

技术与方法

CRISPR/Cas9介导RSAD2基因敲除的ST细胞模型建立

李娟^{1,2} 杜柳阳¹ 顾金燕² 曹瑞兵^{1*}¹南京农业大学动物医学院, 南京 210095;²浙江大学动物医学中心, 农业农村部动物病毒学重点实验室, 杭州 310058)

摘要 RSAD2是一种多功能干扰素(interferon, IFN)诱导蛋白。该研究利用CRISPR/Cas9系统建立了RSAD2基因敲除的猪睾丸细胞系(swine testicular cell, ST cell)模型。应用在线工具设计了针对RSAD2基因的4条sgRNA, 并将其克隆至pX459载体。经嘌呤霉素初步筛选、Western blot检测确定了RSAD2-sgRNA-4具有最优敲除效果。该实验通过单克隆化转染RSAD2-sgRNA-4的ST细胞后成功获得RSAD2基因敲除ST细胞模型。双荧光素酶活性实验及实时荧光定量PCR实验(RT-qPCR)证明, RSAD2基因敲除对ST细胞的IFN- β 、IRF3、NF- κ B基因启动子活性及mRNA水平没有明显影响。该实验利用CRISPR/Cas9系统构建并获得稳定敲除RSAD2基因的ST细胞模型, 为RSAD2功能研究提供有力工具。

关键词 RSAD2; CRISPR/Cas9系统; 基因敲除

Construction of RSAD2-Knockout ST Cells by CRISPR/Cas9 System

LI Juan^{1,2}, DU Liuyang¹, GU Jinyan², CAO Ruibing^{1*}¹College of Veterinary Medicine, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China;²MOA Key Laboratory of Animal Virology, Zhejiang University Center for Veterinary Sciences, Hangzhou 310058, China)

Abstract RSAD2 is a multifunctional IFN (interferon) inducible protein. In this study, a RSAD2 gene knockout ST (swine testicular) cell line was established using CRISPR/Cas9 system. Four sgRNAs targeting RSAD2 gene were designed using online tools and cloned into pX459 vector. Recombinant plasmids were initially screened by puromycin and detected by Western blot, confirming that RSAD2-sgRNA-4 has the best knockout effect. The study successfully obtained the RSAD2 knockout ST cell model by sub-cloned the ST cells transfected with RSAD2-sgRNA-4. Dual luciferase activity assay and RT-qPCR (real-time fluorescence quantitative PCR) test proved that RSAD2 gene knockout had no significant effect on the promoter activities and mRNA levels of IFN- β , IRF3, and NF- κ B genes in ST cells. In total, the RSAD2 gene knockout ST cell model, which is constructed by CRISPR/Cas9 system, will come to be a powerful tool for studying the function of RSAD2.

Keywords RSAD2; CRISPR/Cas9 system; gene knockout

收稿日期: 2020-11-11 接受日期: 2021-03-23

国家重点研发计划(批准号: 2016YFD0500102)资助的课题

*通讯作者。Tel: 13805170659, E-mail: crb@njau.edu.cn

Received: November 11, 2020 Accepted: March 23, 2021

This work was supported by National Key Research and Development Program of China (Grant No.2016YFD0500102)

*Corresponding author. Tel: +86-13805170659, E-mail: crb@njau.edu.cn

规律成簇的间隔短回文重复序列(clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR)起源于细菌免疫系统的防御机制,这种防御机制的基本单位被称为CRISPR阵列,其主要由富含AT的前导序列、间隔序列及散布在其中的20~50 bp的重复序列组成,当细菌第一次被某病原感染时,病原体的一段基因会作为间隔序列加入细菌CRISPR阵列中,作为标记以抵抗再次感染^[1]。目前II型CRISPR系统被广泛应用于基因编辑技术,其核心元件为Cas9蛋白、CRISPR RNA和trans-activating RNA,后者融合为一条单向导RNA(single guide RNA, sgRNA),介导Cas9蛋白识别前间区序列临近基序(proto-spacer adjacent motif, PAM)并进行靶向剪切^[2]。

RSAD2(the radical S-adenosylmethionine domain containing 2)是一种多功能干扰素诱导蛋白。1997年, ZHU等^[3]在原代成纤维细胞感染人巨细胞病毒(human cytomegalovirus, HCMV)后显著上调的mRNA中首次发现该基因,并将其命名为*cig5*。该分子在进化过程中十分保守,有多种同源类似物,如虹鳟鱼白细胞感染鱼横纹病毒后产生的*vig-1*^[4]、鼠脾细胞感染水疱性口炎病毒(vesicular stomatitis virus, VSV)后产生的*mvig*^[5]及人巨噬细胞感染HCMV后产生的*viperin*^[6]。人源RSAD2含有361个氨基酸,分子量约为42 kDa,具有3个不同的结构域: N末端结构域、中心域及C末端结构域。N末端结构域含有1个双亲性 α 螺旋,具有内质网定位功能。中心域较为保守,包含1个CxxxCxxC(C为半胱氨酸残基)基序,结构与自由基S-腺苷甲硫氨酸(S-adenosylmethionine, SAM)酶家族中的MoaA分子类似,可以利用SAM作为辅因子,通过CxxxCxxC基序结合[4Fe-4S]簇。C末端具有种间高度保守性,与蛋白质间相互作用及底物识别有关^[7]。RSAD2过表达的成纤维细胞系感染HCMV实验最早证明了RSAD2具有抗病毒活性,其中病毒晚期蛋白gB、pp28和pp65的表达量显著降低,且干扰素刺激可以诱发不同种类细胞中RSAD2蛋白的大量产生^[6],预示RSAD2可能拥有广泛的抗病毒作用。随后,陆续有研究证明了RSAD2对流感病毒^[8](influenza virus, IV)、登革热病毒(dengue virus, DENV)、西尼罗病毒(West Nile virus, WNV)、寨卡病毒^[9](ZIKA virus, ZIKV)、丙型肝炎病毒^[10](hepatitis C virus, HCV)、狂犬病毒^[11](rabies virus, RV)及人类免疫缺陷病毒^[12](human immunodeficiency virus,

