



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 116254264 A

(43) 申请公布日 2023. 06. 13

(21) 申请号 202211248146.9

C12N 7/01 (2006.01)

(22) 申请日 2022.10.12

C12N 5/10 (2006.01)

(71) 申请人 中国农业科学院兰州兽医研究所
地址 730070 甘肃省兰州市盐场堡徐家坪1号

A61K 31/7105 (2006.01)

A61P 31/12 (2006.01)

(72) 发明人 袁红 白兴文 卢曾军 黄磊
宫晓华 刘在新 孙普 李平花
包慧芳 李冬 马雪青 陈应理
曹轶梅 付元芳 赵志荀 张婧
王健

(74) 专利代理机构 北京高沃律师事务所 11569
专利代理师 薛红凡

(51) Int. Cl.

C12N 15/113 (2010.01)

C12N 15/867 (2006.01)

权利要求书1页 说明书8页

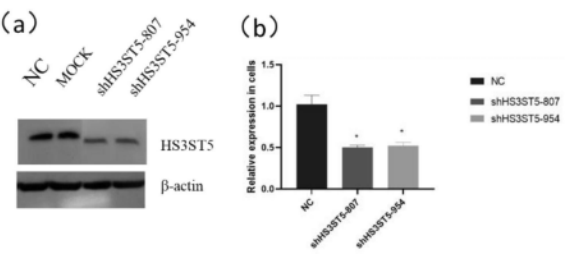
序列表 (电子公布) 附图1页

(54) 发明名称

一种沉默HS3ST5基因表达的shRNA及其重组慢病毒载体和应用

(57) 摘要

本发明提供了一种沉默HS3ST5基因表达的shRNA及其重组慢病毒载体和应用,属于基因沉默技术领域。本发明设计2种沉默HS3ST5基因表达的shRNA,并构建携带所述shRNA的重组慢病毒质粒,利用包装出重组慢病毒建立了敲降HS3ST5的重组BHK-21细胞系,结果表明,敲降HS3ST5表达水平能有效抑制病毒的增殖。可见,本发明为抗病毒感染提供了新思路。



1. 一种沉默HS3ST5基因表达的shRNA,其特征在于,所述shRNA的核苷酸序列如SEQ ID NO:1和/或SEQ ID NO:3所示。
2. 一种含shRNA的重组慢病毒质粒,其特征在于,所述shRNA为权利要求1所述shRNA。
3. 根据权利要求2所述重组慢病毒质粒,其特征在于,所述重组慢病毒质粒的骨架质粒为pLK0.1载体。
4. 一种重组慢病毒,其特征在于,由权利要求2或3所述重组慢病毒质粒和辅助质粒拯救得到。
5. 权利要求1所述shRNA、权利要求2或3所述重组慢病毒质粒或权利要求4所述重组慢病毒在降低细胞中HS3ST5基因表达中应用。
6. 一种敲降细胞中HS3ST5基因的试剂在制备降低病毒增殖的细胞或制备抗病毒感染的药物中的应用。
7. 根据权利要求6所述应用,其特征在于,所述试剂包括以下一种或几种:权利要求1所述shRNA、权利要求2或3所述重组慢病毒质粒或权利要求4所述重组慢病毒;
所述病毒包括利用HS受体入侵细胞的病毒。
8. 一种抗病毒感染的药物,其特征在于,以权利要求1所述shRNA、权利要求2或3所述重组慢病毒载体或权利要求4或5所述重组慢病毒为活性成分,还包括药学上可接受的辅料。
9. 一种基于权利要求1所述shRNA介导的稳定敲降HS3ST5基因的重组BHK-21细胞系。
10. 权利要求9所述重组BHK-21细胞系在抵抗病毒感染的材料中的应用。

一种沉默HS3ST5基因表达的shRNA及其重组慢病毒载体和应用

技术领域

[0001] 本发明属于基因沉默技术领域,具体涉及一种沉默HS3ST5基因表达的shRNA及其重组慢病毒载体和应用。

背景技术

[0002] 短发夹RNA(shRNA)是能够形成发夹结构的非编码小RNA分子。shRNA具有特殊的茎环结构,是常用的沉默基因的手段,能够长期、稳定的发挥RNA干扰作用而不引起非特异性反应。shRNA包含siRNA正义链、loop序列、反义链和转录终止信号,将shRNA连接在表达载体上,在RNA聚合酶作用下产生含有小发夹结构的双链RNA。shRNA介导的RNA干扰技术已经成为基因编辑中的有力工具,在基因治疗、药物研发、动物疾病模型、以及农业遗传育种等领域具有重要应用潜力。

