



CRISPR/Cas9 介导的 RPSA 基因敲除细胞系的建立及其应用

高利利, 王聪聪, 杨帆, 曹伟军, 张向乐, 刘湘涛, 朱紫祥*, 郑海学*

中国农业科学院兰州兽医研究所, 家畜疫病病原生物学国家重点实验室, 国家口蹄疫参考实验室,
甘肃 兰州 730046

摘要: 【目的】利用CRISPR/Cas9技术建立RPSA基因缺失的乳仓鼠肾细胞(baby hamster kidney cells, BHK21)细胞系, 为开展RPSA调控病毒复制机制研究提供工具; 同时, 初步探究RPSA对塞内卡病毒复制的影响。【方法】根据GenBank中仓鼠的RPSA基因序列找到产生不同转录本的共同外显子段, 设计并合成4对引导RNA (sgRNA), 分别构建至PX330载体中; 经过筛选选择打靶活性较高的PX330-RPSA-sgRNA2质粒用于后续敲除细胞系构建。将PX330-RPSA-sgRNA2质粒转染BHK21细胞后, 通过有限稀释法筛选单克隆细胞, 通过Western blot及序列测定检测RPSA基因的敲除。通过Western blot及qPCR分析比较塞内卡病毒在野生型及RPSA基因敲除BHK21细胞中的复制差异。【结果】Western blot检测及序列测序证实了RPSA基因敲除单克隆细胞构建成功。进一步研究发现, 塞内卡病毒在RPSA基因敲除细胞中的复制水平明显低于其在野生型BHK21细胞中复制的水平。【结论】成功构建了RPSA基因敲除的BHK21细胞系, 首次表明RPSA对塞内卡病毒的复制具有重要作用, 为进一步开展RPSA在细胞内调控病毒复制机制研究奠定基础。

关键词: CRISPR/Cas9, RPSA, 基因缺失细胞, 塞内卡病毒

基因组编辑(genome editing)是对基因组进行精确修饰和定向编辑的一种技术, 是指通过人为操作在基因组特定碱基位置引入插入、缺失或DNA序列替换等修饰的方法, 从而实现编辑受体基因组序列的突变, 最终达到改变基因的结构

或功能的目的。最初的基因组编辑技术是利用基因枪、显微注射或者电转的方法将外源供体的遗传物质导入细胞中, 借助自身的修复系统, 通过同源重组方法将导入的DNA片段插入到细胞基因组中, 进而完成基因的转移或修饰。但这些早

基金项目: 国家自然科学基金(31972688); 甘肃省重大科技专项(19ZDNA001); 中央公益性科研院所基本科研业务费(1610312016013, 1610312017003)

*通信作者。Tel/Fax: +86-931-8342086; E-mail: 朱紫祥, zhuzixiang@caas.cn, 郑海学, haixuezheng@163.com

收稿日期: 2020-06-21; 修回日期: 2020-08-18; 网络出版日期: 2021-06-15

期技术因插入效率较低、打靶定点编辑能力差等缺点,使其应用以及推广受到了很大程度的限制。伴随着人工核酸内切酶在基因组编辑中逐步得以应用,基于锌指核酸酶编辑技术(zinc finger nucleases, ZFNs)和基于植物病原体-黄单胞菌分泌的一种转录激活子样效应因子而建立的类转录激活因子效应物核酸酶编辑技术(transcription activator-like effector nucleases, TALENs)成为更为简便和高效的基因组编辑技术^[1-2]。ZFNs 和 TALENs 技术在基因编辑精准性及编辑效率等方面和早期的物理打靶技术相比有了大幅度提升,但是这两种技术在使用过程中由于操作难度大,载体构建复杂、实验周期冗长、成本高和结果难控等弊端也逐步限制了其广泛应用^[3]。

CRISPR/Cas9 基因编辑技术是利用小分子 RNA 介导的一种靶向基因组编辑技术,是继 ZFNs 和 TALENs 技术之后出现的第三代新型基因编辑技术^[3-4]。该技术是基于广泛存在于古细菌及细菌中的一种免疫系统经由人工改造开发建立^[5]。CRISPR/Cas9 技术通过导向 RNA 序列在靶标基因特定位点进行切割形成 DNA 双链断裂^[6-7],进而诱发细胞固有的同源重组和非同源末端连接的自我修复过程,实现对基因组特定靶标位点进行编辑或修饰^[8]。该技术使用便捷,重复性好,而且合成简单、周期短、插入效率高、操作灵活,能够实现基因精准编辑,而且近年来通过逐步升级改造使得其实用性不断提升^[9-10],已在医学、药物和生命科学等多领域得以广泛应用^[11-13]。

宿主核糖体蛋白 SA (ribosomal protein SA, RPSA)是核糖体亚基的 RPSA 的组成部分,也被称为层粘连蛋白受体 1^[14-15],在细胞中广泛表达,

并且在各种细胞反应中起着多种作用。RPSA 参与 RNA 合成^[16]、细胞迁移^[17]、血管生成^[18]和脾脏发育等生物学反应过程^[18]。同时,分布于细胞表面的 RPSA 能够被登革热病毒、猪瘟病毒和委内瑞拉马脑脊髓炎病毒利用作为受体感染靶标细胞^[19-20]。在口蹄疫病毒感染宿主细胞后,RPSA 可抑制 MAPK 通路,从而抑制病毒的复制^[21]。因此,RPSA 与病毒在感染细胞中存在着重要关联,并且在不同病毒感染过程中 RPSA 可能发挥着不同的作用。我国于 2015 年鉴定了 1 种新发的猪水泡病病原塞内卡病毒(Senecavirus A, SVA),其感染引起的临床症状与口蹄疫、猪泡状病、泡状口炎或泡状疹的临床症状难以区分^[22]。至今关于 SVA 感染致病机制仍不清楚,有待深入阐明。为了研究 SVA 感染过程中,宿主 RPSA 蛋白是否能够调控病毒的复制,本研究利用 CRISPR/Cas9 技术建立 RPSA 基因敲除细胞系,为深入研究 SVA 致病机制提供试验材料。

1 材料和方法

1.1 细胞、病毒及载体

BHK21 细胞由本实验室提供。细胞培养使用含有 10%胎牛血清和 1%双抗的 DMEM 培养基进行培养。塞内卡病毒 CH-FJ-2017 毒株由中国农业科学院兰州兽医研究所口蹄疫与新发病流行病学团队分离并保存。PX330 载体为中国农业大学赵要风教授惠赠。