HIV)等均具有抗病毒作用,但是猪源RSAD2对重要猪源病毒的抗病毒作用及机制还有待研究。

养猪业的稳定是我国三农发展和国计民生中的重要议题,当前中国猪肉价格居高不下,猪肉的安全生产和供给受到来自“非洲猪瘟”等病毒性传染病的冲击,正面临巨大挑战。面对“新病频发、老病新发”的严峻局面,抗病毒策略的研究是解决养猪业困境的关键环节。猪睾丸细胞系(swine testicular cell, ST cell)是多种猪病毒性病原的最适生长细胞系,本研究利用CRISPR/Cas9工具构建RSAD2抗病毒基因敲除的ST细胞模型,为猪源病毒致病机制及抗病毒策略的深入研究提供必要工具。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞和病毒 ST细胞和仙台病毒(Sendai Virus, SeV)由本实验室保存。SeV的血凝效价为: 2^{11} 。ST细胞培养于含10%胎牛血清的DMEM培养基中,0.05%胰酶消化后按1:3比例传代。

1.1.2 质粒 CRISPR/Cas系统载体pX459及海肾荧光素酶报告质粒pRL-TK由本实验室保存;萤火虫荧光素酶报告质粒pGL3-IFN- β -Luc、pGL3-IRF3-Luc、pGL3-NF- κ B-Luc均由本实验室构建及保存。

1.1.3 生物材料及主要试剂 基因组抽提试剂盒、pMD18-T载体购自TaKaRa公司; *Bbs* I内切酶购自NEB公司; 2 \times taq plus master mix、T4连接酶、反转录试剂盒5 \times HiScript II qRT Super Mix、2 \times AceQ qPCR SYBR Green Master Mix试剂盒、DH5 α 感受态细胞购自南京诺唯赞生物科技有限公司; LipoMax转染试剂购自SUDEGEN公司; GeneRuler 1 000 bp Plus DNA Ladder购自Thermo公司; DMEM培养基和胎牛血清购自Gibco公司; TPCK胰蛋白酶购自Invitrogen公司; poly(I:C)购自InvivoGen公司; CCK-8及双荧光素酶报告基因检测试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司; RSAD2抗体购自proteintech公司; 兔抗 β -actin抗体购自杭州华安生物技术有限公司; HRP标记羊抗兔二抗和HRP标记羊抗鼠二抗购自KPL公司。蛋白裂解液1% TritonX-100由本实验室制备并保存。PCR引物由生工生物工程股份有限公司合成。

1.2 方法

1.2.1 sgRNA设计 从NCBI下载猪RSAD2基因序

列并利用在线设计网站 (<http://crispr.mit.edu>) 获得不同得分的sgRNA, 选择第一个外显子中得分较高的sgRNA-1、sgRNA-2、sgRNA-3、sgRNA-4作为候选序列。在其正义链5'端添加CACC, 反义链3'端添加AAAC, 形成黏性末端, 与*Bbs* I酶的黏性末端互补, 同时在正义链5'端CACC后添加G, 反义链5'端添加C以促进转录, 以此设计RSAD2基因敲除引物, 并将其送至生工生物工程股份有限公司合成, 引物信息见表1。

1.2.2 敲除载体构建 将pX459载体用*Bbs* I内切酶线性化酶切, 利用1%琼脂糖凝胶进行电泳鉴定并按照凝胶回收试剂盒说明书切胶回收。sgRNA寡核苷酸引物干粉用双蒸水稀释至100 $\mu\text{mol/L}$, 各取5 μL 正义链混合, 沸水浴2 min, 自然降至室温, 退火形成双链。双链sgRNA连接至pX459载体, 连接体系为: 1 μL T4连接酶, 1 μL 10 \times Ligase, 7 μL 双链sgRNA片段, 1 μL 线性化pX459载体, 16 $^{\circ}\text{C}$ 连接2 h。将连接产物转化DH5 α 感受态细胞, 涂布于氨苄抗性的固体LB平板中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 倒置培养过夜, 挑取单克隆振荡培养, 菌液PCR, 1%琼脂糖核酸胶鉴定并挑取阳性克隆送至南京擎科生物科技有限公司测序。

