



Y3498252



河北农业大学

HEBEI AGRICULTURAL UNIVERSITY

全日制硕士专业学位（毕业）论文

小干扰 RNA 抑制猪流行性腹泻病毒  
在 Vero 细胞内的复制

学位申请人：牛 山

指导教师：范京惠 副教授

学位名称：兽医硕士

研究领域：不区分研究领域

授予单位：河北农业大学

答辩日期：二〇一八年六月三日

类 号： S855.3  
密 级： 公 开

单位代码： 10086  
学 号： 20169200797



## 小干扰 RNA 抑制猪流行性腹泻病毒 在 Vero 细胞内的复制

Inhibitory effects of small interfering RNAs on replication  
of porcine epidemic diarrhea virus in Vero cells

学位申请人：牛 山

指导教师：范京惠 副教授

学位名称：兽医硕士

研究领域：不区分研究领域

授予单位：河北农业大学

答辩日期：二〇一八年六月三日

## 独创性声明

本人声明所呈交的学位论文是本人在导师指导下进行的研究工作及取得的研究成果。据我所知，除了文中特别加以标注和致谢的地方外，论文中不包含其他人已经发表或撰写过的研究成果，也不包含为获得河北农业大学或其他教育机构的学位或证书而使用过的材料。与我一同工作的同志对本研究所做的任何贡献均已在论文中作了明确的说明并表示谢意。

学位论文作者签名：牛山 签字日期：2018 年 6 月 4 日

## 学位论文版权使用授权书

本学位论文作者完全了解河北农业大学有关保留、使用学位论文的规定，有权保留并向国家有关部门或机构送交论文的复印件和磁盘，允许论文被查阅和借阅。本人授权河北农业大学可以将学位论文的全部或部分内容编入有关数据库进行检索，可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存、汇编学位论文。

(保密的学位论文在解密后适用本授权书)

学位论文作者签名：牛山 导师签名：范京惠

签字日期：2018 年 6 月 4 日 签字日期：2018 年 6 月 4 日

学位论文作者毕业后去向：

工作单位：

电话：

通讯地址：

邮编：

## 摘要

猪流行性腹泻(Porcine epidemic diarrhea PED)是由猪流行性腹泻病毒(Porcine epidemic diarrhea virus PEDV)引起一类急性、高度接触性传染病。猪感染 PEDV 可引起肠道疾病,临床症状主要是仔猪的腹泻、呕吐和脱水。目前,该病在猪场频频暴发给养猪业造成了巨大的经济损失,因此研究预防和治疗 PED 的新制剂对于 PED 的防控具有重要的科学意义。RNA 干扰(RNA interference, RNAi)现象是自然界中机体的一种防御机制,它也是一种强大的基因沉默技术。RNAi 是指生物体外源或者内源 dsRNA(double-stranded RNA)介导产生特异性的转录后基因沉默的现象, RNA 诱导的沉默复合物(RNA-induced silencing complex, RTSC)降解靶 mRNA。RNAi 作为一种基因阻断技术,它凭借着灵敏特异性的优点广泛应用在基因功能研究及人类疾病治疗等领域。本研究拟通过 RNA 干扰技术来抑制猪流行性腹泻病毒在 Vero 细胞内的复制作用。

PEDV M 和 N 基因在不同毒株之间保守性都很高。其中 M 蛋白是病毒囊膜的主要组成成分,是跨膜糖蛋白,在病毒装配过程中起到重要作用, N 蛋白与病毒基因组 RNA 构成螺旋核衣壳结构,在病毒进入细胞过程中起到很大的作用,同时也参与病毒颗粒组装和释放过程。M 和 N 基因都是 PEDV 基因组中的重要基因,均参与病毒的复制。本研究以 PEDV 的 M 和 N 基因为靶基因,筛选出 2 个 small interfering RNAs (siRNA)序列,然后设计 1 个与 PEDV 基因组没有同源性的 siRNA 序列作为阴性对照。继而合成编码三对 shRNA 型的核苷酸链。将单链核苷酸经过退火形成双链,分别将 3 对双链 DNA 连接克隆至 pGenesil-1 质粒载体的启动子下游,经过测序成功构建了针对 PEDV 特异的 pGenesil-M 和 pGenesil-N 2 个 siRNA 表达质粒和 1 个阴性对照质粒 pGenesil-NC。

在脂质体介导下将构成的 3 种质粒分别转染到 Vero 细胞,经 G418 筛选及 PCR 鉴定后,最终建立 3 个阳性重组细胞系。不同细胞系接种 PEDV 48h 后,检测病毒的 TCID<sub>50</sub> 观察病毒滴度的变化,应用 TaqMan 实时荧光定量 PCR 方法测定病毒的 mRNA 水平,Western-blotting 检测蛋白合成表达情况。在转染特异性 pGenesil-M 和 pGenesil-N 质粒的 Vero 细胞中,检测其病毒滴度、mRNA 和蛋白水平均低于转染 pGenesil-NC 的阴性对照和未转染质粒的阳性对照。PEDV 特异性 pGenesil-M 和 pGenesil-N 表达质粒能够不同程度地抑制病毒在 Vero 细胞中 mRNA 水平及 M、N 蛋白的合成,且 pGenesil-N 质粒的抑制作用显著高于 pGenesil-M 质粒。综上所述,本研究证明靶向 PEDV 的 M 和 N 基因的 siRNA 能够有效抑制 PEDV 在 Vero 细胞内的增殖。靶位不同的 siRNA 其抑制效果存在一定的差异。这些结果为研发防治 PED 的新制剂提供了科学依据。

**关键词:** 猪流行性腹泻病毒; RNA 干扰; 小干扰 RNA; Vero 细胞; 抑制作用

## **Inhibitory effects of small interfering RNAs on replication of porcine epidemic diarrhea virus in Vero cells**

Author: Niu Shan

Advisor: Associate Professor Fan Jinghui

Major: Veterinary Medicine

### **Abstract**

Porcine epidemic diarrhea (PED) is a highly contagious intestinal infectious disease of swine, caused by the porcine epidemic diarrhea virus (PEDV). PEDV can cause enteric disease with clinical signs including diarrhea, vomiting and dehydration in neonatal piglets. At present, the outbreak of the disease in pig farms has caused huge economic losses to the pig industry. Therefore, the study of new preparations for the prevention and treatment of PED has important scientific significance for the prevention and control of PED. The phenomenon of RNA interference (RNAi) is a defense mechanism in natural. This is a powerful technology of gene silencing. RNAi is a post transcriptional gene silencing mechanism mediated by exogenous or endogenous dsRNA. RTSC degrades the target mRNA and silences it. As a gene blocking technology, RNAi is widely used for gene function research and human disease treatment due to its sensitivity and specificity. In this study, inhibition of porcine epidemic diarrhea virus replication in Vero cells using RNA interference technology.

The PEDV M and N genes are highly conserved among different strains. M protein is the main component of the viral envelope and is a transmembrane glycoprotein. The M protein plays an important role in the viral assembly process. The N protein forms a helical nucleocapsid with genomic RNA. N protein plays a very important role in the process of virus entering the cell, and N protein also participates in the assembly and release of virus particles. Both M and N genes are important genes in the PEDV genome and are involved in the replication of the virus. In this study, two siRNA sequences were screened from the M and N genes of PEDV respectively. Then, a siRNA sequence that was non-specific to the PEDV genome was designed as a negative control. After that, three pairs of shRNA-type nucleotide chains were synthesized. Single-stranded nucleotides were annealed to make the double-strands, respectively. Three pairs of double-stranded DNA strands were cloned into the downstream of the promoter of the pGenesil-1 plasmid. After sequencing, two PEDV-specific siRNA expression plasmids (pGenesil-M and pGenesil-N) and one negative control plasmid (pGenesil-NC) were successfully constructed.

The constructed three plasmids were respectively transfected into Vero cells by liposome. After selection with G418 and PCR identification, three cell lines of correctly

recombinant was screened. Different cell lines were inoculated with PEDV for 48 h. The viral infection titers were determined by TCID<sub>50</sub>. Expression of PEDV mRNA and protein were detected by TaqMan Real-time quantitative PCR and Western-blotting, respectively. As a result, in the Vero cells of the PEDV-specific pGenesil-M and pGenesil-N, the virus titer, mRNA, and protein levels were all lower than those of the negative control (pGenesil-NC) and positive control of the non-transfected plasmid. The PEDV-specific pGenesil-M and pGenesil-N expression plasmids could inhibit the synthesis of PEDV mRNA and the M and N protein in Vero cell in various degrees. Especially, the inhibitory effect of pGenesil-N plasmid was significantly higher than pGenesil-M plasmids. In conclusion, this study demonstrated that siRNA targeting the M and N genes of PEDV can inhibit the replication of PEDV in Vero cells. Different siRNAs have different inhibitory effects. These results provide scientific basis for the development of new biologics for the prevention and treatment of PEDV.

**Key words:** porcine epidemic diarrhea virus; RNA interference; small interfering RNA; Vero cell; inhibiting effect

## 缩略词表

### Abbreviations and acronyms

缩略词	英文全称	中文全称
RNAi	RNA interference	RNA 干扰
SiRNA	Small interfering RNA	小分子干扰 RNA
ShRNA	Short hairpin RNA	短发夹 RNA
DNTPs	Deoxyribonucleoside triphosphate	三磷酸脱氧核苷
PEDV	Porcine epidemic diarrhea virus	猪流行性腹泻病毒
EB	Ethylene bromide	溴化乙锭
DsRNA	Double stranded RNA	双链 RNA
SsRNA	Single stranded RNA	单链 RNA
DEPC	Diethylpyrocarbonate	焦碳酸二乙酸
Kan	Kanamycin	卡那霉素
LB	Luria-Bertani medium	LB 培养基
EDTA	Ethylene diamine tetra acetatic acid	乙二胺四乙酸
Kb	Kilo base pair	千碱基对
Rpm	Revolutions per minute	转每分钟
D	Day	天
NSP	Nonstructural protein	非结构蛋白
H	Hour	小时
Min	Minute	分钟
S	Second	秒
μL	Microliter	微升
ORF	Open reading frame	开放阅读框
Bp	Base pair	碱基对
L	Liter	升
Mg	Milligram	毫克
OD	Optical density	光密度
ML	Milliliter	毫升
CDNA	Deoxyribonucleic acid	脱氧核糖核酸
Nt	Nucleotide	核苷酸
μg	microgram	微克
RT	Reverse transcription	逆转录
Real-time FQ-PCR	Real-time fluorescent quantitative PCR	实时荧光定量 PCR
RNA	Ribonucleic acid	核糖核酸
RT-PCR	Reverse transcription polymerase chain reaction	反转录聚合酶链式反应
NA	Neutralizing antibodies	中和抗体
RNasin	Ribonuclease inhibitor	核糖核酸酶抑制剂
PAGE	Polyacrylamide gel electrophoresis	聚丙烯酰胺凝胶电泳
PCR	Polymerase chain reaction	聚合酶链式反应
PBS	Phosphate buffered saline	磷酸盐缓冲液

TCID <sub>50</sub>	Tissue culture infective dose	半数组织培养感染量
SDS	Sodium dodecyl sulfate	十二烷基硫酸钠
RISC	RNA-induced silencing complex RNA	RNA 诱导沉默复合体
DAB	Diaminobenzidin	二氨基联苯胺

---

# 目录

1 引言.....	1
1.1 猪流行性腹泻病毒概述.....	1
1.1.1 PED 的流行病学.....	1
1.1.2 PED 的临床症状及病理变化.....	2
1.1.3 PEDV 的病原学.....	2
1.1.4 PEDV 的基因组结构及编码蛋白.....	2
1.1.5 PEDV 的诊断.....	4
1.1.6 PED 的疫苗研究情况.....	4
1.2 RNA 干扰的研究进展.....	5
1.2.1 RNAi 的研究历史.....	5
1.2.2 RNA 干扰的作用机制.....	5
1.2.3 RNAi 技术的应用.....	6
1.3 研究目的和意义.....	7
2 材料与方法.....	9
2.1 细胞与病毒.....	9
2.2 主要试验仪器.....	9
2.3 试验所需主要试剂.....	9
2.4 主要试剂的配置.....	10
2.4.1 RNA 提取所使用的试剂.....	10
2.4.2 琼脂糖凝胶电泳实验使用的溶液.....	10
2.4.3 培养基的配置.....	10
2.4.4 细胞培养时所使用的溶液.....	11
2.4.5 Western-Blotting 所使用的溶液.....	11
2.5 猪流行性腹泻病毒的增殖.....	11
2.5.1 Vero 细胞的复苏.....	11
2.5.2 PEDV 的增殖传代.....	11
2.5.3 PEDV 细胞毒的鉴定.....	12
2.6 设计 siRNA 序列及构建 pGenesil-shRNA 质粒.....	13
2.6.1 选择设计 siRNA 序列.....	13
2.6.2 编码 shRNA 型 DNA 单链的设计与合成.....	13
2.6.3 表达质粒 pGenesil-shRNA 的构建.....	14
2.7 重组质粒 pGenesil-shRNA 瞬时转染 Vero 细胞及 G418 筛选细胞系.....	16
2.7.1 质粒瞬时转染 Vero 细胞.....	16
2.7.2 利用 G418 筛选高效稳定表达质粒的 Vero 细胞系.....	16
2.8 表达不同质粒的 Vero 细胞系感染 PEDV.....	17

2.9 不同样品中 PEDV 感染滴度的测定.....	18
2.10 应用 TaqMan 实时荧光定量 PCR 方法检测抑制效果.....	18
2.10.1 PEDV TaqMan 实时荧光定量 PCR 方法的建立.....	18
2.10.2 管家基因 $\beta$ -actin TaqMan 实时荧光定量 PCR 方法的建立.....	19
2.10.3 应用 TaqMan 实时荧光定量 PCR 方法检测.....	21
2.11 病毒蛋白 Western-blotting 检测.....	21
3 结果.....	22
3.1 PEDV 细胞毒 PCR 检测结果.....	22
3.2 构建 pGenesil-shRNA 阳性重组质粒的酶切鉴定.....	22
3.3 重组质粒 pGenesil-shRNA 瞬时转染 Vero 细胞及 G418 筛选细胞系.....	23
3.3.1 重组质粒的瞬时转染结果.....	23
3.3.2 G418 筛选细胞系.....	24
3.4 不同样品中病毒感染滴度测定结果.....	26
3.5 应用 TaqMan 实时荧光定量 PCR 对 RNA 干扰效果的检测结果.....	27
3.5.1 PEDV TaqMan 实时荧光定量 PCR 标准曲线的建立结果.....	27
3.5.2 管家基因 $\beta$ -actin TaqMan 实时荧光定量 PCR 标准曲线的建立结果.....	28
3.5.3 TaqMan 实时荧光定量 PCR 检测结果.....	29
3.6 针对 PEDV M 和 N 蛋白表达检测结果.....	29
4 讨论.....	31
4.1 PEDV M 和 N 基因的 siRNA 筛选及表达质粒的构建.....	31
4.2 不同重组质粒转染 Vero 细胞及细胞系的建立.....	32
4.3 质粒表达的 siRNA 对 PEDV 在 Vero 细胞内复制的抑制效应.....	32
5 结论.....	33
参考文献.....	34
作者简介.....	42
致谢.....	43

# 1 引言

## 1.1 猪流行性腹泻病毒概述

猪流行性腹泻 (Porcine epidemic diarrhea, PED) 是一种高度接触性肠道传染病, 是由冠状病毒家族中的猪流行性腹泻病毒 (Porcine epidemic diarrhea virus, PEDV) 感染之后, 引起猪的临床症状主要有腹泻、呕吐和脱水, 该病毒对初生仔猪的危害最大可引起高致死率<sup>[1,2]</sup>。该病于 1971 年首次在英格兰被发现<sup>[3]</sup>, 当时该病除了 4-5 周以下哺乳仔猪不发病, 其他都与猪传染性胃肠炎等肠道腹泻疾病相似, 随后本病蔓延至欧洲其他国家<sup>[4,5]</sup>。1977 年比利时的 Debouck 和 Pensaert 等人通过电镜从病料中发现与猪传染性胃肠炎病毒无关的冠状病毒样粒子, 并命名为类冠状病毒 CV777 株<sup>[4]</sup>。2010 年全国各地暴发了猪流行性腹泻, 集中表现在仔猪腹泻、机体脱水死亡, 死亡率达到了 70%~100%, 造成了巨大的经济损失<sup>[6]</sup>。目前 PED 已经成为了我国最常见的猪传染病之一<sup>[7]</sup>。

### 1.1.1 PED 的流行病学

PED 无明显季节性, 主要通过粪-口途径传播。被病毒污染的水源、饲料、车辆或者未消毒干净的栏舍只要被健康猪只直接或间接地接触都可感染 PEDV<sup>[8]</sup>, 传播 PEDV 的方式还包括气溶胶传播<sup>[9]</sup>。有研究学者报道, 在感染该病的母猪乳汁中能检测到 PEDV<sup>[10,11]</sup>, 说明该病毒可以通过乳汁感染仔猪。

1982 年 PED 在亚洲首次报道, 并对亚洲养猪业的影响日益严重<sup>[12]</sup>。1984 年, 宣华等最先证实在国内某养猪场的猪只存在 PED 的感染<sup>[13]</sup>。在 1984 年到 2010 年间, 国内大部分猪场为预防该病毒的流行进行疫苗免疫接种, 才使得呈现零星发病和小规模发病, 没有发生大流行。2010 年冬季, PEDV 变异株开始在我国南方部分猪场流行, 蔓延至周围乃至全国各地, 一周龄以内的仔猪几乎 100% 死亡, 当时给畜禽业带来非常大的经济损失<sup>[10]</sup>。

2010 年以后, 我国研究学者对国内 PED 的分子流行病学进行大规模的调研, 刘云波通过对全国 13 个省市采集的 2011-2012 年腹泻猪的肠道粪便检测, 发现这些检测腹泻样品中 PEDV 的阳性率为 24.49 %<sup>[14]</sup>。在 2011-2014 这四年间进行了大规模的腹泻样品进行检查, 最终国内 PEDV 阳性率高达 61.10-78.49 % , 表现出腹泻临床症状的猪场阳性率高达 71.43-83.47 % , 比 TGEV、PRV 等引起腹泻的病毒阳性率都要高, 说明我国的猪群中该病毒已经出现流行, 并且在猪病毒性腹泻中 PEDV 已成为主要病原<sup>[15]</sup>。