[0003] 由于病毒感染比转染方法传递核酸的效率更高,病毒载体向细胞内递送核酸成为高效的方法。常用的病毒载体为腺病毒载体、腺相关病毒载体、逆转录病毒载体和慢病毒载体等。慢病毒载体是一类改造自人免疫缺陷病毒(HIV)的病毒载体,属于假病毒,其毒性基因已被剔除并被外源基因替代。慢病毒载体在逆转录酶作用下可以将外源基因稳定整合到细胞基因组内,实现外源基因的稳定表达。慢病毒载体可以作为递送shRNA进入细胞内的手段之一。携带shRNA的慢病毒质粒转染细胞后能够包装出重组慢病毒,重组慢病毒感染细胞后将shRNA整合到细胞基因组中,通过抗生素压力筛选或荧光激活的细胞分选能够筛选出稳定整合shRNA的重组细胞,从而长期在细胞内转录shRNA,产生稳定沉默靶基因的效果。

[0004] 利用shRNA沉默宿主细胞内有利于病毒感染的蛋白基因可作为一种新型的抗病毒策略。

[0005] 硫酸乙酰肝素(HS)广泛表达于大多数动物组织的细胞表面和细胞外基质中,以硫酸乙酰肝素蛋白多糖(HSPG)的形式存在。许多病原体通过HS结合到细胞表面,从而感染宿主细胞。硫酸乙酰肝素3-O-硫酸基转移酶(HS3ST)家族蛋白参与HS合成过程中硫酸化修饰的最后一步,是HS生物合成的关键酶。HS3ST家族蛋白包括7个异构体,其中HS3ST5的生物活性最强。HS3ST5等HS3ST异构体能够在多种组织和同一组织的不同发育阶段控制配体结合、信号转导和病原微生物感染等,影响宿主细胞的稳态和病原微生物的感染进程。近年来,HS3ST5独特的底物特异性和特殊的修饰位点使其在HS生物合成和功能研究中越来越受到重视。HS于1996年被证实可以作为替代受体被口蹄疫病毒(FMDV)利用而感染细胞,目前还不清楚HS3ST5对FMDV复制的影响。

发明内容

[0006] 有鉴于此,本发明的目的在于提供一种沉默HS3ST5基因表达的shRNA,能有效沉默HS3ST5基因的表达,为抑制FMDV的增殖奠定基础。

[0007] 本发明提供了一种沉默HS3ST5基因表达的shRNA,所述shRNA的核苷酸序列如SEQ

ID NO:1和/或SEQ ID NO:3所示。

[0008] 本发明提供了一种含shRNA的重组慢病毒质粒,所述shRNA为所述shRNA。

[0009] 优选的,所述重组慢病毒质粒的骨架质粒为pLK0.1载体。

[0010] 本发明提供了一种重组慢病毒,由所述重组慢病毒质粒和辅助质粒拯救得到。

[0011] 优选的,所述辅助质粒包括psPAX2辅助质粒和pMD2.G辅助质粒;

[0012] 所述拯救的方法为在转染试剂的作用下将重组慢病毒质粒、psPAX2辅助质粒、pMD2.G辅助质粒进行共转染;

[0013] 所述重组慢病毒质粒、psPAX2辅助质粒、pMD2.G辅助质粒的质量比为4:3:1。

[0014] 本发明提供了所述shRNA、所述重组慢病毒质粒或所述重组慢病毒在降低细胞中HS3ST5基因表达中应用。

[0015] 本发明提供了一种敲降细胞中HS3ST5基因的试剂在制备降低病毒增殖的细胞或制备抗病毒感染的药物中的应用。

[0016] 优选的,所述试剂包括以下一种或几种:所述shRNA、所述重组慢病毒质粒或所述重组慢病毒;

