

干扰素调节因子3基因敲除对伪狂犬病病毒增殖的影响

张爽,樊爽爽,常雯茹,丁光绪,郭瑞珍,段利芳,杜永坤,褚贝贝,杨国宇*,王江*

(河南农业大学,农业农村部动物生化与营养重点开放实验室,郑州 450002)

摘要: 试验旨在研究敲除干扰素调节因子3 (interferon regulatory factor 3, IRF3)对伪狂犬病病毒 (pseudorabies virus, PRV)复制的影响。使用慢病毒介导的CRISPR/Cas9 基因编辑技术建立了IRF3 基因敲除PK15 细胞系。通过构建重组质粒 pIRF3-sgRNA, 转染至 HEK293T/17 细胞, 收获慢病毒并感染 PK15 细胞, 经嘌呤霉素筛选获得多克隆细胞系, T7 酶切鉴定后通过有限稀释法获得 PK15-IRF3^{-/-} 单克隆稳定细胞系。为验证敲除 IRF3 基因稳定细胞系是否构建成功, 采用实时荧光定量 PCR、Western blotting 方法检测 PRV 相关基因及蛋白的表达, 应用荧光显微镜和流式细胞术观察病毒复制情况并进行病毒滴度检测。结果显示, PK15-IRF3^{-/-} 细胞系感染 PRV-GFP 后 PK15-IRF3^{-/-} 细胞荧光强度明显强于 PK15 细胞。感染 PRV 野毒 (PRV-QXX) 后 PK15-IRF3^{-/-} 病毒滴度明显强于 PK15 细胞, PRV 的 gE 蛋白水平明显高于 PK15 细胞。在 mRNA 水平检测两种细胞中 PRV TK 基因的变化也得到相同的结果。进一步研究表明, 在感染 PRV-QXX 后, PK15 细胞中 IFN- β mRNA 会随着时间增加显著增高 ($P<0.05$), 但 PK15-IRF3^{-/-} 细胞中 IFN- β mRNA 则无明显变化。上述结果表明, 敲除 IRF3 基因后显著促进 PRV 的增殖, IRF3 在病毒的复制中发挥着重要作用, 为伪狂犬病的防控提供了新的方法和策略。

关键词: 干扰素调节因子3 (IRF3); 伪狂犬病病毒 (PRV); CRISPR/Cas9

中图分类号: Q78 **文献标识码:** A

Doi: 10.16431/j.cnki.1671-7236.2019.05.001

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



Effect of Interferon Regulatory Factor 3 Gene Knockout on Proliferation of Pseudorabies Virus

ZHANG Shuang, FAN Shuangshuang, CHANG Wenru, DING Guangxu, GUO Ruizhen,

DUAN Lifang, DU Yongkun, CHU Beibei, YANG Guoyu*, WANG Jiang*

(Key Laboratory of Animal Biochemistry and Nutrition, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China)

Abstract: The aim of the study was to investigate the effect of knockout of interferon regulatory factor 3 (IRF3) on the replication of pseudorabies virus (PRV). The IRF3 knockout PK15 cell line was established using lentiviral-mediated CRISPR/Cas9 genome editing technology. The recombinant plasmid pIRF3-sgRNA was constructed and transfected into HEK293T/17 cells. Lentivirus was obtained and infected with PK15 cells. The polyclonal cell line was obtained by puromycin screening. After T7 digestion, PK15-IRF3^{-/-} monoclonal stable cell line was obtained by limiting dilution method. To verify whether the stable cell line of IRF3 gene was successfully con-

收稿日期:2018-12-03

基金项目:转基因生物新品种培育重大专项(2016ZX08006001-006);国家自然科学基金(31502031);霍英东教育基金会高等院校青年教师基金(151033);优势特色学科建设经费(203/18xk0102)

作者简介:张爽(1994-),女,河南南阳人,硕士生,研究方向:基础兽医学,E-mail:2280901418@qq.com

*通信作者:杨国宇,博士,教授,博士生导师,研究方向:分子生物与生物化学,E-mail:haubiochem@163.com

王江,博士,副教授,硕士生导师,研究方向:细胞分子生物学,E-mail:nowingdream@126.com

structed, Real-time PCR and Western blotting were used to detect the expression of PRV-related genes and proteins. Fluorescence microscopy and flow cytometry were used to observe the virus replication. The results showed that the fluorescence intensity of PK15-IRF3^{-/-} cells was significantly stronger than that of PK15 cells after infection of PRV-GFP in PK15-IRF3^{-/-} cell line. The PK15-IRF3^{-/-} virus titer was significantly stronger than that of PK15 cells after infection with PRV-QXX, and the gE protein level of PRV was significantly higher than that of PK15 cells. The same results were obtained by detecting changes of PRV TK gene in the two cells at the mRNA level. Further studies showed that IFN- β mRNA in PK15 cells increased significantly with time after infection with PRV-QXX ($P < 0.05$), but there was no significant change in IFN- β mRNA in PK15-IRF3^{-/-} cells. The above results indicated that knocking out IRF3 significantly promoted the proliferation of PRV, and IRF3 played an important role in virus replication, providing new methods and strategies for the prevention and control of pseudorabies.

Key words: interferon regulatory factor 3 (IRF3); pseudorabies virus (PRV); CRISPR/Cas9

伪狂犬病(pseudorabies, PR)是由伪狂犬病病毒(pseudorabies virus, PRV)感染引起的多种属动物发热、奇痒(猪除外)并伴随着脑脊髓炎的发生的传染病。PRV是 α 疱疹病毒,猪是PRV的天然宿主和储存宿主^[1]。猪伪狂犬病主要症状为母猪流产、死胎、木乃伊胎,初生仔猪主要表现为衰竭死亡且死亡率高达100%^[2]。近年来,PRV在全国各个猪场广泛流行,给养猪业带来了严重的经济损失^[3-4]。为减少养殖业的经济损失并为PRV的防控提供新的策略与方法,本试验以GAS-STING信号通路的干扰素调节因子3(interferon regulatory factor 3, IRF3)为着手点进行研究,IRF3是干扰素调节因子之一,IRFs是一具有螺旋—螺旋结构的转录因子家族,目前已发现有10种IRFs,即IRF1~IRF10,IRF3基因定位于19q13.3-13.4,编码由427个氨基酸组成的、分子质量为55 ku的蛋白质^[5-6]。IRF3属于螺旋—转角—螺旋蛋白,由不同的功能结构域组成^[7],其主要功能是诱导IFN- α /β干扰素的表达^[8-9],IFN- α /β的诱导受到多种转录因子如干扰素调节因子的调节,在病毒感染早期对IFN- α /β基因表达起重要调节作用。本试验应用CRISPR/Cas9基因编辑技术,通过sgRNA(single guide RNA)引导Cas9蛋白在IRF3基因组中对相应的含有PAM(protospacer-adjacent motif)序列的靶点进行切割,断裂基因组DNA,然后通过机体自身两种修复机制进行修复而达到敲除目的蛋白的目的,以期为PRV等DNA病毒引起疾病的防控提供新的方案。

