

王金玉,上官爱哨,孙玉梅,等. *IL20RB*、*ATP6V0A1*和*STX10*基因对PRRSV和PEDV的增殖作用[J]. 华中农业大学学报, 2022, 41(2): 176-184.  
DOI: 10.13300/j.cnki.hnlkxb.2022.02.021

## *IL20RB*、*ATP6V0A1*和*STX10*基因对PRRSV 和PEDV的增殖作用

王金玉,上官爱哨,孙玉梅,蒋金河,刘忠柱,张淑君

华中农业大学动物科学技术学院与动物医学院, 武汉 430070

**摘要** 为了明确*IL20RB*、*ATP6V0A1*和*STX10*基因对猪繁殖与呼吸综合征病毒(porcine reproductive and respiratory syndrome virus, PRRSV)和猪流行性腹泻病毒(porcine epidemic diarrhea virus, PEDV)的增殖作用,利用CRISPR/Cas9技术在PK15-CD163-Cas9细胞和IPEC-J2-Cas9细胞(笔者所在实验室前期制备)中分别敲除这3个基因,用PRRSV感染基因敲除的3种细胞(PK15-CD163-Cas9-*ATP6V0A1*、PK15-CD163-Cas9-*IL20RB*和PK15-CD163-Cas9-*STX10*),荧光定量PCR检测PRRSV的*ORF7*基因表达水平,分析PRRSV增殖情况;用PEDV感染基因敲除的3种细胞(IPEC-J2-Cas9-*ATP6V0A1*、IPEC-J2-Cas9-*IL20RB*和IPEC-J2-Cas9-*STX10*),荧光定量PCR检测PEDV的N蛋白基因表达水平,分析PEDV增殖情况。结果显示,在3个基因分别被敲除的PK15-CD163-Cas9-*ATP6V0A1*、PK15-CD163-Cas9-*IL20RB*和PK15-CD163-Cas9-*STX10*细胞中病毒基因*ORF7*表达水平均显著低于未敲除基因的细胞(PK15-CD163-Cas9-NC, 对照组),在3个基因分别被敲除的IPEC-J2-Cas9-*ATP6V0A1*、IPEC-J2-Cas9-*IL20RB*和IPEC-J2-Cas9-*STX10*细胞中PEDV的N蛋白基因表达水平均显著低于未敲除基因的细胞(IPEC-J2-Cas9-NC, 对照组),表明敲除这3个基因对PRRSV和PEDV增殖均具有显著的抑制作用,*ATP6V0A1*、*IL20RB*和*STX10*对PRRSV和PEDV增殖均具有重要调控作用。

**关键词** 基因敲除; CRISPR/Cas9技术; 猪繁殖与呼吸综合征病毒; 猪流行性腹泻病毒

**中图分类号** S855.3 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2022)02-0176-09

猪繁殖与呼吸综合征(porcine reproductive and respiratory syndrome, PRRS)又称蓝耳病,是由猪繁殖与呼吸综合征病毒(PRRS virus, PRRSV)感染而引起的严重病毒性传染病。猪流行性腹泻(porcine epidemic diarrhea, PED)是一种由猪流行性腹泻病毒(porcine epidemic diarrhea virus, PEDV)感染引起的猪肠道病毒性疾病。这2种疾病都具有高发病率、高死亡率、能感染任何年龄及生产阶段的猪的特点,特别是免疫系统发育不完全和抵抗力较弱的哺乳期仔猪极易感染,尤其是PEDV导致的发病率可高达70%以上,发病猪的死亡率可达90%以上<sup>[1-2]</sup>。近年来,随着生物信息学和基因编辑技术的发展,人们对病毒(如PRV、PRRSV等)感染相关基因进行了筛选和功能研究。笔者所在实验室利用全基因组基因敲除的猪源gRNA文库筛选出55个与PRRSV感染相

关的候选基因,根据筛选过程中打分和排序及功能,从这55个候选基因中选择3个基因(*IL20RB*、*ATP6V0A1*和*STX10*),进一步探讨其功能。前人研究发现,*IL20RB*参与IL-20受体合成,可能影响病毒与宿主免疫系统的互作<sup>[3]</sup>; *ATP6V0A1*和*STX10*参与胞内运输,可能影响病毒的合成和释放<sup>[4]</sup>; *IL-20RB*基因编码的IL20RB链和IL20RA共同组成白细胞介素-20受体I复合物(IL-20-RI),参与一些慢性炎症和自身免疫性疾病的调控<sup>[5]</sup>; 细胞因子IL-10、IL-20和IL-24均参与调控IL20RB形成的IL-20-RI传输信号<sup>[6]</sup>; IL20RB是宿主免疫系统的一部分,可能会成为病毒及其他病原攻击的潜在靶点<sup>[7]</sup>。*ATP6V0A1*基因编码的ATP6V0A蛋白参与维持细胞内酸碱平衡和胞内运输<sup>[8]</sup>; 现有研究表明*ATP6V0A1*促进内体的成熟,V型ATP酶和相关蛋

收稿日期: 2021-08-12

基金项目: 国家自然科学基金项目(31872328, 31572367)

王金玉, E-mail: 137989114@qq.com

通信作者: 张淑君, E-mail: sjxiaozhang@mail.hzau.edu.cn

白可能在不同的胞内运输中发挥调控作用<sup>[9]</sup>;而 *ATP6V0A1* 的表达可能也会影响自噬体进而影响病毒粒子在胞内的运输及释放过程<sup>[10]</sup>。*STX10* 基因编码的突触融合蛋白 10(Syntaxin-10)在突触泡停靠在突触前膜、释放递质的过程中起作用,也参与胞内的运输过程<sup>[11]</sup>; *STX10* 与 *STX16* 等基因共同介导晚期溶酶体与高尔基体的互动和自噬过程,在细胞凋亡过程中发挥作用<sup>[12]</sup>。然而,这3个基因对 PRRSV 和 PEDV 增殖的作用还不清楚,故本研究利用 CRISPR/Cas9 基因敲除技术对实验室前期构建的猪源细胞分别敲除这3个基因,探讨该基因敲除和功能缺失对 PRRSV 和 PEDV 增殖的影响,以明确这3个基因在 PRRSV 和 PEDV 增殖中的作用。