美国在 2013 年 4 月首次关于出现 PED 流行的报道, 并在一年内广泛传播到美洲一些国家, 如加拿大、墨西哥<sup>[16,17]</sup>, 之后 PED 又传播到亚洲的韩国和中国台湾<sup>[18,19]</sup>。相关研究员通过序列分析对比, 最终得出在遗传学上讲 2013 年美国暴发的 PEDV 毒株和中国 2012 年的流行毒株相近<sup>[20]</sup>。韩国和中国台湾流行的 PEDV 毒株与美国流行毒株相近<sup>[18]</sup>。2014 年, 欧洲一些国家德国、意大利、比利时再次暴发 PED, 还有荷兰、法国、葡萄牙和乌克兰等也暴发 PED<sup>[21-26]</sup>。

### 1.1.2 PEDV的临床症状及病理变化

所有年龄阶段的猪只均能感染 PEDV 并发病，区别是症状和死亡率不同。其中 1 周龄以内的仔猪临床症状一般会出现水样腹泻、呕吐、最终引起脱水导致死亡，死亡率高达 100%；该病毒感染年龄稍大的断奶仔猪主要表现为厌食，还会出现呕吐症状，但是死亡率只有 1%-3%，远比 7 日龄以内的仔猪死亡率低；PEDV 感染成年种猪或育肥猪后表现多为厌食，严重感染的猪只会伴随水样腹泻，死亡数量很少。猪被 PEDV 感染后，主要破坏其消化系统，所有病变主要集中在小肠段，因为病毒在小肠粘膜上皮细胞内定植和大量复制，剖检可见小肠黏膜萎缩脱落，PEDV 严重感染的猪只小肠肠壁会充血、变薄、透明，小肠内存有一定的淡黄色液体，其他组织器官病变不明显<sup>[27]</sup>。

### 1.1.3 PEDV的病原学

PEDV 在分类上属于尼多病毒目（Nidovirales）、冠状病毒科（Coronaviridae）、 $\alpha$ -冠状病毒属（Coronavirus）。该病毒之所以称为冠状病毒是因为它多为球形，具有囊膜，呈皇冠状病毒粒子。PEDV 在 4℃ 或 37℃ 温度下 pH 6.5~7.5 能稳定存活，外界环境对该病毒影响较大，60℃ 温度下，半小时以上病毒就会失去感染活力，并对乙醚和氯仿等有机溶剂敏感<sup>[28]</sup>。

### 1.1.4 PEDV的基因组结构及编码蛋白

PEDV 单股正链 RNA 病毒，基因组全长约 28 kb<sup>[29]</sup>。PEDV 基因组结构如图 1-1 所示<sup>[30]</sup>，包含 7 个开放阅读框（open reading frames, ORFs）。ORF1a 和 ORF1b 较大位于 5'UTR 下游 2/3 基因组，剩下的 1/3 基因组编码 4 个结构蛋白分别是 S 蛋白、E 蛋白、M 蛋白、N 蛋白其中还包含一个 ORF3 非结构蛋白<sup>[31]</sup>。研究表明，在冠状病毒家族中的 5'UTR 还包含一个短 ORF，这个短的 ORF 编码 3-11 个氨基酸不等，且不同冠状病毒之间该序列与氨基酸序列存在差异，其作用是增强或抑制后面 ORF 的翻译<sup>[32]</sup>。

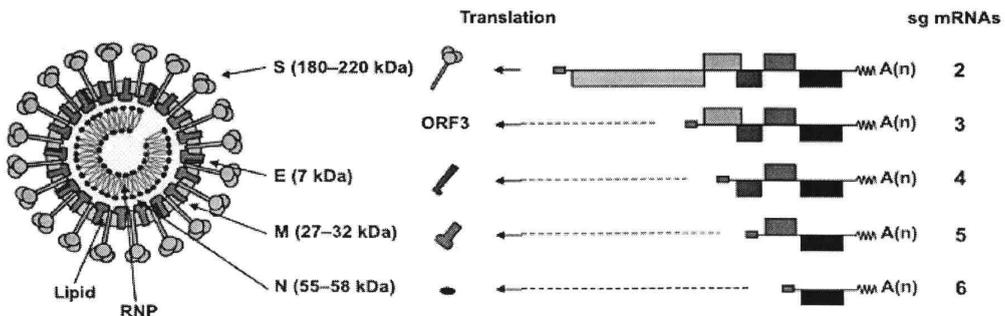


图 1-1 PEDV 基因组结构及模式图

Fig. 1-1 Schematic representations of PEDV genome organization and virion structure

ORF1 基因大约占据了整个 PEDV 基因组的 2/3, 在病毒基因组的复制、转录方面以及病毒形成多聚蛋白的过程中, ORF1 都发挥了很大的作用。ORF1 基因组包括 ORF1a 和 ORF1b, 在这两个基因组的重叠部分包含一个假结结构 (pseudoknot structure), 它的作用是诱导核糖体在结构上面发生改变, 使滑动序列处发生移码突变, 之后产生一个多聚蛋白 pp1ab。这个重叠部分还包含一个“滑动序列”(UUUAAAAC)<sup>[33, 34]</sup>。pp1a 和 pp1b 多聚蛋白经过加工后, 就可以形成 Nsp1~Nsp16 共 16 个非结构蛋白<sup>[35]</sup>。

S 蛋白属于 I 型膜糖蛋白是 PEDV 重要抗原蛋白之一, 共编码氨基酸残基 1383 个, 毒株不同略有差异。S 蛋白的功能是识别受体表面分子, 然后使 PEDV 顺利进入宿主细胞产生抗体。PEDV 与宿主发生结合的过程中, S 蛋白会被水解成为 N 端 S1 和 C 端 S2 两段, S1 功能独特占据基因组的前部分 (1~789aa) 和 S2 占据了基因组的后半部分 (790~1383aa), 它们的作用是融合病毒囊膜与宿主细胞膜, 从而达到将病毒的核酸顺利地释放并进入细胞质的目的<sup>[36]</sup>。不同毒株之间变异较大是 S1 区域, 所以该区域在疫苗有效性及其开发方面的研究表现的非常重要, 是 S 蛋白的主要功能区域, 发挥着病毒与受体结合的功能; 跨膜的 S2 区域相对 S1 区域来说比较保守, 主要发挥膜融合功能<sup>[37]</sup>。S 蛋白包含两个序列分别是 COE 序列和 S1D 序列, 其中 COE 序列位于 499aa~638aa, S1D 序列位于 636aa~789aa。其中 COE 序列上有中和抗体表位, S1D 序列中有一个线性抗原表位和两个 B 细胞抗原表位, 其中线性抗原表位位于 697~742aa, B 细胞抗原表位分别位于 744~759aa 和 756~771aa<sup>[38, 39]</sup>, 作用是诱导产生中和性抗体<sup>[40, 41]</sup>。技术人员在研制亚单位疫苗和基因工程疫苗时常用于 S 基因<sup>[42-44]</sup>。

ORF3 基因位于 S、E 基因之间, 没有经过任何致弱处理的原代 PEDV 中, ORF3 包含 675 个核苷酸, 它一共编码氨基酸残基 224 个。在冠状病毒家族中的所有成员基因组中都存有 ORF3 基因, 唯一的区别就是大小不一。例如我们研究发现在 TGEV 中的 ORF3 基因组也被划分两部分, 不同的是它被划分为 ORF3a 和 ORF3b<sup>[45]</sup>, 而猫冠状病毒如猫肠道病毒, 相应区段则被划分为 ORF7a 和 7b<sup>[46]</sup>。研究表明, PEDV 一旦经过致弱, 它的基因组中 ORF3 随之就发生改变, 病毒的致病力会有所减弱, 可能说明 ORF3 在 PEDV 毒力方面有着很大的联系<sup>[47]</sup>。为了进一步证明 ORF3 是否与病毒毒力存在一定的关系, Li 等将 PEDV 的 ORF3 基因缺失, 他采用的是定向重组技术达到这一目的, 之后测定病毒在细胞内的增殖含量, 发现亲本毒株与 ORF3 基因缺失的病毒相比, 两者病毒在细胞内复制能力并没有明显差异<sup>[48]</sup>。Wang 等将 PEDV 的 ORF3 基因沉默, 他利用的是基因沉默技术, 最终结论是 PEDV 在细胞内的增殖与 ORF3 基因是否沉默没有较大的联系, 但沉默 ORF3 基因后细胞外的病毒粒子在数量上明显降低了许多<sup>[49]</sup>。

M 基因全长 681bp 共编码 216 个氨基酸。研究证明, M 基因的功能是协助病毒粒子组装和出芽, 刺激机体产生免疫保护<sup>[50, 51]</sup>。由于 M 基因在不同毒株之间高度保守, 研究人员在 PEDV RT-PCR 的检测时经常将 M 基因作为靶基因<sup>[52]</sup>。在不同 PEDV 毒株中研究人员发现 M 蛋白 B 细胞抗原表位 195WAFYVR200 高度保守, 故常用于建立 PEDV 表位鉴别诊断及设计表位疫苗<sup>[53]</sup>。在 PED 血清学诊断方面 M 蛋白也是候选蛋白<sup>[54]</sup>。

E 基因全长为 231 个核苷酸共编码氨基酸 76 个。E 蛋白又被称为小膜蛋白在病毒囊膜表面含量最少, 分子量约为 9kDa。E 基因在不同 PEDV 分离毒株之间算是比较保守的。E 基因的功能是协助病毒组装和出芽<sup>[55]</sup>。Ye 等研究表明, 小鼠肝炎病毒 (MHV) 的 E 蛋白可以干扰病毒在细胞内的复制<sup>[56]</sup>, SARS-冠状病毒在没有 N 蛋白的参与下, 形成病毒样粒子只需要 E 蛋白和 M 蛋白

就可以完成<sup>[57, 58]</sup>。Xu 等人证明 PEDV 感染小肠上皮细胞后, E 蛋白会在细胞核与内质网中含量增高, E 蛋白在刺激内质网的同时也会激活信号通路 NF- $\kappa$ B, 最终上调 IL-8 和 Bcl-2 的表达<sup>[59]</sup>。

N 基因全长 1326 bp, 分子量约为 58 kDa, 在 PEDV 结构蛋白中是含量最多的, 潜在的磷酸化位点 7 个。病毒基因组 RNA 与 N 蛋白构成核衣壳结构, 由于 N 蛋白中含有抗原决定簇的存在, 所以它能够产生细胞免疫, 可以用来研制 PED 疫苗<sup>[60]</sup>。在诊断 PEDV 早期感染的研究中, 人们发现一旦细胞感染病毒后会产生大量的 N 蛋白, 可以说明 PEDV 在增殖过程中, N 蛋白起到重要作用<sup>[61, 62]</sup>。N 蛋白具有逃避宿主免疫反应的能力, 可以激活 NF- $\kappa$ B 通路<sup>[63, 64]</sup>。Huan 等研究表明, 一旦 N 蛋白与 C/EBP- $\beta$  之间发生联系时, 就会促进 HMGB1 的转录和释放, 可以调控炎症细胞因子的表达<sup>[65]</sup>。Jaru-Ampornpan 等研究表明, PEDV 毒株适应细胞传代后, N 蛋白就会被 3C 样蛋白酶切割, 这表明适应细胞传代的 PEDV 可能与 3C 样蛋白酶介导的 N 蛋白切割进程有一定的关联<sup>[66]</sup>。

### 1.1.5 PEDV 的诊断

常用于 PED 诊断的方法有 RT-PCR、血清中和试验 (SN)、ELISA、免疫层析检测、免疫荧光检测等。RT-PCR 是 PEDV 检测最常用的方法<sup>[67, 68]</sup>, 常以保守的 M 基因为靶序列设计引物进行 RT-PCR 检测<sup>[69]</sup>。早在 2001 年, Kim 利用 RT-PCR 鉴别诊断 TGEV 和 PEDV<sup>[70]</sup>。高灵敏性和高特异性的血清中和试验 (SN) 会表现出耗时耗力的缺点。PEDV 快速检测抗体或抗原的常用方法是 ELISA 法, 该方法适合大批量样本检测。商品化出售的针对 PEDV 设计的免疫层析检测 (胶体金) 的试剂盒应用也较多, 尽管敏感性 (92%) 低于 RT-PCR, 但是操作简便适合推广。

### 1.1.6 PED 的疫苗研究情况

在欧洲和美洲, 在猪场内控制和净化 PED 主要方式是通过返饲和扑杀。返饲的主要目的是把母猪的乳汁中的 IgA 抗体传递给仔猪, 方法是饲喂母猪处理后的感染 PEDV 小猪肠内容物, 母猪会产生粘膜免疫。但返饲存在很多问题, 比如说会增加其他病毒的感染如 PRRSV、PRV, 从而造成更大经济损失。目前规模化猪场主要依靠生物安全管理并结合 PED 疫苗免疫来防控 PED 的暴发, 目前在市场上销售的 PED 疫苗主要包括三种: PED 弱毒活疫苗、新型基因工程疫苗和细胞灭活苗。

1998 年, 佟有恩等人在 Vero 细胞内把 CV777 毒株传至 125 代, 成功获得 PED 弱毒疫苗<sup>[71]</sup>, 与灭活苗相比, 弱疫苗在主动和被动免疫方面具有一定的优势。1993 年, 王明等学者研制出一种通过猪的后海穴注射法, 将 PED 组织灭活苗进行免疫, 能有效预防 PED 的发生<sup>[72]</sup>。在 1995 年和 2004 哈尔滨兽医研究所分别成功研制了猪传染性胃肠炎和猪流行性腹泻二联灭活苗<sup>[73, 74]</sup>。日韩两国防控 PED 也是利用 PED 的弱毒疫苗<sup>[75, 76]</sup>。Song 等研究表明, 给 PEDV 阴性妊娠母猪免疫接种时, 口服弱毒活疫苗免疫比肌肉注射免疫效果更好, 在减少仔猪死淘的方面占有一点的优势, 未来 PED 疫苗很有可能向口服疫苗方向发展<sup>[77]</sup>。在抵抗 PEDV 感染时, 肠道的黏膜免疫起到重要作用。基因工程疫苗一般的给药方式是口服。徐丽丽等利用 PEDV 基因组中的 S 基因 COE 和 S1D 序列克隆转化到致弱的伤寒沙门氏菌时, 在刺激机体产生免疫方面重组菌表现出了更好的免

疫效果，可以增强粘膜免疫和细胞免疫<sup>[43]</sup>。葛俊伟等研究说明重组乳杆菌表达 COE 序列的菌株经过猪的口服后，黏膜免疫和细胞免疫都能够得到很大的提升。<sup>[78]</sup>孟凡丹等构建了一种 DNA 疫苗，它能够表达 PEDV 的 S 蛋白，诱导高水平 IFN- $\gamma$  产生，刺激细胞免疫和产生特异性的中和抗体<sup>[79]</sup>。

## 1.2 RNA 干扰的研究进展

RNA 干扰 (RNA interference, RNAi) 现象是自然界中机体的一种防御机制，保证机体保守性进化抵御外来病毒入侵，是指外源 dsRNA (double stranded) 进入细胞后引起同源 mRNA 降解，导致靶基因表达发生沉默的现象<sup>[80]</sup>。起初 RNAi 是在植物<sup>[80, 81]</sup>和线虫<sup>[82, 83]</sup>上做探索，Elbashir 首次在哺乳动物发现 RNAi<sup>[84]</sup>。RNAi 研究性论文在 Nature 等高级杂志上获得发表，2006 年诺贝尔奖就颁发给了发现该项技术的两位科学家 Andrew and Craig。该技术高特异性使得在基因功能和人类疾病治疗等研究上应用广泛。

### 1.2.1 RNAi 的研究历史

早在 1990 年，Jorgensen 等发现将一段基因导入矮牵牛花中，牵牛花并没有变得鲜艳反而漂白了，这种现象被称为共阻遏<sup>[85]</sup>，它是内源基因过度表达引发基因沉默的现象。1992 年，Romano 等人研究发现，粗糙脉孢菌中表达 albino 基因过量后，粗糙脉孢菌会出现抑制自身 albino 基因表达的现象，与牵牛花出现了相似的结果，并将其称为基因抑制<sup>[86]</sup>。1994 年，Cogoni 发现链孢霉菌导入类胡萝卜素基因，能压制 35% 左右内源基因<sup>[87]</sup>。1998 年，Fire and Mello 他们在进行线虫基因沉默的研究中，分别注射肌肉蛋白的正义 RNA (sense RNA)、反义 RNA (antisense RNA) 和双链 RNA (double-stranded RNA, dsRNA)，结果发现，只有在线虫体内被注射 dsRNA 后，罕见的抽搐运动现象才会在子代线虫身上发生，而注射正义和反义 RNA 的线虫，子代线虫没有任何表型的改变。这说明注射 dsRNA 后肌肉蛋白的翻译受到抑制发生基因沉默，首次在秀丽线虫中阐明了基因沉默的机制，并将其出现的抑制现象称为转录后水平基因沉默 (post-transcriptional gene silencing, PTGS)，他们将这种 dsRNA 抑制基因表达的现象称为 RNAi<sup>[82]</sup>。RNAi 现象广泛存在于动植物等真核生物的细胞中。自从 RNAi 发现之后，在生物的基因功能研究中得到了广泛的应用。

### 1.2.2 RNA 干扰的作用机制

根据现有的实验和理论，RNA 沉默主要分为 TGS (Transcriptional gene silencing) 和 PTGS 两种。从科学家发现的时间上来算 PTGS 更早一些，从研究程度上来讲 PTGS 研究更成熟。在真核生物 RNA 的防御机制是 PTGS，抵抗病毒入侵，维持基因稳定性<sup>[88]</sup>。RNAi 的主要效应分子 siRNA (small interfering RNA) 和 miRNA (microRNA) 介导的 PTGS，主要分为：效应分子特异性降解靶 mRNA 和靶 mRNA 翻译抑制。

