

斜带石斑鱼神经坏死病毒 CP 基因 shRNA 干扰载体的构建及效果评价

黄桂菊^{1,2,3}, 陈健光¹, 喻达辉^{1*}, 曾令兵^{2,3}, 龙华^{2,3}

- (1. 中国水产科学研究院南海水产研究所,农业部海水养殖生态与质量控制重点开放实验室,广东 广州 510300;
2. 中国水产科学研究院长江水产研究所,农业部淡水鱼类种质资源与生物技术重点开放实验室,湖北 荆州 434000;
3. 中国水产科学研究院长江水产研究所,淡水生态与健康养殖重点开放实验室,湖北 荆州 434000)

摘要: 利用 Invitrogen 公司的在线生物学软件分析斜带石斑鱼神经坏死病毒 CP 基因,设计针对 CP 基因不同位置的小发卡 RNA (short hairpin RNA, shRNA) 干扰序列[其结构特征为正链(19 nt) - 环(4 nt) - 负链(19 nt)]。化学合成这些序列,并退火连接为双链干扰片段,将双链干扰片段定向克隆到干扰载体 pENTR™/U6 中,构建 shRNA 干扰载体 pshRNA-124、pshRNA-896 和 pshRNA-NNV。然后,用脂质体转染法分别将 3 种 shRNA 干扰载体和 pEGFP-CP 基因共转染导入黑头呆鱼 (FHM) 肌肉细胞,荧光显微镜观察细胞荧光强度,分析荧光抑制效率,Real-time RT-PCR 检测 CP 基因 mRNA 的表达水平变化。结果表明,在 pEGFP-CP 与 shRNA 干扰载体共转染组,pshRNA-124、pshRNA-896、pshRNA-NNV 的荧光抑制效率分别为 47%、68%、51%。3 种 shRNA 干扰载体都有干扰效果,均能干扰绿色荧光蛋白的表达,其中 pshRNA-896 干扰效率最好。Real-time RT-PCR 检测表明,干扰质粒 pshRNA-124、pshRNA-896、pshRNA-NNV 对 pEGFP-CP 基因的沉默效率分别约为 60%、96% 和 55%,与对照组相比差异显著 ($P < 0.05$)。研究表明,靶向斜带石斑鱼神经坏死病毒 CP 基因的 shRNA 干扰载体构建成功,为进一步运用 RNA 干扰技术进行 CP 基因的功能研究奠定了基础。

关键词: 斜带石斑鱼; 神经坏死病毒; CP 基因; shRNA 干扰载体

中图分类号: S 917; Q 785

文献标志码: A

鱼类病毒性神经坏死病 (viral nervous necrosis, VNN) 属于诺达病毒科 Beta 诺达病毒属^[1], 又称空泡性脑病和视网膜病 (viral encephalopathy and retinopathy, VER)^[2], 是一种世界范围内鱼类流行性病毒病, 具有极高的危害性, 被世界动物卫生组织 (OIE) 列为重要的鱼类病害^[3], 受感染的鱼类已达 40 余种^[4], 主要发生在海水鱼类种苗生产阶段, 鱼苗死亡率高达 90% 以上, 给海水鱼类养殖业的发展带来严重的危害^[5]。病毒基因组包括两条正义的 RNA 单链

(RNA1 和 RNA2)。RNA1 主要编码非结构 A 蛋白, RNA2 开放阅读框编码一个病毒衣壳蛋白 (CP 蛋白)。衣壳蛋白是主要的致病因子, 目前国内的研究重点集中在衣壳蛋白的重组表达、抗体制备方面。

RNA 干扰 (RNA interference, RNAi) 是生物体内双链 RNA (double-stranded RNA, dsRNA) 介导同源 mRNA 发生特异性降解, 从而导致靶基因的表达沉默, 产生相应的功能表型缺失的现象^[6]。外源或内源的双链 RNA 进入细胞后, 被

收稿日期: 2011-08-30 修回日期: 2011-11-10

资助项目: 广东省海洋渔业科技推广专项项目 (A201001H06); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金项目 (2007TS02);

农业部淡水鱼类种质资源与生物技术重点开放实验室开放课题 (LFB20070610); 中国水产科学研究院淡水生态与健康养殖重点开放实验室开放课题 (2007FEA0214)