1.2.3 敲除载体验证 将ST细胞接种于24孔板, 待细胞融合至80%时, 按照LipoMax转染试剂说明书将RSAD2-sgRNA重组载体转染至ST细胞中, 转染6 h后换成含有2%血清的DMEM培养基, 24 h后换为含有终浓度为2 $\mu\text{g/mL}$ 嘌呤霉素的新鲜培养基。用该浓度的嘌呤霉素可以筛选转染成功的ST细胞, 每隔24 h换液, 进行连续3天的阳性细胞的筛选。3天后换成含有20%血清的DMEM培养基, 扩大培养阳性细胞。分别取各自存活下来的细胞, 一部分用

于抽取基因组检测碱基序列的变化, 检测引物见表1, 另一部分用poly(I:C)刺激后收取细胞用Western blot检测RSAD2的蛋白表达水平, 以此挑选敲除效果最好的sgRNA来进行RSAD2稳定敲除细胞系的筛选。

1.2.4 RSAD2稳定敲除细胞系的筛选 将敲除效果最好的RSAD2-sgRNA-4重组载体瞬时转染ST细胞, 经浓度为2 $\mu\text{g/mL}$ 嘌呤霉素的连续筛选后扩大培养, 用胰酶消化并计数, 倍比稀释后取出100个细胞接种于96孔板。待孔板里长出单克隆细胞群落后, 取出一部分细胞抽取基因组测序, 与原基因组序列比对, 分析切割修复效果。另一部分用poly(I:C)刺激后进行Western blot检测RSAD2蛋白水平。挑取1个经测序及Western blot验证为阳性的单克隆细胞株进行亚克隆, 待亚克隆细胞株长成群落后再次进行测序及Western blot验证, 确保其敲除效果。最后, 将序列分析有切割修复效果及不表达RSAD2蛋白的单克隆细胞扩大培养并冻存。

1.2.5 CCK8试剂盒检测细胞活力 按照CCK8试剂盒说明书, 将4株单克隆细胞系及正常ST细胞稀释至 5×10^4 个/mL并接种于96孔板(100 μL /孔), 同时设置DMEM为空白对照。待培养过夜后每孔添加10 μL CCK-8溶液, 分别于1 h、2 h、4 h后用酶标仪检测波长在450 nm处的吸光度(D)值。本实验至少独立重复三次。

1.2.6 双荧光素酶报告基因实验 将RSAD2基因敲除细胞及正常的ST细胞分别接种于12孔板, 置于37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO₂培养箱中培养, 待细胞融合至80%左右时, 按照脂质体转染试剂盒LipoMax说明书进行转染, 0.9 μg 荧光素酶报告质粒IFN- β -Luc、IRF3-

表1 引物寡核苷酸序列

Table 1 The oligo nucleotide sequences of primers

| 引物名称 Primer names | 寡核苷酸序列 Oligo nucleotide sequences |
|----------------------|--|
| sgRNA-1 primer | F: 5'-CAC CGA AGT GGT AAT TGA CGC TAG TGG G-3' R: 5'-AAA CCC CAC TAG CGT CAA TTA CCA CTT C-3' |
| sgRNA-2 primer | F: 5'-CAC CGA GAA GCT GGG GAA CCC CCG AGG G-3' R: 5'-AAA CCC CTC GGG GGT TCC CCA GCT TCT C-3' |
| sgRNA-3 primer | F: 5'-CAC CGT GGG CAG CTT TCT GGC GGG CAG G-3' R: 5'-AAA CCC TGC CCG CCA GAA AGC TGC CCA C-3' |
| sgRNA-4 primer | F: 5'-CAC CGT GGG GAA CCC CCG AGG GCA CAG G-3' R: 5'-AAA CCC TGT GCC CTC GGG GGT TCC CCA C-3' |
| Detection primer | F: 5'-GAA ACT TGA ACT CAA TTG AGA GTG-3' R: 5'-ATA CGA TGG TAC ACA GGA ACC T-3' |

表2 实时荧光定量PCR引物
Table 2 Primers used in real-time quantitative PCR

| 引物名称 Primer names | 寡核苷酸序列 Oligo nucleotide sequences |
|----------------------|--|
| GAPDH | F: 5'-TGG TGA AGG TCG GAG TGA AC-3' R: 5'-GGA AGA TGG TGA TGG GAT TTC-3' |
| IFN- β | F: 5'-GAT ACC AAC AAA GGA GCA GCA AT-3' R: 5'-GAG CAT CTC GTG GAT AAT CAA TAC-3' |
| IRF3 | F: 5'-CTC ACC ACG CTA CAC CCT CTG GTT C-3' R: 5'-GAA ATG TGC AGG TCC ACC GTG TTC T-3' |
| NF- κ B | F: 5'-AAA GAC TGC CGG GAT GGC TTC TAT G-3' R: 5'-TGT TGT TGG TCT GGA TGC GCT GAT T-3' |

Luc、NF- κ B-Luc以及0.1 μ g内参质粒pRL-TK共转染细胞, 转染24 h后感染10 μ L SeV, 12 h后根据双荧光素酶报告基因检测试剂盒说明书进行双荧光素酶检测。本实验至少独立重复三次。

