

# 宿主 *ARF4* 和 *ARF5* 基因敲除小鼠的构建及其在寨卡病毒感染中的作用

邓考<sup>1,2#</sup>, 李明圆<sup>2,3#</sup>, 张惠莹<sup>1</sup>, 邓永强<sup>2</sup>, 秦源<sup>1</sup>, 秦成峰<sup>2\*</sup>

1 福建农林大学 生命科学学院, 福建 福州 350002

2 军事科学院军事医学研究院微生物流行病学研究所 病原微生物生物安全全国重点实验室, 北京 100071

3 香港中文大学 化学病理系 李嘉诚健康科学研究所, 香港 999077

邓考, 李明圆, 张惠莹, 邓永强, 秦源, 秦成峰. 宿主 *ARF4* 和 *ARF5* 基因敲除小鼠的构建及其在寨卡病毒感染中的作用[J]. 生物工程学报, 2024, 40(12): 4605-4615.

DENG Kao, LI Mingyuan, ZHANG Huiying, DENG Yongqiang, QIN Yuan, QIN Chengfeng. Characterization of host factors *ARF4* and *ARF5* upon Zika virus infection *in vivo* by construction of gene knockout mice[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(12): 4605-4615.

**摘要:** 本研究旨在构建宿主 ADP-核糖基化因子 4 (ADP-ribosylation factor 4, *ARF4*)和 ADP-核糖基化因子 5 (ADP-ribosylation factor 5, *ARF5*)基因敲除小鼠, 明确 *ARF4* 和 *ARF5* 基因对寨卡病毒感染的作用。首先利用 CRISPR-Cas9 技术, 获得 *ARF4* 和 *ARF5* 单基因敲除小鼠(*ARF4KO* 和 *ARF5KO*), 并通过杂交繁育获得双基因敲除小鼠(*ARF4KO/ARF5KO*), 通过 PCR 法鉴定小鼠基因型, 定量 RT-PCR 法检测目标基因的敲除效果。之后, 用寨卡病毒感染基因敲除小鼠, 采集第 2、4、6 天小鼠血液和各组织样本, 提取核酸后用 RT-qPCR 法检测病毒载量, 用 HE 染色观察组织病理变化。结果显示, 用 *ARF4* 和 *ARF5* 特异引物, 分别在 *ARF4KO*<sup>-/-</sup>、*ARF5KO*<sup>-/-</sup>以及 *ARF4KO*<sup>-/-</sup>/*ARF5KO*<sup>-/-</sup>小鼠扩增到与目标基因大小一致的条带。RT-qPCR 检测结果显示, *ARF4KO*<sup>-/-</sup>小鼠各组织中 *ARF4* mRNA 水平显著降低, 其敲除效率在 37.8%-50.0%之间, *ARF5* 表达水平无变化。*ARF5KO*<sup>-/-</sup>小鼠组织中 *ARF5* mRNA 完全敲除, *ARF4* 无变化。*ARF4KO*<sup>-/-</sup>/*ARF5KO*<sup>-/-</sup>小鼠在肺、肾和睾丸中 *ARF4* mRNA 水平显著降低, *ARF5* 完全敲除。最后, 用寨卡病毒分别感染基因敲除小鼠和野生型小鼠。结果显示, 与野生型小鼠相比, *ARF4KO*<sup>-/-</sup>小鼠在各时间点血清中病毒载量均显著下降, 但 *ARF5KO*<sup>-/-</sup>小鼠与 *ARF4KO*<sup>-/-</sup>/*ARF5KO*<sup>-/-</sup>小鼠无明显变化。同时, 与野生型小鼠相比, *ARF4KO*<sup>-/-</sup>小鼠各组织病毒载量没有显著降低, 但其大脑和睾丸的病理性改变减轻。本研究利用 CRISPR-Cas9 技术成功构建了 *ARF4* 和 *ARF5* 基因敲除小鼠, 并证实 *ARF4* 是寨卡病毒感染必需的宿主蛋白, 为

资助项目: 国家重点研发计划(2022YFC2303700); 国家自然科学基金(82172271)

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2022YFC2303700) and the National Natural Science Foundation of China (82172271).

#These authors contributed equally to this study.

\*Corresponding author. E-mail: qincf@bmi.ac.cn

Received: 2024-04-08; Accepted: 2024-07-08; Published online: 2024-07-11

后续深入研究 ARF4 和 ARF5 在寨卡病毒感染致病中的作用机制以及抗病毒药物研发奠定了基础。  
关键词: CRISPR-Cas9 技术; 基因敲除小鼠; ADP-核糖基化因子 4; ADP-核糖基化因子 5

## Characterization of host factors *ARF4* and *ARF5* upon Zika virus infection *in vivo* by construction of gene knockout mice

DENG Kao<sup>1,2#</sup>, LI Mingyuan<sup>2,3#</sup>, ZHANG Huiying<sup>1</sup>, DENG Yongqiang<sup>2</sup>, QIN Yuan<sup>1</sup>,  
QIN Chengfeng<sup>2\*</sup>

1 College of Life Sciences, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, Fujian, China

2 State Key Laboratory of Pathogen and Biosecurity, Institute of Microbiology and Epidemiology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071, China

3 Department of Chemical Pathology and Li Ka Shing Institute of Health Sciences, The Chinese University of Hong Kong, Hong Kong 999077, China

**Abstract:** The effects of host factors ADP-ribosylation factor 4 (ARF4) and ADP-ribosylation factor 5 (ARF5) upon Zika virus (ZIKV) infection *in vivo* were characterized by construction of gene knockout mice via CRISPR-Cas9. Firstly, *ARF5* and *ARF4* genes were modified by the CRISPR-Cas9 system and then microinjected into the fertilized eggs of C57BL/6JGpt mice. Fertilized eggs were transplanted to obtain *ARF4* or *ARF5* knockout (ARF4KO or ARF5KO) mice, and *ARF4/5* double knockout mice were achieved by the mating between ARF4KO and ARF5KO mice (ARF4KO/ARF5KO). Then, the mouse genotypes were identified by PCR to identify the positive knockout mice, and RT-qPCR was employed to examine the knockout efficiency. The mice were then infected with ZIKV and the blood and tissue samples were collected after 2, 4, and 6 days. RT-qPCR was then employed to determine the virus load, and hematoxylin-eosin staining was employed to observe the pathological changes in the tissue. The results showed that expected PCR bands were detected from ARF4KO<sup>-/+</sup>, ARF5KO<sup>-/-</sup>, and ARF4KO<sup>-/+</sup>/ARF5KO<sup>-/-</sup> mice, respectively. The results of mRNA transcription measurement indicated the significant knockdown of *ARF4* by 37.8%–50.0% but not *ARF5* in ARF4KO<sup>-/+</sup> compared with the wild-type mice. Meanwhile, complete knockout of *ARF5* and no changes in *ARF4* were observed in ARF5KO<sup>-/-</sup> mice. Additionally, completed knockout of *ARF5* and down-regulated mRNA level of *ARF4* in the lung, kidney, and testis were detected in ARF4KO<sup>-/+</sup>/ARF5KO<sup>-/-</sup> mice in comparison with the wild-type mice. The virus load in the serum decreased in ARF4KO<sup>-/+</sup> mice, while it showed no significant change in ARF5KO<sup>-/-</sup> or ARF4KO<sup>-/+</sup>/ARF5KO<sup>-/-</sup> mice compared with that in the wild type. Meanwhile, ARF4KO<sup>-/+</sup> mice showcased no significant difference in virus load in various tissues but attenuated pathological changes in the brain and testis compared with the wild-type mice. We successfully constructed ARF4KO and ARF5KO mice by CRISPR-Cas9 in this study. ARF4 rather than ARF5 is essential for ZIKV infection *in vivo*. This study provided animal models for studying the roles of ARF4 and ARF5 in ZIKV infection and developing antivirals.

