

# 基于 CRISPR/Cas9 系统筛选猪流行性腹泻病毒复制相关基因及其验证

张雪<sup>1,2</sup>, 范宝超<sup>2</sup>, 赵永祥<sup>2</sup>, 钱嘉莉<sup>2</sup>, 王传红<sup>2</sup>, 徐红<sup>2</sup>, 郭容利<sup>2</sup>, 李彬<sup>\*2</sup>, 贾斌<sup>\*1</sup>

1 石河子大学动物科技学院, 新疆 石河子 832000

2 江苏省农业科学院兽医研究所, 江苏 南京 210014

张雪, 范宝超, 赵永祥, 钱嘉莉, 王传红, 徐红, 郭容利, 李彬, 贾斌. 基于 CRISPR/Cas9 系统筛选猪流行性腹泻病毒复制相关基因及其验证[J]. 微生物学通报, 2022, 49(12): 5138-5149

Zhang Xue, Fan Baochao, Zhao Yongxiang, Qian Jiali, Wang Chuanhong, Xu Hong, Guo Rongli, Li Bin, Jia Bin. Screening and validation of porcine epidemic diarrhea virus replication-related genes based on genome-scale CRISPR/Cas9 system[J]. Microbiology China, 2022, 49(12): 5138-5149

**摘要:**【背景】成簇规律间隔的短回文重复序列相关蛋白(clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated protein, CRISPR/Cas9)已被广泛证实是高效、强大的第三代基因编辑工具, 在发现功能基因等领域取得了重要进展, 但至今尚无利用该方法挖掘猪流行性腹泻病毒(porcine epidemic diarrhea virus, PEDV)宿主基因的报道。【目的】利用 CRISPR/Cas9 系统在全基因组范围内筛选 PEDV 复制相关基因, 并进行候选基因的初步验证, 为培育抗 PEDV 种猪提供科学参考。【方法】通过 CRISPR/Cas9 技术构建人肝癌细胞系(Huh-7)全基因组敲除文库, 利用 PEDV 感染 Huh-7 文库细胞, 随后经过高通量测序筛选影响 PEDV 复制的关键宿主因子, 结合基因干扰和检测病毒效价等相关试验对影响 PEDV 复制的候选基因进行初步验证。【结果】构建了 CRISPR/Cas9 系统在全基因组范围内筛选 PEDV 复制相关基因的方法, 将富集程度排名靠前的整合素  $\alpha 11$  (integrin  $\alpha 11$ , *ITGA11*)、哺乳动物复制蛋白 A2 (replication protein A2, *RPA2*)、驱动蛋白家族成员 2A (kinesin family member 2A, *KIF2A*)、诱导髓系白血病细胞分化蛋白 1 (induced myeloid leukemia cell differentiation protein 1, *MCL1*)、多聚 ADP 核糖化酶 1 [poly (ADP-ribose) polymerase 1, *PARP1*]和囊泡单胺转运蛋白(vesicular monoamine transporter, *SLC18A1*)基因进行了验证; 采用 siRNA 对上述基因分别进行干扰后, 结果与对照组相比, 干扰 *ITGA11* 可显著降低 PEDV 猪源靶向细胞 IPEC-J2 中 PEDV-N mRNA、蛋白表达水平及子代病毒滴度。【结论】基于 CRISPR/Cas9 系

基金项目: 国家自然科学基金(32272996); 江苏省杰出青年基金(BK20190003); 江苏省种业振兴揭榜挂帅项目(JBGS [2021] 024)

Supported by: National Natural Science Foundation of China (32272996); Natural Science Foundation of Jiangsu Province (BK20190003); The JieBangGuaShuai Project of Seed Industry Revitalization in Jiangsu Province (JBGS [2021] 024)

\*Corresponding authors: E-mail: LI Bin: libinana@126.com; JIA Bin: jiabin@shzu.edu.cn

Received: 2022-09-14; Accepted: 2022-10-19; Published online: 2022-11-02

统的全基因组敲除文库可作为挖掘 PEDV 复制相关功能基因的有效工具, *ITGA11* 基因可作为一种制备抗 PEDV 猪种潜在的靶基因。

**关键词:** 成簇规律间隔的短回文重复序列相关蛋白(CRISPR/Cas9); 猪流行性腹泻病毒; 遗传筛选; 整合素  $\alpha 11$

## Screening and validation of porcine epidemic diarrhea virus replication-related genes based on genome-scale CRISPR/Cas9 system

ZHANG Xue<sup>1,2</sup>, FAN Baochao<sup>2</sup>, ZHAO Yongxiang<sup>2</sup>, QIAN Jiali<sup>2</sup>, WANG Chuanhong<sup>2</sup>, XU Hong<sup>2</sup>, GUO Rongli<sup>2</sup>, LI Bin<sup>\*2</sup>, JIA Bin<sup>\*1</sup>

1 College of Animal Science and Technology, Shihezi University, Shihezi 832000, Xinjiang, China

2 Institute of Veterinary Medicine, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, Jiangsu, China

**Abstract:** [Background] Clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated protein (CRISPR/Cas9) has been proven to be an efficient and powerful third-generation gene editing tool and has achieved great progress in the discovery of functional genes. However, few studies have reported about using this method to screen the host genes associated with porcine epidemic diarrhea virus (PEDV). [Objective] To screen out the genes related to PEDV replication in the whole genome by using the CRISPR/Cas9 system, and to perform preliminary verification of candidate genes, so as to provide scientific reference for breeding PEDV-resistant pigs. [Methods] A genome-wide knockout library of human hepatoma cell line (Huh-7) was constructed via CRISPR/Cas9 technology, and the Huh-7 library cells were infected with PEDV. Then, the key host factors affecting PEDV replication were screened by high-throughput sequencing. The interference and detection experiments of virus replication were performed to preliminarily verify the candidate genes that affected PEDV replication. [Results] A CRISPR/Cas9 system was successfully constructed to screen the genes related to PEDV replication in the whole genome. The genes with top enrichment degree, including those encoding integrin  $\alpha 11$  (*ITGA11*), replication protein A2 (*RPA2*), kinesin family member 2A (*KIF2A*), induced myeloid leukemia cell differentiation protein 1 (*MCL1*), poly (ADP-ribose) polymerase 1 (*PARP1*), and solute carrier family 18 member A1 (vesicular monoamine transporter, *SLC18A1*), were verified. Compared with the control group, the interference of *ITGA11* via siRNA significantly down-regulated the mRNA and protein levels of PEDV-N and reduced the virus titer in the IPEC-J2 cells infected with PEDV. [Conclusion] The genome-wide knockout library based on the CRISPR/Cas9 system can be used as an effective tool for screening PEDV replication-related functional genes. *ITGA11* may be a potential target gene for the breeding of PEDV-resistant pigs.