1.2.7 实时荧光定量PCR(real-time quantitative PCR, RT-qPCR) 将ST细胞及RSAD2基因敲除的ST细胞接种于24孔板, 置于37 $^{\circ}$ C、5% CO₂培养箱中培养, 待细胞融合至80%左右时感染5 μ L SeV, 12 h后收样。以Trizol法抽提RNA后反转录获得cDNA, 以cDNA为模板进行qPCR扩增, 检测IFN- β 、IRF3及NF- κ B基因mRNA水平, 以GAPDH基因为内参, mRNA相对水平采用比较Ct法来计算, 即每个样品中靶基因的相对mRNA水平用以下公式计算: 相对mRNA水平 = $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 。每个样品做3个重复孔, 实时荧光定量PCR引物见表2。反应扩增条件为: 94 $^{\circ}$ C预变性300 s; 94 $^{\circ}$ C变性15 s, 60 $^{\circ}$ C退火15 s, 进行40个循环扩增并收集荧光信号。实时荧光定量PCR反应体系为: 上下游引物各1 μ L, 2 μ L cDNA, 10 μ L 2 \times SYBR Green Master Mix, 6 μ L ddH₂O。本实验至少独立重复三次。

1.3 统计学处理

实验数据用GraphPad Prism 8.0软件进行分析, 结果采用 $\bar{x}\pm s$ 表示, 两组间的比较采用t检验分析, * $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 RSAD2-sgRNA载体成功构建

pX459载体(载体图谱如图1A所示)经Bbs I酶切, 与双链的sgRNA连接并转化DH5 α , 挑取阳性单克隆送测序鉴定。测序结果显示, sgRNA片段均已成功插入pX459载体, 4个RSAD2-sgRNA均构建成功, 分

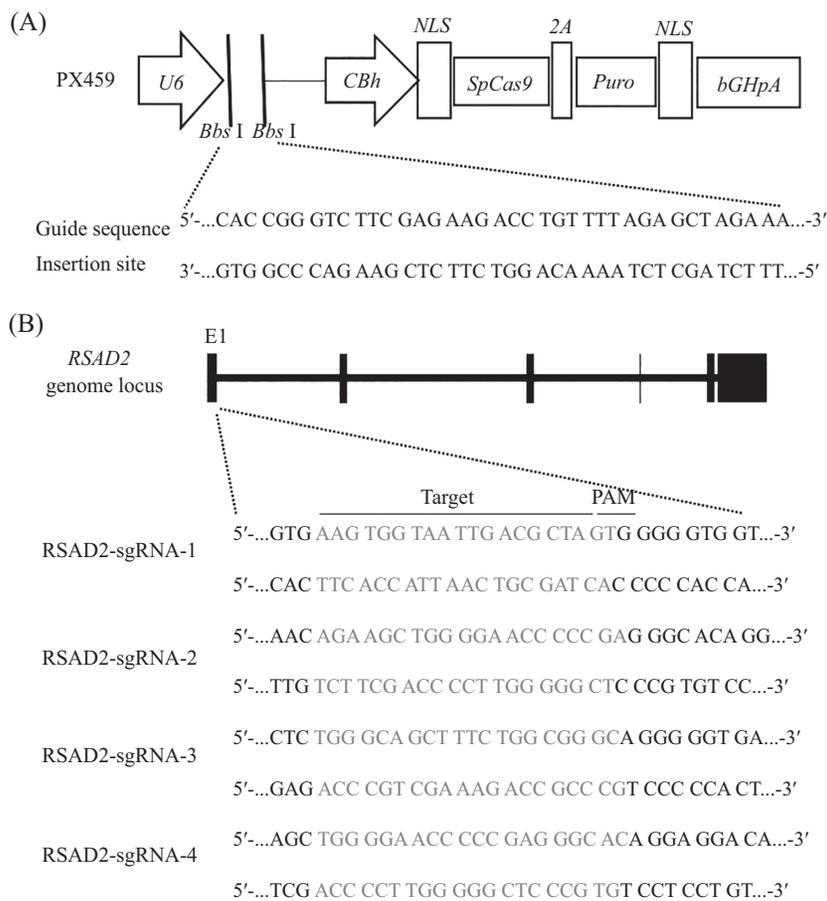
别被命名为: RSAD2-sgRNA-1、RSAD2-sgRNA-2、RSAD2-sgRNA-3、RSAD2-sgRNA-4。4个sgRNA均靶向RSAD2基因第一外显子处, 靶向识别位点和核苷酸序列如图1B所示。

2.2 RSAD2-sgRNA敲除效果验证

为了挑选具有最佳敲除效果的RSAD2-sgRNA, 我们对4个RSAD2-sgRNA重组质粒在ST细胞上的敲除效果进行验证。将ST细胞接种于24孔板, 用LipoMax转染试剂将RSAD2-sgRNA重组载体转染至ST细胞中, 24 h后换成含有终浓度为2 μ g/mL嘌呤霉素的新鲜培养基, 每隔24 h换液进行连续3天的阳性细胞的筛选后, 增加血清浓度扩大培养阳性细胞。存活细胞经poly(I:C)刺激后, 收取细胞并用Western blot检测RSAD2蛋白表达水平, 结果如图2所示, RSAD2-sgRNA-1没有发挥敲除作用; RSAD2-sgRNA-2发挥部分敲除效应; RSAD2-sgRNA-3和RSAD2-sgRNA-4敲除效果最好, 其中RSAD2-sgRNA-4敲除最彻底, 故选取RSAD2-sgRNA-4进行RSAD2基因稳定敲除细胞系的构建。