**Keywords:** CRISPR-Cas9; gene knockout mice; ADP-ribosylation factor 4; ADP-ribosylation factor 5

病毒生命周期极大依赖于宿主,特别是与病毒感染关键的宿主蛋白。因此,发现关键宿主蛋白并阐明其与病毒的相互作用及其机制,对于理解病毒感染致病的分子机制以及抗病毒药物研发都具有非常重要的意义<sup>[1-3]</sup>。ADP-核糖基化因子(ADP-ribosylation factor, ARF)属于 Ras 超家族的小型 GTP 酶,已知的生物学功能主要是调控制细胞内囊泡运输和维持细胞器结构<sup>[4-5]</sup>。根据其氨基酸序列同源性,可将哺乳动物的 ARF 蛋白分为 3 类: I 类(ARF1-3)、II 类(ARF4-5)和 III 类(ARF6)。研究发现, ARF 蛋白能被病毒利用以帮助其完成细胞内的感染复制周期<sup>[6-10]</sup>。例如,小鼠肝炎冠状病毒和柯萨奇病毒被证实可劫持和操纵 ARF1 相关的信号通路<sup>[7,9]</sup>。而 II 类(ARF4-5)序列高度保守,生物学功能被认为是类似的且具有互补作用<sup>[11-12]</sup>。本课题组前期研究表明,利用 II 类 ARF 特异性的 siRNA 敲低细胞内 ARF4 和 ARF5 的表达可显著降低登革病毒子代病毒的释放<sup>[13]</sup>。近期,本课题组利用 CRISPR-Cas9 技术,成功获得了 ARF4 和 ARF5 完全敲除的细胞系,明确了 ARF4 而非 ARF5 是寨卡病毒的关键宿主因子(尚未发表)。然而, ARF4 和 ARF5 对寨卡病毒体内感染和致病性的影响尚不清楚。

基因敲除小鼠是研究某个特定基因功能的重要工具,其中, CRISPR-Cas9 技术是近年来高速发展成熟的最为先进的基因编辑技术,具有靶向精确性高、易操作、实验周期短、不受物种限制的特征<sup>[14-16]</sup>。目前,这项技术已经被成熟地应用于基因敲除、基因激活或者抑制以及高通量筛选方面,对包括小鼠、大鼠等实验动物以及人类的基因编辑均适用。

本研究首先利用 CRISPR-Cas9 技术,分别构建了 ARF4 和 ARF5 单基因和双基因敲除小鼠。然后,通过 PCR 鉴定 ARF4 和 ARF5 基因

敲除小鼠是否构建成功,通过 RT-qPCR 鉴定敲除小鼠组织中目标基因的敲除效果。最后,利用基因敲除小鼠进行寨卡病毒感染实验,通过 RT-qPCR 检测感染小鼠血清和组织中的病毒载量,并通过 HE 染色观察脑组织和睾丸中的病理变化,明确 ARF4 和 ARF5 在寨卡病毒体内感染中的作用。本研究的发现不仅为后续深入研究 ARF4 在寨卡病毒感染致病中的作用机制提供了重要线索,也为筛选宿主靶向的抗寨卡病毒药物提供了潜在靶标。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 实验动物

60 只 CRISPR-Cas9 基因编辑和对照组野生型小鼠,均为 C57BL/6JGpt 背景,2-3 周龄,体重约 10 g,由江苏集萃药康生物科技股份有限公司提供[SCXK(苏)2023-0009],在中国人民解放军军事科学院军事医学研究院实验动物中心进行繁育和饲养。饲养环境:昼夜各半循环照明,湿度恒定,温度控制在 22-25 °C。所有操作均符合军事医学研究院实验动物伦理委员会(动物伦理审批号: IACUC-IME-2022-051)要求。

#### 1.1.2 病毒

寨卡病毒 GZ01 株(GenBank 登录号: KU820898),由本实验室分离并于-80 °C 保存。使用 C6/36 细胞扩增,并用 Vero 细胞进行空斑滴定。

#### 1.1.3 主要试剂与仪器

2×Taq Master Mix、RNase-free ddH<sub>2</sub>O、1×TEA buffer 和 DL2000 marker 购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司, DNA/RNA 提取试剂盒购自西安天隆科技有限公司, One-step PrimeScript RT-PCR kit 购自 TaKaRa 公司。

凝胶电泳仪购自上海天能生物有限公司, GeneRotex 96 全自动核酸提取仪购自天隆科技有限公司, LightCycler 480 Real-time PCR system 购自 Roche 公司。

#### 1.1.4 引物和探针

PCR 和 RT-qPCR 检测所需引物使用 Oligo 软件设计, 由生工生物工程(上海)股份有限公司合成, 引物序列见表 1。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 基因敲除小鼠构建与繁殖

应用 CRISPR-Cas9 技术构建 *ARF4* 和 *ARF5* 基因敲除小鼠的实验方案如图 1 所示。具体操

作步骤如下: 首先, 将构建好的 *ARF4* 或 *ARF5* 靶向特异的 CRISPR-Cas9 载体体外转录成 gRNA, 将 gRNA 和 Cas9 混合后显微注射到 C57BL/6JGpt 小鼠受精卵的细胞质中, 再将受精卵移植到假孕的 C57BL/6 母鼠子宫中, 出生的 F0 代小鼠通过 PCR 验证敲除结果。然后, 将阳性 F0 代小鼠与野生型小鼠进行杂交, 经 PCR 鉴定获得稳定的阳性 F1 代杂合子小鼠。将 F1 代小鼠互相交配, 产生 F2 代小鼠, 经 PCR 鉴定获得稳定的纯合基因敲除(knockout, KO)小鼠。此外, 将 *ARF4* 和 *ARF5* 敲除阳性小鼠进行杂交, 经 PCR 鉴定获得 *ARF4* 和 *ARF5* 双敲阳性小鼠。