**Keywords:** clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated protein (CRISPR/Cas9); porcine epidemic diarrhea virus (PEDV); genetic screening; integrin  $\alpha 11$  (*ITGA11*)

CRISPR/Cas9 系统是对基因组进行高效编辑的重要技术,其利用 sgRNA 的引导性和 Cas9 核酸酶的定点切割功能,可直接对编码区和非编码区精准打靶目的基因片段<sup>[1]</sup>。将 CRISPR/Cas9 基因编辑系统与全基因组筛选和后续的功能基因鉴定相结合,已成功应用于病毒感染必需基因的筛选研究中。例如, Ma 等<sup>[2]</sup>利用 CRISPR/Cas9 系统发现了宿主基因 *EMC2*、*EMC3*、*SELIL*、*DERL2*、*UBE2G2*、*UBE2J1* 和 *HRDI* 对西尼罗病毒(west nile virus, WNV)诱导的细胞死亡具有重要的调控作用。Sun 等<sup>[3]</sup>通过 CRISPR 基因组规模筛查表明, TMEM41B 是猪传染性胃肠炎病毒(transmissible gastro enteritis virus, TGEV)和猪德尔塔冠状病毒(porcine deltacoronavirus, PDCoV)等冠状病毒复制所必需的宿主因子,为深入研究基因功能及其在抗病中的作用奠定了重要基础。

猪流行性腹泻病毒(porcine epidemic diarrhea virus, PEDV)属冠状病毒科  $\alpha$  冠状病毒属,可引起仔猪急性腹泻,具有高死亡率,给全国养猪业造成巨大经济损失。因此,开展 PEDV 复制相关基础研究具有重要意义。Xu 等<sup>[4]</sup>研究发现, PEDV 通过其核衣壳蛋白(N)与宿主转录因子 Sp1 结合能够抑制 HDAC1 的表达以促进 PEDV 的复制。石达<sup>[5]</sup>在研究宿主蛋白 NPM1 对病毒复制的作用中发现,受 PEDV 感染的细胞中 NPM1 蛋白表达显著上调,进一步研究发现 N 蛋白和 NPM1 蛋白相互作用能够上调细胞的抗凋亡能力,从而促进病毒的复制。目前虽已发现多种与 PEDV 复制相关宿主基因,但 PEDV 的受体仍未明确,而继续挖掘病毒复制相关基因,寻找与病毒复制相关的关键宿主因子,并通过抗病育种途径培育抗 PEDV 品种/品系猪,是从根本上抵御该病毒感染的重要途径。以 CRISPR/Cas9 高通量筛选策略为基

础的分子设计育种能够实现畜禽抗病力的快速改良,现已广泛应用于遗传育种研究中,但针对 PEDV 的研究尚未见报道。前期研究证实, PEDV 可有效感染人肝癌细胞系 Huh-7<sup>[6]</sup>。为此,本研究基于 CRISPR/Cas9 系统构建 Huh-7 全基因组敲除文库,并结合高通量筛选全面系统地挖掘 PEDV 复制相关候选基因,以期培育靶向抗病品系提供科学参考和理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞和病毒

人的全基因组 CRISPR/Cas9 sgRNA 质粒文库购自 Addgene 网站(Addgene #1000000048);人胚胎肾细胞(HEK-293T)、人肝癌细胞(Huh-7)和猪小肠上皮细胞(IPEC-J2)由本实验室保存;猪流行性腹泻病毒株(AH2012/12)由本实验室分离并扩大培养(GenBank 登录号为 KU646831)。

### 1.2 主要试剂和仪器

DMEM 高糖培养基和胎牛血清及脂质体转染试剂盒 Lipofectimine<sup>TM</sup> 3000, Thermo Fisher 公司;细胞基因组 DNA 提取试剂盒,天根生化科技(北京)有限公司;Premix Ex Taq Hot Start Version, TaKaRa 公司;FastPure Cell/Tissue Total RNA Isolation Kit V2、Phanta Max Master Mix HiScript II 1st Strand cDNA Synthesis Kit 和 ChamQ SYBR qPCR Master Mix, 南京诺唯赞生物科技有限公司;PEDV-N 蛋白鼠单克隆抗体由本实验室保存;GAPDH 兔多克隆抗体,Proteintech 公司;ITGA11 兔多克隆抗体,艾博抗(上海)贸易有限公司;RIPA(强)裂解液、HRP 标记山羊抗鼠 IgG (H+L)、HRP 标记山羊抗兔 IgG (H+L)和 BCA 蛋白定量试剂盒,碧云天生物技术公司;FITC Conjugated AffiniPure Goat Anti-mouse IgG (H+L), 武汉博士德生物工程有限公司;引物由

生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

高速冷冻离心机, 上海 ScanSpeed 公司; 全自动化学发光图像分析系统, 上海天能科技有限公司; 荧光定量 PCR 仪, Thermo Fisher 公司; 酶标仪, Bio-Rad 公司。

### 1.3 制备全基因组 CRISPR/Cas9 敲除细胞库

#### 1.3.1 构建全基因组 CRISPR/Cas9 敲除质粒文库

人的全基因组 CRISPR/Cas9 sgRNA 质粒文库由 Sanjana 等<sup>[7]</sup>提交至 Addgene 网站, 针对人类 19 050 个基因设计共计 123 411 条 sgRNA 靶向序列, 分为 A 库(65 383 条 sgRNA)和 B 库(58 028 条 sgRNA)。A 文库和 B 文库都包含 1 000 个对照 sgRNA, 这些对照 sgRNA 不靶向任何基因组。利用高通量合成与克隆方法将 A 和 B 质粒文库连接至 lentiCRISPRv2 慢病毒表达载体(Addgene #52961)。

#### 1.3.2 慢病毒包装及滴度测定

取生长状态良好的 HEK-293T 细胞接种至 10 cm 细胞培养皿, 当细胞汇合度达到 80%–90%时将 12 μg 文库质粒、4 μg pMD2.G 质粒和 8 μg psPAX2 质粒共转染于 HEK-293T 细胞中, 6 h 后更换为 DMEM 高糖完全培养基(体积分数 10%胎牛血清), 继续培养 60 h 后收集病毒上清液, 4 °C、3 000 r/min 离心 10 min, 将上清转移到新的离心管中, 4 °C、12 000 r/min 离心 30 min, 然后用 0.22 μm 滤器过滤, 分装后置于–80 °C 冰箱保存, 同时进行慢病毒滴度测定。

#### 1.3.3 慢病毒 sgRNA 文库感染 Huh-7 细胞系

取生长状态良好的 Huh-7 细胞接种于 10 cm 细胞培养皿, 待细胞融合度达到 60%左右, 按照感染复数(multiplicity of infection, MOI)=0.4 感染  $3 \times 10^7$  个 Huh-7 细胞进行慢病毒感染, 同时感染上清液中加入 8 μg/mL 嘌呤霉素(puromycin)进行筛选, 培养至 12 h 更换为正常培养基。为