1.2 试剂及抗体

大肠杆菌 Trans5 α 感受态、LA Taq DNA 聚合酶、限制性核酸内切酶 *Kpn* I 和 *Xba* I、T4 DNA 连接酶、Trizol 试剂、TB Green II 购自宝生物工

程大连有限公司。Trizol 试剂、蛋白预染 Marker 和 Lipofectamine 3000 转染试剂购自 Invitrogen 公司。Opti-MEM、0.25% EDTA 胰酶和新生牛血清 (FBS) 均购自 Gibco 公司。DMEM 细胞培养液和 PBS 溶液购自 Hyclone 公司。胶回收试剂盒、微量 DNA 提取试剂盒购自 OMEGA 公司。大提质粒试剂盒购自 MACHEREY-NAGEL 公司。RPSA 抗体(Laminin Receptor 1)购自 Abcam, 羊抗兔 IgG (IgG-HRP) 购自 Invitrogen 公司。塞内卡病毒 VP2 兔抗多抗由本实验室制备保存。

1.3 sgRNA 靶点的设计

在 NCBI 中查询 RPSA 基因序列, 并找到仓鼠全基因组, 定位 RPS 在基因组中不同转录本的重叠区第一个外显子, 通过 <http://tolls.genome-engineering.org> (<http://crispr.mit.edu/>) 网站设计 sgRNA, 根据评分设计 20 bp 的引导 RNA (sgRNA), 并在 sgRNA 序列 5'端加 CACC/AAAC 粘性末端, 共选取了评分较高的 4 对 sgRNA 序列, 分别命名为 BHK-sgRNA-1、BHK-sgRNA-2、BHK-sgRNA-3、BHK-sgRNA-4。sgRNA 序列见表 1。

表 1. 设计合成的靶向 RPSA 的 sgRNA 序列

Table 1. The synthesized sgRNAs that target RPSA gene

SgRNA names	Sequences (5'→3')
sgRNA1	F: <u>CACCGCTCAATAGCAACGATGGCCC</u> R: <u>AAACGGGCCATCGTTGCTATTGAGC</u>
sgRNA2	F: <u>CACCGCATCGTTGCTATTGAGAACC</u> R: AAACGGTTCTCAATAGCAACGATGC
sgRNA3	F: <u>CACCGTCTCAATAGCAACGATGGCC</u> R: <u>AAACTCGTTGCTATTGAGAACCCGC</u>
sgRNA4	F: <u>CACCGTCTCAATAGCAACGATGGCC</u> R: AAACGGCCATCGTTGCTATTGAGAC

1.4 PX330-sgRNA 重组表达质粒构建

PX330-sgRNA 重组表达质粒构建步骤:
(1) sgRNA 的退火。将 sgRNA 上下游序列合成产物稀释至 100 μmol/L 后, 取上下游引物各 2.5 μL, 并加入 ddH₂O 4 μL、Taq buffer I 1 μL, 共 10 μL 体系按照 0.3 °C/s 梯度降温进行退火处理: 95 °C 3 min; 95 °C 1 min, 85 °C 1 min, 75 °C 1 min, 65 °C 1 min, 55 °C 1 min, 45 °C 1 min, 35 °C 1 min, 25 °C 1 min, 16 °C 1 h, 使上下游引物形成双链。(2) 利用 BBSI 内切酶酶切 PX330 载体。反应体系如下: PX330 载体 5 μL, BBSI 1 μL、10×buffer 2 μL、ddH₂O 12 μL, 共 20 μL 体系; 37 °C、2 h 酶切。转化回收酶切片段。(3) 酶切载体与 sgRNA 的连接。T₄ 连接酶 1 μL、10×T₄ 连接酶 buffer 1 μL、PX330 酶切片段 1.5 μL、退火后的 sgRNA 各 6.5 μL, 共 10 μL 体系。16 °C 过夜连接。(4) PX330-sgRNA 连接产物转化。将连接产物转化 Trans5α 感受态细胞, 提取质粒, 送样测序。

1.5 细胞的转染

在转染前复苏 BHK21 细胞于 T25 细胞瓶中, 使用含有 10% 的 FBS、1% 双抗的 DMEM 培养基培养, 当细胞传代 2-3 次性状稳定且状态较好时, 将细胞消化后铺于细胞板中, 待细胞融合度至 70%-80% 时, 将质粒与 Lipofectamine 3000 (按照比例 1 μg:2 μL) 分别加至 Opti-MEM 中, 静止 15 min 后将两者混合; 将脂质体-质粒复合物混合静置 5 min 后直接加至细胞培养基中; 将细胞重新置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养 48 h。

1.6 细胞 DNA 的提取及 T7EI 实验

按照微量 DNA 提取试剂盒的操作说明提取

细胞 DNA, 使用 check 引物进行扩增, 对扩增出的目的片段进行胶回收, 并按照上述的退火体系和程序进行变性再退火。取再退火 DNA 产物 8 μL 、T7 核酸内切酶 1 μL 和相应 buffer 1 μL , 共 10 μL 体系, 按照 T7 核酸内切酶说明书推荐酶切温度和时间进行酶切, 使用 10 \times loading buffer 终止反应后, 使用 1%琼脂糖胶进行鉴定其是否具有切割片段, 分析切割效率。设计 check 引物进行检测, 引物序列为 Check-F: 5'-GTCTGCCTTCCTGTAGTGTCCT-3'; Check-R: 5'-CAACCTA ACTCAGCCAGCCTAT-3'。

1.7 有限稀释法

T7EI 实验中具有切割条带的细胞进行有限稀释挑选单克隆细胞。利用 0.25%胰酶消化细胞, 轻拍脱落后, 加入培养基吹打均匀; 留取 100 μL 细胞悬液用于后续测序使用以确定打靶作用。剩余细胞使用无血清培养基将细胞稀释至 $1 \times 10^3/\text{mL}$, 再使用 5% FBS 培养基稀释到 10 个细胞/mL, 即每 0.1 mL 培养基 1 个细胞; 使用 100 μL 排枪将稀释后细胞悬液每孔 0.1 mL 加入 96 孔板中; 培养 4–5 d 后观察, 除去双细胞孔、多细胞孔, 对细胞形态正常且单一细胞孔标记; 继续培养 7–9 d, 将 96 孔中细胞传代转入 48 孔板继续培养, 待细胞长满后依次传至 24 孔板、6 孔板进行放大培养。

