



## 病毒功能性受体的筛选新策略及其应用

孙慧敏, 李素, 王文静, 仇华吉\*

中国农业科学院哈尔滨兽医研究所, 黑龙江 哈尔滨 150069

**摘要:** 病毒通过与靶细胞表面的特异性受体结合, 进而吸附、入侵靶细胞, 劫持细胞的复制机器完成自身的复制周期。细胞受体作为病毒入侵宿主的门户, 细胞受体的结构与功能及其介导病毒入侵的机制一直是病毒学研究的热点之一。对细胞受体的研究有助于了解病毒的致病机制并为病毒性疾病的防控提供科学依据。近年来, 利用功能缺失性基因组学筛选病毒功能性受体的进展极大地拓展了人类对病毒入侵机制的认识和理解。目前, 应用较为广泛的病毒功能性受体筛选策略包括 RNA 干扰技术、利用单倍体细胞系随机插入逆转录病毒致突变技术以及基于 CRISPR/Cas9 系统的新型编辑技术。本文系统介绍并比较了这三种病毒功能性受体筛选新策略, 同时对其应用及优缺点进行了归纳总结, 可为相关研究者提供一定的参考。

**关键词:** 病毒功能性受体, 筛选新策略, RNA 干扰, 单倍体细胞筛选, CRISPR/Cas9

大多数病毒严格依赖宿主完成自身的复制并产生新的病毒粒子<sup>[1]</sup>。病毒在特定的细胞质或细胞核等细胞环境中招募相关大分子并利用各种方式劫持细胞内合成核酸和蛋白质的原料, 并通过相关机制调节细胞的生理活动以利于其生存。该过程主要依赖于参与病毒基因组表达和复制的病毒粒子与宿主因子之间的相互作用<sup>[2]</sup>。病毒感染细胞的基本前提是特异性结合细胞表面的受体, 通过受体介导的内吞作用进入细胞以完成其复制周期。细胞受体是能够特异性结合病毒、介导并促

进病毒入侵细胞且定位于宿主细胞膜表面的生物分子。细胞受体是抗病毒策略的重要靶点, 发现并鉴定病毒功能性受体对于更好地理解病毒入侵机制和防控病毒性疾病至关重要。

基于表型的筛选技术是研究人员快速寻找调控特定表型的关键基因的主要方法。阐明基因功能最常用的方法是沉默或完全破坏其正常表达<sup>[3]</sup>。近年来, 在阐明模型系统中, 利用基因功能性缺失原理的筛选策略已在阐明基因功能及其信号通路方面得到广泛应用, 但直到出现 RNA 干扰(RNA

基金项目: 国家自然科学基金(31630080, 31672537)

\*通信作者。Tel/Fax: +86-451-51051708; E-mail: qiuhuaji@caas.cn

收稿日期: 2018-07-23; 修回日期: 2018-09-10; 网络出版日期: 2018-11-20

interference, RNAi)技术后,这种基因功能缺失性筛选策略才应用于哺乳动物细胞<sup>[4]</sup>。借助于 RNAi 以及之后的单倍体细胞筛选技术,已揭示了许多重要病毒的感染机制<sup>[5-9]</sup>。CRISPR/Cas9 技术的兴起预示着哺乳动物体外基因筛选跨入了一个新时代,利用该技术可以在基因组水平上通过精准编辑实现对基因表达的人为调控<sup>[10]</sup>。本文将介绍并比较用于筛选病毒功能性受体的 3 种新策略,包括 RNA 干扰法、单倍体细胞遗传筛选及 CRISPR/Cas9 文库法,并对 3 种方法进行比较,以为病毒功能性受体的筛选提供参考。

## 1 病毒功能性受体及其筛选关键

病毒入侵宿主细胞的第一步是吸附在细胞表面,吸附过程由病毒与受体的结合介导,受体分子作为宿主细胞膜的重要组成部分,具有特异性、高亲和性和饱和性等性质<sup>[11]</sup>。在生物化学中,受体是接收细胞外部配体信号的蛋白质分子。其与配体信号结合时,会引起某种形式的细胞或组织反应。根据位置可将受体蛋白分为两类:一类是细胞表面受体,如细胞因子、蛋白质多肽类激素、水溶性激素、前列腺素、亲水性神经递质等,由于不能通透靶细胞膜进入胞内,因此,这类配体信号分子的受体定位于靶细胞膜上;另一类是细胞内受体,可以直接穿过靶细胞膜,与细胞质或细胞核受体相互作用,通过调控特定基因的转录,启动一系列的生化反应,最终导致靶细胞产生生物效应,包括脂溶性的固醇类激素、甲状腺激素等。细胞中存在多种受体,而且每种受体都与特定的细胞生化途径相关,但每种受体只能与特定结构的配体结合,就像“锁”只接受特定形状的“钥匙”一样。配体与相应受体结合时,激活或抑制受体的相关信号通路。

病毒与细胞受体的相互作用十分复杂,同一种受体可以协助多种病毒的入侵过程,如硫酸乙酰肝素可协助辛德毕斯病毒、猪瘟病毒等吸附于细胞表面<sup>[12-14]</sup>;一种病毒也可利用多种受体入侵宿主细胞,如人类免疫缺陷病毒(human immunodeficiency virus, HIV)能够识别 CD4 分子、半乳糖苷神经酰胺(ceramide galactoside)和乙酰胆碱 3 种受体<sup>[15]</sup>。

在进行受体筛选工作时,应注意外部环境条件,有些条件可能会影响受体的表达情况,从而影响受体的筛选工作的进行,如极低密度脂蛋白(VLDLR)可不依赖 CD81 分子介导丙型肝炎病毒(hepatitis C virus, HCV)的入侵,但在正常情况下细胞不会表达 VLDLR,只有在低氧条件下培养的 Huh7.5 细胞才能表达 VLDLR 而促进 HCV 的入侵<sup>[16]</sup>;同时,有些受体可能是与其他的共受体共同发挥作用,如 HIV 进入宿主细胞的 CD4 分子以及共受体 CCR5<sup>[17]</sup>,这样只对其中一种分子进行研究可能不会得到预期的结果。