排除未感染细胞的影响, 48 h 后加入 1 μg/mL 的嘌呤霉素, 连续筛选 1 周, 得到全基因组敲除细胞库。

### 1.4 全基因组 CRISPR/Cas9 敲除细胞库验证

利用 PCR 及 DNA 测序对全基因组 CRISPR/Cas9 敲除细胞库进行验证。收集全基因组 CRISPR/Cas9 敲除细胞并提取基因组 DNA, 针对 lentiCRISPRv2 载体区间序列设计引物, 扩增区间包含 sgRNA 序列。引物序列为: F: 5'-GAGGGCCTATTTCCCATGATTCC-3'; R: 5'-CACGGCGACTACTGCACTTATATAC-3'。

以基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增。PCR 反应体系: Premix Ex Taq Hot Start Version 25 μL, 上、下游引物(1 μmol/L)各 1 μL, 模板 1 μg, 加 ddH<sub>2</sub>O 补足 50 μL。PCR 反应条件: 94 °C 2 min; 94 °C 30 s, 58 °C 30 s, 72 °C 1 min, 40 个循环; 72 °C 10 min。PCR 扩增产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 并进行切胶回收, 回收产物用于高通量测序。

### 1.5 利用全基因组 CRISPR/Cas9 敲除文库筛选 PEDV 复制相关基因

Huh-7-Cas9-KO 细胞以  $1 \times 10^6$  个细胞铺于 T25 细胞培养瓶中, 待细胞长满单层后, 吸弃培养基并使用无菌 PBS 洗涤 3 次, 加入含 100 TCID<sub>50</sub> PEDV 变异株 AH2012/12 和 3 μg/mL 胰酶无血清培养基孵育细胞, 37 °C 作用 2 h 后补充含 2.5 μg/mL 胰酶无血清培养基至 7 mL, 放回细胞培养箱(37 °C、5% CO<sub>2</sub>)继续培养。同时设置 Huh-7-Cas9-NC 细胞为对照组, 当对照组细胞全部死亡, 收集敲除细胞组存活的细胞进行扩大培养。待细胞生长至一定数量后, 再次以相同剂量 PEDV AH2012/12 病毒毒株进行感染, 最终收集并扩增第 3 轮感染后存活细胞, 经基因组 DNA 提取后送至苏州泓迅生物科技股份有限公司测序。利用 MAGeCK Flute 分析

富集到的 sgRNA reads 进行排序绘制散点图, 筛选出参与 PEDV 复制的关键宿主基因。

### 1.6 候选基因功能与通路富集分析

采用 DAVID 数据库(<https://david.ncifcrf.gov>) 对通过 3 轮 PEDV 筛选获得的 sgRNA 对应的靶基因按照  $\text{pos|score}$  排序, 并以  $\text{pos|p-value}<0.01$ 、 $\text{pos|lfc}>2$  为依据得到的 120 个候选基因进行基因本体(Gene Ontology, GO)富集分析和京都基因与基因组百科全书(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG)通路富集分析。利用 R 软件中 GO plot 包使 GO 富集结果可视化, 最后使用 ggplot2 包绘制气泡图。

### 1.7 PEDV 复制相关候选基因的验证

由广州锐博生物科技有限公司设计并合成 6 个候选基因干扰片段(表 1)。将 IPEC-J2 细胞加入 24 孔细胞板, 待细胞汇合度达 70%时, 更换新鲜的培养基(不含抗生素), 同时根据脂质体 Lipofectamine™ 3000 说明书配制转染体系, siRNA 终浓度为 50 nmol/L, 并逐滴加入培养板, 在滴加的同时轻轻混匀培养基, 置于细胞培养箱中培养 24 h。

取出细胞培养板, 弃培养基并用无菌 PBS 洗涤 3 次, 将 PEDV AH2012/12 病毒毒株以 MOI=1 的剂量接种, 每孔加入 200  $\mu\text{L}$  病毒和病毒维持液(含有 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  胰酶的无血清培养基), 吸附 2 h 后每孔补病毒维持液至 500  $\mu\text{L}$ , 36 h 后提取细胞总 RNA 和蛋白质。

实时定量 PCR (real-time quantitative PCR, RT-qPCR)检测 PEDV mRNA 表达水平。细胞总 RNA 提取和 cDNA 合成参照 FastPure Cell/Tissue Total RNA Isolation Kit V2 及 HiScript II Q RT SuperMix for qPCR (+gDNA wiper)反转录酶说明书进行, 使用 ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix 试剂检测 PEDV-N mRNA 表达水平。引物序列为: PEDV-N-F:

5'-CGCAAAGACTGAACCCACTAACTT-3'; PEDV-N-R: 5'-TT GCCTCTGTTGTTACTCGGG GAT-3'。

Western blotting 检测 PEDV 蛋白水平变化。取 100  $\mu\text{g}$  总蛋白加入 5 $\times$ 载样缓冲液(loading buffer), 100  $^{\circ}\text{C}$ 变性 8–10 min, 瞬时离心后进行 SDS-PAGE 电泳, 转膜封闭后分别加入 ITGA11 兔多抗(稀释度 1:500)、PEDV-N 鼠单抗(稀释度 1:500)和内参抗体 GAPDH (稀释度 1:10 000) 4  $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。使用 PBST 缓冲液清洗 3 次, 每次 30 min, 加入相应二抗(稀释度 1:10 000), 常温孵育 1.5 h, PBST 清洗 3 次, 每次 30 min, 最后进行显色曝光。

### 1.8 ITGA11 对 PEDV 复制的影响

IPEC-J2 细胞转染 si-ITGA11 24 h 后, 将 PEDV AH2012/12 病毒毒株以 MOI=1 的剂量接种。RT-qPCR 检测 *ITGA11* mRNA 表达水平, Western blotting 检测 ITGA11 及 PEDV 蛋白水平变化, 操作同 1.7。

#### 1.8.1 免疫荧光检测 PEDV-N 表达情况

细胞感染 PEDV 36 h 后, 加入预冷的无水乙醇,  $-20^{\circ}\text{C}$ 固定 30 min; PBS 清洗 3 次, 5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h; PBS 清洗 3 次, 加入一抗 PEDV-N 鼠单抗(稀释度 1:500), 37  $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h; PBS 清洗 3 次后, 加入二抗 FITC Conjugated AffiniPure Goat Anti-mouse IgG (H+L) (稀释度 1:500), 37  $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 30 min; PBS 清洗 3 次后, 加入 DAPI 染色剂(1:2 000)进行核染, 室温避光孵育 10 min; PBS 清洗 3 次后, 抗荧光淬灭剂封片, 利用激光共聚焦显微镜观察绿色荧光数量及分布并拍照记录。