表 1 本研究所用引物和探针序列

Table 1 Primers and probes used in this study

Gene	Primer name	Sequence of primer (5'→3')	Product size (bp)
<i>ARF4</i>	ARF4 F1	GGACTTGGTGAGAATGCTTCTG	WT 7 656 bp
	ARF4 R1	CAGCCTAGGAACAACAGTATGGA	KO 307 bp
	ARF4 F2	GGCATCCTTAGCCACATAATGAG	WT 377 bp
	ARF4 R2	ACCGATGGTTTCTATCTGTGC	KO 0 bp
	ARF4 F3	CAGTATGGGATGTTGGTGGTCAA	125 bp
	ARF4 R3	AGCTGCTCCTTCTGGATTCTT	
<i>ARF5</i>	ARF5 F1	AGCAGGAATGTCGCTTTGAGCCTT	WT 1 223 bp
	ARF5 R1	TTCATTGCTGAACGTCAACACGG	KO 326 bp
	ARF5 F2	AGGATAAGATTCGGCCTCTGTGGC	WT 324 bp
	ARF5 R2	CCTGGTCTCACTTCTCCCATCTTGA	KO 0 bp
	ARF5 F3	TGTTGGAGGCCAGGATAAGATTC	130 bp
	ARF5 R3	CATCTTCTGGAGTTCATCAGCAGAC	
<i>NS5</i>	ZIKV-ASF	GGTCAGCGTCTCTCTAATAAACG	147 bp
	ZIKV-ASR	GCACCCTAGTGCCACTTTTTCC	
	ZIKV-Probe	FAM-AGCCATGACCGACACCACACCGT-BQ1	

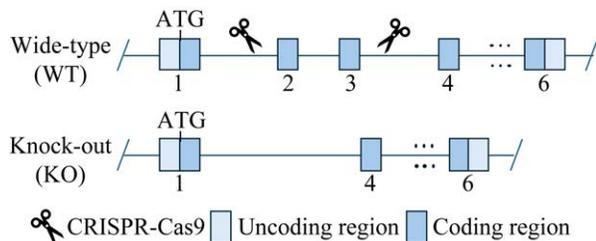


图 1 CRISPR-Cas9 介导的 *ARF4* 和 *ARF5* 敲除小鼠的构建策略

Figure 1 The schematic diagram of CRISPR-Cas9 mediated establishment of *ARF4* and *ARF5* constitutive knock-out (KO) mice.

#### 1.2.2 小鼠基因型 PCR 鉴定

待新生小鼠 2-3 周龄, 剪取少许鼠尾组织, 研磨后提取组织 DNA, 采用 PCR 法对基因型进行鉴定。PCR 扩增体系为 20  $\mu$ L, 引物序列见表 1。反应条件为: 94  $^{\circ}$ C 预变性 5-10 min; 95  $^{\circ}$ C 变性 30 s; 58  $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72  $^{\circ}$ C 延伸 60 s, 35-40 个循环; 72  $^{\circ}$ C 总延伸 7 min。使用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳鉴定 PCR 产物。

#### 1.2.3 小鼠组织靶基因 mRNA 水平检测

处死小鼠, 取脑、心、肝、脾、肺、肾和

睾丸(雄鼠),加入 1 mL 预冷的 PBS,低温研磨,4 °C、12 000 r/min 离心 2 min。取 100  $\mu$ L 上清,用 DNA/RNA 提取试剂盒和 GeneRotex 96 全自动核酸提取仪提取 RNA,分别用 *ARF4* 和 *ARF5* 特异引物 F3/R3 (表 1),采用 One-step PrimeScript RT-PCR kit 进行 RT-qPCR 检测。将 18  $\mu$ L 反应混合物与 2  $\mu$ L RNA 混合后置于 LightCycler 480 实时 PCR 系统。反应条件为:42 °C 5 min,95 °C 10 s;95 °C 5 s,60 °C 20 s,45 个循环,反应结束后进行分析,得出  $C_t$  值。

#### 1.2.4 寨卡病毒小鼠感染实验

随机挑选 4–6 周龄野生型或敲除小鼠进行寨卡病毒感染实验。首先,在病毒感染前 1 天,腹腔注射抗小鼠 I 型干扰素抗体(2 mg/只)。然后,经腹腔注射寨卡病毒 GZ01 株( $5 \times 10^5$  PFU/只),在感染后第 2、4 和 6 天分别眼眶采血和处死小鼠收集各组织,用 DNA/RNA 提取试剂盒提取 RNA,采用 One Step PrimeScript RT-PCR kit 进行 RT-qPCR 检测,引物序列见表 1。

#### 1.2.5 组织病理观察

在感染后第 6 天处死小鼠,取脑和睾丸(雄鼠),用 4%多聚甲醛固定,经水洗、脱水和石蜡包埋后进行切片,HE 染色后观察组织病理学变化。

#### 1.2.6 统计学分析

使用 GraphPad Prism 软件进行统计和分析,实验数据用平均值 $\pm$ 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,显著性差异采用 Student's unpaired *t*-test 或 Two-way ANOVA 进行分析显著性。\*:  $P < 0.05$ ; \*\*:  $P < 0.01$ ; \*\*\*:  $P < 0.001$ ; \*\*\*\*:  $P < 0.0001$ 。

