

文章编号:1000-0615(2010)04-0611-07

DOI:10.3724/SP.J.1231.2010.06703

RNA 干扰技术抑制新加坡石斑鱼虹彩病毒感染细胞多肽 ICP46 与绿色荧光蛋白融合基因的表达

夏立群^{1,2}, 梁海鹰¹, 张红莲^{1,2}, 秦启伟^{3*}

(1. 广东海洋大学水产学院, 广东 湛江 524025;

2. 中山大学生命科学学院有害生物控制与资源利用国家重点实验室, 广东 广州 510275;

3. 中国科学院南海海洋研究所中国科学院海洋生物资源可持续利用重点实验室, 广东 广州 510301)

摘要:新加坡石斑鱼虹彩病毒(singapore grouper iridovirus, SGIV)是一种严重的能引起全身性疾病的病原体,对石斑鱼养殖造成了重大的经济损失。将含有 SGIV 感染细胞多肽 ICP46 (infected cell polypeptides 46) 基因的真核表达载体 pEGFP-ICP46 转染到胖头鲤细胞(fathead minnow cells, FHM)中进行融合表达,用荧光显微镜观察到 ICP46-GFP 融合蛋白主要分布于 FHM 细胞的细胞质中。根据 SGIV ICP46 的序列,设计并体外化学合成了特异性干扰 SGIV ICP46 的 siRNA (siRNA-ICP46),与 pEGFP-ICP46 共转染到 FHM 细胞中,通过荧光显微镜观察不同时间点荧光强度的变化。转染后 24~48 h,实验细胞(共转染 siRNA-ICP46 和 pEGFP-ICP46)和阳性对照细胞(共转染 siRNA-GFP 和 pEGFP-ICP46)中的荧光微弱,发荧光的细胞数量较阴性对照(共转染 siRNA-Negative 和 pEGFP-ICP46)少 70% 左右,但其后实验细胞和阳性对照细胞的荧光强度开始增强,在转染后 72 h 其与阴性对照组已差别不大。说明体外化学合成的 siRNA-ICP46 转染后 24~48 h 可有效抑制 FHM 细胞中外源导入 SGIV ICP46 基因的表达。

关键词:RNA 干扰;绿色荧光蛋白;石斑鱼虹彩病毒;感染细胞多肽 ICP46

中图分类号:Q 78; S 941

文献标识码:A

新加坡石斑鱼虹彩病毒(singapore grouper iridovirus, SGIV)是近年来分离自养殖石斑鱼(*Epinephelus tauvina*)的一种新型致病性虹彩病毒,该病毒可导致石斑鱼死亡率达 90% 以上,鱼类感染后的主要症状为脾肿大、出血^[1-2]。目前 SGIV 的分离鉴定、分子分类、基因组学、转录组学、蛋白组学及快速检测方法等相关基础研究已经完成^[3-5],对 SGIV 重要功能基因的研究正陆续展开^[6-8]。

SGIV 转录图谱研究确定 ORF162L 是一个立即早期基因^[5],通过对 SGIV ORF162L 的生物信息学分析,发现这个基因与感染细胞多肽 ICP46 (infected cell polypeptides 46) 具有较高同

源性。Eaton 等^[9]对全基因组测序的 12 种虹彩病毒进行了比较基因组研究,并找出 26 个虹彩病毒科的核心基因,ICP46 即为核心基因之一,提示 ICP46 可能在虹彩病毒科病毒的感染过程中具有重要的作用。目前,尚未有 ICP46 功能的研究报道^[10]。对立即早期基因 SGIV ICP46 (ORF162) 的研究有助于在分子与细胞水平上了解虹彩病毒与宿主的相互作用机制及其感染致病机理,并为防治虹彩病毒病害提供有力的科学依据。

RNA 干扰(RNA interfering, RNAi)是短双链 RNA 即小干扰 RNA (small interfering RNA, siRNA)介导的对同源基因转录后水平的抑制作用,是细胞发育基因水平的重要调节方式和