通讯作者: 喻达辉, E-mail: pearlydh@126.com

RNase III 家族核酸酶 (dicer, DCR) 切割成小片段干扰 RNA 分子 (siRNA)^[7]。siRNA 与某些作用因子结合形成无活性的 RNA 诱导的沉默复合物 (RISC)。RISC 与靶 mRNA 结合并将其降解, 完成 siRNA 介导的 RNAi 过程^[8]。siRNA 表达载体可以转录产生短发卡状 RNA (shRNA), 在体内进一步被切割形成 siRNA 发挥干扰作用, 能够稳定持续地维持较长时间的基因沉默^[9]。此前, 本课题组已经克隆了石斑鱼神经坏死病毒的 CP 基因, 并构建了带有绿色荧光蛋白 (EGFP) 报告基因的真核表达质粒 pEGFP-CP^[10]。在此基础上, 本实验通过构建靶向斜带石斑鱼 (*Epinephelus coioides*) 神经坏死病毒 CP 基因的 shRNA 干扰载体, 对 pEGFP-CP 表达进行沉默干扰, 以筛选有效的 shRNA, 为进一步运用 RNA 干扰技术进行该病毒病防治的研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 shRNA 干扰序列的设计及质粒构建

根据 BLOCK-iT™ U6 RNAi Entry Vector 试剂盒 (Invitrogen 公司) 的操作说明进行 shRNA 干扰载体构建 (图 1)。利用 Invitrogen 公司的在线软件设计并合成用以敲减目的基因表达的 shRNA oligo 和其互补链 NNV 002-F/NNV 002-R、124-F/124-R 和 896-F/896-R。2 条互补 oligo 各有 1 个 4 碱基的突出末端用以连接 pENTR™/U6 载体的粘性末端。将 2 条互补 oligo 退火形成双链。退火时分别把 2 条互补 oligo 用 ddH₂O 溶解成 100 μmol/L, 各取 5 μL 混合, 再加入 2 μL 的 10 × oligo annealing buffer 和 8 μL 的 ddH₂O。在 95 °C 加热 4 min, 然后放置室温自然冷却 20 min, 形成双链 oligo。将退火的双链 oligo 稀释成 5 nmol/L, 用 T₄ ligase 克隆入 pENTR™/U6 载体, 然后转化至感受态细胞 DH5α, 筛选阳性克隆并送往上海英骏公司进行测序验证。构建的 3 个 shRNA 干扰载体分别命名为 pshRNA-124、pshRNA-896、pshRNA-NNV。

1.2 shRNA 干扰质粒与 pEGFP-CP 共转染

黑头呆鱼 (fathead minnow, FHM) 肌肉细胞由本实验室 (农业部海水养殖生态与质量控制重点实验室) 保存, 培养于 28 °C。将生长状态良好的 FHM 肌肉细胞消化计数后, 按照每孔 5×10^5 个细胞接种于 6 孔板中。待细胞生长状态稳

定、融合率在 90% 左右时进行转染实验。为避免内毒素对细胞的损害, 转染用的质粒均要用 Omega 公司无内毒素质粒提取试剂盒提取。转染前用 Invitrogen 公司无血清培养基 Opti-MEM I 轻洗细胞一次, 然后再加入 1.5 mL Opti-MEM I。取干扰质粒 pshRNA-124、pshRNA-896、pshRNA-NNV 以及阴性对照质粒 sh-neg 各 4 μg 分别用 250 μL Opti-MEM I 稀释, 轻轻混匀。干扰质粒和 pEGFP-CP 质粒按照 3:1 混合。用 250 μL Opti-MEM I 稀释 10 μL Lipofectamine 2000 脂质体 (Invitrogen 公司), 轻轻混匀, 室温孵育 5 min。轻轻混合已稀释的质粒和 Lipofectamine 2000 稀释液, 室温放置 20 min 以形成质粒脂质体混合物, 将每管 500 μL 质粒脂质体混合物慢慢加入到细胞培养板中, 轻轻混匀。在 28 °C 的培养箱中培养 4 ~ 6 h 后, 换上完全培养液 (不含抗生素), 放置在 28 °C 的培养箱中继续培养过夜, 每组设 3 个孔, 重复 3 次。第 2 天观察荧光表达情况。