## 2 结果与分析

### 2.1 *ARF4* 和 *ARF5* 单基因和双基因敲除小鼠基因型的鉴定

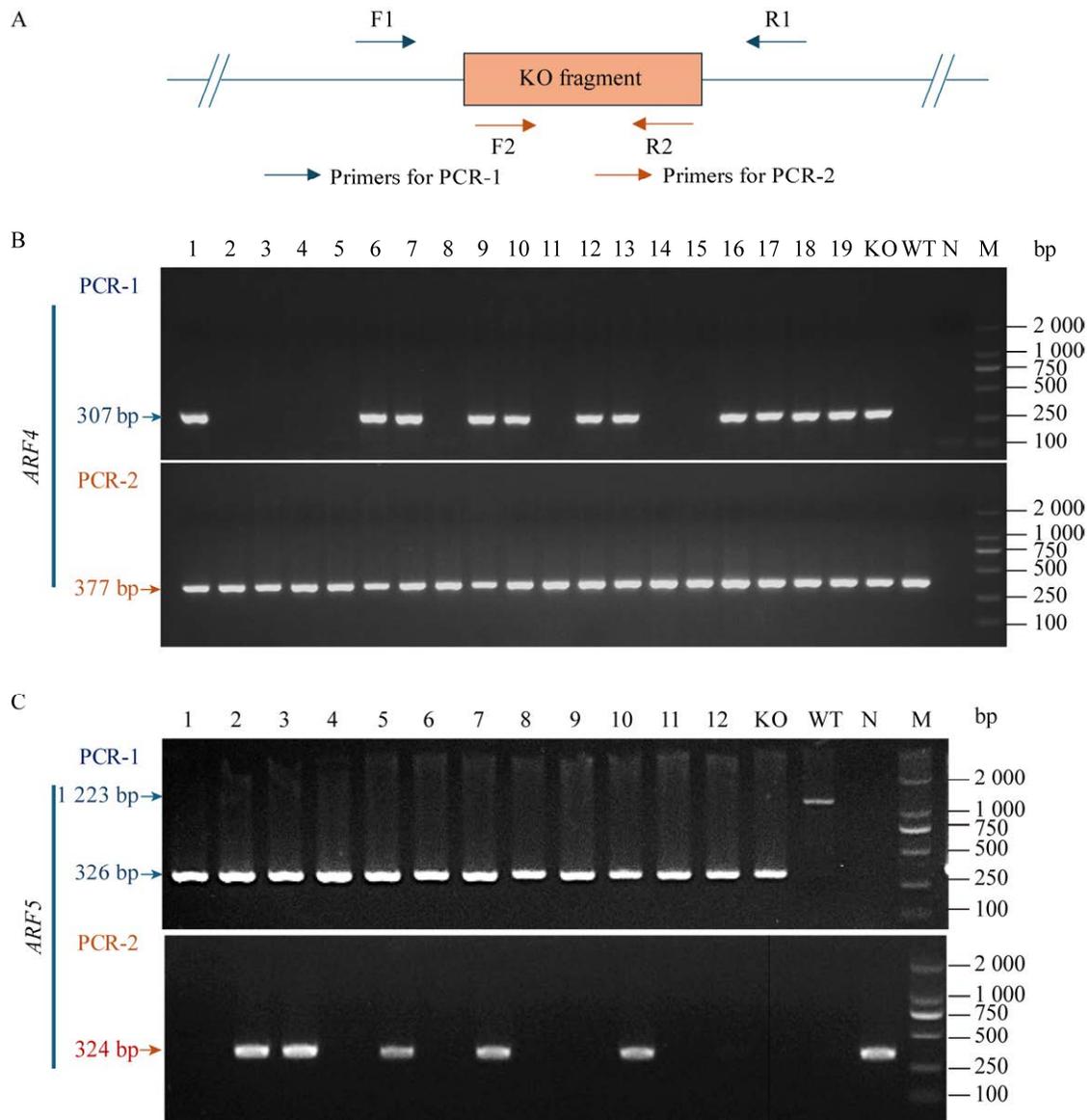
为鉴定 *ARF4* 和 *ARF5* 单基因敲除小鼠是否

构建成功,分别采用 *ARF4* 和 *ARF5* 特异引物进行 PCR 扩增,其中 PCR-1 含有被剪切片段,PCR-2 则在剪切片段内(图 2A)。如图 2B 所示,编号为 1、6–7、9–10、12–13 和 16–19 小鼠同时检测到了 PCR-1 和 PCR-2 片段,提示为 *ARF4* 杂合敲除小鼠(*ARF4KO*<sup>-/+</sup>),而其余小鼠仅能检测到 PCR-2 片段,不能检测到 PCR-1 片段,提示其为野生型小鼠,表明成功构建了 *ARF4* 杂合敲除小鼠。如图 2C 所示,编号为 2–5、7–8、10 和 12 小鼠只能检测 PCR-1 片段,不能检测到 PCR-2 片段,提示其为 *ARF5* 纯合敲除小鼠(*ARF5KO*<sup>-/-</sup>),而其余小鼠同时检测到 2 个片段,提示其为 *ARF5* 杂合敲除小鼠(*ARF5KO*<sup>-/+</sup>),表明同时成功构建了 *ARF5* 纯合敲除和杂合敲除小鼠。

为鉴定 *ARF4* 和 *ARF5* 双基因敲除小鼠是否构建成功,同时用 *ARF4* 和 *ARF5* 特异引物进行 PCR 鉴定(图 3A)。结果显示,编号为 11 和 15 为 *ARF4* 杂合敲除和 *ARF5* 纯合敲除小鼠(*ARF4KO*<sup>-/+</sup>/*ARF5KO*<sup>-/-</sup>),编号 1、4–7、10 和 12 是 *ARF4* 杂合敲除和 *ARF5* 杂合敲除小鼠(*ARF4KO*<sup>-/+</sup>/*ARF5KO*<sup>-/+</sup>),编号 9、13 和 14 是 *ARF5* 纯合敲除小鼠(*ARF5KO*<sup>-/-</sup>),而其余的是 *ARF5* 杂合敲除小鼠(*ARF5KO*<sup>-/+</sup>) (图 3B),表明成功构建了 *ARF4* 和 *ARF5* 基因双敲除小鼠。

### 2.2 敲除小鼠 *ARF4* 和 *ARF5* 基因敲除效果的检测

为评价敲除小鼠 *ARF4* 和 *ARF5* 基因的敲除效果,分别挑选 3 只 4–6 周龄的 *ARF4KO*<sup>-/+</sup>、*ARF5KO*<sup>-/-</sup> 和 *ARF4KO*<sup>-/+</sup>/*ARF5KO*<sup>-/-</sup> 和野生型小鼠,取脑、心、肝、脾、肺、肾和睾丸(雄鼠),提取 RNA 后用 *ARF4* 和 *ARF5* 特异引物分别对其 mRNA 转录水平进行 RT-qPCR 检测。如图 4A 所示,与野生型小鼠相比,*ARF4KO*<sup>-/+</sup> 小鼠在各组织中的 *ARF4* mRNA 水平均下降。其中,



**图 2** *ARF4* 和 *ARF5* 敲除小鼠基因型 PCR 鉴定结果 A: 基因型鉴定策略示意图. 野生型: F1/R1 引物 PCR 扩增得 1 条 WT 条带; F2/R2 引物 PCR 扩增得 1 条 WT 条带. 杂合: F1/R1 引物 PCR 扩增得 1 条 KO 条带; F2/R2 引物 PCR 扩增得 1 条 WT 条带. 纯合: F1/R1 引物 PCR 扩增得 1 条 KO 条带; F2/R2 引物 PCR 扩增无任何条带. B: *ARF4* 杂合敲除小鼠鉴定结果. C: *ARF5* 纯合敲除小鼠鉴定结果. KO 为阳性对照, WT 为野生型对照, N 为阴性对照, M 为 DNA marker

**Figure 2** Genotype identification of *ARF4* and *ARF5* KO mice by PCR. A: The schematic diagram of genotyping strategy. Wild type: PCR reaction with primers-F1/R1 obtains a single WT band; PCR reaction with primers-F2/R2 obtains a single WT band; Heterozygote: PCR reaction with primers-F1/R1 obtains a WT band and a KO band; PCR reaction with primers-F2/R2 obtains a WT band; Homozygote: PCR reaction with primers-F1/R1 obtains a single KO band; PCR reaction with primers-F2/R2 without product. B: Genotype results of *ARF4* KO mice. C: Genotype results of *ARF5* KO mice. KO: Positive control; WT: Wild-type control; N: Negative control; M: DNA marker.