### 1.2.2.1 siRNA 引起的 mRNA 降解

细胞内的小分子 siRNA 在一般情况下是来源于长 dsRNA 前体分子。它可能是 RNA 病毒在复制过程中生成的物质、转染人工合成的 dsRNA 分子或者其他外源性转入的 DNA 等。胞质中的 dsRNA 被 Dicer 蛋白识别, 然后被降解成 siRNA<sup>[89]</sup>; 然后 siRNA 装载到 RISC 复合体上, 切割随链并释放, 形成成熟的 RISC 复合体<sup>[90]</sup>。靶 mRNA 序列与引导链完全互补配对, 启动序列特异性切割通路, 由 RISC 复合体进行切割, 从而使靶 mRNA 降解<sup>[91]</sup>。RNAi 中存在 RNA 聚合酶依赖性的现象, 高效的 RNAi 产生则需要更多地外源 dsRNA, 此时则需要 siRNA 扩增, 使 PTGS 反应更加显著而稳定<sup>[92-94]</sup>。

在 RNAi 反应过程中 siRNA 与靶 mRNA 完全互补配对是形成有效的 PTGS 的关键因素, RISC 复合体 AGO 蛋白裂解靶 mRNA<sup>[95]</sup>, 其中 Argonaute2 (AGO2) 酶具有催化活性<sup>[96]</sup>。小分子双链 siRNA 在解锁过程中, 随从链被分解, 只有引导链保留在成熟有功能的 RISC 复合体中。引导链的 5'端位于 AGO2 上 RNase-like PIWI 域具有催化活性, 引导链的 3'端位于 PIWI-Argonaute-Zwille (PAZ) 结构域的缺口<sup>[97]</sup>。从双链 siRNA 中的引导链的 5'端开始, 靶 mRNA 在第 10 和 11bp 的位置发生裂解<sup>[98]</sup>。

### 1.2.2.2 miRNA 引起的 mRNA 的降解

细胞基因组自身编码可以产生微小 RNA 分子, 这种分子具有调控活性的作用, 它的作用主要表现在生物发育和分化过程方面并起到了非常重要的作用, 可以调节相关基因的表达<sup>[99]</sup>。Ambros 等实验室随后发现线虫的 lin-4 可以和 lin-14 的 3'非编码区的多个位点互补, 这种互补导致了 LIN-14 蛋白的产量下降<sup>[100]</sup>。在动物细胞内, 独立的转录单位 miRNA 编码基因在 RNA polymerase II (Pol II) 启动子的调控下, 核内转录出初始 miRNA 转录本<sup>[101]</sup>。随后初始 miRNA 被 Drosha 蛋白及其辅助因子的作用下产生发夹型 dsRNA, 构成 miRNA 的前体—Pre-miRNA<sup>[102]</sup>。它由 Ran-GTP 和 Exportin-5 从细胞核内运输到细胞质中<sup>[103]</sup>, 在细胞质中被 Dicer 酶等加工成含有 miRNA 的 RISC 复合体 (miRISC)<sup>[104]</sup>。

MiRNA 诱导 PTGS 的主要方式分为两种, 一种是靶 mRNA 翻译抑制, 特点是靶 mRNA 数量不发生改变, 在动物中绝大部分 miRNA 不完全配对于靶 mRNA, 通常是以这种方式诱导 PTGS 的<sup>[105]</sup>; 另一种是降解靶 mRNA, 这种方式会使 mRNA 数量减少, 植物的 miRNA 完全配对于靶 mRNA, 通常是以这种方式发挥抑制作用<sup>[106]</sup>。其中 miRNA 负责靶标 mRNA 的识别的种子序列是 5'端前 2-7 或 8 个碱基。动物中也存在 miRNA 不完全配对于靶 mRNA 时出现靶 mRNA 降解的情况<sup>[107]</sup>, 这说明 siRNA 和 miRNA 引起 mRNA 降解过程中存在功能重叠。研究表明, Argonaute 蛋白 PIWI 结构域的活性位点可以剪切降解靶 mRNA<sup>[108]</sup>。翻译抑制主要是指抑制起始因子的装配, 它是由 Argonaute 蛋白介导的<sup>[109]</sup>。miRNA 有时也可以理解是翻译起始后起到抑制作用, 原因是核糖体在延伸过程中被 RISC 空间上阻碍, 导致降低靶 mRNA 的翻译效率<sup>[110]</sup>。

### 1.2.3 RNAi 技术的应用

从发现 RNAi 到现在已经过去二十年了, 在各个领域的研究中几乎都能看到 RNAi 技术的影子。该技术逐渐发展成为一种能够代替基因敲除技术, 成为一种新型的高级工具。归纳该技术

以广泛应用在功能基因组学、生物技术和医学上等相关领域。

### 1.2.3.1 RNAi 用于基因组功能研究

随着 RNAi 机制的发现, 以及多种生物基因组测序的完成, 人们很快意识到可以利用 RNAi 的方法, 构建已知基因缺失或者表达下调的株系, 可通过从基因到表型的反向遗传学方法研究该基因的功能。利用 RNAi 技术研究基因功能与传统的诱变策略相比具有明显的优势。RNAi 的优势具有更高的便捷性<sup>[111]</sup>。利用 RNAi 技术研究基因功能大致分为以下几步, 要对靶基因进行测序, 根据测序结果筛选合成 siRNA, 将 siRNA 植入到个体细胞内, 根据个体表型变化确定基因的作用。Maeda 等利用 RNAi 技术构建靶基因缺失表型, 确定出数百个基因的功能<sup>[112]</sup>。Harborth 等应用 RNAi 技术对影响细胞分化的功能基因进行筛选, 最终确认 13 个相关基因<sup>[113]</sup>。Paddison、Berns、Simmer、Nollen 等研究人员在生物工程领域中的细胞分裂增殖、胚胎生长发育和生殖系统发育三个方面通过 RNAi 技术对相关基因进行筛选, 最终确定出关键基因<sup>[114-117]</sup>。随着科技的进步, 科学家对研究基因的手段也越来越先进, 高通量测序就提供了简单快捷的途径。

### 1.2.3.2 基因治疗

目前, 世界上存在难治疗的疾病有很多, 而且没有相关的高效的药物进行防治, RNAi 技术成熟以后不少的研究人员将其应用到病毒、肿瘤和癌症等领域的治疗, 经过体内和体外试验证明 RNAi 具有潜在的基因治疗效果。Zender 等通过导入设计的 siRNA 成功抑制 Fas 的下游基因 caspase8 基因的表达, 保护 Fas 抗体及肝脏<sup>[118]</sup>。Lee 和 Novina 等研究证明 siRNA 有效抑制 HIV 病毒的感染及复制能力<sup>[119, 120]</sup>。Cao 等研究证明设计合成的重组 PRV 介导的 siRNA 可显著抑制传统 PRRSV H1 株在 Marc-145 细胞中 mRNA 和蛋白水平的复制<sup>[121]</sup>。Li 等设计表达靶向猪传染性胃肠炎病毒 M 基因的短发夹 RNA, 抑制该病毒在猪肾细胞 PK-15 的增殖<sup>[122]</sup>。Porntrakulpipat 研究针对 CSF 病毒的核衣壳蛋白 (C) 合成 siRNA, 数据表明 siRNA 能够抑制 CSF 病毒的复制<sup>[123]</sup>。研究肿瘤发现, 它是靠许多基因、多种因素彼此作用产生的, 利用 RNAi 技术沉默多个基因切断信号通路, 有效抑制肿瘤生长。研究学者 Nagy 等筛选出靶向 erbB1 基因的 siRNA, 利用化学合成并导入到细胞内, 成功抑制 erbB1 的表达及减弱肿瘤繁殖能力<sup>[124]</sup>。通过以上研究得出在治疗基因相关性疾病时, RNAi 技术存在一定的效果和优势。

## 1.3 研究目的和意义

中国作为世界第一生猪养殖和消费的大国, 我国生猪养殖业产值占畜牧业总产值的比重达 47%, 由此可见中国生猪饲养数量巨大。目前, 国内养猪过程中仔猪的死亡率居高不下, PEDV 是引起仔猪高死亡率的病原之一。自 2010 年起该病的发病率明显升高, 且发病规模较大。国内外预防猪流行性腹泻病毒主要方法是接种疫苗, 然而疫苗的免疫效果参差不齐, 目前仍没有防治 PEDV 的理想疫苗和药物, 因此研究预防和治疗 PED 的新制剂显得尤为重要, 对于 PED 的防控具有重要的科学意义。RNAi 是近年来发现的由双链 siRNA 介导的以序列特异性方式诱导同源靶 mRNA 降解的新技术。RNAi 效应应具有快速、高效和高度特异性的特征, 有望弥补传统抗病毒制剂的缺陷。近来, RNA 干扰技术应用于猪蓝耳病、口蹄疫、猪瘟等许多疾病, 并对相应病毒取

得了显著的基因沉默效果，这为猪流行性腹泻的有效防治提供了一种研究思路。本研究拟通过筛选针对猪流行性腹泻病毒的 M 和 N 基因有效的 siRNA 序列，并构建特异的 siRNA 表达质粒，探讨 siRNA 对猪流行性腹泻病毒复制的抑制效应，旨在开发一条新的治疗途径，为猪流行性腹泻的防治提供一种新的思路以及解决方法。

## 2 材料与方法

### 2.1 细胞与病毒

Vero 细胞和 PEDV HB-HS 毒株，由河北农业大学兽医微生物实验室保存和分离鉴定。

### 2.2 主要试验仪器

仪器名称	型号	生产厂家
高速冷冻离心机	Neofuge 13R	上海力申科学仪器有限公司
蔡司倒置荧光显微镜	Observer.Z1	德国 ZEISS 公司
Haier 超低温冰箱	BCD-205TA	青岛海尔股份有限公司
PCR 热循环仪	T100	BIO-RAD 公司
全自动实时荧光定量 PCR 仪	LightCycler®96	上海罗氏诊断产品有限公司
稳压稳流电泳仪	DYY-8C	北京六一仪器厂
全温振荡培养箱	HZQ-F100	太仓市豪成实验仪器制造有限公司
半干转印槽	Trans-Blot-SD	美国 Bio-rad 伯乐公司
凝胶成像系统	GELDOC-2000	BIO-RAD 公司
全自动立式蒸汽灭菌器	YXQLS18SI	上海博讯医疗生物股份有限公司
超微量分光光度计	ND-2000C	Thermo Scientific 公司
液氮罐	YDS-3	北京欣康亿达
倒置显微镜	BDS2000-PM	奥特光学

### 2.3 试验所需主要试剂

试剂名称	生产厂家
异丙醇	天津市进丰化工有限公司
氯仿	天津市进丰化工有限公司
琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒	TIANGEN BIOTECH (BEIJING)
RPMI-1640 培养基	Gibco 公司
PrimeScript™ 1st Strand cDNA Synthesis Kit	宝生物工程（大连）有限公司
dNTP Mixture	宝生物工程（大连）有限公司
10×PCR Buffer(Mg <sup>2+</sup> plus)	宝生物工程（大连）有限公司
TaKaRa Taq™	宝生物工程（大连）有限公司
DL2000 DNA Marker	宝生物工程（大连）有限公司
6×Loading Buffer	宝生物工程（大连）有限公司
Trizol	宝生物工程（大连）有限公司
Pmd19-T Vector	宝生物工程（大连）有限公司

Soluton I	宝生物工程（大连）有限公司
<i>Bam</i> H I、 <i>Hind</i> III、 <i>Sal</i> I	宝生物工程（大连）有限公司
T4 DNA 连接酶	宝生物工程（大连）有限公司
质粒小提试剂盒	美国 BIOMIGA 公司
胎牛血清	浙江天杭生物科技股份有限公司
pGenesil-1 质粒	长沙赢润生物技术有限公司
QuickShuttle-Basic 转染试剂基础型	北京博奥龙免疫技术有限公司
Rabbit Anti-mouse IgG/HRP	北京博奥森生物技术有限公司
$\beta$ -actin Mouse Monoclonal Antibody	北京博奥森生物技术有限公司
G418	北京索莱宝生物科技股份有限公司
DAB 显色液	北京索莱宝生物科技股份有限公司
2×Fast TaqMan Mixture	康为世纪生物科技股份有限公司

## 2.4 主要试剂的配置

### 2.4.1 RNA提取所使用的试剂

0.1 % DEPC 水 (W/V)：称取 0.1 g DEPC，加入 100 mL 蒸馏水，在 37 °C 条件下静置，待完全溶解后，经高压灭菌后冰箱 4 °C 保存；

75 % DEPC 水：100 % 乙醇与 0.1 % DEPC 水按 3:1 的体积比配制。

### 2.4.2 琼脂糖凝胶电泳实验使用的溶液

50×TAE 电泳缓冲液：5.71 mL 冰乙酸、24.2 g Tris 碱、1.47 g EDTA，蒸馏水定容至 100 mL，避光保存。

1×TAE 电泳缓冲液：按 1:50 的比例混合 50×TAE 电泳缓冲液和无菌蒸馏水，避光保存。

1.5 % 琼脂糖凝胶：琼脂糖 1.5 g 加入电泳缓冲液 100 mL，加热沸腾，室温静置 12 min 后加入商品化的 5.0  $\mu$ L 10 mg/mL EB。

### 2.4.3 培养基的配置

LB 液体培养基：称量 5.0 g Tryptone、2.5 g Yeast extract、5.0 g NaCl，蒸馏水定容至 500 mL，pH 值 7.4，高压后 4 °C 保存。

LB 固体培养基（100  $\mu$ g/mL）：称量 5.0 g Tryptone、2.5 g Yeast extract、5.0 g NaCl，蒸馏水定容至 500 mL，pH 值 7.4，加入 7.5 g 琼脂粉，高压后冷却至 40 °C，无菌条件下倒入平板内，凝固后冰箱 4 °C 保存备用。

Kan/LB 固体培养基（100  $\mu$ g/mL）：称量 5.0 g Tryptone、2.5 g Yeast extract、5.0 g NaCl，蒸馏水定容至 500 mL，pH 值 7.4，加入 7.5 g 琼脂粉，高压后冷却至 40 °C 加入 10  $\mu$ L Kan 储存液，倒入平板 4 °C 保存。

Kan/LB 液体培养基（100  $\mu$ g/mL）：500 mL LB 液体培养基加入 Kan 贮存液 50  $\mu$ L 于 4 °C 保

存备用。

#### 2.4.4 细胞培养时所使用的溶液

0.3%胰酶溶液：取胰酶粉剂 0.12 g 加入 40 mL PBS，滤器除菌，冰箱-20℃保存。

PBS：NaCl 6.40 g，KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.192 g，Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.152 g，KCl 0.16 g，无菌水定容至 800 mL，高压后 4℃保存。

7.5% NaHCO<sub>3</sub>：6 g NaHCO<sub>3</sub> 用无菌水定容至 80 mL，高压后备用。

1×RPMI-1640 不完全营养液（维持液）：取 RPMI-1640 粉剂加入 2.2 g NaHCO<sub>3</sub> 无菌水定容至 1 L 加入 10 mL 双抗，过滤除菌，4℃保存。

1×RPMI-1640 完全营养液：270 mL 1×RPMI-1640 不完全营养液，加入 30 mL 新生牛血清，4℃保存。

#### 2.4.5 Western-Blotting所使用的溶液

30%丙烯酰胺：取丙烯酰胺 150 g N'N'-亚甲基丙烯酰胺，定容至 500 mL (pH≤8.8)，4℃保存。

1.5 mol/L Tris-HCl：36.34 g Tris-碱用无菌水定容至 200 mL，pH 调到 8.8，室温保存。

1 mol/L Tris-HCl：48.4 g Tris-碱用无菌水定容至 500 mL，pH 调到 6.8，室温保存。

10%过硫酸胺：50 g 过硫酸胺，无菌水定容至 500 mL，-20℃保存。

10% SDS：60 g SDS 无菌水定容至 600 mL，室温保存。

10×TBS：9.68 g Tris 碱和 32 g NaCl 无菌水定容至 1 L，调 pH 至 7.5。

TBST 洗涤液：每 100 mL 1×TBS 中加入 50 μL Tween-20，混匀。

蛋白转印缓冲液：3.03 g Tris 碱和 14.3 g Gly 溶解于 0.3 L 的无菌水中，加入 0.2 L 甲醇，定容至 1 L，4℃保存。

脱脂奶粉封闭液：将 7.5 g 脱脂奶粉用无菌水定容至 150 mL，4℃保存备用。

### 2.5 猪流行性腹泻病毒的增殖

#### 2.5.1 Vero细胞的复苏

取 7 ml 和 10 ml 的 1640 完全营养液分别加入到灭菌的 12 ml 离心管内，用热水水浴到 40℃左右，从液氮罐取出 Vero 细胞，迅速放到 40℃水内快速解冻，用移液器将细胞液取出加入含有 7 ml 营养液的 12 ml 离心管内，离心 5 min。倒掉上清液，将之前准备的 10 ml 营养液加入到离心管内，混匀加入到细胞瓶内，将细胞放入 37℃ 5%二氧化碳培养箱内，次日换液。

#### 2.5.2 PEDV的增殖传代

选取单层 85%左右铺满细胞瓶的 Vero 细胞，PBS 洗两次，然后加入 1 mL 实验室保存的

HB-HS 株细胞毒，添加适量胰酶，放入 37 °C 5 %二氧化碳培养箱内孵育 1 h，然后加入 9 mL 1640 细胞维持液继续培养，实时观察细胞病变情况。当细胞出现到 80-90 %病变（CPE）时，将细胞放入-80 °C 冰箱内，然后反复冻融三次，目的是使细胞破裂释放病毒，用移液器反复吹打细胞毒液并移入到 15 mL 的离心管内，2000 rpm 离心 5 分钟，收集上清病毒液。

