

不同靶点 shRNA 干扰对虾 白斑综合征病毒增殖效果分析

周俊芳¹ 杨先乐² 万夕和³ 沈辉³ 房文红¹

1. 中国水产科学研究院东海水产研究所/农业部海洋与河口渔业资源及生态重点开放实验室, 上海 200090;
2. 上海海洋大学农业部渔业动植物病原库, 上海 201306; 3. 江苏省海洋水产研究所, 南通 226007

摘要 设计合成了靶向对虾白斑综合征病毒(WSSV)基因组不同位点的5个shRNA:RR9、RR1、DP1、DP2和PK1,并在凡纳滨对虾体内实施了RNA干扰(RNAi)抗WSSV增殖的试验。结果显示:5个shRNA不同程度地抑制了WSSV的复制,降低了对虾的死亡率,其中,靶向病毒核糖核酸还原酶的shRNA RR9的RNA干扰效果最佳。

关键词 凡纳滨对虾; 对虾白斑综合征病毒; RNA干扰

中图分类号 S 945.1⁺3 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2011)01-0105-04

作为对虾白斑综合征(white spot disease, WSD)的病原,对虾白斑综合征病毒(white spot syndrome virus, WSSV)以其对宿主的泛嗜性、高致病性以及高致死率而位居“需向 OIE 报告的对虾三大病毒性病原”之首。对虾一般感染 48 h 后即可出现典型症状——红体和甲壳白斑,3~10 d 内死亡率可高达 100%^[1]。因此,自从 1993 年该病首次暴发以来,几乎每年给我国对虾养殖业带来巨大经济损失,塘口绝收现象常有发生。与其它无脊椎动物一样,对虾特异性免疫机制的缺乏大大增加了对其病毒防治的难度。由于疾病频发和专用防治药物的匮乏,导致各种消毒、防治药物的滥用;养殖生态系统遭到持续破坏,海洋生态平衡和水产养殖业的可持续发展受到严重威胁^[2]。鉴于我国对虾养殖面积和产量的逐年递增,寻求高效、特异的抗病毒方法成为确保对虾养殖业健康发展的关键。

RNA 干扰(RNA interference, RNAi)是在真核细胞中由双链 RNA(dsRNA)诱导的特异性 RNA 降解过程,在细胞水平和动植物体内均表现出高效特异的抗病毒能力^[3-5]。近几年的相关研究证明, RNAi 在水生无脊椎动物体内也能激发高效的抗病毒效应^[6-7]。但是,由于水生无脊椎动物的特殊性,相关研究仍然存在较多需要探究和发展的空

间^[6-8]。鉴于以上原因和对虾病害现状,笔者也于近期在凡纳滨对虾体内实施了 RNAi 技术抑制 WSSV 增殖的研究,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 WSSV 分离纯化与感染浓度的确定

将人工接种 WSSV 死亡的凡纳滨对虾去除附肢、头胸甲和肝胰腺并称质量,用 0.01 mol/L PBS (pH 7.4)按每 10 mL 1 g 的量稀释并匀浆,匀浆液于 4℃ 4 000 r/min 离心 20 min,上清液用 0.45 μm 滤膜过滤除菌并分装成病毒保存液,-86℃冻存备用。同时参照 Robalino 等^[8]的方法,以 7 d 内对虾全部死亡的组的最大病毒稀释度作为 RNAi 用病毒感染液使用剂量。

1.2 shRNA 的设计与构建

设计了 5 个靶向 WSSV 基因组(GenBank 登录号:AF369029)的小干扰 RNA (small interfering, siRNA),对应序列见表 1。所有 siRNA 均合成发卡型 shRNA(晶赛)。

1.3 RNAi 试验

体质量 7~9 g、PCR 检测阴性的健康凡纳滨对虾在室内池塘暂养 1 周后,随机分成不同 shRNA 干扰组,阳性对照组和阴性对照组各 1 个,分别暂养

收稿日期:2010-06-08

基金项目:中国博士后科学基金项目(20080440654)、中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(2007M25)