## 2 病毒功能性受体筛选新策略及其应用

随着细胞受体筛选方法的改进及广泛应用,我们发现了越来越多的病毒细胞受体。绝大部分细胞受体的化学本质都是蛋白质,之前的研究基本都以蛋白质相互作用为原理的方法来筛选细胞受体,如病毒铺覆蛋白印迹技术<sup>[18]</sup>、免疫共沉淀技术<sup>[19]</sup>、亲和层析技术<sup>[20]</sup>、噬菌体表面展示技术<sup>[21]</sup>、抗独特型单克隆抗体筛选技术<sup>[22]</sup>等经典筛选方法。随着研究的深入,利用 cDNA 文库<sup>[23]</sup>这一既经典又在不断发展的方法来筛选和鉴定病毒

受体,使受体筛选工作进入了一个新的阶段。如今,新兴的筛选策略(RNA干扰法、单倍体细胞遗传筛选、CRISPR/Cas9文库法等)为病毒细胞受体的筛选提供新的技术平台。

## 2.1 RNA干扰法

RNAi是广泛用于研究哺乳动物细胞基因功能的反向遗传学方法<sup>[3]</sup>。Andrew Fire与Craig C. Mello因在线虫中发现RNAi而获得诺贝尔生理学或医学奖。近10年来,该技术在哺乳动物系统中的广泛应用,为病毒学家和遗传学家提供了一个强大的检测病毒致病机制的新型工具<sup>[24-25]</sup>。学术界和工业界都迅速地接受了RNAi技术,实现对整个人类基因组遗传解析的同时,也建立了多个大规模的功能基因组筛选库<sup>[26-28]</sup>。由于所有的哺乳动物细胞系都能表达RNA诱导的沉默复合物(RNA-induced silencing complex, RISC),因此可以利用该技术对任何病毒易感细胞系进行病毒功能性受体的筛选<sup>[27]</sup>。

现已建立了混合型和阵列型两种类型的RNAi文库。混合型筛选流程为:首先设计针对某一病毒易感细胞膜蛋白的短发夹RNA(short hairpin RNA, shRNA),将所有的shRNA克隆至慢病毒载体,包装成慢病毒文库;之后将其以低剂量转导细胞系,尽量保证每一个细胞只进入一个shRNA,以大剂量感染报告病毒或能够引起细胞病变的病毒,筛选出报告基因阴性、弱阴性或存活的细胞;然后提取细胞基因组进行PCR扩增,利用高通量测序技术确定候选基因,进一步鉴定该基因对病毒感染的影响,最后获得影响病毒入侵的受体。阵列型siRNA的筛选流程为:首先设计针对某一病毒易感细胞膜蛋白的siRNA,将排序的siRNA转染至细胞中,进而感染病毒,分析

病毒拷贝数,筛选出下调宿主蛋白后对病毒复制有影响的相应siRNA,进一步鉴定该基因对病毒感染的影响,最后获得影响病毒入侵的受体。

混合型shRNA筛选主要用于探索宿主-病毒相互作用,包括HIV-1在T细胞系中复制所需要的宿主因子、甲型流感病毒(influenza A virus, IAV)诱导细胞死亡的关键宿主因子以及对IAV感染至关重要的宿主因子的筛选<sup>[29-31]</sup>。混合型筛选的优点是相对成本较低;将逆转录病毒转导至不易进行siRNAs转染的细胞(如原代细胞或悬浮培养细胞)来实现较高的敲低效率。但需要注意的是,对于较长期的筛选试验可能需要数周才能完成,因此最好应用能够稳定表达的shRNA文库,因为siRNA在分裂细胞中的瞬时转染效果会在转染后7d内迅速下降<sup>[32]</sup>。相比于混合型shRNA筛选方法,阵列siRNA筛选有以下几个优点:基于瞬时转染的阵列siRNA文库的筛选周期更短;另外,以高效脂质体介导的转染能够将大量有效浓度的siRNAs导入细胞,促进了目标mRNA的降解,产生更强的外显表型;而且,相比于混合型筛选,阵列型筛选的每个孔只敲低一种蛋白基因,可以根据更精确的表型差异来筛选候选基因。

RNAi是功能强大且易于实现的工具,但其较高脱靶率等原因易导致假阳性,同时对表达丰度高和半衰期较长的蛋白敲低效率低下等原因易导致假阴性,使其在某些条件下的应用受到限制<sup>[33-34]</sup>。例如,利用不同筛选系统检测到的同类病毒(如HIV-1、HRV或IAV)的候选基因的一致性较低<sup>[32-36]</sup>。为了解决这个问题,Perreira等利用多种同源RNAi试剂(multiple orthologous RNAi reagents, MORR)并行的办法,在发挥每个试剂最佳特性的同时,将其缺点最小化<sup>[37]</sup>,因此,他们

利用 MORR 筛选方法鉴定了 HIV-1 依赖因子 (HDFs) 以及 HRV 宿主因子 (HRV-HFs)<sup>[38-39]</sup>, 通过对 siRNA 序列的比较, 最终发现这 3 个文库的同源性大于 90%, 在一定程度上降低了其假阴性和假阳性水平。

## 2.2 单倍体细胞遗传筛选

基因靶向和 RNAi 技术已经成功地应用于哺乳动物细胞的基因筛选, 但这些方法也存在着不可避免的技术缺陷。尽管 RNAi 可用于细胞水平的高通量筛选, 但易造成基因沉默不完全或将非目标基因沉默<sup>[40]</sup>。近年来, 单倍体胚胎干细胞 (haploid embryonic stem cells, haESCs) 的研究备受关注。单倍体细胞只有一套染色体, 有利于研究一些未知的隐性表型基因突变, 因此它们在遗传分析、基因功能与性状研究中具有独特的优势。单倍体遗传筛选技术利用大量的随机插入逆转录病毒的基因陷阱使单倍体细胞剩余的等位基因突变而灭活, 形成一个随机失活的单倍体细

