



李华玮,王旭英,井汇源,万博,乔宏兴,郭科威,侯文静. *eIF5A* 基因敲除 MARC-145 多克隆细胞系的建立及其对 PRRSV 增殖的影响[J]. 中国农业大学学报, 2023,28(07):122-129.

Li Huawei, Wang Xuying, Jing Huiyuan, Wan Bo, Qiao Hongxing, Guo Kewei, Hou Wenjing. Establishment of *eIF5A* gene knockout polyclonal MARC-145 cell line and its effect on PRRSV infection[J]. *Journal of China Agricultural University*, 2023, 28(07): 122-129.

DOI: 10.11841/j.issn.1007-4333.2023.07.11

## *eIF5A* 基因敲除 MARC-145 多克隆细胞系的建立及其对 PRRSV 增殖的影响

李华玮<sup>1,2</sup> 王旭英<sup>3</sup> 井汇源<sup>3</sup> 万博<sup>4</sup> 乔宏兴<sup>3</sup> 郭科威<sup>4</sup> 侯文静<sup>2</sup>

(1. 河南牧业经济学院 食品与生物工程学院, 郑州 450046;

2. 河南牧业经济学院 畜产品质量安全技术研究院, 郑州 450046;

3. 河南牧业经济学院 动物医药学院, 郑州 450046;

4. 河南农业大学 动物医学院, 郑州 450046)

**摘要** 旨在利用 CRISPR/Cas9 系统构建敲除真核翻译起始因子 5A (Eukaryotic translation initiation factor 5A, *eIF5A*) 的 MARC-145 多克隆细胞系, 并验证该细胞系对 PRRSV 感染的影响。针对 *eIF5A* 基因构建并筛选成功获得重组慢病毒, 用重组慢病毒感染 MARC-145 细胞, 嘌呤霉素及有限稀释法进行筛选, 获得敲除 *eIF5A* 的 MARC-145 多克隆细胞系。对构建细胞系进行活力检测, *T7E1* 核酸内切酶、Real-time PCR 以及 Western blot 验证 *eIF5A* 体外敲除效率, 病毒增殖试验验证该细胞系对 PRRSV 复制的影响。结果表明: 1) 细胞活性检测结果显示敲除 *eIF5A* 基因对细胞活性无显著影响; 2) 通过 *T7E1* 核酸内切酶、Real-time PCR 以及 Western blot 表明 *eIF5A* 表达显著降低, 并将此细胞系命名为 MARC-145- $\Delta$ *eIF5A* 细胞系; 3) 使用 PRRSV HN07-1 感染 MARC-145- $\Delta$ *eIF5A*, 体外试验证明敲除 *eIF5A* 对 PRRSV 的增殖有抑制作用。综上, 本研究成功构建 *eIF5A* 基因敲除的 MARC-145 多克隆细胞系, 体外敲除 *eIF5A* 显著抑制 PRRSV 增殖, 这将为进一步探索 *eIF5A* 调控 PRRSV 复制的分子机制奠定基础。

**关键词** 真核翻译起始因子 5A; PRRSV; CRISPR/Cas9; MARC-145 细胞

中图分类号 S852.659.6

文章编号 1007-4333(2023)07-0122-08

文献标志码 A

## Establishment of *eIF5A* gene knockout polyclonal MARC-145 cell line and its effect on PRRSV infection

Li Huawei<sup>1,2</sup>, Wang Xuying<sup>3</sup>, Jing Huiyuan<sup>3</sup>, Wan Bo<sup>4</sup>,

Qiao Hongxing<sup>3</sup>, Guo Kewei<sup>4</sup>, Hou Wenjing<sup>2</sup>

(1. College of Food and Bioengineering, Henan University of Animal Husbandry and Economy, Zhengzhou 450046, China;

2. Institute of Animal Product Quality and Safety Technology, Henan University of Animal Husbandry and Economy, Zhengzhou 450046, China;

3. College of Veterinary Medicine, Henan University of Animal Husbandry and Economy, Zhengzhou 450046, China;

4. College of Veterinary Medicine, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450046, China)

**Abstract** The study was to construct MARC-145 polyclonal cell line with *eIF5A* (Eukaryotic translation initiation factor 5A) knockout using CRISPR/Cas9 system and to verify the effect of this cell line on PRRSV infection. In this study, for

收稿日期: 2022-02-22

基金项目: 国家自然科学基金项目(31902284); 河南省科技研发计划联合基金(应用攻关类)(222103810022); 河南省科技攻关计划项目(232102110104); 河南省高等学校青年骨干教师培养计划项目(2020GGJS258); 河南牧业经济学院预防兽医学重点学科(XJXK202202)

第一作者: 李华玮(ORCID:0000-0002-1675-7628), 副教授, 主要从事动物病毒感染机制及相关诊断试剂研究, E-mail: centrosome@126.com

*eIF5A* gene, the recombinant lentivirus was successfully constructed and screened. MARC-145 cells were infected with the lentivirus and screened using puromycin through limited dilution method. Viability assays were performed on the transformed cells, *T7E1* nucleic acid endonuclease, real-time PCR and western blot to verify the efficiency of *eIF5A* knockdown *in vitro*, and viral proliferation assays to verify the effect of this cell line on PRRSV replication. The results showed that: 1) *eIF5A* knockout had no effect on cell activity. 2) The expression of *eIF5A* was significantly decreased by *T7E1* endonuclease, Real-time PCR and Western blot, and the cell line was named MARC-145- $\Delta$ *eIF5A* cell line. 3) *In vitro* assays demonstrated that knockout of *eIF5A* had an inhibitory effect on PRRSV proliferation. In conclusion, this study successfully constructed MARC-145 polyclonal cell lines with *eIF5A* gene knockout, and *eIF5A* knockout can significantly inhibit PRRSV proliferation *in vitro*, which lay a foundation for further exploration of the molecular mechanism of *eIF5A* regulation of PRRSV replication.

