 1506 页)

就更谈不上文章被人引用的次数了。(2) 摘要: 同样, 摘要往往是独立的, 一般和正文分开被检索利用, 因此也不用缩写语。对于摘要中出现的真正十分冗长的名词或短语, 如果出现频率较高, 例如大于 6 次, 则可以考虑使用缩写。但是在第一次出现这个缩写语时, 要把缩写语放在括号内并紧跟在缩写语所代表的名词或短语(全拼)之后, 即: 名词或短语全拼(缩写语), 而此后就不再使用该缩写语的全名。(3) 正文: 正文中缩写语的使用规则和摘要中万不得已要使用的情况一样。我这里强调万不得已就是要强调尽量不用缩写语。

有一些例外的缩写语, 包括度量单位如毫升(mL)、公斤(kg)、分钟(min)等, 则不必全拼全名给予解释。其实即使记不住那么多的惯例和规则, 始终记住你文章的可读性和信息传播的目的, 你就会负责地正确使用科技写作的英语缩写语。期待《微生物学报》能够迅速成为一个正确使用英语缩写语的净土。

注: 在中文稿件中, 对于正文中第一次出现的西文缩写语, 应附上完整的西文名, 以避免由于翻译上的不统一而造成误解。应写为: 中文名(西文全名, 缩写)

(朱阳 供稿)