胞群, 之后利用报告病毒或能产生病变的病毒感染该细胞群, 最后利用高通量测序技术对筛选出报告基因阳性或存活下来的细胞进行分析来初步筛选并鉴定出可能参与病毒入侵的细胞受体 (图 1)。

虽然目前仅有两种单倍体细胞株——来源于慢性粒细胞白血病 (chronic myelogenous leukemia, CML) 患者的 KBM-7 细胞和一种类似于成纤维细胞的 HAPI 细胞两种单倍体细胞株<sup>[38-39]</sup>, 但该技术也已应用于多种病毒的研究, 例如, Timms 等利用 KBM-7 细胞进行了正向遗传筛选, 发现蛋白脂质蛋白 2 (proteolipid protein 2, PLP2) 作为一种功能未知的 MARVEL 结构域蛋白是卡波西肉瘤相关疱疹病毒 (Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus) 基因产物 K5 发挥病毒 E3 泛素连接酶活性所必需的<sup>[41]</sup>; Davis 等利用单倍体遗传学方法剖析了人类细胞中的糖磷脂酰肌醇锚定蛋白 (glycophosphatidylinositol-anchored proteins,

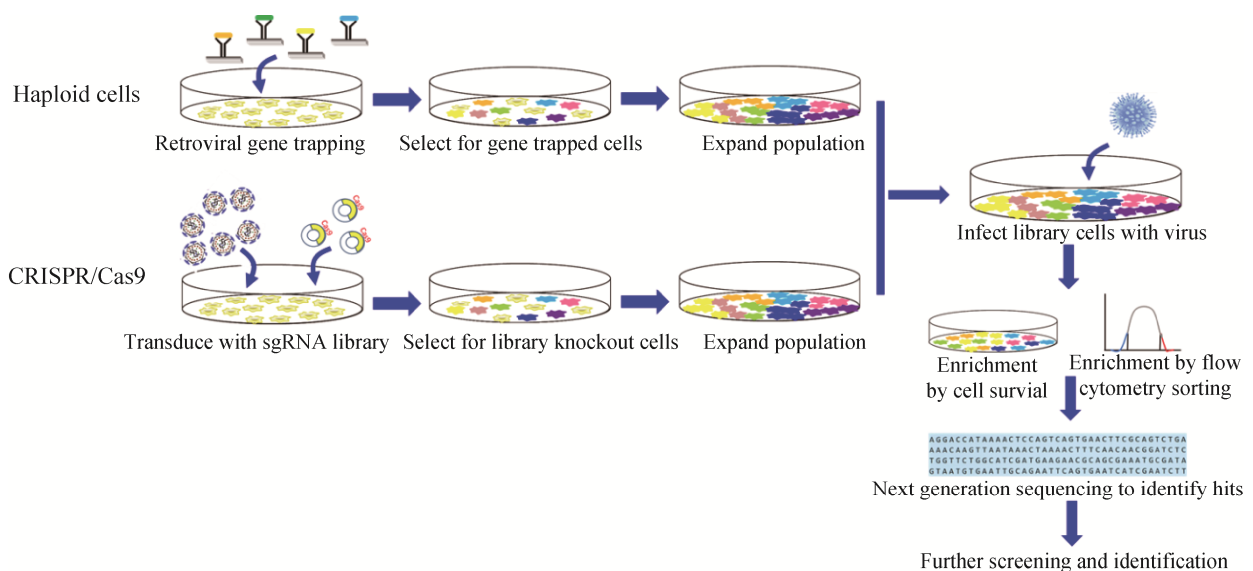


图 1. 单倍体细胞筛选技术及 CRISPR/Cas9 技术筛选病毒功能性受体流程

Figure 1. Screening process of functional viral receptors by haploid cells and CRISPR/Cas9.

GPI-APs)通路, 表明 GPI 锚定成分以底物依赖性的方式影响 GPI-Aps 通路发挥作用<sup>[42]</sup>; Lebensohn 等为了探索 WNT 信号的调控机制, 在人类单倍体细胞中进行了系统的正向遗传筛选, 获得了许多新的发现, 包括 *ANINX2* 的 DAX 结构域在  $\beta$ -连环蛋白( $\beta$ -catenin)转录活性调控中的作用、糖磷脂酰肌醇的生物合成和磷脂酰肌醇聚糖在 Rspo 蛋白(R-spondin)增强 WNT 信号传导中的作用等<sup>[43]</sup>; Kleinfelter 等利用 HAP1 细胞进行单倍体基因筛选, 以鉴定安第斯病毒(Andes virus, ANV)入侵所需的宿主因子, 发现了参与胆固醇传感、调节和生物合成过程的多个基因, 包括甾醇反应元件结合蛋白(sterol response element-binding protein, SREBP)通路的关键分子对 ANV 的入侵至关重要<sup>[44]</sup>。单倍体细胞遗传筛选技术具有特异性高、假阳性率低并且可产生基因的零表型等众多优势, 但其随机插入突变原理使其不能特异性针对某一基因发挥作用, 这成为限制其发展的重要因素。

### 2.3 CRISPR/Cas9 文库法

利用锌指核酸酶(zinc-finger nucleases, ZFNs)<sup>[45]</sup>或转录激活因子样效应物核酸酶(transcription activator-like effector nucleases, TALENs)<sup>[46]</sup>进行同源重组<sup>[47]</sup>的基因靶向是一种耗时的获得纯合子突变体方法, 不适合进行高通量的基因功能分析。而 CRISPR/Cas9 技术通过构建 sgRNA 文库并利用高通量的基因功能分析实现对关键性宿主因子的筛选。CRISPR 是规律间隔性成簇短回文重复序列(clustered regularly interspaced short palindromic repeats)的简称, Cas 是 CRISPR 相关蛋白的简称。该系统最初是在细菌体内发现的, 为了自卫, 细菌和古细菌利用 CRISPR/Cas9 系统进行适应性免疫反应, 以攻击和破坏入侵病