1 材料与方法

1.1 材料

猪肾上皮细胞PK15、人胚胎肾细胞HEK293T/17、非洲绿猴肾细胞(Vero细胞)、大肠杆菌Top10感受态细胞、PRV-GFP和PRV-QXX(野毒株)均由本实验室保存;52961载体购自Addgene公司;两种辅助包装原件载体质粒pMD2.G和pSPAX2均购自Sigma公司;PEI和SanPrep柱式DNA胶回收试剂盒均购自生工生物工程(上海)股份有限公司;质粒中提试剂盒购自QIAGEN公司;Q5® Hot Start High-Fidelity DNA Polymerase、限制性内切酶BsmBI、T4 DNA连接酶、T7核酸内切酶均购自NEB公司;细胞/细菌/酵母基因组DNA提取试剂盒购自上海莱枫生物科技有限公司;PRV内切鼠源gE单克隆抗体购自普莱柯生物工程股份有限公司; β -actin购自武汉三鹰生物技术有限公司;IRF3激活剂KIN1148购自MCE公司。

1.2 方法

1.2.1 引物设计与合成 根据NCBI公布的猪IRF3基因序列(GenBank登录号:NC_010448.4),以猪IRF3基因的第一个外显子为起始,在同源序列区域找到2个合适的(符合SpCas9的PAM序列要求:NGG)靶位点设计sgRNA(表1),以高效敲除猪IRF3基因,使其低于正常表达水平;利用Primer Premier 6.0软件设计T7核酸内切酶酶切检测PCR扩增引物;根据NCBI网站提供的mRNA序列,应用NCBI的Primer-BLAST网页设计实时荧光定量PCR引物,引物信息见表1。

表1 引物信息

Table 1 Primers information

基因 Genes	引物序列 Primer sequences (5'→3')	片段大小 Fragment size/bp	用途 Application
sgRNA1	F: CACCGTGGAAAGCACGGCTTGCAGC R: AAACGCCGCAAGCCGTGCTTCCAC	114, 517	基因敲除
sgRNA2	F: CACCGAGGGATGCGGAAGCGCGTG R: AAACCACCGCTTCCGCATCCCT	96, 535	基因敲除
IRF3	F: GCCCATGGAACTCAGAA R: AAATCCCCCTTACCTCCACC	651	普通 PCR
IFN-β	F: AGTTGCCTGGGACTCCTCAA R: CAGGATGCTCAGTGGGTCTC	235	实时荧光定量 PCR
TK	F: GCGTACTGGCGCACTCTG R: ATGTCCCCGACGATGAAGC	153	实时荧光定量 PCR
β-actin	F: CTGAACCCCAAAGCCAACCGT R: TTCTCCTTGATGTCCCCGACCG	317	实时荧光定量 PCR

1.2.2 载体的构建及鉴定 将上、下游引物分别进行退火杂交:上、下游引物(50 μmol/L)各5 μL,置于PCR仪进行退火,退火程序:95 °C 10 min,95~85 °C(-2 °C/s),85~25 °C(-0.1 °C/s)。将52961质粒用BsmBI酶切,反应体系30 μL:52961质粒(1 μg/μL)2 μL,10×NEBuffer™ 2 3 μL,BsmBI 1 μL,ddH₂O 24 μL;反应条件:37 °C酶切3 h。酶切结束后用0.8%琼脂糖凝胶电泳检测并进行胶回收。回收线性片段与退火杂交的引物以T4 DNA连接酶4 °C连接过夜。连接产物转化大肠杆菌Top10感受态细胞,挑取单克隆菌落送生工生物工程(上海)股份有限公司测序验证。测序正确的样品以中提试剂盒提取质粒,分别命名为:pIRF3-sgRNA1、pIRF3-sgRNA2。

1.2.3 细胞转染 将HEK293T/17细胞以1×10⁶个/瓶接种于T-25培养瓶,培养18~24 h,至细胞融合度约40%时分为3组进行试验:第1组阴性对照(NC);第2组pIRF3-sgRNA1;第3组pIRF3-sgRNA2。A液配制:将重组质粒(pIRF3-sgRNA1/pIRF3-sgRNA2)同pMD2.G及pSPAX2按比例(重组质粒2 μg,pMD2.G 0.5 μg,pSPAX2 1.5 μg)加入到100 μL Opti-MEM中,静置5 min;B液配制:将转染试剂按1×PEI:DNA为4:1的比例加入至100 μL Opti-MEM中,并将A液和B液进行混匀后室温静置25 min;然后将混合液滴加入到相应的细胞瓶中,在37 °C、5% CO₂的培养箱中培养8~10 h,将转染液置换为新鲜的10% FBS DMEM培养基继续培养,48和72 h进行两次病毒液收集,两次收集的病毒液混合后1 000 g离心5 min收集

上清。

1.2.4 慢病毒液感染细胞 在6孔板中,以5×10⁵个/孔铺种PK15细胞,当细胞生长至40%融合度时,分3组进行感染:第1组阴性对照(NC);第2组pIRF3-sgRNA1;第3组pIRF3-sgRNA2。将1 mL慢病毒液和1 mL培养基加入细胞。感染48 h后,用含8 μg/mL Puromycin的10% FBS DMEM筛选阳性细胞,隔天更换培养液,连续培养7 d左右,观察到第1组细胞(NC)全部死亡,其他两组细胞换用维持浓度为2 μg/mL 含嘌呤霉素的10% FBS DMEM继续培养。将筛选获得的细胞接种于60 mm培养皿中,当细胞生长至80%融合度时,取适量细胞利用细胞/细菌/酵母基因DNA提取试剂盒进行基因组提取,剩余细胞继续传代培养并冻存。

1.2.5 T7核酸内切酶检测 以提取的基因组DNA为模板进行PCR扩增,PCR反应体系50 μL:基因组模板量200 ng,5×Q5 Reaction Buffer 10 μL,5×Q5 High GC Enhancer Buffer 10 μL,10 mmol/L dNTP 1 μL,IRF3-F/R(20 μmol/L)各1 μL,Q5® Hot Start High-Fidelity DNA Polymerase 0.5 μL,ddH₂O补至50 μL。PCR反应条件:98 °C预变性5 min;98 °C变性30 s,66 °C退火20 s,72 °C延伸30 s,共35个循环;72 °C延伸2 min;4 °C保存。PCR产物进行1.0%琼脂糖凝胶电泳检测。用SanPrep柱式DNA胶回收试剂盒对PCR产物进行纯化回收。取200 ng PCR产物进行退火杂交,反应条件同引物退火杂交,用T7核酸内切酶进行酶切,反应体系15 μL:模板200 ng,10×NEBuffer™ 2 1 μL,ddH₂O补至15 μL。退火杂交结束后各加