收稿日期:2009-11-12 修回日期:2009-12-24

资助项目:国家“八六三”高技术研究发展计划(2006AA09Z411, 2006AA100306);国家自然科学基金项目(30930070);广东省自然科学基金项目(06104920)

通讯作者:秦启伟, Tel.:020-89023638; E-mail: qinqw@scsio.ac.cn

宿主抵抗病毒感染的一种重要手段^[11-12]。目前, RNAi 技术已广泛应用于基因功能、抗病毒感染和基因治疗等的研究^[13-15]。绿色荧光蛋白 (green fluorescent protein, GFP) 对细胞无毒性, 其表达可用荧光显微镜直接观察, 因此作为报告基因广泛应用于基因工程实验中^[16-18]。本文将 SGIV ICP46 和 GFP 基因融合表达, 对 SGIV ICP46 在 FHM 细胞中的表达进行了研究, 并对利用 GFP 作为报告分子筛选能有效抑制 SGIV ICP46 基因表达的 siRNA。对 RNA 干扰技术抑制 SGIV ICP46 绿色荧光融合蛋白表达的研究为今后研究 SGIV ICP46 的功能和抗 SGIV 病毒感染奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 病毒、细胞和质粒

新加坡石斑鱼虹彩病毒、FHM 细胞、质粒 pEGFP-N3、受体菌 DH5 α 由中山大学有害生物控制及资源利用国家重点实验室保存提供。

1.2 工具酶和试剂

PrimeSTAR DNA 聚合酶, 限制性核酸内切酶 *Bam*H I, *Xho* I, T_4 连接酶, DNA 片段纯化试剂盒购自 TaKaRa 公司; 质粒微量提取试剂盒购自 U-gene 公司; M199 培养基, 胰酶 (含 EDTA) 购自 Gibco 公司; 提取无内毒素质粒试剂盒 (Endo-Free plasmid mini kit) 购自 Omega 公司; 转染试剂 Lipofectamine 2000 购自 Invitrogen 公司; 其它试剂均为国产分析纯。

1.3 SGIV 总 DNA 的提取

取适量 SGIV 病毒悬液, 加入等体积的碱裂解缓冲液, 37 $^{\circ}$ C 作用 15 min 至病毒悬液变得较为澄清, 再加入等体积的 2% SDS 和 25 μ L 蛋白酶 K (10 mg/mL), 50 $^{\circ}$ C 作用 30 min, 至病毒悬液完全澄清, 12 000 r/min 离心 5 min, 除去碱解不溶物。吸取上清用酚、酚-氯仿 (1:1) 与酚-氯仿-异戊醇 (25:24:1) 依次轻柔抽提, 上清用 2.5 倍体积的 95% 冰乙醇沉淀病毒 DNA, 12 000 r/min 离心 20 min。沉淀用冰冷的 70% 乙醇洗涤 2 次, 12 000 r/min 离心 1 min, 沉淀溶于 TE 缓冲液后, -20 $^{\circ}$ C 保存。

1.4 ICP46-GFP 融合表达载体的构建

根据 SGIV (accession number: AY521625) ICP46 (ORF 162L, nucleotide position: 139822 -

138674) 的序列和质粒 pEGFP-N3 酶切位点设计引物:

P1: 5'-GCCTCTCGAGTTGTGGAAGATTTAA-3' (*Xho* I)

P2: 5'-CGTGGATCCTTCAGCTGACTCTTCT-3' (*Bam*H I)

用 PrimeSTAR DNA 聚合酶高保真扩增目的片段, 反应条件为 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 52 $^{\circ}$ C 40 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 共 30 个循环, 再 72 $^{\circ}$ C 延伸 8 min。PCR 产物经 DNA 片段纯化试剂盒纯化, 酶切后以摩尔数比 1:3 (质粒/插入片段) 的比例克隆入质粒 pEGFP-N3, 菌落 PCR 和双酶切鉴定后, 阳性克隆送上海英骏生物技术有限公司测序。

