



CRISPR/Cas9 介导的 *USP30* 基因敲除细胞系的建立及其对塞内卡病毒增殖的影响

赵振翔¹, 张向乐², 杨帆², 曹伟军², 顾峰幸², 李康丽², 郑海学^{1,2}, 王雯慧^{1*}, 朱紫祥^{1,2*}

1 甘肃农业大学动物医学院, 甘肃 兰州 730070

2 中国农业科学院兰州兽医研究所 兰州大学动物医学与生物安全学院 动物疫病防控全国重点实验室, 甘肃 兰州 730046

赵振翔, 张向乐, 杨帆, 曹伟军, 顾峰幸, 李康丽, 郑海学, 王雯慧, 朱紫祥. CRISPR/Cas9 介导的 *USP30* 基因敲除细胞系的建立及其对塞内卡病毒增殖的影响[J]. 微生物学报, 2023, 63(10): 4064-4074.

ZHAO Zhenxiang, ZHANG Xiangle, YANG Fan, CAO Weijun, GU Fengxing, LI Kangli, ZHENG Haixue, WANG Wenhui, ZHU Zixiang. HEK-293T cells with *USP30* knockout: construction using the CRISPR/Cas9 system and effects on Senecavirus A replication[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2023, 63(10): 4064-4074.

摘要:【目的】利用规律成簇的间隔短回文重复序列/Cas9 核酸酶(clustered regularly interspaced short palindromic repeats/Cas9 nuclease, CRISPR/Cas9)技术建立 *USP30* 基因敲除的人胚胎肾细胞(human embryonic kidney 293T cells, HEK-293T)细胞系, 为开展宿主泛素特异性蛋白酶 30(ubiquitin-specific protease 30, USP30)蛋白的功能研究建立了细胞模型; 同时, 初步探究 USP30 蛋白在病毒感染过程中的作用。【方法】根据 Ensemble 数据库查询 *USP30* 基因序列, 定位 *USP30* 在基因组中不同转录本重叠区的第一个外显子段, 设计并合成 2 对引导 RNA (single guide RNAs, sgRNA), 分别构建在 pX459 载体中; 将 pX459-USP30-sgRNA 质粒转染 HEK-293T 细胞, 并用嘌呤霉素处理, 筛选出转染阳性的细胞, 然后通过有限稀释法筛选单克隆细胞, 通过 Western blotting

资助项目: 国家重点研发计划(2021YFD1800300); 甘肃省重大专项(21ZD3NA001, 20ZD7NA006, 19ZDNA001); “十四五”广东省农业科技创新十大主攻方向“揭榜挂帅”项目(2022SDZG02); 生猪产业体系(CARS-35); 甘肃省优秀博士生项目(23JRRA559); 兰州大学中央高校基本科研业务费专项资金(lzujbky-2022-13)

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2021YFD1800300), the Key Technologies Research and Development Program of Gansu Province (21ZD3NA001, 20ZD7NA006, 19ZDNA001), the Open Competition Program of Top Ten Critical Priorities of Agricultural Science and Technology Innovation for the 14th Five-Year Plan of Guangdong Province (2022SDZG02), the Swine Industry System (CARS-35), the Excellent Doctoral Program of Gansu Province (23JRRA559), and the Fundamental Research Funds for the Central Universities of Lanzhou University (lzujbky-2022-13).

*Corresponding authors. WANG Wenhui, Tel/Fax: +86-931-8342086, E-mail: ww777@126.com;

ZHU Zixiang, E-mail: zhuzixiang@caas.cn

Received: 2023-02-20; Accepted: 2023-05-12; Published online: 2023-05-22

及测序检测 *USP30* 基因的敲除。通过 Western blotting 及实时荧光定量 PCR 分析比较塞内卡病毒 (Senecavirus A, SVA) 在野生型和 *USP30* 基因敲除 HEK-293T 细胞中的复制差异。【结果】Western blotting 及测序证实 *USP30* 基因敲除单克隆细胞系构建成功。进一步实验发现, SVA 在 *USP30* 基因敲除细胞中的复制水平显著低于野生型细胞。【结论】成功构建 *USP30* 基因敲除的 HEK-293T 细胞系, 首次证明 *USP30* 对 SVA 的复制具有促进作用, 为进一步揭示 *USP30* 相关免疫反应和 SVA 感染过程的作用机制提供了良好的细胞模型, 也为开展宿主 *USP30* 蛋白调控病毒复制的机制研究提供了关键工具和一定的理论依据。

关键词: CRISPR/Cas9; 泛素特异性蛋白酶 30; 基因敲除细胞; 塞内卡病毒

HEK-293T cells with *USP30* knockout: construction using the CRISPR/Cas9 system and effects on Senecavirus A replication

ZHAO Zhenxiang¹, ZHANG Xiangle², YANG Fan², CAO Weijun², GU Fengxing²,
LI Kangli², ZHENG Haixue^{1,2}, WANG Wenhui^{1*}, ZHU Zixiang^{1,2*}

1 College of Veterinary Medicine, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, Gansu, China

2 State Key Laboratory for Animal Disease Control and Prevention, College of Veterinary Medicine, Lanzhou University, Lanzhou Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou 730046, Gansu, China