## 1 材料与方 法

### 1.1 质粒、菌株及细胞

质粒 PLH-sgRNA1-hygb、pMD2.G 和 psPAX2, 以及 Marc145 细胞、WUH3 PRRSV 毒株 (GenBank Accession No.: HM853673)、PEDV YN145 毒株 (GenBank Accession No.: KT02123) 均由华中农业大学何启盖教授馈赠。猪肾 PK15-CD163-Cas9 细胞和猪小肠上皮细胞 (IPEC-J2-Cas9 细胞) 均为笔者所在实验室前期研究中制备,其中,PK15-CD163-Cas9 是在猪肾 PK15 细胞中转入 PRRSV 受体 CD163 和核酸酶 *Cas9* 基因,使该细胞既可感染 PRRSV 又可用于敲除基因; IPEC-J2-Cas9 是在猪小肠上皮细胞 (IPEC-J2 细胞) 中转入核酸酶 *Cas9* 基因,使该细胞既可感染 PEDV 又可用于基因敲除。

### 1.2 试剂

无内毒素质粒小提中量试剂盒、细胞基因组 DNA 提取试剂盒、无内毒素质粒大提试剂盒、琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒、PCR 扩增试剂和 Marker 均购于 Tiangen 公司,Neofect、反转录试剂盒和 RNAex 均购于 AG 公司, simply P 总 RNA 提取试剂盒购于 BioFlux 公司,定量 PCR 所需荧光染料购于 Biomed 公司,琼脂糖购于普博欣生物公司, Dul Red 核酸染料购于 Fanbo 公司, 50 × TAE 购于谷歌生物有限公司, DH5 $\alpha$  感受态购于全式金公司, DMEM 购于 Hyclone 公司, FBS 购于 Gibico 公司, *Bbs*I 限制性内切酶和 T4 连接酶为 Thermo Fisher 公司产品。

### 1.3 gRNA 的设计、Cas9-gRNA 载体的构建和转化

根据 Genbank 中 *ATP6V0A1* (Gene ID: 100523018)、*IL20RB* (Gene ID: 100620875) 和 *STX10* (Gene ID: 100627609) 基因的序列,从笔者所在实验室前期筛选所设计的全基因组基因敲除 gRNA 文库中选出每个基因有效敲除的 gRNA 各 1 条,并根据所用限制酶的酶切位点,合成带有粘性末端的 gRNA (表 1)。

表 1 3 个基因分别被敲除的 gRNA 及其与表达载体连接的粘性末端序列

Table 1 The gRNA of knocked three genes and sticky end sequences connected expression vector

引物名称 Primer name	序列(5'-3') Sequence(5'-3')
<i>ATP6V0A1</i> -F	<u>ACCGGCAAGACCAAAATGCACATA</u>
<i>ATP6V0A1</i> -R	<u>AAACTATGTGCATTTTGGTCTTGC</u>
<i>IL20RB</i> -F	<u>ACCGGCAGCCACTCTCATCCCACC</u>
<i>IL20RB</i> -R	<u>AAACGGTGGGATGAGAGTGGCTGC</u>
<i>STX10</i> -F	<u>ACCGGTAGAAAATGAAAGACCATA</u>
<i>STX10</i> -R	<u>AAACTATGGTCTTTTCATTTCTAC</u>

注:下划线标注的 4 个碱基为 gRNA 与载体连接的粘性末端序列。Note: The four bases marked are the sticky end sequences of the gRNA and the vector.

### 1.4 重组慢病毒质粒的构建

用 T4 DNA 连接酶将引物二聚体连接到用 *Bbs*I 限制性核酸内切酶酶切后的 PLH-sgRNA1-hygb 载体上,4 °C 连接培养 12 h,转入 DH5 $\alpha$  感受态中。将得到的单菌落稀释在 50  $\mu$ L 培养液中,取其中 10  $\mu$ L 进行菌落的 PCR 扩增,对菌落 PCR 扩增产物和鉴定有亮斑的菌液进行测序。选择测序结果与插入片段符合的菌落,其余菌液扩大培养。取 30  $\mu$ L 菌液加入 50 mL 培养基中,培养 12 h 后,使用 Tiangen 无内毒素试剂盒(小提中量)提取质粒。

### 1.5 基因敲除细胞的制备

将 HEK-293T 细胞接种至 6 孔板中,生长至 80% 时,利用 HEK-293T 细胞包装慢病毒。转染前 2 h,移除细胞培养基,更换为新鲜的完全培养基。离心管中加入 100  $\mu$ L 的 OPTI-MEM,再按质量比 3:2:4 (质粒质量分别为 0.67、0.44、0.89  $\mu$ g) 加入包装质粒 psPAX2、病毒外壳质粒 pMD2.G 和核心质粒,混合均匀。采用 6 孔板进行包装,DNA 总量为 2  $\mu$ g,每孔加入 Neofect 2  $\mu$ L,混匀静置 25 min,将混合液加入 HEK-293T 细胞培养基中。转染 6~12 h 后,更换培养基,继续培养。分别在转染后 24、48 和 72 h 时收集上清。

在2个6孔板中分别接种PK15-CD163-Cas9细胞和IPEC-J2-Cas9细胞,生长到60%左右时,在培养基中加入100  $\mu$ L包装48 h后收取的慢病毒液(48 h慢病毒液效果最好),轻摇混匀。6 h后,将培养基吸弃,换入新鲜培养基。从第2天开始,将培养液换成含有潮霉素B(300 ng/mL)的培养基,共筛

选7 d,即可得到3个基因分别被敲除的细胞。用表2所示引物对gRNA靶向区域进行扩增,并对PCR产物进行测序,将靶向区域与原序列进行对比,即可得知敲除效果。若靶向区域出现碱基缺失,则基因敲除成功。