1.8 Western blot 蛋白检测

取野生型细胞与各个候选单克隆细胞株分别进行培养, 待细胞长满后, 收取细胞放置冰上。加入适量 1 \times SDS loading buffer 充分搅拌裂解, 待细胞全部脱落后吸取至 EP 管中, 做好标记; 金属浴变性 10 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心后, 取上清进行

SDS-PAGE。电泳后通过湿转法转印至 NC 膜上, 转印后使用 5%的脱脂奶粉封闭, 用购买的 67 kDa laminin 为一抗, 羊抗兔 IgG (IgG-HRP)为二抗, 进行抗原抗体复合物检测, 对 RPSA 基因敲除的 BHK21 单细胞系在蛋白表达水平上进行验证。

1.9 Sanger 测序鉴定

取野生型细胞与各个候选单克隆细胞株分别进行培养, 待细胞长满后, 收取细胞放置冰上。按照细胞微量 DNA 提取试剂盒说明书操作提取 DNA, 使用 check 引物扩增含有 sgRNA 靶向位点的片段, 胶回收纯化后送样进行测序鉴定。将返回结果中显示为套峰的片段, 或无套峰、但发生了编辑的样品, 进行进一步分析, 将扩增片段连接 T 载体, 进行连接转化, 分别随机挑取 5 个单克隆菌进行再次测序鉴定。

1.10 细胞接毒感染

将正常传代 2–3 代的野生型 BHK21 和 RPSA 基因敲除细胞分别铺于培养板中, 待其密度长至 90%时, 使用无血清培养基润洗细胞, 洗去残留血清; 用无血清培养基将病毒稀释至适当浓度, 充分混匀后加入细胞; 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 细胞培养箱中孵育 1 h, 去掉含有病毒的培养基, 更换为含有 1%血清的维持液, 放置于培养箱中继续培养。

1.11 Trizol 法提取 RNA 及反转录

收取细胞样品(如 6 孔细胞培养板), 加入 1 mL Trizol, 反复吹打使得细胞充分裂解, 室温静置 5 min, 将裂解细胞液转入 EP 管中; 在上述 EP 管中加入 250 μL 氯仿, 振荡 30 s, 4 $^{\circ}\text{C}$ 放置 15 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 、12000 r/min 离心 15 min; 取 450 μL 上清(勿吸取下层沉淀)到新的无 RNase 的 1.5 mL EP 管中, 并加入等量的异丙醇以沉淀 RNA,

-20 °C 放置 30 min, 4 °C、12000 r/min 离心 15 min, 弃去上清; 加入 1 mL 的 75%乙醇, 轻轻上下颠倒 3 次, 4 °C、12000 r/min 离心 5 min, 弃去上清, 将 EP 管倒置于超净台中晾干; 加入适量 DEPC 水溶解 RNA, 并测定浓度, 放置于-80 °C 保存。取 5×HiScript II qRT SuperMix II 4 μL, RNA 4 μL, ddH₂O 12 μL, 共 20 μL 体系, 按照 50 °C 15 min, 85 °C 2 min, 16 °C 10 s 进行反转录。

1.12 荧光定量 PCR (TB Green II 法)

收集细胞样品, 提取总 RNA, 反转录获得 cDNA。按照 TB Green II Premix Ex Taq 10 μL, 上下游引物各 1 μL, cDNA 1 μL, ddH₂O 7 μL, 共 10 μL 的体系配置预混反应, 并按照 CFX96™ real-time system 操作流程, 95 °C 3 min; 95 °C 10 s, 60 °C 34 s, 共 40 个循环进行荧光定量 PCR 反应, 利用 GAPDH 作为内参进行不同基因的 mRNA 的相对定量。利用 *t*-test 检验对不同处理

组病毒 RNA 复制水平差异进行统计学分析, “***”表示 $P < 0.01$, 统计学分析差异极显著。

2 结果和分析

2.1 sgRNA 重组表达质粒的鉴定

将 PX330 酶切产物与 sgRNA 连接转化, 提取质粒后, 使用 PX330 载体引物和相应的 sgRNA 分别作为上下游引物进行 PCR 扩增鉴定, 且将有条带的质粒送测序。使用 BLAST 软件对测序结果与目的基因序列进行对比, 成功构建具有靶向不同目的基因外显子的 sgRNA 重组质粒, 分别命名为: PX330-RPSA-sgRNA1、PX330-RPSA-sgRNA2、PX330-RPSA-sgRNA3、PX330-RPSA-sgRNA4。重组质粒模式结构见图 1。并使用 1%琼脂糖核酸胶对质粒大小进行鉴定, 结果见图 2, 其大小符合预期结果。表明重组质粒构建成功。



图 1. PX330-RPSA-sgRNA 重组质粒模式图

Figure 1. The model of PX330-RPSA-sgRNA recombinant plasmid.

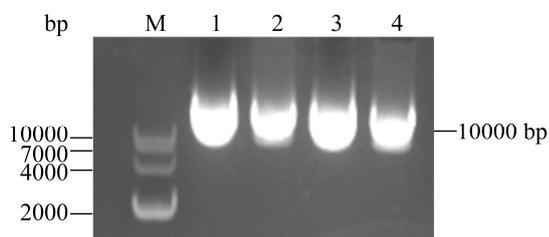


图 2. PX330-RPSA-sgRNA 重组质粒的核酸电泳检测
Figure 2. Identification of PX330-RPSA-sgRNA recombinant plasmid. M: DNA maker; 1: PX330-RPSA-sgRNA1; 2: PX330-RPSA-sgRNA2; 3: PX330-RPSA-sgRNA3; 4: PX330-RPSA-sgRNA4.