原体的 DNA<sup>[48]</sup>。这种被称为 CRISPR/Cas9 系统的保护性反应已经适应于基因组编辑和基因表达调控, 包括哺乳动物全基因组的体外遗传筛选<sup>[49-51]</sup>。该筛选方法的步骤为: 首先构建稳定表达 Cas9 蛋白的病毒易感细胞的细胞系; 之后设计针对某一病毒易感细胞膜蛋白的 sgRNA, 将所有的 sgRNA 克隆至慢病毒载体, 包装成慢病毒文库; 然后将其以低剂量转导 Cas9 细胞系, 尽量保证每一个细胞只进入一个 sgRNA, 以大剂量感染报告病毒或能够产生细胞病变的病毒, 筛选出报告基因阴性或存活的细胞; 而后提取细胞基因组进行 PCR 扩增, 利用高通量测序技术确定 sgRNA, 找到对应的敲除基因, 进一步研究所敲除基因对病毒感染的影响, 最后获得影响病毒入侵的受体(图 1)。CRISPR/Cas9 技术无疑对影响病毒感染的功能性基因的筛选进行了革新, 利用该技术筛选到调节西尼罗河病毒(West Nile virus, WNV)细胞病变效应的 7 个宿主因子(EMC2、EMC3、SEL1L、DERL2、UBE2G2、UBE2J1 及 HRD1), 敲除这些宿主因子后, 两种 WNV 毒株在 3 种细胞系中不再引起细胞病变<sup>[52]</sup>; Marceau 等利用该技术对登革热病毒(dengue virus, DENV)和 HCV 进行了研究, 在验证了已经报道的细胞受体之外, 还发现了缺乏寡糖基转移酶(oligosaccharyltransferase, OST)复合物的细胞几乎完全阻断 DENV 的复制, 研究还表明, HCV 的复制完全依赖于一定量的黄素腺嘌呤二核苷酸(flavin adenine dinucleotide, FAD)<sup>[53]</sup>; 利用该技术还发现一种唾液酸转运蛋白(sialic acid transporter) SLC35A1 对 IAV 受体的表达和病毒的入侵至关重要<sup>[54]</sup>; 最近利用全基因组 CRISPR/Cas9 的筛选表明, 细胞黏附分子 Mxra8 可作为基孔肯雅病毒(Chikungunya virus)等多种致

关节炎性甲病毒的细胞侵入受体<sup>[55]</sup>。

CRISPR/Cas9 筛选技术克服了采用 RNAi 技术时仅能从 mRNA 水平上抑制基因表达的障碍<sup>[3]</sup>,而单倍体细胞筛选技术受到目前仅有两种单倍体细胞的限制,由此可见,CRISPR/Cas9 技术显然比 RNAi 和单倍体细胞筛选这两种技术更具有优势。利用 CRISPR/Cas9 技术在全基因组规模上构建敲除载体库十分简便,构建了人源和鼠源全基因组的 sgRNA 文库并不断改进该技术<sup>[56-58]</sup>。将靶向特定基因的 Cas9 蛋白与针对全基因组的多个重组 sgRNA 的设计结合起来,在全基因组范围内有效鉴定机体内重要的功能基因<sup>[53]</sup>。对 Cas9 蛋白进行改造后而获得的 CRISPR/dCas9 系统可以招募不同的转录因子促进或抑制基因的表达水平,如 Julianna 等利用 CRISPR/dCas9 文库筛选出宿主分子糖基转移酶 B4GALNT2 可抑制禽流感病毒(pan-avian influenza virus)的复制<sup>[59]</sup>。最近研究表明, Cas9 对单链 RNA 也有作用<sup>[60]</sup>。这一发现可能使人们能够像操纵 DNA 一样对 RNA 分子进行分析。经过不断的努力,在体内应用 Cas9 介导的 RNA 识别技术可能会使 RNA 切割等应用成为可能,进而增强特异性 RNA 的翻译或分离<sup>[60]</sup>。同样, Cas9 融合蛋白对 RNA 进行特异性修饰的能力,为探讨 RNA 调控中的功能提供了一种新的工具。

### 3 病毒功能性细胞受体筛选策略的比较

这些看似存在竞争的技术给研究人员留下一个问题:应该在实际研究中应用哪种技术?每种功能缺失性筛选策略都有其自身的优点和局限性(表 1),因此最优策略的选择一般取决于病毒的感

染特点、研究平台和试验设计。单倍体细胞筛选技术作为筛选技术的“金标准”,因其具有特异性高、假阳性率低并且能够产生基因零表型等优势,存在可应用的单倍体细胞的情况下,可选择该技术进行病毒功能性细胞受体的筛选。而对于 RNAi 和 CRISPR/Cas9 基因组编辑技术间最显著的差异在于 RNAi 引起基因表达的短暂性下调,通过 Cas9 核酸酶进行基因组编辑会导致靶向 DNA 的永久性损伤。因此,应该考虑的主要问题是“需要进行一个基因完全敲除还是一个等位基因的敲低”。对于许多研究来说,实现完全敲除是必需的。例如,在蛋白质缓慢降解的情况下,转录水平的降低不一定会引起蛋白水平的降低。与转录抑制相比, Cas9 核酸酶介导的基因组编辑有一个显著的优势,即它针对的是外显子结构域,而不是转录起始位点(transcription start sites, TSSs),这样可以利用一个 sgRNA 敲除整个基因家族各成员之间保守的外显子。另外,由于 CRISPR/Cas9 筛选条件严格,所获得的宿主分子较少,因此极大地降低了假阳性结果,所筛选的大多是调控病毒感染的关键宿主因子。RNAi 虽然不能完全破坏基因功能,但也有其自身的优势。首先,基因敲低的过程是可逆的,这种性质在某些研究中是非常有价值的<sup>[61]</sup>;此外,基因敲低或许更利于某些药物靶点的发现,因为基因敲低后的效果可能更接近于抑制性药物的作用;另一个重要的优势是短期内即可获得 RNAi 敲低细胞株,而且不需要筛选纯合子的敲除克隆,这对于增殖能力有限或生长活力不佳的原代细胞尤为重要。