Abstract: [Objective] The clustered regularly interspaced short palindromic repeats/Cas9 nuclease (CRISPR/Cas9) system was employed to knock out the ubiquitin-specific protease 30 (*USP30*) gene from human embryonic kidney 293T (HEK-293T) cells, which established a cell model for studying the function of *USP30* and the regulatory role of this protein in virus replication. [Methods] According to the sequence of the first exon in the overlapping region of different transcripts of *USP30* in Ensemble, we designed two pairs of single guide RNAs (sgRNAs) and constructed the recombinant plasmids pX459-*USP30*-sgRNAs. The HEK-293T cells were transfected with pX459-*USP30*-sgRNA and treated with puromycin for the screening of transfection-positive cells, from which the monoclonal cells were screened out by limited dilution method. We then employed Western blotting and DNA sequencing to evaluate the knockout of *USP30* and compare the replication of Senecavirus A (SVA) in the wild type and the cells with *USP30* knockout. [Results] We confirmed that *USP30* was knocked out from HEK-293T cells by Western blotting and DNA sequencing. Further experiments revealed that the replication level of SVA in the cells with *USP30* knockout was significantly lower than that in the wild type, indicating a positive role of *USP30* in SVA replication. [Conclusion] We successfully constructed the HEK-293T cells with *USP30* knockout and confirmed that *USP30* played a positive role in SVA replication. The constructed cell line provides a good cell model for further deciphering the mechanisms of *USP30*-associated immune response and SVA infection process and serves as a tool for studying the regulatory role of *USP30* in viral replication.

Keywords: CRISPR/Cas9; ubiquitin-specific protease 30; cells with gene knockout; Senecavirus A

基因编辑(gene editing)是一种可精确对生物体基因组特定目标基因进行修饰的一种基因工程技术,主要包括基于锌指核酸酶(zinc finger nucleases, ZFNs)^[1]、转录激活样效应因子核酸酶(transcription activator-like effector nucleases, TALENs)^[2]和规律成簇的间隔短回文重复序列(clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR)等进行的编辑技术^[3-4]。CRISPR/Cas9 系统是基于古细菌或者古生菌的获得性免疫系统而发展起来的一种快速、高效和稳定的基因编辑技术^[5-6]。该系统通过设计一条或者多条靶向目的基因的 guide RNA 引导 Cas9 对目的基因进行切割^[7],然后通过同源重组或者非同源末端连接的方式进行修复使基因片段发生缺失、插入或替换,从而使基因发生敲除^[8]。该技术易于设计、周期短、插入效率高、操作灵活便捷且适用于多种细胞类型和生物^[9-10],已经广泛应用在医学、生命科学等多个领域^[11-12]。

蛋白的翻译后修饰主要是在氨基酸残基上以共价连接的方式加上或者除去修饰基团,从而发挥蛋白调控功能,包括甲基化、乙酰化、磷酸化、糖基化、SUMO 化、乳酸化和泛素化等^[13-14]。泛素化修饰是将泛素分子共价连接到蛋白质底物上,形成结构与功能复合体,参与调控细胞周期、细胞增殖、细胞凋亡、修复 DNA 损伤和免疫炎症等几乎一切生命活动^[15]。泛素化是一个可逆的过程,去泛素化酶能够除去底物蛋白的泛素修饰,从而调节细胞功能。去泛素化酶不仅可以逆转底物蛋白的泛素化过程,而且可以参与信号转导的调节,比如调控基因转录和 DNA 损伤修复、细胞分裂和细胞凋亡等^[16-18]。

泛素特异性蛋白酶 30 (ubiquitin-specific protease 30, USP30)是一种属于 USP 亚家族的去

泛素化酶(deubiquitinase, DUBs),位于线粒体外膜和过氧化物酶体。USP30 可以抑制由泛素连接酶 PARK2 和蛋白激酶 PINK1 介导的线粒体自噬,调节线粒体的动态变化;也可以通过抑制 PEX2 的 E3 泛素连接酶活性来阻止过氧化物酶体吞噬^[19],而敲除 USP30 则会诱导过氧化物酶体吞噬^[20-21]。有研究表明,USP30 主要逆转线粒体上 Parkin 依赖的 TOM20 泛素化,USP30 缺失则会促进去极化诱导的细胞死亡^[22]。在神经元中,过表达 USP30 阻止 Parkin 介导的线粒体自噬,而降低 USP30 的活性则增强了线粒体的降解,敲低 USP30 能缓解 Parkin 病理活性突变所引起的线粒体自噬障碍,以及在 Parkin 或者 PINK1 缺陷的果蝇中增强线粒体的完整性^[23]。在肺腺癌细胞中,小干扰 RNA (small interfering RNA, siRNA)筛选发现 USP30 是参与肝细胞生长因子(hepatocyte growth factor, HGF)诱导的细胞散射反应的因素,表明 USP30 在癌细胞转移中具有重要作用。USP30 的泛素水解活性可以去除 K6、K11、K48 和 K63 连接的泛素链,但对以 K6 连接的泛素链最为有效^[22,24]。USP30 的缺失导致 K6 连接的泛素链丰度明显高于 K11、K48 和 K63 连接的泛素链,并促进神经元中线粒体的降解^[24-25]。USP30 也可以去泛素化修饰和稳定动力相关蛋白 DRP1,促进线粒体形态、脂质代谢和肝癌的发生的调节,抑制甘油磷酸-O-酰基转移酶(glycerone-phosphate O-acyltransferase, GNPAT)和线粒体动力相关蛋白 1 (dynamin-related protein 1, DRP1)可显著降低脂质代谢和肝癌的发生^[26]。

塞内卡病毒(Senecavirus A, SVA)是我国在 2015 年发现的一种新的猪水疱病病原,其感染引发的水疱病与口蹄疫(foot-and-mouth disease, FMD)、猪水疱病(swine vesicular disease, SVD)