**Keywords** *eIF5A*; PRRSV; CRISPR/Cas9; MARC-145 cell

猪繁殖与呼吸综合征 (Porcine reproductive and respiratory syndrome, PRRS) 是由猪繁殖与呼吸综合征病毒 (Porcine reproductive and respiratory syndrome virus, PRRSV) 引起的猪繁殖障碍和呼吸系统的急性、高度接触性传染病<sup>[1]</sup>。PRRSV 属于动脉炎病毒科、动脉炎病毒属, 单股正链、不分节段的 RNA 病毒, 有囊膜包裹, 基因组全长为 15.4 kb, 编码 10 个开放阅读框<sup>[2]</sup>。根据抗原的差异性 PRRSV 分为两种类型, 即 PRRSV I 型和 PRRSV II 型, 两种基因型间氨基酸的相似性 78%~81%<sup>[3-4]</sup>。PRRS 传染性强、流行范围广、危害持久, 严重损害世界养猪业的健康发展<sup>[5-7]</sup>。PRRSV 在我国不断变异、进化, 多种毒株并存的局面让 PRRS 防控成为棘手问题。病毒没有自身的复制体系, 必须通过劫持宿主的翻译系统完成自身复制, 真核生物翻译起始因子 (Eukaryotic translation initiation factors, eIFs) 则是帮助病毒实现这一生物学过程的关键宿主蛋白。大量研究表明, eIFs 与多种病毒存在直接或间接的相互作用<sup>[8-10]</sup>。病毒可以通过调控 eIFs 表达及修饰, 抑制核糖体对宿主 mRNA 招募或影响翻译起始复合体活性等方式, 创造有利于自身复制的环境。

真核翻译起始因子 5A (Eukaryotic translation initiation factor 5A, eIF5A) 广泛存在于各种真核细胞中, 是唯一包含羟脯氨酸修饰的蛋白<sup>[11-12]</sup>。羟脯氨酸修饰合成过程需要脱氧羟脯氨酸赖氨酸合酶和脱氧羟脯氨酸赖氨酸羟化酶 2 个关键酶参与<sup>[13]</sup>。只有经过羟脯氨酸修饰, eIF5A 才具有活性。有研究表明 eIF5A 与病毒感染密切相关, 人免疫缺陷病毒 (Human immunodeficiency virus, HIV) 辅助因子 Rev 蛋白能与 eIF5A 结合, eIF5A 功能缺失突变体阻断了 Rev 蛋白核输出和 HIV 的复制<sup>[14]</sup>。酵母双

杂交技术进一步发现 HIV Rev 蛋白通过 eIF5A 与核糖体蛋白 L5 形成复合物而获得病毒 mRNA 核输出路径, 用核糖体蛋白 L5 抗体处理细胞会导致病毒 mRNA 不能正常运输至细胞质, HIV 结构蛋白不能合成<sup>[15]</sup>。另有研究表明, 埃博拉病毒 (Ebola virus, EBOV) 需要多胺和 eIF5A 羟脯氨酸修饰进行复制<sup>[16]</sup>。使用脱氧羟脯氨酸赖氨酸合酶的小分子抑制剂 GC7 处理细胞能有效地阻断 EBOV 复制, 并使其滴度下降约 30%<sup>[17]</sup>。eIF5A 在登革热病毒感染时起到了防止细胞死亡的作用, 促进登革热病毒在细胞中的持续性感染<sup>[18]</sup>。课题组前期研究表明, PRRSV 感染 PAMs 后 eIF5A 等翻译相关蛋白显著下调<sup>[19]</sup>, 但 eIF5A 是否能调控 PRRSV 复制尚未可知。

CRISPR/Cas9 系统首次 in 古生物和细菌中被发现, 其作用是降解序列特异性 DNA<sup>[20-25]</sup>。本研究利用 CRISPR/Cas9 系统构建敲除 eIF5A 基因的 MARC-145 多克隆细胞系, 通过间接免疫荧光 (IFA)、荧光定量 PCR (Real-time PCR)、免疫印迹 (Western blot) 和病毒滴度 (TCID<sub>50</sub>) 测定来验证病毒在敲除 eIF5A 的 MARC-145- $\Delta$ eIF5A 多克隆细胞系的增殖情况。本研究为探索 eIF5A 调控 PRRSV 增殖的分子机制提供理论基础, 也为抗 PRRSV 新药的筛选提供新思路。

## 1 材料与方 法

### 1.1 试验材料

#### 1.1.1 细胞、病毒及载体

HEK293T 和 MARC-145 细胞均由河南省非常规饲料资源创新利用重点实验室保存并稳定传代。PRRSV HN07-1 毒株为河南农科院动物免疫学重点实验室惠赠 (GenBank 登陆号为 KX766378.1)。

慢病毒载体 LentiCRISPR v2、辅助质粒 Pmd2. G 和 psPAX2 均购自 Addgene 公司。

### 1.1.2 主要试剂

质粒提取试剂盒购自 TIANGEN 公司,限制性内切酶 *Bsm*I、DMEM 细胞培养液购自 Thermo Fisher; T4 DNA 连接酶、T7E1 酶购自 NEB 公司; DNA 凝胶回收试剂盒、ECL 发光试剂盒、嘌呤霉素、Lipo8000TM 转染试剂、RIPA 裂解液购自上海碧云天生物技术有限公司;胎牛血清购自杭州四季青有限公司;反转录试剂盒购自 TaKaRa 公司;荧光定量检测试剂盒购自 Roche 公司;Trizol 试剂购自 Invitrogen 公司;MTS 试剂盒购自 Promega 公司;FITC 标记的羊抗鼠 IgG 及羊抗兔 IgG、HRP 标记的羊抗鼠及羊抗兔 IgG 购自 Abbkine 公司;PRRSV N 蛋白单克隆抗体购自 VMRD 公司;eIF5A 蛋白单抗购自 Cell Signaling 公司。