表2 用于扩增gRNA靶向敲除区域的引物序列

Table 2 Primer sequences used to amplify gRNA knockout sites

引物名称 Primer name	引物序列(5'-3') Primer sequence (5'-3')	产物长度/bp Product length	扩增基因位置/bp Amplified gene location
ATP6V0A1-F	TCCCTGAGACTTTTGGCCTG	1 169	42 770~43 939
ATP6V0A1-R	CTACTCAGACAACCTCCGGGC		
IL20RB-F	ATGAGCCTGGCATGTTTCCA	569	27 717~28 286
IL20RB-R	GGCTGAGAAGACACGCTGAT		
STX10-F	GGTGTCTCTGCTCGGTCTGG	356	718~1 074
STX10-R	GACGCTTCAGGCTTGCATTC		

## 1.6 病毒基因表达量的qPCR检测

将PRRSV(MOI=0.1)感染PK15-CD163-Cas9-NC(对照组,基因未敲除)和3个基因分别敲除的3种细胞(试验组),在12、24及48 h,分别收取对照组和试验组中的细胞,从细胞中提取RNA,反转录为cDNA,并进行相对定量PCR分析(ATP6V0A1敲除组12、24 h实验重复5次,48 h实验重复7次;IL20RB敲除组12、24 h实验重复5次,48 h实验重复7次;STX10敲除组实验重复3次),感染24、48 h细胞内ORF7基因的表达量能有效反映PRRSV感染水平。用PEDV(MOI=0.1)分别感染基因ATP6V0A1、IL20RB和STX10被敲除的3种细胞(IPEC-J2-Cas9-ATP6V0A1、IPEC-J2-Cas9-IL20RB和IPEC-J2-Cas9-STX10)(试验组)和IPEC-J2-Cas9-NC细胞(对照组)。因为笔者所在实验室前期研究表明感染24 h能有效地反映PEDV感染水平,而且在IPEC-J2-Cas9-NC细胞和IPEC-J2-Cas9细胞中PEDV感染效果类似,故本研究只比较分析感染后第24小时的PEDV感染情况。

在感染后24 h,对照组细胞大量死亡,为了检测细胞内及培养液中所有病毒含量,收取细胞及其上清,根据PEDV的N蛋白基因设计引物,对PEDV的N蛋白基因表达量进行绝对定量PCR检测。引物序列如表3所示,绝对定量的标准曲线如图1所示。

### 1.7 t检验及方差分析

利用GraphPad Prism 8软件进行统计分析,定量数据采用方差分析和参数检验、双尾未配对t检验进行评估。分别对试验组和对照组病毒感染后的病毒基因表达量进行统计分析。

表3 定量PCR所用引物及探针序列

Table 3 Sequences of primers and probes used for quantification PCR

引物名称 Primer name	引物序列(3'-5') Primer sequence (3'-5')
ORF7-F	TCAGCTGTGCCAAATGCTGG
ORF7-R	AAATGGGGCTTCTCCGGGTTT
$\beta$ -actin-F	TGGCACCACACCTTCTACA
$\beta$ -actin-R	ATCTTCTCACGGTTGGCTTTG
PEDV-N-protein-F	CGTACAGGTAAGTCAATTAC
PEDV-N-protein-R	GATGAAGCATTGACTGAA
Probe	FAM-TTCGTCACAGTCGCCAAGG-TAM-RA

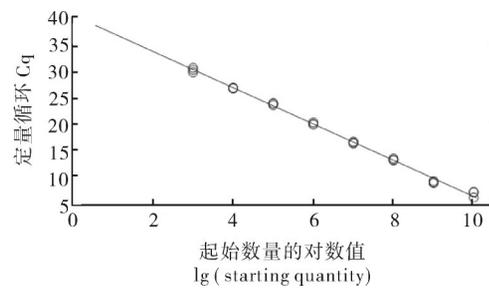


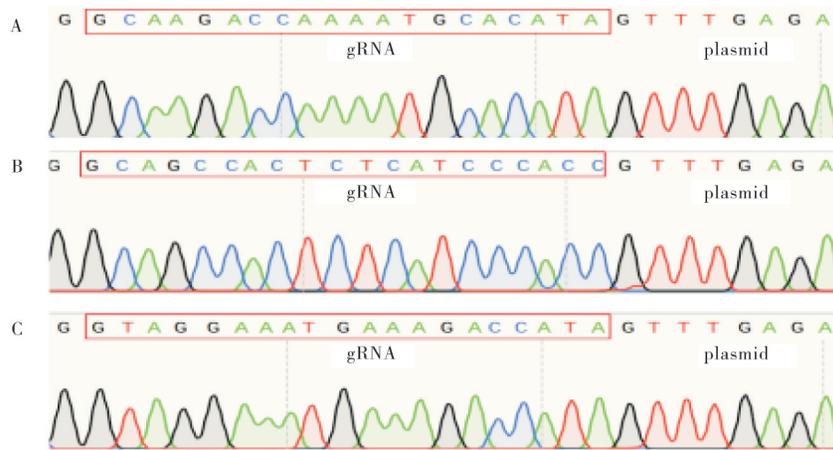
图1 PEDV绝对定量所用标准曲线

Fig.1 Standard curve for absolute quantification of PEDV

## 2 结果与分析

### 2.1 ATP6V0A1、IL20RB和STX10基因分别敲除及其对PRRSV感染的作用

对连接gRNA的载体进行测序鉴定,结果如图2所示。



A: *ATP6V0A1* 基因敲除的 gRNA; B: *IL20RB* 基因敲除的 gRNA; C: *STX10* 基因敲除的 gRNA。 A: *ATP6V0A1* gene knocked-out gRNA; B: *IL20RB* gene knocked-out gRNA; C: *STX10* gene knocked-out gRNA.

