



敲除 *LTA4H* 基因的 PK-15 细胞系构建及其对 口蹄疫病毒复制的影响

王家丽^{1,2,3}, 蒲秀瑛¹, 杨帆^{2,3}, 邵文华^{2,3}, 黄梦瑶^{2,3}, 曹伟军^{2,3}, 郑海学^{1,2,3*},
张伟^{2,3*}

1 兰州理工大学生命科学与工程学院, 甘肃 兰州 730050

2 中国农业科学院兰州兽医研究所/兰州大学动物医学与生物安全学院 动物疫病防控全国重点实验室,
甘肃 兰州 730000

3 甘肃省病原生物学基础学科研究中心, 甘肃 兰州 730046

王家丽, 蒲秀瑛, 杨帆, 邵文华, 黄梦瑶, 曹伟军, 郑海学, 张伟. 敲除 *LTA4H* 基因的 PK-15 细胞系构建及其对口蹄疫病毒复制的影响[J]. 微生物学报, 2024, 64(3): 733-744.

WANG Jiali, PU Xiuying, YANG Fan, SHAO Wenhua, HUANG Mengyao, CAO Weijun, ZHENG Haixue, ZHANG Wei. Construction of PK-15 cell line with *LTA4H* gene knockout and its impact on the replication of foot-and-mouth disease virus[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2024, 64(3): 733-744.

摘要: 【目的】利用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术构建白三烯 A4 水解酶(leukotriene A4 hydrolase, *LTA4H*)基因缺失的猪肾细胞系(porcine kidney-15, PK-15), 探究 *LTA4H* 对口蹄疫病毒(foot-and-mouth disease virus, FMDV)复制的影响, 为开展 *LTA4H* 功能研究及调控病毒复制机制研究提供理论依据。

【方法】设计 2 条针对猪 *LTA4H* 基因的引导 RNA (small guide RNA, sgRNA), 分别构建至载体 pX459-puro-MCS 中; 将 CRISPR 重组质粒转染 PK-15 细胞, 用嘌呤霉素(puromycin)抗生素筛选, 并通过有限稀释法筛选单克隆细胞, 之后通过 Western blotting 和测序检测 *LTA4H* 基因的敲除, 获得 *LTA4H* 基因功能缺失细胞系。使用 Western blotting, RT-qPCR 及病毒滴度测定等方法检测敲除 *LTA4H* 基因后对 FMDV 复制及相关蛋白的表达情况。【结果】获得的单克隆敲除细胞系与野生型细胞相比,

资助项目: 国家自然科学基金(32102639, 32072831); 国家重点研发计划(2021YFD1800300); 甘肃省杰出青年基金(21JR7RA026); 兰州大学中央高校基本科研业务费专项资金(lzujbky-2022-ey20); “十四五”广东省农业科技创新十大主攻方向“揭榜挂帅”项目(2023SDZG02); 国家生猪产业技术体系(CARS-35)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (32102639, 32072831), the National Key Research and Development Program of China (2021YFD1800300), the Distinguished Young Scholars Fund of Gansu Province (21JR7RA026), the Basic Research Fund of the Central University of Lanzhou University (lzujbky-2022-ey20), the Open Competition Program of Top Ten Critical Priorities of Agricultural Science and Technology Innovation for the 14th Five-Year Plan of Guangdong Province (2023SDZG02), and the National Technical System for Pig Industry (CARS-35).

*Corresponding authors. E-mail: ZHENG Haixue, zhenghaixue@caas.cn; ZHANG Wei, zw20082008@126.com

Received: 2023-07-29; Accepted: 2023-12-13; Published online: 2023-12-25

能够显著抑制 FMDV 复制。【结论】本研究成功构建了 *LTA4H* 基因敲除的 PK-15 细胞系，证明 *LTA4H* 对 FMDV 的复制具有促进作用，研究结果为后续 *LTA4H* 功能研究提供理论依据。

关键词：CRISPR/Cas9；白三烯 A4 水解酶；细胞系；口蹄疫病毒

Construction of PK-15 cell line with *LTA4H* gene knockout and its impact on the replication of foot-and-mouth disease virus