## 1.2 试验方法

### 1.2.1 *sgRNA* 序列的设计与合成

利用 NCBI(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)网站查阅猪基因组 *eIF5A* 序列(GenBank 登陆号为 XM\_005655285.2),然后根据网站(<http://crispr.mit.edu/>)设计相关 *sgRNA* 基因序列(表 1),分别命名为 *sgRNA* 1-4,经软件预测和预试验,*sgRNA*1 编辑效率最高,可用于做后续试验。

表 1 *sgRNA* 序列信息

Table 1 Information of *sgRNA* sequence

名称 Name	序列(5'-3') Sequence (5'-3')
<i>sgRNA</i> 1	GATGATTTGGACTTCGAGAC
<i>sgRNA</i> 2	TGCTCAGCATTACGTAAGAA
<i>sgRNA</i> 3	CGTAATGCTGAGCACTGCAT
<i>sgRNA</i> 4	AATGGCTTTGTGGTGCTCAA

### 1.2.2 LentiCRISPRv2-*sgRNA* 载体构建

使用 *Bsm*I 限制性内切酶,在 37 °C 的条件下对 LentiCRISPR v2 载体酶切。4 h 后使用琼脂糖凝胶电泳检测并用 DNA 回收试剂盒纯化。利用 T4 DNA 连接酶,将回收产物与经退火形成双链的 *sgRNA*1 在 16 °C 条件下连接。将连接产物转化至感受态细胞 *E. Coli* Top10,随后涂布于氨苄抗性的固体 LB 平板并培养过夜,挑取单克隆震荡培养,并

提取质粒。将重组质粒命名为 LentiCRISPRv2-*sgRNA*1,挑取单个菌落进行基因测序鉴定,测序正确的质粒用于后续试验。

### 1.2.3 eIF5A 敲除多克隆细胞系的构建

将生长对数期的 HEK293T 细胞均匀接种至 10 cm 细胞培养皿,待细胞密度达 80%左右时,将重组质粒 LentiCRISPRv2-*sgRNA*1 与慢病毒包装质粒 pMD2. G、psPAX2 按一定的比例(4:3:1)共转染 HEK293T 细胞,同时设立转入空载体的对照组细胞,2 d 后收集慢病毒。将 MARC-145 细胞接种至 12 孔细胞板,待生长密度达到 40%时,将 MOI=1 的慢病毒接种至 MARC-145 细胞。培养 24 h,换用含有 7 μg/mL 的嘌呤霉素生长液。对照组细胞彻底死亡后,消化收集试验组细胞,转移至含有 5 μg/mL 嘌呤霉素生长液中扩大培养。获得的细胞使用有限稀释法进行筛选:用含有 5 μg/mL 嘌呤霉素生长液稀释细胞,将细胞悬液加入 96 孔细胞培养板中,每孔加 0.1 mL(约 5.5 个细胞/孔)。使用含有 5 μg/mL 嘌呤霉素生长液作倍比稀释,直至使每孔含一个细胞。培养 7~10 d 后,选择单个克隆生长的阳性孔再扩大培养。

### 1.2.4 *eIF5A* 基因敲除多克隆细胞系的鉴定

#### 1.2.4.1 Real-time PCR 检测

收集对照组细胞和筛选得到的细胞,使用 Trizol 法提取细胞 RNA 并反转录,将得到的 cDNA 作为模板进行 Real-time PCR 检测,反应程序为:95 °C 5 min 预变性,95 °C 15 s、65 °C 30 s、72 °C 1 min 重复 50 个循环,最后 60 °C 1 min、95 °C 15 s 完成检测。引物信息见表 2。

#### 1.2.4.2 T7E1 核酸内切酶检测

以提取的基因组为模板,利用设计好的引物进行 PCR 扩增(表 2),反应条件为:95 °C 30 s 预变性,95 °C 15 s、65 °C 30 s、72 °C 30 s 重复 30 个循环。扩增产物经琼脂糖凝胶电泳检测后,胶回收试剂盒对 PCR 产物进行纯化。使用 T7E1 酶,37 °C 孵育 1 h 后,通过琼脂糖凝胶电泳检测酶切产物。

#### 1.2.4.3 Western blot 检测

将筛选细胞均匀传代至平皿中,待细胞长满平皿 80%后,消化收集至 EP 管,每管样品约 10<sup>7</sup> 个细胞,用 RIPA 裂解液冰上超声细胞,加入 5×上样缓冲液 100 °C 煮沸 5 min 后进行 SDS-PAGE,将条带转印至 PVDF 膜上,5%脱脂奶封闭 1 h,然后以 eIF5A 兔源单抗作一抗(1:1 000 稀释使用),HRP 标

表2 本研究中 PCR 引物序列信息

Table 2 PCR primer sequences in the study

名称 Name	序列(5'-3') Sequences (5'-3')
eIF5A-F	CGGCAAGGAGATTGAGCAGA
eIF5A-R	TTTGCCATGGCCTTGATTGC
$\beta$ -Actin-F	TGCGGGACATCAAGGAGAA
$\beta$ -Actin-R	TCGTTGCGATGGTGATG
p-eIF5A-F	CTCCATACACACACCAGTT
p-eIF5A-R	GAGCAGGTGTAGTTGTCTGA

记的羊抗兔 IgG 为二抗(1:5 000 稀释使用) 37 °C 孵育 1 h, 最后使用 ECL 化学发光试剂显影成像。

### 1.2.5 *eIF5A* 基因敲除后 MARC-145 细胞活性的影响

MTS 法可用于检测细胞增殖活性和细胞毒性, 利用活细胞中的线粒体脱氢酶将 MTS 还原产生可溶性的褐黄色物质这一反应, 测定 490 nm 波长处 OD 值, 推算出细胞的存活率。分别将筛选得到的细胞和对照组细胞, 按每孔  $1 \times 10^4$  的数量接种至 96 孔板中, 每孔加入 10  $\mu$ L MTS 试剂, 轻微震荡混匀, 然后于培养箱中 37 °C 孵育 4 h, 用酶标仪于 490 nm 处测定 OD 值。