和水疱性口炎(vesicular stomatitis, VS)引起的病变极为类似^[27], 但由于 SVA 感染与致病机制仍不清楚, 仍未有商品化的疫苗或药物问世。为了研究宿主 USP30 蛋白相关免疫反应和 SVA 感染过程的作用机制提供了良好的细胞模型, 本研究利用 CRISPR/Cas9 技术建立 *USP30* 基因敲除细胞系, 为开展宿主 USP30 蛋白调控病毒复制的机制研究提供了关键工具和一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 细胞、病毒及质粒

HEK-293T 细胞[美国模式菌种收集中心(ATCC)]、pcDNA3.1-Myc-vec 空载体、pcDNA3.1-Myc-USP30(融合表达含有 Myc 标签的 USP30 蛋白)、SVA-eGFP 毒株和 SVA-CH-FJ-2017 毒株保存于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与动物疫病防控全国重点实验室。pSpCas9(BB)-2A-Puro(pX459)载体由中国农业大学吴森教授惠赠。

1.2 试剂及抗体

大肠杆菌 Trans5 α 感受态细胞、T4 DNA 连接酶、LA *Taq* 酶、T-Vector pMDTM 19 载体、DNA Ligation Kit (Mighty Mix)、Trizol 试剂购自宝日医生物(北京)有限公司; ChamQ Universal SYBR[®] qPCR Master Mix 购自诺唯赞生物科技股份有限公司; 预染蛋白 Marker 购自雅酶生物; jetPRIME[®] (Polyplus transfection reagent)转染试剂购自 Polyplus-transfection 公司; DMEM 细胞培养基、PBS 溶液、0.25% EDTA 胰酶和新生牛血清(FBS)均购自 BI 公司; 胶回收试剂盒、微量 DNA 提取试剂盒购自 OMEGA 公司; 嘌呤霉素购自北京索莱宝科技有限公司; 大提质粒试剂盒购自 MACHEREY-NAGEL 公司; USP30 抗体

(TD4590S)购自 Abmart 公司; HRP-山羊抗小鼠 IgG (H+L) (BF03001)、HRP-山羊抗兔 IgG (H+L) (BF03008)购自北京博奥龙公司; 小鼠抗 β -actin 单克隆抗体(ARM2001)购自上海诺莱生物。塞内卡病毒 VP2 兔多抗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制备保存。

1.3 sgRNA 靶点设计

利用 Ensemble 数据库查询 *USP30* 基因序列, 在 *USP30* 基因不同转录本第一个外显子区段的重叠区设计靶点。

根据 CRISPR/Cas9 设计原则, 登录 CRISPR 在线设计网站 <http://crispor.tefor.net/> 进行 sgRNA 的设计, 分别命名为 USP30-sgRNA1、USP30-sgRNA2; 在 sgRNA 片段正向序列的 5' 端加入 CACC 粘性末端, 在反向序列的 5' 端加入 AAAC 粘性末端, 作为靶向 *USP30* 基因的 sgRNA 寡聚核苷酸 (sgRNA1-oligo)。所述 sgRNA-oligo 由金唯智生物科技有限公司合成, 详细序列见表 1。

1.4 pX459-sgRNA 重组质粒的构建

pX459-sgRNA 重组质粒的构建: (1) 退火。将合成的 sgRNA 稀释至 100 μ mol/L, 配制共 10 μ L 反应体系: 上游引物(10 μ mol/L) 4.5 μ L, 下游引物(10 μ mol/L) 4.5 μ L, 10 \times LA PCR Buffer 1 μ L, 轻柔混匀。退火程序: 95 $^{\circ}$ C, 10 min; 退火完成后自然放凉反应体系, 使上下游引物形成双链。(2) pX459 载体质粒的酶切: 利用 *Bbs* I 限制性内切酶酶切 pX459 载体, 共配制 20 μ L 酶切体系如下: pX459 载体 5 μ L, *Bbs* I 1 μ L, 10 \times Buffer 2 μ L, ddH₂O 12 μ L。37 $^{\circ}$ C 酶切 3 h, 核酸电泳纯化回收线性化片段。(3) pX459-sgRNA 重组质粒的构建: 将纯化回收 pX459 线性化片段产物与双链 sgRNA-oligo 进行连接反

表 1 靶向 *USP30* 基因的 sgRNA 序列Table 1 The sgRNAs that target *USP30* gene

sgRNA	Primer sequence (5'→3')
USP30-sgRNA1-F	CACCGTCGCTCATCTTCCAATGACG
USP30-sgRNA1-R	AAACCGTCATTGGAAGATGAGCGA
USP30-sgRNA2-F	CACCGCTCACCCCTACATCCAATCAC
USP30-sgRNA2-R	AAACGTGATTGGATGTAGGGTGAG

应, 反应体系: T4 Ligase 0.5 μL, 10×T4 Ligase Buffer 0.5 μL, pX459 酶切纯化片段 0.5 μL, 双链 sgRNA-oligo 3.5 μL, 共 5 μL 体系。16 °C 过夜连接后转化至 Trans5α 感受态细胞, 克隆扩增重组质粒。转化程序: 将 50 μL 的 Trans5α 感受态细胞与 500 ng 连接产物混合, 冰上放置 30 min。42 °C 水浴热激 45 s, 取出冰浴 2 min。加入无抗性 LB 培养液 500 mL, 37 °C、220 r/min 摇菌 60 min。将复苏好的菌液 4 000 r/min 室温离心 5 min。吸去 400 μL 上清后, 将剩余的上清与沉淀的菌体充分悬浮, 利用涂菌棒将转化的大肠杆菌涂布在具有氨苄抗生素抗性的 LB 平板上, 37 °C 温箱培养 12 h, 观察生长状况。挑取单克隆菌落, 利用含有氨苄抗生素抗性的 LB 液体培养基摇菌 12 h, 提取质粒并测序验证。