2.3 RSAD2基因稳定敲除ST细胞系成功构建

利用转染试剂瞬时转染重组载体RSAD2-sgRNA-4至ST细胞中, 经嘌呤霉素筛选及初步验证, 选出阳性单克隆细胞系, 挑取其中1个阳性单克隆细胞集落进行亚克隆, 最后挑出4株单克隆细胞。将这4株细胞系抽提基因组测序, 序列比对发现这4株细胞系均在sgRNA靶标序列PAM前插入了1个碱基C(图3A), 说明打靶成功。Western blot结果显示, 4株单克隆细胞系均不表达RSAD2蛋白(图3B), 说明RSAD2基因在ST细胞中成功敲除, 并将这4株敲除细胞系分别命名为RSAD2-KO-1、RSAD2-KO-2、RSAD2-KO-3以及RSAD2-KO-4。

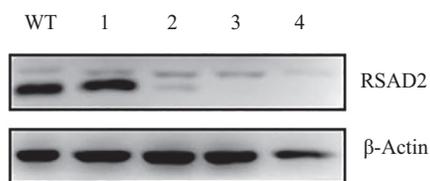


A: PX459质粒结构; B: *RSAD2*第一外显子处4条sgRNA的靶标序列和PAM序列。

A: structure of plasmid PX459; B: four sgRNA targeting sequences and PAM sequences of *RSAD2* exon 1.

图1 构建靶向*RSAD2*基因的PX459质粒示意图

Fig.1 Schematic of *RSAD2*-targeting PX459 plasmid



WT: 对照组; 1: RSAD2-sgRNA-1; 2: RSAD2-sgRNA-2; 3: RSAD2-sgRNA-3; 4: RSAD2-sgRNA-4。

WT: control group; 1: RSAD2-sgRNA-1; 2: RSAD2-sgRNA-2; 3: RSAD2-sgRNA-3; 4: RSAD2-sgRNA-4.

图2 Western blot检测RSAD2-sgRNA质粒在ST细胞中的敲除效果

Fig.2 *RSAD2*-sgRNA plasmids knockout effect detection in ST cells by Western blot

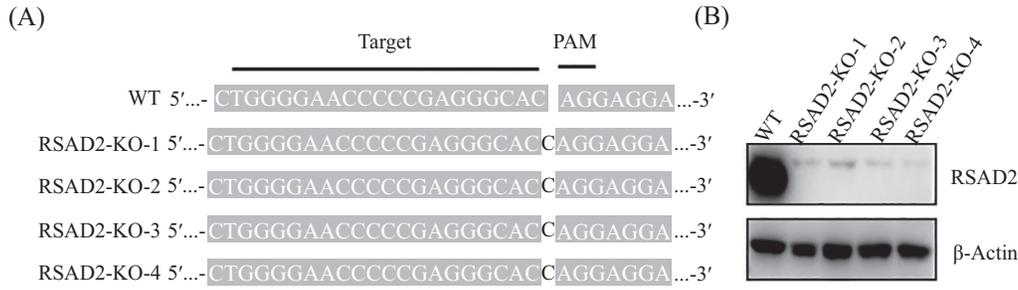
2.4 敲除细胞系的细胞活力鉴定

利用CCK8试剂盒对4株单克隆细胞的细胞活力进行鉴定。结果如图4所示,与正常ST细胞相比,RSAD2-KO-1、RSAD2-KO-2和RSAD2-KO-3的细胞活力均发生了不同程度的变化,而RSAD2-KO-4与正常ST细胞的细胞活力没有统计学差异,说明*RSAD2*基因敲除对RSAD2-KO-4的细胞活力没有影响,RSAD2-KO-4单克隆细胞株是用于*RSAD2*基因

功能研究的最佳敲除细胞系。

2.5 *RSAD2*基因敲除不影响SeV诱导的*IFN- β* 、*IRF3*、*NF- κ B*基因启动子活性

将荧光素酶报告质粒*IFN- β -Luc*、*IRF3-Luc*、*NF- κ B-Luc*以及内参质粒pRL-TK按照9:1的比例共转染ST细胞和敲除细胞系,24 h后感染10 μ L SeV,12 h后裂解细胞检测荧光素酶活性,鉴定*RSAD2*基因敲除对*IFN- β* 、*IRF3*、*NF- κ B*基因启动子活性的影响。

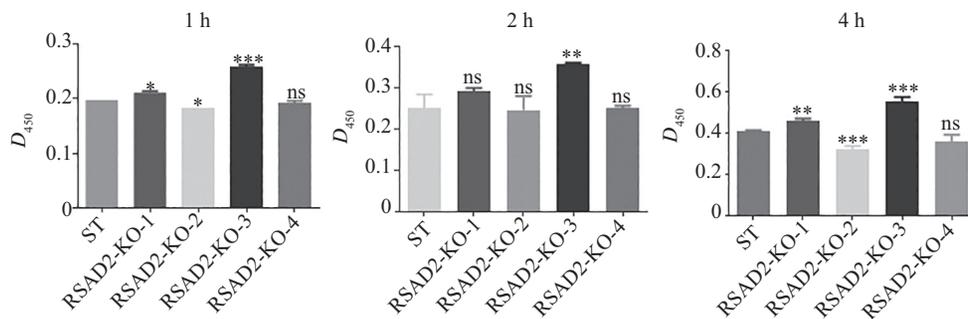


A: RSAD2-KO细胞序列与RSAD2基因序列比对分析; B: Western blot检测ST细胞单克隆稳定株。

A: comparison and analysis of gene sequences between the RSAD2-KO cells and *RSAD2* gene; B: detection of monoclonal stable strains in ST cells by Western blot.