### 1.2.6 *eIF5A* 敲除对 PRRSV 滴度的影响

将筛选得到的细胞命名为 MARC-145- $\Delta$ eIF5A 细胞系, 以转入空载体 LentiCRISPR v2 的 MARC-145 细胞为对照, 分别将 MARC-145- $\Delta$ eIF5A 细胞系和对照组细胞接种到 96 孔培养板培养, 细胞长至 80% 左右时, 将 PRRSV 配制成  $10^{-1} \sim 10^{-10}$  10 个浓度梯度, 分别接种到 MARC-145- $\Delta$ eIF5A 细胞孔中, 37 °C 培养 4~6 d 后观察并记录 CPE, 通过 Reed-Muench 两氏法计算病毒的 TCID<sub>50</sub> 值。

### 1.2.7 *eIF5A* 敲除对 PRRSV ORF7 mRNA 表达的影响

将对照组细胞和 MARC-145- $\Delta$ eIF5A 细胞均匀传代至 24 孔板中, 细胞密度达到 80% 后接种 MOI=0.1 的 PRRSV, 收集 24 h 的细胞, 提取 RNA 并反转录成 cDNA, 通过 Real-time PCR 检测 PRRSV 在 MARC-145- $\Delta$ eIF5A 细胞的增殖情况。

PRRSV 的 Real-time PCR 检测方法及其反应条件同 1.2.4.1, 使用引物信息见表 2。

### 1.2.8 *eIF5A* 敲除对 PRRSV N 蛋白表达的影响

通过 IFA 法, 将对照组细胞和 MARC-145- $\Delta$ eIF5A 细胞均匀传代至 24 孔板中, 待细胞密度达到 80% 以上时, 接种 MOI=0.1 的 PRRSV, 24 h 后收获细胞, 用预冷的 95% 甲醇固定细胞 15~20 min, 5% 脱脂奶于 37 °C 封闭 1 h, PBST 洗涤细胞 3 次, 以 PRRSV N 蛋白单抗为一抗(1:500 稀释使用), FITC 标记的羊抗兔 IgG 为二抗(1:1 000 稀释使用)于 37 °C 各避光孵育 1 h, 避光环境下每孔覆盖 DAPI 显色液 5 min, 用 PBST 洗涤 3~5 次, 在 IX53 型荧光倒置显微镜下观察结果。

Western blot 试验方法同 1.2.4.3, 以 PRRSV N 蛋白单抗为一抗, HRP 标记的羊抗鼠 IgG 为二抗, 用 ECL 化学发光法显色并观察结果。

### 1.2.9 数据统计

各试验均平行重复 3 次, 采用 Graphpad 8.0 软件对试验数据进行 *t-test* 统计学分析。

## 2 结果与分析

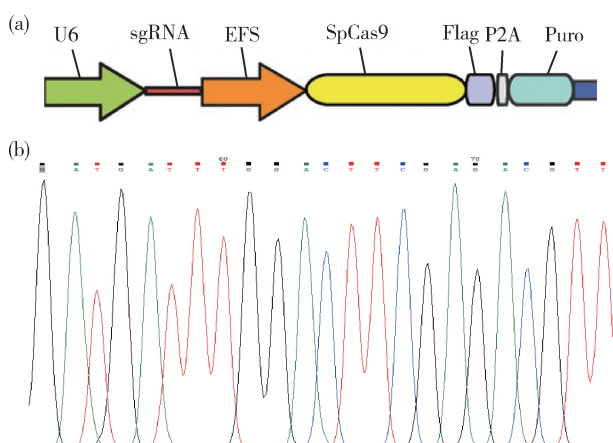
### 2.1 LentiCRISPRv2-sgRNA 载体构建

在 37 °C 的条件下, 用 *Bsm*I 对 LentiCRISPR v2 质粒线性化, 4 h 后使用琼脂糖凝胶进行电泳检测。目的片段用 DNA 胶回收试剂盒进行回收纯化, 然后连接 *sgRNA*, 将连接产物转化入 TOP10 感受态细胞, 构建重组质粒 LentiCRISPRv2-sgRNA1。经过测序比对发现重组质粒 LentiCRISPRv2-sgRNA1 构建成功(图 1)。

### 2.2 MARC-145- $\Delta$ eIF5A 多克隆细胞系的鉴定

收集对照组细胞和敲除 *eIF5A* 的细胞系, 提取细胞总 RNA 反转录成 cDNA, 利用 Real-time PCR 方法检测 *eIF5A* 基因在 MARC-145 对照、MARC-145- $\Delta$ eIF5A 细胞中表达量的变化。图 2(a) MARC-145- $\Delta$ eIF5A 细胞中 *eIF5A* 基因的 mRNA 相对表达量显著低于对照组细胞( $P < 0.05$ ), 表明设计的 *sgRNA* 具有较高的编辑效率, 能够显著降低 *eIF5A* 表达。提取细胞基因组后, 以其作为模板进行 PCR 扩增, PCR 产物经纯化试剂盒纯化, 按照 *T7E1* 核酸内切酶说明书对多克隆细胞基因组进行酶切, 检测编辑效率。由图 2(b) 可知, 第 4 条泳道出现了小分子量条带, 表明 *sgRNA1* 能有效对 *eIF5A* 基因进行编辑。由图 2(c) 可知, 收集对照组





(a) 构建模式图; (b) 测序结果

(a) Construction pattern diagram;

(b) The results of sgRNA sequencing

图1 LentiCRISPRv2-sgRNA的构建模式图和测序结果

Fig. 1 Construction pattern diagram of LentiCRISPRv2-sgRNA and the results of sgRNA sequencing