### 2.5.3 PEDV细胞毒的鉴定

#### 2.5.3.1 细胞毒总 RNA 的提取

根据 TRIZOL 试剂说明书过程如下：

取出 500  $\mu$ L PEDV 细胞毒放于 4 °C 离心机中，6000 rpm 离心 2 min 抽取 250  $\mu$ L 上清并移至新的 1.5 mL 离心管中，加入 Trizol 750  $\mu$ L，混匀震荡 2~3 min，室温静置 5 min。然后加入氯仿 200  $\mu$ L，震荡 1 min，室温静置 5 min，12000 rpm 离心 10 min。取上清，加入等体积异丙醇，-20 °C 的环境下静置 1~2 h。然后取出离心管，12000 rpm 离心 10 min，弃去上清液，尽量吸干管内残留，然后加入 75 % DEPC 水 0.7 mL 进行洗涤，8000 rpm 离心 5 min，弃去上清尽量吸干管内残留。加入 RT-PCR 洗脱液 20  $\mu$ L，溶解核酸，进行反转录。

#### 2.5.3.2 反转录合成 cDNA

参照 PrimeScript™ 1st Strand cDNA Synthesis Kit 说明书进行如下操作：

取新的 PCR 反应管，以上述提取的总 RNA 为模板，配置 20  $\mu$ L 反转录体系依次加入以下组分：

RNA	8.0 $\mu$ L
dNTP Mixture	1.0 $\mu$ L
Oligo dT Primer	1.0 $\mu$ L

RT 反应程序：65 °C 水浴 5 min，冰浴 3 min。

在 PCR 反应管中依次加入如下组分：

RNase Free dH <sub>2</sub> O	4.5 $\mu$ L
5×PrimeScript Buffer	4.0 $\mu$ L
PrimeScript RTase	1.0 $\mu$ L
RNase Inhibitor	0.5 $\mu$ L

42 °C 水浴 1 h，然后 70 °C 水浴 15 min。

#### 2.5.3.3 常规 PCR 反应

将获得的反转录产物 cDNA 为模板，用检测引物上游：5' -CCAGCGTAGTTGAGATTG-3'，下游 5' -GCTCACGAACAGCCACA-3' 进行常规 PCR 扩增，在 20  $\mu$ L RT-PCR 反应体系中依次加

入如下成分:

模板	2.0 $\mu\text{L}$
2×Es Taq MasterMix	10.0 $\mu\text{L}$
上游引物	1.0 $\mu\text{L}$
下游引物	1.0 $\mu\text{L}$
RNase Free dH <sub>2</sub> O	6.0 $\mu\text{L}$
Total	20.0 $\mu\text{L}$

PCR 扩增程序:

	94 °C 预变性	5 min
35 个循环	$\left\{ \begin{array}{l} 94\text{ }^{\circ}\text{C} \\ 50\text{ }^{\circ}\text{C} \\ 72\text{ }^{\circ}\text{C} \end{array} \right.$	30 s
		30 s
		40 s
	72 °C 延伸	10 min

其扩增产物的目的条带大小应为 642 bp, 取 7  $\mu\text{L}$  PCR 反应产物进行电泳检测 (1.5% 琼脂糖凝胶), 应用凝胶成像系统观察结果。

## 2.6 设计 siRNA 序列及构建 pGenesil-shRNA 质粒

### 2.6.1 选择设计 siRNA 序列

根据 siRNA 的设计原则, 应用 Ambion 在线软件 <http://www.thermofisher.com/cn/zh/home/brands/ambion.html>, 筛选目的基因的 siRNA 序列, 针对 Genbank 公布的猪流行性腹泻病毒 HB-HS 株 (登录号 JF690779) 的 M 基因和 HB-HS 株 (JF700126) N 基因序列选择了 2 个 siRNA 靶位点, 另外还设计了一个与 PEDV 无同源性的 siRNA 序列作为阴性对照, 记为 Negative Control (NC)。如表 2-1

表 2-1 siRNA 序列

Table 2-1 siRNA sequence

基因名称	siRNA 序列	序列在相应基因中的位置
M	5' - CCAACTGGTGTAAACGCTAA -3'	409-427
N	5' - GCACCAAATGTTGCAGCAT -3'	976-994
NC	5' - GCATTTCGTATCGGTTCCAT -3'	

### 2.6.2 编码 shRNA 型 DNA 单链的设计与合成

根据上述筛选结果编码三对 shRNA, 其中包括一对阴性对照。按照 BamH I+正义链+loop 环+反义链+TTTTTT+GGAA+ Hind III 排列顺序设计编码 shRNA, 其中 LOOP 环选择的是 TTCAAGA

GA，终止密码子为 TTTTTT，选择 *Bam*H I、*Hind* III 酶切位点，是便于与 pGenesil-1 质粒载体的连接。核苷酸链的合成均由上海生工生物工程有限公司完成。如表 2-2。

表 2-2 shRNA 序列

Table 2-2 shRNA sequence

名称	序列
M-Top	5'-GATCCCCCAACTGGTGTAAACGCTAATCAAGAGATTAGCGTTACACCAGTTGGTTTTTTGGAAA-3'
M-Bottom	5'-AGCTTTTCCAAAAACCAACTGGTGTAAACGCTAATCTCTTGAATTAGCGTTACACCAGTTGGG-3'
N-Top	5'-GATCCGCACCAAAATGTTGCAGCATTCAAGAGAATGCTGCAACATTTGGTGCTTTTTTTGGAAA-3'
N-Bottom	5'-AGCTTTTCCAAAAAGCACCAAAATGTTGCAGCATTCTCTTGAATGCTGCAACATTTGGTGCG-3'
NC-Top	5'-GATCCGCATTCGTATCGGTTCCATTCAAGAGAATGGAACCGATACGAATGCTTTTTTTGGAAA-3'
NC-Bottom	5'-AGCTTTTCCAAAAAGCATTCGTATCGGTTCCATTCTCTTGAATGGAACCGATACGAATGCG-3'

### 2.6.3 表达质粒 pGenesil-shRNA 的构建

构建 pGenesil-shRNA 质粒如图 2-1，参照 pGenesil-1 质粒图谱，调控 shRNA 的启动子为 hU6 启动子，shRNA 插入位点是 *Bam*H I、*Hind* III。构建质粒在真核细胞内大量表达 shRNA，并被胞质中的 Dicer 酶等进一步加工成 siRNA。

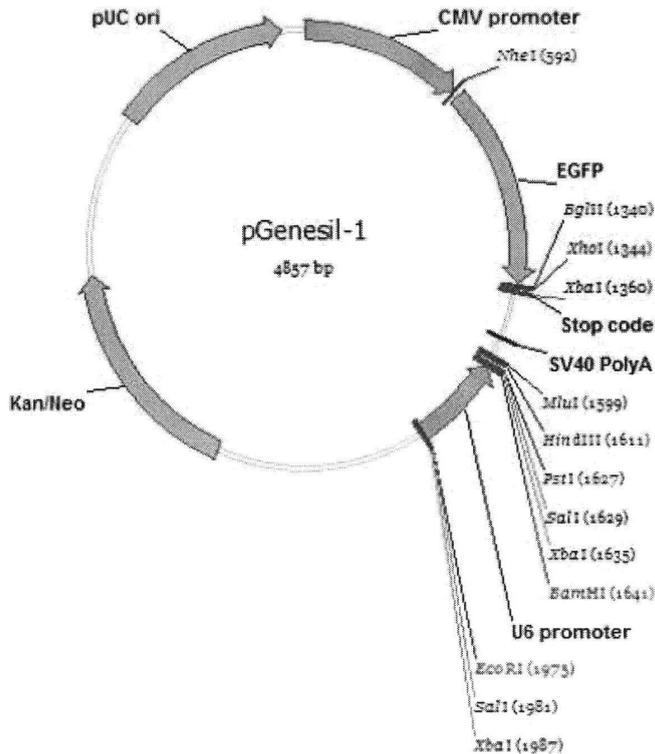


图 2-1 pGenesil-1 质粒图谱

Fig. 2-1 Schematic diagram of plasmid pGenesil-1

## 2.6.3.1 编码 shRNA 序列的 DNA 单链的退火连接

把上述合成的 DNA 单链用无菌水分别配成 50  $\mu\text{M}$ /L 的稀释液，然后按照如下列表依次加入各反应成分，95  $^{\circ}\text{C}$  水浴锅反应 4 min，关闭电源过夜连接，产物 -20  $^{\circ}\text{C}$  保存备用。

上游引物	5.0 $\mu\text{L}$
下游引物	5.0 $\mu\text{L}$
10 $\times$ PCR Buffer	2.0 $\mu\text{L}$
RNase Free dH <sub>2</sub> O	8.0 $\mu\text{L}$
Total	20.0 $\mu\text{L}$

## 2.6.3.2 质粒 pGenesil-1 的双酶切及胶回收

采用 *Bam*H I 和 *Hind* III 双酶切 pGenesil-1 质粒。按照如下列表建立 20  $\mu\text{L}$  的酶切体系，37  $^{\circ}\text{C}$  酶切 3 h。酶切产物经 1% 的琼脂糖凝胶电泳，按照 BIOMIGA 公司的胶回收试剂盒说明书进行回收。

pGenesil-1 质粒	12.0 $\mu\text{L}$
<i>Bam</i> H I	1.0 $\mu\text{L}$
<i>Hind</i> III	1.0 $\mu\text{L}$
10 $\times$ K Buffer	2.0 $\mu\text{L}$
RNase Free dH <sub>2</sub> O	4.0 $\mu\text{L}$
Total	20.0 $\mu\text{L}$

## 2.6.3.3 退火双链 DNA 片段与质粒 pGenesil-1 双酶切产物的连接与转化

按照如下列表建立 10  $\mu\text{L}$  连接体系，然后 16  $^{\circ}\text{C}$  水浴连接过夜。取 DH5 $\alpha$  感受态细胞，置冰浴中融化后，将 10  $\mu\text{L}$  连接产物加入，冰浴 30 min，42  $^{\circ}\text{C}$  热激 1 min 后，再冰浴 1 min，加入 600  $\mu\text{L}$  LB，37  $^{\circ}\text{C}$  震荡培养 60 min，2500 r/min 离心 6 min，弃去部分上清，剩余菌液涂布于含 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  卡那霉素抗性的 LB 板中，37  $^{\circ}\text{C}$  恒温培养箱培养 17 h。

pGenesil-1 质粒双酶切产物	5.0 $\mu\text{L}$
退火双链 DNA	3.0 $\mu\text{L}$
10 $\times$ T4 DNA ligase buffer	1.0 $\mu\text{L}$
T4 DNA ligase	1.0 $\mu\text{L}$
Total	10.0 $\mu\text{L}$

### 2.6.3.4 阳性重组质粒 pGenesil-shRNA 的筛选及鉴定

挑取 LB 培养基上的白色单菌落，接种到 5 mL 含 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  卡那霉素抗性 LB 液体的试管中扩大培养，在 37  $^{\circ}\text{C}$  全温振荡培养箱中培养 12~16 h。获得的菌液进行质粒提取，按照 BIOMIGA 公司的试剂盒说明书进行，质粒采用 *Sal*I 单酶切鉴定阳性重组子。按照如下列表建立 10  $\mu\text{L}$  酶切体系，37  $^{\circ}\text{C}$  酶切 2 h，1% 琼脂糖凝胶电泳观察结果。将鉴定阳性质粒送往上海生工生物工程有限公司测序。重组质粒分别命名为 pGenesil-M、pGenesil-N 和 pGenesil-NC。

待鉴定质粒	4.0 $\mu\text{L}$
10 $\times$ buffer H	1.0 $\mu\text{L}$
<i>Sal</i> I	0.5 $\mu\text{L}$
RNase Free dH <sub>2</sub> O	4.5 $\mu\text{L}$
Total	10.0 $\mu\text{L}$

## 2.7 重组质粒 pGenesil-shRNA 瞬时转染 Vero 细胞及 G418 筛选细胞系

### 2.7.1 质粒瞬时转染 Vero 细胞

在转染前一天，将 Vero 细胞用胰酶消化下来，接种到 24 孔板中，每孔  $5\times 10^4$ — $1\times 10^5$  个细胞和 1 mL 1640 完全营养液，然后将 24 孔板放于 37  $^{\circ}\text{C}$  5% 二氧化碳恒温培养箱内培养 18 h。按照 QuickShuttle-Basic 转染试剂说明书，分别瞬时转染 pGenesil-M、pGenesil-N 和 pGenesil-NC 质粒，步骤如下：分别将 2  $\mu\text{g}$  质粒和 4  $\mu\text{L}$  转染试剂混匀到 100  $\mu\text{L}$  生理盐水中，无需等待直接加入孔内。每种质粒重复转染 3 孔。转染 16 h 后，荧光倒置显微镜观察转染效率。

### 2.7.2 利用 G418 筛选高效稳定表达质粒的 Vero 细胞系

#### 2.7.2.1 筛选 Vero 细胞 G418 最佳浓度的确定

使用 1640 完全营养液将 Vero 细胞稀释至  $1\times 10^4$  个/mL，然后加入到 24 孔板中，每孔为 1 mL 细胞液。待细胞生长 24 h 后，将每组加入不同浓度的 G418 进行浓度滴度筛选，每组设定为 3 孔。G418 浓度依次为 0, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  11 个级别。每天观察 Vero 细胞死亡状况，每 3 天更换一次培养基，G418 保持相应级别浓度。Vero 细胞培养 13-14 天，此时确定最佳筛选浓度应该是细胞全部死亡的最低 G418 浓度。

#### 2.7.2.2 对转染后 Vero 细胞进行 G418 结合 GFP 表达的双重筛选

将 2.7.1 中得到重组质粒转染 24 h 后的 Vero 细胞，24 孔板以每孔加入最佳浓度 G418 进行筛选，筛选一周后，孔内细胞大部分死亡，存活的细胞使用荧光显微镜观察，将绿色荧光强度高的细胞进行标记，将不表达和表达较弱的 GFP Vero 细胞用细胞刮刮掉，然后待存留细胞生长后，

将细胞传代到新的 24 孔板、12 孔板、6 孔板扩大培养。期间冻存部分筛选得到的阳性细胞，备用。每次传代后，细胞营养液中均加入 G418，此时 G418 浓度为最佳浓度的一半。将第 10 代细胞利用倒置荧光显微镜观察细胞内质粒表达情况。

### 2.7.2.3 含重组质粒 Vero 细胞系的 PCR 检测

应用 Primer Premier 5.0 软件，根据 pGenesil-1 质粒载体序列，在插入 shRNA 序列的前后端设计出一对引物：上游 5'-CTTGTATTATGCAGCTTATAATG-3'，下游 5'-ATCATATGCTTACCGTAACTTG-3'，引物由上海生工生物工程有限公司合成。

将 3 种分别含有不同重组质粒的第 10 代 Vero 细胞各自取 500  $\mu\text{L}$ ，6000 r/min 离心 3 min，弃掉上清液 300  $\mu\text{L}$ ，然后将剩余细胞沉淀重悬，利用 DNA 提取试剂盒提取各自细胞总 DNA。然后按照如下列表建立 20  $\mu\text{L}$  PCR 体系。

2×Es Taq MasterMix	10 $\mu\text{L}$
上游引物	1.0 $\mu\text{L}$
下游引物	1.0 $\mu\text{L}$
DNA 模板	2.0 $\mu\text{L}$
RNase Free dH <sub>2</sub> O	6.0 $\mu\text{L}$
Total	20.0 $\mu\text{L}$

PCR 扩增程序：

	94 °C 预变性	5 min
30 个循环	$\left\{ \begin{array}{l} 94\text{ °C} \\ 53\text{ °C} \\ 72\text{ °C} \end{array} \right.$	30 s
		30 s
		30 s
	72 °C 延伸	10 min

其扩增产物的目的片段大小应为 263 bp，取 7  $\mu\text{L}$  PCR 反应产物进行 1.5 % 琼脂糖凝胶电泳检测，应用凝胶成像系统观察结果。

## 2.8 表达不同质粒的 Vero 细胞系感染 PEDV

将筛选得到的三种重组质粒的 Vero 细胞系，利用细胞完全营养液稀释细胞浓度为  $1 \times 10^5$  个/mL 左右传代到 24 孔板，待细胞生长 20 h 后，每孔接种 1000 TCID<sub>50</sub> 单位 PEDV HB-HS 细胞培养毒，同时将未转入质粒的正常 Vero 细胞接种 PEDV 细胞毒作为阳性对照。将 24 孔板放入 37 °C 5 % 二氧化碳恒温培养箱内孵育 1 h，使病毒充分吸附到 Vero 细胞，之后将未吸附的细胞毒液倒掉，PBS 洗两遍，每孔加入 1640 维持液 1ml，放入 37 °C 5 % 二氧化碳恒温培养箱内培养 48 h 采集样品。

## 2.9 不同样品中 PEDV 感染滴度的测定

将上述收取的病毒液上清，反复冻融 3 次，然后冻存在 -80 °C 备用。生长良好的普通 Vero 细胞传代到 96 孔细胞培养板中，在 37 °C 5 %二氧化碳恒温培养箱内培养单层细胞汇合率达到 80 % 以上。将保存的病毒液上清按照  $10^{-1}$ 、 $10^{-2}$ 、 $10^{-3}$ 、 $10^{-4}$ 、 $10^{-5}$ 、 $10^{-6}$ 、 $10^{-7}$ 、 $10^{-8}$  稀释，取稀释后的上清液按照每孔 100  $\mu\text{L}$  依次加入到 96 孔板中，每个稀释度重复 12 孔，5 %二氧化碳恒温培养箱内吸附 1 h，然后倒掉孔内液体，PBS 清洗 3 次，加入 1640 维持液 200  $\mu\text{L}$ 。96 孔板在 5%二氧化碳恒温培养箱内培养 7 天，按 Reed-Muench 法计算病毒的 TCID<sub>50</sub>。