#### 1.8.2 TCID<sub>50</sub> 检测 PEDV 滴度水平

将 IPEC-J2 细胞铺于 96 孔板, 待细胞长满单层后吸弃培养基, 使用无菌 PBS 洗 3 遍, 将收获的病毒上清液于 8 000 r/min 离心 5 min 后用 0.45  $\mu\text{m}$  分子筛过滤, 利用含 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  胰酶的高糖 DMEM 进行梯度稀释( $10^{-1}$ – $10^{-8}$ ), 每个

表 1 siRNA 干扰序列信息

Table 1 Information of siRNA sequences

Gene name	siRNA sequence (5'→3')
<i>ITGAI1</i>	GCGAATACGTCCTGTAACA
<i>RPA2</i>	GGCTTGTCCAAGACCTGAA
<i>KIF2C</i>	GACCTAGAGACCTTTGTGA
<i>MCL1</i>	CAGTACGGATGGGTCACCTA
<i>PARP1</i>	GTGACTTTGCAGCAGAGTA
<i>SLC18A1</i>	GTGTCTACACCGATGACCA

梯度设 16 个重复孔,同时设置不含病毒液细胞为阴性对照。每 12 h 观察记录细胞病变情况,6 d 后统计病变细胞孔数,利用 Reed-Muench 两氏法计算病毒的半数组织培养感染剂量 (tissue culture infective dose,  $TCID_{50}$ )。

### 1.9 数据统计与分析

使用 SPSS 19.0 对试验数据进行独立样本  $t$  检验分析,结果以“平均值±标准误”表示,应用 GraphPad Prism 6.0 软件对数据进行绘图。\*:  $P < 0.05$  为差异显著; \*\*:  $P < 0.01$  为差异极显著。

## 2 结果与分析

### 2.1 制备全基因组 CRISPR/Cas9 敲除细胞库

人的全基因组 CRISPR/Cas9 sgRNA 质粒文库分为 A 库和 B 库,数量级约为  $1 \times 10^5$ 。为保证感染过程中 sgRNA 的丰度和分布均匀,参照 Joung 等<sup>[8]</sup>方法,成功制备滴度为  $1 \times 10^7$  TU/mL 的慢病毒,随后按照 0.4 MOI 感染  $3 \times 10^7$  个 Huh-7 细胞进行慢病毒感染,最终得到全基因组 CRISPR/Cas9 敲除细胞库。

为检测全基因组 CRISPR/Cas9 敲除细胞库是否构建成功,提取敲除细胞库基因组 DNA,PCR 扩增 sgRNA 区域。PCR 产物直接测序显示在 sgRNA 序列区域,4 种碱基信号值较接近,基本符合 ATGC 平均分配的原则。与来自 Addgene 网站的参考文库相比,质粒文库 A 和 B 分别含有

98.64%和 97.87%的 sgRNA。由于 sgRNA 可能靶向细胞存活所必需的宿主基因或在细胞培养过程中丢失,因此,细胞文库 A 和 B 分别仅含有参考文库覆盖度的 78.76%和 75.54% (图 1)。随后,将细胞文库 A 和 B 合成为全基因组 CRISPR/Cas9 敲除细胞库,即具有足够覆盖 sgRNA 的文库,用于筛选 PEDV 复制相关基因。

### 2.2 利用全基因组 CRISPR/Cas9 敲除文库筛选 PEDV 复制相关基因

通过 MAGeCK Flute 分析 sgRNA reads 的倍数变化进行排序绘制散点图 (图 2)。结果显示,富集到排名前 10 的 sgRNA 对应的靶基因分别为 *FICD*、*MCL1*、*VAT1L*、*MTIX*、*MYO10*、*PARP1*、*ITGAI1*、*ENTPD2*、*CCNT2* 和 *RPS27A*。本次筛选中,富集到 reads > 10 000 的 sgRNA 有 16 个,reads > 1 000 的 sgRNA 有 20 个。

### 2.3 候选基因功能与通路富集分析结果

通过 DAVID 数据库对候选基因进行 GO 和 KEGG 分析 (图 3)。GO 分析结果显示,这些靶基因主要参与的生物过程包括双键断裂修复、有丝分裂细胞周期负调控和程序性细胞凋亡等过程。利用 KEGG 通路数据库进行信号通路的

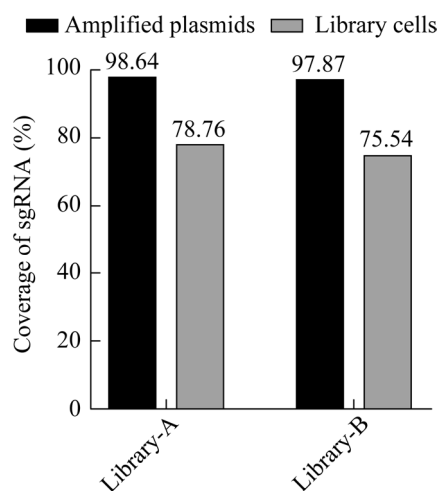


图 1 扩增质粒文库和细胞文库的覆盖率图

Figure 1 Coverage of amplified plasmid library and cell library.

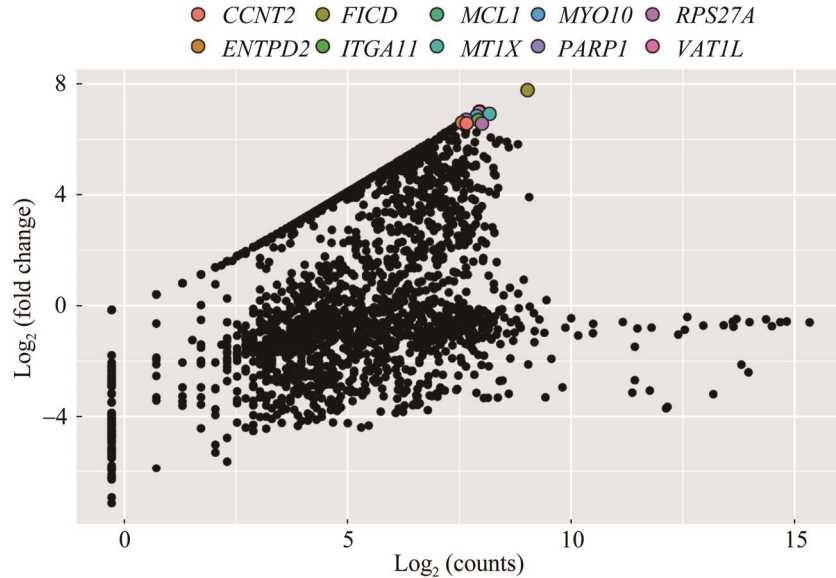


图2 基因分布散点图 Huh-7-Cas9-KO 细胞经3轮 PEDV 筛选富集到的 sgRNA 靶序列的频率和富集程度(PEDV 感染组 vs. mock 组);  $\text{Log}_2(\text{fold change})$  为 PEDV 感染组与 mock 组标准化 sgRNA 计数之间的中值  $\text{Log}_2$  比值

Figure 2 Scatter plot of the distribution of candidate genes. Scatter plot shows the frequencies and the enrichment degrees of sgRNA-targeted sequences enriched by three rounds of PEDV screening in Huh-7-Cas9-KO cells (mock-treated versus PEDV infected);  $\text{Log}_2(\text{fold change})$  is the median  $\text{Log}_2$  ratio of normalized sgRNA count between PEDV challenged group and mock-treated populations.