细胞和 MARC-145- $\Delta$ eIF5A 细胞的蛋白样品, 进行 Western blot 检测。结果显示与对照组细胞相比 MARC-145- $\Delta$ eIF5A 细胞中 eIF5A 蛋白表达显著降低。综上, 敲除 eIF5A 的 MARC-145 细胞系 MARC-145- $\Delta$ eIF5A 构建成功。

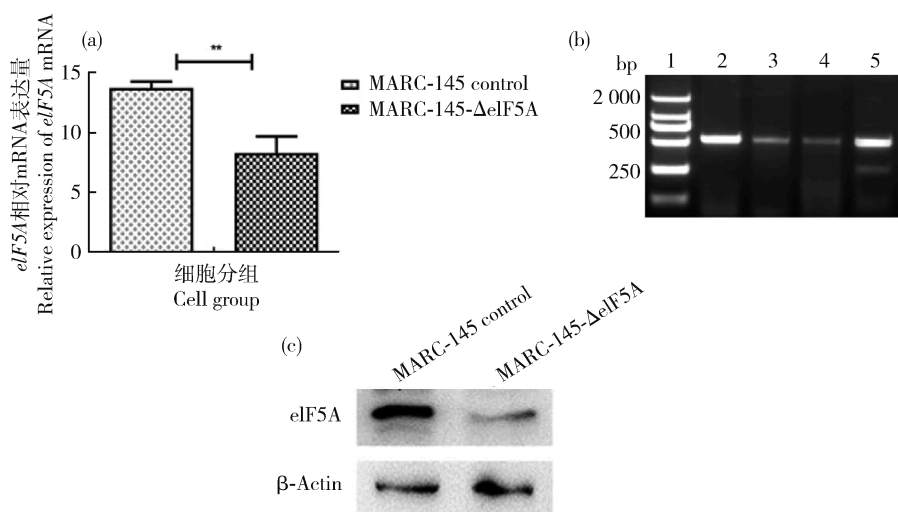
### 2.3 eIF5A 基因敲除对 MARC-145 细胞活性的影响

将 MARC-145 细胞和 MARC-145- $\Delta$ eIF5A 传

代培养, 待细胞生长密度达到 80% 时, 分别于 0、6、12 和 24 h 使用 MTS 试剂盒检测 490 nm 波长下的吸光度值。结果显示: MARC-145- $\Delta$ eIF5A 细胞与对照组细胞 MARC-145 相比, 490 nm 波长下的吸光度值无显著差异, 表明 eIF5A 基因的敲除对 MARC-145 细胞的增殖无显著影响 ( $P > 0.05$ ) (图 3)。

### 2.4 eIF5A 敲除对 PRRSV 增殖的影响

用 PRRSV 分别感染 MARC-145 细胞和 MARC-145- $\Delta$ eIF5A 多克隆细胞系。设置 12 和 24 h 2 个比较组, 由 Real-time PCR 结果可知 (图 4(a)), 与对照组相比 PRRSV 感染 MARC-145- $\Delta$ eIF5A 细胞系病毒 ORF7 mRNA 表达量显著降低 ( $P < 0.05$ ), 说明体外敲除 eIF5A 可显著抑制 PRRSV 复制。通过 Western blot 检测 PRRSV 感染 12 和 24 h 的细胞样品, 结果显示 MARC-145- $\Delta$ eIF5A 细胞系 PRRSV N 蛋白的表达显著低于对照组 (图 4(b)), 表明体外敲除 eIF5A 能够显著抑制 PRRSV N 蛋白的表达。通过 IFA 检测 PRRSV 感染 MARC-145 细胞和 MARC-145- $\Delta$ eIF5A 细胞 24 h 的细胞样品, 以 PRRSV N 蛋白单抗为一抗, FITC 标记的羊抗鼠抗体为二抗, 在荧光显微镜下观察发现 MARC-145- $\Delta$ eIF5A 细胞系与对照组相比荧光均有不同程度的减少 (图 4(c)), 说明体外敲除 eIF5A 可显著抑制 PRRSV 复制。用 PRRSV 分别感染 MARC-145 细胞和 MARC-145- $\Delta$ eIF5A 细胞



(a) Real-time PCR 检测; (b) T7E1 酶切鉴定。1: DL 2 000 Marker; 2: 对照; 3: sgRNA-eIF5A; 4: 对照 + T7E1; 5: sgRNA-eIF5A-T7E1; (c) Western blot 鉴定。 \*\*  $P < 0.01$ 。

(a) Detection of real-time PCR; (b) Restriction enzyme digestion. 1: DL 2 000 Marker; 2: Control; 3: sgRNA-eIF5A; 4: Control + T7E1; 5: sgRNA-eIF5A-T7E1; (c) Western blot.