2.2 不同 RPSA 基因缺失细胞株的筛选和鉴定

2.2.1 不同 sgRNA 酶切效率鉴定: 将构建成功的 4 种 PX330-sgRNA 重组质粒分别转染 BHK21 细胞, 48 h 后收取细胞样品并提取细胞基因组 DNA。使用 sgRNA check 引物进行 PCR 扩增。通过对 DNA 目的片段回收后, 进行变性再退火, 使用 T7 核酸内切酶检测切割效应和切割效率, 结果如图 3 所示, 4 对 sgRNA 均有酶切条带。

选取酶切效率较高的 PX330-RPSA-sgRNA2 进行进一步后续实验。将 PX330-RPSA-sgRNA2 转染细胞中扩增的片段送样进行 DNA 测序, 结果如图 4 所示, 测序峰图中出现了大量的套峰, 表明扩增片段中发生了有效的基因编辑, sgRNA2 成功发挥了打靶效应。同时对 PX330-RPSA-sgRNA2 转染的细胞收样, 利用 Western blot 检测 RPSA 表达情况, 结果如图 5 所示, RPSA-sgRNA2 转染后, RPSA 的表达量显著下降, 进一步证实

sgRNA2 成功发挥编辑效应。

2.2.2 RPSA 基因敲除单克隆细胞候选株的筛选: 利用有限稀释法将 PX330-RPSA-sgRNA2 转染后的细胞接种到 96 孔细胞培养板中, 正常培养 7–9 d, 去除双细胞孔、多细胞孔, 仅挑选标记单克隆细胞群并进行后续的扩大培养。经过有限稀释法筛选出的 10 株候选单克隆细胞分别标记为 #1、#2、#3、#4、#5、#6、#7、#8、#9、#10。如图 6 所示为培养 8 d 后的部分单克隆细胞团。

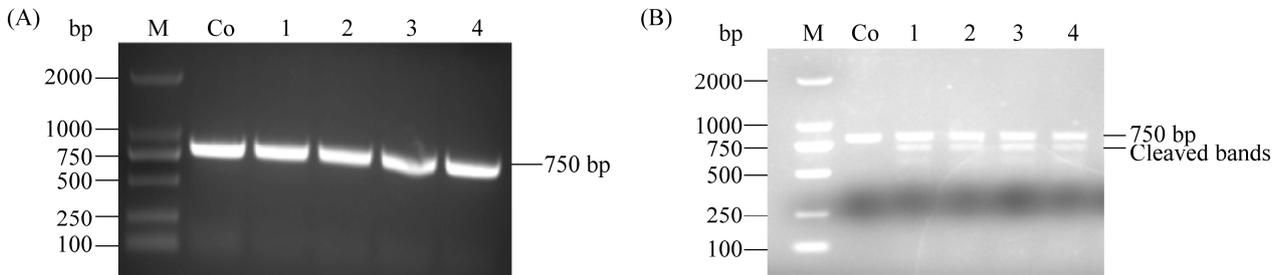


图 3. 不同 sgRNA 酶切效率的检测分析

Figure 3. The analysis of the editing efficiency of each sgRNA. A: the RPSA gene fragments amplified using the check primer. M: DNA maker; Co: WT BHK21; lane 1: PX330-RPSA-sgRNA1; lane 2: PX330-RPSA-sgRNA2; lane 3: PX330-RPSA-sgRNA3; lane 4: PX330-RPSA-sgRNA4; B: the electrophoresis analysis of the re-annealed DNA products digested by the T7E1 endonuclease. M: DNA Maker; Co: negative control; lane 1: PX330-RPSA-sgRNA1; lane 2: PX330-RPSA-sgRNA2; lane 3: PX330-RPSA-sgRNA3; lane 4: PX330-RPSA-sgRNA4.

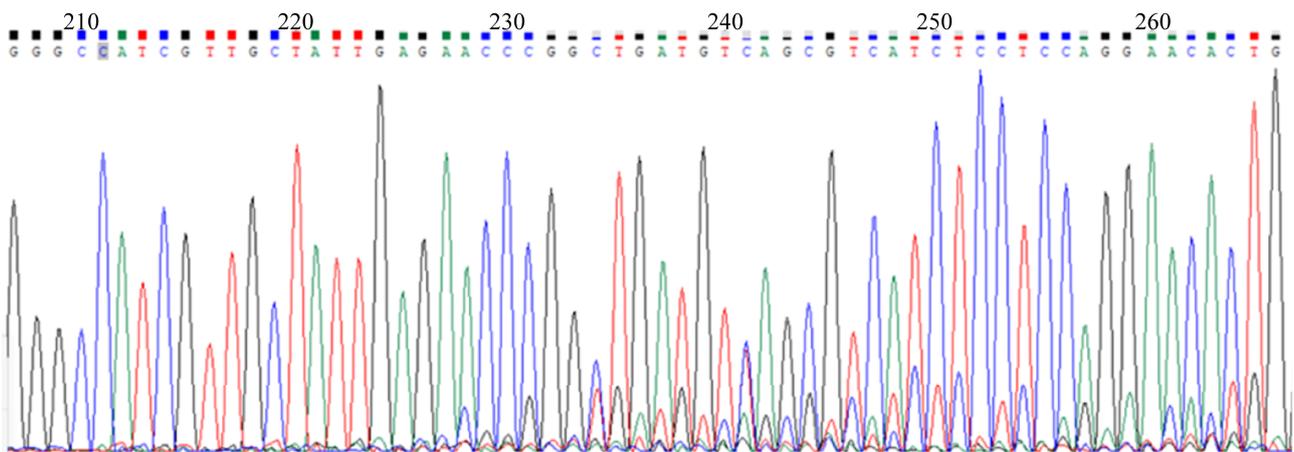


图 4. PX330-RPSA-sgRNA2 转染 BHK21 细胞后, check 引物扩增 RPSA 基因片段测序峰图

Figure 4. The sequencing data of the RPSA fragment amplified by the check primers from the PX330-RPSA-sgRNA2-transfected BHK21 cells.

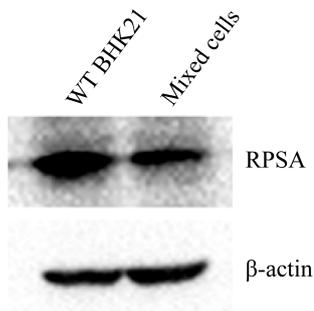


图 5. 转染 PX330-RPSA-sgRNA2 能够降低 BHK21 细胞 RPSA 的表达

Figure 5. Transfection of PX330-RPSA-sgRNA2 decreased RPSA expression in BHK21 cells.