## 2.10 应用 TaqMan 实时荧光定量 PCR 方法检测抑制效果

### 2.10.1 PEDV TaqMan 实时荧光定量 PCR 方法的建立

#### 2.10.1.1 PEDV M 基因标准质粒的制备

根据 GenBank 登录的 PEDV 的 M 基因序列，利用 Premier5 软件设计扩增 M 基因的特异性引物 PEDV-MF 5' -TTCCCCGTGATGAGGTGATT-3' 和 PEDV-MR 5' -CCGTGTTTGGACCGGACATA-3'，目的片段 595 bp。提取病毒 RNA 并进行反转录获得 cDNA，然后按照如下列表建立 20  $\mu\text{L}$  PCR 扩增体系。将扩增的目的基因片段进行胶回收，具体操作过程详见琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒（TIANGEN BIOTECH (BEIJING) 说明书。将 4.5  $\mu\text{L}$  胶回收产物与 0.5  $\mu\text{L}$  pMD19-T 载体连接，转化至 DH5 $\alpha$ 。PCR 鉴定阳性菌后，提取重组质粒并送往上海生工生物工程公司测序。测序结果进行比对，准确无误后可做为 PEDV M 基因标准质粒。然后将质粒  $10^{-1}$ 、 $10^{-2}$ 、 $10^{-3}$ 、 $10^{-4}$ 、 $10^{-5}$ 、 $10^{-6}$ 、 $10^{-7}$ 、 $10^{-8}$ 、 $10^{-9}$ 、 $10^{-10}$  稀释，将稀释后的质粒标准品做为制作标准曲线的模板，放入 4 °C 保存备用。

2×Es Taq MasterMix	10 $\mu\text{L}$
上游引物	1.0 $\mu\text{L}$
下游引物	1.0 $\mu\text{L}$
模板	2.0 $\mu\text{L}$
RNase Free dH <sub>2</sub> O	6.0 $\mu\text{L}$
<hr/>	
Total	20.0 $\mu\text{L}$

PCR 扩增程序：

	94 °C 预变性	5 min	
35 个循环	{	94 °C	30 s
		53 °C	30 s
		72 °C	30 s
	72 °C 延伸	10 min	

#### 2.10.1.2 PEDV M 基因引物及相应探针的设计

根据 PEDV 的 M 基因序列，设计扩增 M 基因的探针引物及相应探针。要求探针  $T_M$  值要比引物  $T_M$  值高 5 °C 以上，选择的探针引物及探针要极其保守，确保引物的特异性。探针的荧光基团选择 FAM 基团，猝灭基团选择的 BHQ1。引物及探针序列参见表 2-3，由上海生工生物工程公司合成。

表 2-3 扩增 M 基因的引物序列及探针序列

Table 2-3 The primer and probe sequences designed to amplify M gene

引物名称	引物序列	扩增片段大小
PEDV-F 探针	5'-CGCCAAGGCCACTACAACAA-3'	107bp
PEDV-R 探针	5'-AGTAGTCGCCGTGTTGGAC-3'	
PEDV-probe	5'-FAM-ACGGACGTGTTGGTCGTTTCAGTCAATGCT-BHQ1-3'	

### 2.10.1.3 PEDV TaqMan 实时荧光定量 PCR 标准曲线的建立

将 2.10.1.1 得到的 10 倍梯度稀释后的标准品和 2.10.1.2 合成的引物及探针进行实时荧光定量 PCR，建立标准曲线。按照如下列表建立 15 $\mu$ L 体系，进行 PCR 扩增。每个梯度做三个重复，对扩增结果进行分析，以排除引物二聚体及非特异性扩增的干扰。探针荧光定量 PCR 反应条件：95 °C 1 min; 95 °C 20 s, 60 °C 30 s, 40 个循环。同时设置无菌水为阴性对照。

2 $\times$ Fast TaqMan Mixture	7.5 $\mu$ L
PEDV F 探针	0.3 $\mu$ L
PEDV R 探针	0.3 $\mu$ L
PEDV-Probe	0.3 $\mu$ L
模板	1.5 $\mu$ L
RNase Free dH <sub>2</sub> O	5.1 $\mu$ L
<b>Total</b>	<b>15.0 <math>\mu</math>L</b>

### 2.10.2 管家基因 $\beta$ -actin TaqMan实时荧光定量PCR方法的建立

#### 2.10.2.1 管家基因 $\beta$ -actin 标准质粒的制备

根据 GenBank 登录的猴管家基因，序列号为 NM001033084.1，利用 Premier5 软件设计扩增管家基因的特异性引物 $\beta$ -actin 上游 5'-GCGGGAAATCGTGC GTGAC-3' 和 $\beta$ -actin 下游 5'-ATG CCCAGGAAGGAAGGTTG-3'，目的片段 192bp。提取 Vero 细胞的总 RNA，然后进行反转录获得 cDNA，按照如下列表建立 20  $\mu$ L PCR 扩增体系。将扩增的目的基因片段进行胶回收，具体操作过程详见琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒（TIANGEN BIOTECH (BEIJING) 说明书。将 4.5 $\mu$ L 胶回收产物与 0.5  $\mu$ L pMD19-T 载体连接，转化至 DH5 $\alpha$ 。PCR 鉴定阳性菌后，提取重组质粒并测

序，测序机构是上海生工生物工程公司。测序结果进行比对，准确无误后可做为 $\beta$ -actin 标准质粒。然后将质粒  $10^{-1}$ 、 $10^{-2}$ 、 $10^{-3}$ 、 $10^{-4}$ 、 $10^{-5}$ 、 $10^{-6}$ 、 $10^{-7}$ 、 $10^{-8}$ 、 $10^{-9}$ 、 $10^{-10}$  稀释，将稀释后的质粒标准品做为制作标准曲线的模板，放入 4℃ 保存备用。

2×Es Taq MasterMix	10 $\mu$ L
$\beta$ -actin 上游引物	1.0 $\mu$ L
$\beta$ -actin 下游引物	1.0 $\mu$ L
模板	2.0 $\mu$ L
RNase Free dH <sub>2</sub> O	6.0 $\mu$ L
<b>Total</b>	<b>20.0 <math>\mu</math>L</b>

PCR 扩增程序：

35 个循环	}	94 °C 预变性	5 min
		94 °C	30 s
		57 °C	30 s
		72 °C	30 s
	72 °C 延伸	10 min	

### 2.10.2.2 管家基因 $\beta$ -actin 引物及相应探针的设计

根据 $\beta$ -actin 管家基因序列，设计扩增管家基因的引物及相应探针。要求探针  $T_M$  值要比引物  $T_M$  值高 5 °C 以上，选择的引物及探针要极其保守，确保引物的特异性。探针的荧光基团选择 FAM 基团，猝灭基团选择的 BHQ1。引物及探针序列参见表 2-4，由上海生工生物工程公司合成。

表 2-4 扩增 $\beta$ -actin 基因的引物序列及探针序列

Table 2-4 The primer and probe sequences designed to amplify  $\beta$ -actin gene

引物名称	引物序列	扩增片段大小
$\beta$ -actin-F 探针	5' - CCCTGGAGAAGAGCTACGAGC -3'	94bp
$\beta$ -actin-R 探针	5' - AAGGAAGGTTGGAAGAGTGCC -3'	
$\beta$ -actin-probe	5' -FAM-TACGTCGCCCTGGAAGAGCAAGAGA-BHQ1-3'	

### 2.10.2.3 管家基因 $\beta$ -actin TaqMan 实时荧光定量 PCR 标准曲线的建立

将 2.10.2.1 得到的 10 倍梯度稀释后的标准品和 2.10.2.2 合成的引物及探针进行实时荧光定量 PCR，建立标准曲线。按照如下列表建立 15  $\mu$ L 体系，进行 PCR 扩增。每个梯度做三个重复，对扩增结果进行分析，以排除引物二聚体及非特异性扩增的干扰。探针荧光定量 PCR 反应条件：95 °C 1 min；95 °C 20 s，60 °C 30 s，40 个循环。同时设置无菌水为阴性对照。

2×Fast TaqMan Mixture	7.5 $\mu$ L
$\beta$ -actin F 探针	0.3 $\mu$ L
$\beta$ -actin R 探针	0.3 $\mu$ L

### 小干扰 RNA 抑制猪流行性腹泻病毒在 Vero 细胞内的复制

$\beta$ -actin -Probe	0.3 $\mu$ L
模板	1.5 $\mu$ L
RNase Free dH <sub>2</sub> O	5.1 $\mu$ L
Total	15.0 $\mu$ L

#### 2.10.3应用TaqMan实时荧光定量PCR方法检测

将 2.8 采集的样品,使用 Tizol 法提取总 RNA, RNA 用 M-MLV 反转录酶反转录获得 cDNA, 然后以 cDNA 为模板分别应用 PEDV 实时荧光定量 PCR 和管家基因 $\beta$ -actin 实时荧光定量 PCR 进行检测, 体系分别按照 2.10.1.3、2.10.2.3 进行。将获得各自的循环阈值, 利用  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  方法计算结果, 整理数据。

#### 2.11 病毒蛋白 Western-blotting 检测

将三种重组质粒的 Vero 细胞系传代到 6 孔板, 细胞浓度为  $1 \times 10^5$  个/mL 左右, 待细胞生长 20 h 后汇合率达到 80 % 以上时, 每孔接种 1000 TCID<sub>50</sub> PEDV。接毒后 48 h 弃去部分上清每孔留下大约 1 mL 的上清液, 然后刮下细胞层每孔收集到 1.5 mL 离心管内, 1500 r/min 离心 10 min 弃掉上清, 用预冷的 PBS 洗两遍, 加入细胞 RIPA 裂解液 100  $\mu$ L, 混匀使裂解液与细胞充分接触, 4  $^{\circ}$ C 条件下震荡 20 min, 14000 r/min 离心 15 min, 快速收取 64  $\mu$ L 上清液至新的离心管内。然后每管加入 16  $\mu$ L 的 5 $\times$ SDS 上样缓冲液。进行 12 % SDS-PAGE 电泳分离时, 每孔加 10  $\mu$ L 样品, 电压 100 V 电泳 1.5 h。电泳结束后取下分离胶, 在去离子水中洗涤后进行 Western-blotting 分析。其中以 $\beta$ -actin 管家基因编码表达的蛋白作为内部参照, 校正蛋白质定量、上样过程中存在的误差, 以保证实验结果的准确性。具体过程如下: 剪一张大小与分离胶一样的 NC 膜, 将胶、NC 膜和转膜垫用转印缓冲液浸泡 15 min。转印装置从负极到正极依次放置转膜垫、分离胶、NC 膜和转膜垫, 用玻璃棒轻轻滚动以清除空气, 盖上台板, 接通电源, 23 V 恒压转印 30 min。转印完毕关闭电源取出 NC 膜。

免疫印迹: 将转印后的 NC 膜置于直径 8 cm 平皿中, 用 10 mL 5 % 脱脂奶粉 4  $^{\circ}$ C 封闭过夜。PBST 洗膜 3 次, 每次 10 min; 将 NC 膜置于平皿中, 其中显示 PEDV 蛋白条带的 NC 膜加入 1 : 100 稀释的鼠抗 PEDV 多克隆抗体, 显示内参蛋白条带的 NC 膜加入 1 : 2000 稀释的 $\beta$ -actin Mouse Monoclonal Antibody 37  $^{\circ}$ C 摇晃 2 h; PBST 洗膜 3-5 次, 每次 10 min; 将 NC 膜置于平皿中, 加入 1 : 2000 稀释后的 HRP 兔抗鼠 IgG, 37  $^{\circ}$ C 摇晃 2 h; PBST 洗膜 5 次, 每次 10 min, 洗涤要彻底。用 DAB 显色 15 min, 直到蛋白条带清晰后加入蒸馏水充分洗涤, 终止显色反应。检测及分析 PEDV M、N 蛋白及内参蛋白的表达情况。

### 3 结果

#### 3.1 PEDV 细胞毒 PCR 检测结果

对本实验室分离的猪流行性腹泻病毒 HB-HS 株经 Vero 细胞增殖传代后进行 RT-PCR 检测，经过提取 RNA、反转录获得 cDNA，利用本实验 PEDV 检测引物进行 PCR 扩增，其引物扩增条带大小为 642 bp，最终结果与预期一致如图 3-1，说明病毒在 Vero 细胞内成功增殖。

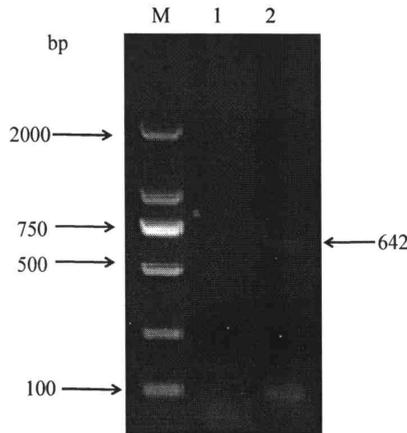


图 3-1 PEDV RT-PCR 检测

Fig. 3-1 The RT-PCR detection of PEDV

注：M. 2000 DNA 分子标准量； 1. 阴性对照； 2. 检测样品。

Note: M. DL2000 Maker; 1. negative control; 2. samples.

#### 3.2 构建 pGenesil-shRNA 阳性重组质粒的酶切鉴定

因为 pGenesil-1 质粒载体中是含有两个 *Sal* I 酶切位点，在使用 *Sal* I 进行酶切后，可得到 352 bp 和 4505 bp 两个片段。在阳性重组质粒中，双链 DNA 目的片段取代了原有的一段多克隆位点，只余一个 *Sal* I 酶切位点，所以单酶切时阳性重组质粒酶切后无 352 bp 的小片段，只有一条 4890 bp 的大片段（图 3-2），初步判定 shRNA 序列成功插入到载体中。阳性质粒经上海生工生物公司测序，结果证实插入目的片段与设计的序列完全一致，将重组质粒分别命名为 pGenesil-M、pGenesil-N 和 pGenesil-NC。

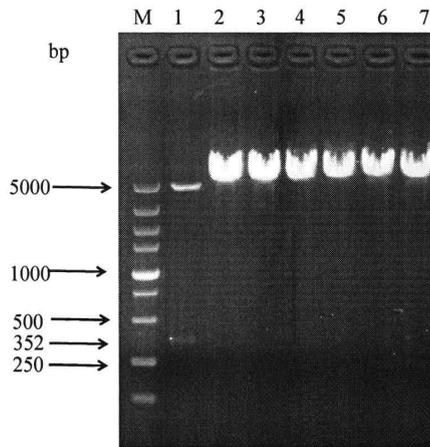


图 3-2 pGenesil-shRNA 重组质粒经 *Sal* I 酶切电泳结果

Fig. 3-2 Electrophoretic identification of pGenesil-shRNA recombinant plasmids by restriction endonuclease *Sal* I digestion

注: M.DL5000DNA 分子标准量; 1.pGenesil-1 质粒; 2,3.pGenesil-M 质粒; 4,5.pGenesil-N 质粒; 6,7.pGenesil-NC 质粒

Note: M.DL5000marker; 1.Plasmid of pGenesil-1; 2,3.Plasmid of pGenesil-M; 4,5.Plasmid of pGenesil-N; 6,7.Plasmid of pGenesil-NC

### 3.3 重组质粒 pGenesil-shRNA 瞬时转染 Vero 细胞及 G418 筛选细胞系

#### 3.3.1 重组质粒的瞬时转染结果

将事先准备好的 Vero 细胞接种到 24 孔板中,按照 QuickShuttle-Basic 转染试剂说明书,分别瞬时转染 pGenesil-M、pGenesil-N 和 pGenesil-NC 质粒,每种质粒重复转染 3 孔。转染 16 h 后,荧光倒置显微镜 100 倍放大观察三种质粒的转染情况。如图 3-3 所示,三种质粒的荧光较少,说明瞬时转染效率较低,暂时达不到较高水平的实验要求。根据 pGenesil-1 质粒载体带有 Neo 抗性基因,所以在瞬时转染 Vero 细胞效率较低时,可利用 G418 进行筛选最终获得质粒表达效率高且稳定细胞系。

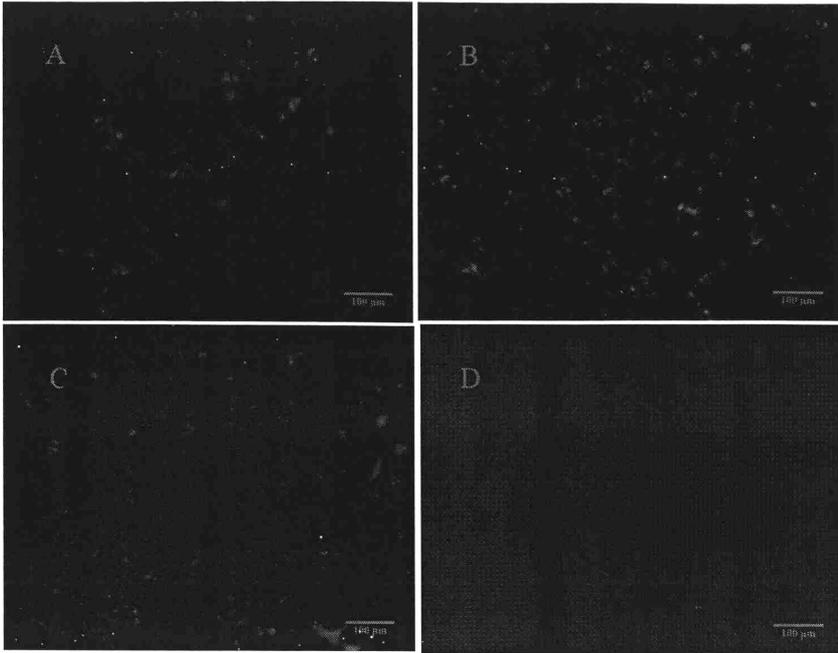


图 3-3 荧光显微镜观察质粒瞬时转染的结果

Fig. 3-3 The results of plasmid transient transfection were observed under a fluorescence microscope

注：A.pGenesil-M 质粒瞬时转染组; B.pGenesil-N 质粒瞬时转染组; C.pGenesil-NC 质粒瞬时转染组; D.阴性对照

Note:: A.group of pGenesil-M plasmid transient transfection; B.group of pGenesil-N plasmid transient transfection; C.group of pGenesil-NC plasmid transient transfection; D.negative control

### 3.3.2 G418筛选细胞系

#### 3.3.2.1 筛选 Vero 细胞 G418 最佳浓度的确定

将 Vero 细胞接种到 24 孔板，待细胞汇合率达到 50 %左右时，依次加入浓度为 0, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的 G418 进行滴度筛选，起初 Vero 细胞没有出现死亡，随着时间的加长，加入 G418 高浓度的 Vero 细胞开始出现死亡。细胞在筛选到 14 天时，G418 含量为 400  $\mu\text{g}/\text{mL}$  以上所有细胞全部死亡。所以 Vero 细胞最佳筛选浓度确定为 400  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