周俊芳,助理研究员.研究方向:水产动物病害与防治. E-mail: junfangzhou@yahoo. com

通讯作者:房文红,博士,研究员.研究方向:水产动物病害与防治. E-mail: whfang06@yahoo. com. cn

表 1 靶向 WSSV 基因组不同位点的 shRNA 序列

Table 1 shRNA sequences targeting different sites in WSSV genome

shRNA	序列 Sequence	靶基因 Target gene
RR9	GGACCAACAAC- CCAAGAA	核糖核酸还原酶 Ribonucleotide reductase
RR1	GACGGTCCATGAT- GTGAGA	核糖核酸还原酶 Ribonucleotide reductase
DP1	GGCTCATGAAACT- GCCTAT	DNA 聚合酶 DNA polymerase
DP2	GACACTCTATTGC- CACAGA	DNA 聚合酶 DNA polymerase
PK1	GGCAATTGCTGCT- TCTTGA	蛋白激酶 Protein kinase

于 90 L 的白色玻璃纤维桶中。用胰岛素注射器分别于干扰组凡纳滨对虾第四腹节的一侧肌肉注射 shRNA 50 μL /只(25 μg), 4 h 后于对侧肌肉注射 WSSV 感染液 50 μL /只;与此同时,阳性对照组分别每只注射 50 μL 0.01 mol/L PBS(pH 7.4)和 50 μL WSSV 感染液,而阴性对照组 2 次均注射 50 μL /只 0.01 mol/L PBS(pH 7.4)。对虾养殖水温控制在 27~28 $^{\circ}\text{C}$,每天换水 1/2,24 h 持续充气。

1.4 RNAi 抗 WSSV 效应分析

1) 对虾死亡率观察。对虾随机分成 5 个 shRNA(RR9、RR1、DP1、DP2 和 PK1)干扰组,1 个阳性对照组(W),以及 1 个阴性对照组(Z),每组 9 只对虾,按本文“1.3”方法实施 RNAi 试验。每天观察 4 次,及时检出死亡和濒死对虾,记录死亡数,并且以 WSSV 特异 PCR 引物检测死亡对虾,持续观察 7 d。试验重复 3 次。

2) PCR 检测 WSSV。对虾随机分成 5 个 shRNA 干扰组和 W、Z 2 个对照组,每组 15 只对虾,按本文“1.3”方法实施 RNAi 试验。WSSV 感染 72 h 后,每组随机采集 4 只对虾分别提取总 DNA 并等量混匀,半定量 PCR 法检测分析各组采集对虾的平均 WSSV 感染量。

所有待检对虾均剪取背部肌肉,按 Tiangen 组织基因组 DNA 提取试剂盒说明抽提总 DNA。参考 WSSV 和凡纳滨对虾基因组分别设计 2 对引物 P1、P2^[9] 和 P3、P4。其中, P1(5'-GTGACCAAGACCATCGAA-3')和 P2(5'-CCACACCTTGAATGTTCCC-3')扩增 WSSV 囊膜蛋白 VP28 基因片段;P3(5'-GATCGAGTGGAGGGCAAGT-3')和 P4(5'-ACGACCATTCTGGGCTGTA-3')用于扩增对虾 18S rDNA 基因片段。产物长度应分别为 280 和 282 bp。根据宝生物 Ex taq HS Premix 试

剂盒说明书分别扩增上述片段,反应条件为 94 $^{\circ}\text{C}$ 3 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,55 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,共 30 个循环;最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 5 min。PCR 产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳后检测。

2 结果与分析

2.1 WSSV 的感染浓度

为了标准化每次 RNAi 试验的 WSSV 感染量,本研究根据 Robalino 等^[8]的方法确定 RNAi 试验用病毒感染剂量为 1×10^{-3} 倍的 WSSV 保存液。

2.2 不同 shRNA 降低对虾死亡率的效应

WSSV 感染 7 d 后,对各组对虾的累积死亡率进行分析比较发现,除阴性对照组外,各组都存在对虾死亡现象。但是,如图 1 所示,各 shRNA 干扰组的对虾累积死亡率均低于阳性对照组(W),显示不同 shRNA 均有保护对虾抵抗 WSSV 感染的作用,其保护对虾抵抗 WSSV 侵袭的能力大小依次为:RR9>DP1>DP2>RR1>PK1。

