DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.02.001
第26卷第2期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 2
封2 2004年1月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jan. 2004

研究快报

文章编号:1000-5404(2004)02-封2-01

RNA干扰能有效抑制SARS相关冠状病毒复制

Inhibition of severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus replication by RNA interference

李 阳[1],倪 兵[1],石辛甫[2],吴玉章[1],王希良[2],何仰东[1],肖 宇[1],姜 旻[1],黎万玲[1] ([1]第三军医大学基础医学部全军免疫学研究所,重庆 400038;[2]军事医学科学院五所三室,北京 100071)

基于RNA干扰可抑制HIV等病毒的事实[1],本课题组构建了针对SARS病毒的、能表达小发夹结构RNA的siRNA质粒,利用RNA干扰有效抑制了该病毒的复制。

1 材料与方法

将SARS病毒全基因组序列用Ambion公司的siRNA在线设计工具进行分析,得到若干19nt的候选干扰靶序列,随机选择四条,经对比确定其序列与人类无关。根据pSilencer 3.1-H1载体的使用要求设计出8条寡核苷酸,送上海生工公司合成。将合成好的、两两互补的寡核苷酸经退火后所得的4条DNA片段分别克隆到线性化的pSilencer 3.1-H1载体上抽提的1~4号重组质粒经 *Bam*HⅠ/*Hin*dⅢ双酶切鉴定和测序鉴定证明已构建成功。采用DOTAP脂质体转染1~4号质粒至Vero E6细胞,分别得到相应的1~4号细胞,经潮霉素筛选10 d,获得稳定的潮霉素抗性细胞。在P3实验室内,用不同浓度的病毒攻击对照细胞和1~4号细胞,分别进行细胞病变效应(CPE)、MTT试验和病毒空斑减少试验。

2 结果

①不同浓度的病毒攻击细胞24 h后,未转染质粒的对照细胞在病毒滴度10^{-1}至10^{-4}即出现CPE,1~4号细胞均正常;48 h后,对照细胞直到病毒滴度10^{-8}时都见CPE,1~4号细胞在病毒滴度10^{-1}至10^{-3}时才见CPE;72 h后,10^{-10}滴度的病毒对对照细胞都产生CPE,而除1号细胞在病毒滴度10^{-7}时仅有极微弱CPE外,2、3、4号细胞CPE持续到病毒滴度10^{-4}。②MTT试验中,计算出各孔细胞存活率,发现在各种病毒浓度条件下1~4号细胞存活率都显著高于对照细胞。③未转染质粒的对照细胞不加病毒液无空斑形成,加入2×10^{-5}滴度病毒的该细胞形成18个空斑;1~4号细胞形成的空斑数分为:7±2.35、5.33±1.80、3.66±1.52、3.3±1.15个(图1),与对照相比,空斑数都明显减少。



C:对照细胞;①~④:1~4号细胞

图1 病毒攻击各种细胞后空斑实验的结果

3 讨论

分别转染四种siRNA质粒的细胞都对SARS病毒有抵抗作用,证明这些质粒在细胞内都有效,诱导了产生针对SARS病毒基因的RNA干扰效应,使病毒复制和蛋白表达受到抑制,对细胞形成了保护作用;同时,该病毒基因相当稳定[2],这又为RNA干扰的运用提供了有利条件。目前,针对SARS主要还是靠对症进行各种支持治疗,而利用RNA干扰来特异性抑制SARS病毒复制、保护细胞免受病毒攻击,在体外现已获得证实,这为预防、治疗SARS提供了新的思路和方法。

基金项目:国家重点基础研究发展规划资助项目("973"项目):SARS防治基础研究(2003CB514108)
Supported by the National Key Basic Research Development Plan of China ("973" Projects): Fund for the Basic Research of SARS Prevention (2003CB514108)

作者简介:李 阳(1976-),男,安徽省巢湖市人,硕士研究生,技师,主要从事分子生物学和肿瘤免疫方面的研究。电话:(023)68752238-619

收稿日期:2003-12-31;修回日期:2004-01-05

参考文献:

[1] Qin X F, An D S, Chen I S, *et al*. Inhibiting HIV-1 infection in human T cells by lentiviral-mediated delivery of small interfering RNA against CCR5 [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003, 100(1): 183-188.
[2] 吕燕波,万 瑛,吴玉章. SARS病毒S蛋白的B细胞表位预测[J]. 第三军医大学学报, 2004, 26(2): 101-103

(编辑 张大春)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net