[0017] 所述病毒包括利用HS受体入侵细胞的病毒。

[0018] 本发明提供了一种抗病毒感染的药物,以所述shRNA、所述重组慢病毒载体或所述重组慢病毒为活性成分,还包括药学上可接受的辅料。

[0019] 本发明提供了一种基于所述shRNA介导的稳定敲降HS3ST5基因的重组BHK-21细胞系。

[0020] 本发明提供了所述重组BHK-21细胞系在抵抗病毒感染的材料中的应用。

[0021] 本发明提供了一种沉默HS3ST5基因表达的shRNA,核苷酸序列如SEQ ID NO:1和/或SEQ ID NO:3所示。本发明设计出的shRNA具有良好靶向沉默细胞HS3ST5基因表达的作用。实验表明,shRNA以重组慢病毒载体形式包装成重组慢病毒,感染细胞后,成功建立敲除HS3ST5基因的重组BHK-21细胞系,与空白对照组和空载体组相比,重组BHK-21细胞系中HS3ST5基因或蛋白的表达量显著降低,以本发明保护的shRNA敲除细胞,获得显著降低的重组BHK-21细胞系(BHK-shHS3ST5-807-2-KD和/或BHK-shHS3ST5-954-47-KD)。可见,本发明提供的shRNA具有较强的沉默HS3ST5基因表达的功能。

[0022] 本发明提供了一种敲降细胞中HS3ST5基因的试剂在制备降低病毒增殖的细胞中的应用。本发明将病毒然敲降HS3ST5的细胞,通过检测细胞中病毒蚀斑数量评估子代病毒形成情况,结果表明与对照细胞相比,shRNA-807敲降HS3ST5的BHK-21重组细胞系中的蚀斑数目降低40%,shRNA-954敲降HS3ST5的BHK-21重组细胞系中的蚀斑数目降低38%。可见本发明首次证明敲降HS3ST5的BHK-21重组细胞显著抑制病毒的感染,为抗病毒感染药物提供了有效靶点,同时为抗病毒感染提供新思路。

附图说明

[0023] 图1为敲降HS3ST5的重组BHK-21细胞系中HS3ST5基因表达水平,其中(a)为敲降HS3ST5的BHK-21重组细胞系中HS3ST5蛋白表达水平;(b)敲降HS3ST5的BHK-21重组细胞系中HS3ST5mRNA表达水平;其中*表示与NC组相比,处理组细胞中HS3ST5基因表达水平显著降低, $P<0.05$;

[0024] 图2为敲降HS3ST5的单克隆重组BHK-21细胞中HS3ST5基因表达水平,(a)敲降HS3ST5的单克隆重组BHK-21细胞中HS3ST5蛋白表达水平;其中*或**表示与NC组相比,处理组细胞中HS3ST5基因表达水平显著降低,* $P<0.05$,** <0.01 ;

[0025] (b)敲降HS3ST5的单克隆重组BHK-21细胞中HS3ST5mRNA表达水平;

[0026] 图3为两种shRNA敲降HS3ST5对FMDV子代病毒生成的影响。

具体实施方式

[0027] 本发明提供了一种沉默HS3ST5基因表达的shRNA,所述shRNA的核苷酸序列如SEQ ID NO:1 (CCGGGCTCGTGGAGAAGTTCTTAACTCGAGTTTAAGAACTTCTCCACGAGCTTTTGC) 和/或SEQ ID NO:3 (CCGGGAGAAGTTCTTAAACCTTCCCTCGAGGGAAGGTTTAAGAACTTCTCCTTTTGTG) 所示。

[0028] 在本发明中,所述shRNA以BHK-21细胞中的HS3ST5基因为模板设计得到,具有较强靶向HS3ST5基因沉默的功能。

[0029] 本发明提供了一种含shRNA的重组慢病毒质粒,所述shRNA为上述方案中所述shRNA。

[0030] 本发明对重组慢病毒质粒的骨架质粒没有特殊限制,采用本领域所熟知的骨架质粒即可。在本发明实施例中,所述重组慢病毒质粒的骨架质粒为pLK0.1载体。

[0031] 在本发明中,所述重组慢病毒质粒的构建方法,优选为将shRNA正反向干扰序列退火形成双链粘末端DNA;

[0032] 将所述双链粘末端DNA和pLK0.1载体用AgeI和EcoRI酶切,电泳回收目标片段后,得到酶切后的DNA片段和线性化pLK0.1载体;

[0033] 将所述酶切后的DNA片段和线性化pLK0.1载体进行连接,得到重组慢病毒质粒。

[0034] 在本发明中,所述shRNA807正反向干扰序列如SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:2所示,所述shRNA954正反向干扰序列如SEQ ID NO:3和SEQ ID NO:4所示。所述退火的条件优选为100℃环境中4min后自然降温。