WANG Jiali^{1,2,3}, PU Xiuying¹, YANG Fan^{2,3}, SHAO Wenhua^{2,3}, HUANG Mengyao^{2,3}, CAO Weijun^{2,3}, ZHENG Haixue^{1,2,3*}, ZHANG Wei^{2,3*}

1 School of Life Science and Engineering, Lanzhou University of Technology, Lanzhou 730050, Gansu, China

2 State Key Laboratory of Animal Disease Prevention and Control, Lanzhou Veterinary Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences/College of Animal Medicine and Biosafety, Lanzhou University, Lanzhou 730000, Gansu, China

3 Gansu Provincial Research Center of Pathogen Biology, Lanzhou 730046, Gansu, China

Abstract: [Objective] A *LTA4H*-deleted porcine kidney cell line (PK-15) was constructed by CRISPR/Cas9 to study the effect of *LTA4H* on the replication of foot-and-mouth disease virus (FMDV), with a view to providing a theoretical basis for revealing the functions of *LTA4H* and the mechanism of regulating virus replication. [Methods] Two small guide RNAs (sgRNAs) targeting porcine *LTA4H* were designed and integrated into the vector pX459-puro-MCS, respectively. The recombinant plasmid was transfected into PK-15 cells, which were then cultured in the medium supplemented with puromycin, and the monoclonal cells were selected by limiting dilution method. Western blotting and sequencing were performed to detect *LTA4H* knockout, and *LTA4H*-deleted cells were obtained. Furthermore, Western blotting, RT-qPCR, and virus titer assay were employed to examine FMDV replication and protein expression after *LTA4H* knockout. [Results] Compared with the wild type cells, the *LTA4H*-deleted PK-15 cells exhibited inhibited FMDV replication. [Conclusion] This study successfully constructed a PK-15 cell line with *LTA4H* gene knockout, demonstrating that *LTA4H* can promote the replication of FMDV, and the results provided a theoretical basis for the subsequent research on the function of *LTA4H*.

Keywords: CRISPR/Cas9; leukotriene A4 hydrolase; cell lines; foot-and-mouth disease virus

白三烯 A4 水解酶(leukotriene A4 hydrolase, LTA4H)属于肽酶 M1 家族蛋白，是一种双功能含锌酶，也是重要的抗炎靶点^[1]，具有环氧化物水解酶和氨基肽酶的活性。作为环氧化物水解酶，LTA4H 催化环氧化物白三烯 A4 (leukotriene A4, LTA4)水解转化为促炎物质白三烯 B4

(leukotriene B4, LTB4)，LTA4H 主要起化学引诱剂和炎症细胞激活剂的作用，以响应各种刺激反应^[2-3]。作为一种氨基肽酶，LTA4H 可以处理与炎症和宿主防御相关的肽。此外，LTA4H 和 5-脂氧合酶(5-lipoxygenase, 5-LOX)作为花生四烯酸(arachidonic acid, AA)代谢途径中 5-LOX 分

支的主要靶点, 发挥其经典的生物学功能, 包括趋化性、内皮细胞黏附和白细胞活化^[4-5], 其在炎症的治疗中起着重要作用, 是癌症化学预防和化疗的新靶点^[6]。

近几年来, 对 *LTA4H* 基因多态性的研究多集中在癌症及呼吸系统疾病等方面^[7], 最近的研究表明, *LTA4H* 促进了肿瘤的增殖、迁移和转移^[8-9], 在几种人类癌症中过表达^[10]。在食管腺癌的慢性炎症相关动物模型中, 与正常组织相比, *LTA4H* 在肿瘤中过表达^[11-12]。Mansoura 大学的研究人员报道了一种新的烷型二萜通过抑制 *LTA4H* 活性抑制人 HCT-116 结直肠癌^[13]。*LTA4H* 也参与结核病(tuberculosis, TB)中的反常反应(paradoxical reaction, PR), 当 PR 涉及中枢神经系统(central nervous system, CNS)等关键结构时, 进行免疫调节治疗^[14]。在病毒研究方面, *LTA4H* 水解酶在杆状病毒载体感染昆虫细胞中高水平表达^[15]。此外, *LTA4H* 抑制剂 MTX 通过高亲和力靶向 *LTA4H* 抑制促炎介质 *LTB4* 的产生, 有效抑制宿主的促炎功能和抗病毒免疫, 从而促进病毒感染^[16]。然而, *LTA4H* 在口蹄疫中的作用尚不清楚, 前期本团队通过质谱筛选发现口蹄疫病毒 3B 蛋白可能与 *LTA4H* 相互作用(质谱分析图数据已提交国家微生物科学数据中心, 编号: NMDCX0000244), 但具体调控机制不清楚。为此本团队在 PK-15 细胞上构建 *LTA4H* 缺失细胞系, 研究 *LTA4H* 蛋白是否能够调控病毒的复制, 为后续 *LTA4H* 功能研究及抗病毒机制研究提供理论依据。