#### 3.3.2.2 细胞系的建立

重组质粒瞬时转染 Vero 细胞 24 h 后，在 24 孔板中每孔加入浓度为 400  $\mu\text{g}/\text{mL}$  G418 进行筛选，筛选 7 天后，24 孔板内 Vero 细胞大部分死亡，只留下小部分具有 G418 抗性的 Vero 细胞存活，这些细胞质粒表达稳定。荧光显微镜下观察存活的细胞，然后扩大培养绿色荧光强度高的细胞，历时一个月时间，筛选出稳定高效表达质粒的 Vero 细胞系。如图 3-4 是第 10 代细胞利用倒

置荧光显微镜 100 倍放大观察细胞内质粒绿色荧光表达情况。如图可见质粒在 Vero 细胞内高效表达。

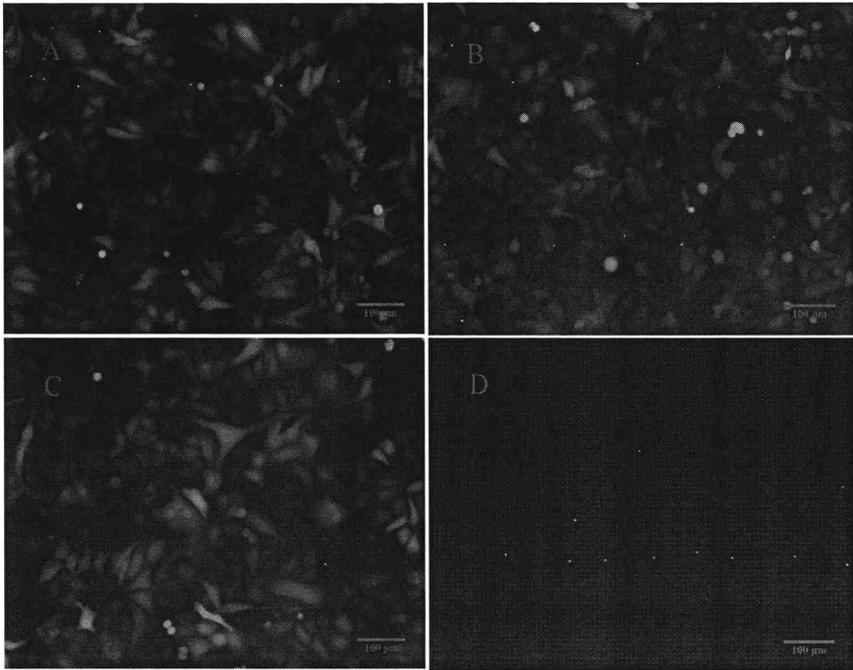


图 3-4 荧光显微镜观察 Vero 细胞质粒表达的结果

Fig. 3-4 The results of plasmid expression in Vero cells were observed under a fluorescence microscope

注：A. pGenesil-M 质粒转染组; B. pGenesil-N 质粒转染组; C. pGenesil-NC 质粒转染组; D. 阴性对照

Note:: A.group of pGenesil-M plasmid transfection; B.group of pGenesil-N plasmid transfection; C.group of pGenesil-NC plasmid transfection; D.negative control

利用 DNA 提取试剂盒提取第 10 代 3 种不同质粒的 Vero 细胞总 DNA，然后利用设计好的引物建立 20  $\mu$ L 体系进行 PCR 扩增，其引物扩增条带大小为 263 bp，PCR 产物在 1.5 %琼脂糖凝胶电泳鉴定最终结果与预期一致如图 3-5，进一步说明成功建立了重组质粒 pGenesil-M、pGenesil-N 和 pGenesil-NC 细胞系。

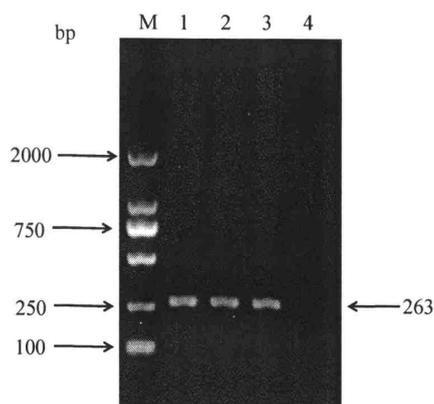


图 3-5 第 10 代 Vero 细胞质粒 PCR 鉴定结果

Fig. 3-5 Result of Passage 10 Vero cells plasmid PCR

注: M.DL2000DNA 分子标准量; 1.第 10 代 pGenesil-M 质粒细胞; 2.第 10 代 pGenesil-N 质粒细胞; 3.第 10 代 pGenesil-NC 质粒细胞; 4. Vero 细胞

Note: M.DL2000 marker; 1.Passage 10 of pGenesil-M plasmid cells; 2.Passage 10 of pGenesil-N plasmid cells; 3.Passage 10 of pGenesil-NC plasmid cells; 4.Vero cells

### 3.4 不同样品中病毒感染滴度测定结果

三种重组质粒的 Vero 细胞系及未转染质粒的正常 Vero 细胞分别接种 1000 TCID<sub>50</sub> PEDV, 培养 48 h 后反复冻融 3 次收取病毒上清液。然后分别进行病毒 TCID<sub>50</sub> 的检测, 按 Reed-Muench 法计算结果得出转染 pGenesil-M、pGenesil-N、pGenesil-NC 质粒组及阳性对照组病毒的感染滴度分别为  $10^{4.23}$ 、 $10^{3.86}$ 、 $10^{5.65}$ 、 $10^{5.62}$ 。如图 3-6 所示, 转染 pGenesil-NC 质粒的对照细胞及未转染质粒的正常 Vero 细胞接种病毒 48 h 后的感染滴度, 均高于转染 pGenesil-M、pGenesil-N 质粒基因组病毒的感染滴度。未转染质粒的阳性对照组与转染质粒组进行比较, 得出转染 pGenesil-M、pGenesil-N 质粒组接种 48 h 后病毒滴度分别降低 24.5 倍和 57.5 倍, 在统计学上讲差异显著 ( $P < 0.05$ ) 具有统计学意义。这些数据表明基于 M 和 N 基因的 siRNA 对 PEDV 在 Vero 细胞内的复制过程中能够有效的降低病毒的感染滴度, 其中 pGenesil-N 质粒的抑制效果要高于 pGenesil-M 质粒, 表明了不同基因的 siRNA 对 PEDV 的感染滴度会产生不同的抑制效果。

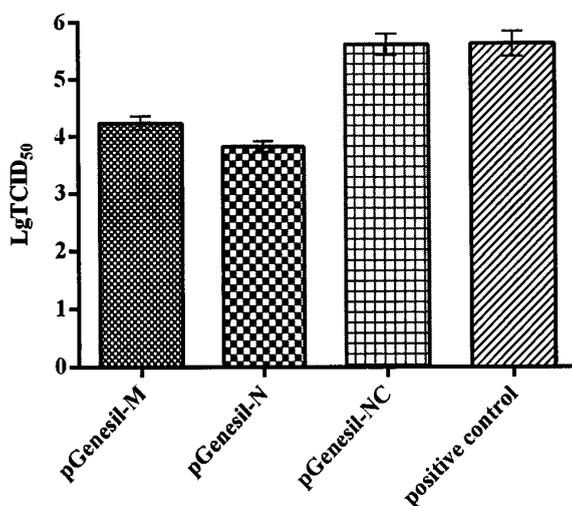


图 3-6 病毒感染滴度测定结果

Fig. 3-6 Quantity of infectious PEDV production

### 3.5 应用 TaqMan 实时荧光定量 PCR 对 RNA 干扰效果的检测结果

#### 3.5.1 PEDV TaqMan 实时荧光定量 PCR 标准曲线的建立结果

荧光定量标准曲线的模板选用  $10^{-3}$ - $10^{-9}$  倍稀释的 PEDV M 基因标准质粒, 然后加入引物和探针组成  $15 \mu\text{L}$  体系, 进行荧光定量 PCR 扩增, 最终获得检测 PEDV TaqMan 荧光定量 PCR 标准曲线图 3-7。标准曲线横坐标显示为 DNA copies/ $\mu\text{L}$  数值, 纵坐标显示为反应阈值循环数 (cycle quantity, cq), 两者呈线性反应关系 ( $R^2=1$ )。根据建立的标准曲线方程, 表明不同浓度质粒的扩增与 cq 值存在良好的线性关系, 可以用于 PEDV 的定量分析。

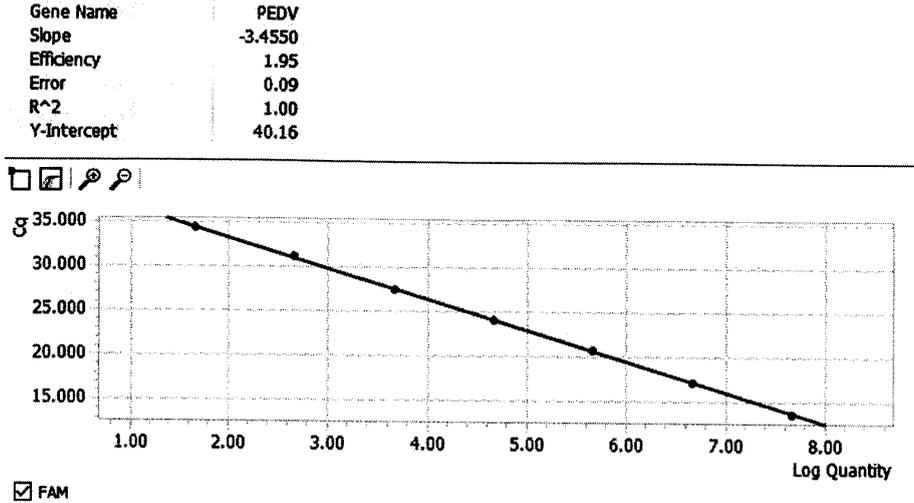


图 3-7 PEDV TaqMan 实时荧光定量 PCR 标准曲线图

Fig. 3-7 TaqMan Real-time PCR standard curve graph for PEDV

### 3.5.2 管家基因β-actin TaqMan实时荧光定量PCR标准曲线的建立结果

选用  $10^{-3}$ - $10^{-9}$  倍稀释的部分管家基因标准质粒做为荧光定量标准曲线的模板，然后加入引物和探针组成  $15\mu\text{L}$  体系，进行荧光定量 PCR 扩增，最终获得检测β-actin TaqMan 荧光定量 PCR 标准曲线图 3-8。标准曲线横坐标显示为 DNA copies/ $\mu\text{L}$  数值，纵坐标显示为反应阈值循环数 (cycle quantity, cq)，两者呈线性反应关系 ( $R^2=1$ )。根据建立的标准曲线方程，表明不同浓度质粒的扩增与 cq 值存在良好的线性关系，可以用于β-actin 的定量分析。

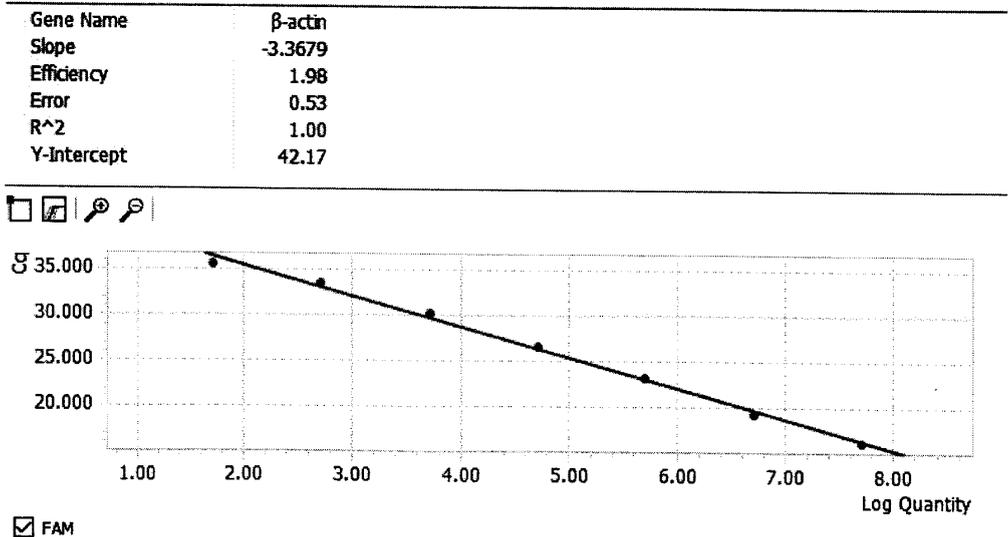


图 3-8 β-actin TaqMan 实时荧光定量 PCR 标准曲线图

Fig. 3-8 TaqMan Real-time PCR standard curve graph for β-actin

## 3.5.3 TaqMan实时荧光定量PCR检测结果

三种重组质粒的 Vero 细胞系及未转染质粒的正常 Vero 细胞分别接种 1000 TCID<sub>50</sub> PEDV, 培养 48h 后反复冻融 3 次收取病毒上清液。然后用 Trizol 法提取样品总 RNA, DNase I 处理后反转录成 cDNA, 然后进行 TaqMan 实时荧光定量 PCR 扩增, 同时以转录相对保守的  $\beta$ -actin 基因作为内参。每个样品重复三孔, 得出结果如下表 3-1, 然后利用平均值采用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  方法计算。将未转染质粒的 Vero 细胞阳性对照组的值设为“1”, 计算出各个检测样品的相对量, 结果得出阴性对照质粒 pGenesil-NC、pGenesil-M 和 pGenesil-N 质粒的相对值分别为 0.986、0.354、和 0.301, 质粒 pGenesil-M 和 pGenesil-N 的抑制率分别达到 64.6 %和 69.9 %。进一步说明这两种质粒对 PEDV mRNA 的表达具有明显的抑制作用, 其中 pGenesil-N 质粒的抑制效果较好。

表 3-1 荧光定量 PCR 检测结果

Table 3-1 The results of Real-time qPCR

类别	pGenesil-M		pGenesil-N		pGenesil-NC		阳性对照	
	PEDV	$\beta$ -actin	PEDV	$\beta$ -actin	PEDV	$\beta$ -actin	PEDV	$\beta$ -actin
Cq 值	34.39	24.85	35.01	25.27	32.23	24.22	32.62	24.59
	34.51	25.02	35.05	25.32	32.06	24.05	32.64	24.65
	34.43	24.95	34.82	25.10	32.19	24.16	32.58	24.60
平均值	34.44	24.94	34.96	25.23	32.16	24.14	32.61	24.61

## 3.6 针对 PEDV M 和 N 蛋白表达检测结果

三种重组质粒的 Vero 细胞系及未转染质粒的正常 Vero 细胞分别接种 1000 TCID<sub>50</sub> PEDV, 培养 48 h 后刮下细胞层利用 RIPA 裂解液裂解细胞, 分别提取上清液, 进行 Western-blotting 技术检测病毒 M 和 N 蛋白表达情况, 其中 M 蛋白约 27.6 KD, N 蛋白约 58 KD, 内参蛋白  $\beta$ -actin 为 43 KD。结果如图 3-9 所示, 使用 ImageJ 软件分析 pGenesil-M、pGenesil-N、pGenesil-NC 阴性对照、阳性对照中内参蛋白  $\beta$ -actin 条带浓度, 分别是 24.96 %、24.95 %、25.05 %、25.04 %浓度相当, 保证了实验的准确性。如图 3-10 所示, 针对转染 pGenesil-M 和 pGenesil-N 质粒的 Vero 细胞中病毒的 M 和 N 蛋白条带信号强度均低于转染 pGenesil-NC 质粒和阳性对照的蛋白信号强度。进一步利用 ImageJ 软件分析各样品中 PEDV 的 M 和 N 蛋白的相对含量, 得出阳性对照和 pGenesil-NC、pGenesil-M 和 pGenesil-N M 蛋白相对含量分别为 29.72 %、29.81 %、21.53 %和 18.94 %, N 蛋白的相对含量分别为 31.07 %、30.51 %、20.91 %和 17.51 %。表明靶向 M 和 N 基因的 siRNA 同时抑制了 PEDV 的 M 和 N 蛋白的合成, 以靶位点 N 基因的 siRNA 抑制效果最强。

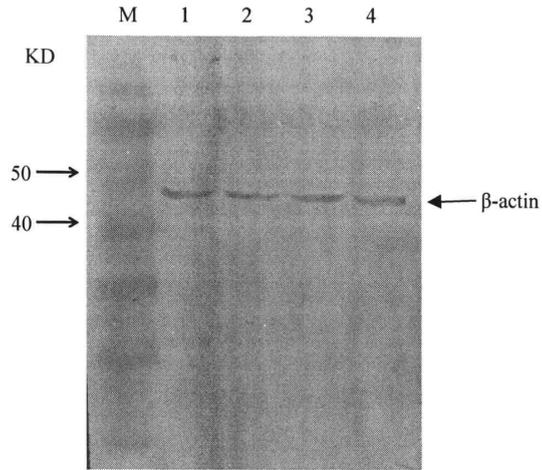


图 3-9  $\beta$ -actin 蛋白的 Western-blotting 分析

Fig. 3-9 Analysis of  $\beta$ -actin protein by Western-blotting

注: M.Blue plus protein marker; 1.pGenesil-M; 2.pGenesil-N; 3.pGenesil-NC; 4. positive control

Note: M.Blue plus protein marker; 1.pGenesil-M; 2.pGenesil-N; 3.pGenesil-NC; 4. positive control