入 T7 核酸内切酶 $0.4\ \mu\text{L}$, $37\ ^\circ\text{C}$ 酶切 1 h, 用 DNA-PAGE 胶进行电泳检测, 并计算编辑效率。

1.2.6 PK15-IRF3^{-/-} 单克隆细胞系的筛选 本试验选择位于猪 *IRF3* 基因外显子 1 上编辑效率较高的 sgRNA2 位点进行单克隆细胞筛选。将筛选获得的 PK5-IRF3 sgRNA2 多克隆细胞系用有限稀释法以 0.3 个/孔铺种于 96 孔板中, 共 4 板。培养 1 周后, 将 96 孔板中单细胞群落转移至 24 孔板中并置于培养箱, 待细胞长至 80% 融合度时, 将 24 孔板里的 PK15-IRF3 sgRNA2 细胞取 1/3 进行基因组提取, 剩余细胞转至 6 孔板内。待细胞长满后取适量细胞进行基因组提取, 并以基因组为模板, 对 *IRF3* 基因进行 PCR 扩增。PCR 扩增产物送往生工生物工程(上海)股份有限公司测序, 分析测序结果。

1.2.7 荧光观察及流式细胞仪检测 以 2.5×10^4 个/孔在 24 孔板中铺种 PK15 和 PK15-IRF3^{-/-} 细胞, 各 12 孔。当细胞生长至 40% 融合度时用 PRV-GFP 处理细胞。各选取 1 孔 PK15 和 PK15-IRF3^{-/-} 细胞计数, 以感染复数(MOI)为 0.01 感染 PRV-GFP; 加入适量 PRV-GFP 于不含血清的 DMEM 中进行稀释, 取出细胞弃去培养基并用 PBS 清洗细胞一次后加入稀释好的病毒液置于 $37\ ^\circ\text{C}$ 、5% CO₂ 培养箱孵育细胞 1 h, 而后弃去培养基并用 PBS 清洗细胞 2 次, 后加入 1% FBS 的 DMEM 置于培养箱中继续培养。分别在感染 PRV-GFP 后 6、12、24、36、48 h 用荧光倒置显微镜观察各组细胞的荧光情况并进行拍照, 利用流式细胞仪进行检测, 并进行数据收集分析。

1.2.8 PRV 滴度测定

1.2.8.1 病毒扩增和收取 以 1.5×10^4 个/孔在 12 孔板中铺种 PK15 和 PK15-IRF3^{-/-} 细胞。当细胞生长至 40% 融合度时, 用 PRV-QXX 处理细胞。各选取 1 孔 PK15 和 PK15-IRF3^{-/-} 细胞进行计数, 以 MOI = 0.1 感染 PRV-QXX; 加入适量 PRV-QXX 于不含血清的 DMEM 中进行病毒稀释, 取出细胞, 弃去培养基并用 PBS 清洗细胞 1 次, 加入稀释好的病毒液后置于 $37\ ^\circ\text{C}$ 、5% CO₂ 培养箱孵育 1 h, 1 h 后弃去培养基用 PBS 清洗细胞 2 次, 后加入 1% FBS 的 DMEM 置于培养箱中培养, 分别在感染 PRV-QXX 后 6、12、24、36、48 h 观察细胞病变并将 12 孔板置于 $-80\ ^\circ\text{C}$ 冰箱里反复冻融 2 次后取出, 用移液枪吹打 12 孔板底部的细胞, 吸出培养基和细胞加入到 2 mL 离心管, $12\ 000\ \text{g}$ 离心 5 min 收集上清。

1.2.8.2 病毒滴度测定 将 Vero 细胞以 1×10^4 个/孔铺种于 96 孔板, 细胞 30% 融合度左右时进行病毒滴度测定。取 12 个 2 mL 离心管, 每管加入 900 μL 不含血清的 DMEM, 取 100 μL 病毒液进行倍比稀释。弃去培养基, 在每孔中加上述稀释好的病毒液 100 $\mu\text{L}/\text{孔}$, 置于培养箱吸附 1 h。1 h 后, 弃去病毒液, 加入 1% FBS DMEM 120 $\mu\text{L}/\text{孔}$ 置于培养箱培养。每隔一天观察细胞病变, 观察 5~7 d, 读出病变孔数并计算病毒滴度:(Reed-Muench 两氏法)找到 $>50\%$ 和 $<50\%$ 病变的两列, 然后计算比距($>50\%$ 的病变孔数 - 50% 的病变孔数) / ($>50\%$ 的病变孔数 - $<50\%$ 的病变孔数), 计算 TCID₅₀。

1.2.9 Western blotting 检测 PRV gE 蛋白 以 5×10^5 个/孔在 60 mm 培养皿中铺种 PK15 和 PK15-IRF3^{-/-} 细胞, 培养细胞融合度约 60% 时进行细胞计数, 并以 MOI = 0.01 感染 PRV-QXX; 加入适量病毒于不含血清的 DMEM 进行稀释, 取出细胞并用 PBS 清洗细胞 1 次, 把稀释好的病毒液加入细胞培养基中置于培养箱中孵育 1 h, 然后弃去培养基并用 PBS 清洗细胞 2 次, 分别在感染病毒后 6、12、24、36、48 h 提取蛋白。

1.2.9.1 蛋白的提取 弃去培养基, 加入预冷的 PBS, 用细胞刮刮起细胞, 吸取细胞液到 2 mL EP 管中, $4\ ^\circ\text{C}$ 、1 000 g 离心 5 min。弃上清, 加入现配的 RIPA 裂解液(1 mL RIPA + 0.2 μL PMSF + 0.1 μL cocktail + 0.1 μL leu + 0.1 μL MG132), 100 $\mu\text{L}/\text{管}$, 并使用一次性针头进行蛋白抽剪 30 次, 抽剪结束后 $4\ ^\circ\text{C}$ 、13 200 g 离心 10 min, 吸取 91 μL 上清到 EP 管中, 取 1 μL 进行蛋白浓度测定, 剩余 90 μL 上清加入 30 μL 4 × Loading 98 $^\circ\text{C}$ 变性 10 min, 于 $-80\ ^\circ\text{C}$ 保存。

1.2.9.2 电泳及转膜 用 SDS-PAGE 电泳分离蛋白, 随后将蛋白转至 PVDF 膜上, 再将膜放入含 5% 脱脂奶粉的 TBST 内, 室温封闭 1 h。1 h 后用 1 × TBST 洗膜 3 次, 加入 1 : 1 000 稀释 PRV-gE 抗体, $4\ ^\circ\text{C}$ 孵育过夜后, 用 1 × TBST 洗膜 3 次; 再加入 1 : 5 000 的 HRP 标记的山羊抗鼠 IgG 二抗, 反应 60 min 后, 用 1 × TBST 洗膜 3 次。采用 Thermo 的 ECL 显色试剂盒进行显色, 检测目的蛋白的表达情况。