睾丸的最为明显, 仅为原来的 37.8%, 其他组织也降低至原来的 50.0% 左右。而 *ARF5* mRNA 水平没有变化, 表明 *ARF4*KO<sup>-/-</sup> 小鼠可特异性地敲低 *ARF4* 基因。同样, 如图 4B 所示, 与野生型小鼠相比, *ARF5*KO<sup>-/-</sup> 小鼠的各组织中基本检测不到 *ARF5* mRNA, 而 *ARF4* mRNA 水平没有改

变, 表明 *ARF5*KO<sup>-/-</sup> 小鼠的 *ARF5* 基因可特异性地完全敲除。最后, *ARF4*KO<sup>-/-</sup>/*ARF5*KO<sup>-/-</sup> 小鼠的 *ARF4* mRNA 水平在肺、肾和睾丸中显著性下降, 而 *ARF5* mRNA 在各组织中基本检测不到 (图 4C)。上述结果表明, 各基因敲除小鼠能在组织中显著降低了 *ARF4* 和 *ARF5* mRNA 水平。

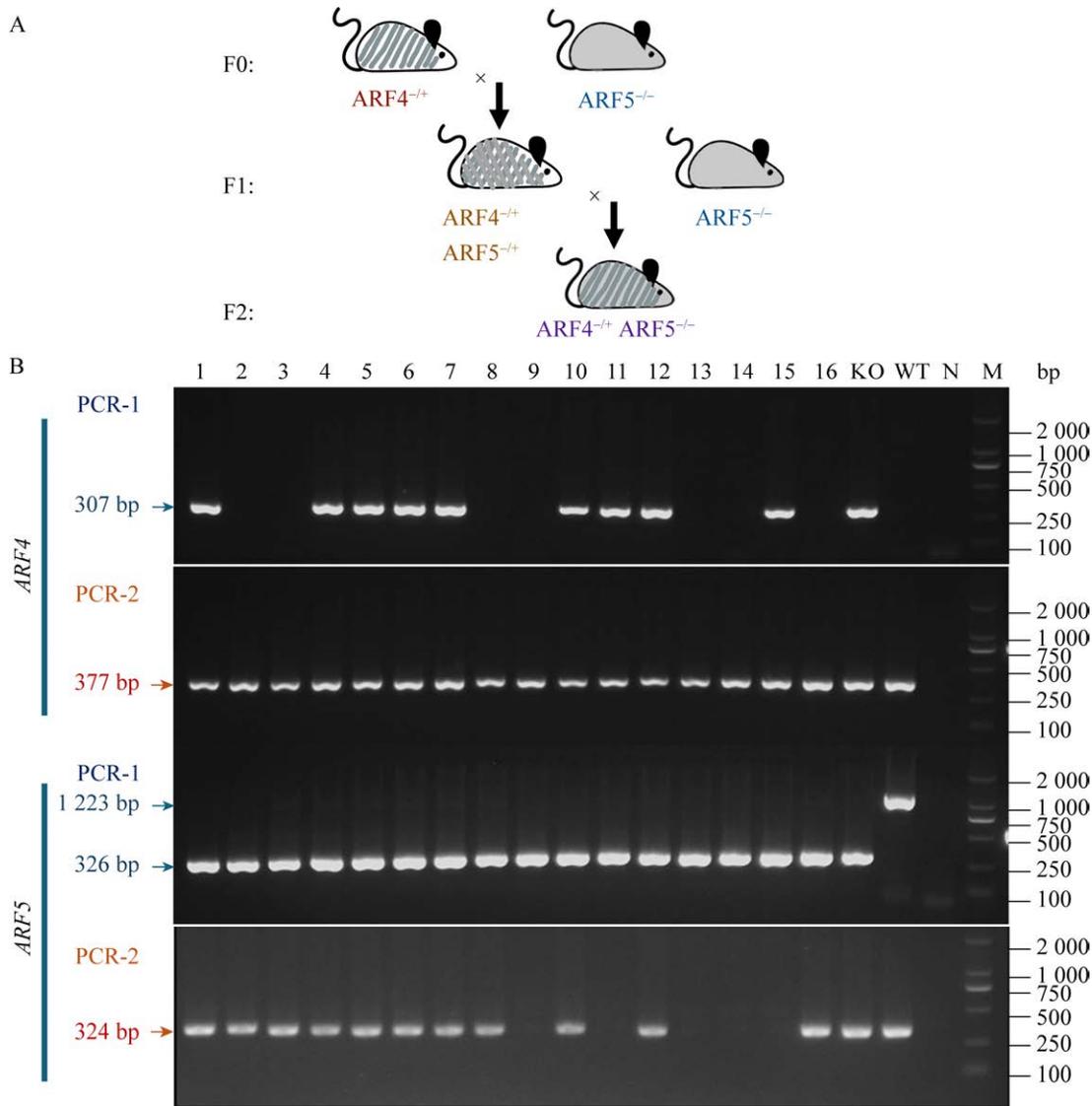


图 3 *ARF4* 和 *ARF5* 双基因敲除小鼠的繁育和基因型 PCR 鉴定结果 A: *ARF4* 和 *ARF5* 双敲除小鼠的繁育示意图。B: *ARF4* 和 *ARF5* 双敲除小鼠基因型 PCR 鉴定结果。KO 为阳性对照, WT 为野生型对照, N 为阴性对照, M 为 DNA marker

Figure 3 Genotype identification of *ARF4*KO/*ARF5*KO mice by PCR. A: The schematic diagram of genotyping strategy. B: Genotype results of *ARF4*KO/*ARF5*KO mice. KO: Positive control; WT: Wild-type control; N: Negative control. M: DNA marker.