[0035] 本发明对所述酶切和连接的方法没有特殊限制,采用本领域所熟知的酶切和连接方法即可。所述连接后,优选对连接进行鉴定。所述鉴定的方法优选包括酶切鉴定和酶切阳性质粒的测序。所述酶切鉴定优选采用AgeI和EcoRI酶切,得到目标大小的片段说明为酶切阳性质粒。所述测序优选采用测序引物进行测序,得到测序结果与目标序列一致,说明成功获得重组慢病毒质粒。所述shRNA807和shRNA-954的测序引物的核苷酸序列如SEQ ID NO:5。

[0036] 本发明提供了一种重组慢病毒,由所述重组慢病毒质粒和辅助质粒拯救得到。

[0037] 在本发明中,所述辅助质粒优选包括psPAX2辅助质粒和pMD2.G辅助质粒。所述拯救的方法为在转染试剂的作用下将重组慢病毒质粒、psPAX2辅助质粒、pMD2.G辅助质粒进行共转染。所述重组慢病毒质粒、psPAX2辅助质粒、pMD2.G辅助质粒的质量比优选为4:3:1。本发明对转染试剂的种类没有特殊限制,采用本领域所熟知的转染试剂即可。在本发明实施例中,所述转染试剂采用Lipofectamine2000。所述拯救时,共转染的细胞优选为HEK-293T细胞。共转染后,优选6h后补加DMEM完全培养基,继续放至37℃培养箱中培养48h,收集细胞上清液,测定病毒滴度。

[0038] 本发明提供了一种基于所述shRNA介导的稳定敲降HS3ST5基因的重组BHK-21细胞

系。

[0039] 在本发明中,所述重组BHK-21细胞系的构建方法,优选采用所述重组慢病毒感染BHK-21细胞,嘌呤霉素筛选一周,经鉴定,得到重组BHK-21细胞系。所述鉴定方法优选为利用WesternBlot和RT-qPCR鉴定细胞系。

[0040] 本发明提供了所述shRNA、所述重组慢病毒质粒或所述重组慢病毒在降低细胞中HS3ST5基因表达中应用。

[0041] 在本发明中,所述降低细胞中HS3ST5基因表达的方法,优选包括以下步骤:

[0042] 将含shRNA的重组慢病毒质粒与辅助质粒共转染细胞拯救获得重组病毒;

[0043] 将所述重组病毒感染细胞,培养,用含嘌呤霉素的培养基筛选细胞;

[0044] 检测所述筛选的细胞中HS3ST5的表达水平。

[0045] 在本发明中,所述细胞优选包括BHK-21细胞系。所述培养的温度优选为37℃,所述培养的时间优选为6~7d。所述嘌呤霉素的浓度优选为4μg/mL。

[0046] 在本发明中,所述检测所述筛选的细胞中HS3ST5的表达水平的方法优选为利用实时荧光定量PCR(RT-qPCR)和蛋白免疫印迹杂交方法进行。所述实时荧光定量PCR检测用引物优选为SEQ ID NO:6和SEQ ID NO:7。

[0047] 鉴于敲降HS3ST5基因的细胞为材料培养病毒,结果显示敲降HS3ST5基因的细胞不利于子代病毒的增殖,因此本发明提供了一种敲降细胞中HS3ST5基因的试剂在制备降低病毒增殖的细胞中的应用。同时本发明还提供了一种敲降细胞中HS3ST5基因的试剂在制备抗病毒感染的药物中的应用。

[0048] 在本发明中,所述试剂优选包括以下一种或几种:所述shRNA、所述重组慢病毒质粒或所述重组慢病毒。所述病毒优选包括利用HS受体入侵细胞的病毒,例如口蹄疫病毒。所述细胞优选包括BHK-21细胞系。

[0049] 本发明提供了一种抗病毒感染的药物,以所述shRNA、所述重组慢病毒载体或所述重组慢病毒为活性成分,还包括药学上可接受的辅料。

[0050] 本发明对所述辅料没有特殊限制,采用本领域所熟知的基因治疗药物的辅料即可。本发明对所述药物的制备方法没有特殊限制,采用本领域所熟知的基因治疗药物的制备方法即可。

[0051] 本发明提供了所述重组BHK-21细胞系在抵抗病毒感染的材料中的应用。

[0052] 下面结合实施例对本发明提供的一种沉默HS3ST5基因表达的shRNA及其重组慢病毒载体和应用进行详细的说明,但是不能把它们理解为对本发明保护范围的限定。