图3 RSAD2基因敲除ST单克隆细胞系的鉴定

Fig.3 Identification of *RSAD2* gene knock out ST monoclonal cell lines

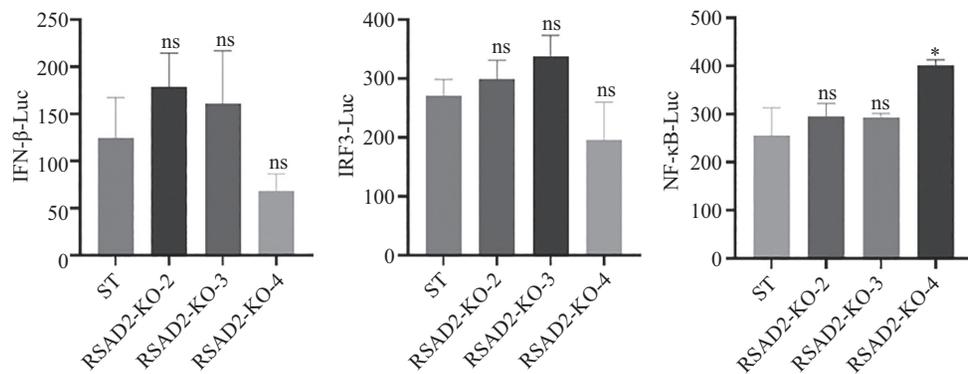


ns: 没有差异; * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$, 与ST组比较。

ns: no significance; * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ compared with ST group.

图4 CCK-8法细胞增殖活力检测

Fig.4 Detection of cell proliferation activity by CCK-8



ns: 没有差异; * $P < 0.05$, 与ST组比较。

ns: no significance; * $P < 0.05$ compared with ST group.

图5 RSAD2基因敲除对SeV诱导的IFN- β 、IRF3、NF- κ B启动子活性的影响

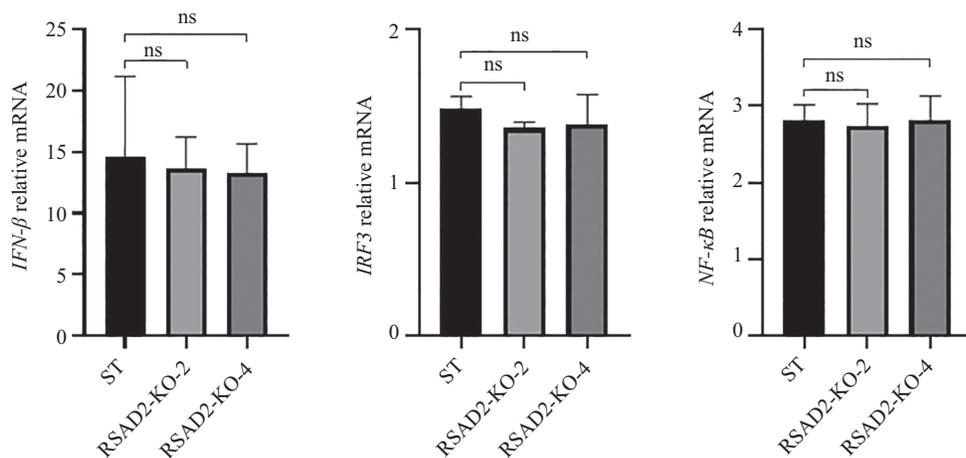
Fig.5 Effects of *RSAD2* gene knockout on SeV-induced *IFN- β* , *IRF3* and *NF- κ B* promoter activity

结果如图5所示,与对照ST细胞相比,RSAD2-KO-2和RSAD2-KO-3克隆细胞株的RSAD2基因敲除对SeV诱导的*IFN- β* 、*IRF3*、*NF- κ B*基因启动子活性无显著影响。RSAD2-KO-4克隆细胞株的RSAD2基因敲除对SeV诱导的*IFN- β* 、*IRF3*基因启动子活性无显著影响,对*NF- κ B*基因启动子活性具有轻微促进

作用(1.6倍)。综合本实验结果,RSAD2基因敲除对SeV在ST细胞上诱导的*IFN- β* 、*IRF3*、*NF- κ B*基因启动子活性没有显著影响。

2.6 RSAD2基因敲除不影响SeV诱导的IFN- β 、IRF3、NF- κ B基因mRNA水平

将ST细胞及RSAD2基因敲除ST细胞接种于24



ns: 没有差异。

ns: no significance.