富集, 寻找所富集的信号通路, 分析显示这些靶基因主要参与细胞凋亡、肿瘤转录调控和线粒体自噬等信号通路, 以及富集程度较高、几乎所有肿瘤都会发生异常的细胞周期通路。

#### 2.4 PEDV 复制相关候选基因的验证结果

由于筛选到多个候选基因参与细胞凋亡代谢过程, 而且有研究表明它们能够介导肿瘤代谢及多种病毒的黏附和入侵<sup>[9-11]</sup>, 因此选择了富集排名靠前的整合素  $\alpha 11$  (integrin  $\alpha 11$ , *ITGA11*)、哺乳动物复制蛋白 A2 (replication protein A2, *RPA2*)、驱动蛋白家族成员 2A (kinesin family member 2A, *KIF2A*)、诱导髓系白血病细胞分化蛋白 (induced myeloid leukemia cell differentiation protein 1, *MCL1*)、多聚 ADP 核糖化酶 [poly (ADP-ribose) polymerase 1, *PARP1*] 和囊泡单胺转运蛋白 1 (vesicular monoamine transporter, *SLC18A1*) 基因进行 PEDV 复制相关验证。结果显示, 与无关对照

si-NC 相比, *ITGA11* 基因在干扰后 PEDV-N mRNA (图 4A) 及蛋白 (图 4B) 水平显著降低 ( $P < 0.01$ ), 说明 *ITGA11* 基因可能为 PEDV 复制相关基因; 干扰 *KIF2C*、*MCL1* 及 *SLC18A1* 基因后, PEDV 的 mRNA 拷贝数及蛋白水平均有所下调, 但差异不显著 ( $P > 0.01$ ), 而 *RPA2* 及 *PARP1* 在干扰后与对照组 mRNA 及蛋白水平无明显差异, 说明二者可能并不直接参与 PEDV 在宿主细胞中的复制。

#### 2.5 ITGA11 能够促进 PEDV 的复制

为进一步验证 *ITGA11* 对 PEDV 复制的影响, 对猪源靶向细胞 IPEC-J2 细胞转染 si-*ITGA11* 后接毒, 采用 RT-qPCR 测定 *ITGA11* mRNA 相对表达量, Western blotting 检测 *ITGA11* 和 PEDV-N 蛋白表达情况。结果显示, 与 si-NC 相比, 转染 *ITGA11* 干扰片段能显著降低 *ITGA11* mRNA 表达量 ( $P < 0.01$ ) (图 5A), 并且有效减少 *ITGA11* 和

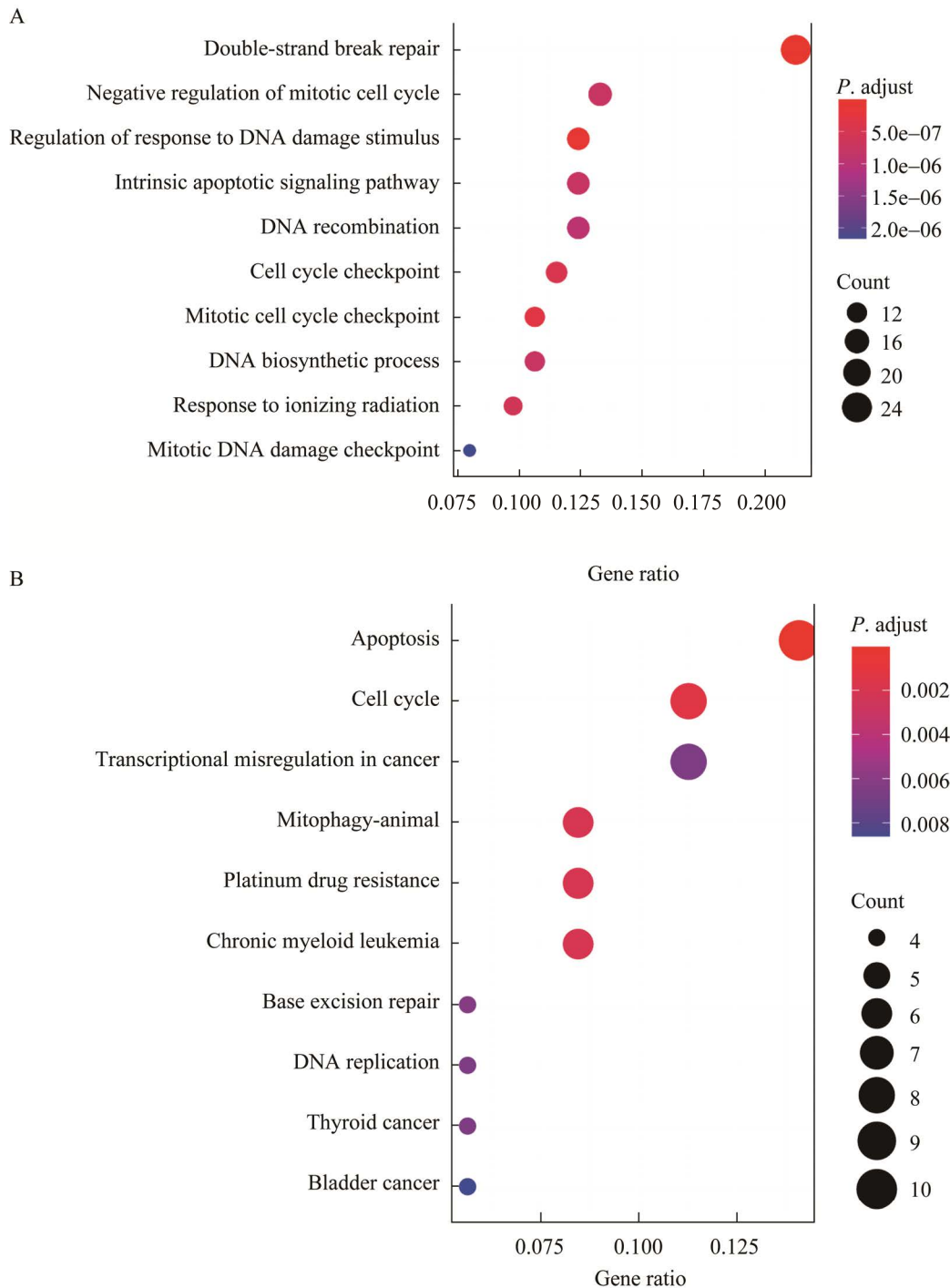


图3 候选基因 GO 和 KEGG 富集分析图 A: 候选基因 GO 分析气泡图; B: 候选基因 KEGG 富集分析气泡图

Figure 3 Enrichment analysis of candidate gene GO and KEGG. A: Bubble chart of candidate gene GO analysis; B: Bubble chart of candidate gene KEGG enrichment analysis.