1.5 去内毒素质粒的提取和转染

按 Omega 公司 (Endo-Free plasmid mini kit) 说明书, 提取无内毒素 pEGFP-ICP46 和 pEGFP-N3 质粒。将 FHM 细胞传代至 24 孔细胞培养板中, 于 25 $^{\circ}$ C 恒温培养箱中培养, 待细胞长满单层的 90% ~ 95% 开始转染。每孔转染需 1 μ g 质粒, 2 μ L 转染试剂 (Lipofectamin 2000)。将质粒和转染试剂分别用 Opti-MEM 培养基稀释至 50 μ L, 两者混匀后静置 20 min。在静置期间, 吸走培养板孔中的培养液, 加入 300 μ L Opti-MEM 培养基洗涤 1 次, 吸走洗涤液。加入质粒和 Lipofectamin 2000 的混合液, 轻摇培养板以使混合液与细胞充分接触。25 $^{\circ}$ C 恒温培养箱中培养 4 h 后, 吸走混合液, 加入 500 μ L 含有 10% 胎牛血清的 M199 培养液, 转染完成。

1.6 荧光显微镜观察

转染后 48 h, 将转染的细胞消化后传到置于 6 孔板中的无菌盖玻片上, 继续培养 12 ~ 24 h 后, 吸去培养基, PBS 漂洗一次, 然后用 4% 多聚甲醛 (paraformaldehyde, PFA) 室温固定 15 min; PBS 漂洗 3 次后用抗荧光淬灭封片剂封片, 用荧光显微镜 (ZEISS) 观察。

1.7 siRNA 序列的设计

根据 SGIV ICP46 的序列信息分析结果和 siRNA 序列的设计原则, 设计了特异性干扰 SGIV ICP46 的 siRNA, 由广州市锐博生物科技有限公司体外化学合成。正义链和反义链 siRNA 都为 19 bp, 为了提高 siRNA 的稳定性, 保护 siRNA 不受 Rnase 降解, 两端各加 2 个脱氧核酸悬垂。

序列名: siRNA-ICP46

靶序列: GGCAGATCCTTTTCGACAAA

正义链 (5'-3'): 5'-GGCAGAUCUUUCGAC-AAA dTdT-3'

反义链 (3'-5'): 3'-dTdT CCGUCUAGGAAAG-CUGUUU-5'

实验所用阴性对照 siRNA (siRNA-negative) 和针对报告基因 GFP 的阳性对照 siRNA (siRNA-GFP) 均购自广州市锐博生物科技有限公司, 目前其对照序列尚未公开。

1.8 真核质粒和 siRNA 共转染

将 FHM 细胞传代至 24 孔细胞培养板中, 于 25 °C 恒温培养箱中培养, 等细胞长满单层的 70 - 80%, 用 Lipofectamine 2000 将 2 μL 重组质粒 pEGF-ICP46 分别和 2.5 μL (20 μmol/L) siRNA-ICP46、siRNA-GFP 或 siRNA-Negative 共转染 FHM 细胞。转染后 24、36、48、60 和 72 h, 用荧光显微镜观察 siRNA 对外源导入 FHM 细胞中 SGIV ICP46 基因的干扰效果, 照相时随机选取视野, 在 GFP 激发光下拍摄绿色荧光, 拍摄放大倍数为 10 × 40, 曝光时间统一为 600 ms。

2 结果

2.1 SGIV ICP46 基因的高保真 PCR 扩增

SGIV ICP46 基因的高保真 PCR 扩增产物, 用 1% 的琼脂糖凝胶作电泳分析 (图 1-A)。得到大小约为 1 191 bp 的目标带, 与理论结果相符合, 证明扩增目标带成功。

2.2 ICP46-GFP 融合表达载体的构建

将 ICP46 基因 PCR 产物与 pEGFP-N3 载体连接后, 转化大肠杆菌 DH5α 细胞, 挑取转化平板上生长的单菌落进行菌落 PCR (图 1-B) 及双酶切鉴定 (图 1-C)。pEGFP-N3 载体长 4.7 kb, 重组质粒经 *Xho* I 和 *Bam*H I 双酶切后, 得到与预期结果一致的大小约为 1.2 kb 和 4.7 kb 的两个片段, 表明 SGIV ICP46 基因已正确克隆到了 pEGFP-N3 载体上。将重组质粒进行测序, Clustalx 1.83 的比对分析结果表明, 重组质粒的插入序列与已报导 SGIV ICP46 (ORF162L) 的序列完全一致, 将成功构建的重组质粒命名为 pEGFP-ICP46。