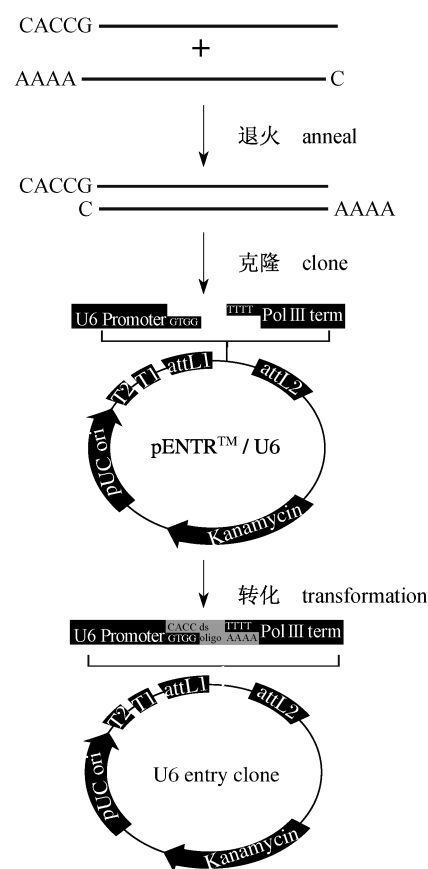


图 1 shRNA 载体构建
Fig. 1 Construction of shRNA vector

1.3 干扰效率的 Q-PCR 检测

siRNA 的作用机理在于引起其靶 mRNA 的降解,靶 mRNA 的降解水平是 siRNA 沉默效率的最直接指标。因此,本实验通过 Real-time RT-PCR 检测 CP 基因的表达情况来评价各干扰质粒的干扰效率。根据 Invitrogen 公司的 Trizol 和 SuperScript III RT 操作说明书进行细胞总 RNA 的提取和 RNA 逆转录获得 cDNA。Real-time RT-PCR 反应总体积为 50 μL ,包括 1.5 μL cDNA,0.4 μL dNTPs(25 mmol/L),引物各 1 μL (10 $\mu\text{mol/L}$),3 μL MgCl_2 (25 mmol/L),5 μL 10 \times Buffer,0.3 μL Taq 酶(5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$)和 36.8 μL 超纯水。反应条件为 94 $^{\circ}\text{C}$ 2 min,然后 94 $^{\circ}\text{C}$ 10 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 20 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,共 40 个循环,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。最后 60 $^{\circ}\text{C}$ 开始,每升高 0.5 $^{\circ}\text{C}$,保持温度 30 s,70 个循环后升至 95 $^{\circ}\text{C}$,用以制作溶解曲线。Taq DNA 聚合酶和 dNTP 为 TaKaRa 公司产品。其他药品和试剂均为国产分析纯。荧光定量仪器型号:ABI 公司的 7500。其中目的基因-F:5'-TCACCTGGTCGGCTGATACTC-3',目的基因-R:5'-GGAACGCTCAGTCGAACACTC-3',内参 β -actin-F:5'-GAAGAGCTACGAGCTGCCTGAC-3',内参 β -actin-R:5'-GATTCCGCAAGACTCC-ATACC-3'。

CP 基因在各组的相对表达量以阴性对照组为基准,采用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ [11] 分析实时定量 PCR 数据。 $\Delta\Delta C_T = (\text{待测样品的目的基因的 } C_T - \text{待测样本$

的内参基因的 C_T) - (对对照样品的目的基因的 C_T - 对照样本的内参基因的 C_T),基因的表达量 $F = 2^{-\Delta\Delta C_T}$,目标基因的沉默效率为 $1 - 2^{-\Delta\Delta C_T}$ 。

采用统计软件 SPSS 12.0 进行方差分析。不同数据之间的差异性比较采用单因子方差分析 (One-Way ANOVA) 的 LSD 进行多重比较。

2 结果

2.1 干扰质粒的鉴定

采用 pENTRTM/U6 载体上的通用引物进行测序,插入序列与设计序列一致,不存在核苷酸的插入、缺失等突变现象,说明靶向 NNV-CP 基因的 pshRNA-124、pshRNA-896、pshRNA-NNV 构建成功。