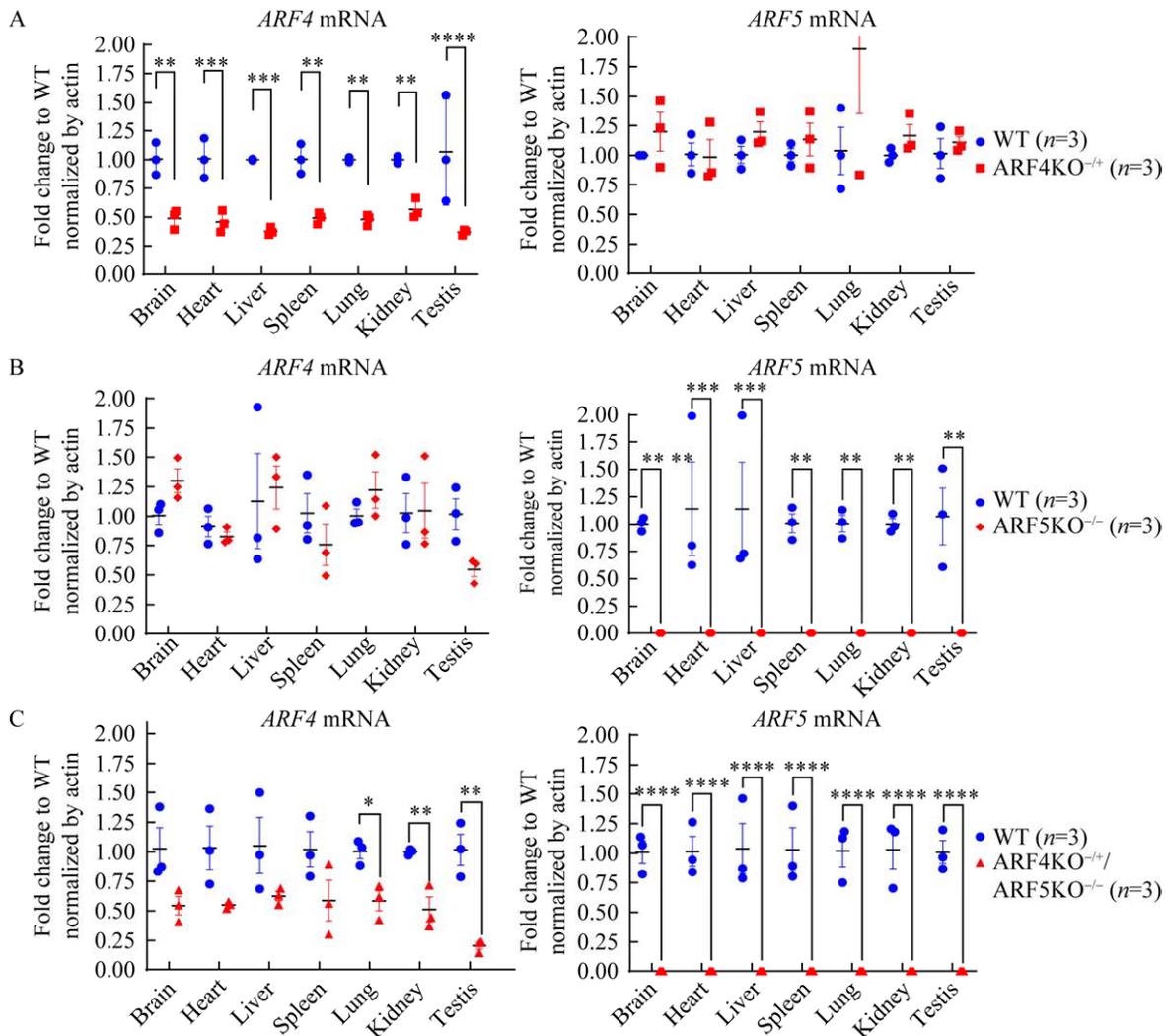


图4 基因敲除小鼠组织 *ARF4* 和 *ARF5* mRNA 的 RT-qPCR 检测结果 A: *ARF4*KO<sup>-/-</sup> 小鼠组织 *ARF4* 和 *ARF5* mRNA 的 RT-qPCR 检测结果. B: *ARF5*KO<sup>-/-</sup> 小鼠组织 *ARF4* 和 *ARF5* mRNA 的 RT-qPCR 检测结果. C: *ARF4*KO<sup>-/+</sup>/*ARF5*KO<sup>-/-</sup> 小鼠组织 *ARF4* 和 *ARF5* mRNA 的 RT-qPCR 检测结果. 实验数据用平均值±标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 显著性差异采用 Student's unpaired *t*-test. \*:  $P < 0.05$ ; \*\*:  $P < 0.01$ ; \*\*\*:  $P < 0.001$ ; \*\*\*\*:  $P < 0.0001$

Figure 4 Detection of *ARF4* and *ARF5* mRNA levels in multiple tissues of KO mice by quantitative RT-PCR. A: Detection of *ARF4* and *ARF5* mRNA levels in *ARF4*KO<sup>-/-</sup> mice by quantitative RT-PCR. B: Detection of *ARF4* and *ARF5* mRNA levels in multiple tissues of *ARF5*KO<sup>-/-</sup> mice by quantitative RT-PCR. C: Detection of *ARF4* and *ARF5* mRNA levels in *ARF4*KO<sup>-/+</sup>/*ARF5*KO<sup>-/-</sup> by quantitative RT-PCR. All data were expressed as  $\bar{x} \pm s$ , Student's *t*-test was performed to analyze the significance. \*:  $P < 0.05$ ; \*\*:  $P < 0.01$ ; \*\*\*:  $P < 0.001$ ; \*\*\*\*:  $P < 0.0001$ .

### 2.3 *ARF4* 和 *ARF5* 基因敲除抑制寨卡病毒感染效果评价

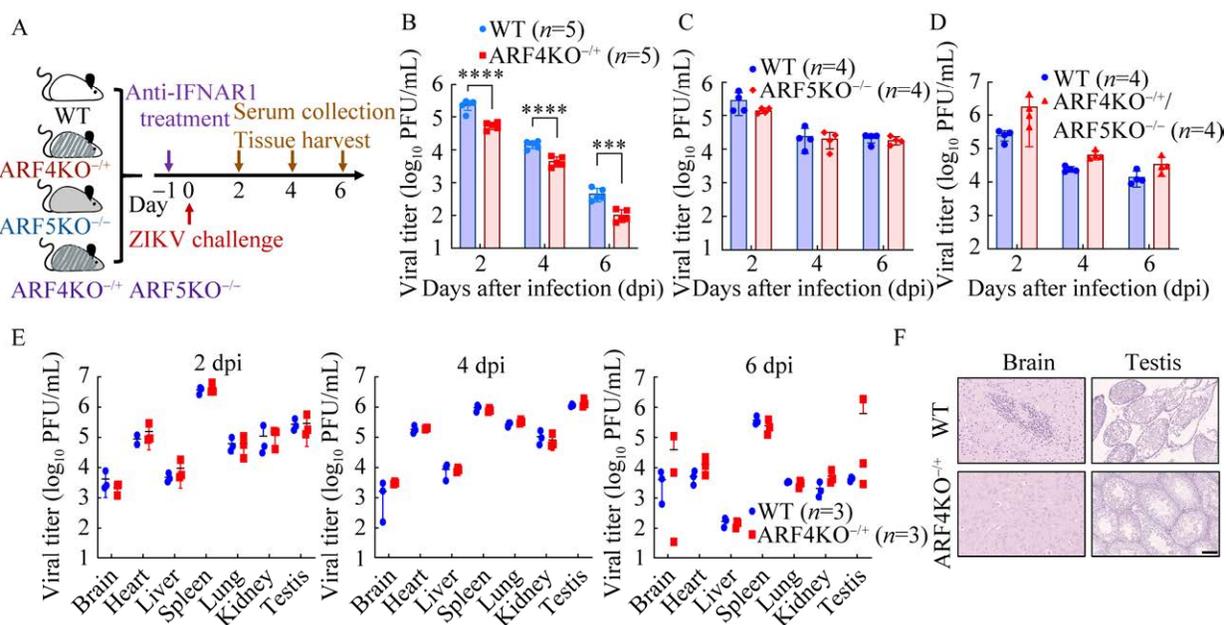
为观察 *ARF4* 和 *ARF5* 基因敲除对寨卡病毒

感染的影响, 将寨卡病毒分别感染 *ARF4*KO<sup>-/+</sup>、*ARF5*KO<sup>-/-</sup>、*ARF4*KO<sup>-/+</sup>/*ARF5*KO<sup>-/-</sup> 和野生型小鼠, 检测攻毒后血清中的病毒载量(图 5A)。