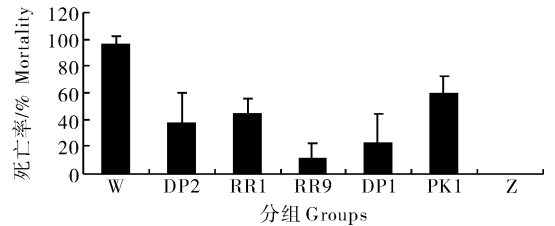


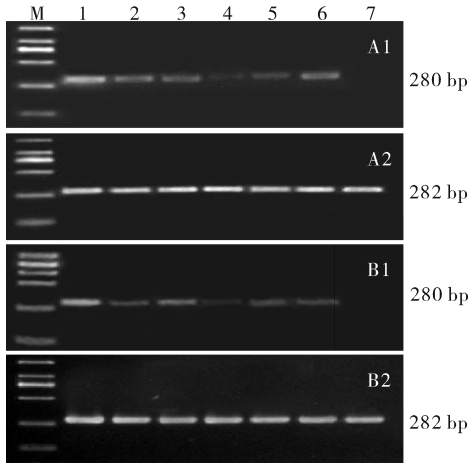
图 1 各组 WSSV 感染对虾的死亡率
Fig. 1 The mortality of WSSV-infected *L. vannamei* shrimp in every group

2.3 不同 shRNA 抑制 WSSV 增殖的效应分析

WSSV 感染 72 h 后,对各组对虾体内携带的 WSSV 进行半定量分析。结果显示(图 2),各 shRNA 干扰组对虾体内 WSSV 的平均感染量均低于 W 组,说明凡纳滨对虾体内 WSSV 的增殖被 shRNA 不同程度抑制。尤其是 RR9 组与 W 组的对虾病毒携带量差异显著,显示了 shRNA RR9 对 WSSV 增殖的高效抑制作用。以上结果与对虾死亡率试验基本一致,证实导入 shRNA 后对虾死亡率降低的主要原因是序列特异的 shRNA 在对虾体内激发了 RNAi 抗 WSSV 的通路。

3 讨论

对虾白斑综合征病毒(WSSV)宿主广泛、感染对虾病死率极高,自 20 世纪 90 年代暴发以来,几乎



M. Marker; 1~7. W, DP2, RR1, RR9, DP1, PK1 和 Z 组 The group of W, DP2, RR1, RR9, DP1, PK1 and Z; A1. 各组对虾平均 WSSV 感染量 The average quantity of WSSV carried by the shrimp in every group; A2. 各组对虾平均 18S rDNA 携带量 (内标) The average quantity of 18S rDNA in shrimp in the same group (internal control); B1, B2. 分别为重复试验的结果 Results of the repeated trial.

图 2 不同处理组对虾体内 WSSV 的平均感染量

Fig.2 Relative quantity of WSSV carried by the *L. vannamei* shrimp in different groups

每年都给我我国对虾养殖业带来巨大经济损失。由于对虾属于无脊椎动物,缺乏特异的适应性免疫机制,病毒防治不能沿用在脊椎动物行之有效的疫苗措施,因此,寻求抗体以外的高效防治策略一直是 WSSV 防治研究的重点。在此之前,国内外已经实施了一些 RNAi 技术抗 WSSV 复制的相关研究探索^[6-8]。Wu 等^[7]分别设计了靶向 WSSV 复制相关酶和病毒组装相关结构蛋白基因的 siRNA,通过一系列筛选试验后确认,靶向复制相关酶的 siRNA 表现出更好的抗 WSSV 攻击的能力,对虾成活率普遍高于结构蛋白基因干扰组,这与我们先前在脊椎动物体内实施 RNAi 试验的结论一致^[4-5]。鉴于对虾白斑综合征病毒基因组巨大,根据传统 siRNA 设计原则筛选靶向全病毒基因组的所有可能 siRNA 将不利于高效筛选,因此本研究中我们只设计了 5 个靶向病毒复制相关酶的小 RNA,以期快速筛选出高效抗病毒分子。正如预期的一样,病毒 PCR 检测和对虾死亡率分析结果均表明,这 5 个 shRNAs 可同时降低对虾体内 WSSV 感染量和对虾死亡率,尤其是靶向病毒核糖核酸还原酶的 shRNA RR9 的保护效果最为明显。综合分析显示,对虾死亡率的降低与对虾体内病毒 DNA 的减少成正相关,说明是

shRNA 诱导的特异 RNAi 不同程度地抑制了 WSSV 的增殖,减轻了 WSSV 对对虾的攻击,降低了对虾死亡率。

已有报道指出,在无脊椎动物体内也存在着类似脊椎动物的病毒特异的小 RNA 干扰机制^[6-7,10],这与本文的结论一致,而与部分研究人员认为的短序列无效^[8]的结论相矛盾。仔细分析国内外以及我们的各种多序列筛选的试验结果发现,并非所有根据 RNAi 原则设计的序列均能有效抑制目的病毒的复制^[4,7],这与序列本身的碱基组成和 mRNA 的二级结构等均有关,因此,某几个序列低效甚至无效并不能代表所有序列的结果。当然,这里是否还存在某些来自无脊椎动物的原因还有待探索。