2.2 干扰质粒与 pEGFP-CP 共转染的荧光观察

共转染 24 h 后,荧光倒置显微镜 (Nikon TE300) 观察,放大倍数是 100 倍,全面观察每孔整体转染情况。荧光倒置显微镜下可见到阴性对照质粒 sh-neg 与 pEGFP-CP 共转染组在转染 24 h 后,细胞中有明显的绿色荧光。比较而言,pshRNA-124、pshRNA-896、pshRNA-NNV 与 pEGFP-CP 共转染组细胞中绿色荧光细胞数明显减少,且荧光强度也明显降低,亮度明显减弱,用荧光分析软件计算 pshRNA-896、pshRNA-NNV、pshRNA-124 的荧光抑制效率分别为 68%、51%、47%。从共转染的效果来看,pshRNA-896 的干扰效果要好于其他两个(图 2)。

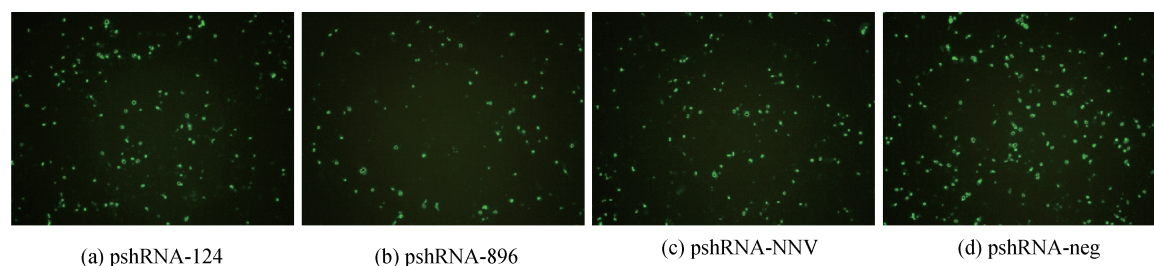


图 2 不同干扰质粒和 pEGFP-CP 共转染 FHM 细胞 ($\times 100$)

Fig. 2 Interference effects of co-transfection of different RNAi vectors and pEGFP-CP into FHM cells

2.3 Q-PCR 检测结果

干扰质粒和 pEGFP-CP 共转染 48 h 后,斜带石斑鱼神经坏死病毒 CP 基因的相对表达量明显下降,说明干扰质粒对 pEGFP-CP 基因 mRNA 的表达均有抑制作用,目的基因和内参基因的实时

定量 PCR 的溶解曲线表现为单一峰,说明是特异性扩增。以 pshRNA-neg 与 pEGFP-CP 共转染组中的 mRNA 表达量为 100%,目标基因的沉默效率为 $(1 - 2^{-\Delta\Delta C_T}) \times 100\%$,干扰质粒 pshRNA-124、pshRNA-896、pshRNA-NNV 沉默效率分别约

为60%、96%和55%，与对照组相比差异显著($P < 0.05$)。其中以 pshRNA-896 对 pEGFP-CP 表达的抑制率最为明显，而 pshRNA-124 与 pshRNA-NNV 之间差异不显著($P > 0.05$) (图3)。

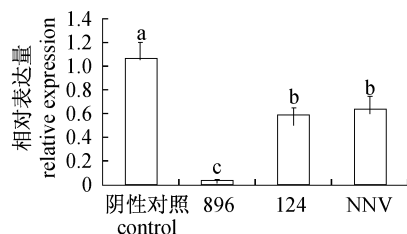


图3 干扰质粒和 pEGFP-CP 共转染后斜带石斑鱼神经坏死病毒 CP 基因的相对表达量

字母不同表示差异显著($P < 0.05$)。

Fig. 3 Relative mRNA expression of CP after co-transfection of different RNAi vector and pEGFP-CP into FHM cells

The different letters mean significantly different ($P < 0.05$).

3 讨论

到目前为止,鱼类病毒性疾病的防治还没有可供利用的有效药物和疫苗,而 RNA 干扰技术是目前研究的热门,已广泛应用于植物、模式动物(线虫、果蝇、斑马鱼、小鼠等)和人类基因的功能研究以及疾病治疗的探索方面^[12]。RNAi 作为基因治疗的一种工具,已经在某些重大病毒性传染疾病上取得了一定成效,如甲肝病毒^[13]、乙肝病毒^[14]、登革热病毒^[15]、SARS 病毒^[16]等。但目前国内还未见开展石斑鱼神经坏死病毒(NNV)的 RNAi 研究报道。