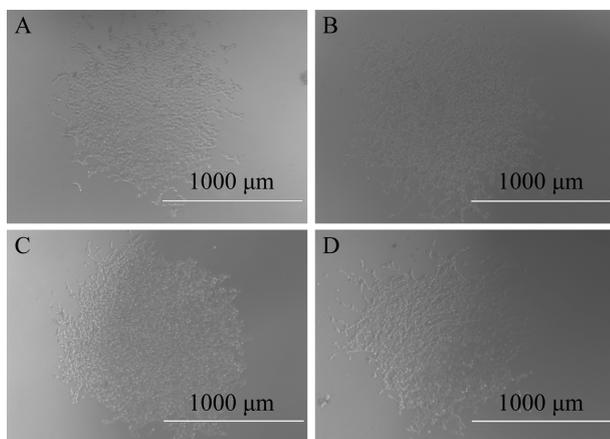


图 6. 有限稀释法获取的单克隆细胞团

Figure 6. Screening the single-cell clones by the limited dilution method. A: single-cell clone #1; B: single-cell clone #3; C: single-cell clone #6; D: single-cell clone #7.

2.2.3 不同单克隆细胞株基因水平的鉴定: 经过扩大培养的细胞, 收取单克隆细胞样品进行 Western blot 验证, 其结果如图 7 所示, 与转染空载体的野生型 BHK21 相比, #1、#6、#7 细胞株中 RPSA 蛋白的表达发生了缺失。

2.2.4 不同单克隆细胞株 RPSA 基因编辑效果检测: 不同单克隆细胞的 DNA 为模板, 使用 check 引物进行目的条带的扩增, 条带单一且明亮, 回

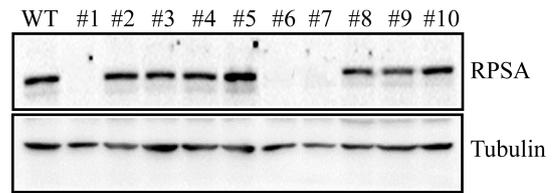


图 7. RPSA 蛋白在候选基因敲除细胞中表达的 Western blot 检测

Figure 7. Detection of RPSA expression in the candidate KO cell lines by Western blot.

收#1、#6、#7 后进行测序。结果如图 8 所示, #1、#7 等结果显示为套峰, #6 无套峰, 但发生了基因编辑。将扩增的#1、#6、#7 目的片段, 连接 T 载体, 转化后随机挑选 5 个单克隆菌落, 提取质粒再次进行测序鉴定。使用 MegAlign 对测序结果进行分析, 证实其基因组发生移码突变, 结合蛋白水平结果, 成功筛选出#6 细胞株为 RPSA 基因敲除细胞株。

2.3 RPSA 基因敲除细胞系的初步应用

2.3.1 敲除 RPSA 抑制 SVA 的复制: 在获得 RPSA 基因敲除细胞系后, 首先测定比较了基因敲除细胞系的生长速率和状态与野生型 BHK21 细胞的差异, 细胞生长曲线、细胞活性测定结果表明在 BHK-21 细胞中敲除 RPSA 没有显著影响细胞的正常生长特性(图 9-A-B)。因此, 本研究进一步利用建立的细胞系初步开展了 RPSA 对 SVA 复制调控影响的研究。使用 SVA 感染野生型 BHK21 细胞和#6 RPSA 基因敲除细胞, 结果显示 RPSA 基因缺失后, SVA 的复制水平显著下降。结果如图 9-C 与 9-D 所示, 表明 RPSA 对 SVA 的复制具有重要的调控作用, 将 RPSA 敲除后, SVA 的复制能力受到严重影响。

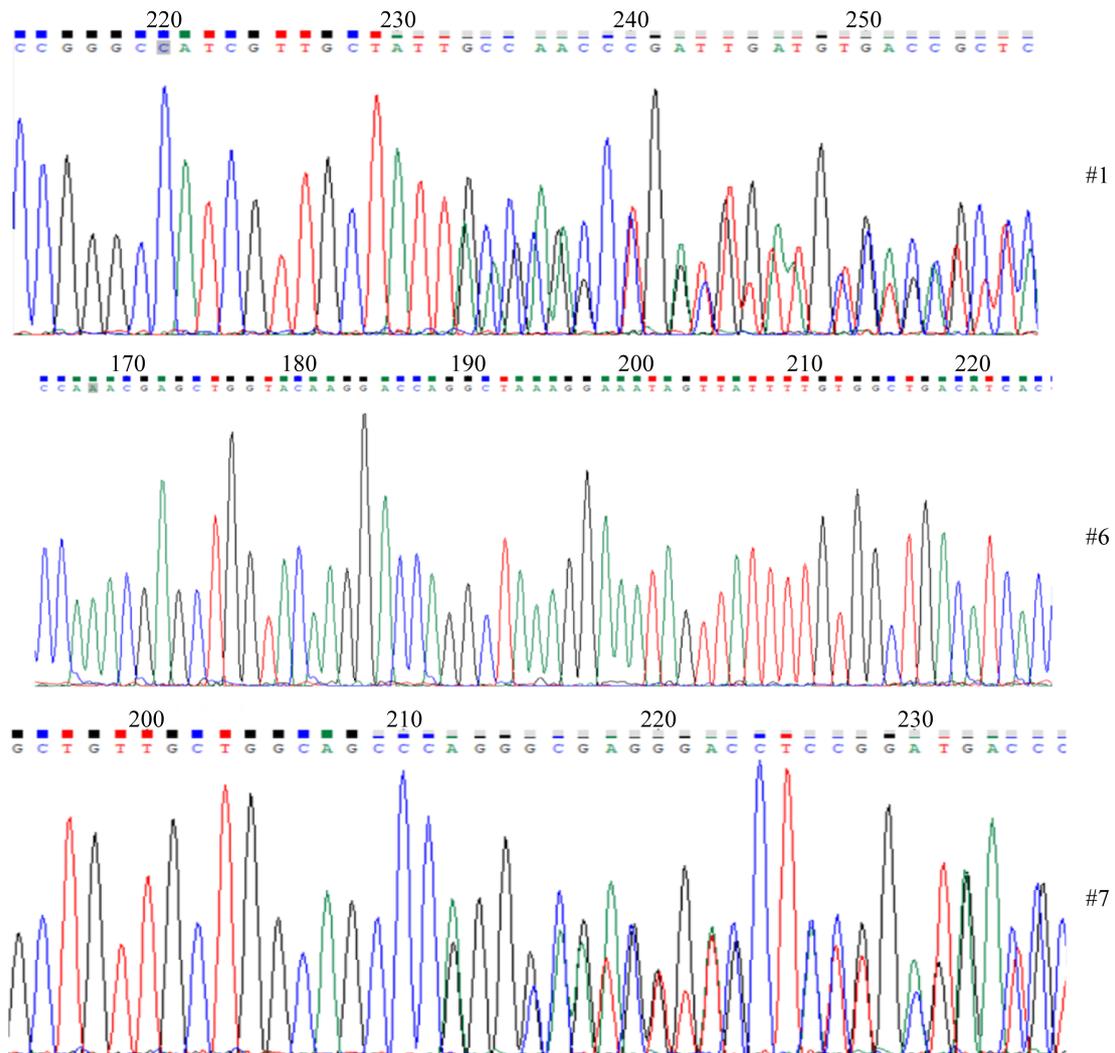


图 8. #1、#6、#7 细胞系 check 引物扩增 RPSA 基因片段测序峰图

Figure 8. The sequencing data of the RPSA fragment amplified by the check primers from the #1, #6 and #7 BHK21 KO cells.