1.2.10 实时荧光定量 PCR 检测 IFN- β 和 PRV-TK mRNA 的表达 按 5×10^5 个/孔在 35 mm 培养皿中接种 PK15 和 PK15-IRF3^{-/-} 细胞。培养 18~24 h, 至细胞融合度约 60% 时, 加入用不含 FBS 的

DMEM 倍比稀释的 PRV-QXX, 把稀释好的病毒液加到相应的孔中, 在生化培养箱中培养, 分别在 0、2、4、6、8、10、12、24、36、48 h 收取 RNA 样品, 并用 RNAiso Plus 提取总 RNA, 将总 RNA 用 Prime-Script RT Reagent Kit with gDNA Eraser 反转录成 cDNA。各试验组细胞 cDNA 样品作为反应模板, 利用 *IFN-β*-PRV TK 及 *β-actin* 基因引物进行实时荧光定量 PCR 测定, 每个样品设 3 个重复。反应体系 10 μL: SYBR Premix Ex Taq II 5 μL, 上、下游引物 (20 μmol/L) 各 0.4 μL, cDNA 1.5 μL, ddH₂O 2.7 μL。反应条件: 95 °C 预变性 2 min; 95 °C 变性 20 s, 60 °C 退火 20 s, 72 °C 延伸 20 s, 共 40 个循环; 加熔解曲线, 25 °C 1 min。反应结束后, 熔解曲线判断产物特异性, 单一的峰图说明引物扩增特异性好。以内参基因 *β-actin* 的 Ct 值为基准, 使目标基因的 Ct 值标准化, 计算 Ct 值。

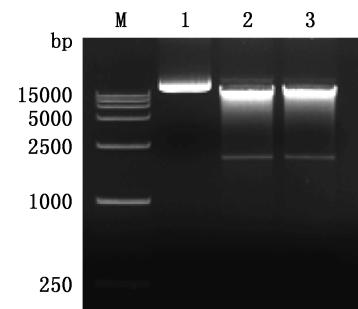
1.2.11 IRF3 激活剂 KIN1148 处理后检测 PRV-GFP 表达 以 2.5×10^4 个/孔在 24 孔板中铺种 PK15 细胞。当细胞生长至 40% 融合度时用 IRF3 抑制剂 KIN1148 处理细胞: 用 10% FBS DMEM 倍比稀释化合物, 浓度分别为 0、0.04、0.2、1 μmol/L。将稀释好的化合物加入 PK15 细胞对应孔, 置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱处理 4 h。4 h 后感染 PRV-GFP, 选取 1 孔 PK15 细胞计数, 以 MOI=0.01 感染 PRV-GFP; 加入适量 PRV-GFP 于不含血清的 DMEM 中进行稀释, 取出细胞弃去培养基并用 PBS 清洗细胞一次后加入稀释好的病毒液置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱孵育细胞 1 h, 1 h 后弃去培养基并

用 PBS 清洗细胞 2 次, 然后加入 1% FBS 的 DMEM 置于培养箱中继续培养, 24 h 后用流式细胞仪进行检测, 并进行数据收集分析。

2 结果

2.1 载体鉴定结果

2.1.1 52961 质粒酶切结果 用限制性内切酶 *Bsmb* I 对 52961 质粒酶切后进行电泳检测, 结果显示, 分离出大小为 13 000 和 1 873 bp 左右的目的条带(图 1), 证明载体质粒酶切成功。



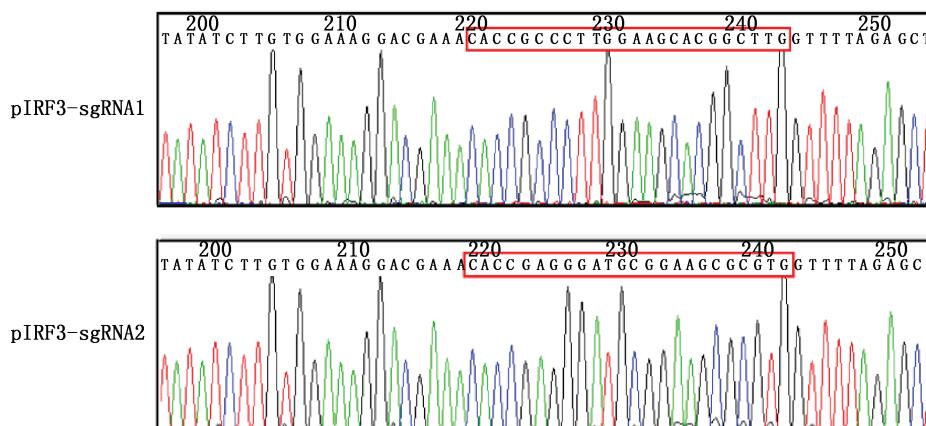
M, DL15000 DNA Marker; 1, 52961 质粒; 2, 3, 52961 单酶切产物

M, DL15000 DNA Marker; 1, Plasmid 52961; 2 and 3, Single digestion products of plasmid 52961

图 1 载体鉴定结果

Fig. 1 Vector identification results

2.1.2 质粒测序结果 质粒测序数据见图 2。由图 2 可知, 筛选出的阳性菌序列信息与理论序列信息一致, 表明该克隆为正确的 sgRNA 质粒菌种, 可用于后续试验。



框内序列为 sgRNA 序列

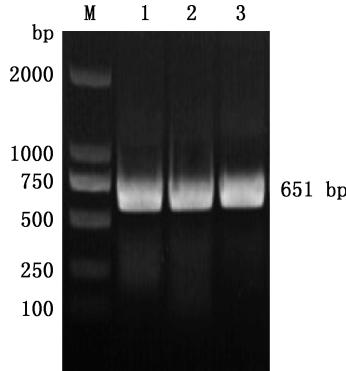
The sequence in box is sgRNA sequence

图 2 pIRF3-sgRNA 测序结果

Fig. 2 Sequencing results of pIRF3-sgRNA

2.2 目的基因 PCR 扩增

以感染慢病毒并进行嘌呤霉素筛选后的细胞基因组为模板, sgRNA1 和 sgRNA2 检测引物扩增 *IRF3* 基因编码区, 经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测, 在 651 bp 处有一条特异性条带(图 3), 与预期结果相符。



M, DL2000 DNA Marker; 1, PK15 细胞; 2, PK15-*IRF3*^{-/-} sgRNA1 多克隆细胞; 3, PK15-*IRF3*^{-/-} sgRNA2 多克隆细胞