图2 MARC-145- $\Delta$ eIF5A 多克隆细胞系的鉴定

Fig. 2 Identification of MARC-145- $\Delta$ eIF5A polyclone cell line

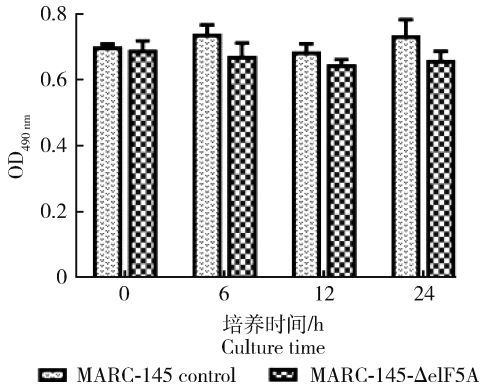


图 3 *eIF5A* 基因敲除对 MARC-145 细胞活性的影响

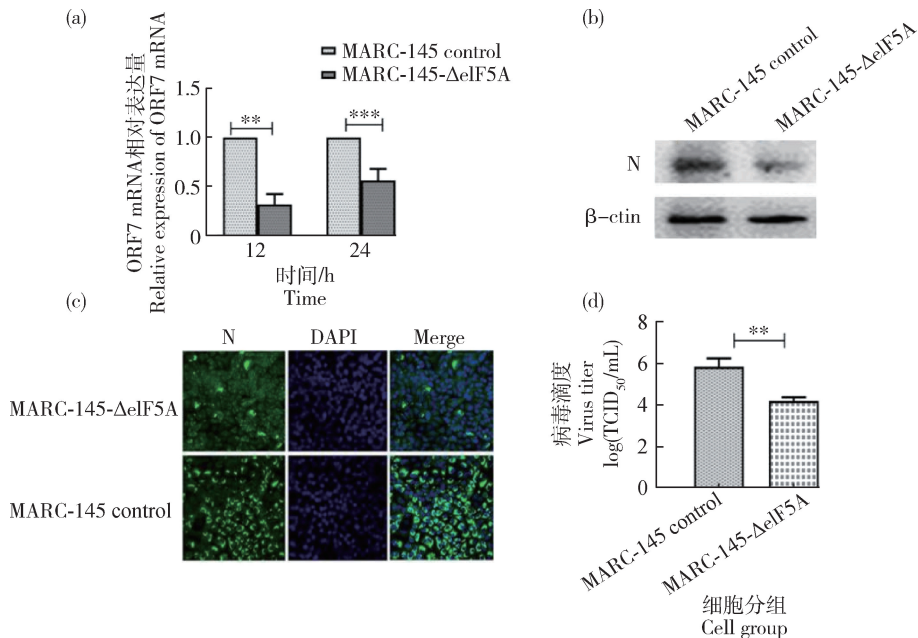
Fig. 3 Effect of *eIF5A* gene knockout on cell viability of MARC-145 cells

系,从 TCID<sub>50</sub> 结果可知(图 4(d)),MARC-145-Δ*eIF5A* 细胞系 PRRSV 病毒滴度显著低于对照组 ( $P < 0.05$ ),这表明体外敲除 *eIF5A* 可显著抑制 PRRSV 的滴度 ( $P < 0.01$ )。

### 3 讨论

PRRSV 是危害我国生猪生产的重大流行病之

一,由于 PRRSV 在猪体内增殖十分迅速,并且具有易变异和持续性感染等特点,使得当前 PRRSV 的防控具有较大难度,迫切需要寻找新药靶点,研制有效的治疗药物<sup>[26]</sup>。Wang 等<sup>[27]</sup>研究发现 OAS1b 的过表达可抑制 PRRSV 的复制,而 OAS1b RNA 沉默导致病毒滴度增加。此外,OAS1b 促进了干扰素的表达以及干扰素-β 启动子的活性。TRIM (Tripartite motif, TRIM)家族成员是对抗病毒感染的先天免疫反应的重要效应物。Wei 等<sup>[28]</sup>对猪的 TRIM(pTRIM)家族进行了表征,并预测 pTRIM5、14、21、25 和 38 是抵抗 PRRSV 感染的宿主限制因子。pTRIM21 过表达可以明显抑制 PRRSV 的复制,但不影响 PRRSV 附着和内吞作用。DDX21 是 DDX 家族成员,除了调节细胞 RNA 代谢的功能外,DDX21 还调节先天免疫,并参与一些病毒的复制周期。DDX21 的过表达可促进 PRRSV 的复制,而 DDX21 敲除则抑制 PRRSV 的增殖,进一步研究发现敲除 DDX21 可激活 PRRSV 感染细胞的 IFN-β 信号通路,促进 IFN-β 的表达抑制 PRRSV 复制<sup>[29]</sup>。



(a) Real-Time PCR 检测 PRRSV ORF7 mRNA 的表达量;(b) Western blot 检测 PRRSV N 蛋白的表达;(c) IFA 检测 PRRSV N 蛋白的表达;(d) TCID<sub>50</sub> 检测 PRRSV 浓度。\*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$ ; \*\*\*  $P < 0.001$ 。

(a) Identification of the mRNA expression of PRRSV N protein by real-time PCR; (b) Identification of the expression of PRRSV N protein by Western blot; (c) Identification of the expression of PRRSV N protein by IFA; (d) Identification of PRRSV titer by TCID<sub>50</sub>。

图 4 *eIF5A* 敲除对 PRRSV 增殖的影响

Fig. 4 Effect of *eIF5A* knockout on PRRSV replication

课题组前期在 PRRSV 感染 PAMs 蛋白质组学研究中发现 eIF5A 在 PRRSV 感染细胞后显著下调,推测其是调控 PRRSV 复制的潜在药物靶点<sup>[19]</sup>。eIF5A 也被称为 eIF4D,是从未成熟的红细胞中分离出来的。它是一种分子质量为 17 ku 的酸性蛋白质,从酵母到人类高度保守。近年来,eIF5A 在翻译过程中的功能得到了广泛研究,eIF5A 与核糖体中翻译功能相关的区域结合,促进了多脯氨酸链的延伸。eIF5A 也与真核 mRNA 的 3'端多聚腺苷酸化尾结合,并在翻译终止中发挥重要作用。eIF5A 另一个重要功能是介导 mRNA 的核质转运,保证 mRNA 在细胞核和细胞质中的平衡分布<sup>[30]</sup>。eIF5A 及其羟脯氨酸修饰在 HIV 以及 EBOV 复制中的作用已被证实,而 eIF5A 对 PRRSV 复制的影响尚未见报道。本研究利用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术首次在 MARC-145 细胞对 eIF5A 基因成功敲除,构建了 MARC-145- $\Delta$ eIF5A 多克隆细胞系,研究 eIF5A 对 PRRSV 感染的影响。通过 IFA、Western blot 证实 eIF5A 基因敲除可显著抑制 PRRSV N 蛋白的表达,Real-time PCR 试验证实 MARC-145- $\Delta$ eIF5A 细胞系中 PRRSV ORF7 mRNA 的表达显著低于对照组,TCID<sub>50</sub> 试验证实 MARC-145- $\Delta$ eIF5A 细胞系中子代病毒的滴度显著低于对照组。以上结果均说明体外敲除 eIF5A 对 PRRSV 复制有抑制作用。说明 eIF5A 是抑制 PRRSV 复制的潜在药物靶点。PRRSV RNA 基因组的复制是一个十分复杂的过程,涉及到由病毒和细胞成分组成的复制和转录复合物的组装<sup>[31-33]</sup>,推测宿主细胞中 eIF5A 的缺失有可能影响了 PRRSV 转录复制复合体的形成,从而抑制了 PRRSV 的复制。本研究为新型抗 PRRSV 药物的研发提供理论依据,也为 PRRSV 的防控提供新思路。但目前 eIF5A 对 PRRSV 复制的调控机制尚未明确,尚需要进一步深入研究。