[0053] 实施例1

[0054] 一种沉默HS3ST5基因表达的重组慢病毒载体的构建方法

[0055] 1.材料

[0056] 1.1细胞和质粒

[0057] BHK-21和HEK-293T细胞源自中国典型培养物保藏中心,pMD2.G、psPAX2、pLK0.1质粒购自Invitrogen公司。

[0058] 1.2主要试剂

[0059] 高糖DMEM、MEM培养基、Lipofectamine2000、Opti-MEM培养基和胰酶购自Invitrogen公司,胎牛血清(FBS)和嘌呤霉素购自Gibco公司,兔源HS3ST5多克隆抗体购自

Novus公司,鼠源 β -actin单克隆抗体购自康为世纪公司,慢病毒快速检测卡购自北京博奥龙免疫技术有限公司,ChamQ SYBRqPCRMasterMix购自诺唯赞公司。

[0060] 1.3引物

[0061] HS3ST5基因的上游引物为5'-CCATTTGCCCTGTTGAAAGCC-3' (SEQ ID NO:6),下游引物为5'-CCGGAATTCATGCAGCAGAC-3' (SEQ ID NO:7);内参引物GAPDH的上游引物为5'-CAAGAAGGTGGTGAAGCA-3' (SEQ ID NO:8),下游引物为5'-AAGTGAAGAGTGAGTGTC-3' (SEQ ID NO:9)。以上引物由金唯智生物技术公司合成。

[0062] 2.方法

[0063] 2.1靶向HS3ST5基因的shRNA设计及合成

[0064] 根据BHK-21细胞中的HS3ST5基因序列,利用BLOCK-iTRNAi Designer (Invitrogen)线上软件设计靶向HS3ST5的shRNA,序列见表1。设计出的shRNA序列由金唯智生物技术公司合成。

[0065] 表1 shRNA序列

shRNA	
名称	合成序列 (5'→3')
shRNA-807 (+)	CCGGGCTCGTGGAGAAGTTCTTAAACTCGAGTTTAAGAACTTCTCCA CGAGCTTTTTCG (SEQ ID NO:1)
[0066] shRNA-807 (-)	AATTCAAAAAGCTCGTGGAGAAGTTCTTAAACTCGAGTTTAAGAAC TTCTCCACGAGC (SEQ ID NO:2)
shRNA-954 (+)	CCGGGGAGAAGTTCTTAAACCTTCCCTCGAGGGAAGGTTTAAGAAC TTCTCCTTTTTCG (SEQ ID NO:3)
shRNA-954 (-)	AATTCAAAAAGGAGAAGTTCTTAAACCTTCCCTCGAGGGAAGGTTT AAGAACTTCTCC (SEQ ID NO:4)

[0067] 2.2 pLK0-shRNA重组慢病毒质粒的构建

[0068] 将表1合成的shRNA正反向干扰序列以10 μ M浓度溶于ddH₂O,如表2以下体系,将正反向干扰序列退火形成双链粘末端DNA,体系置于100℃环境中4min后自然降温。

[0069] 将pLK0.1载体用AgeI和EcoRI酶切,琼脂糖凝胶电泳后回收长度为7000bp的片段,与shRNA退火产物在16℃金属浴中连接14-16h,待连接反应结束,进行质粒转化并提取质粒。构建的shRNA重组慢病毒质粒先经琼脂糖凝胶电泳初步鉴定,后将阳性质粒送至金唯智生物技术公司进行测序,测序引物为5'-CAAGGCTGTTAGAGATAATTGGA-3' (SEQ ID NO:5)。大量提取鉴定正确的质粒与辅助质粒pMD2.G和psPAX2备用。

[0070] 表2 shRNA干扰序列退火体系

	成分	体积
[0071]	正向序列	10 μ L
	反向序列	10 μ L
	10 $\times$ NEB buffer	5 μ L
	水	25 μ L

[0072] 3.pLK0-shRNA重组慢病毒质粒的构建及鉴定结果

[0073] 将pLK0.1载体用AgeI和EcoRI酶切,琼脂糖凝胶电泳观察到2条片段,回收7000bp片段,并与shRNA的双链DNA产物进行连接。连接产物经琼脂糖凝胶电泳初步鉴定后,将阳性克隆送至由金唯智生物技术公司进行序列鉴定,结果表明成功构建出pLK0-shRNA-807和pLK0-shRNA-954两个重组慢病毒质粒,将测序正确的阳性质粒大提留存备用。