M, DL2000 DNA Marker; 1, PK15 cell; 2, PK15-*IRF3*^{-/-} sgRNA1 polyclonal cell; 3, PK15-*IRF3*^{-/-} sgRNA2 polyclonal cell

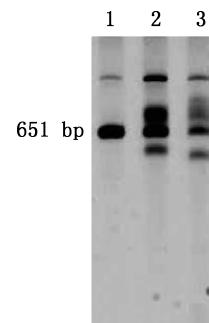
图 3 *IRF3* 基因 PCR 扩增结果

Fig. 3 PCR amplification results of *IRF3* gene

2.3 T7 核酸内切酶酶切鉴定基因编辑效率

基因组 PCR 扩增后进行 T7 核酸内切酶酶切

检测, 结果发现, 猪 *IRF3* 基因外显子 1 区的 2 个 sgRNA 位点均切出了目的条带(图 4), 表明该靶点可能存在碱基突变。*IRF3*-sgRNA1 和 *IRF3*-sgRNA2 基因编辑效率分别为 19% 和 25%。



1, PK15 细胞; 2, PK15-*IRF3*^{-/-} sgRNA1 多克隆细胞; 3, PK15-*IRF3*^{-/-} sgRNA2 多克隆细胞

1, PK15 cell; 2, PK15-*IRF3*^{-/-} sgRNA1 polyclonal cell; 3, PK15-*IRF3*^{-/-} sgRNA2 polyclonal cell

图 4 T7 核酸内切酶酶切结果

Fig. 4 Results of T7 digestion

2.4 PK15-*IRF3*^{-/-} 单克隆细胞系的筛选

分析测序结果见图 5。由图 5 可知, 经 *IRF3* 基因序列比对, 在外显子 1 区内基因出现缺失情况, 表明成功获得 PK15-*IRF3*^{-/-} 单克隆稳定细胞系。

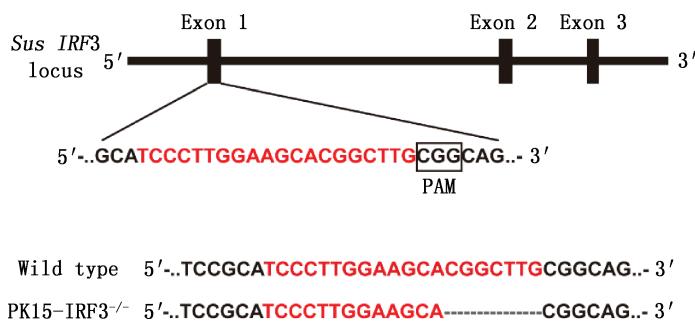


图 5 PK15-*IRF3*^{-/-} 单克隆细胞测序结果

Fig. 5 Sequencing results of PK15-*IRF3*^{-/-} monoclonal cell

2.5 *IRF3* 基因敲除对 PRV-GFP 复制的影响

通过检测 0、6、12、24、36、48 h 荧光强度发现, PK15-*IRF3*^{-/-} 细胞荧光强度强于 PK15 细胞(图 6), 且流式细胞仪检测发现, 感染 PRV-GFP 后相同

时间点 PK15-*IRF3*^{-/-} 感染病毒细胞比例显著或极显著高于 PK15 细胞系($P < 0.05$; $P < 0.01$)(图 7、8), 表明 *IRF3* 基因敲除会一定程度上促进 PRV 的复制。

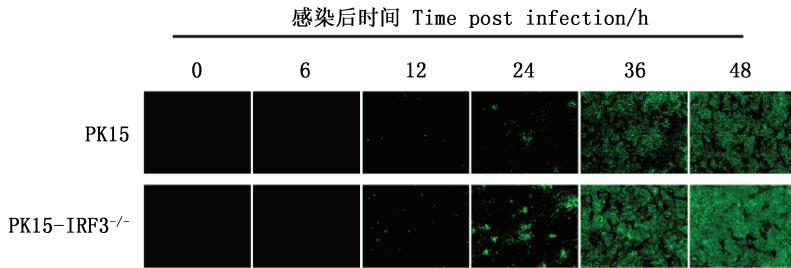


图 6 荧光显微镜观察 PRV-GFP 感染 PK15 及 PK15-IRF3^{-/-} 细胞对病毒复制的影响(40×)

Fig. 6 Effect of PRV-GFP infecting PK15 and PK15-IRF3^{-/-} cells on viral replication observed by fluorescence microscopy (40×)

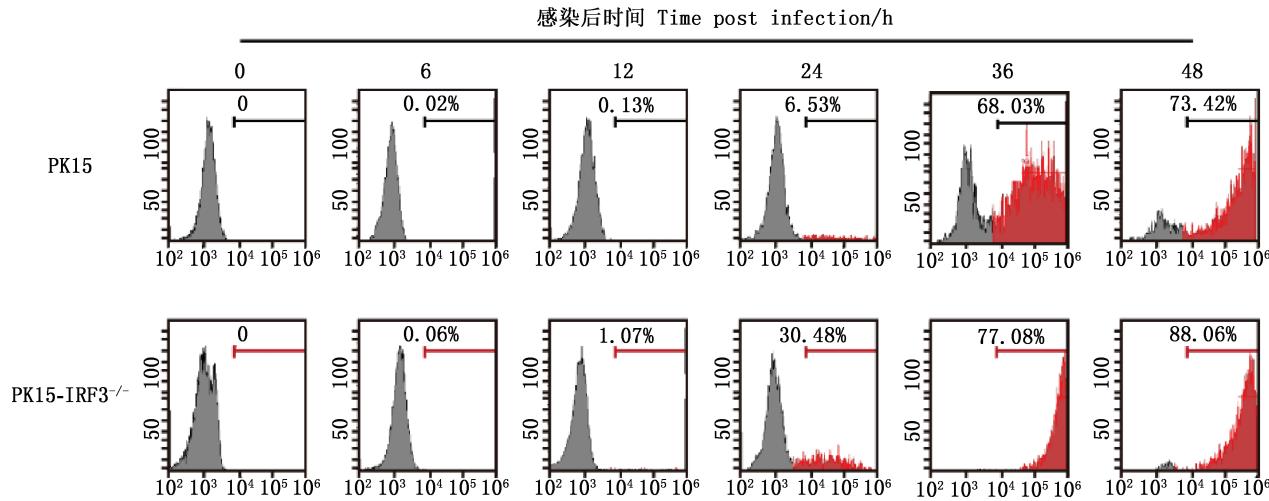
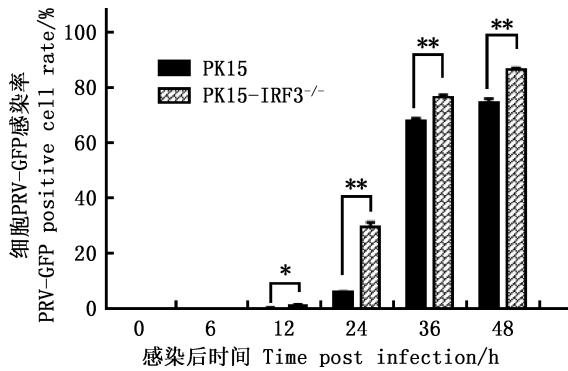


图 7 流式细胞仪检测 PRV-GFP 感染 PK15 及 PK15-IRF3^{-/-} 细胞对病毒复制的影响

Fig. 7 Effect of PRV-GFP infecting PK15 and PK15-IRF3^{-/-} cells on viral replication detected by flow cytometry



* , 差异显著($P < 0.05$)；** , 差异极显著($P < 0.01$)；ns, 无显著差异($P > 0.05$)。下同。

* , Significant difference ($P < 0.05$)；** , Extremely significant difference ($P < 0.01$)；ns, No significant difference ($P > 0.05$)。The same as below.