1.5 细胞的转染

将细胞铺至培养皿中, 待细胞生长到 70%–80% 时, 可以进行转染实验; 取实验所需数量的高压灭菌的 EP 管, 每管加入 200 μL 配套提供的专用缓冲液, 每管加入转染所需真核表达质粒 DNA, 涡旋均匀; 按照 DNA:jetPRIME® 转染试剂=1:2 (体积比) 的比例将 jetPRIME® 转染试剂加入到 DNA 溶液中, 涡旋 10 s, 然后快速减速, 室温孵育 10 min 使形成 DNA-jetPRIME® 复合物; 细胞培养液更换为新鲜的完全培养液, 并将 DNA-jetPRIME® 复合物逐滴添加到培养皿中, 轻轻地摇动培养皿, 使其均匀分布; 在 37 °C、5% CO₂ 培养箱中继续培养, 12 h 后将转染的细胞均分为 3 份铺至新的培养皿中, 并加

入嘌呤霉素筛选。

1.6 T7EI 实验

使用微量 DNA 提取试剂盒提取细胞 DNA 后, 对目的片段进行扩增并胶回收, 将胶回收的目的片段进行变性后再退火。将再退火的产物使用 T7 核酸内切酶酶切, 反应体系: 再退火产物 8 μL, T7 核酸内切酶 1 μL, buffer 1 μL。37 °C 酶切 1 h 后加入 10×Loading Buffer 终止反应。核酸电泳检测酶切是否成功。check 引物序列 F: 5'-GTAGGGTGTCTGCCCCGAGGTGGGTAGTT-3'; R: 5'-TATCAAGTGTTGGTATTGTATTACCTG-3'。

1.7 连接产物转化

将连接至 T-Vector pMD™ 19 载体的混合物加入 100 μL Trans5α 感受态细胞中, 轻轻混合并置于冰上 30 min; 42 °C 水浴 45 s 后迅速转入冰中放置 2 min; 加入 800 μL 无抗 LB 液体培养基, 37 °C 振荡培养 60 min; 取 100 μL 涂在含有 X-Gal、IPTG、Amp 的 LB 固体培养基上, 37 °C 过夜培养; 挑选白色阳性菌落进行扩大培养。

1.8 有限稀释法

将嘌呤霉素筛选的阳性细胞消化后, 稀释细胞浓度至 10 个细胞/mL, 将稀释的细胞加入 96 孔板(每孔加入 0.1 mL 培养基)中, 于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中继续培养; 7 d 后, 标记细胞形态正常且单一的细胞孔; 继续培养 7 d 后, 选取状态良好的标记细胞进行传代扩大培养。

1.9 Western blotting 蛋白检测

收取细胞样品, 培养皿中加入适量的细胞裂解液充分裂解细胞, 4 °C、12 000 r/min 离心 10 min 后吸取 80 μL 上清, 并加入 20 μL 5×SDS 上样缓冲液, 金属浴 10 min 使蛋白变性, -40 °C 保存。SDS-PAGE 凝胶电泳后通过湿转法进行转印, 转印结束后 5% 脱脂奶粉封闭 2 h; 1×TBST 清洗 NC 膜 2 次, 一抗(USP30 兔抗) 4 °C 过夜孵

育后, 1×TBST 清洗 NC 膜 3 次, 羊抗兔 IgG (IgG-HRP) 为二抗, 室温孵育 2 h。使用凝胶成像仪成像, 分析结果。

1.10 回补实验

将正常传代的野生型 HEK-293T 细胞和 *USP30* 基因敲除细胞分别铺于培养板中, 待其密度长至 80% 左右时, 野生型 HEK-293T 细胞、*USP30* 基因敲除细胞和 *USP30* 基因敲除细胞分别转染 pcDNA3.1-Myc-vec、pcDNA3.1-Myc-vec 和 pcDNA3.1-Myc-*USP30* 质粒, 24 h 后进行接毒感染。

1.11 细胞接毒感染

将细胞状态良好的野生型 HEK-293T 细胞和 *USP30* 基因敲除细胞分别铺于 6 孔板中, 待细胞密度长至 90% 时, 使用 PBS 清洗细胞以去除残留血清; 随后用 SVA 病毒感染细胞于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中吸附 1 h 后, 更换含有 1% FBS 的 DMEM 维持液, 放置于培养箱中继续培养。

1.12 实时荧光定量 PCR (real-time quantitative PCR, RT-qPCR)

SVA 病毒感染 12 h 后, 收取细胞, 使用 Trizol 法提取 RNA 并反转录成 cDNA 进行实时荧光定量 PCR, 以 *GAPDH* 基因为内参, 检测 SVA 的转录水平。实时荧光定量 PCR 反应体系: ChamQ Universal SYBR® qPCR Master Mix 10 μL, 上、下游引物 (10 μmol/L) 各 0.4 μL, ddH₂O 8.2 μL, cDNA 1 μL。反应程序为: 95 °C 预变性 2 min; 95 °C 变性 10 s, 60 °C 退火 34 s, 循环扩增 40 次。