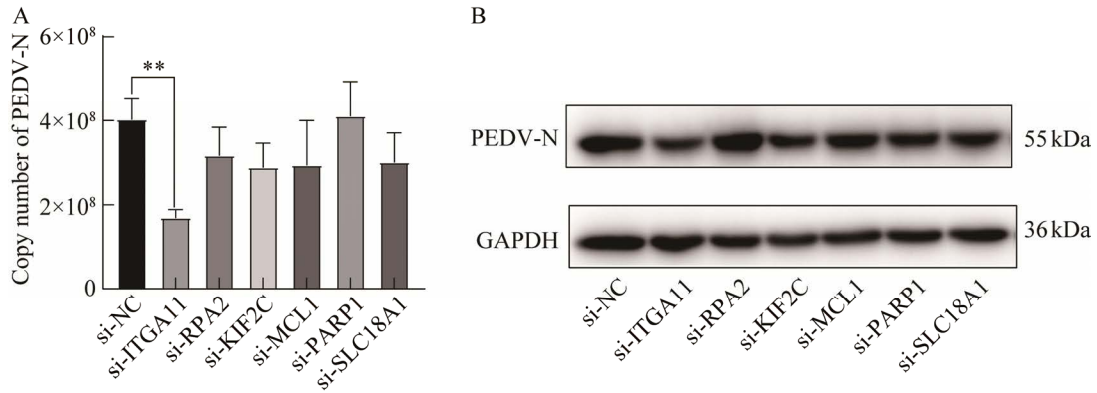


图4 PEDV复制相关候选基因的验证 A: 候选基因转染干扰片段后对PEDV-N拷贝数变化; B: 候选基因转染干扰片段后对PEDV-N蛋白变化; \*\*: 表示具有极显著差异( $P < 0.01$ )

Figure 4 Validation of candidate genes related to PEDV replication. A: Changes in the copy number of PEDV-N after candidate gene transfection with interference fragments; B: Changes in PEDV-N protein after candidate gene transfection with interference fragments; \*\*: Significant difference ( $P < 0.01$ ).

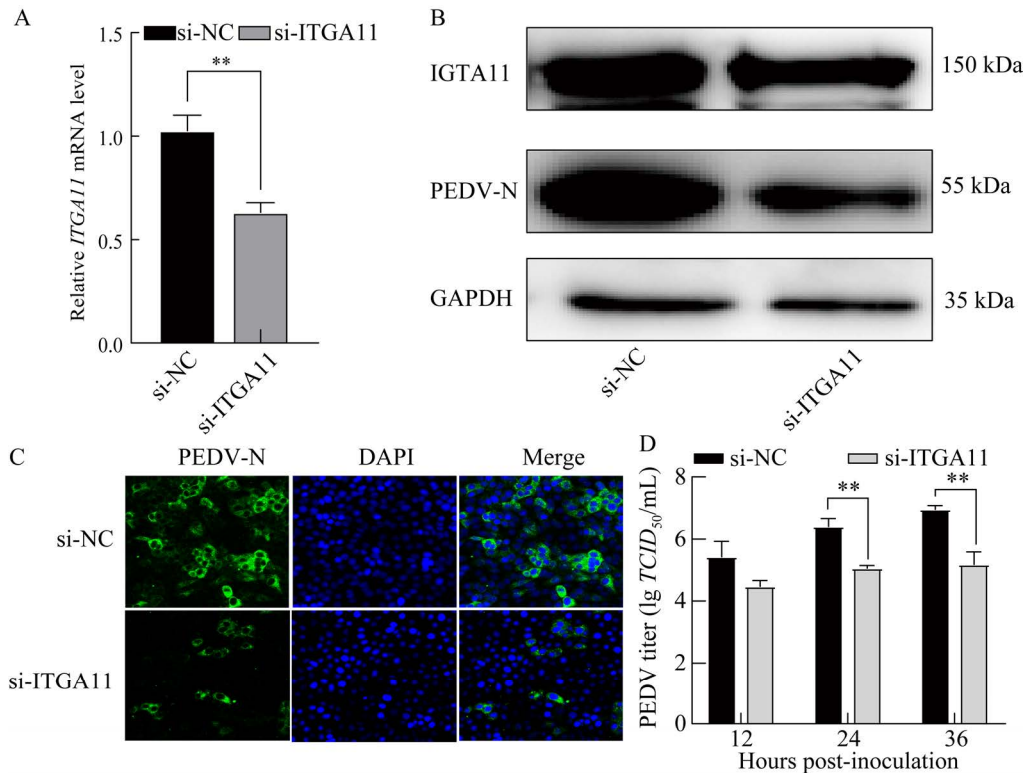


图5 ITGA11促进PEDV的复制 A: 转染si-ITGA11后接毒对*ITGA11* mRNA表达的影响; B: 转染si-ITGA11后接毒对ITGA11和PEDV-N蛋白的影响; C: 转染si-ITGA11后接毒对PEDV-N的激光共聚焦观察; D: PEDV感染不同时间后子代病毒滴度测定; \*\*: 表示具有极显著差异( $P < 0.01$ )

Figure 5 Role of ITGA11 in promoting the replication of PEDV. A: Effect of transfection with si-ITGA11 followed by exposure on *ITGA11* mRNA expression; B: Effect of transfection with si-ITGA11 followed by exposure on ITGA11 and PEDV-N protein; C: Confocal laser observation of PEDV-N after si-ITGA11 transfection; D: Detection of virus titer at different time intervals post infection with PEDV; \*\*: Statistically significant difference ( $P < 0.01$ ).