图 8 流式细胞仪检测 PRV-GFP 感染 PK15 及 PK15-IRF3^{-/-} 细胞对病毒复制的影响(数据分析结果)

Fig. 8 Effect of PRV-GFP infecting PK15 and PK15-IRF3^{-/-} cells on viral replication detected by flow cytometry (data analysis result)

2.6 IRF3 基因敲除对 PRV-QXX 滴度的影响

由图 9 可知,随着感染时间的增加,PK15-IRF3^{-/-} 细胞系病毒滴度显著或极显著高于 PK15 细胞系

($P < 0.05$; $P < 0.01$)。表明敲除 IRF3 基因后 PRV-QXX 滴度增强。

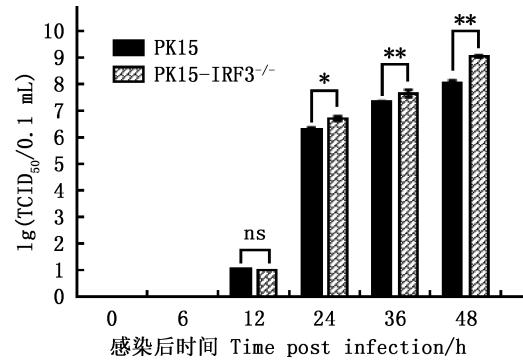


图 9 PRV-QXX 感染 PK15 及 PK15-IRF3^{-/-} 细胞对病毒滴度的影响

Fig. 9 Effect of PRV-QXX infecting PK15 and PK15-IRF3^{-/-} cells on virus titer

2.7 IRF3 基因敲除对 gE 蛋白表达的影响

Western blotting 检测 PRV gE 蛋白的表达,结果表明,随着感染时间的增加,PK15-IRF3^{-/-} 细胞系所检测到的 gE 蛋白的表达强于 PK15 细胞(图 10),表明敲除 IRF3 基因促进病毒的复制。

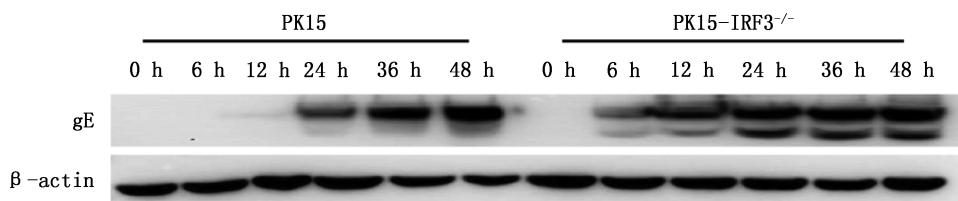


图 10 Western blotting 检测 PRV-QXX 感染 PK15 及 PK15-IRF3^{-/-} 细胞对病毒复制的影响

Fig. 10 Effect of PRV-QXX infecting PK15 and PK15-IRF3^{-/-} cells on viral replication detected by Western blotting

2.8 IRF3 基因敲除对 IFN-β 和 PRV TK 基因 mRNA 水平的影响

利用实时荧光定量 PCR 进行 IFN-β mRNA 水平检测,结果显示,PK15-IRF3^{-/-} 细胞中 IFN-β mRNA 表达水平随着时间增加无明显变化,PK15 细胞中 IFN-β mRNA 表达水平明显增强,PK15-IRF3^{-/-} 细胞中 IFN-β 基因 mRNA 表达水平显著或极显著低于 PK15 细胞($P<0.05$; $P<0.01$)(图 11),表明敲除 IRF3 基因抑制 IFN-β 的表达。

利用实时荧光定量 PCR 进行 PRV TK 基因 mRNA 水平检测,结果显示,PK15-IRF3^{-/-} 和 PK15 细胞中 TK mRNA 表达水平均明显增强,PK15-IRF3^{-/-} 细胞中 TK 基因 mRNA 表达水平强于 PK15 细胞($P<0.05$; $P<0.01$)(图 12),表明敲除 IRF3 基因可促进 PRV 的复制。

2.9 IRF3 激活剂 KIN1148 处理后检测 PRV-GFP 表达

IRF3 激活剂处理 PK15 细胞后感染 PRV-GFP,24 h 后进行流式细胞仪检测,结果显示,0.2 和 1 $\mu\text{mol/L}$ KIN1148 分别显著($P<0.05$)和极显著($P<0.01$)抑制 PRV-GFP 的表达(图 13),证实了 IRF3 基因可抑制 PRV 的复制。

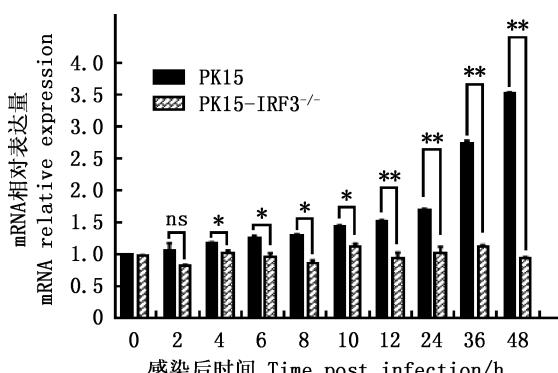


图 11 实时荧光定量 PCR 检测 PRV-QXX 感染 PK15 及 PK15-IRF3^{-/-} 细胞对 IFN-β mRNA 表达水平影响

Fig. 11 Effect of PRV-QXX infecting PK15 and PK15-IRF3^{-/-} cells on IFN-β mRNA expression detected by Real-time PCR