### 4 结语和展望

病毒受体是病毒侵入靶细胞的关键宿主因

表 1. RNA 干扰、单倍体细胞和 CRISPR/Cas9 筛选技术的优缺点

Table 1. Advantages and disadvantages of RNAi, haploid cells, and CRISPR/Cas9

Methods	Advantages	Disadvantages
RNAi (arrayed)	Can use diverse cell lines; High transfection efficiency of adherent cells; Increased sensitivity: arrayed format permits selection of a gradation of phenotypes; Library key permits rapid gene identification; Readily validated using reagent redundancy; Short-term screens (<10 days).	Off-target effects; False negatives; Loss-of-function only; RISC has questionable or limited activity in the nucleus; Difficult to transfect primary cells or suspension cells; Difficult to use suspension cells in an arrayed format.
RNAi (pooled)	No limitations on cell lines; Viral transduction works better for suspension cells; Good format for suspension cells; Long-term screens (>10 days); Lower cost than siRNA once the shRNA library is available.	Off-target effects; False negatives; Loss-of-function only; RISC has questionable or limited activity in the nucleus; Target knockdown more difficulty due to only one shRNA-producing provirus per cell.
Haploid cells	Finds receptors, entry factors, and associated genes; High specificity: less false positives; Generates null phenotype; Long-term screens (>10 days); Low cost to perform survival screens. Can use diverse cell lines; High specificity: less offtarget effects; Generates null phenotype; Viral transduction works better for suspension cells than transfection;	Random insertion mutagenesis cannot specifically target a gene; Only two available haploid cell lines; PCR/next-generation sequencing needed to identify hits; Loss-of-function only; Retroviral insertion bias may not permit saturation. PCR/next-generation sequencing needed to identify hits;
CRISPR/Cas9	High specificity; Long-term screens (>10 days); Can inhibit or activate gene expression (CRISPRa and CRISPRi); Can remove large sections of a targeted locus (e.g., inactivate lncRNAs).	Relatively slower validation; Arrayed lentiviral format will be cumbersome.

子, 对其结构、本质和特征的探索, 对病毒感染过程、致病机理以及有针对性地研制抗病毒药物和疫苗具有重要的理论意义和极大的应用价值。绝大多数病毒受体是膜相关蛋白, 在细胞浆中的表达水平极低, 而且各种病毒受体研究方法具有一定的局限性, 仅靠一种研究方法往往难以达到预期目标, 因此需要将各种研究方法结合起来, 取长补短, 发挥各种筛选策略的最大优势, 以达

到筛选病毒功能性受体的目的。近年来, 随着基因功能研究技术的不断更新, 利用基因功能性缺失原理的受体筛选策略引领了病毒功能性受体研究的新方向, RNA 干扰技术、单倍体细胞遗传筛选技术及 CRISPR/Cas9 技术的应用极大地扩展了我们对致病病毒如何利用宿主细胞进行复制的认识和理解(表 1), 但这些方法的缺点也限制了其更广泛的应用, 因此我们应该根据实际需要, 结合

这些方法的优缺点,合理地利用这些筛选策略进行病毒功能性受体的筛选工作。将高通量筛选与精准试验验证相结合,如利用高通量筛选技术确定了一部分候选基因后,利用病毒铺覆蛋白印迹技术、免疫共沉淀技术、亲和层析技术、噬菌体表面展示技术、特异性单克隆抗体技术、受体重建试验等方法进行系统鉴定,以获得参与病毒入侵的功能性受体。

即使人们普遍认为高通量 RNAi 筛选策略不足以对基因功能进行高度分析<sup>[29]</sup>。但如果在筛选过程中注意试剂、分析设计、数据分析、数据集成和后续实验验证,大规模的 RNAi 筛选可以成功地发现新的基因、信号通路和基因网络。在未来的几年里,它将一直是众多研究领域中有价值的研究工具;单倍体细胞遗传筛选技术因其可以特异性地产生基因的零表型成为筛选策略的“金标准”,但目前仅有两种可利用的单倍体细胞株,并且基于随机插入突变的筛选具有不确定性。利用单倍体细胞株结合 CRISPR/Cas9 基因编辑技术的筛选,可以使筛选结果更为可靠并能够较深层次地进行全基因组功能性筛选分析。

利用各种形式的 CRISPR 系统,可以简单便捷地实现全基因组编辑,还可以根据具体的实验需求采用敲除、抑制或激活等不同的调节方式,弥补了 RNAi、TALEN 等技术的不足。但 CRISPR 技术仍存在许多改进的空间,主要是如何进一步提高靶向编辑效率并降低脱靶率。首先,对于任何 DNA 序列,“NGG”前的邻近基序 PAM 序列,都可以作为 sgRNA 的靶点,但整个基因组中存在着很多这样的靶向序列。目前已经有一些研究者针对 CRISPR 系统对于靶点序列的偏好性进行了研究。Doench 等利用 sgRNA 文库对小鼠和人类

的细胞表面标记进行筛选,发现新的 PAM 序列“CGGH”(H=A、C 或 T)比一般认定“NGG”的 PAM 序列效果更好<sup>[62]</sup>;其次,也有必要对 CRISPR 系统所需要的 Cas 酶进行改造,Ran 等发现了一种源自金黄色葡萄球菌的新型 saCas9 并成功地应用于哺乳动物基因组的编辑<sup>[63]</sup>,因其基因组较小,极大地提高了慢病毒效价,在基因敲除领域具有更广的应用前景;而 Zetsche 等发现了一种源自毛螺旋菌科的 CRISPR II 型蛋白 Cpf1,与 Cas9 相比,Cpf1 仅需一段 42–44 个核苷酸组成的单链 RNA 即可识别和切除 DNA,从而简化了实验设计步骤,更有利于多基因编辑<sup>[64]</sup>。随着对更多来自其他物种的 Cas 家族蛋白的逐渐开发,在未来很可能会找到性能更好、适用于不同实验目的的新型 Cas 酶。这样随着 CRISPR 系统相应组件的逐渐优化以及技术的不断成熟,该技术的应用前景将十分广阔!