2.3.2 RPSA 激活 ERK 通路调控 SVA 复制:

RPSA 能够调控 MAPK 通路参与肿瘤形成, 而且 RPSA 能够靶向 MAPK 通路调控口蹄疫病毒复制^[21]。为了研究 RPSA 在 SVA 复制过程中是否能够靶向 MAPK 发挥调控作用, 本研究首先研究了 MAPK 通路的活化是否影响 SVA 的复制, 利用 SVA 分别感染 BHK-21 细胞及 MAPK 通路抑制剂 M0126 处理的 BHK-21 细胞, 结果表明 SVA 复制能够激活 MAPK 通路的活化(ERK1/2 发生了磷酸化), 而利用

M0126 抑制 MAPK 通路激活后, SVA 的复制明显被抑制(图 10-A), 表明 MAPK 通路的活化能够促进 SVA 的复制, 抑制 MAPK 通路活化能够降低 SVA 的复制水平。我们进一步研究了 RPSA 敲除后 MAPK 通路的活化情况, 结果发现 RPSA 基因缺失后, MAPK 通路活化显著下降, SVA 复制明显受抑制(图 10-B)。因此, 研究结果表明 RPSA 能够靶向 MAPK 通路活化调控 SVA 复制, 敲除 RPSA 抑制了 MAPK 通路的活化, 进而导致 SVA 复制能力的下降。

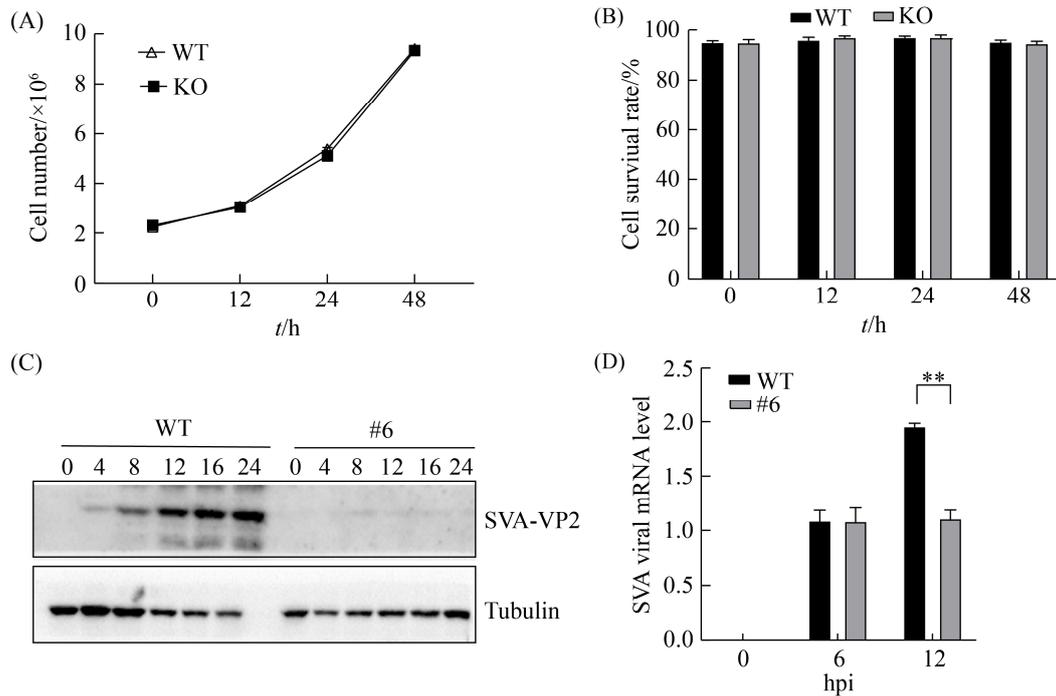


图 9. 敲除 RPSA 能够显著抑制 SVA 在 BHK21 细胞中的复制

Figure 9. Knockout of RPSA in BHK21 cells considerably inhibited SVA replication. A: the growth curve of wild-type BHK21 and #6 RPSA KO cells. Same amount of WT or KO cells were seeded equally in the 6-Well culturing plates. The cell number was calculated at 0, 12, 24 and 48 h respectively. B: the cell viability was measured at 0, 12, 24 and 48 h respectively. C: the wild-type BHK21 and #6 RPSA KO cells were infected with SVA for 0, 4, 8, 12, 16 or 24 h, and the expression of viral VP2 protein was detected by Western blotting at the indicated time point.; D: the wild-type BHK21 and #6 RPSA KO cells were infected with SVA for 0, 6 or 12 h, the total RNA was extracted and the SVA transcripts were detected by qPCR. The error bar indicated mean \pm SD: ** $P < 0.01$ (highly statistically significant).

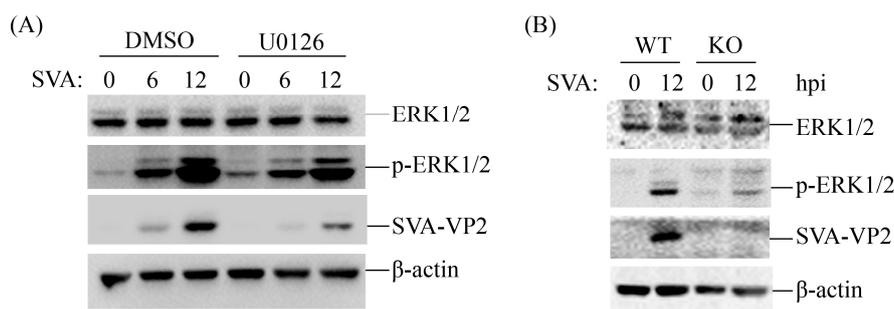


图 10. 敲除 RPSA 能够抑制 MAPK 通路的活化, 抑制 SVA 的复制

Figure 10. Knockout of RPSA in BHK21 cells inhibited the activation of MAPK pathway, resulting in the decreased replication of SVA. A: wild-type BHK21 were pretreated with DMSO (solvent control) or 20 μ mol/L of U0126 for 1 h and then infected with SVA for 0, 6, 12 h. The cells were then lysed and subjected to Western blotting analysis. The expression levels of ERK1/2, p-ERK1/2, SVA VP2 were detected. B: wild-type BHK21 and #6 RPSA KO cells were infected with SVA for 0, 12 h. The cells were then lysed and subjected to Western blotting analysis. The expression of ERK1/2, p-ERK1/2, SVA VP2 were detected by anti-ERK1/2, anti-p-ERK1/2 and anti-SVA VP2 antibodies respectively.