口蹄疫(foot-and-mouth disease, FMD)是一种由口蹄疫病毒(foot-and-mouth disease virus, FMDV)感染偶蹄类动物的传染病, 目前发现猪、牛、羊等多种易感动物。由于口蹄疫的巨大危害性, 被世界动物卫生组织(World Organization for Animal Health, WAHO)列为一种最具传染性

的疫病。FMDV 属于小 RNA 病毒科、口蹄疫病毒属^[17-18], 无囊膜, 包含一个约 8 500 bp 的单股正链 RNA 基因组^[19]。FMDV 的基因组本身只编码 12 种蛋白质, 然而这些蛋白不足以完成自身的生命周期, 因此必须借助宿主细胞。宿主细胞蛋白种类繁多, 功能多样, 其中一些蛋白质功能的发挥有利于病毒生长, 另一些蛋白质功能的发挥威胁病毒生存。宿主细胞被病毒感染, 感染过程一方面采用了能够表达蛋白质或复制其基因组和子代的机制组装病毒粒子, 另一方面病毒需要以某种方式避免被宿主清除, 包括逃避免疫监视、抑制免疫相关基因表达、诱导凋亡等。

本研究发现宿主蛋白 *LTA4H* 在调控 FMDV 复制中有重要作用, 采用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术, 在 PK-15 细胞上成功构建了 *LTA4H* 缺失细胞系, 通过 RT-qPCR、Western blotting 和病毒滴度测定试验, 评价 *LTA4H* 对 FMDV 感染的 PK-15 细胞的作用, 为进一步阐明 *LTA4H* 促进 FMDV 复制及调控 FMDV 复制机制提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 载体、细胞及病毒

CRISPR/Cas9 载体质粒 pX459-puro-MCS、PK-15 细胞、BHK-21 细胞、FMDV (O/BY/CHA/2010) 来源于中国农业科学院兰州兽医研究所口蹄疫与新发病流行病学团队与国家口蹄疫参考实验室。

1.2 试剂及抗体

DMEM 细胞培养基及 0.25% EDTA 胰酶购自 Gibco 公司; 大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞、T4 DNA 连接酶购自宝生物工程(大连)有限公司; 胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)购自 Biological Industries (BI)公司; 蛋白预染 Marker、TRIzol 试剂等均购自 Invitrogen 公司; Western blotting

抗体稀释液购自上海碧云天生物技术有限公司；10×LA *Taq* 酶购自康为世纪生物科技股份有限公司；Prime Script™ TMRT Reagent Kit with gDNA Eraser 反转录试剂盒、RT-qPCR 试剂盒 TB Green™ Premix Ex *Taq*™ II 购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司；胶回收试剂盒、质粒提取试剂盒购自 OMEGA 公司；jet PRIME Transfection Reagent 购自 Polyplus Transfection 公司；蛋白检测显色试剂盒(Pierce™ ECL Western Blotting Substrate)购自 ThermoFisher Scientific 公司；限制性核酸内切酶 *Bbs* I 购自 NEB 公司；*LTA4H* 抗体购自 Proteintech 公司；β-actin 抗体购自 Santa Cruz 公司；VP1 单抗由兰州兽医研究所流行病学团队保存；辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)标记的山羊抗兔 IgG 抗体、HRP 标记的山羊抗鼠 IgG 抗体购自 Sigma-Aldrich 公司。

1.3 sgRNA 引物的设计及合成

利用 NCBI 数据库查询 *LTA4H* 基因序列 (Transcript: ENSSSCT00000000975.4)，根据 CRISPR/Cas9 设计原则^[20-21]，并基于张峰实验室网站(<http://crispr.mit.edu/>)推荐，在 *LTA4H* 基因的外显子区域设计 2 条 sgRNA 序列，结果如表 1 所示。