## 参 考 文 献

- [1] Konan KV, Sanchez-Felipe L. Lipids and RNA virus replication. *Current Opinion in Virology*, 2014, 9: 45–52.
- [2] Schmid M, Speiseder T, Dobner T, Gonzalez RA. DNA virus replication compartments. *Journal of Virology*, 2014, 88(3): 1404–1420.
- [3] Boettcher M, McManus MT. Choosing the right tool for the job: RNAi, TALEN, or CRISPR. *Molecular Cell*, 2015, 58(4): 575–585.
- [4] Fire A, Xu SQ, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 1998, 391(6669): 806–811.
- [5] Brass AL, Dykxhoorn DM, Benita Y, Yan N, Engelman A, Xavier RJ, Lieberman J, Elledge SJ. Identification of host proteins required for HIV infection through a functional genomic screen. *Science*, 2008, 319(5865): 921–926.
- [6] Hao LH, Sakurai A, Watanabe T, Sorensen E, Nidom CA, Newton MA, Ahlquist P, Kawaoka Y. *Drosophila* RNAi screen identifies host genes important for influenza virus



- replication. *Nature*, 2008, 454(7206): 890–893.
- [7] Krishnan MN, Ng A, Sukumaran B, Gilfoy FD, Uchil PD, Sultana H, Brass AL, Adametz R, Tsui M, Qian F, Montgomery RR, Lev S, Mason PW, Koski RA, Elledge SJ, Xavier RJ, Agaisse H, Fikrig E. RNA interference screen for human genes associated with West Nile virus infection. *Nature*, 2008, 455(7210): 242–245.
- [8] Randall G, Panis M, Cooper JD, Tellinghuisen TL, Sukhodolets KE, Pfeffer S, Landthaler M, Landgraf P, Kan S, Lindenbach BD, Chien M, Weir DB, Russo JJ, Ju J, Brownstein MJ, Sheridan R, Sander C, Zavolan M, Tuschl T, Rice CM. Cellular cofactors affecting hepatitis C virus infection and replication. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2007, 104(31): 12884–12889.
- [9] Sessions OM, Barrows NJ, Souza-Neto JA, Robinson TJ, Hershey CL, Rodgers MA, Ramirez JL, Dimopoulos G, Yang PL, Pearson JL, Garcia-Blanco MA. Discovery of insect and human dengue virus host factors. *Nature*, 2009, 458(7241): 1047–1050.
- [10] Shalem O, Sanjana NE, Zhang F. High-throughput functional genomics using CRISPR-Cas9. *Nature Reviews Genetics*, 2015, 16(5): 299–311.
- [11] Rajčani J. Molecular mechanisms of virus spread and virion components as tools of virulence. A review. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica*, 2003, 50(4): 407–431.
- [12] Klimstra WB, Ryman KD, Johnston RE. Adaptation of Sindbis virus to BHK cells selects for use of heparan sulfate as an attachment receptor. *Journal of Virology*, 1998, 72(9): 7357–7366.
- [13] Sa-Carvalho D, Rieder E, Baxt B, Rodarte R, Tanuri A, Mason PW. Tissue culture adaptation of foot-and-mouth disease virus selects viruses that bind to heparin and are attenuated in cattle. *Journal of Virology*, 1997, 71(7): 5115–5123.
- [14] Hulst MM, van Gennip HGP, Vlot AC, Schooten E, de Smit AJ, Moormann RJM. Interaction of classical swine fever virus with membrane-associated heparan sulfate: role for virus replication *in vivo* and virulence. *Journal of Virology*, 2001, 75(20): 9585–9595.
- [15] Schols D. HIV co-receptor inhibitors as novel class of anti-HIV drugs. *Antiviral Research*, 2006, 71(2/3): 216–226.
- [16] Ujino S, Nishitsuji H, Hishiki T, Sugiyama K, Takaku H, Shimotohno K. Hepatitis C virus utilizes VLDLR as a novel entry pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2016, 113(1): 188–193.
- [17] Martínez-Muñoz L, Barroso R, Dyrhaug SY, Navarro G, Lucas P, Soriano SF, Vega B, Costas C, Muñoz-Fernández MÁ, Santiago C, Rodríguez Frade JM, Franco R, Mellado M. CCR5/CD4/CXCR4 oligomerization prevents HIV-1 gp120IIIB binding to the cell surface. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2014, 111(19): E1960–E1969.
- [18] Li XX, Bangari DS, Sharma A, Mittal SK. Bovine adenovirus serotype 3 utilizes sialic acid as a cellular receptor for virus entry. *Virology*, 2009, 392(2): 162–168.
- [19] Li WH, Moore MJ, Vasilieva N, Sui JH, Wong SK, Berne MA, Somasundaran M, Sullivan JL, Luzuriaga K, Greenough TC, Choe H, Farzan M. Angiotensin-converting enzyme 2 is a functional receptor for the SARS coronavirus. *Nature*, 2003, 426(6965): 450–454.
- [20] Yan H, Zhong GC, Xu GW, He WH, Jing ZY, Gao ZC, Huang Y, Qi YH, Peng B, Wang HM, Fu LR, Song M, Chen P, Gao WQ, Ren BJ, Sun YY, Cai T, Feng XF, Sui JH, Li WH. Sodium taurocholate cotransporting polypeptide is a functional receptor for human hepatitis B and D virus. *eLife*, 2012, 1: e00049.
- [21] Jolly CL, Huang JA, Holmes IH. Selection of rotavirus VP4 cell receptor binding domains for MA104 cells using a phage display library. *Journal of Virological Methods*, 2001, 98(1): 41–51.
- [22] Shimojima M, Miyazawa T, Ikeda Y, McMonagle EL, Haining H, Akashi H, Takeuchi Y, Hosie MJ, Willett BJ. Use of CD134 as a primary receptor by the feline immunodeficiency virus. *Science*, 2004, 303(5661): 1192–1195.
- [23] Ploss A, Evans MJ, Gaysinskaya VA, Panis M, You H, de Jong YP, Rice CM. Human occludin is a hepatitis C virus entry factor required for infection of mouse cells. *Nature*, 2009, 457(7231): 882–886.
- [24] Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschl T. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature*, 2001, 411(6836): 494–498.