## 参考文献 References

- [1] Han J, Zhou L, Guo X, Guo X, Yang H. Pathogenesis and control of the Chinese highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus[J]. *Veterinary Microbiology*, 2017, 209(9): 30-47
- [2] Snijder E J, Kikkert M, Fang Y. Arterivirus molecular biology and pathogenesis[J]. *Journal of General Virology*, 2013, 94(10): 2141-2163
- [3] 祝徐航,胡灵子,牟泓晔,宋厚辉,王晓社. 反向遗传学技术在 PRRSV 基础与应用领域中的研究进展[J]. *中国预防兽医学报*, 2021, 43(8): 895-901
- [4] Zhu X H, Hu L G, Mou H Y, Song H H, Wang X D. Research progress of reverse genetics in PRRSV [J]. *Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine*, 2021, 43: 895-901 (in Chinese)
- [5] Chen N H, Ye M X, Huang Y C, Li S, Xiao Y, Li X, Li S, Li X, Yu X K, Zhu J. Identification of two porcine reproductive and respiratory syndrome virus variants sharing high genomic homology but with distinct virulence[J]. *Viruses*, 2019, 11(9): 73-77
- [6] Hu J, Zhang C. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus vaccines, current status and strategies to a universal vaccine [J]. *Transboundary and Emerging Diseases*, 2014, 61(2): 109-120
- [7] 吕静,刘文波,刘杨,任同伟,陈樱,欧阳康,黄伟坚,韦祖樟. 稳定表达猪 CD163 受体的 MARC-145 细胞系的构建[J]. *中国兽医学报*, 2022, 42(3): 529-534
- [8] Lu J, Liu W B, Liu C, Ren T W, Chen Y, Ouyang K, Huang W J, Wei Z Z. Construction of MARC-145 cell line stably expressing porcine CD163 receptor[J]. *Chinese Journal of Veterinary Science*, 2022, 42(3): 529-534 (in Chinese)
- [9] Wei Y, Zeng S Y, Zou C C, Zhang H, Peng O, Xue C, Cao Y. Porcine TRIM21 RING-finger E3 ubiquitin ligase is essential for anti-PRRSV activity[J]. *Veterinary Microbiology*, 2021, 256(2): 109043
- [10] Montero H, Garcia-Roman R, Mora, S I. EIF4E as a control target for viruses[J]. *Viruses*, 2015, 7(2): 739-750
- [11] Sun P, Zhang S, Qin X, Chang X, Cui X, Li H, Zhang S, Gao H, Wang P, Zhang Z, Luo J, Li Z. Foot-and-mouth disease virus capsid protein VP2 activates the cellular EIF2S1-ATF4 pathway and induces autophagy via HSPB1[J]. *Autophagy*, 2018, 14(2): 336-346
- [12] Tsukimoto A, Sugiyama R, Abe M, Nishitsuji H, Shimizu Y, Shimotohno K, Kawai G, Takaku H. A new role for PGA1 in inhibiting hepatitis C virus-IRES-mediated translation by targeting viral translation factors[J]. *Antiviral research*, 2015, 117: 1-9
- [13] Barba-Aliaga M, Alepuz P. Role of eIF5A in mitochondrial function[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022, 23(3): 1284
- [14] Dever T E, Gutierrez E, Shin B S. The hypusine-containing translation factor eIF5A [J]. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 2014, 49(5): 413-425
- [15] Moreira D S, Duarte A P, Pais F S M, Silva-Pereira R A D, Romanha A J, Schenkman S, Murta S M F. Overexpression of eukaryotic initiation factor 5A (eIF5A) affects susceptibility to benzimidazole in *Trypanosoma cruzi* populations[J]. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 2018, 113(9): e180162
- [16] Schroeder M, Kolodzik A, Pfaff K, Priyadarshini P, Kreptakies M, Hauber J, Rarey M, Meier C. In silico design, synthesis, and screening of novel deoxyhypusine synthase inhibitors targeting HIV-1 replication [J]. *ChemMedChem*, 2014, 9(5): 940-952
- [17] Schatz O, Oft M, Dascher C, Schebesta M, Rosorius O, Jaksche H, Dobrovnik M, Bevec D, Hauber J. Interaction of the HIV-1 rev cofactor eukaryotic initiation factor 5A with ribosomal protein L5[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1998, 95(4): 1607-1612
- [18] Olsen M E, Cressey T N, Mühlberger E, Connor J H. Differential mechanisms for the involvement of polyamines and hypusinated eIF5A in ebola virus gene expression[J]. *Journal of Virology*, 2018, 92(20): e01260-e01218
- [19] Olsen M E, Filone C M, Rozelle D, Mire C E, Agans K N, Hensley L, Connor J H. Polyamines and hypusination are required for ebolavirus gene expression and replication[J]. *mBio*, 2016, 7(4): e00882-e00816
- [20] Shih Y T, Yang C F, Chen W J. Upregulation of a novel eukaryotic translation initiation factor 5A (eIF5A) in dengue 2 virus-infected mosquito cells[J]. *Virology Journal*. 2010, 7(1): 214
- [21] 李华玮,陈鑫鑫,赵孟孟,周恩民,乔松林,张改平. 猪繁殖与呼吸综合征病毒感染猪肺泡巨噬细胞天然免疫信号通路相关分子变化分析[J]. *畜牧兽医学报*, 2017, 48(7): 1288-1299
- [22] Li H W, Chen X X, Zhao M M, Zhou E M, Qiao S L, Zhang G P. Analysis of related molecular changes of innate immune signaling