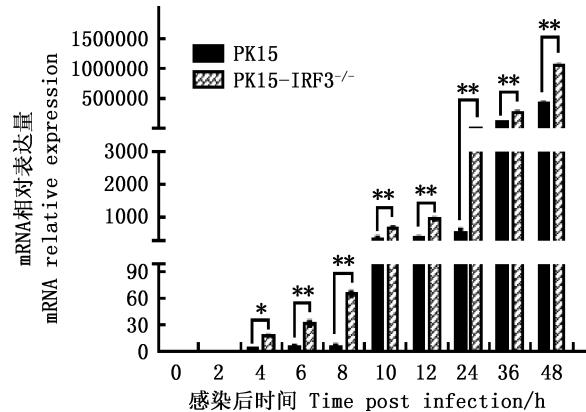


图 12 实时荧光定量 PCR 检测 PRV-QXX 感染 PK15 及 PK15-IRF3^{-/-} 细胞对 TK 基因 mRNA 表达水平影响

Fig. 12 Effect of PRV-QXX infecting PK15 and PK15-IRF3^{-/-} cells on TK gene mRNA expression detected by Real-time PCR

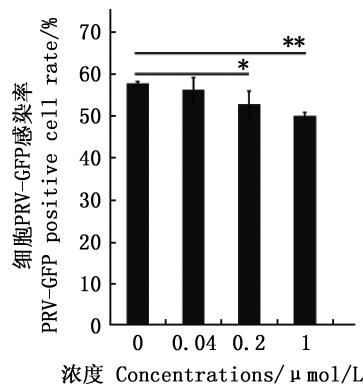


图 13 流式细胞仪检测 IRF3 激活剂 KIN1148 处理对 PRV-GFP 复制的影响

Fig. 13 Effect of IRF3 activator KIN1148 on PRV-GFP replication detected by flow cytometry

3 讨论

伪狂犬病给养猪业造成了巨大的经济损失,现阶段接种疫苗是最有效防治该病发生的方法。但野生 PRV 会调节宿主的早期免疫应答建立病毒潜伏感染条件,以便逃逸免疫^[10]。先天性免疫系统是机体抵御病原体入侵的第一道防线^[11],病原感染机体后可激活 NF-κB、IRF3 等转录因子继而诱导产生促炎性细胞因子和 I 型干扰素(IFN)产生^[12]。

IRF3 在大多数细胞中呈高水平组成性表达,不受病毒感染和 IFN 的影响,主要以单体形式存在于细胞浆中,胞浆中的 IRF3 无活性;IRF3 定位于细胞浆与其分子内部存在神经元特异性烯醇化酶(NSE)相关,若 NSE 发生突变则 IRF3 移位至细胞核,但仍无激活基因的能力,提示 IRF3 存在于细胞中将有利于其被特异性激酶磷酸化。CRISPR-Cas9 可通过核酸酶介导的基因敲除和转录调节方法对整个基因组进行功能筛选^[13-17]。研究者通过基于 CRISPR-Cas9 的全基因组筛选发现毒力因子的宿主靶点,感染和致死的必需基因,研究病毒—宿主间的相互作用,鉴别病毒蛋白质的加工通路等^[18-23]。CRISPR-Cas9 不仅可通过直接靶向病毒基因组和宿主相关基因,还可通过敲除疫苗细胞株的宿主基因来提高抗病毒疫苗的生产和促进新型抗菌剂的开发^[24-27]。CRISPR-Cas9 技术还被应用于调控靶基因的转录水平,这种保持基因组完整性的方法适用于调控抗病毒因子的表达和筛选病毒感染的必需基因^[28],接头蛋白 TRIF 和 TLAM-1 参与 dsRNA 和 LPS 刺激 IRF3 的活化,表明 TLR4 与病毒诱导的信号具有交互作用^[29]。进一步鉴定和确定这些分子的特征,研究这些分子的下游信号蛋白,将有助于分离和鉴定特异性 IRF3 激酶,阐明病毒诱导机体产生先天性免疫和特异性免疫的分子机制,了解抗感染性免疫防御机制。病毒感染是诱导 IRF3 活化的主要刺激剂,PRV 可诱导 IRF3 C 端磷酸化,磷酸化的 IRF3 两两结合形成二聚体后,能从细胞浆转移至细胞核内,然后与相关转录因子如 NF-κB 等结合,诱导 IFN 的分泌与表达,参与机体的抗病毒反应。此外,结合 DNA 末端的 Csn2 蛋白招募 DNA 修复蛋白保护双链 DNA 末端免于核酸外切酶的降解来协助原间隔序列的整合^[29],编辑效率是 CRISPR/Cas9 基因编辑技术中的关键点,影响编辑效率的主要因素包括靶位点、内切酶、输送载体的选择等^[30-31]。本试验利用 CRISPR/Cas9 对猪 IRF3 基因进行敲除,选择输送效率更高的慢病毒载体系统,输送 Cas9 基因进入细胞系更能提高切割效率,pIRF3-sgRNA 重组质粒构建成功后,对 PK15 细胞 IRF3 基因具有显著基因编辑作用。用有限稀释法获得 PK15-IRF3^{-/-} 单克隆胞系,在体外用 PRV-GFP 感染上述两株细胞系细胞后,进行荧光拍照和流式细胞仪检测发现,不同时间点 PK15-IRF3^{-/-} 细胞荧光强度强于 PK15 细胞;进一步研究发现,PRV-QXX 感染两株细胞后,PK15-IRF3^{-/-} 细胞病毒

滴度强于 PK15 细胞。随后用 PRV-QXX 感染 PK15 和 PK15-IRF3^{-/-} 细胞后,检测对 IFN-β 及 PRV TK 基因 mRNA 表达水平的影响,结果显示,在 PK15 细胞中 IFN-β mRNA 表达水平随时间增加明显增高,PK15-IRF3^{-/-} 细胞中 IFN-β mRNA 表达水平无明显变化;PK15-IRF3^{-/-} 细胞中 TK 基因 mRNA 表达水平强于 PK15 细胞。

以上结果证明,IRF3 基因在抵抗病毒入侵或病毒复制的过程中发挥着重要的作用,从而为伪狂犬病等 DNA 病毒引起的疾病的防控提供了新的策略与方法。

4 结 论

本试验成功构建了猪 pIRF3-sgRNA 重组质粒。通过慢病毒感染 PK15 细胞成功构建了 PK15-IRF3^{-/-} 多克隆细胞系,并筛选得到 PK15-IRF3^{-/-} 单克隆细胞系。PK15-IRF3^{-/-} 能在一定程度上促进 PRV 的增殖与复制,并促进 PRV TK 基因的表达,抑制干扰素刺激基因的表达。

参考文献(References):