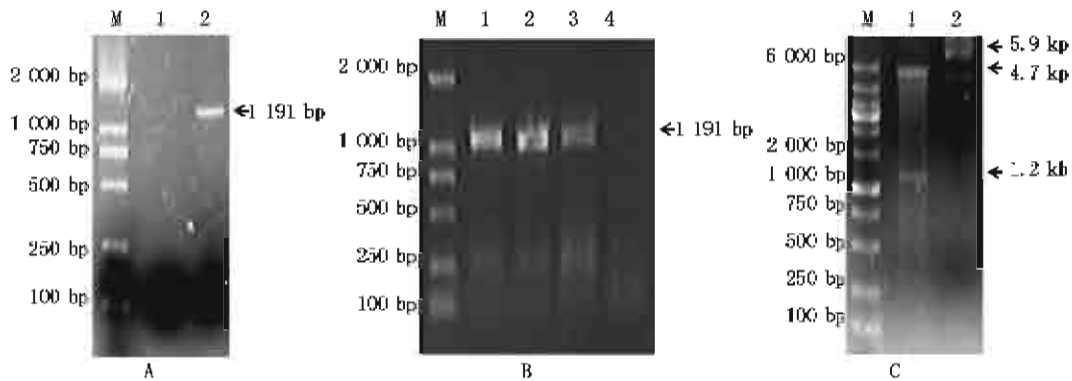


图 1 SGIV ICP46 基因高保真 PCR 扩增 (A), 重组质粒 pEGFP-ICP46 菌落 PCR 鉴定 (B) 及酶切鉴定 (C)

A: M. DL 2000 DNA 分子量标准; 1. 阴性对照; 2. SGIV ICP46 基因的高保真 PCR 产物;

B: M. DL 2000 DNA 分子量标准; 1~3. 阳性克隆; 4. 阴性对照;

C: M. DL 6000 DNA 分子量标准; 1. pEGFP-ICP46 / *Xho* I + *Bam*H I ; 2. pEGFP-ICP46。

Fig.1 Agarose gel electrophoresis of PCR product of SGIV ICP46 gene (A), identification of the recombinant plasmid pEGFP-ICP46 by colony PCR (B) and restriction analysis (C)

A: M: DL 2000 DNA marker; 1: negative control; 2: PCR amplification of SGIV ICP46 gene;

B: M: DL 2000 DNA marker; 1-3: positive clone; 4: negative control;

C: M: DL 6000 DNA marker; 1: pEGFP-ICP46/*Xho* I + *Bam*H I ; 2: pEGFP-ICP46.

2.3 ICP46-GFP 融合蛋白在 FHM 细胞中的表达

将真核表达重组质粒 pEGFP-ICP46 转染到真核细胞后, 该质粒能在自身携带的 SV40 早期

启动子的作用下中表达一个羧基末端带有增强型绿色荧光蛋白标签 (enhanced green fluorescent protein, EGFP) 的 ICP46-GFP 融合蛋白, 通过绿色荧光蛋白来研究 ICP46 蛋白的表达。实验以空载

体 pEGFP-N3 和未转染质粒的 FHM 细胞为对照, 转染后在倒置荧光显微镜 GFP 滤镜下观察。

荧光显微镜观察结果显示, 未转染质粒的 FHM 细胞中没有荧光出现; pEGFP-N3 转染的

FHM 细胞所表达的 GFP 在细胞核和细胞质中都存在, 细胞核中的绿色荧光较强; 而 pEGFP-ICP46 转染 FHM 细胞后所表达的 ICP46-GFP 则主要分布于细胞质中(图 2)。