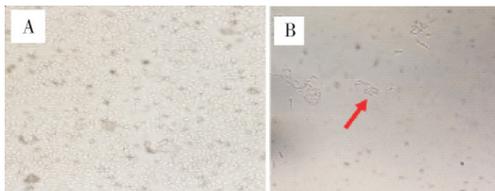
图2 靶向基因敲除的gRNA表达载体的测序鉴定

Fig.2 Knocked-out gRNA expression vectors targeted genes' sequencing identification

从图2可以看出,在PLH-sgRNA1-hygb载体中,分别插入了 *ATP6V0A1*、*IL20RB* 和 *STX10* 基因敲除的 gRNA 序列(表1),gRNA 与表达载体连接正确,表明靶向3个基因分别被敲除的3个gRNA表达载体构建成功。

用潮霉素 B (300 ng/mL) 筛选 10 d 后,得到 gRNA 靶向目的基因敲除的存活细胞(图3B)。扩增靶向区域得到 PCR 产物(图4),对 PCR 产物进行测序。从图5中可以看出:与NCBI数据库中基因序列相比,目标序列附近出现基因编辑导致的杂峰现象,表明 gRNA 靶向区附近碱基被敲除,3个基因分别被敲除的3种细胞(PK15-CD163-Cas9-IL20RB、PK15-CD163-Cas9-ATP6V0A1、PK15-CD163-Cas9-STX10) 制备成功。

用 PRRSV (MOI=0.1) 感染 3 个基因分别被敲除的 PK15-CD163-Cas9-IL20RB、PK15-CD163-Cas9-ATP6V0A1、PK15-CD163-Cas9-STX10 细胞



A: 正常生长 10 d 后的 PK15 细胞 (阴性对照); B: 潮霉素 B 筛选 10 d 后的存活细胞 (试验组)。 A: PK15 cells after 10 days of normal growth (negative control); B: Live cells after 10 days selected of by hygromycin B (test group).

图3 用潮霉素 B 筛选 *ATP6V0A1* 基因被敲除的存活细胞

Fig.3 Live cells knocked *ATP6V0A1* gene selected of by hygromycin B

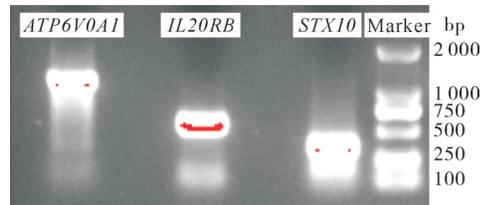
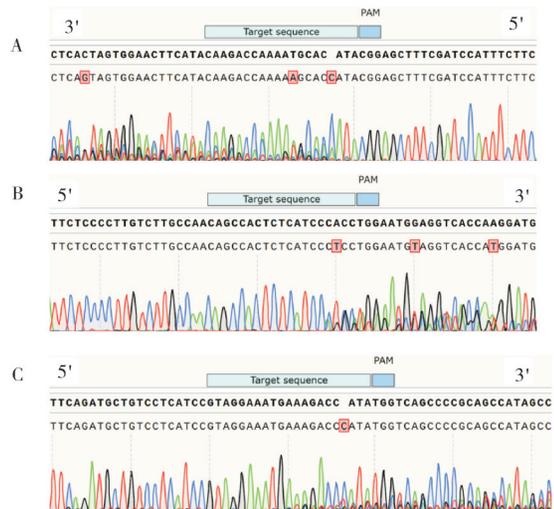


图4 靶向敲除区域的 PCR 产物电泳检测

Fig.4 PCR products targeted in knocked-out region detected by electrophoresis



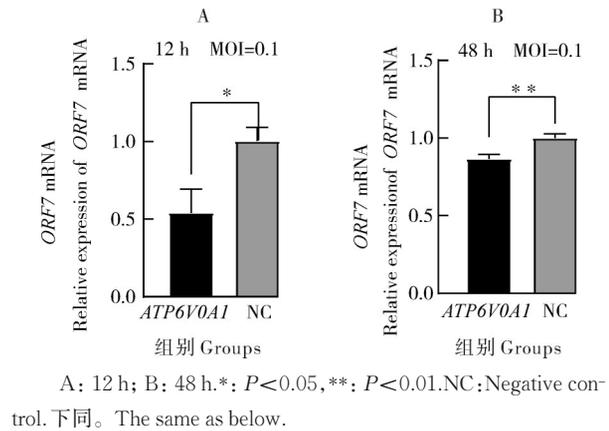
A: *ATP6V0A1*; B: *IL20RB*; C: *STX10*. 上面序列为基因原序列(来源于NCBI),下面序列为测序结果。 A: *ATP6V0A1*; B: *IL20RB*; C: *STX10*. The sequence above is the original gene sequence (from NCBI), and the sequence below is the sequencing result.

图5 基因敲除的PK-15细胞中 *ATP6V0A1*、*IL20RB* 和 *STX10* 基因测序鉴定

Fig.5 Sequencing identification of *ATP6V0A1*, *IL20RB* and *STX10* in gene-knocked-out PK-15 cells

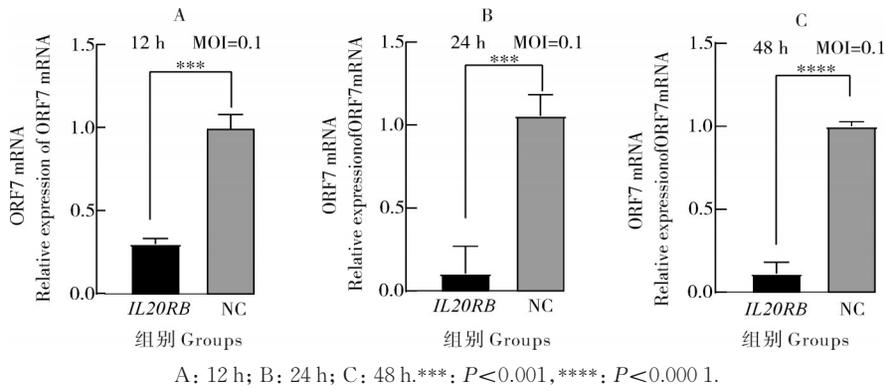
(试验组)和未敲除基因的细胞(对照组,PK15-CD163-Cas9-NC)。从荧光定量PCR检测结果(图6)可知,与对照组相比,PRRSV感染 *ATP6V0A1* 基因被敲除的试验组细胞PK15-CD163-Cas9-*ATP6V0A1* 后的第12小时显著 ( $P(12\text{ h}) = 1.04 \times 10^{-2}$ )、第48小时极显著 ( $P(48\text{ h}) = 4.49 \times 10^{-3}$ )降低 *ORF7* 表达量(因感染24 h样本收集不成功,没有第24小时的数据),说明 *ATP6V0A1* 敲除和功能缺失可显著抑制PRRSV增殖。