- [1] 龙晓婷,刘俊磊,郭洪,等.伪狂犬病毒在潜伏感染猪体内的组织分布[J].畜牧兽医学报,2008,39(5):645-651.
- [2] LONG X T, LIU J L, GUO H, et al. Distribution of pseudorabies virus in latently infected pigs[J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2008, 39(5):645-651. (in Chinese)
- [3] 青宁生.动物病毒学家——殷震[J].微生物学报,2018,58(5):955-956.
- [4] QING N S. An animal virologist——Yin Z[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2018, 58(5):955-956. (in Chinese)
- [5] GUZ Q, HOUC C, SUN H F, et al. Emergence of highly virulent pseudorabies virus in Southern China[J]. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 2015, 79(3):221-228.
- [6] WU R, BAI C Y, SUN J Z, et al. Emergence of virulent pseudorabies virus infection in Northern China[J]. *Journal of Veterinary Science*, 2013, 14(3):363-365.
- [7] ZHAO G N, JIANG D S, LI H. Interferon regulatory factors: At the crossroads of immunity, metabolism, and disease[J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2015, 1852(2):365-378.
- [8] JUANG Y T, LOWTHER W, KELLUM M, et al. Primary activation of interferon A and interferon B gene transcription by interferon regulatory factor 3[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1998, 95(17):9837-9842.
- [9] BELLINGHAM J, GREGORY-EVANS K, GREGO-

- RY-EVANS C Y, et al. Mapping of human interferon regulatory factor 3 (IRF3) to chromosome 19q13.3-13.4 by an intragenic polymorphic marker[J]. *Annals of Human Genetics*, 1998, 62(Pt 3): 231-234.
- [8] TANIGUCHI T, OGASAWARA K, TAKAOKA A, et al. IRF family of transcription factors as regulators of host defense[J]. *Annual Review of Immunology*, 2001, 19(1): 623-655.
- [9] OZATO K, TAILOR P, KUBOTA T. The interferon regulatory factor family in host defense: Mechanism of action[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2007, 282(28): 20065-20069.
- [10] LIN R, HEYLBROECK C, PITHA P M, et al. Virus-dependent phosphorylation of the IRF-3 transcription factor regulates nuclear translocation, transactivation potential, and proteasome-mediated degradation [J]. *Molecular and Cellular Biology*, 1998, 18(5): 2986-2996.
- [11] 李帅, 赵一霏, 沈国顺. 一例猪伪狂犬病的诊断与防控建议[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2018, 22: 122-124.
LI S, ZHAO Y Z, SHEN G S. A diagnosis and prevention and control of a case of pseudorabies in pigs[J]. *Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine*, 2018, 22: 122-124. (in Chinese)
- [12] SAITO T, GALE M JR. Principles of intracellular viral recognition [J]. *Current Opinion Immunology*, 2007, 19(1): 17-23.
- [13] WANG H, YANG H, SHIVALILA C S, et al. One-step generation of mice carrying mutations in multiple genes by CRISPR/Cas-mediated genome engineering[J]. *Cell*, 2013, 153(4): 910-918.
- [14] KORKMAZ G, LOPES R, UGALDE A P, et al. Functional genetic screens for enhancer elements in the human genome using CRISPR-Cas9[J]. *Nature Biotechnology*, 2016, 34(2): 192-198.
- [15] MAZ A, PERETZ M, AHARONY A, et al. Defining essential genes for human pluripotent stem cells by CRISPR-Cas9 screening in haploid cells[J]. *Nature Cell Biology*, 2018, 20(5): 610-619.
- [16] KLANN T S, BLACK J B, CHELLAPPAN M, et al. CRISPR-Cas9 epigenome editing enables high-throughput screening for functional regulatory elements in the human genome[J]. *Nature Biotechnology*, 2017, 35(6): 561-568.
- [17] NELSON C A, FREMONT D H, VIRGIN H W, et al. Discovery of a proteinaceous cellular receptor for a norovirus[J]. *Science*, 2016, 353(6302): 933-936.
- [18] HAGA K, FUJIMOTO A, TAKAI-TODAKA R, et al. Functional receptor molecules CD300lf and CD300ld within the CD300 family enable murine noroviruses to infect cells[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2016, 113(41): E6248-E6255.
- [19] VIRREIRA WINTER S, ZYCHLINSKY A, BAR-
- DOEL B W. Genome-wide CRISPR screen reveals novel host factors required for *Staphylococcus aureus* α -hemolysin-mediated toxicity[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 242-244.
- [20] ZHANG R, MINER J J, GORMAN M J, et al. A CRISPR screen defines a signal peptide processing pathway required by flaviviruses[J]. *Nature*, 2016, 535(7610): 164-168.
- [21] MA H, DANG Y, WU Y, et al. A CRISPR-based screen identifies genes essential for West-Nile-virus-induced cell death[J]. *Cell Reports*, 2015, 12(4): 673-683.
- [22] MARCEAU C D, PUSCHNIK A S, MAJZOUB K, et al. Genetic dissection of Flaviviridae host factors through genome-scale CRISPR screens[J]. *Nature*, 2016, 535(7610): 159-163.
- [23] SIDIK S M, HUET D, GANESAN S M A, et al. A genome-wide CRISPR screen in toxoplasma identifies essential apicomplexan genes[J]. *Cell*, 2016, 166(6): 1423-1435.
- [24] MODELL J W, JIANG W, MARRAFFINI L A. CRISPR-Cas systems exploit viral DNA injection to establish and maintain adaptive immunity[J]. *Nature*, 2017, 544(7648): 101-104.
- [25] MOCH C, FROMANT M, BLANQUET S, et al. DNA binding specificities of *Escherichia coli* Cas1-Cas2 integrase drive its recruitment at the CRISPR locus[J]. *Nucleic Acids Research*, 2017, 45(5): 2714-2723.
- [26] WRIGHT A V, LIU J J, KNOTT G J, et al. Structures of the CRISPR genome integration complex[J]. *Science*, 2017, 357(6356): 1113-1118.
- [27] SHALEM O, SANJANA N E, HARTENIAN E, et al. Genome-scale CRISPR-Cas9 knockout screening in human cells[J]. *Science*, 2014, 343(6166): 84-87.
- [28] SHALEM O, SANJANA N E, ZHANG F. High-throughput functional genomics using CRISPR-Cas9[J]. *Nature Reviews Genetics*, 2015, 16(5): 299-311.
- [29] MILLER L C, ZANELLA E L, WATERS W R, et al. Cytokine protein expression levels in tracheobronchial lymph node homogenates of pigs infected with pseudorabies virus[J]. *Clinical Vaccine Immunology*, 2010, 17(5): 728-734.
- [30] VAN DER SANDEN S M, WU W, DYBDAHL-SISSOKO N, et al. Engineering enhanced vaccine cell lines to eradicate vaccine-preventable diseases: The polio end game[J]. *Journal of Virology*, 2015, 90(4): 1694-1704.
- [31] BIKARD D, EULER C W, JIANG W, et al. Exploiting CRISPR-Cas nucleases to produce sequence-specific antimicrobials[J]. *Nature Biotechnology*, 2014, 32(11): 1146-1150.