1.13 统计学分析

实验数据均使用 GraphPad 9.0 软件进行分析, 实验的组间比较利用 *t*-test 进行统计学分析, **: *P* < 0.01 代表具有极显著性差异。

2 结果与分析

2.1 sgRNA 重组质粒的鉴定

将构建的 pX459-sgRNA 质粒进行 PCR 扩增, 并测序鉴定。测序结果表明 pX459-sgRNA 质粒构建成功, 分别命名为 pX459-*USP30*-sgRNA1、pX459-*USP30*-sgRNA2。载体信息和克隆位置如图 1A 所示。重组质粒测序结果如图 1B、1C 所示, 利用通用引物检测所构建质粒得到的序列与 pX459 载体进行比对, 与预期结果相符。表明表达 sgRNA 的质粒 pX459-*USP30*-sgRNA1、pX459-*USP30*-sgRNA2 构建成功。

2.2 *USP30* 基因缺失细胞株的筛选和鉴定

2.2.1 sgRNA 酶切鉴定

将构建成功的 pX459-sgRNA 重组质粒共转染至 HEK-293T 细胞并设置 3 个重复, 分别标记为 #1、#2、#3, 将细胞重新置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养 24 h 后, 用含有嘌呤霉素 (浓度 8 μg/mL) 的完全培养基处理细胞 2–3 d, 筛选阳性细胞, 收取小部分细胞样品提取细胞基因组 DNA, 使用 sgRNA check 引物进行 PCR 扩增, 将野生型 HEK-293T 细胞设为对照, 阳性筛选组细胞扩增到约 2 000 bp 大小的片段, 与预期设计片段大小相符 (图 2A)。胶回收目的条带, 变性再退火后, 使用 T7 核酸内切酶切割, 结果如图 2B 所示, 均有酶切条带, 说明均发生了有效的酶切。将 PCR 扩增产物测序, 峰图中出现套峰, 表明扩增产物中发生了基因编辑。

2.2.2 *USP30* 基因敲除细胞筛选

利用有限稀释法将嘌呤霉素筛选阳性的细胞加入 96 孔板中, 于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养 7 d, 标记细胞形态正常且单一的细胞孔并进行扩大培养, 培养 7 d 的部分单克隆细胞团如图 3 所示。

连接 T 载体, 转化后随机挑取 5 个阳性单克隆菌落扩大培养并提取质粒测序鉴定, 结果显示 #1、#2、#3 候选细胞株的基因分别发生了 134、

134、131 个碱基的缺失突变。结合蛋白水平检测结果, 表明成功筛选出 *USP30* 基因敲除的细胞株, 并命名为 *USP30*^{-/-} 细胞。

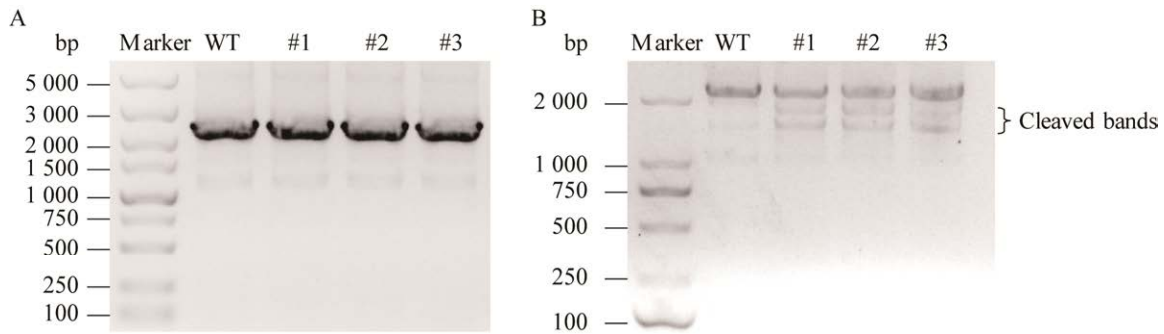


图 2 sgRNA 酶切效率分析

Figure 2 The analysis of the enzymatic efficacy of sgRNA. A: The *USP30* gene fragments. Marker: DNA marker; WT: The *USP30* gene fragments of WT HEK-293T; #1, #2, #3 indicate the amplified *USP30* gene fragments in pX459-sgRNA1 and pX459-sgRNA2 transfected cells (three replicate samples). B: The analysis of the products digested by the T7E1 endonuclease. Marker: DNA marker; WT: Negative control; #1, #2, #3 indicate the digested products of the amplified *USP30* gene fragments in pX459-sgRNA1 and pX459-sgRNA2 transfected cells (three replicate samples) by the T7E1 endonuclease.

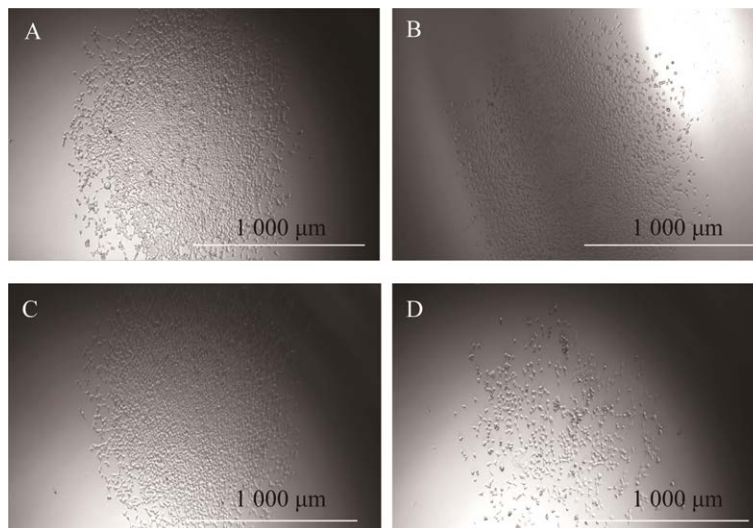


图 3 单克隆细胞筛选

Figure 3 The screening of monoclonal cells. A–D: Monoclonal cells.