3 讨论

本研究采用 CRISPR/Cas9 技术建立 RPSA 基因敲除的 BHK21 细胞株,为进一步建立 RPSA 其他基因敲除细胞系提供了参考。RPSA 基因敲除细胞系的建立过程中构建了 PX330-sgRNA 重组质粒,转染 BHK21 细胞后,经有限稀释法得到备选单克隆细胞株,通过蛋白、基因水平检测鉴定,成功获得了 RPSA 基因敲除细胞系。在筛选基因敲除细胞株过程中仅通过有限稀释法进行盲筛,未使用任何抗生素进行筛选,细胞生长曲线和细胞活性测定结果表明所得的基因敲除细胞系生长速率和状态与野生型 BHK21 细胞基本相同,最大程度保持了细胞的正常生理性状。为在 RPSA 基因敲除细胞系中进一步通过抗性筛选进行多基因敲除奠定基础。同时,在利用 CRISPR/Cas9 技术进行实际操作过程中,对转染方式、试剂和剂量,有限稀释法等一系列的操作和方法进行了摸索,总结了有效的实验操作流程,提高了敲除细胞系的建立效率。

本实验中利用 RPSA 敲除细胞系,在正常传代培养后开展 SVA 感染实验,与正常野生型 BHK21 细胞相比,我们发现病毒复制水平大幅度下降。表明敲除 RPSA 基因能够限制 SVA 在细胞中的复制,表明 RPSA 对 SVA 的复制具有重要的调控作用,其可以作为抑制 SVA 感染复制的一个重要靶点。而进一步研究表明 RPSA 能够靶向 MAPK 通路活化调控 SVA 的复制。

RPSA 为高度保守的核糖体蛋白质,其不仅在多种细胞中广泛表达,还参与细胞迁移^[16]、血管生成^[18]和脾脏发育^[23]等,具有多形性、多位点和多功能的特点。RPSA 可作为消化道结合外源性致病朊蛋白的候选蛋白,参与朊病毒蛋白的结合

和内化^[14]。在肿瘤细胞扩散中,RPSA 参与丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)信号通路的相关调节^[17]。同时 RPSA 是登革热病毒进入肝脏细胞的血清型特异性受体,也是猪瘟病毒感染过程中进入宿主细胞的细胞附着受体。RPSA 也被称为 37 kDa 层粘连蛋白受体前体/67 kDa 层粘连蛋白受体^[20,24-25]。其是否是 SVA 感染宿主细胞的一个潜在受体,有待进一步研究。我们将利用成功建立的 RPSA 基因敲除细胞系对 RPSA 是否作为 SVA 感染其宿主细胞的潜在受体进行进一步鉴定,深入开展 RPSA 调控 SVA 复制的分子机制,挖掘 RPSA 蛋白的功能。

综上所述,我们利用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术实现了 RPSA 基因的高效编辑,为其他基因敲除细胞系的建立提供了参考。RPSA 基因敲除细胞系的建立能够为 RPSA 分子功能的深入研究提供实验材料,RPSA 调控 SVA 复制的研究能够为进一步开展 RPSA 调控其他病毒复制的机制研究提供思路。

参考文献

- [1] Joung JK, Sander JD. TALENs: a widely applicable technology for targeted genome editing. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2013, 14(1): 49–55.
- [2] Kianianmomeni A. Genome editing using engineered zinc finger nucleases. *Clinical Biochemistry*, 2011, 44(S13): S28.
- [3] Zhang F, Wen Y, Guo X. CRISPR/Cas9 for genome editing: progress, implications and challenges. *Human Molecular Genetics*, 2014, 23(R1): R40–R46.
- [4] Cong L, Ran FA, Cox D, Lin SL, Barretto R, Habib N, Hsu PD, Wu XB, Jiang WY, Marraffini LA, Zhang F. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*, 2013, 339(6121): 819–823.
- [5] Ishino Y, Shinagawa H, Makino K, Amemura M, Nakata A. Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. *Journal of Bacteriology*, 1987, 169(12): 5429–5433.