1.4 重组质粒 pX459-sgRNA 的构建

将上述 sgRNA 上下游引物稀释至 100 μmol/L，配制共 10 μL 反应体系：上游引物(10 μmol/L) 4.5 μL，下游引物(10 μmol/L) 4.5 μL，10×LA

Taq 酶 1 μL，轻轻混匀。退火程序：95 °C 10 min；退火完成后室温静置，形成双链 DNA。利用 *Bbs* I 内切酶酶切 pX459-puro-MCS 载体，经 1% 琼脂糖凝胶电泳后，胶回收酶切片段。将胶回收获取的线性化酶切产物与 sgRNA 序列在 T4 连接酶作用下进行连接，然后转化到 DH5α 感受态细胞，涂布于氨苄青霉素抗性的 LB 平板上，37 °C 倒置培养过夜，选择单克隆培养物，用菌液 PCR 对阳性克隆进行鉴定筛选，提取质粒送西安擎科生物科技有限公司测序。

1.5 细胞的转染与筛选

复苏 PK-15 细胞于 T25 细胞培养瓶中，放置 37 °C、5% CO₂ 温箱中培养，传代细胞 1–2 次，待细胞状态稳定后，按每孔 2×10⁵ 个细胞的密度接种至 6 孔板中，细胞生长密度至 70%–80% 后，根据 Poly plus 的标准转染程序，将 2 μg 的 CRISPR 重组质粒转染进 PK-15 细胞，生长 1 d 后消化细胞，按照 1:3 比例传代到 6 孔板中，同时每孔细胞中加入终浓度 3 μg/mL 的嘌呤霉素加压筛选 3 d，剔除大量 sgRNA 阴性细胞，更换正常培养基使阳性细胞正常生长 1 d 后，使用有限稀释法进行亚克隆，将细胞稀释至 10 个/mL 细胞，接种于 96 孔板中，每孔 100 μL，即每孔中有 1 个细胞，筛选 7 d。标记状态良好的单克隆细胞孔，加胰酶消化后混匀，传代至 48 孔板继续培养，待细胞长满，选取细胞状态良好的孔传代至 24 孔板并进行测序鉴定。

1.6 基因测序鉴定

取待鉴定单克隆细胞株，使用细胞微量 DNA 提取试剂盒提取 DNA，用 *LTA4H* 鉴定引物扩增含有 sgRNA 靶向位点的片段后，使用 1% 琼脂糖凝胶对质粒大小进行鉴定，胶回收后扩增产物，进行测序。对扩增产物的测序结果进行序列分析比对。将测序结果中显示为套峰或基因突变的样品进行进一步分析，将扩增片

表 1 *LTA4H*-sgRNA 序列

Table 1 *LTA4H*-sgRNA sequences

Primer names	Primer sequences (5'→3')
<i>LTA4H</i> -sgRNA1-F	GCAGCGTCGACTTTACTCGC
<i>LTA4H</i> -sgRNA1-R	GCGAGTAAAGTCGACGCTGC
<i>LTA4H</i> -sgRNA2-F	TTACTCGCCGGGTACTGACC
<i>LTA4H</i> -sgRNA2-R	GGTCAGTACCCGCGCAGTAA

段连接到 T 载体上进行连接转化, 随机选取 8 株单克隆细菌进行重测序和鉴定。

1.7 细胞活力检测

将野生型(wild type, WT) PK-15 细胞和 LTA4H 基因敲除 PK-15 细胞系消化后计数, 调整细胞密度为 1×10^5 – 2×10^5 个/mL, 每孔 100 μ L 接种至 96 孔板, 在细胞培养箱培养 12 h 后; 加入 CCK-8 溶液, 10 μ L/孔, 注意不要向孔中引入气泡。置于细胞培养箱继续培养 2–4 h, 测定细胞个数, 分析活力。

1.8 细胞生长速率测定

将 WT 型 PK-15、LTA4H-KO-1 和 LTA4H-KO-2 细胞调整密度为 1×10^5 – 2×10^5 个/mL, 每孔 100 μ L 接种至 96 孔中, 分别于 0、2、4、6、8、10、12 h 测定细胞个数, 制作细胞的生长曲线。