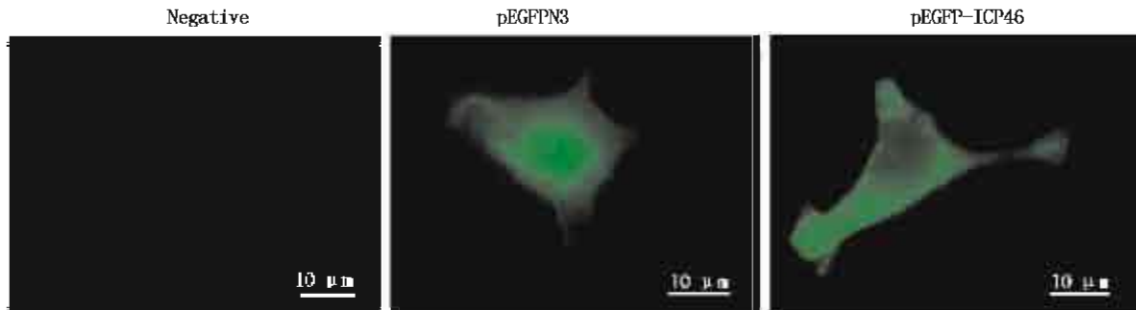


图 2 带 GFP 标签的 SGIV ICP46 融合蛋白在 FHM 细胞中的表达

Fig. 2 SGIV ICP46 fusion protein expressed by pEGFP-ICP46 in FHM cells

2.4 siRNA 与 pEGFP-ICP46 共转染后对 ICP46 抑制效果的检测

将 siRNA-ICP46、siRNA-GFP 和 siRNA-Negative 分别与质粒 pEGFP-ICP46 共转染 FHM 细胞, 在转染 24、36、48、60 和 72 h 后利用荧光倒置显微镜观察拍照。结果显示, 转染后 24 ~ 72 h, 阴性对照细胞(共转染 siRNA-Negative 和 pEGFP-ICP46)都有较强的荧光, 且发荧光的细胞数目随时间而不断增多; 而转染后 24 ~ 48 h, 实验细胞(共转染 siRNA-ICP46 和 pEGFP-ICP46)和阳性对照细胞(共转染 siRNA-GFP 和 pEGFP-ICP46)中的荧光微弱, 发荧光的细胞数量较阴性对照少 70% 左右(图 3 上排, 中排), 但到转染后 60 h, 实验细胞和阳性对照细胞的荧光强度开始增强, 在转染后 72 h 其与阴性对照组已差别不大(图 3 下排)。这表明从转染后 24 h 起, siRNA-ICP46 就能有效的抑制外源导入 ICP46 的表达, 抑制效果可以持续到转染后 48 h。这些结果说明, 针对 ICP46 基因专门设计的 siRNA-ICP46 能有效抑制 FHM 细胞中外源导入 ICP46 基因的表达。

3 讨论

立即早期基因是病毒感染宿主后在细胞中最早表达的一类基因, 并在病毒感染复制、宿主细胞生长调控和免疫逃避等方面具有重要功能^[19-21]。对立即早期基因的研究, 有利于在分子与细胞水平上了解病毒与宿主的相互作用机制。SGIV 转

录图谱研究揭示 SGIV ICP46 是一个立即早期基因^[5]。ORF162 同源类似物是虹彩病毒科的核心基因, 可能对该科病毒的感染复制具有重要作用, 但目前该家族功能未知^[9-10]。对 SGIV ICP46 的研究, 有助于进一步阐明 SGIV 的感染致病机制, 并为防治虹彩病毒病害提供有力的科学依据与应用基础。本实验室通过构建稳定表达 SGIV ICP46 的细胞系, 发现过量表达 SGIV ICP46 对 FHM 细胞生长具有促进作用, 表明 ICP46 可能参与细胞的生长调控。研究还发现过量表达 SGIV ICP46 可以显著提高 SGIV 的滴度, 表明 ICP46 可能对病毒复制起重要作用。