选择合适的靶基因是能否成功抑制病毒的关键因素之一,最适合的靶基因应该是病毒侵染过程中的关键基因。病毒的衣壳蛋白 CP 在侵染宿主细胞过程中起重要作用,是主要的致病因子^[17],也是病毒主要的抗原^[18],能引起动物产生保护性抗体,在病毒侵染宿主细胞过程中起重要作用。Nishizawa 等^[19]根据 25 种 β 诺达病毒的病毒衣壳蛋白基因部分核苷酸序列(427 nt)的分析,将现有的鱼类 VNNV 分为 4 种基因型,并且发现这 4 种基因型的 NNV 具有大量相同的抗原决定位点,表明 NNV 的衣壳蛋白在病毒感染动物过程中以及诱导机体产生保护性抗体时起重要作用。因此,通过 RNAi 技术将神经坏死病毒 CP

基因沉默达到防治鱼类神经坏死病将成为可能。本研究利用 Invitrogen 公司的在线软件设计的 shRNA oligo 靶序列,遵循“Tuschl 法则”^[20]和“多靶点验证”建议^[21],兼顾热动力学参数和 mRNA 靶位二级结构,经合成短发夹结构 DNA oligos 构建重组 shRNA 表达质粒。此前,本课题组已构建了绿色荧光蛋白(EGFP)基因与 CP 基因的融合真核表达质粒载体 pEGFP-CP,本实验通过构建靶向石斑鱼神经坏死病毒 CP 基因的 shRNA 干扰载体,用脂质体转染法将 pEGFP-CP 和不同的 shRNA 干扰载体共转染导入 FHM 细胞观察干扰载体的干扰效果。荧光显微镜观察和 Q-PCR 检测均证明 3 个 shRNA 干扰载体都有干扰效果,均能干扰绿色荧光蛋白的表达,其中 pshRNA-896 干扰效果最好,表明靶向石斑鱼神经坏死病毒 CP 基因的 shRNA 干扰载体构建成功, pshRNA-896 的靶序列可以作为后续实验 RNAi 靶点序列,为进一步运用 RNA 干扰技术进行 CP 基因的功能研究奠定了基础。本研究选择 EGFP 作为报告基因并将其转染进 FHM 细胞使其表达,是因为 EGFP 可以在荧光显微镜下直接观察,使实验结果直观可靠。

在构建的 3 个 shRNA 中,荧光显微镜观察和 Q-PCR 检测都表明 pshRNA-896 干扰效果最好,但 pshRNA-NNV 与 pshRNA-124 结果不一致,荧光显微镜观察 pshRNA-NNV 干扰效果稍优于 pshRNA-124,而 Q-PCR 检测则相反。初步推测荧光显微镜观察中统计发光点,有些发光点很弱没统计,但其 mRNA 水平还是可以检测到 CP 基因的表达。mRNA 水平和蛋白水平的变化通常不绝对一致^[22],有些细胞内蛋白只要变化 10% ~ 20%,功能上就可能表现出明显差别。蛋白作为翻译的最终产物受多种因素影响,比如转录后调控,翻译调控及翻译后调控都会影响到其水平。如果蛋白被干扰后的功能实验效果明显,那就在功能水平验证了基因被干扰后的差别,就体现了生物学意义。

化学合成 siRNA 具有操作简便,起效快的优点,但非修饰的 siRNA 在细胞培养过程中很容易降解,因此其干扰效果是有一定时效性的,夏立群等^[23]研究发现 siRNA 在转染后 72 h 干扰效果基本消失。梁艳等^[24]发现在斑节对虾(*Penaeus monodon*)体内注射的 dsRNA 数量有限,产生的