1.9 RT-qPCR 检测

将 WT 型 PK-15、LTA4H-KO-1 和 LTA4H-KO-2 细胞分别铺于 6 孔板中, 待细胞长满后感染 FMDV, 于 0、6、12、24 h 分别收取细胞, 用 Trizol 裂解法提取细胞总 RNA, 测定浓度后, 利用 Prime Script™ TMRT Reagent Kit with gDNA Eraser 反转录试剂盒进行反转录获得 cDNA。配制总反应体系: TB Green™ Premix Ex Taq™ II 10 μ L, FMDV 相对定量上游引物 FMDV-F (5'-CACTGGTGACAGGCTAAGG-3') 和下游引物 FMDV-R (5'-CCCTTCTCAGATTCCG AGT-3') 各 0.4 μ L, ddH₂O 8.2 μ L, cDNA 1 μ L, 共 20 μ L。RT-qPCR 反应程序: 95 $^{\circ}$ C 2 min; 95 $^{\circ}$ C 15 s, 60 $^{\circ}$ C 30 s (收集荧光), 共 40 个循环。GAPDH 作为内参基因, 对 FMDV mRNA 的相对表达水平进行定量, 所有试验设置 3 个重复, 用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法分析数据。

1.10 Western blotting 分析病毒蛋白的表达

为了研究敲除 LTA4H 基因之后对 FMDV 蛋白水平的影响, 将 LTA4H 基因敲除 PK-15 细

胞系(LTA4H-KO-1 和 LTA4H-KO-2)和野生型 PK-15 细胞(WT)分别铺 6 孔板, 待细胞长满后感染 FMDV, 分别于 0、6、12、24 h 收取细胞样品。加入上样缓冲液混匀, 金属浴 100 $^{\circ}$ C 煮沸 15 min, 室温静置冷却。利用定量结果确定上样体积, 上样量一般为 20–40 μ L。蛋白样品经 SDS-PAGE 电泳后, 冰水浴中 100 V 恒压转 NC 膜 1.5 h。5%脱脂奶粉封闭 1–2 h。 β -actin 抗体(Santa Cruz) 1:1 000 倍比稀释; LTA4H 的抗体(Cat No.11315-1-AP) 1:1 000 倍比稀释; VP1 单克隆抗体(由本实验室制备保存) 1:1 000 倍比稀释。一抗 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。辣根过氧化物酶(HRP) 标记的相应二抗 1:5 000 倍比稀释, 二抗室温孵育 1 h。蛋白检测用 Thermo Fisher Scientific 公司的显色试剂盒 1:1 配制, 图片经 Image Lab 4.1 软件 (Bio-Rad) 扫描成像。

1.11 病毒滴度

在 LTA4H 基因敲除 PK-15 细胞系 LTA4H-KO-1、LTA4H-KO-2 和野生型 PK-15 细胞(WT)中分别比较了病毒滴度的差异, 将 FMDV 分别感染 LTA4H-KO-1、LTA4H-KO-2 和 WT 细胞, 不同时间点收取样品。反复冻融 3 次后, 用无血清的 DMEM 将获得细胞样品进行 10^{-3} – 10^{-7} 倍梯度稀释, 将各梯度稀释毒液分别接种于单层 BHK-21 细胞的 96 孔细胞培养板中, 每个稀释度做 8 个重复孔, 每个孔 100 μ L。置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 恒温培养箱中培养, 每隔 12 h 观察并记录细胞病变效应(cytopathy effect, CPE)情况, 观察 3 d。根据 Reed-Muench 法计算扩增病毒的 TCID₅₀。

1.12 一步生长曲线

分别将 LTA4H 基因敲除 PK-15 细胞系 LTA4H-KO 和野生型 PK-15 细胞(WT)铺于 6 孔板中, 细胞生长密度至 70%–80%后, 感染 FMDV, 于 0、4、8、12 h 分别收取样品, 反复冻融 3 次后, 做病毒滴度试验, 每个稀释度做

8 个重复孔。置于 37 °C、5% CO₂ 恒温培养箱中培养并观察 3 d, 每隔 12 h 观察并记录细胞病变效应(CPE)情况, 根据 Reed-Muench 法计算扩增病毒的 TCID₅₀。