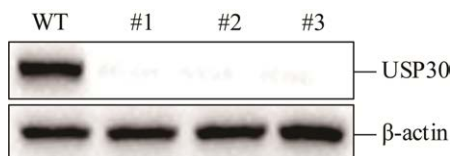


图 4 *USP30* 蛋白在单克隆细胞中表达的 Western blotting 检测

Figure 4 The expression of *USP30* in the monoclonal cell lines by Western blotting.

2.3 敲除 *USP30* 抑制 SVA 病毒的复制

在获得 *USP30* 基因敲除细胞系后, 开展了 *USP30* 蛋白对 SVA 病毒复制调控的研究。SVA-eGFP 分别感染野生型 HEK-293T 细胞和 *USP30*^{-/-} 细胞, 结果显示 *USP30*^{-/-} 细胞中 SVA 的复制显著降低(图 5A)。Western blotting 检测结果表

明, USP30^{-/-}细胞中 SVA VP2 蛋白的表达水平显著低于野生型细胞, 但回补 USP30 后, SVA VP2 蛋白的表达量显著上升(图 5B)。实时荧光定量 PCR 结果显示, USP30^{-/-}细胞感染 SVA 后, 病

毒的 mRNA 水平相比野生型细胞显著下调(图 5C)。表明 USP30 在 SVA 病毒复制过程中发挥重要作用, USP30 基因敲除后, 显著抑制 SVA 的复制。

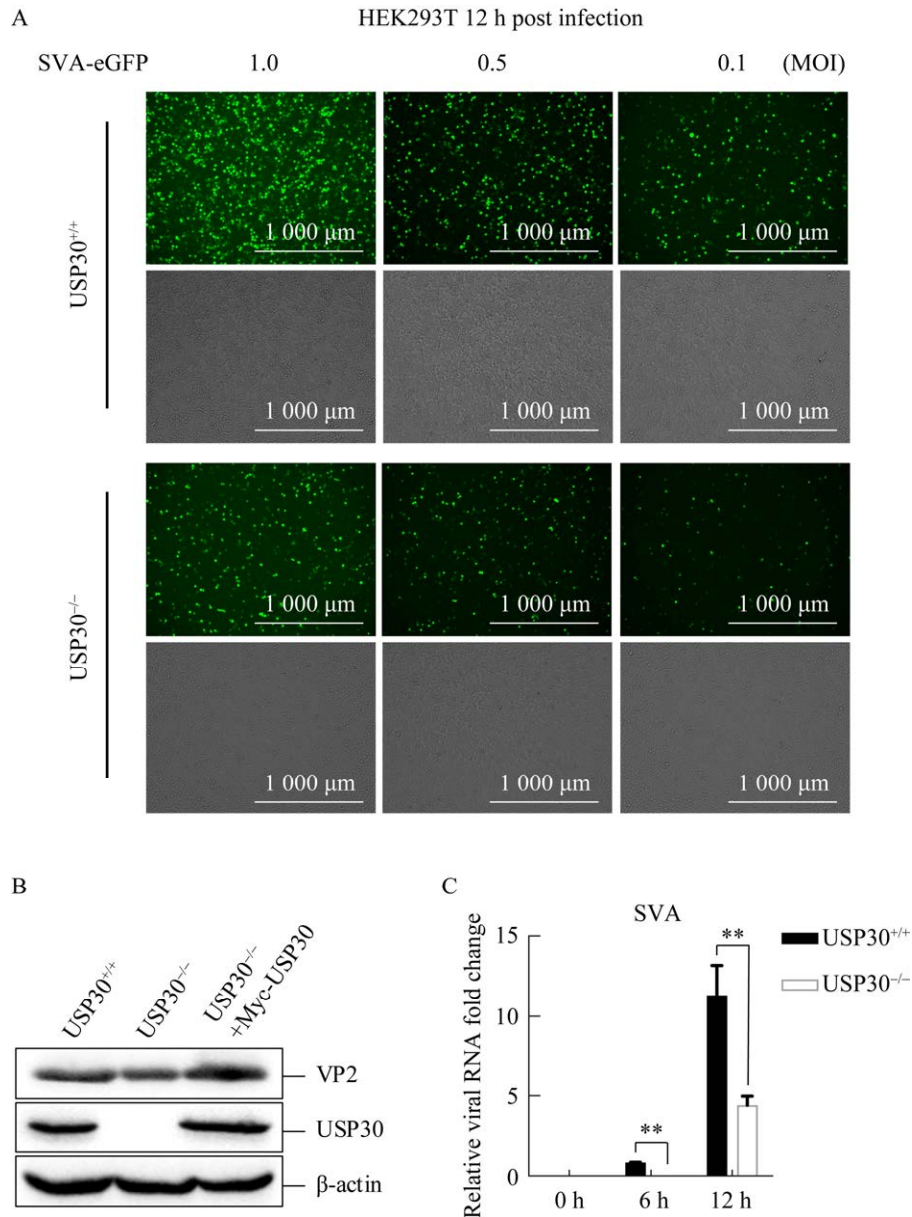


图 5 敲除 USP30 显著抑制 SVA 的复制

Figure 5 Knockout of USP30 significantly inhibited SVA replication in HEK-293T cells. A: The wild type HEK-293T and USP30^{-/-} cells were infected with 1.0, 0.5, or 0.1 MOI of SVA-eGFP for 12 h. B: The wild type HEK-293T and USP30^{-/-} cells were infected with SVA for 12 h, and the Western blotting detection of viral VP2 protein expression. C: The wild type HEK-293T and USP30^{-/-} cells were infected with SVA for 0, 6, or 12 h, and the SVA transcripts were detected by real time quantitative PCR. **: $P < 0.01$.