RNAi 效果也具有时效性,不能实现长期的沉默效果。为了获得更为稳定长效的干扰效果,本试验构建了 RNA 干扰载体。在体内构建 RNA 干扰载体有两种策略。一种是串连型,2 个 U6/H1 启动子分别位于 2 个载体上转录正义链或反义链,或者一前一后。2 条链退火形成双链,功能与体外合成的 siRNA 一样。另一种是茎环型,包括两个短反向重复序列,中间由一茎环(loop)序列分隔,组成发夹结构,由 pol III 启动子控制。间隔序列一般 3~9 个核苷酸,这些 shRNAs 在体内被 Dicer 加工。实验证明,两种载体都可以在体内抑制基因表达,但是 shRNA 表达载体比双启动子载体抑制效果更好而且有效剂量更低^[12]。因此,本实验也选择茎环型的表达载体,Invitrogen 公司的 pENTRTM/U6 载体上有哺乳动物的 U6 启动子,茎环是 4 个核苷酸,能在水生动物细胞中转录出针对 CP 的短发夹状 RNA (shRNA),shRNA 在细胞内被 RNase III 内切酶从茎环处剪切,产生 siRNA 发挥 RNA 干扰的作用。与阴性对照质粒 sh-neg 与 pEGFP-NNV 共转染组相比较,共转染 shRNA 与 pEGFP-NNV 组的细胞荧光明显减弱,CP 的 mRNA 水平明显降低,证明本实验构建的干扰质粒可以显著地抑制 CP 基因的表达,利用该体系可以进行 RNAi 抑制因子的筛选。但不同种类的启动子驱动 shRNA 并引发 RNAi 的效果并不一致,Zenk 等^[25]分别构建了老鼠 U6 启动子和东方鲀(*Fugu sp.*) U6 启动子的 siRNAs 表达载体,在东方鲀细胞系中检测 RNAi 的活性,结果表明鱼类自身的 U6 启动子具有更强的启动活性,更适合于鱼类的干扰表达载体的构建。因此,可以在后续的研究中用鱼类自身的 U6 启动子代替哺乳动物的 U6 启动子以获取更好的干扰效果。

参考文献:

- [1] 罗卫,田飞焱,刘焱,等. 鱼类病毒性神经坏死病毒衣壳蛋白在昆虫细胞中的表达及其特性[J]. 水产学报,2008,32(4):651-656.
- [2] Munday B L, Langdon J S, Hyatt A, et al. Mass mortality associated with a viral-induced vacuolating encephalopathy and retinopathy of larval and juvenile barramundi, *Lates calcarifer* Bloch[J]. Aquaculture, 1992,103(3-4):197-211.
- [3] 世界动物卫生组织(OIE)鱼病专家委员会. 水生动物疾病诊断手册[M]. 4 版. 北京:中国农业出版社,2003.
- [4] Lin L, He J G, Mori K, et al. Mass mortalities associated with viral nervous necrosis in hatchery-reared groupers in the People's Republic of China [J]. Fish Pathology, 2001,36(3):186-188.
- [5] Munday B L, Kwang J, Moody N. Beta nodavirus infections of teleost fish; a review[J]. Journal of Fish Disease, 2002,25(3):127-142.
- [6] Fire A, Xu S Q, Montgomery M K, et al. Potent and specific genetic interference by double stranded RNA in *Caenorhabditis elegans* [J]. Nature, 1998, 391: 806-810.
- [7] Zamore P D, Tuschl T, Sharp P A, et al. RNAi: Double stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals [J]. Cell, 2000,101(1):25-33.
- [8] Finnegan E J, Margis R, Waterhouse P M, et al. Posttranscriptional gene silencing is not compromised in the *Arabidopsis* CARPEL FACTORY (DICER-LIKE1) mutant, a homolog of Dicer-1 from *Drosophila* [J]. Journal of Current Biology, 2003, 13(3):236-240.
- [9] Hammold S M, Caudy A A, Harmon G. Post-transcriptional gene silencing by double-stranded RNA [J]. Nature Reviews Genetics, 2001, 2: 110-119.
- [10] 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.
- [11] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method [J]. Methods, 2001, 25(4): 402-408.
- [12] 黄桂菊,王庆,喻达辉,等. RNA 干扰机制及其在水产生物中的应用[J]. 中国兽药杂志, 2009, 43(12):41-45.
- [13] Kanda T, Kusov Y, Yokosuka O, et al. Interference of hepatitis a virus replication by small interfering RNAs [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2004,318(2):341-345.
- [14] McCaffrey A P, Nakai H, Pandey K, et al. Inhibition of hepatitis B virus in mice by RNA interference [J]. Nature Biotechnology, 2003,21(6):639-644.
- [15] Zhang W, Singam R, Hellermann G, et al. Attenuation of dengue virus infection by adeno-associated virus-mediated siRNA delivery [J]. Genetic Vaccines and Therapy, 2004,2(1):8