[0074] 实施例2

[0075] 一种靶向HS3ST5基因沉默的重组慢病毒的拯救方法

[0076] 将HEK-293T细胞铺在10cm的细胞培养皿中,细胞状态良好且密度长至70%时,利用Lipofectamine2000进行质粒转染(10 μ g实施例1制备的两种重组慢病毒质粒+7.5 μ gpsPAX2辅助质粒+2.5 μ gpMD2.G辅助质粒)。6h后补加4mlDMEM完全培养基,继续放至37 $^{\circ}$ C培养箱中培养。48h后收取细胞上清液,使用慢病毒快速检测卡鉴定慢病毒是否包装成功,并用0.45 μ m滤器过滤后保存慢病毒液备用。

[0077] shRNA敲降HS3ST5的重组BHK-21细胞系的建立及鉴定结果

[0078] 将阳性的pLK0-shRNA-807和pLK0-shRNA-954两种重组慢病毒质粒转染至HEK-293T细胞,48h后将细胞上清液滴加到慢病毒快速检测卡中,最终慢病毒快速检测卡都呈深红色,换算出的慢病毒滴度约为 $1.25 \times 10^{6-7}$ TU/ml,表明2种慢病毒包装成功。

[0079] 实施例3

[0080] 稳定敲降HS3ST5的重组BHK-21细胞株的构建

[0081] 1.嘌呤霉素筛选浓度的确定

[0082] 将BHK-21细胞平铺至六孔板中,细胞密度长至80%后,分别加入浓度为1、2、3、4、5和6 μ g/mL的嘌呤霉素处理,每隔24h重新加药处理,连续7d观察细胞存活情况,选择无细胞存活的最低药物浓度作为嘌呤霉素筛选的最佳浓度。

[0083] 2.稳定敲降HS3ST5的重组BHK-21细胞株构建方法

[0084] 慢病毒液(实施例2拯救的含shRNA-807或shRNA-954的重组慢病毒毒株)和细胞完全培养基按1:1体积混匀制成混合培养基。正常的BHK-21细胞铺在六孔板中,用混合培养基进行培养,待细胞长满后,转至T25细胞培养瓶中,继续加入混合培养基培养,每隔24h更换一次混合培养基。7d后用最佳浓度的嘌呤霉素处理慢病毒感染后的细胞,每隔24h更换带有嘌呤霉素的完全培养基,7d后收取细胞样品,利用实时荧光定量PCR(RT-qPCR)分析HS3ST5的相对mRNA水平,其中RT-qPCR方法的反转录体系见表3,反转录程序为37 $^{\circ}$ C 15min,85 $^{\circ}$ C 5s。RT-qPCR方法的扩增体系见表4,扩增反应程序为95 $^{\circ}$ C 30s预变性;95 $^{\circ}$ C 5s,60 $^{\circ}$ C 30s,72 $^{\circ}$ C 30s,40个循环;95 $^{\circ}$ C 15s,60 $^{\circ}$ C 1min,95 $^{\circ}$ C 30s,60 $^{\circ}$ C 15s。利用 $\Delta\Delta$ CT法计算HS3ST5的相对mRNA拷贝数。利用蛋白免疫印迹杂交(WesternBlot)试验检测HS3ST5的蛋白水平,

WesternBlot试验使用的一抗为兔源HS3ST5多克隆抗体和鼠源 β -actin单克隆抗体,使用的二抗为HRP标记的山羊抗小鼠IgG和HRP标记的山羊抗兔IgG。

[0085] 表3 HS3ST5的RT-qPCR反转录体系

[0086]	成分	体积
	RNA	(1000/浓度) μ L
[0087]	5 $\times$ RFMix	4 μ L
	水	至 20 μ L

[0088] 表4 HS3ST5的RT-qPCR的扩增体系

[0089]	成分	体积
	2 $\times$ TB Green Premix EX Taq	10 μ L
[0089]	cDNA	2 μ L
	上游引物	0.4 μ L
	下游引物	0.4 μ L
	ROX Dye	0.4 μ L
	水	6.8 μ L

[0090] 将消化下来的阳性重组细胞计数,加入培养基稀释成单个细胞后加入96孔板中,细胞长满后,对单克隆重组细胞进行扩大培养和冻存,并利用RT-qPCR和WesternBlot检测单克隆重组细胞中HS3ST5的表达情况。

[0091] 结果

[0092] 用梯度浓度的嘌呤霉素处理BHK-21细胞,观察到BHK-21细胞经过最小浓度为4 μ g/mL的嘌呤霉素筛选一周后,细胞全部死亡。因此确定后续实验中筛选重组BHK-21细胞系的最佳嘌呤霉素浓度为4 μ g/mL。