图6 RSAD2基因敲除对SeV诱导的IFN-β、IRF3、NF-κB mRNA水平的影响

Fig.6 Effects of RSAD2 gene knockout on SeV-induced IFN-β, IRF3 and NF-κB mRNA level

孔板,待细胞长成80%左右时接种5 μL SeV,感染12 h后收样,抽提细胞总RNA,通过RT-qPCR检测IFN-β、IRF3、NF-κB基因mRNA的相对水平。实验结果如图6所示,RSAD2基因敲除细胞与正常ST细胞内IFN-β、IRF3、NF-κB的mRNA水平没有显著差异,表明RSAD2基因敲除不影响SeV诱导的IFN-β、IRF3、NF-κB基因转录水平。

3 讨论

IFN是机体天然免疫反应的主要成员,也是机体抵御外来病毒感染的重要防线,能够诱导大量抗病毒蛋白的产生,RSAD2就是一种受到广泛关注的IFN诱导蛋白,其能够在多种细胞中被I型、II型、III型IFN、dsDNA、dsRNA、LPS, poly(I:C)及病毒感染诱导产生。当外源刺激物刺激细胞时,胞内模式识别受体如TLRs、RLRs激活IFN调节因子IRF3和IRF7,分泌的IFN与细胞表面IFN受体结合,诱导产生IFN刺激基因因子3复合体,该复合体与RSAD2基因启动子结合,诱导RSAD2蛋白表达,发挥抗病毒作用,这种RSAD2的诱导表达被称为经典的IFN依赖途径^[13]。此外,有些病毒,如HCMV^[14]、VSV^[15]能够通过IFN不依赖途径诱导产生RSAD2,该途径产生的RSAD2受到IRF1或IRF3等干扰素调控因子的调控,IRF3通过作用于RSAD2基因上游的IFN刺激反应元件直接诱导RSAD2基因表达^[7,16-17]。

大量文献表明,RSAD2对多种病毒具有广谱的抗病毒效应,能够利用不同机制抑制不同病毒的

复制。正常细胞内,N-端双亲性α螺旋结构域能使RSAD2定位于内质网的胞质面,但在丙型肝炎病毒(hepatitis C virus, HCV)感染的细胞中,RSAD2定位于脂滴,发挥抗病毒作用,N-端结构域缺失后这种定位能力及抗病毒能力消失^[18];在抗IV的研究中,RSAD2利用其N-端结构域与法尼基焦磷酸合酶(farnesyl diphosphate synthase, FPPS)互作,降低FPPS活性,抑制脂滴的形成,改变质膜的流动性,抑制病毒粒子的出芽与复制^[8]。JIANG等^[19]通过点突变实验第一次证实了RSAD2中心结构域的重要性,当将CxxxCxxC基序中的3个半胱氨酸突变为丙氨酸后,RSAD2丧失了对HCV的抑制能力;GIZZI与其同事^[9]在研究黄病毒属成员包括DENV、WNV、ZIKV等时发现RSAD2通过中心域催化底物CTP为ddhCTP,后者发挥链终止子的作用,降低RNA依赖的RNA聚合酶的活性,抑制黄病毒属多种病毒的活性。目前,关于RSAD2的C末端结构域功能研究还较少,但已有其抗病毒功能的报道,它能与NS5A竞争性结合宿主跨膜蛋白hVAP-33,从而抑制HCV基因组的复制^[20];其C末端的17位氨基酸在抗DENV-2中发挥关键作用,通过病毒NS3蛋白与病毒复制中间体结合,抑制感染性病毒粒子的释放^[21]。以上研究表明,RSAD2是一种可以利用多途径发挥抗病毒效应的功能蛋白。

近年来,非洲猪瘟等病毒性传染病给养猪行业带来了巨大冲击,也给国家公共卫生安全带来威胁,抗病毒策略研究及疫苗研发是解决该问题的关键。

RSAD2对猪源病毒的抗病毒作用也逐渐被报道^[22-25],但其机制还未被全面解析。ST细胞是许多猪源病毒良好的体外研究模型,如猪丁型冠状病毒^[26]、猪传染性胃肠炎病毒^[27]、猪细小病毒、猪伪狂犬病毒、猪瘟病毒及日本乙型脑炎病毒等均能利用ST细胞进行分离和增殖,因此,本研究利用CRISPR/Cas9系统构建的RSAD2基因敲除ST细胞模型可为RSAD2抑制猪源病毒作用机制的研究提供有效工具。在后续研究中,用此细胞系开展RSAD2抗病毒机制研究会涉及IFN信号通路,而RSAD2基因敲除细胞系作为一个研究工具,不影响其他基因特别是RSAD2相关通路基因的表达,这是其可以作为研究工具的重要前提。为了排除由于脱靶等效应引起的对IFN信号通路的影响,我们检测了RSAD2基因敲除对IFN- β 、IRF3、NF- κ B表达的影响,结果显示RSAD2基因敲除不影响这些IFN相关基因的表达,证明了其作为细胞工具的可信度及应用价值。

参考文献 (References)