- [16] Wang Z, Ren L L, Zhao X G, *et al.* Inhibition of severe acute respiratory syndrome virus replication by small interfering RNAs in mammalian cells [J]. *Virology*, 2004, 78(14): 7523 – 7527.
- [17] Nagai T, Nishizawa T. Sequence of the non-structural protein gene encoded by RNA1 of striped jack nervous necrosis virus [J]. *Journal of General Virology*, 1999, 80(11): 3019 – 3022.
- [18] Tanaka S, Mori K, Arimoto M, *et al.* Protective immunity of seven band grouper, *Epinephelus septemfasciatus* Thunberg, against experimental viral nervous necrosis [J]. *Journal of Fish Disease*, 2001, 24(1): 15 – 22.
- [19] Nishizawa T, Takano R, Muroga K. Mapping a neutralizing epitope on the coat protein of striped jack nervous necrosis virus [J]. *Journal of General Virology*, 1999, 80: 3023 – 3027.
- [20] Elbashir S M, Harborth J, Lendeckel W, *et al.* Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells [J]. *Nature*, 2001, 411: 497 – 498.
- [21] Cullen B R. Enhancing and confirming the specificity of RNAi experiments [J]. *Nature Methods*, 2006, 3(9): 677 – 681.
- [22] Tian Q, Stepaniants S B, Mao M, *et al.* Integrated genomic and proteomic analyses of gene expression in mammalian cells [J]. *Molecular & Cellular Proteomics*, 2004, 3(10): 960 – 969.
- [23] 夏立群, 梁海鹰, 张红莲, 等. RNA 干扰技术抑制新加坡石斑鱼虹彩病毒感染细胞多肽 ICP46 与绿色荧光蛋白融合基因的表达 [J]. *水产学报*, 2010, 34(4): 611 – 617.
- [24] 梁艳, Saksamerprorne V, Sritunyalucksan K, 等. 一种大规模制备双链 RNA 的简单方法及其在斑节对虾中的应用 [J]. *水产学报*, 2010, 34(7): 1011 – 1017.
- [25] Zenk K, Kim K H. Novel fugu U6 promoter driven shRNA expression vector for efficient vector based RNAi in fish cell lines [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2008, 371(3): 480 – 483.

Construction and evaluation of short hairpin RNA interference vector targeting CP gene of *Epinephelus coioides* nervous necrosis virus

HUANG Gui-ju^{1,2,3}, CHEN Jian-guang¹, YU Da-hui^{1*}, ZENG Ling-bing^{2,3}, LONG Hua^{2,3}

(1. The Key Laboratory of Mariculture, Ecology and Quality Control, Ministry of Agriculture, South China Sea Fisheries

Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510300, China;

2. The Key Laboratory of Freshwater Fish Germplasm and Biotechnology, Ministry of Agriculture, Yangtze River Fisheries

Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Jingzhou 434000, China;

3. The Key Laboratory of Freshwater Ecology and Healthy Aquaculture, Yangtze River Fisheries

Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Jingzhou 434000, China)

Abstract: The short hairpin RNA interference sequences targeting CP gene of red-spotted grouper nervous necrosis virus were designed by using online designing software of Invitrogen Co., Ltd. The structure consisted of 19 nt sense strand, -4 nt loop and -19 nt antisense strand. These sequences are synthesized, annealed, and cloned into pENTR™/U6 to construct the shRNA interference vectors named pshRNA-124, pshRNA-896 and pshRNA-NNV, respectively. Then the expression vector of pEGFP-CP and each of the three shRNA interference vectors are co-transfected into FHM cells by using Lipofectamine 2000. Then the expression and inhibition of EGFP are observed by using fluorescent microscope. The mRNA expression level of CP gene is analysed by using real time RT-PCR. The result shows that pshRNA-124, pshRNA-896 and pshRNA-NNV all suppress the EGFP expression with inhibitory efficiency of 47%, 68% and 51%, respectively. The pEGFP-CP gene silencing efficiencies of pshRNA-124, pshRNA-896 and pshRNA-NNV at mRNA level are 60%, 96% and 55%, respectively, significantly higher than that of control ($P < 0.05$). It demonstrates that all of the three shRNAi vectors have interference effects and can interfere with the expression of EGFP, of which pshRNA-896 is the best one. The result above suggests that shRNAi vectors targeting CP gene of red-spotted grouper nervous necrosis virus has been successfully constructed, which will be a basis for further study of the function of CP gene with RNAi technique.

Key words: *Epinephelus coioides*; nervous necrosis virus; capsid protein gene; short hairpin RNA interference vector

Corresponding author: YU Da-hui. E-mail: pearlydh@126.com