RNAi 技术作为一种全新的抑制基因表达技术, 在基因功能研究和抗病毒感染等方面展现出非常诱人的前景。近年来, RNAi 抗病毒的研究更是突飞猛进。利用基因沉默机制, 减少或消除病毒侵染、增殖必需的关键基因的表达, 抑制病毒的复制和侵染, 对由病毒感染引起的疾病的基因治疗提供了一种非常有希望的全新手段, 也为反向遗传学和功能基因组学的研究提供了有价值且经济快捷的工具^[22-23]。

本文构建了与 GFP 基因以同一编码读框共表达的 ICP46-GFP 表达载体, 与 siRNA-ICP46 共转染 FHM 细胞。由于 ICP46-GFP 表达载体拥有同一翻译起始序列、翻译起始密码子 ATG 和一致编码读框, 如果 ICP46 mRNA 被降解, ICP46-GFP 就不能表达, 使 GFP 成为反映 ICP46 表达的报告分子。以 GFP 为报告分子, 通过荧光显微镜来观

察 siRNA-ICP46 对 FHM 细胞中外源导入 ICP46 基因的表达的抑制效果,结果显示:siRNA-ICP46 能在转染后 24 ~ 48 h 有效抑制外源 ICP46 基因

的表达,说明实验设计的 siRNA 靶点是有效的,为进一步研究 SGIV ICP46 的功能奠定了基础。

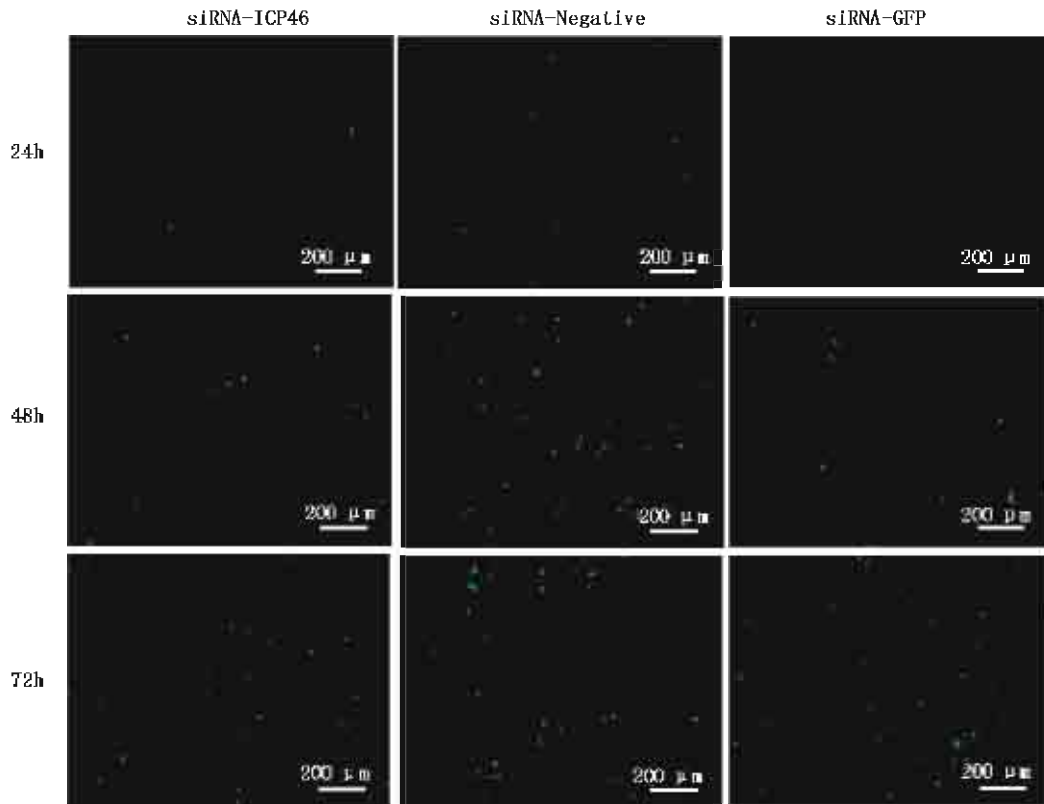


图3 siRNA 与 pEGFP- ICP46 共转染 FHM 细胞后的荧光变化

Fig.3 Green fluorescence detection in FHM cells after co-transfection with siRNA and pEGFP- ICP46