RT-qPCR 结果显示, 与野生型小鼠相比, *ARF4KO*<sup>-/-</sup>小鼠血清中的病毒载量在第 2、4 和 6 天分别下降了 76.8%、68.9%和 77.5% (图 5B), 而 *ARF5KO*<sup>-/-</sup>和 *ARF4KO*<sup>-/-</sup>/*ARF5KO*<sup>-/-</sup>小鼠血清中的病毒载量则无明显下降(图 5C 和 5D), 表明 *ARF4* 基因敲除可显著抑制寨卡病毒在小鼠体内感染, 而 *ARF5* 基因敲除则没有影响。

分别对感染后第 2、4 和 6 天的野生型小鼠和 *ARF4KO*<sup>-/-</sup>小鼠进行解剖, RT-qPCR 检测各组织中的病毒载量。结果显示, 与野生型小鼠

相比, *ARF4KO*<sup>-/-</sup>小鼠各组织中的病毒载量没有明显变化(图 5E)。最后, 对感染后第 6 天的脑和睾丸进行 HE 染色。结果显示, 与野生型小鼠相比, *ARF4* 基因敲除可以缓解由寨卡病毒感染引起的病理性变化, 如大脑内的炎症细胞浸润和睾丸内部分生精小管结构性破坏和生精小管被渗出物充盈(图 5F)。上述结果表明, 尽管 *ARF4* 基因敲除没有降低小鼠组织中的病毒载量, 但仍然可缓解由寨卡病毒感染引起的脑和睾丸病理性变化。



**图 5** 寨卡病毒感染基因敲除小鼠的检测结果 A: 寨卡病毒感染小鼠及检测示意图. B-D: 基因敲除小鼠病毒血症的 RT-qPCR 检测结果. E: *ARF4* 基因敲除小鼠组织病毒载量的 RT-qPCR 检测结果. F: *ARF4* 基因敲除小鼠感染第 6 天脑和睾丸的 HE 染色结果. 标尺为 100  $\mu\text{m}$ . 实验数据用平均值 $\pm$ 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示, 显著性差异采用 two-way ANOVA 进行分析显著性. \*:  $P < 0.05$ ; \*\*:  $P < 0.01$ ; \*\*\*:  $P < 0.001$ ; \*\*\*\*:  $P < 0.0001$

**Figure 5** Detection of ZIKV infection in KO mice. A: Schematic diagram of the experimental design. B-D: Detection of viremia of WT and KO mice at 2, 4, and 6 dpi by quantitative RT-PCR. E: Detection of viral load in various tissue of WT and *ARF4KO*<sup>-/-</sup> mice at 2, 4, and 6 dpi by quantitative RT-PCR. F: HE staining of ZIKV infected brain and testis collected from WT and *ARF4KO*<sup>-/-</sup> mice at 6 dpi. Scale bar=100  $\mu\text{m}$ . All data were expressed as  $\bar{x} \pm s$ , two-way ANOVA was performed to analyze the significance. \*:  $P < 0.05$ ; \*\*:  $P < 0.01$ ; \*\*\*:  $P < 0.001$ ; \*\*\*\*:  $P < 0.0001$ .

### 3 讨论与结论

本研究成功获得 *ARF4* 和 *ARF5* 基因特异性敲除小鼠, 且基因型鉴定结果显示基因敲除达到预期效果, 这表明 CRISPR-Cas9 技术可以准确地对目标基因进行剪切, 而对高度同源的非目标基因没有影响。然而, 本研究并没有获得 *ARF4* 基因敲除纯合小鼠, 这与此前报道的使用其他方法进行 *ARF4* 敲除的结果相一致<sup>[17]</sup>, 原因可能是纯合敲除会导致小鼠胚胎死亡。在敲除效果方面, *ARF5KO*<sup>-/-</sup> 小鼠各组织中几乎可以完全敲除, 而 *ARF4KO*<sup>-/+</sup> 小鼠的则只能敲低 38%–50% 左右。因此, 为了更好地达到完全敲除, 下一步可以尝试采用 Cre/LoxP 系统构建诱导型基因敲除小鼠<sup>[18]</sup>, 该技术可在小鼠出生后通过注射诱导剂的方式进行基因敲除, 从而避免了因胚胎死亡而得不到基因敲除纯合小鼠。此外, CRISPR-Cas9 技术有潜在的脱靶风险, 虽然在设计 *ARF4* 和 *ARF5* sgRNA 时规避了有潜在脱靶风险的序列, 但后续还需要经过基因检测的方式确定敲除小鼠基因组其他位置有没有出现碱基减少、突变或移码等异常, 从而确认 *ARF4* 和 *ARF5* 基因敲除小鼠 sgRNA 没有发生脱靶, *ARF4* 和 *ARF5* 基因敲除是特异性的, 以更好地为之后的研究提供实验证据支持。

体外感染实验结果显示, 寨卡病毒对 CRISPR-Cas9 介导的 *ARF4* 敲除细胞内子代病毒的释放量在第 2、6 天显著性下降了 99%–99.99%。因此, 本研究又利用构建好的基因敲除小鼠模型评价了 *ARF* 敲除对寨卡病毒感染的影响。结果显示, 寨卡病毒对 *ARF4* 敲除杂合小鼠感染明显减弱, 而对 *ARF5* 敲除纯合小鼠的感染没有影响, 该结果与体外感染实验的结果相一致。但与体外感染结果相比, 血清中病毒载量降低不多, 组织中病毒载量无明显降低, 这可能与

*ARF4* 基因没有在敲除小鼠各组织内完全敲除有关。然而, *ARF4* 基因敲除仍然能够缓解由寨卡病毒感染引起的脑组织和睾丸病理性变化。令人意外的是, *ARF4* 和 *ARF5* 共同敲除对病毒感染没有影响, 这可能与 *ARF4* 在双敲小鼠内的敲除效率不如单敲小鼠的有关, 导致大脑、心、肝和脾脏在内的寨卡病毒靶器官的 *ARF4* 转录水平明显没有下降。

细胞内不同亚细胞器之间的囊泡运输是胞内蛋白和脂质交换的主要方式, 也是通过内吞、吞噬、胞吐和分泌等方式进行细胞间物质交换的重要途径<sup>[19-20]</sup>。囊泡运输无疑在病毒胞内感染复制周期, 特别是进入和释放这两个重要感染过程中起到了关键性的作用<sup>[21]</sup>。病毒被认为可以劫持并调控细胞囊泡分选过程, 为其有效进入和正确释放提供保障<sup>[21-23]</sup>。ARF 家族是召集囊泡成分并决定其运送目的地的重要调控蛋白, 前期的体外研究已证明了 ARF 家族参与了一系列高致病性病毒的胞内感染过程<sup>[6-10,13]</sup>。但由于目前缺乏合适的动物模型, ARF 家族对病毒体内感染和致病性的影响尚不清楚, 因此阻碍了以 ARF 为靶标的抗病毒药物的研发。本研究构建的 *ARF4* 和 *ARF5* 单敲和双敲小鼠有望协助解决这一难题。未来将利用这些基因敲除小鼠构建登革、流感和新冠病毒的动物模型, 进一步明确 *ARF4* 和 *ARF5* 在病毒侵染、组织嗜性和致病上的作用。