PEDV-N 的蛋白表达水平(图 5B); 同时, PEDV 感染 si-ITGA11 组细胞中绿色荧光标记的量子点明显减少, 表明干扰 *ITGA11* 可抑制 PEDV 的增殖(图 5C)。IPEC-J2 细胞感染 PEDV 不同时间收集病毒液, 使用 Reed-Muench 法测定子代病毒  $TCID_{50}$ 。结果如图 5D 所示, 与对照组相比, PEDV 感染细胞 24 h 和 36 h 时子代病毒滴度显著下降, 表明干扰 *ITGA11* 基因能够减少子代病毒颗粒的形成与释放, 抑制 PEDV 在宿主细胞的复制, 证实 *ITGA11* 具有促进 PEDV 复制作用。

### 3 讨论与结论

构建全基因组 CRISPR/Cas9 敲除细胞库时, 物种的基因组注释是否完善对筛选的准确性十分重要, 不完善的基因组注释会给 sgRNA 文库的设计带来很大困扰。与猪相比, 人的基因组注释体系更加成熟, 具有较为完善的 sgRNA 文库, 能够大大节省科研时间精力。因此, 本研究构建了人肝癌细胞 Huh-7 全基因组 CRISPR/Cas9 敲除细胞库, 为重要表型筛选提供了技术支撑和筛选平台。为确保筛选的准确性, 在设计 sgRNA 文库时, 一个基因分别设计 6 条 sgRNA, 这大大降低了由于各种因素导致的基因组不稳定性和假阳性候选基因的产生<sup>[12-13]</sup>。然而, 在整个筛选过程中, 为扩大富集 sgRNA 的数量, 需要对全基因组 CRISPR/Cas9 敲除细胞库进行传代操作, 该过程会导致细胞丢失从而影响 sgRNA 的丰度, 因此本研究得到的 sgRNA 敲除细胞库覆盖率低于 80%。

2020 年初, 随着新型冠状病毒(corona virus disease-2019, COVID-19)将病毒性疾带入公众视野, 病毒性人畜共患病再次成为人们关注的焦点, 研究病毒感染机制并发现病毒-宿主相互作用的新靶点将有助于开发新的抗病毒猪品

种<sup>[14]</sup>。Zhang 等<sup>[15]</sup>基于全基因组 CRISPR/Cas9 筛选验证了 9 个参与黄病毒感染的宿主基因, 其中, 内质网相关信号肽酶复合物(signal peptidase complex subunit, SPCS)基因敲除后可显著降低几乎所有黄病毒科病毒的复制水平。在丙型肝炎病毒(hepatitis c virus, HCV)研究中, CRISPR/Cas9 筛选到已报道的 HCV 入侵受体、RNA 结合蛋白及代谢相关酶等多种宿主因子<sup>[16]</sup>, 说明 CRISPR/Cas9 筛选具有较强的特异性及可靠性。本研究结合反向遗传筛选策略, 利用 PEDV 感染 Huh-7 敲除细胞库, 收集所有存活的细胞进行高通量测序, 通过 MAGeCK Flute 分析富集到的 sgRNA reads 进行排序绘制散点图, 最终筛选到参与 PEDV 复制的关键宿主基因。在所有的候选基因中, 我们筛选到了 2 个已知病毒复制相关候选基因, 即核蛋白基因 *RPS27a*<sup>[9]</sup> 和诱导髓系白血病细胞分化蛋白基因 *MCL1*<sup>[10]</sup>, 说明本筛选系统可信度较高。此外, 我们也富集到参与肿瘤合成和代谢过程的重要基因, 包括 DNA 拓扑异构酶 II  $\beta$  结合蛋白 1 (*TopBP1*)、*RPA2*、*KIF2A*、*SLC18A1* 和 *ITGA11*。(1) *TopBP1* 在人和牛乳头瘤病毒基因组复制中起重要作用, 其能够定位于离散的核病灶, 并与乳头瘤病毒 E2 蛋白复合, 在 G1/S 和早期 S 期被招募到病毒复制起点的区域<sup>[11]</sup>。(2) 尿嘧啶 DNA 糖基化酶与 RPA 复合物的 p32 亚基相互作用能够调节 HIV-1 逆转录从而促进病毒传播<sup>[17]</sup>, 同时有研究通过 COPD 发现 *RPA2* 是参与 COVID-19 的关键基因<sup>[18]</sup>。(3) *KIF2A* 是驱动蛋白家族成员之一<sup>[19-21]</sup>, 吴炜等<sup>[22]</sup>研究报道, 敲降 *KIF2A* 可抑制 PI3K/AKT 信号通路的激活, 从而抑制结直肠癌细胞恶性增殖、迁移能力, 促进其凋亡。(4) *SLC18A1* 常见于结直肠癌中, 可作为生物标志物<sup>[23]</sup>。(5) *ITGA11* 是一种可识别胶原蛋白中 GFOGER (O=羟脯氨酸)序列的

胶原蛋白受体。有研究表明<sup>[24]</sup>, *ITGA11* 在癌症相关成纤维细胞的促肿瘤发生亚型中显著上调。本文通过基因干扰和检测病毒效价等相关试验,初步验证 *ITGA11* 基因干扰后能够显著抑制 PEDV 的复制。另有研究报道<sup>[25]</sup>, I 型干扰素能够诱导 T98G 细胞中 *ITGA11* 的 mRNA 及蛋白水平升高,说明 *ITGA11* 是一种新的干扰素刺激基因,但 *ITGA11* 是否通过调节 I 型干扰素进而影响 PEDV 的复制尚未见报道。本文首次利用全基因组 CRISPR/Cas9 文库方法筛选到 *ITGA11* 可能作为关键基因参与 PEDV 在宿主细胞中的复制。此外,由于受到候选基因干扰片段设计效果、转染条件及不同 PEDV 毒株的感染等影响,*ITGA11* 是否为 PEDV 复制必需基因,以及该基因如何调控 PEDV 在宿主细胞的增殖仍需进一步研究。

综上所述,本研究通过全基因组 CRISPR/Cas9 敲除文库发现 *ITGA11* 为 PEDV 复制相关基因,而且在干扰后能显著降低 PEDV-N mRNA 及蛋白质表达水平。上述研究表明, *ITGA11* 基因可作为制备抗 PEDV 猪种的潜在靶基因。