3 讨论与结论

CRISPR/Cas9 基因编辑技术与 ZNFs、TALENs 相比,具有编辑效率高、成本低、操作方便等诸多优点,已经成为应用最广泛的基因编辑技术。本研究采用 CRISPR/Cas9 技术成功构建了 *USP30* 基因敲除的 HEK-293T 细胞系。首先成功构建了 pX459-sgRNA 重组质粒,共转染 HEK-293T 细胞后,利用嘌呤霉素筛选出阳性细胞通过有限稀释法获得了备选单克隆细胞株,筛选出 *USP30* 基因发生了碱基缺失突变,Western blotting 也未检测到 *USP30* 蛋白表达的细胞株,成功获得了 *USP30* 基因敲除细胞系,为下一步研究 *USP30* 功能建立了稳定的细胞模型和工具。

USP30 作为 USP 去泛素化酶家族成员,是位于线粒体外膜上的跨膜 DUB,其功能研究主要集中在其对线粒体自噬的调节^[24-25,28]。作为去泛素化酶,*USP30* 在癌症中也发挥着重要作用。在 HCCs 小鼠中,*USP30* 含量丰富,而 *USP30* 缺失小鼠肿瘤结节减少,肿瘤负担降低,会减弱脂肪的生成与炎症和肿瘤的发生^[29]。*USP30* 还可以调节 BAX/BAK 依赖的细胞凋亡,*USP30* 的缺失可使癌细胞对 BH3 类似物敏感。*USP30* 可能不仅是治疗帕金森综合症的靶点,而且也是联合抗癌治疗的潜在靶点^[30]。但 *USP30* 对病毒复制的影响未曾有报道。本研究利用构建的 *USP30* 基因敲除细胞系对 *USP30* 基因在 SVA 感染过程中的作用进行探究。结果表明,与正常野生型 HEK-293T 细胞相比,*USP30*^{-/-}细胞中 SVA 表达量显著降低,表明敲除 *USP30* 基因能够显著抑制 SVA 在 HEK-293T 细胞中的复制,但在回补 *USP30* 后,SVA VP2 蛋白的表达量显著上升,说明其是抑制 SVA 感染复制的一个重要靶点。*USP30* 在调控 SVA 病毒复制过程中发挥

重要作用,但其在宿主抗病毒免疫应答中的机制仍不清楚,将利用构建的 *USP30* 基因敲除细胞系继续深入探究 *USP30* 促进 SVA 复制的分子机制。

综上所述,本研究通过 CRISPR/Cas9 基因编辑技术成功构建了 *USP30* 基因敲除的 HEK-293T 细胞系,为进一步揭示 *USP30* 相关免疫反应和 SVA 感染过程的作用机制提供了良好的细胞模型,也为开展宿主 *USP30* 蛋白调控病毒复制的机制研究提供了关键工具和一定的理论依据。

参考文献

- [1] KIANIANMOMENI A. Genome editing using engineered zinc finger nucleases[J]. Clinical Biochemistry, 2011, 44(13): S28.
- [2] 张金脉,任兆瑞. TALENs: 一种新的基因定点修饰技术[J]. 生命科学, 2013, 25(1): 126-132.
ZHANG JM, REN ZR. TALENs: a new genome site-specific modification technology[J]. Chinese Bulletin of Life Sciences, 2013, 25(1): 126-132 (in Chinese).
- [3] ZHANG QY, CHEN H, LIN Z, LIN JM. Chemiluminescence enzyme immunoassay based on magnetic nanoparticles for detection of hepatocellular carcinoma marker glypican-3[J]. Journal of Pharmaceutical Analysis, 2011, 1(3): 166-174.
- [4] CONG L, RAN FA, COX D, LIN S, BARRETTO R, HABIB N, HSU PD, WU X, JIANG W, MARRAFFINI LA, ZHANG F. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems[J]. Science, 2013, 339(6121): 819-823.
- [5] ZHANG F. CRISPR/Cas9: prospects and challenges[J]. Human Gene Therapy, 2015, 26(7): 409-410.
- [6] 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[J]. Journal of Bacteriology, 1987, 169(12): 5429-5433.
- [7] ZINOVIEVA NA, VOLKOVA NA, BAGIROV VA. Genome editing: state of the art and application to animal husbandry[J]. Biotechnologiya, 2018, 34(3): 9-22.