PCR检测结果显示,PRRSV感染试验组细胞(*IL20RB* 基因被敲除的PK15-CD163-Cas9-*IL20RB*),感染后的第12、24及48小时的 *ORF7* 表达量显著低于对照组(图7),重复3次感染试验均得到类似的结果 ( $P(12\text{ h}) = 2.03 \times 10^{-4}$ ,  $P(24\text{ h}) = 1.45 \times 10^{-4}$ ,  $P(48\text{ h}) = 7.84 \times 10^{-7}$ )。表明PK15细



A: 12 h; B: 48 h.\*:  $P < 0.05$ , \*\*:  $P < 0.01$ .NC: Negative control.下同。The same as below.

图6 *ATP6V0A1*敲除后PRRSV基因 *ORF7*的相对表达量  
Fig.6 The related expression of PRRSV gene *ORF7* after *ATP6V0A1* knocked-out 胞 *IL20RB* 敲除(该基因功能缺失)能显著抑制 PRRSV增殖。

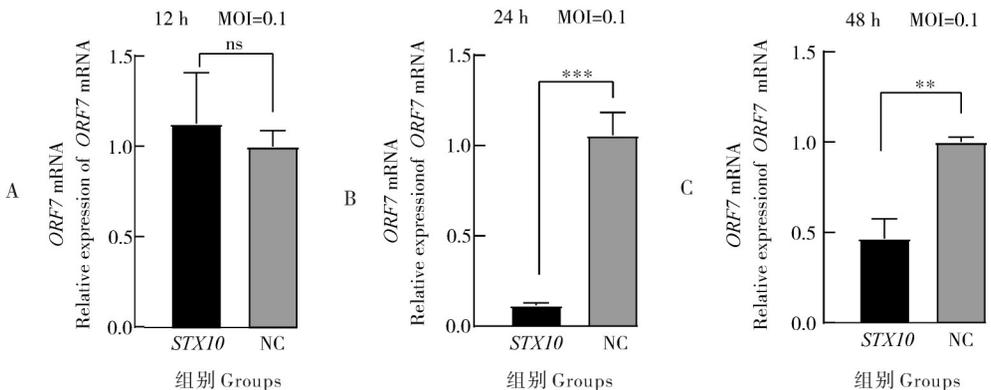


A: 12 h; B: 24 h; C: 48 h.\*\*\*:  $P < 0.001$ , \*\*\*\*:  $P < 0.0001$ .

图7 *IL20RB*敲除后PRRSV基因 *ORF7*的相对表达量  
Fig.7 The related expression of PRRSV gene *ORF7* after *IL20RB* knocked-out

用PRRSV感染 *STX10* 基因被敲除的试验组细胞PK15-CD163-Cas9-*STX10*,感染后第24及48小时的 *ORF7* 表达量均显著低于对照组(PK15-CD163-

Cas9-NC),其中24 h病毒 *ORF7* 表达量更低(图8),3次重复试验结果均相似 ( $P(12\text{ h}) = 4.94 \times 10^{-1}$ ,  $P(24\text{ h}) = 2.15 \times 10^{-3}$ ,  $P(48\text{ h}) = 1.16 \times 10^{-3}$ )。证实



A: 12 h; B: 24 h; C: 48 h. ns:  $P > 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$ , \*\*\*,  $P < 0.001$ .

图8 *STX10*敲除后PRRSV基因 *ORF7*的相对表达量  
Fig.8 The related expression of PRRSV gene *ORF7* after *STX10* knocked-out

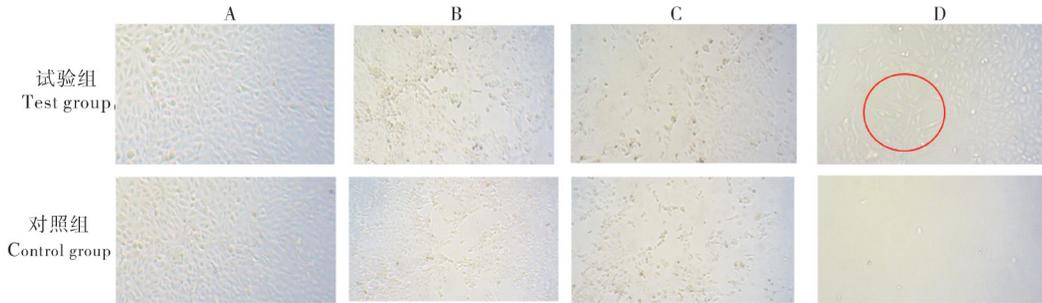
*STX10* 敲除(该基因功能缺失)能显著抑制 PRRSV 增殖,其抑制作用在感染 24 h 较强。

### 2.2 *ATP6V0A1*、*IL20RB* 和 *STX10* 基因分别敲除及其对 PEDV 增殖的抑制作用

由于 PEDV 不能感染猪 PK-15 和 PK15-CD163 细胞,但可感染猪小肠上皮细胞(IPEC-J2),笔者所在实验室前期已制备了可用于基因敲除且可被

PEDV 感染的 IPEC-J2-Cas9 细胞,故本研究利用 CRISPR/Cas9 技术在 IPEC-J2-Cas9 细胞中分别敲除 3 个基因,研究基因敲除对 PEDV 增殖的作用。

在筛选第 7 天时,对照组细胞死亡,试验组还有少量存活细胞,即为整合了 gRNA 表达载体、gRNA 靶向目的基因敲除的存活细胞,如图 9 所示。



A:第1天;B:第3天;C:第5天;D:第7天。红圈内为筛选出的整合了gRNA表达载体的细胞。A:1st day;B:3rd day;C:5th day;D:7th day. Cells in the red circle are the selected cells integrated with the gRNA expression vector.