本实验采用化学合成 siRNA 进行 RNA 干扰,这种方法具有操作简便,起效快的优点,但非修饰的 siRNA 在细胞培养过程中很容易降解,因此其干扰效果是有一定时效性的,我们的研究发现 siRNA-ICP46 在转染后 72 h 干扰效果基本消失,这个结果与在哺乳动物细胞中获得的结果类似^[24-25]。为了获得更为稳定长效的的干扰效果,使其在抗 SGIV 病毒感染中具有实际应用的价值,今后可以考虑通过构建 RNA 干扰载体体内表达,或使用经过修饰的 siRNA 来进一步开展研究。

参考文献:

[1] Qin Q W, Lam T J, Sin Y M, *et al.* Electron micro-

scopic observations of a marine fish iridovirus isolated from brown-spotted grouper, *Epinephelus tawina*[J]. J Virol Methods, 2001, 98(1):17 - 24.

[2] Qin Q W, Chang S F, Ngho G H, *et al.* Characterization of a novel ranavirus isolated from brown-spotted grouper, *Epinephelus tawina*[J]. Dis Aquat Organ, 2003, 53(1):1 - 9.

[3] Song W J, Qin Q W, Qiu J, *et al.* Functional genomics analysis of Singapore grouper iridovirus: complete sequence determination and proteomic analysis[J]. J Virol, 2004, 78(22): 12576 - 12590.

[4] Song W, Lin Q, Joshi S B, *et al.* Proteomic studies of the Singapore grouper iridovirus[J]. Mol Cell

- Proteomics, 2006, 5(2): 256-264.
- [5] Teng Y, Hou Z, Gong J, *et al.* Whole-genome transcriptional profiles of a novel marine fish iridovirus, Singapore grouper iridovirus (SGIV) in virus-infected grouper spleen cell cultures and in orange-spotted grouper, *Epinephelus coioides* [J]. Virology, 2008, 377(1): 39-48.
- [6] Wang F, Bi X, Chen L M, *et al.* ORF018R, a highly abundant virion protein from Singapore grouper iridovirus, is involved in serine/threonine phosphorylation and virion assembly [J]. J Gen Virol, 2008, 89(5): 1169-1178.
- [7] Huang X H, Huang Y H, Gong J, *et al.* Identification and characterization of a putative lipopolysaccharide-induced TNF-alpha factor (LITAF) homolog from Singapore grouper iridovirus [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2008, 373(1): 140-145.
- [8] Xia L Q, Cao J H, Huang X H, *et al.* Characterization of the Singapore grouper iridovirus (SGIV) ORF086R, a putative homolog of ICP18 involved in cell growth control and virus replication [J]. Arch Virol, 2009, 154(9): 1409-1416.
- [9] Eaton H E, Metcalf J, Penny E, *et al.* Comparative genomic analysis of the family Iridoviridae; re-annotating and defining the core set of iridovirus genes [J]. Virol J, 2007, 4(11): 1-17.
- [10] Pallister J, Goldie S, Coupar B, *et al.* Promoter activity in the 5' flanking regions of the Bohle iridovirus ICP18, ICP46 and major capsid protein genes [J]. Arch Viro, 2005, 150(8): 1911-1919.
- [11] Matzke M, Matzke A J, Kooter J M. RNA: guiding gene silencing [J]. Science, 2001, 293(5532): 1080-1083.
- [12] Carmichael G G. Silencing viruses with RNA [J]. Nature, 2002, 418(6896): 379-380.
- [13] Kim D, Rossi J. RNAi mechanisms and applications [J]. Biotechniques, 2008, 44(5): 613-616.
- [14] Berkhout B. Toward a durable anti-HIV gene therapy based on RNA interference [J]. Ann N Y Acad Sci, 2009, 1175(4): 3-14.
- [15] Cronin S J, Nehme N T, Limmer S, *et al.* Genome-wide RNAi screen identifies genes involved in intestinal pathogenic bacterial infection [J]. Science, 2009, 325(5938): 340-343.
- [16] Gerdes H H, Kaether C. Green fluorescent protein: applications in cell biology [J]. FEBS Lett, 1996, 389(1): 44-47.
- [17] 程顺峰. 牙鲆淋巴囊肿病毒-抗原蛋白的确认及定位 [J]. 水产学报, 2006, 30(4): 544-548.
- [18] 单志新, 林秋雄, 符永恒, 等. 用绿色荧光蛋白 (GFP) 作为报告分子筛选有效的 siRNA [J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2007, 23(3): 231-235.
- [19] Hobbs W E, DeLuca N A. Perturbation of cell cycle progression and cellular gene expression as a function of herpes simplex virus ICP0 [J]. J Virol, 1999, 73(10): 8245-8255.
- [20] Moss B, Shisler J L. Immunology 101 at poxvirus U: immune evasion genes [J]. Semin Immunol, 2001, 13(1): 59-66.
- [21] Kinchington P R, Fite K, Seman A, *et al.* Virion Association of IE62, the varicella-zoster virus (VZV) major transcriptional regulatory protein, requires expression of the VZV open reading frame 66 protein kinase [J]. J Virol, 2001, 75(19): 9106-9113.
- [22] Kleinman M E, Yamada K, Takeda A, *et al.* Sequence- and target-independent angiogenesis suppression by siRNA via TLR3 [J]. Nature, 2008, 452(7187): 591-597.
- [23] Barichievy S, Saayman S, Arbuthnot P, *et al.* RNA interference-based gene expression strategies aimed at sustained therapeutic inhibition of HIV [J]. Curr Top Med Chem, 2009, 9(12): 1065-1078.
- [24] Mittal V. Improving the efficiency of RNA interference in mammals [J]. Nat Rev Genet, 2004, 5(5): 355-65.
- [25] 沈剑虹, 罗其中, 包映晖, 等. siRNA 抑制神经元 NgR mRNA 的时效关系和毒性研究 [J]. 中华神经外科杂志, 2006, 22(11): 695-698.