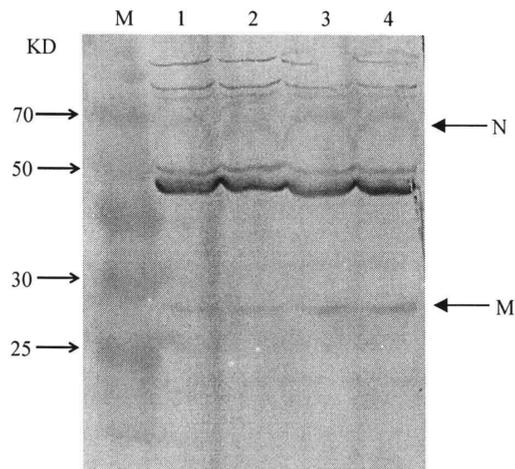


图 3-10 PEDV M 与 N 蛋白的 Western-blotting 分析

Fig. 3-10 Analysis of PEDV M and N proteins by Western-blotting

注: M.Blue plus protein marker; 1.pGenesil-M; 2.pGenesil-N; 3.pGenesil-NC; 4. positive control

Note: M.Blue plus protein marker; 1.pGenesil-M; 2.pGenesil-N; 3.pGenesil-NC; 4. positive control

## 4 讨论

### 4.1 PEDV M 和 N 基因的 siRNA 筛选及表达质粒的构建

科学家根据自然界发生的 RNA 干扰(RNA interference, RNAi)现象来模拟出类似的 RNAi 技术用于抑制靶基因的表达,他们在研究自然界中 RNA 干扰的过程时发现 19 bp-21 bp 的 siRNA 是由细胞内的 Dicer 酶切割双链 RNA 产生的并发挥其作用。RNA 干扰现象是自然界中机体的一种防御机制,是指外源 dsRNA (double stranded) 进入细胞后引起同源靶 mRNA 降解,导致靶基因表达发生沉默的现象。因此靶序列对 RNAi 的效果至关重要,我们选择的靶序列要具有一定的结构模式和原则。靶序列的选择主要遵循以下原则:靶序列在基因上的位置很重要,尽量避免 5' 和 3' 端的非编码区,这些区域影响 siRNA 复合物与 mRNA 结合降低 RNAi 的效果,通常起始密码子下游 50 bp-100 bp 和终止密码子上游 100 bp 之间的序列选取目的基因;5' 端第一个碱基是 A 或 U,19 位一般为 G 或 C,1-7 位富含 AU;避免出现连续超过 3 个 G 或 C;建议选择低 GC 含量的序列,30-52% 的 GC 含量的 siRNA 抑制效率更高;RNA 聚合酶 III 转录终止信号是 4-6 个的 poly(T),靶序列中避免出现  $\geq 4$  个 T 或 A 的情况;避免 siRNA 序列作用于复杂二级结构;经 BLAST 分析,排除与其他基因同源性高的靶位点。以上原则是总结前人的研究成果。

PEDV 基因组含有 7 个 ORFs,分别是 ORF1a、ORF1b、S、E、M、N 和 ORF3。在这 7 个 ORFs 中,M 基因和 N 基因在不同 PEDV 之间高度保守,分别编码 M 蛋白和 N 蛋白。M 蛋白是膜蛋白,主要参与病毒粒子的装配<sup>[57]</sup>。N 蛋白是核衣壳蛋白是 RNA 结合蛋白,该蛋白的作用很多主要参与基因组的转录及组装等<sup>[125]</sup>。它对病毒的复制和感染有紧密的联系<sup>[126]</sup>。因此,在本实验中以 PEDV 复制和病毒粒子形成密切相关的 M 和 N 基因为靶基因,通过 Ambion 公司的在线的 RNAi design 工具设计了多个针对 M 和 N 基因的 siRNA,再遵循靶序列的结构模式进行筛选。最终确定了 2 个 siRNA 序列及 1 个阴性对照序列。

目前来讲,siRNA 的合成方式较多,其中应用较多的是化学合成法和体内转录法。化学合成法主要是以核苷酸为基础材料合成两条 RNA 单链,两条单链要具有完全互补性,然后经过退火形成双链分子,但是此方法周期较长,作用时间短,且价格昂贵,限制推广。体内转录法是将 siRNA 的表达质粒、病毒表达载体转入细胞,在细胞内转录成 shRNA,shRNA 经 Dicer 酶剪切成 siRNA,进而诱发 RNAi。该方法优点是对细胞特异性强,适用于基因功能的长时间研究。因此本实验就是采用体内转录法,在筛选 siRNA 靶序列后,设计合成 shRNA 型 DNA 核苷酸,它由正义链、loop 环和反义链组成,退火形成双链与 pGenesil-1 载体连接,构建 siRNA 表达质粒。载体 pGenesil-1 为 RNAi 载体,含有 RNA 聚合酶 III (RNA polymerase III, RNA pol III) 启动子,调控 shRNA 的启动子为 hU6 启动子,带有 EGFP 荧光基团和 Neo 抗性基因,可在真核细胞内用 G418 进行筛选,便于细胞系的建立。本研究成功构建了基于 M 和 N 基因的 siRNA 重组表达质粒 pGenesil-M、pGenesil-N 和 pGenesil-NC。

## 4.2 不同重组质粒转染 Vero 细胞及细胞系的建立

将 siRNA 表达质粒转染细胞,可以利用 RNAi 沉默基因来揭示人类、动植物某段基因的功能,以及用于探索病毒传染病、肿瘤及癌症等治疗方面的新途径<sup>[127, 128]</sup>。Shen 等研究证明靶向 PEDV M 和 N 基因的 siRNA 表达质粒能够抑制该病毒体外复制和蛋白的合成<sup>[129]</sup>。脂质体、聚合物和多肽都属于非病毒性载体,优点是免疫原性可递送片段大的基因等,但是在细胞转染效率方面不如病毒性载体<sup>[130, 131]</sup>,故提高转染效率是重中之重。目前载体中以脂质体应用最广泛,于是本研究选用脂质体转染试剂将构建的质粒转染到 Vero 细胞,我们利用倒置荧光显微镜查看初次转染效率,结果显示转染效率确实较差,达不到预期转染效果,于是我们利用 G418 筛选阳性质粒细胞。

G418 是氨基糖类抗生素,它的结构大致与卡那霉素相似。机理是阻断蛋白质的合成,影响 80S 核糖体的功能,对原核细胞和真核细胞均有毒性。G418 常作为一种选择试剂用来筛选阳性稳定转染细胞系。不同的细胞种类针对 G418 的最低死亡浓度是不同的,所以在筛选之前,一定要确定 G418 的最佳筛选浓度。经过我们试验得出 Vero 细胞 G418 最佳筛选浓度确定为 400  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,我们就利用该浓度进行细胞的筛选。在筛选一周后,24 孔板大部分的 Vero 细胞出现死亡,只留下很少的存活细胞,然后利用倒置荧光显微镜观察存活的 Vero 细胞,再将没有绿色荧光的细胞用无菌枪头刮掉,只繁殖培养具有绿色荧光表达的 Vero 细胞。本研究经过长达一个月的筛选,我们成功建立了 3 种 siRNA 表达质粒的 Vero 细胞系。

## 4.3 质粒表达的 siRNA 对 PEDV 在 Vero 细胞内复制的抑制效应

本研究将稳定表达 siRNA 质粒的 Vero 细胞系及未转染质粒的正常 Vero 细胞分别感染 1000 TCID<sub>50</sub> PEDV。然后在感染 24 h 之后,通过检测病毒 TCID<sub>50</sub> 结果显示,转染 pGenesil-M, pGenesil-N 质粒组 PEDV 感染滴度均低于转染 pGenesil-NC 质粒组及阳性对照组;应用 TaqMan 实时荧光定量 PCR 对 Vero 细胞中 PEDV 的 mRNA 进行检测,结果表明转染 pGenesil-M, pGenesil-N 质粒组 PEDV mRNA 水平均低于转染 pGenesil-NC 质粒组及阳性对照组;应用 Western-blotting 技术对 M、N 蛋白的表达水平进行检测,结果得出 pGenesil-M, pGenesil-N 质粒均能抑制 M 和 N 蛋白的表达水平。通过以上可以得出 pGenesil-M, pGenesil-N 质粒对 PEDV 在 Vero 细胞内的复制具有一定的抑制作用,其中以 pGenesil-N 质粒抑制效果较好,表明针对不同基因构建的 siRNA 干扰质粒对 PEDV 的复制会产生不同的抑制效果。

综上所述,靶向 PEDV M 和 N 基因的 siRNA 能够快速、特异地抑制 PEDV 在 Vero 细胞中的复制,为进一步开展体内研究提供了基础,同时也为开展治疗 PED 新型制剂研究提供了重要的试验依据。

## 5 结论

5.1 成功构建出三个表达质粒 pGenesil-M、pGenesil-N 和 pGenesil-NC。

5.2 利用 G418 筛选成功获得稳定表达不同 siRNA 的 3 种 Vero 细胞系。

5.3 通过病毒的 TCID<sub>50</sub>、TaqMan 荧光定量 PCR 及 Western-blotting 检测结果，得出靶向 M 和 N 基因的 siRNA 能够明显降低病毒感染滴度、mRNA 水平及蛋白的表达，进一步说明这两种 siRNA 对 PEDV 在 Vero 细胞中的复制均起到一定的抑制作用，其中以靶向 N 基因的 siRNA 抑制效果较好。

## 参考文献

- [1] Wang L, Zhang Y, Byrum B. Development and evaluation of a duplex real-time RT-PCR for detection and differentiation of virulent and variant strains of porcine epidemic diarrhea viruses from the United States[J]. *J Virol Methods*, 2014,207:154-157.
- [2] Duarte M, Gelfi J, Lambert P, et al. Genome organization of porcine epidemic diarrhoea virus[J]. *Adv Exp Med Biol*, 1993,342:55-60.
- [3] Pensaert M B, de Bouck P. A new coronavirus-like particle associated with diarrhea in swine[J]. *Arch Virol*, 1978,58(3):243-247.
- [4] Debouck P, Pensaert M. Experimental infection of pigs with a new porcine enteric coronavirus, CV 777[J]. *Am J Vet Res*, 1980,41(2):219-223.
- [5] 李佑民, 柳桂信, 朱维正, 等. 吉林省“猪传染性胃肠炎”疫情调查、人工感染传代和病毒分离试验[J]. *家畜传染病*, 1981(01):1-7.
- [6] 宋聪, 刘宁, 姚俊, 等. 猪流行性腹泻病毒的实验室检测方法和生产防控措施[J]. *养猪*, 2015(04):93-96.
- [7] 林裕胜, 王隆柏, 吴秋玉, 等. 福建省猪流行性腹泻流行病学调查[J]. *中国农学通报*, 2014(35):83-86.
- [8] Pasick J, Berhane Y, Ojkic D, et al. Investigation into the role of potentially contaminated feed as a source of the first-detected outbreaks of porcine epidemic diarrhea in Canada[J]. *Transbound Emerg Dis*, 2014,61(5):397-410.
- [9] Alonso C, Goede D P, Morrison R B, et al. Evidence of infectivity of airborne porcine epidemic diarrhea virus and detection of airborne viral RNA at long distances from infected herds[J]. *Vet Res*, 2014,45:73.
- [10] Li W, Li H, Liu Y, et al. New variants of porcine epidemic diarrhea virus, China, 2011[J]. *Emerg Infect Dis*, 2012,18(8):1350-1353.
- [11] Sun R Q, Cai R J, Chen Y Q, et al. Outbreak of porcine epidemic diarrhea in suckling piglets, China[J]. *Emerg Infect Dis*, 2012,18(1):161-163.
- [12] Pensaert M B, Martelli P. Porcine epidemic diarrhea: A retrospect from Europe and matters of debate[J]. *Virus Res*, 2016,226:1-6.
- [13] 宣华, 邢德坤, 王殿瀛, 等. 应用猪胎肠单层细胞培养猪流行性腹泻病毒的研究[J]. *兽医大学学报*, 1984(03):202-208.
- [14] 刘云波, 赵洪翠, 王志成, 等. 猪病毒性腹泻分子流行病学调查[J]. *中国畜牧兽医*, 2013(02):204-207.
- [15] Sun D, Wang X, Wei S, et al. Epidemiology and vaccine of porcine epidemic diarrhea virus in China: a mini-review[J]. *J Vet Med Sci*, 2016,78(3):355-363.
- [16] Stevenson G W, Hoang H, Schwartz K J, et al. Emergence of Porcine epidemic diarrhea virus in the United States: clinical signs, lesions, and viral genomic sequences[J]. *J Vet Diagn Invest*,

- 2013,25(5):649-654.
- [17] Vlasova A N, Marthaler D, Wang Q, et al. Distinct characteristics and complex evolution of PEDV strains, North America, May 2013-February 2014[J]. *Emerg Infect Dis*, 2014,20(10):1620-1628.
- [18] Lin C N, Chung W B, Chang S W, et al. US-like strain of porcine epidemic diarrhea virus outbreaks in Taiwan, 2013-2014[J]. *J Vet Med Sci*, 2014,76(9):1297-1299.
- [19] Cho Y Y, Lim S I, Kim Y K, et al. Complete Genome Sequence of K14JB01, a Novel Variant Strain of Porcine Epidemic Diarrhea Virus in South Korea[J]. *Genome Announc*, 2014,2(3).
- [20] Huang Y W, Dickerman A W, Pineyro P, et al. Origin, evolution, and genotyping of emergent porcine epidemic diarrhea virus strains in the United States[J]. *MBio*, 2013,4(5): e713-e737.
- [21] Dastjerdi A, Carr J, Ellis R J, et al. Porcine Epidemic Diarrhea Virus among Farmed Pigs, Ukraine[J]. *Emerg Infect Dis*, 2015,21(12):2235-2237.
- [22] Grasland B, Bigault L, Bernard C, et al. Complete genome sequence of a porcine epidemic diarrhea s gene indel strain isolated in france in december 2014[J]. *Genome Announc*, 2015,3(3).
- [23] Hanke D, Jenckel M, Petrov A, et al. Comparison of porcine epidemic diarrhea viruses from Germany and the United States, 2014[J]. *Emerg Infect Dis*, 2015,21(3):493-496.
- [24] Mesquita J R, Hakze-van D H R, Almeida A, et al. Outbreak of Porcine Epidemic Diarrhea Virus in Portugal, 2015[J]. *Transbound Emerg Dis*, 2015,62(6):586-588.
- [25] Steinrigl A, Fernandez S R, Stoiber F, et al. First detection, clinical presentation and phylogenetic characterization of Porcine epidemic diarrhea virus in Austria[J]. *BMC Vet Res*, 2015,11:310.
- [26] Theuns S, Conceicao-Neto N, Christiaens I, et al. Complete genome sequence of a porcine epidemic diarrhea virus from a novel outbreak in belgium, january 2015[J]. *Genome Announc*, 2015,3(3).
- [27] Jung K, Wang Q, Scheuer K A, et al. Pathology of US porcine epidemic diarrhea virus strain PC21A in gnotobiotic pigs[J]. *Emerg Infect Dis*, 2014,20(4):662-665.
- [28] Song D, Park B. Porcine epidemic diarrhoea virus: a comprehensive review of molecular epidemiology, diagnosis, and vaccines[J]. *Virus Genes*, 2012,44(2):167-175.
- [29] Kocherhans R, Bridgen A, Ackermann M, et al. Completion of the porcine epidemic diarrhoea coronavirus (PEDV) genome sequence[J]. *Virus Genes*, 2001,23(2):137-144.
- [30] Lee C. Porcine epidemic diarrhea virus: An emerging and re-emerging epizootic swine virus[J]. *Virol J*, 2015,12:193.
- [31] Duarte M, Gelfi J, Lambert P, et al. Genome organization of porcine epidemic diarrhoea virus[J]. *Adv Exp Med Biol*, 1993,342:55-60.
- [32] Brian D A, Baric R S. Coronavirus genome structure and replication[J]. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2005,287:1-30.
- [33] Zhang Q, Shi K, Yoo D. Suppression of type I interferon production by porcine epidemic diarrhea virus and degradation of CREB-binding protein by nsp1[J]. *Virology*, 2016,489:252-268.
- [34] Enjuanes L, Sola I, Almazan F, et al. Coronavirus derived expression systems[J]. *J Biotechnol*, 2001,88(3):183-204.
- [35] Masters P S. The molecular biology of coronaviruses[J]. *Adv Virus Res*, 2006,66:193-292.

- [36] Li B X, Ge J W, Li Y J. Porcine aminopeptidase N is a functional receptor for the PEDV coronavirus[J]. *Virology*, 2007,365(1):166-172.
- [37] Cruz D J, Kim C J, Shin H J. The GPRLQPY motif located at the carboxy-terminal of the spike protein induces antibodies that neutralize Porcine epidemic diarrhea virus[J]. *Virus Res*, 2008,132(1-2):192-196.
- [38] Chang S H, Bae J L, Kang T J, et al. Identification of the epitope region capable of inducing neutralizing antibodies against the porcine epidemic diarrhea virus[J]. *Mol Cells*, 2002,14(2):295-299.
- [39] Sun D, Feng L, Shi H, et al. Identification of two novel B cell epitopes on porcine epidemic diarrhea virus spike protein[J]. *Vet Microbiol*, 2008,131(1-2):73-81.
- [40] Park S J, Moon H J, Yang J S, et al. Sequence analysis of the partial spike glycoprotein gene of porcine epidemic diarrhea viruses isolated in Korea[J]. *Virus Genes*, 2007,35(2):321-332.
- [41] Bosch B J, van der Zee R, de Haan C A, et al. The coronavirus spike protein is a class I virus fusion protein: structural and functional characterization of the fusion core complex[J]. *J Virol*, 2003,77(16):8801-8811.
- [42] 向敏, 张洁, 高其双, 等. 猪流行性腹泻病毒COE核酸疫苗的构建及免疫原性[J]. *中国兽医学报*, 2013(11):1627-1630.
- [43] 徐丽丽. 猪流行性腹泻病毒重组沙门氏菌的构建及免疫原性分析[D]. 华中农业大学, 2011.
- [44] Oh J, Lee K W, Choi H W, et al. Immunogenicity and protective efficacy of recombinant S1 domain of the porcine epidemic diarrhea virus spike protein[J]. *Arch Virol*, 2014,159(11):2977-2987.
- [45] Woods R D. Efficacy of a transmissible gastroenteritis coronavirus with an altered ORF-3 gene[J]. *Can J Vet Res*, 2001,65(1):28-32.
- [46] Herrewegh A A, Vennema H, Horzinek M C, et al. The molecular genetics of feline coronaviruses: comparative sequence analysis of the ORF7a/7b transcription unit of different biotypes[J]. *Virology*, 1995,212(2):622-631.
- [47] Park S J, Moon H J, Luo Y, et al. Cloning and further sequence analysis of the ORF3 gene of wild- and attenuated-type porcine epidemic diarrhea viruses[J]. *Virus Genes*, 2008,36(1):95-104.
- [48] Li C, Li Z, Zou Y, et al. Manipulation of the porcine epidemic diarrhea virus genome using targeted RNA recombination[J]. *PLoS One*, 2013,8(8): e69997.
- [49] Wang K, Lu W, Chen J, et al. PEDV ORF3 encodes an ion channel protein and regulates virus production[J]. *FEBS Lett*, 2012,586(4):384-391.
- [50] De Haan C A, Kuo L, Masters P S, et al. Coronavirus particle assembly: primary structure requirements of the membrane protein[J]. *J Virol*, 1998,72(8):6838-6850.
- [51] Xu X G, Zhang H L, Zhang Q, et al. Porcine epidemic diarrhea virus M protein blocks cell cycle progression at S-phase and its subcellular localization in the porcine intestinal epithelial cells[J]. *Acta Virol*, 2015,59(3):265-275.
- [52] Fan H, Ye Y, Luo Y, et al. Quantitative proteomics using stable isotope labeling with amino acids in cell culture reveals protein and pathway regulation in porcine circovirus type 2 infected PK-15 cells[J]. *J Proteome Res*, 2012,11(2):995-1008.