当然,我们研究的资料以及相关研究报道^[11]也表明,由于病毒感染对虾后增殖迅速、致死率高,目前 RNAi 技术作为疾病暴发后的治疗措施,效果明显弱于预防性应用。因此,一方面,对于 WSSV 的防治应重点在于预防和及早治疗;另一方面,也提示我们 WSSV 相关 RNAi 研究仍需加强和深入。为此,我们将在后续研究中选定具有高效抗病毒能力的 RR9 构建成抗病毒表达载体,为把 RNAi 技术尽早应用于水产实践做进一步优化和探索。

参 考 文 献

- [1] 蔡生力,黄健,王崇明,等. 1993-1994 年对虾暴发病的流行病学研究[J]. 水产学报,1995,19(2):112-117.
- [2] LIGHTNER D V. A handbook of pathology and diagnostic procedures for diseases of cultured penaeid shrimp [M]. Section 3: Viruses. Baton Rouge, Louisiana, USA: World Aquaculture Society, 1996.
- [3] 刘学芹,曹胜波,李小明,等. siRNA 对乙型脑炎病毒复制的抑制效果[J]. 华中农业大学学报,2009,28(2):188-192.
- [4] ZHOU J F, HUA X G, CUI L, et al. Effective inhibition of porcine transmissible gastroenteritis virus replication in ST cells by shRNAs targeting RNA-dependent RNA polymerase gene [J]. Antiviral Res, 2007, 74(1): 36-42.
- [5] ZHOU J F, HUANG F, HUA X G, et al. Inhibition of porcine transmissible gastroenteritis virus (TGEV) replication in minipigs by shRNA [J]. Virus Research, 2010, 149: 51-55.
- [6] XU J Y, HAN F, ZHANG X B. Silencing shrimp white spot syndrome virus (WSSV) genes by siRNA [J]. Antiviral Research, 2007, 73: 126-131.
- [7] WU Y, LU L, YANG L S, et al. Inhibition of white spot syndrome virus in *Litopenaeus vannamei* shrimp by sequence-specific siRNA [J]. Aquaculture, 2007, 271: 21-30.
- [8] ROBALINO J, BARTLETT T, SHEPARD E, et al. Double-

- stranded RNA induces sequence-specific antiviral silencing in addition to nonspecific immunity in a marine shrimp: convergence of RNA interference and innate immunity in the invertebrate antiviral response? [J]. *J Virol*, 2005, 79 (21): 13561-13571.
- [9] REYES A, SALAZAR M, GRANJA C. Temperature modifies gene expression in subcuticular epithelial cells of white spot syndrome virus-infected *Litopenaeus vannamei* [J]. *Dev Comp Immunol*, 2007, 31(1): 23-29.
- [10] 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: 494-498.
- [11] TIRASOPHON W, YODMUANG S, CHINNIRUNVONG W, et al. Therapeutic inhibition of yellow head virus multiplication in infected shrimps by YHV-protease dsRNA [J]. *Antiviral Res*, 2007, 74(2): 150-155.

Effect of the viral interference effects of shRNAs targeting different sites in white spot syndrome virus genome

ZHOU Jun-fang¹ YANG Xian-le² WAN Xi-he³ SHEN Hui³ FANG Wen-hong¹

1. East China Sea Fisheries Research Institute Chinese Academy of Fishery Sciences/Key Laboratory of Marine and Estuarine Fisheries Resources and Ecology, Ministry of Agriculture, Shanghai 200090, China;
2. Aquatic Pathogen Collection Center of Ministry of Agriculture, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;
3. Jiangsu Institute of Marine Fisheries, Nantong 226007, China

Abstract Five shRNAs targeting different sites in white spot syndrome virus (WSSV) genome, respectively designated as RR9, RR1, DP1, DP2 and PK1, were designed and constructed. Followed by WSSV infection, each of which was introduced into *Litopenaeus vannamei* shrimp by injection. The result demonstrated that both the proliferation of WSSV *in vivo* and the shrimp mortality were decreased in different degrees in all of the shRNAs-treated groups. Based on the analysis, the RR9 targeting WSSV ribonucleotide reductase gene had the best protective effect against WSSV, which would be used for a further research on anti-WSSV by RNAi.

Key words *Litopenaeus vannamei*; white spot syndrome virus (WSSV); RNA interference (RNAi)

(责任编辑:边书京)