The inhibition of expression of SGIV ICP46-GFP in FHM cell by RNA interfering

XIA Li-qun^{1,2}, LIANG Hai-ying¹, ZHANG hong-lian^{1,2}, QIN Qi-wei^{3*}

(1. College of Fishery, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524025, China;

2. State Key Laboratory of Biocontrol, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China;

3. South China Sea Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510301, China)

Abstract: Singapore grouper iridovirus (SGIV), as a causative agent of serious systemic disease, resulted in significant economic losses in grouper aquaculture. In this study, recombinant eukaryotic vector pEGFP-ICP46 which was inserted with SGIV ICP46 (infected cell polypeptides 46) gene was transfected into fathead minnow (FHM) cells, and ICP46-GFP fusion protein was successfully expressed in the cytoplasm of FHM cells. Candidate siRNA targeting SGIV ICP46 gene (siRNA-ICP46) was designed and chemically synthesized. To investigate the inhibition effect of siRNA-ICP46, pEGFP-ICP46 and siRNA was co-transfected into FHM cells, and the green fluorescence was observed by fluorescence microscope at the indicated time points (24, 36, 48, 60 and 72 h post transfection). During 24 – 48 h after transfection, the green fluorescence in FHM cells co-transfected with siRNA-ICP46/pEGFP-ICP46 were similar to that of positive control (co-transfected with siRNA-GFP/pEGFP-ICP46), and both of them are about 70% weaker than that of negative control (co-transfected with siRNA-Negative / pEGFP-ICP46), which show the siRNA-ICP46 can effectively inhibit the extrinsic SGIV ICP46 gene in FHM cells during 24 – 48 h after transfection.

Key words: RNA interference; green fluorescent protein; Singapore grouper iridovirus (SGIV); infected cell polypeptides(ICP46)

Corresponding author: QIN Qi-wei. E-mail: qinqw@scsio. ac. cn