- pathway in porcine reproductive and respiratory syndrome virus infected PAMs[J]. *Chinese Journal of Animal and Veterinary Sciences*, 2017, 48(7): 1288-1299 (in Chinese)
- [20] Ledford H. CRISPR treatment inserted directly into the body for first time[J]. *Nature*, 2020, 579(7798): 185
- [21] Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna J A, Charpentier E. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity[J]. *Science*, 2012, 337(6096): 816-821
- [22] Oh Y, Kim S. RPS5A Promoter-Driven Cas9 produces heritable Virus-induced genome editing in *nicotiana attenuata*. [J]. *Molecules and Cells*, 2021, 44(12): 911-919
- [23] Gupta R M, Hadaya J, Trehan A, Zekavat S M, Roselli C, Klarin D, Emdin C A, Hilvering C R E, Bianchi V, Mueller C, Khera A V, Ryan R J H, Engreitz J M, Issner R, Shores N, Epstein C B, de Laat W, Brown J D, Schnabel R B, Bernstein B E, Kathiresan S. A genetic variant associated with five vascular diseases is a distal regulator of endothelin-1 gene expression[J]. *Cell*, 2017, 170(3): 522-533
- [24] Makarova K S, Wolf Y I, Koonin E V. The basic building blocks and evolution of CRISPR-CAS systems [J]. *Biochemical Society Transactions*, 2013, 41(6): 1392-1400
- [25] Thomsen E A, Skipper K A, Andersen S, Haslund D, Skov T W, Mikkelsen J G. CRISPR-Cas9-directed gene tagging using a single integrase-defective lentiviral vector carrying a transposase-based Cas9 off switch[J]. *Molecular Therapy-Nucleic Acids*, 2022, 29(1): 563-576
- [26] 王丙雷,王晶,刘媛,陈少杰,顾文源,郭禹,范京惠,左玉柱. 2016—2020 年华北地区猪繁殖与呼吸综合征病毒分子流行病学调查[J]. *中国兽医学报*, 2022, 42(1): 12-19  
Wang B L, Wang J, Liu Y, Chen S J, Gu W Y, Guo Y, Fan J H, Zuo Y Z. Molecular epidemiology of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in North China from 2016 to 2020[J]. *Chinese Journal of Veterinary Science*, 2022, 42(1): 12-19 (in Chinese)
- [27] Wang R, Kang Y, Li H, Ma H, Wang W, Cheng Y, Ji P, Zhang E, Zhao M. Molecular cloning and functional characterization of porcine 2', 5'-oligoadenylate synthetase 1b and its effect on infection with porcine reproductive and respiratory syndrome virus[J]. *Veterinary immunology and immunopathology*, 2019, 209(1): 22-30
- [28] Wei Y, Zeng S, Zou C, Zhang H, Peng O, Xue C, Cao Y. Porcine TRIM21 RING-finger E3 ubiquitin ligase is essential for anti-PRRSV activity[J]. *Veterinary Microbiology*, 2021, 256: 109043.
- [29] Li J, Wang D, Fang P, Pang Y, Zhou Y, Fang L, Xiao S. DEAD-box RNA helicase 21 (DDX21) positively regulates the replication of porcine reproductive and respiratory syndrome virus via multiple mechanisms[J]. *Viruses*, 2022, 14(3): 467
- [30] Henderson A, Hershey J W B. The role of eIF5A in protein synthesis [J]. *Cell Cycle*, 2011, 10(21): 3617-3618
- [31] Van der Meer Y, van Tol H, Locker J K, Snijder E J. ORF1a-encoded replicase subunits are involved in the membrane association of the arterivirus replication complex[J]. *Journal of Virology*, 1998, 72(8): 6689-6698
- [32] Pedersen K W, van der Meer Y, Roos N, Snijder E J. Open reading frame 1a encoded subunits of the arterivirus replicase induce endoplasmic reticulum derived double-membrane vesicles which carry the viral replication complex[J]. *Journal of Virology*, 1999, 73(3): 2016-2026
- [33] Kroese M V, Zevenhoven-Dobbe J C, Bos-de Ruijter J N A, Peeters B P H, Meulenber J J M, Cornelissen L A H M, Snijder E J. The nsp1alpha and nsp1 papain-like autoproteases are essential for porcine reproductive and respiratory syndrome virus RNA synthesis [J]. *The Journal of General Virology*, 2008, 89(Pt 2): 494-499

责任编辑: 秦梅



第一作者简介: 李华玮,女,博士,副教授,河南牧业经济学院畜产品质量安全技术研究院生物制品研发实验室主任,河南农业大学硕士研究生校外导师,河南省教育厅学术技术带头人,河南省高等学校青年骨干教师,河南省科技特派员。主要从事畜禽传染病的感染机制及分子诊断试剂研发相关科研工作。主持在研或完成国家自然科学基金、河南省科技研发计划联合基金、河南省科技攻关计划项目、河南省高等学校重点科研项目等课题 10 余项,发表 SCI 论文 12 篇,中文核心 30 余篇,获省教育厅优秀科技论文一等奖 2 项,申报国家发明专利 3 项,授权 1 项,主参编教材 7 部。