- [8] SAKUMA T, YAMAMOTO T. CRISPR/Cas9: the leading edge of genome editing technology[M]// Targeted Genome Editing Using Site-Specific Nucleases. Tokyo: Springer Japan, 2014: 25-41.
- [9] 荆耀彬, 汪伟, 张维琦, 刘光慧. CRISPR/Cas9 全基因组筛选在生命科学中的应用[J]. 生命科学, 2018, 30(9): 994-1002.
JING YB, WANG W, ZHANG WQ, LIU GH. Genome-scale CRISPR/Cas9 screen: a powerful tool for life science studies[J]. China Industrial Economics, 2018, 30(9): 994-1002 (in Chinese).
- [10] STERNBERG SH, HAURWITZ RE, DOUDNA JA. Mechanism of substrate selection by a highly specific CRISPR endoribonuclease[J]. RNA (New York, N Y), 2012, 18(4): 661-672.
- [11] 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[J]. Journal of Cellular Physiology, 2019, 234(8): 12267-12277.
- [12] 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[J]. Nature Biotechnology, 2015, 33(1): 102-106.
- [13] COLPITTS CC, LUPBERGER J, DOERIG C, BAUMERT TF. Host cell kinases and the hepatitis C virus life cycle[J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics, 2015, 1854(10): 1657-1662.
- [14] LIU X, WANG Q, PAN Y, WANG C. Sensing and responding to cytosolic viruses invasions: an orchestra of kaleidoscopic ubiquitinations[J]. Cytokine & Growth Factor Reviews, 2015, 26(3): 379-387.
- [15] HE MJ, ZHOU Z, SHAH AA, ZOU HJ, TAO J, CHEN QM, WAN Y. The emerging role of deubiquitinating enzymes in genomic integrity, diseases, and therapeutics[J]. Cell & Bioscience, 2016, 6(1): 1-15.
- [16] CAI JT, CULLEY MK, ZHAO YT, ZHAO J. The role of ubiquitination and deubiquitination in the regulation of cell junctions[J]. Protein & Cell, 2018, 9(9): 754-769.
- [17] BAILEY-ELKIN BA, KNAAP RCM, KIKKERT M, MARK BL. Structure and function of viral deubiquitinating enzymes[J]. Journal of Molecular Biology, 2017, 429(22): 3441-3470.
- [18] CHOU CK, CHANG YT, KORINEK M, CHEN YT, YANG YT, LEU S, LIN IL, TANG CJ, CHIU CC. The regulations of deubiquitinase USP15 and its pathophysiological mechanisms in diseases[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2017, 18(3): 483.
- [19] WANG YQ, SERRICCHIO M, JAUREGUI M, SHANBHAG R, STOLTZ T, DI PAOLO CT, KIM PK, MCQUIBBAN GA. Deubiquitinating enzymes regulate PARK2-mediated mitophagy[J]. Autophagy, 2015, 11(4): 595-606.
- [20] MARCASSA E, KALLINOS A, JARDINE J, RUSILOWICZ-JONES EV, CLAGUE MJ, URBÉ S. New aspects of USP30 biology in the regulation of pexophagy[J]. Autophagy, 2019, 15(9): 1634-1637.
- [21] RICCIO V, DEMERS N, HUA R, VISSA M, CHENG DT, STRILCHUK AW, WANG YQ, MCQUIBBAN GA, KIM PK. Deubiquitinating enzyme USP30 maintains basal peroxisome abundance by regulating pexophagy[J]. Journal of Cell Biology, 2019, 218(3): 798-807.
- [22] B BINGOL, M SHENG. Mechanisms of mitophagy: PINK1, parkin, USP30 and beyond[J]. Free Radical Biology and Medicine, 2016, 100: 210-222.
- [23] ZHANG RH, OZGEN S, LUO HK, KRIGMAN J, ZHAO YT, XIN G, SUN N. The mitochondrial deubiquitinase USP30 regulates AKT/mTOR signaling[J]. Frontiers in Pharmacology, 2022, 13: 816551.
- [24] MICHEL MA, SWATEK KN, HOSPENTHAL MK, KOMANDER D. Ubiquitin linkage-specific affimers reveal insights into K6-linked ubiquitin signaling[J]. Molecular Cell, 2017, 68(1): 233-246.e5.
- [25] CUNNINGHAM CN, BAUGHMAN JM, PHU L, TEA JS, YU C, COONS M, KIRKPATRICK DS, BINGOL B, CORN JE. USP30 and parkin homeostatically regulate atypical ubiquitin chains on mitochondria[J]. Nature Cell Biology, 2015, 17(2): 160-169.
- [26] GU L, ZHU YH, LIN X, LI YJ, CUI KS, PROCHOWNIK EV, LI YJ. Amplification of glyceronephosphate O-acyltransferase and recruitment of USP30 stabilize DRP1 to promote hepatocarcinogenesis[J]. Cancer Research, 2018, 78(20): 5808-5819.
- [27] 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[J]. Transboundary and Emerging Diseases, 2017, 64(4): 1024-1029.
- [28] BINGOL B, TEA JS, PHU L, REICHELT M, BAKALARSKI CE, SONG QH, FOREMAN O, KIRKPATRICK DS, SHENG M. The mitochondrial deubiquitinase USP30 opposes parkin-mediated mitophagy[J]. Nature, 2014, 510(7505): 370-375.
- [29] GU L, ZHU YH, LIN X, LU BJ, ZHOU XY, ZHOU F, ZHAO Q, PROCHOWNIK EV, LI YJ. The IKK β -USP30-ACLY axis controls lipogenesis and tumorigenesis[J]. Hepatology, 2020, 73(1): 160-174.
- [30] LIANG JR, MARTINEZ A, LANE JD, MAYOR U, CLAGUE MJ, URBÉ S. USP30 deubiquitylates mitochondrial Parkin substrates and restricts apoptotic cell death[J]. EMBO Reports, 2015, 16(5): 618-627.