- [25] Grishok A, Mello CC. RNAi (Nematodes: *Caenorhabditis elegans*). *Advances in Genetics*, 2002, 46: 339–360.
- [26] Paddison PJ, Silva JM, Conklin DS, Schlabach M, Li M, Aruleba S, Balija V, O'Shaughnessy A, Gnoj L, Scobie K, Chang K, Westbrook T, Cleary M, Sachidanandam R, McCombie WR, Elledge SJ, Hannon GJ. A resource for large-scale RNA-interference-based screens in mammals. *Nature*, 2004, 428(6981): 427–431.
- [27] Root DE, Hacohen N, Hahn WC, Lander ES, Sabatini DM. Genome-scale loss-of-function screening with a lentiviral RNAi library. *Nature Methods*, 2006, 3(9): 715–719.
- [28] Silva JM, Li MZ, Chang K, Ge W, Golding MC, Rickles RJ, Siolas D, Hu G, Paddison PJ, Schlabach MR, Sheth N, Bradshaw J, Burchard J, Kulkarni A, Cavet G, Sachidanandam R, McCombie WR, Cleary MA, Elledge SJ, Hannon GJ. Second-generation shRNA libraries covering the mouse and human genomes. *Nature Genetics*, 2005, 37(11): 1281–1288.
- [29] Su WC, Chen YC, Tseng CH, Hsu PWC, Tung KF, Jeng KS, Lai MMC. Pooled RNAi screen identifies ubiquitin ligase Itch as crucial for influenza A virus release from the endosome during virus entry. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2013, 110(43): 17516–17521.
- [30] Tran AT, Rahim MN, Ranadheera C, Kroeker A, Cortens JP, Opanubi KJ, Wilkins JA, Coombs KM. Knockdown of specific host factors protects against influenza virus-induced cell death. *Cell Death & Disease*, 2013, 4(8): e769.
- [31] Yeung ML, Houzet L, Yedavalli VSRK, Jeang KT. A genome-wide short hairpin RNA screening of Jurkat T-cells for human proteins contributing to productive HIV-1 replication. *Journal of Biological Chemistry*, 2009, 284(29): 19463–19473.
- [32] Bushman FD, Malani N, Fernandes J, D'Orso I, Cagney G, Diamond TL, Zhou HL, Hazuda DJ, Espeseth AS, König R, Bandyopadhyay S, Ideker T, Goff SP, Krogan NJ, Frankel AD, Young JAT, Chanda SK. Host cell factors in HIV replication: meta-analysis of genome-wide studies. *PLoS Pathogens*, 2009, 5(5): e1000437.
- [33] Hao LH, He QL, Wang ZS, Craven M, Newton MA, Ahlquist P. Limited agreement of independent RNAi screens for virus-required host genes owes more to false-negative than false-positive factors. *PLoS Computational Biology*, 2013, 9(9): e1003235.
- [34] Zhu J, Davoli T, Perriera JM, Chin CR, Gaiha GD, John SP, Sigiollot FD, Gao G, Xu QK, Qu HJ, Pertel T, Sims JS, Smith JA, Baker RE, Maranda L, Ng A, Elledge SJ, Brass AL. Comprehensive identification of host modulators of HIV-1 replication using multiple orthologous RNAi reagents. *Cell Reports*, 2014, 9(2): 752–766.
- [35] Booker M, Samsonova AA, Kwon Y, Flockhart I, Mohr SE, Perrimon N. False negative rates in *Drosophila* cell-based RNAi screens: a case study. *BMC Genomics*, 2011, 12: 50.
- [36] Perreira JM, Aker AM, Savidis G, Chin CR, McDougall WM, Portmann JM, Meraner P, Smith MC, Rahman M, Baker RE, Gauthier A, Franti M, Brass AL. RNASEK is a V-ATPase-associated factor required for endocytosis and the replication of rhinovirus, influenza A virus, and dengue virus. *Cell Reports*, 2015, 12(5): 850–863.
- [37] Perreira JM, Meraner P, Brass AL. Functional genomic strategies for elucidating human-virus interactions: will CRISPR knockout RNAi and haploid cells? *Advances in Virus Research*, 2016, 94: 1–51.
- [38] Andersson BS, Beran M, Pathak S, Goodacre A, Barlogie B, McCredie KB. Ph-positive chronic myeloid leukemia with near-haploid conversion *in vivo* and establishment of a continuously growing cell line with similar cytogenetic pattern. *Cancer Genetics and Cytogenetics*, 1987, 24(2): 335–343.
- [39] Carette JE, Pruszk J, Varadarajan M, Blomen VA, Gokhale S, Camargo FD, Wernig M, Jaenisch R, Brummelkamp TR. Generation of iPSCs from cultured human malignant cells. *Blood*, 2010, 115(20): 4039–4042.
- [40] Campeau E, Gobeil S. RNA interference in mammals: behind the screen. *Briefings in Functional Genomics*, 2011, 10(4): 215–226.
- [41] Timms RT, Duncan LM, Tchasovnikarova IA, Antrobus R, Smith DL, Dougan G, Weekes MP, Lehner PJ. Haploid genetic screens identify an essential role for PLP2 in the downregulation of novel plasma membrane targets by viral E3 ubiquitin ligases. *PLoS Pathogens*, 2013, 9(11): e1003772.
- [42] Davis EM, Kim J, Menasche BL, Sheppard J, Liu XD, Tan AC, Shen JS. Comparative haploid genetic screens reveal divergent pathways in the biogenesis and trafficking of glycoposphatidylinositol-anchored proteins. *Cell Reports*,