[0093] BHK-21细胞经重组慢病毒感染和最佳浓度的嘌呤霉素筛选一周后,利用WesternBlot和RT-qPCR鉴定细胞系是否建立成功。如图1,WesternBlot和RT-qPCR的结果显示BHK-shHS3ST5-807-KD和BHK-shHS3ST5-954-KD中的HS3ST5蛋白和mRNA水平显著下降,表明2种敲降HS3ST5的重组BHK-21细胞系建立成功。然后每种重组细胞系各挑出50个单克隆铺至12孔板中,收取样品后,利用WesternBlot和RT-qPCR检测单克隆重组BHK-21细胞内的HS3ST5蛋白和mRNA表达水平。从BHK-shHS3ST5-807-KD和BHK-shHS3ST5-954-KD中挑选出敲降效果较好的3个单克隆细胞。

[0094] 如图2中a,WesternBlot结果显示相较于正常BHK-21细胞,所有重组细胞系的HS3ST5蛋白水平显著下降。如图2中b,RT-qPCR结果与Western Blot结果一致,显示所有重组细胞系的HS3ST5mRNA水平明显降低。以上结果表明利用shRNA成功构建出2种敲降HS3ST5的重组BHK-21细胞系。选取HS3ST5敲降效果最好的重组BHK细胞,即BHK-shHS3ST5-807-2-KD和BHK-shHS3ST5-954-47-KD,并进行后续功能验证试验。

[0095] 实施例4

[0096] 重组BHK-21细胞对FMDV增殖的影响

[0097] 将重组BHK-21细胞和正常BHK-21细胞分至6孔板内,置于37℃培养箱,18h后接种1MOI的FMDV,4、8、12和16h后分别收取样品。利用蚀斑形成试验测定样品中的FMDV滴度,从而评价shRNA沉默HS3ST5对FMDV增殖的影响。

[0098] 蚀斑形成试验的具体步骤:

[0099] (1)将长满的BHK-21细胞消化后分至6孔板中,置于37℃恒温箱培养18h;

[0100] (2)PBS润洗6孔板细胞2次,吸取100μL样品,用无血清MEM培养基(含1%双抗)作为稀释液,进行十倍倍比梯度稀释至 10^{-7} ,将 10^{-4} 、 10^{-5} 和 10^{-6} 样品稀释液加入6孔板细胞中,每个稀释度重复2孔,将6孔板置于37℃细胞培养箱中孵育1h,每隔10min摇晃1次;

[0101] (3)以1:1比例混合1.2%黄芪胶和2×MEM,每孔加入2mL混合液,置于37℃恒温培养箱培养44h;

[0102] (4)弃去液体,每孔加入2mL预冷固定液(甲醇和丙酮的体积比=1:1),-20℃放置2h;

[0103] (5)弃去固定液,每孔加入2mL结晶紫染液,置于室温孵育染色6h;

[0104] (6)用水冲洗6孔板至无染色液残留。

[0105] 蚀斑形成实验完成后,对蚀斑进行计数,计算不同时间点病毒蚀斑形成单位(PlaqueFormingUnit,PFU)。

[0106] shRNA敲降HS3ST5对子代FMDV生成的影响结果

[0107] 分别收取FMDV感染BHK-shHS3ST5-807-2-KD重组细胞、BHK-shHS3ST5-954-47-KD重组细胞和BHK-21正常细胞后的样品,通过蚀斑形成试验对子代病毒定量,评价shRNA敲降HS3ST5对子代FMDV生成的影响。如图3,在所有时间点样品中,相较于正常BHK-21细胞,BHK-shHS3ST5-807-2-KD和BHK-shHS3ST5-954-47-KD重组细胞株中的FMDV蚀斑数目明显减少。12h时样品中病毒蚀斑数目达到峰值,此时相较于对照,BHK-shHS3ST5-807-2-KD重组细胞系中的蚀斑数目降低40%,BHK-shHS3ST5-954-47-KD重组细胞系中的蚀斑数目降低38%,结果表明敲降HS3ST5的BHK-21重组细胞显著抑制子代FMDV生成。

[0108] 由上述实施例结果可知,本发明通过构建携带shRNA的重组慢病毒质粒,利用包装出的重组慢病毒建立了敲降HS3ST5的重组BHK-21细胞系,RT-qPCR和WesternBlot试验证明设计的携带shRNA的重组慢病毒质粒能够使HS3ST5表达水平明显下降,表明构建的重组慢病毒质粒或其重组慢病毒可作为一种有效工具应用于抑制FMDV等多种利用HS作为受体的病毒增殖中,为抗病毒药物制备提供了新思路。