- [6] Plagens A, Richter H, Charpentier E, Randau L. DNA and RNA interference mechanisms by CRISPR-Cas surveillance complexes. *FEMS Microbiology Reviews*, 2015, 39(3): 442–463.
- [7] Christian M, Cermak T, Doyle EL, Schmidt C, Zhang F, Hummel A, Bogdanove AJ, Voytas DF. Targeting DNA double-strand breaks with TAL effector nucleases. *Genetics*, 2010, 186(2): 757–761.
- [8] Bolotin A, Quinquis B, Sorokin A, Ehrlich DS. Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin. *Microbiology*, 2005, 151(8): 2551–2561.
- [9] Sternberg SH, Haurwitz RE, Doudna JA. Mechanism of substrate selection by a highly specific CRISPR endoribonuclease. *RNA*, 2012, 18(4): 661–672.
- [10] Horii T, Hatada I. Genome engineering using the CRISPR/Cas system. *World Journal of Medical Genetics*, 2014, 4(3): 69–76.
- [11] Yao SH, He ZY, Chen C. CRISPR/Cas9-mediated genome editing of epigenetic factors for cancer therapy. *Human Gene Therapy*, 2015, 26(7): 463–471.
- [12] Karimian A, Azizian K, Parsian H, Rafieian S, Shafiei-Irannejad V, Kheyrollah M, Yousefi M, Majidinia M, Yousefi B. CRISPR/Cas9 technology as a potent molecular tool for gene therapy. *Journal of Cellular Physiology*, 2019, 234(8): 12267–12277.
- [13] Swiech L, Heidenreich M, Banerjee A, Habib N, Li YQ, Trombetta J, Sur M, Zhang F. *In vivo* interrogation of gene function in the mammalian brain using CRISPR-Cas9. *Nature Biotechnology*, 2015, 33(1): 102–106.
- [14] Knorr C, Beuermann C, Beck J, Brenig B. Characterization of the porcine multicopy ribosomal protein SA/37-kDa laminin receptor gene family. *Gene*, 2007, 395(1/2): 135–143.
- [15] Ben-shem A, de Loubresse NG, Melnikov S, Jenner L, Yusupova G, Yusupov M. The structure of the eukaryotic ribosome at 3.0 Å resolution. *Science*, 2011, 334(6062): 1524–1529.
- [16] O'Donohue MF, Choismel V, Faubladiet M, Fichant G, Gleizes PE. Functional dichotomy of ribosomal proteins during the synthesis of mammalian 40S ribosomal subunits. *Journal of Cell Biology*, 2010, 190(5): 853–866.
- [17] Rea VEA, Rossi FW, de Paulis A, Ragno P, Selleri C, Montuori N. 67 kDa laminin receptor: structure, function and role in cancer and infection. *Le Infezioni in Medicina*, 2012, 20(Suppl 2): 8–12.
- [18] Bernard A, Gao-li J, Franco CA, Bouceba T, Huet A, Li ZL. Laminin receptor involvement in the anti-angiogenic activity of pigment epithelium-derived factor. *The Journal of Biological Chemistry*, 2009, 284(16): 10480–10490.
- [19] Brassart B, da Silva J, Donet M, Seurat E, Hague F, Terryn C, Velard F, Michel J, Ouadid-Ahidouch H, Monboisse JC, Hinek A, Maquart FX, Ramont L, Brassart-Pasco S. Tumour cell blebbing and extracellular vesicle shedding: key role of matrikines and ribosomal protein SA. *British Journal of Cancer*, 2019, 120(4): 453–465.
- [20] Ould-Abeih MB, Petit-Topin I, Zidane N, Baron B, Bedouelle H. Multiple folding states and disorder of ribosomal protein SA, a membrane receptor for laminin, anticarcinogens, and pathogens. *Biochemistry*, 2012, 51(24): 4807–4821.
- [21] Zhu ZX, Li WW, Zhang XL, Wang CC, Gao LL, Yang F, Cao WJ, Li KL, Tian H, Liu XT, Zhang KS, Zheng HX. Foot-and-mouth disease virus capsid protein VP1 interacts with host ribosomal protein sa to maintain activation of the MAPK signal pathway and promote virus replication. *Journal of Virology*, 2020, 94(3): e01350-19.
- [22] Zhu Z, Yang F, Chen P, Liu H, Cao W, Zhang K, Liu X, Zheng H. Emergence of novel Seneca valley virus strains in China, 2017. *Transboundary and Emerging Diseases*, 2017, 64(4): 1024–1029.
- [23] Bolze A, Mahlaoui N, Byun M, Turner B, Trede N, Ellis SR, Abhyankar A, Itan Y, Patin E, Brebner S, Sackstein P, Puel A, Picard C, Abel L, Quintana-Murci L, Faust SN, Williams AP, Baretto R, Duddridge M, Kini U, Pollard AJ, Gaud C, Frange P, Orbach D, Emile JF, Stephan JL, Sorensen R, Plebani A, Hammarstrom L, Conley ME, Selleri L, Casanova JL. Ribosomal protein SA haploinsufficiency in humans with isolated congenital asplenia. *Science*, 2013, 340(6135): 976–978.
- [24] Chen JN, He WR, Shen L, Dong H, Yu JH, Wang X, Yu SX, Li YF, Luo YZ, Sun Y, Qiu HJ. The laminin receptor is a cellular attachment receptor for classical swine fever virus. *Journal of Virology*, 2015, 89(9): 4894–4906.
- [25] Thepparit C, Smith DR. Serotype-specific entry of dengue virus into liver cells: identification of the 37-kilodalton/67-kilodalton high-affinity laminin receptor as a dengue virus serotype 1 receptor. *Journal of Virology*, 2004, 78(22): 12647–12656.

Construction of RPSA gene knockout BHK21 cell line using the CRISPR/Cas9 system

Lili Gao, Congcong Wang, Fan Yang, Weijun Cao, Xiangle Zhang, Xiangtao Liu, Zixiang Zhu*, Haixue Zheng*

State Key Laboratory of Veterinary Etiological Biology, National Foot-and-Mouth Disease Reference Laboratory, Lanzhou Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou 730046, Gansu Province, China

Abstract: **[Objective]** Generating ribosomal protein SA (RPSA) knockout baby hamster syrian kidney (BHK21) cells using the clustered regularly interspaced short palindromic repeats/Cas 9 nuclease (CRISPR/Cas9) gene editing technology, and evaluation of the regulatory effect of RPSA on Senecavirus A (SVA) replication. **[Methods]** We designed 4 pairs of guide RNAs (sgRNA). After screening, the PX330-RPSA-sgRNA2 recombinant plasmid was used for construction of RPSA gene knockout cell line. PX330-RPSA-sgRNA2 was transfected into BHK21 cells, and the monoclonal cell was screened by limited dilution method. The knockout of RPSA was evaluated by Western blotting. The replicative difference of SVA in the wildtype and RPSA knockout cells was investigated by Western blotting and qPCR analysis. **[Results]** The Western blotting and Sanger sequencing results showed that RPSA within the BHK21 cell line was knocked out. We further investigated the replication of SVA in the RPSA knockout cells which showed that SVA replication was dramatically decreased in RPSA knockout cells comparing with that in the wildtype cells. **[Conclusion]** The RPSA gene knockout BHK21 cell line was successfully constructed, and RPSA played an important role during SVA replication. The constructed cell line will be a useful tool for exploiting RPSA functions.

Keywords: CRISPR/Cas9, ribosomal protein SA, gene knockout cell, Senecavirus A

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the National Natural Sciences Foundation of China (31972688), by the Key Technologies R&D Program of Gansu Province (19ZDNA001) and by the Central Public-Interest Scientific Institution Basal Research Fund (1610312016013, 1610312017003)

*Corresponding authors. Tel/Fax: +86-931-8342086; E-mail: Zixiang Zhu, zhuzixiang@caas.cn, Haixue Zheng, haixuezheng@163.com

Received: 21 June 2020; Revised: 18 August 2020; Published online: 15 June 2021