- 2015, 11(11): 1727–1736.
- [43] Lebensohn AM, Dubey R, Neitzel LR, Tacchelly-Benites O, Yang E, Marceau CD, Davis EM, Patel BB, Bahrami-Nejad Z, Travaglini KJ, Ahmed Y, Lee E, Carette JE, Rohatgi R. Comparative genetic screens in human cells reveal new regulatory mechanisms in WNT signaling. *eLife*, 2016, 5: e21459.
- [44] Kleinfelter LM, Jangra RK, Jae LT, Herbert AS, Mittler E, Stiles KM, Wirchnianski AS, Kielian M, Brummelkamp TR, Dye JM, Chandran K. Haploid genetic screen reveals a profound and direct dependence on cholesterol for hantavirus membrane fusion. *mBio*, 2015, 6(4): e00801.
- [45] Carroll D. Progress and prospects: zinc-finger nucleases as gene therapy agents. *Gene Therapy*, 2008, 15(22): 1463–1468.
- [46] Reyon D, Tsai SQ, Khayter C, Foden JA, Sander JD, Joung JK. FLASH assembly of TALENs for high-throughput genome editing. *Nature Biotechnology*, 2012, 30(5): 460–465.
- [47] Mortensen R. Overview of gene targeting by homologous recombination. *Current Protocols in Neuroscience*, 2007, 40(1): 4.29.1–4.29.13.
- [48] Doudna JA, Charpentier E. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science*, 2014, 346(6213): 1258096.
- [49] Cong L, Ran FA, Cox D, Lin SL, Barretto R, Habib N, Hsu PD, Wu XB, Jiang WY, Marraffini LA, Zhang F. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*, 2013, 339(6121): 819–823.
- [50] 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. *Science*, 2014, 343(6166): 84–87.
- [51] Wang T, Wei JJ, Sabatini DM, Lander ES. Genetic screens in human cells using the CRISPR-Cas9 system. *Science*, 2014, 343(6166): 80–84.
- [52] 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. *Cell Reports*, 2015, 12(4): 673–683.
- [53] 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. *Nature*, 2016, 535(7610): 159–163.
- [54] Han J, Perez JT, Chen C, Li Y, Benitez A, Kandasamy M, Lee Y, Andrade J, tenOever B, Manicassamy B. Genome-wide CRISPR/Cas9 screen identifies host factors essential for influenza virus replication. *Cell Reports*, 2018, 23(2): 596–607.
- [55] Zhang R, Kim AS, Fox JM, Nair S, Basore K, Klimstra WB, Rimkunas R, Fong RH, Lin H, Poddar S, Crowe JE Jr, Doranz BJ, Fremont DH, Diamond MS. Mxra8 is a receptor for multiple arthritogenic alphaviruses. *Nature*, 2018, 557(7706): 570–574.
- [56] Zhou YX, Zhu SY, Cai CZ, Yuan PF, Li CM, Huang YY, Wei WS. High-throughput screening of a CRISPR/Cas9 library for functional genomics in human cells. *Nature*, 2014, 509(7501): 487–491.
- [57] Sanjana NE, Shalem O, Zhang F. Improved vectors and genome-wide libraries for CRISPR screening. *Nature Methods*, 2014, 11(8): 783–784.
- [58] Slaymaker IM, Gao LY, Zetsche B, Scott DA, Yan WX, Zhang F. Rationally engineered Cas9 nucleases with improved specificity. *Science*, 2016, 351(6268): 84–88.
- [59] Heaton BE, Kennedy EM, Dumm RE, Harding AT, Sacco MT, Sachs D, Heaton NS. A CRISPR activation screen identifies a pan-avian influenza virus inhibitory host factor. *Cell Reports*, 2017, 20(7): 1503–1512.
- [60] O'Connell MR, Oakes BL, Sternberg SH, East-Seletsky A, Kaplan M, Doudna JA. Programmable RNA recognition and cleavage by CRISPR/Cas9. *Nature*, 2014, 516(7530): 263–266.
- [61] Xue W, Zender L, Miething C, Dickins RA, Hernando E, Krizhanovsky V, Cordon-Cardo C, Lowe SW. Senescence and tumour clearance is triggered by p53 restoration in murine liver carcinomas. *Nature*, 2007, 445(7128): 656–660.
- [62] Doench JG, Hartenian E, Graham DB, Tothova Z, Hegde M, Smith I, Sullender M, Ebert BL, Xavier RJ, Root DE. Rational design of highly active sgRNAs for CRISPR-Cas9-mediated gene inactivation. *Nature Biotechnology*, 2014, 32(12): 1262–1267.
- [63] Ran FA, Cong L, Yan WX, Scott DA, Gootenberg JS, Kriz AJ, Zetsche B, Shalem O, Wu XB, Makarova KS, Koonin EV, Sharp PA, Zhang F. *In vivo* genome editing using *Staphylococcus aureus* Cas9. *Nature*, 2015, 520(7546):

186–191.

[64] Zetsche B, Gootenberg JS, Abudayyeh OO, Slaymaker IM, Makarova KS, Essletzbichler P, Volz SE, Joung J, van der

Oost J, Regev A, Koonin EV, Zhang F. Cpf1 is a single RNA-guided endonuclease of a class 2 CRISPR-Cas system. *Cell*, 2015, 163(3): 759–771.

## Novel strategies for screening functional viral receptors and their applications

Huimin Sun, Su Li, Wenjing Wang, Hua-Ji Qiu\*

Harbin Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150069, Heilongjiang Province, China

**Abstract:** Viruses attach and invade target-cells by binding to a specific receptor(s) on the surface of target-cells, and hijack the cellular replication machinery to complete the life cycle. The cellular receptor is the gateway for viruses to infect host cells, and the structure and function of cellular receptors and the mechanism of virus entry mediated by cellular receptors have been one of the hotspots of molecular virology. The discovery of cellular receptors is helpful to understand the pathogenesis of viruses and develop prevention and control strategies for viral diseases. In recent years, the progress in screening functional viral receptors using functional genomics has greatly expanded our understanding of the mechanism of virus entry. At present, widely used functional viral receptor screening strategies include RNA interference, random retroviral insertional mutagenesis using haploid cell lines and the recently emerging CRISPR/Cas9 system. In this review, three novel strategies of functional viral receptors screening are systematically introduced and compared, and their applications, advantages and disadvantages are summarized to provide references for relevant researchers.

**Keywords:** functional viral receptor, novel strategies for screening, RNA interference, haploid genetic screen, CRISPR/Cas9

(本文责编: 李磊)

---

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31630080, 31672537)

\*Corresponding author. Tel/Fax: +86-451-51051708; E-mail: qihuaji@caas.cn

Received: 23 July 2018; Revised: 10 September 2018; Published online: 20 November 2018