图9 基因 *ATP6V0A1* 敲除的细胞(IPEC-J2-Cas9-*ATP6V0A1*,潮霉素B筛选第7天)

Fig.9 The cells knocked gene *ATP6V0A1* (IPEC-J2-Cas9-*ATP6V0A1*, selected using hygromycin B on 7 days)

提取存活细胞中基因组DNA,PCR 扩增 gRNA 靶向区域附近片段,得到如图 10 所示的 PCR 产物。扩增片段测序结果与该基因序列(NCBI 数据库)进行比对,如图 11 所示,测序结果表明 gRNA 靶向区域的碱基被编辑,3 个基因分别敲除的 3 种细胞(IPEC-J2-Cas9-*ATP6V0A1*、IPEC-J2-Cas9-*IL20RB* 和 IPEC-J2-Cas9-*STX10*,为混合细胞)制备成功。

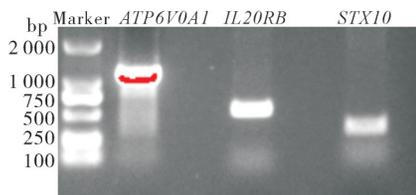
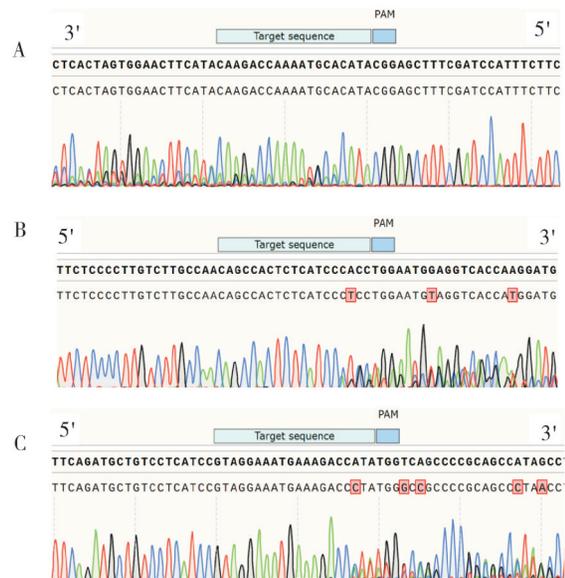


图10 靶向敲除区域的PCR产物

Fig.10 PCR products targeted in knocked region

从图 11 可以看出,与对照组相比,在 24 h 的 3 个基因分别敲除的试验组细胞中,PEDV 的 N 蛋白表达量显著降低。3 次重复试验均获得类似结果。

从图 12 可以看出,与对照组的 PEDV RNA 拷贝数(均值: $4.68 \times 10^6$ )相比,试验组出现了不同程度的显著下降(*ATP6V0A1* 组均值: $6.35 \times 10^4$ ,*IL20RB* 组均值: $1.16 \times 10^6$ ,*STX10* 组均值: $3.72 \times 10^5$ )。表明 *ATP6V0A1* 被敲除对 PEDV 增殖抑制效果最显著,

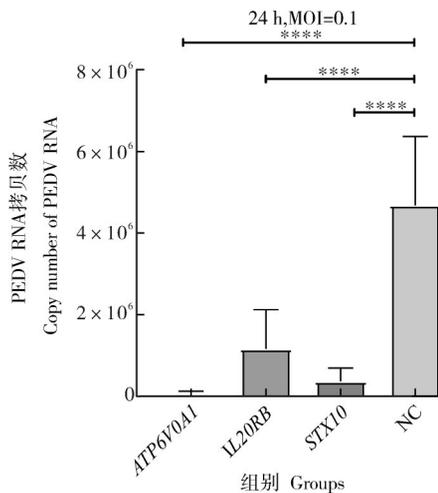


A:*ATP6V0A1*;B:*IL20RB*;C:*STX10*。上面序列为基因原序列(来源于NCBI),下面序列为测序结果。A: *ATP6V0A1*; B: *IL20RB*; C: *STX10*. The sequence above is the original gene sequence (from NCBI), and the sequence below is the sequencing result.

图11 基因敲除 IPEC-J2 细胞中 *ATP6V0A1*、*IL20RB* 和 *STX10* 基因测序鉴定

Fig.11 Sequencing identification of *ATP6V0A1*, *IL20RB* and *STX10* gene in gene-knockout IPEC-J2 cells

*IL20RB* 被敲除细胞和 *STX10* 被敲除对 PEDV 增殖也具有显著抑制作用。



A: *ATP6V0A1*; B: *IL20RB*; C: *STX10*. \*\*\*\*:  $P < 0.0001$ .  $P(ATP6V0A1) = 7.02 \times 10^{-7}$ ,  $P(IL20RB) = 5.28 \times 10^{-5}$ ,  $P(STX10) = 1.33 \times 10^{-7}$ .

图12 荧光定量PCR检测PEDV拷贝数

Fig.12 PEDV copy number detected by fluorescence quantitative PCR

### 3 讨论

CRISPR/Cas9基因敲除技术可有效对gRNA靶向的位点进行编辑敲除,本研究结果显示,用该技术分别敲除细胞中*ATP6V0A1*、*IL20RB*和*STX10*基因后对PRRSV、PEDV感染均有显著抑制作用。

*IL20RB*作为促炎性因子,主要参与炎症早期反应,*IL20RB*基因敲除后,细胞炎症和早期免疫反应可能会受影响,从而影响病毒增殖。IL-10、IL-20、IL-24均可利用与*IL20RB*形成的受体复合物传输信号,IL-10影响机体的免疫抑制过程<sup>[13]</sup>。Zhang等<sup>[14-15]</sup>发现宿主细胞中I型干扰素(IFNs)的产生会被PRRSV抑制,影响下游IFN刺激基因(*ISG*)触发的抗病毒免疫反应,从而使PRRSV进行免疫逃避。敲除*IL20RB*基因可能导致IL-10等细胞因子的信号传输受阻,从而导致病毒无法抑制IFN表达,降低了病毒对免疫机制的调控和逃避能力,使得病毒被宿主免疫和清除,从而抑制病毒增殖。