- [1] WRIGHT A V, NUNEZ J K, DOUDNA J A. Biology and applications of CRISPR systems: harnessing nature's toolbox for genome engineering [J]. *Cell*, 2016, 164(1/2): 29-44.
- [2] SINGH A, CHAKRABORTY D, MAITI S. CRISPR/Cas9: a historical and chemical biology perspective of targeted genome engineering [J]. *Chem Soc Rev*, 2016, 45(24): 6666-84.
- [3] ZHU H, CONG J P, SHENK T. Use of differential display analysis to assess the effect of human cytomegalovirus infection on the accumulation of cellular RNAs: induction of interferon-responsive RNAs [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94(25): 13985-90.
- [4] BOUDINOT P, MASSIN P, BLANCO M, et al. Vig-1, a new fish gene induced by the rhabdovirus glycoprotein, has a virus-induced homologue in humans and shares conserved motifs with the MoaA family [J]. *J Virol*, 1999, 73(3): 1846-52.
- [5] BOUDINOT P, RIFFAULT S, SALHI S, et al. Vesicular stomatitis virus and pseudorabies virus induce a vig1/cig5 homologue in mouse dendritic cells via different pathways [J]. *J Gen Virol*, 2000, 81(Pt11): 2675-82.
- [6] CHIN K C, CRESSWELL P. Viperin (cig5), an IFN-inducible antiviral protein directly induced by human cytomegalovirus [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98(26): 15125-30.
- [7] SEO J Y, YANEVA R, CRESSWELL P. Viperin: a multifunctional, interferon-inducible protein that regulates virus replication [J]. *Cell Host Microbe*, 2011, 10(6): 534-9.
- [8] WANG X, HINSON E R, CRESSWELL P. The interferon-inducible protein viperin inhibits influenza virus release by perturbing lipid rafts [J]. *Cell Host Microbe*, 2007, 2(2): 96-105.
- [9] GIZZI A S, GROVE T L, ARNOLD J J, et al. A naturally occurring antiviral ribonucleotide encoded by the human genome [J]. *Nature*, 2018, 558(7711): 610-4.
- [10] GHOSH S, PATEL A M, GRUNKEMEYER T J, et al. Interactions between viperin, vesicle-associated membrane protein A, and hepatitis C virus protein NS5A modulate viperin activity and NS5A degradation [J]. *Biochemistry*, 2020, 59(6): 780-9.
- [11] DISSANAYAKE T K S S, MIRHAKKAK M H, WU W L, et al. Comparative transcriptomic analysis of rhinovirus and influenza virus infection [J]. *Front Microbiol*, 2020, 11: 1580.
- [12] NASR N, MADDOCKS S, TURVILLE S G, et al. HIV-1 infection of human macrophages directly induces viperin which inhibits viral production [J]. *Blood*, 2012, 120(4): 778-88.
- [13] BOWIE A G, UNTERHOLZNER L. Viral evasion and subversion of pattern-recognition receptor signalling [J]. *Nat Rev Immunol*, 2008, 8(12): 911-22.
- [14] BOEHME K W, SINGH J, PERRY S T, et al. Human cytomegalovirus elicits a coordinated cellular antiviral response via envelope glycoprotein B [J]. *J Virol*, 2004, 78(3): 1202-11.
- [15] DIXIT E, BOULANT S, ZHANF Y, et al. Peroxisomes are signaling platforms for antiviral innate immunity [J]. *Cell*, 2010, 141(4): 668-81.
- [16] DEFILIPPIS V R, ROBISON B, KECK T M, et al. Interferon regulatory factor 3 is necessary for induction of antiviral genes during human cytomegalovirus infection [J]. *J Virol*, 2006, 80(2): 1032-7.
- [17] STIRNWEISS A, KSIENZYK A, KLAGES K, et al. IFN regulatory factor-1 bypasses IFN-mediated antiviral effects through viperin gene induction [J]. *J Immunol*, 2010, 184(9): 5179-85.
- [18] HELBIG K J, EYRE N S, YIP E, et al. The antiviral protein viperin inhibits hepatitis C virus replication via interaction with nonstructural protein 5A [J]. *Hepatology*, 2011, 54(5): 1506-17.
- [19] JIANG D, GUO H, XU C, et al. Identification of three interferon-inducible cellular enzymes that inhibit the replication of hepatitis C virus [J]. *J Virol*, 2008, 82(4): 1665-78.
- [20] WANG S, WU X, PAN T, et al. Viperin inhibits hepatitis C virus replication by interfering with binding of NS5A to host protein hVAP-33 [J]. *J Gen Virol*, 2012, 93(Pt 1): 83-92.
- [21] HELBIG K J C J, CALVERT J K, WATI S, et al. Viperin is induced following dengue virus type-2 (DENV-2) infection and has anti-viral actions requiring the C-terminal end of viperin [J]. *PLoS Negl Trop Dis*, 2013, 7(4): e2178.
- [22] FANG J, WANG H, BAI J, et al. Monkey viperin restricts porcine reproductive and respiratory syndrome virus replication [J]. *PLoS One*, 2016, 11(5): e0156513.
- [23] WU J, CHI H, FU Y, et al. The antiviral protein viperin interacts with the viral N protein to inhibit proliferation of porcine epidemic diarrhea virus [J]. *Arch Virol*, 2020, 165(10): 2279-89.
- [24] XU C, FENG L, CHEN P, et al. Viperin inhibits classical swine fever virus replication by interacting with viral nonstructural 5A protein [J]. *J Med Virol*, 2020, 92(2): 149-60.
- [25] LI W, MAO L, CAO Y, et al. Porcine viperin protein inhibits the replication of classical swine fever virus (CSFV) *in vitro* [J]. *Virology*, 2017, 14(1): 202.
- [26] HU H, JUNG K, VLASOVA A N, et al. Isolation and characterization of porcine deltacoronavirus from pigs with diarrhea in the United States [J]. *J Clin Microbiol*, 2015, 53(5): 1537-48.
- [27] WEI W H, QING H Y, LI Q Z, et al. Complete genomic sequence of the coronavirus transmissible gastroenteritis virus SHXB isolated in China [J]. *Arch Virol*, 2014, 159(9): 2295-302.