## REFERENCES

- [1] Doudna JA, Charpentier E. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9[J]. *Science*, 2014, 346(6213): e1258096
- [2] Ma HM, Dang Y, Wu YG, Jia GX, Anaya E, Zhang JL, Abraham S, Choi JG, Shi GJ, Qi L, Manjunath N, Wu HQ. A CRISPR-based screen identifies genes essential for west-nile-virus-induced cell death[J]. *Cell Reports*, 2015, 12(4): 673-683
- [3] Sun LM, Zhao CZ, Fu Z, Fu YN, Su ZL, Li YY, Zhou Y, Tan YB, Li JJ, Xiang YX, Nie XW, Zhang JF, Liu F, Zhao SH, Xie SS, Peng GQ. Genome-scale CRISPR screen identifies TMEM41B as a multi-function host factor required for coronavirus replication[J]. *PLoS Pathogens*, 2021, 17(12): e1010113
- [4] Xu JD, Mao JY, Han X, Shi FS, Gao Q, Wang TJ, Zhang ZN, Shan Y, Fang WH, Li XL. Porcine epidemic diarrhea virus inhibits HDAC1 expression to facilitate its replication via binding of its nucleocapsid protein to host transcription factor Sp1[J]. *Journal of Virology*, 2021, 5(18): e0085321
- [5] 石达. 宿主蛋白 NPM1、EB3 和 HSP47 对 PEDV 复制影响[D]. 北京: 中国农业科学院博士学位论文, 2015  
Shi D. The influence of host protein NPM1, EB3 and HSP47 on the replication of PEDV[D]. Beijing: Doctoral Dissertation of Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2015 (in Chinese)
- [6] Fan BC, Peng Q, Song SY, Shi DY, Zhang X, Guo WL, Li YC, Zhou JZ, Zhu XJ, Zhao YX, Guo RL, He KW, Fan HY, Ding SY, Li B. Nonstructural protein 1 of variant PEDV plays a key role in escaping replication restriction by complement C3[J]. *Journal of Virology*, 2022, 96(18): e0102422
- [7] Sanjana NE, Shalem O, Zhang F. Improved vectors and genome-wide libraries for CRISPR screening[J]. *Nature Methods*, 2014, 11(8): 783-784
- [8] Joung J, Konermann S, Gootenberg JS, Abudayyeh OO, Platt RJ, Brigham MD, Sanjana NE, Zhang F. Genome-scale CRISPR-Cas9 knockout and transcriptional activation screening[J]. *Nature Protocols*, 2017, 12(4): 828-863
- [9] Contin R, Arnoldi F, Mano M, Burrone OR. Rotavirus replication requires a functional proteasome for effective assembly of viroplasm[J]. *Journal of Virology*, 2011, 85(6): 2781-2792
- [10] Du HX, Zhu JQ, Chen J, Zhou HF, Yang JH, Wan HT. Revealing the therapeutic targets and molecular mechanisms of emodin-treated coronavirus disease 2019 via a systematic study of network pharmacology[J]. *Aging*, 2021, 13(11): 14571-14589
- [11] Kanginakudru S, DeSmet M, Thomas Y, Morgan IM, Androphy EJ. Levels of the E2 interacting protein TopBP1 modulate papillomavirus maintenance stage replication[J]. *Virology*, 2015, 478: 129-135
- [12] 赵长志. 猪全基因组 CRISPR/Cas9 敲除文库的构建及筛选病毒抗性关键宿主因子[D]. 武汉: 华中农业大学博士学位论文, 2019  
Zhao CZ. Construction of pig genome-scale CRISPR/Cas9 knock-out library and screen for key host factors for virus resistance[D]. Wuhan: Doctoral Dissertation of Huazhong Agricultural University, 2019 (in Chinese)
- [13] Shalem O, Sanjana NE, Hartenian E, Shi X, Scott DA, Mikkelsen T, Heckl D, Ebert BL, Root DE, Doench JG, Zhang F. Genome-scale CRISPR-Cas9 knockout screening in human cells[J]. *Science*, 2014, 343(6166):

- 84-87
- [14] 刘海龙. 聚焦型 CRISPR 敲除文库筛选参与乙型肝炎病毒复制的内质网相关蛋白及其功能研究[D]. 武汉: 华中农业大学硕士学位论文, 2020
- Liu HL. Identification of endoplasmic reticulum-associated proteins involved in JEV replication by a focused CRISPR knockout library[D]. Wuhan: Master's Thesis of Huazhong Agricultural University, 2020 (in Chinese)
- [15] Zhang R, Miner JJ, Gorman MJ, Rausch K, Ramage H, White JP, Zuiani A, Zhang P, Fernandez E, Zhang Q, Dowd KA, Pierson TC, Cherry S, Diamond MS. A CRISPR screen defines a signal peptide processing pathway required by flaviviruses[J]. *Nature*, 2016, 535(7610): 164-168
- [16] Marceau CD, Puschnik AS, Majzoub K, Ooi YS, Brewer SM, Fuchs G, Swaminathan K, Mata MA, Elias JE, Sarnow P, Carette JE. Genetic dissection of flaviviridae host factors through genome-scale CRISPR screens[J]. *Nature*, 2016, 535(7610): 159-163
- [17] Herate C, Vigne C, Guenzel CA, Lambele M, Rouyez MC, Benichou S. Uracil DNA glycosylase interacts with the p32 subunit of the replication protein A complex to modulate HIV-1 reverse transcription for optimal virus dissemination[J]. *Retrovirology*, 2016, 13: 26
- [18] Sharma P, Pandey AK, Bhattacharyya DK. Determining crucial genes associated with COVID-19 based on COPD findings [J]. *Computers in Biology and Medicine*, 2021, 128: 104126
- [19] Sheng N, Xu YZ, Xi QH, Jiang HY, Wang CY, Zhang Y, Ye Q. Overexpression of KIF2A is suppressed by miR-206 and associated with poor prognosis in ovarian cancer[J]. *Cellular Physiology and Biochemistry: International Journal of Experimental Cellular Physiology, Biochemistry, and Pharmacology*, 2018, 50(3): 810-822
- [20] Xie T, Li XY, Ye F, Lu CX, Huang HT, Wang F, Cao XL, Zhong CJ. High KIF2A expression promotes proliferation, migration and predicts poor prognosis in lung adenocarcinoma[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2018, 497(1): 65-72
- [21] Wang JL, Ma SQ, Ma R, Qu X, Liu WJ, Lv CX, Zhao S, Gong YY. KIF2A silencing inhibits the proliferation and migration of breast cancer cells and correlates with unfavorable prognosis in breast cancer[J]. *BMC Cancer*, 2014, 14: 461
- [22] 吴炜, 李延宏. 驱动蛋白家族成员 2A 与结直肠癌临床特征/预后的关联及其对癌细胞增殖/侵袭的调控作用[J]. *转化医学杂志*, 2021, 10(3): 140-146, 150
- Wu W, Li YH. Correlation of kinesin family 2A with clinicopathological features/prognosis, and its effect on cell proliferation/migration in colorectal cancer[J]. *Translational Medicine Journal*, 2021, 10(3): 140-146, 150 (in Chinese)
- [23] 李振丽. 基于 SNP 芯片技术的结直肠癌全基因组罕见拷贝数变异研究及相关基因的临床意义探索[D]. 杭州: 浙江大学博士学位论文, 2016
- Li ZL. SNP array-based genome-wide assessment of rare copy number variants in colorectal cancer and exploration of clinical significance of relevant genes[D]. Hangzhou: Doctoral Dissertation of Zhejiang University, 2016 (in Chinese)
- [24] Grella A, Kole D, Holmes W, Dominko T. FGF2 overrides TGF $\beta$ 1-driven integrin ITGA11 expression in human dermal fibroblasts[J]. *Journal of Cellular Biochemistry*, 2016, 117(4): 1000-1008
- [25] Leomil Coelho LF, Mota BEF, Sales PCM, Marques JT, de Oliveira JG, Bonjardim CA, Peregrino Ferreira PC, Kroon EG. Integrin alpha 11 is a novel type I interferon stimulated gene[J]. *Cytokine*, 2006, 33(6): 352-361