敲除*ATP6V0A1*影响了胞内运输和酸碱平衡等过程,从而降低了病毒感染增殖速度。PEDV借助低pH值进入细胞,敲除*ATP6V0A1*可能导致细胞无法形成低pH值环境,PEDV进入细胞过程受阻。现有研究表明,PEDV通过网格蛋白和微囊蛋白介导的内吞途径进入细胞,也可以通过脂筏介导的内吞作用进入细胞;内化的PEDV病毒颗粒通过早期内

体-晚期内体-溶酶体途径到达溶酶体<sup>[16]</sup>。在PRRSV感染细胞的早期阶段,PRRSV颗粒先后被转运到内体和溶酶体中<sup>[17]</sup>,敲除*ATP6V0A1*导致胞内运输过程受阻,可能影响了内体的酸化与成熟,延长了内体到溶酶体的时间,使得病毒在细胞内的复制周期延长。

Lucas等<sup>[18]</sup>发现沙眼衣原体会利用*STX10*拦截宿主的囊泡转运系统以获取营养物质,而在细胞代谢所需的戊糖磷酸途径被抑制时,猪圆环病毒滴度会明显下降<sup>[19]</sup>,因此病毒可能利用*STX10*来控制囊泡转运途径为自己的代谢提供物质,当*STX10*基因敲除后,病毒代谢所需的物质无法正常运输,导致病毒增殖受阻;*STX*家族参与组成的SNARE复合体能够控制膜融合,调节狂犬病毒在神经细胞中释放,使病毒子代滴度下降。*STX10*参与突触小泡形成,也与自噬及病毒释放过程有关<sup>[20]</sup>,病毒利用自噬途径,如PRRSV感染会引起细胞线粒体自噬,干扰动态相关蛋白(dynamic related protein, Drp1)。PRRSV感染细胞后的12 h内即会诱导自噬体的形成,从而抑制PRRSV感染导致的细胞凋亡,延长细胞存活时间,便于病毒增殖<sup>[21]</sup>,PEDV感染vero细胞时诱导完全自噬进程,从而促进PEDV复制<sup>[22]</sup>。而*STX10*参与内体与高尔基体的互作过程,从而影响自噬过程。当敲除自噬相关的*STX10*基因后,病毒利用自噬抑制细胞凋亡的途径可能受阻,病毒复制微环境受损,胞内增殖的时间减少,复制量下降。

PRRSV感染敲除*STX10*基因的细胞后,12 h内病毒增殖未受影响,而24、48 h内病毒增殖量显著降低,表明*STX10*主要影响PRRSV增殖的时间点在感染后12~24 h,而病毒前期复制未受影响,可能是病毒的释放、组装过程受到了影响。有研究<sup>[20]</sup>报道过表达*STX4*能够促进丙肝病毒的释放,*STX*家族参与组成的SNARE复合体也会影响狂犬病毒的释放,对初代病毒的感染无影响,子代病毒的滴度下降,此次试验也出现了类似现象,表明PRRSV的释放过程可能也需要SNARE复合体的参与,敲除*STX10*使SNARE复合体组装过程受影响,病毒难以释放导致复制量下降。PEDV是否也在病毒释放过程受影响,还需要进一步对3种基因敲除细胞在PEDV感染后不同时间点进行检测。

综上所述,本研究制备了*ATP6V0A1*、*IL20RB*

和 *STX10* 基因分别被敲除的 3 种猪 PK15-CD163 细胞以及 3 种猪 IPEC-J2 细胞,并证实了分别敲除 3 个基因可显著抑制 PRRSV 和 PEDV 增殖。