- [53] Zhang Z, Chen J, Shi H, et al. Identification of a conserved linear B-cell epitope in the M protein of porcine epidemic diarrhea virus[J]. *Virol J*, 2012,9:225.
- [54] Ren X, Suo S, Jang Y S. Development of a porcine epidemic diarrhea virus M protein-based ELISA for virus detection[J]. *Biotechnol Lett*, 2011,33(2):215-220.
- [55] Corse E, Machamer C E. Infectious bronchitis virus E protein is targeted to the Golgi complex and directs release of virus-like particles[J]. *J Virol*, 2000,74(9):4319-4326.
- [56] Ye Y, Hogue B G. Role of the coronavirus E viroporin protein transmembrane domain in virus assembly[J]. *J Virol*, 2007,81(7):3597-3607.
- [57] Baudoux P, Carrat C, Besnardeau L, et al. Coronavirus pseudoparticles formed with recombinant M and E proteins induce alpha interferon synthesis by leukocytes[J]. *J Virol*, 1998,72(11):8636-8643.
- [58] Hsieh P K, Chang S C, Huang C C, et al. Assembly of severe acute respiratory syndrome coronavirus RNA packaging signal into virus-like particles is nucleocapsid dependent[J]. *J Virol*, 2005,79(22):13848-13855.
- [59] Xu X, Zhang H, Zhang Q, et al. Porcine epidemic diarrhea virus E protein causes endoplasmic reticulum stress and up-regulates interleukin-8 expression[J]. *Virol J*, 2013,10:26.
- [60] Saif L J. Coronavirus immunogens[J]. *Vet Microbiol*, 1993,37(3-4):285-297.
- [61] Hou X L, Yu L Y, Liu J. Development and evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay based on recombinant nucleocapsid protein for detection of porcine epidemic diarrhea (PEDV) antibodies[J]. *Vet Microbiol*, 2007,123(1-3):86-92.
- [62] Lee H K, Yeo S G. Cloning and sequence analysis of the nucleocapsid gene of porcine epidemic diarrhea virus Chinju99[J]. *Virus Genes*, 2003,26(2):207-212.
- [63] Ding Z, Fang L, Jing H, et al. Porcine epidemic diarrhea virus nucleocapsid protein antagonizes beta interferon production by sequestering the interaction between IRF3 and TBK1[J]. *J Virol*, 2014,88(16):8936-8945.
- [64] Xu X, Zhang H, Zhang Q, et al. Porcine epidemic diarrhea virus N protein prolongs S-phase cell cycle, induces endoplasmic reticulum stress, and up-regulates interleukin-8 expression[J]. *Vet Microbiol*, 2013,164(3-4):212-221.
- [65] Huan C C, Wang H X, Sheng X X, et al. Porcine epidemic diarrhea virus nucleoprotein contributes to HMGB1 transcription and release by interacting with C/EBP-beta[J]. *Oncotarget*, 2016,7(46):75064-75080.
- [66] Jaru-Ampornpan P, Jengarn J, Wanitchang A, et al. Porcine Epidemic Diarrhea Virus 3C-Like Protease-Mediated Nucleocapsid Processing: Possible Link to Viral Cell Culture Adaptability[J]. *J Virol*, 2017,91(2).
- [67] Ishikawa K, Sekiguchi H, Ogino T, et al. Direct and rapid detection of porcine epidemic diarrhea virus by RT-PCR[J]. *J Virol Methods*, 1997,69(1-2):191-195.
- [68] Kweon C H, Lee J G, Han M G, et al. Rapid diagnosis of porcine epidemic diarrhea virus infection by polymerase chain reaction[J]. *J Vet Med Sci*, 1997,59(3):231-232.
- [69] Song D S, Kang B K, Oh J S, et al. Multiplex reverse transcription-PCR for rapid differential detection

- of porcine epidemic diarrhea virus, transmissible gastroenteritis virus, and porcine group A rotavirus[J]. *J Vet Diagn Invest*, 2006,18(3):278-281.
- [70] Kim S Y, Song D S, Park B K. Differential detection of transmissible gastroenteritis virus and porcine epidemic diarrhea virus by duplex RT-PCR[J]. *J Vet Diagn Invest*, 2001,13(6):516-520.
- [71] 佟有恩, 冯力, 李伟杰, 等. 猪流行性腹泻弱毒株的培育[J]. *中国畜禽传染病*, 1998(06):10-13.
- [72] 王明, 马思奇, 周金法, 等. 猪流行性腹泻灭活疫苗的研究[J]. *中国畜禽传染病*, 1993(05):17-19.
- [73] 马思奇, 王明, 冯力, 等. 猪传染性胃肠炎与猪流行性腹泻二联氢氧化铝细胞灭活疫苗的研究[J]. *中国畜禽传染病*, 1995(06):25-29.
- [74] 还红华, 何孔旺, 倪艳秀, 等. 猪流行性腹泻与猪传染性胃肠炎二联油乳剂灭活疫苗的田间免疫试验[J]. *中国兽医杂志*, 2002(06):29-30.
- [75] Kadoi K, Sugioka H, Satoh T, et al. The propagation of a porcine epidemic diarrhea virus in swine cell lines[J]. *New Microbiol*, 2002,25(3):285-290.
- [76] Song D S, Oh J S, Kang B K, et al. Oral efficacy of Vero cell attenuated porcine epidemic diarrhea virus DR13 strain[J]. *Res Vet Sci*, 2007,82(1):134-140.
- [77] Song D, Moon H, Kang B. Porcine epidemic diarrhea: a review of current epidemiology and available vaccines[J]. *Clin Exp Vaccine Res*, 2015,4(2):166-176.
- [78] 葛俊伟, 姜艳平, 汪淼, 等. 表达猪流行性腹泻病毒中和抗原位点的重组干酪乳杆菌免疫小鼠诱导的免疫应答[J]. *中国兽医科学*, 2010(07):708-712.
- [79] 孟凡丹. 猪传染性胃肠炎和流行性腹泻二联核酸疫苗免疫效力研究[D]. 东北农业大学, 2011.
- [80] Hamilton A J, Baulcombe D C. A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants[J]. *Science*, 1999,286(5441):950-952.
- [81] 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.
- [82] Fire A, Xu S, Montgomery M K, et al. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*[J]. *Nature*, 1998,391(6669):806-811.
- [83] Lee R C, Feinbaum R L, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*[J]. *Cell*, 1993,75(5):843-854.
- [84] 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(6836):494-498.
- [85] Jorgensen R. Altered gene expression in plants due to trans interactions between homologous genes[J]. *Trends Biotechnol*, 1990,8(12):340-344.
- [86] Romano N, Macino G. Quelling: transient inactivation of gene expression in *Neurospora crassa* by transformation with homologous sequences[J]. *Mol Microbiol*, 1992,6(22):3343-3353.
- [87] Cogoni C, Romano N, Macino G. Suppression of gene expression by homologous transgenes[J]. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 1994,65(3):205-209.
- [88] Van Wolfswinkel J C, Ketting R F. The role of small non-coding RNAs in genome stability and chromatin organization[J]. *J Cell Sci*, 2010,123(Pt 11):1825-1839.
- [89] Brantl S. Antisense-RNA regulation and RNA interference[J]. *Biochim Biophys Acta*,

- 2002,1575(1-3):15-25.
- [90] Worby C A, Simonson-Leff N, Dixon J E. RNA interference of gene expression (RNAi) in cultured *Drosophila* cells[J]. *Sci STKE*, 2001,2001(95): 11.
- [91] Orban T I, Izaurralde E. Decay of mRNAs targeted by RISC requires XRN1, the Ski complex, and the exosome[J]. *RNA*, 2005,11(4):459-469.
- [92] Lipardi C, Wei Q, Paterson B M. RNAi as random degradative PCR: siRNA primers convert mRNA into dsRNAs that are degraded to generate new siRNAs[J]. *Cell*, 2001,107(3):297-307.
- [93] Zamore P D. Ancient pathways programmed by small RNAs[J]. *Science*, 2002,296(5571):1265-1269.
- [94] Hutvagner G, Zamore P D. A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex[J]. *Science*, 2002,297(5589):2056-2060.
- [95] Martinez J, Patkaniowska A, Urlaub H, et al. Single-stranded antisense siRNAs guide target RNA cleavage in RNAi[J]. *Cell*, 2002,110(5):563-574.
- [96] Liu J, Carmell M A, Rivas F V, et al. Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi[J]. *Science*, 2004,305(5689):1437-1441.
- [97] Parker J S, Roe S M, Barford D. Structural insights into mRNA recognition from a PIWI domain-siRNA guide complex[J]. *Nature*, 2005,434(7033):663-666.
- [98] Elbashir S M, Lendeckel W, Tuschl T. RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs[J]. *Genes Dev*, 2001,15(2):188-200.
- [99] Bartel D P, Chen C Z. Micromanagers of gene expression: the potentially widespread influence of metazoan microRNAs[J]. *Nat Rev Genet*, 2004,5(5):396-400.
- [100] Wightman B, Ha I, Ruvkun G. Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*[J]. *Cell*, 1993,75(5):855-862.
- [101] Lee Y, Kim M, Han J, et al. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II[J]. *EMBO J*, 2004,23(20):4051-4060.
- [102] Lee Y, Ahn C, Han J, et al. The nuclear RNase III Droscha initiates microRNA processing[J]. *Nature*, 2003,425(6956):415-419.
- [103] Lund E, Guttlinger S, Calado A, et al. Nuclear export of microRNA precursors[J]. *Science*, 2004,303(5654):95-98.
- [104] Preall J B, Sontheimer E J. RNAi: RISC gets loaded[J]. *Cell*, 2005,123(4):543-545.
- [105] Filipowicz W, Bhattacharyya S N, Sonenberg N. Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? [J]. *Nat Rev Genet*, 2008,9(2):102-114.
- [106] Tang G, Reinhart B J, Bartel D P, et al. A biochemical framework for RNA silencing in plants[J]. *Genes Dev*, 2003,17(1):49-63.
- [107] Alvarez-Garcia I, Miska E A. MicroRNA functions in animal development and human disease[J]. *Development*, 2005,132(21):4653-4662.
- [108] Okamura K, Ishizuka A, Siomi H, et al. Distinct roles for Argonaute proteins in small RNA-directed RNA cleavage pathways[J]. *Genes Dev*, 2004,18(14):1655-1666.
- [109] Eulalio A, Huntzinger E, Izaurralde E. GW182 interaction with Argonaute is essential for

- miRNA-mediated translational repression and mRNA decay[J]. *Nat Struct Mol Biol*, 2008,15(4):346-353.
- [110] Bhattacharyya S N, Habermacher R, Martine U, et al. Stress-induced reversal of microRNA repression and mRNA P-body localization in human cells[J]. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 2006,71:513-521.
- [111] Silva J M, Mizuno H, Brady A, et al. RNA interference microarrays: high-throughput loss-of-function genetics in mammalian cells[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004,101(17):6548-6552.
- [112] Maeda I, Kohara Y, Yamamoto M, et al. Large-scale analysis of gene function in *Caenorhabditis elegans* by high-throughput RNAi[J]. *Curr Biol*, 2001,11(3):171-176.
- [113] Harborth J, Elbashir S M, Bechert K, et al. Identification of essential genes in cultured mammalian cells using small interfering RNAs[J]. *J Cell Sci*, 2001,114(Pt 24):4557-4565.
- [114] Paddison P J, Silva J M, Conklin D S, et al. A resource for large-scale RNA-interference-based screens in mammals[J]. *Nature*, 2004,428(6981):427-431.
- [115] Berns K, Hijmans E M, Mullenders J, et al. A large-scale RNAi screen in human cells identifies new components of the p53 pathway[J]. *Nature*, 2004,428(6981):431-437.
- [116] Simmer F, Moorman C, van der Linden A M, et al. Genome-wide RNAi of *C. elegans* using the hypersensitive rrf-3 strain reveals novel gene functions[J]. *PLoS Biol*, 2003,1(1): E12.
- [117] Nollen E A, Garcia S M, van Haaften G, et al. Genome-wide RNA interference screen identifies previously undescribed regulators of polyglutamine aggregation[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004,101(17):6403-6408.
- [118] Zender L, Hutker S, Liedtke C, et al. Caspase 8 small interfering RNA prevents acute liver failure in mice[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003,100(13):7797-7802.
- [119] Lee N S, Dohjima T, Bauer G, et al. Expression of small interfering RNAs targeted against HIV-1 rev transcripts in human cells[J]. *Nat Biotechnol*, 2002,20(5):500-505.
- [120] Novina C D, Murray M F, Dykxhoorn D M, et al. siRNA-directed inhibition of HIV-1 infection[J]. *Nat Med*, 2002,8(7):681-686.
- [121] Cao S F, Guo Q Y, Wang Y. Inhibition of highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus replication by recombinant pseudorabies virus-mediated RNA interference in piglets [J]. *Vet Microbiol*, 2015,181(3-4):212-220.
- [122] Wang L, Dai X, Song H, et al. Inhibition of porcine transmissible gastroenteritis virus infection in porcine kidney cells using short hairpin RNAs targeting the membrane gene[J]. *Virus Genes*, 2017,53(2):226-232.
- [123] Pomtrakulpipat S, Supankong S, Chatchawanchonteera A, et al. RNA interference targeting nucleocapsid protein (C) inhibits classical swine fever virus replication in SK-6 cells[J]. *Vet Microbiol*, 2010,142(1-2):41-44.
- [124] Nagy P, Arndt-Jovin D J, Jovin T M. Small interfering RNAs suppress the expression of endogenous and GFP-fused epidermal growth factor receptor (erbB1) and induce apoptosis in erbB1-overexpressing cells[J]. *Exp Cell Res*, 2003,285(1):39-49.

- [125] De Haan C A, Vennema H, Rottier P J. Assembly of the coronavirus envelope: homotypic interactions between the M proteins[J]. *J Virol*, 2000,74(11):4967-4978.
- [126] Shi D, Lv M, Chen J, et al. Molecular characterizations of subcellular localization signals in the nucleocapsid protein of porcine epidemic diarrhea virus[J]. *Viruses*, 2014,6(3):1253-1273.
- [127] Li H W, Ding S W. Antiviral silencing in animals[J]. *FEBS Lett*, 2005,579(26):5965-5973.
- [128] Leonard J N, Schaffer D V. Antiviral RNAi therapy: emerging approaches for hitting a moving target[J]. *Gene Ther*, 2006,13(6):532-540.
- [129] Shen H, Zhang C, Guo P, et al. Effective inhibition of porcine epidemic diarrhea virus by RNA interference in vitro[J]. *Virus Genes*, 2015,51(2):252-259.
- [130] Gao X, Huang L. Cationic liposome-mediated gene transfer[J]. *Gene Ther*, 1995,2(10):710-722.
- [131] Zhdanov R I, Podobed O V, Vlassov V V. Cationic lipid-DNA complexes-lipoplexes-for gene transfer and therapy[J]. *Bioelectrochemistry*, 2002,58(1):53-64.

## 作者简介

姓 名：牛山

性 别：男

出生日期：1991年01月05日

籍 贯：河北省廊坊市

政治面貌：中共党员

学习经历：

2012年09月-2016年06月，就读于河北农业大学动物医学院动物医学专业。

2016年09月-2018年06月，就读于河北农业大学研究生学院兽医专业。

获奖情况：

2016-2017学年：获得校级二等奖学金

## 致 谢

时光荏苒，两年的学习生涯即将结束，本论文是在我的恩师范京惠副教授的悉心指导下完成的，从课题的选择、试验的开展以及论文的撰写，范老师始终给予我耐心的指导及支持。范老师严谨的科研态度、勇于创新的科研精神、精益求精的工作作风，深深地影响着我，是我终身学习的榜样。在生活上，老师给予我细心地照顾，教导我如何为人处事，这将永远地指引着我的人生。在这论文完成之际，首先向我的导师范京惠副教授致以崇高的敬意和衷心的感谢！

在攻读硕士学位期间，感谢预防兽医学科孙继国教授、秦建华教授、袁万哲教授、宋勤叶教授、左玉柱副教授、李丽敏副教授等给予的实验和学术指导。同时感谢刘宝京师兄、罗尚星师姐对我试验的指导和帮助，感谢同届同学师乾凯、侯林杉、郑志强以及我的舍友郭阳、王子昌、郑常龙对我学习和生活的帮助和支持，感谢师弟师妹对我试验的支持和帮助。此外还要感谢我的家人多年来对我学业上的支持和理解，您们给我生活上的关怀和精神上的鼓励是我学习的动力！

借此机会，谨向所有关心、支持和帮助我的老师、家人、同学和朋友们表示深深的感谢，真心地祝福您们身体健康万事如意！

牛山

2018年6月





河北农业大学研究生学院监制