总之, 本研究首次利用 CRISPR-Cas9 技术构建了 *ARF4* 和 *ARF5* 基因敲除小鼠, 并进一步验证了 *ARF4* 基因在寨卡病毒体内感染中作用, 为今后研究 *ARF4* 在病毒感染致病中的作用机制以及抗病毒药物研发提供了动物模型。

### REFERENCES

- [1] ZUR WIESCH PA, KOUYOS R, ENGELSTÄDTER J, REGOES RR, BONHOEFFER S. Population biological principles of drug-resistance evolution in infectious

- diseases[J]. *The Lancet Infectious Diseases*, 2011, 11(3): 236-247.
- [2] NAGY PD, POGANY J. The dependence of viral RNA replication on co-opted host factors[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2012, 10(2): 137-149.
- [3] LIN K, GALLAY P. Curing a viral infection by targeting the host: the example of cyclophilin inhibitors[J]. *Antiviral Research*, 2013, 99(1): 68-77.
- [4] DONALDSON JG, JACKSON CL. ARF family G proteins and their regulators: roles in membrane transport, development and disease[J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2011, 12(6): 362-375.
- [5] D'SOUZA-SCHOREY C, CHAVRIER P. ARF proteins: roles in membrane traffic and beyond[J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2006, 7(5): 347-358.
- [6] LANKE KHW, van der SCHAAR HM, BELOV GA, FENG Q, DUIJSINGS D, JACKSON CL, EHRENFELD E, van KUPPEVELD FJM. GBF1, a guanine nucleotide exchange factor for Arf, is crucial for coxsackievirus B3 RNA replication[J]. *Journal of Virology*, 2009, 83(22): 11940-11949.
- [7] DOROBANTU CM, van der SCHAAR HM, FORD LA, STRATING JRPM, ULFERTS R, FANG Y, BELOV G, van KUPPEVELD FJM. Recruitment of PI4KIII $\beta$  to coxsackievirus B3 replication organelles is independent of ACBD3, GBF1, and Arf1[J]. *Journal of Virology*, 2014, 88(5): 2725-2736.
- [8] KACZMAREK B, VERBAVATZ JM, JACKSON CL. GBF1 and Arf1 function in vesicular trafficking, lipid homeostasis and organelle dynamics[J]. *Biology of the Cell*, 2017, 109(12): 391-399.
- [9] LEBSIR N, GOUESLAIN L, FARHAT R, CALLENS N, DUBUISSON J, JACKSON CL, ROUILLÉ Y. Functional and physical interaction between the arf activator GBF1 and hepatitis C virus NS3 protein[J]. *Journal of Virology*, 2019, 93(6): e01459-e01418.
- [10] VERHEIJE MH, RAABEN M, MARI M, TE LINTELO EG, REGGIORI F, van KUPPEVELD FJM, ROTTIER PJM, de HAAN CAM. Mouse hepatitis coronavirus RNA replication depends on GBF1-mediated ARF1 activation[J]. *PLoS Pathogens*, 2008, 4(6): e1000088.
- [11] CHUN J, SHAPOVALOVA Z, DEJGAARD SY, PRESLEY JF, MELANÇON P. Characterization of class I and II ADP-ribosylation factors (Arfs) in live cells: GDP-bound class II Arfs associate with the ER-Golgi intermediate compartment independently of GBF1[J]. *Molecular Biology of the Cell*, 2008, 19(8): 3488-3500.
- [12] DUIJSINGS D, LANKE KHW, van DOOREN SHJ, van DOMMELEN MMT, WETZELS R, de MATTIA F, WESSELS E, van KUPPEVELD FJM. Differential membrane association properties and regulation of class I and class II Arfs[J]. *Traffic*, 2009, 10(3): 316-323.
- [13] KUDELKO M, BRAULT JB, KWOK K, LI MY, PARDIGON N, PEIRIS JSM, BRUZZONE R, DESPRÈS P, NAL B, WANG PG. Class II ADP-ribosylation factors are required for efficient secretion of dengue viruses[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2012, 287(1): 767-777.
- [14] RAN FA, HSU PD, WRIGHT J, AGARWALA V, SCOTT DA, ZHANG F. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system[J]. *Nature Protocols*, 2013, 8: 2281-2308.
- [15] MOJICA FJ, JUEZ G, RODRÍGUEZ-VALERA F. Transcription at different salinities of *Haloflex mediterranei* sequences adjacent to partially modified PstI sites[J]. *Molecular Microbiology*, 1993, 9(3): 613-621.
- [16] ISHINO Y, KRUPOVIC M, FORTERRE P. History of CRISPR-cas from encounter with a mysterious repeated sequence to genome editing technology[J]. *Journal of Bacteriology*, 2018, 200(7): e00580-17.
- [17] HOSOI N, SHIBASAKI K, HOSONO M, KONNO A, SHINODA Y, KIYONARI H, INOUE K, MURAMATSU SI, ISHIZAKI Y, HIRAI H, FURUICHI T, SADAKATA T. Deletion of class II ADP-ribosylation factors in mice causes tremor by the Nav1.6 loss in cerebellar Purkinje cell axon initial segments[J]. *The Journal of Neuroscience*, 2019, 39(32): 6339-6353.
- [18] RAY MK, FAGAN SP, BRUNICARDI FC. The Cre-loxP system: a versatile tool for targeting genes in a cell- and stage-specific manner[J]. *Cell Transplantation*, 2000, 9(6): 805-815.
- [19] BONIFACINO JS, GLICK BS. The mechanisms of vesicle budding and fusion[J]. *Cell*, 2004, 116(2): 153-166.
- [20] MELLMAN I, WARREN G. The road taken: past and future foundations of membrane traffic[J]. *Cell*, 2000, 100(1): 99-112.
- [21] ROTH AN, ARAVAMUDHAN P, FERNÁNDEZ DE CASTRO I, TENORIO R, RISCO C, DERMODY TS. Ins and outs of reovirus: vesicular trafficking in viral entry and egress[J]. *Trends in Microbiology*, 2021, 29(4): 363-375.
- [22] HASSAN Z, KUMAR ND, REGGIORI F, KHAN G. How viruses hijack and modify the secretory transport pathway[J]. *Cells*, 2021, 10(10): 2535.
- [23] COLLIER KE, HEATON NS, BERGER KL, COOPER JD, SAUNDERS JL, RANDALL G. Molecular determinants and dynamics of hepatitis C virus secretion[J]. *PLoS Pathogens*, 2012, 8(1): e1002466.

(本文责编 郝丽芳)