[0109] 以上所述仅是本发明的优选实施方式,应当指出,对于本技术领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明原理的前提下,还可以做出若干改进和润饰,这些改进和润饰也应视为本发明的保护范围。

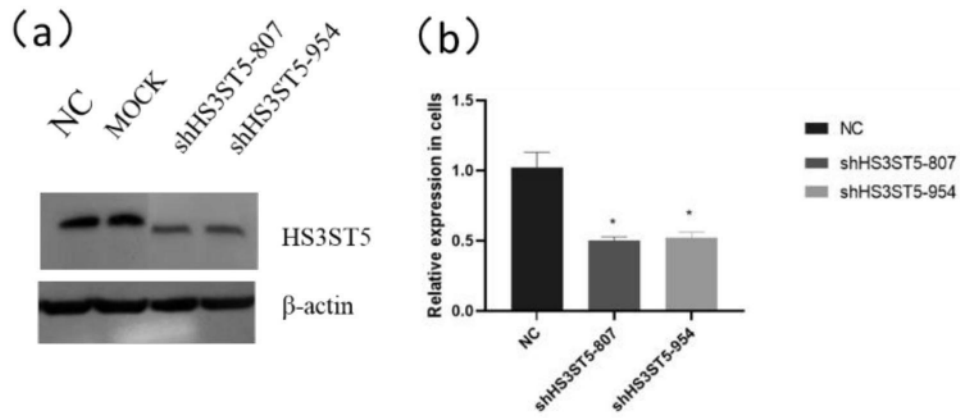


图1

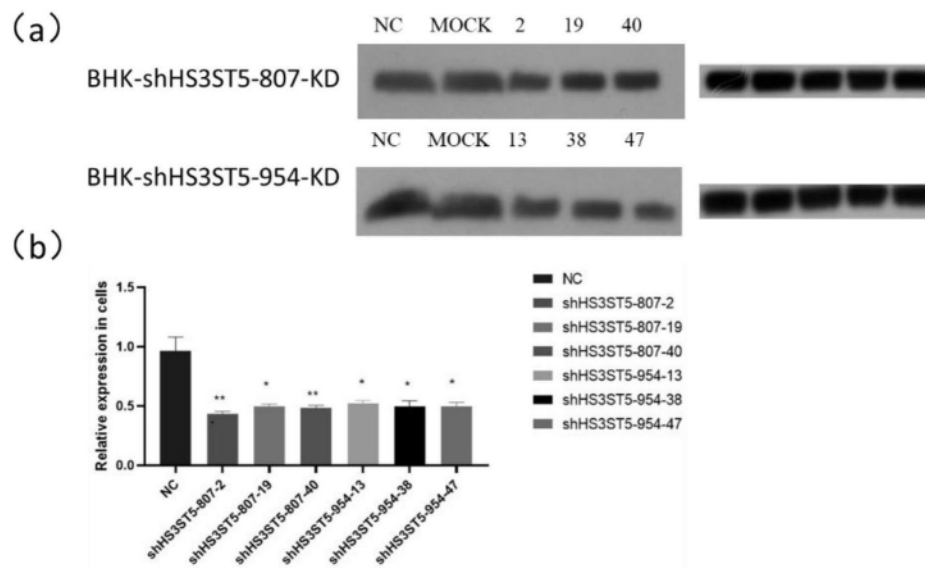


图2

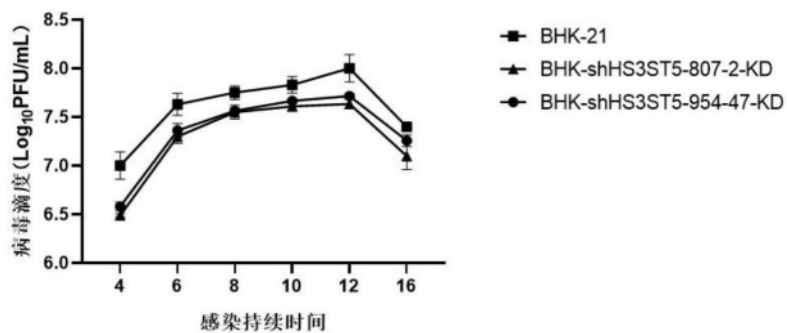


图3