## 参考文献 References

- [1] 吴植,夏文龙,郭长明,等.猪 CD163 游离受体的体内表达与抗猪繁殖与呼吸综合征病毒感染效果的研究[J].动物医学进展,2020,41(1):14-19.WU Z,XIA W L,GUO C M,et al.Soluble CD163 expression and antiviral infection of PRRSV in vivo[J].Progress in veterinary medicine,2020,41(1):14-19(in Chinese with English abstract).
- [2] JUNG K,SAIF L J,WANG Q.Porcine epidemic diarrhea virus (PEDV): an update on etiology,transmission,pathogenesis,and prevention and control[J/OL].Virus research,2020,286:198045 [2021-08-12].https://doi.org/10.1016/j.virusres.2020.198045.
- [3] KONG L,JIANG D,HE C,et al.TgROP18 targets IL20RB for host-defense-related-STAT3 activation during *Toxoplasma gondii* infection[J/OL].Parasites & vectors,2020,13(1):400[2021-08-12].https://doi.org/10.1186/s13071-020-04251-7.
- [4] YIN K,LI Y M,MA Z P,et al.SNAP25 regulates the release of the rabies virus in nerve cells via SNARE complex-mediated membrane fusion[J/OL].Veterinary microbiology,2020,245:108699 [2021-08-12].https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2020.108699.
- [5] CUI X F,CUI X G,LENG N.Overexpression of interleukin-20 receptor subunit beta (IL20RB) correlates with cell proliferation,invasion and migration enhancement and poor prognosis in papillary renal cell carcinoma[J].Journal of toxicologic pathology,2019,32(4):245-251.
- [6] CHEN J,CASPI R R,CHONG W P.IL-20 receptor cytokines in autoimmune diseases[J].Journal of leukocyte biology,2018,104(5):953-959.
- [7] 余志彬.猪繁殖与呼吸综合征病毒(PRRSV)诱导白介素-12(IL-12)产生的分子机制研究[D].北京:中国农业大学,2016.YU Z B.Study on the mechanism of interleukin-12 (IL-12) production induced by porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV)[D].Beijing:China Agricultural University,2016(in Chinese with English abstract).
- [8] KROGSAETER E K,BIEL M,WAHL-SCHOTT C,et al..The protein interaction networks of mucolipins and two-pore channels[J].Biochim Biophys Acta Mol Cell Res,2019,1866:1111-1123.
- [9] TUTTLE A M,HOFFMAN T L,SCHILLING T F.Rabconnectin-3a regulates vesicle endocytosis and canonical Wnt signaling in zebrafish neural crest migration[J/OL].PLoS biology,2014,12(5):e1001852 [2021-08-12].https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001852.
- [10] AOTO K,KATO M,AKITA T,et al.ATP6V0A1 encoding the a1-subunit of the V0 domain of vacuolar H(+)-ATPases is essential for brain development in humans and mice[J/OL].Nat Commun,2021,12(1):2107 [2021-08-12].https://doi.org/10.1038/s41467-021-22389-5.
- [11] REN H M,ELGNER F,HIMMELSBACH K,et al.Identification of syntaxin 4 as an essential factor for the hepatitis C virus life cycle[J].European journal of cell biology,2017,96(6):542-552.
- [12] TANG B L.Syntaxin 16's newly deciphered roles in autophagy[J].Cells,2019,8(12):1655 [2021-08-12].https://doi.org/10.3390/cells8121655.
- [13] 徐鹏.PRRSV 特异性肽对 CSF、PRRS 免疫猪组织淋巴细胞 TGF- $\beta$ 1、IL-10、IL-12 分泌的影响[D].长春:吉林大学,2018.XU P.The effect of prrsv-specific peptides on the secretion of TGF- $\beta$ 1,IL-10 and IL-12 in swine tissue lymphocyte after CSF and PRRS vaccination[D].Changchun:Jilin University,2018(in Chinese with English abstract).
- [14] ZHANG A K,DUAN H,ZHAO H J,et al.Interferon-induced transmembrane protein 3 is a virus-associated protein which suppresses porcine reproductive and respiratory syndrome virus replication by blocking viral membrane fusion[J/OL].Journal of virology,2020,94(24):e01350-20 [2021-08-12].https://doi.org/10.1128/JVI.01350-20.
- [15] ZHANG T,LIU Y,CHEN Y,et al.Antiviral activity of porcine interferon delta 8 against pseudorabies virus *in vitro*[J].International journal of biological macromolecules,2021,177:10-18.
- [16] WEI X N,SHE G L,WU T T,et al.PEDV enters cells through clathrin-,caveolae-,and lipid raft-mediated endocytosis and traffics via the endo-/lysosome pathway[J].Veterinary research,2020,51(1):1-18.
- [17] PATHER R S,WHITWORTH K M,SCHOMMER S K,et al.Genetic engineering alveolar macrophages for host resistance to PRRSV[J].Veterinary microbiology,2017,209:124-129.
- [18] LUCAS A L,OUELLETTTE S P,KABEISEMAN E J,et al.The trans-Golgi SNARE syntaxin 10 is required for optimal development of *Chlamydia trachomatis*[J/OL].Frontiers in cellular and infection microbiology,2015,5:68 [2021-08-12].https://doi.org/10.3389/fcimb.2015.00068.
- [19] GOU H C,BIAN Z B,LI Y,et al.Metabolomics exploration of pseudorabies virus reprogramming metabolic profiles of PK-15 cells to enhance viral replication[J/OL].Frontiers in cellular and infection microbiology,2020,10:599087 [2021-08-12].https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.599087.
- [20] REN H M,ELGNER F,HIMMELSBACH K,et al. Identification of syntaxin 4 as an essential factor for the hepatitis C virus life cycle[J].European journal of cell biology,2017,96(6):542-552.
- [21] 周傲.全基因组 CRISPR/Cas9 文库筛选的宿主基因及细胞自噬在猪病毒复制中的作用与机理研究[D].武汉:华中农业大学,2016.ZHOU A.Function and mechanism of cell autophagy

gy and host genes screened by genome-wide CRISPR/Cas9 in porcine virus replication [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2016 (in Chinese with English abstract).

[22] 郭效珍. PEDV感染vero细胞的蛋白质组学分析及诱导细胞

自噬的机制研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2017. GUO X Z. Proteomics and molecular mechanisms of autophagy in PEDV-infected vero cells [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2017 (in Chinese with English abstract).

## Effects of *ATP6V0A1*, *IL20RB* and *STX10* gene on proliferation of PRRSV and PEDV

WANG Jinyu, SHANGGUAN Aishao, SUN Yumei, JIANG Jinhe, LIU Zhongzhu, ZHANG Shujun

*School of Animal Science and Technology and School of Veterinary Medicine, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China*

**Abstract** The three genes including *ATP6V0A1*, *IL20RB*, and *STX10* were individually knocked out with CRISPR/Cas9 technology (previously established in author's laboratory) in PK15-CD163-Cas9 cells and IPEC-J2-Cas9 cells to study the effects of three genes on the proliferation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) and porcine epidemic diarrhea virus (PEDV). The cells with knocked-gene (PK15-CD163-Cas9-*ATP6V0A1*, PK15-CD163-Cas9-*IL20RB* and PK15-CD163-Cas9-*STX10*) were infected with PRRSV. The expression of the *ORF7* of PRRSV was analyzed with fluorescence quantitative PCR to detect the proliferation of PRRSV. Meanwhile, the cells with knocked-gene (IPEC-J2-Cas9-*ATP6V0A1*, IPEC-J2-Cas9-*IL20RB* and IPEC-J2-Cas9-*STX10*) were infected with PEDV. The expression of N protein gene of PEDV and the proliferation of PEDV were detected. The results showed that the expression level of *ORF7* in the cells with knocked-gene was significantly lower than that of the wildtype cells (PK15-CD163-Cas9-NC, control group). The expression of N protein gene was significantly reduced in the cells with knocked-gene, compared with the wildtype cells (IPEC-J2-Cas9-NC, control group). It is indicated that individually knocking out of the three genes significantly inhibits the proliferation of PRRSV and PEDV. *ATP6V0A1*, *IL20RB*, and *STX10* can play important roles in the proliferation of PRRSV and PEDV.

**Keywords** gene knocked-out; CRISPR/Cas9 technology; porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV); porcine epidemic diarrhea virus (PEDV)

(责任编辑:边书京)