1.13 统计学分析

实验数据使用 Graph pad Prism 8. 01 软件, 通过统计学方法进行数据分析并作图。同一时间点重复 3 次试验, 使用 *t*-test 检验法进行显著性差异分析。*: *P*<0.05; **: *P*<0.01; ***: *P*<0.001。

2 结果与分析

2.1 pX459-*LTA4H*-sgRNA 的鉴定

根据 CRISPR/Cas9 设计原则, 利用 CRISPR 网站在 *LTA4H* 基因的第 1 个外显子区域的 327 bp 位置和 339 bp 位置分别设计了 2 条 sgRNA 序列(图 1)。单链的 sgRNA 退火过程中形成双链片段, 分别构建至载体 pX459-puro-MCS 中, 提取质粒送测序。基因测序结果显示具有靶向

LTA4H 基因同一外显子的 sgRNA 重组质粒构建成功, 重组质粒分别命名为 pX459-*LTA4H*-gRNA-1 和 pX459-*LTA4H*-gRNA-2。

2.2 敲除 *LTA4H* 基因的 PK-15 细胞系的构建与鉴定

将重组质粒 pX459-*LTA4H*-gRNA-1 和 pX459-*LTA4H*-gRNA-2 分别转染 PK-15 细胞, 转染 24 h 后加入嘌呤霉素筛选, 一周后单个细胞克隆形成后转移至 48 孔板, 于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中, 添加 DMEM 培养基中[10%胎牛血清和 1%抗生素(penicillin-streptomycin)]扩大培养。收集不同细胞克隆分别在 DNA 水平和蛋白水平进行鉴定; 扩增产物进行基因测序, 结果如图 2A 和 2B 所示, 在 *LTA4H* 基因第 1 个外显子的 327 bp 预定切割位置处[距离 PAM 基序(CGG)第 4 个和 5 个碱基之间]有 1 个碱基的插入, 在 *LTA4H* 基因第 1 个外显子的 339 bp 预定切割位置处[距离 PAM 基序(GGG)第 3 个和 4 个碱基之间]有 1 个碱基的缺失。

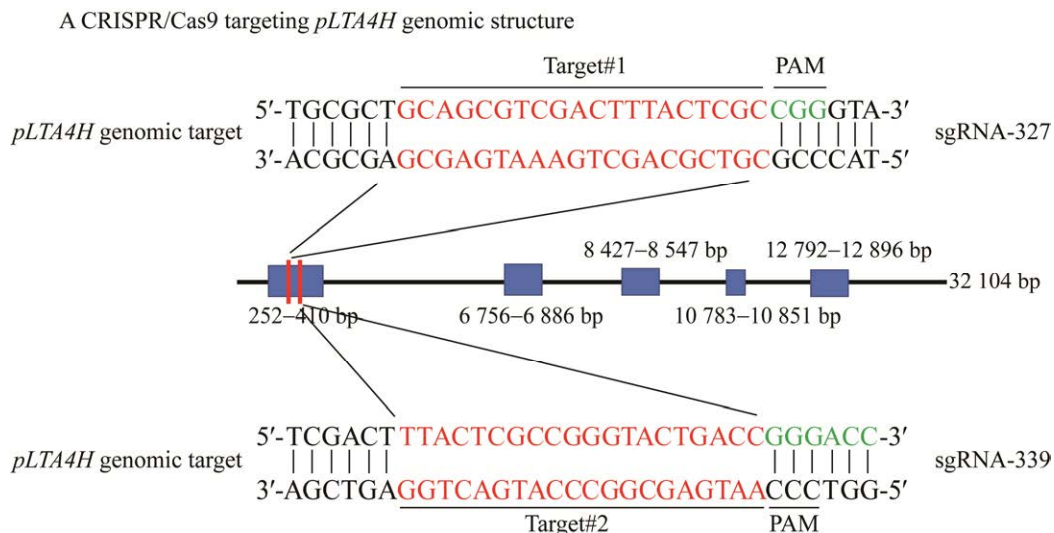


图 1 猪 *LTA4H* 敲除重组质粒的构建

Figure 1 Construction of the porcine *LTA4H* knockout recombinant plasmid. PAM sequences are underlined and highlighted in green; sgRNA targeting sites are underlined and highlighted in red; Red vertical bar arrows indicate gRNA targeting sites.

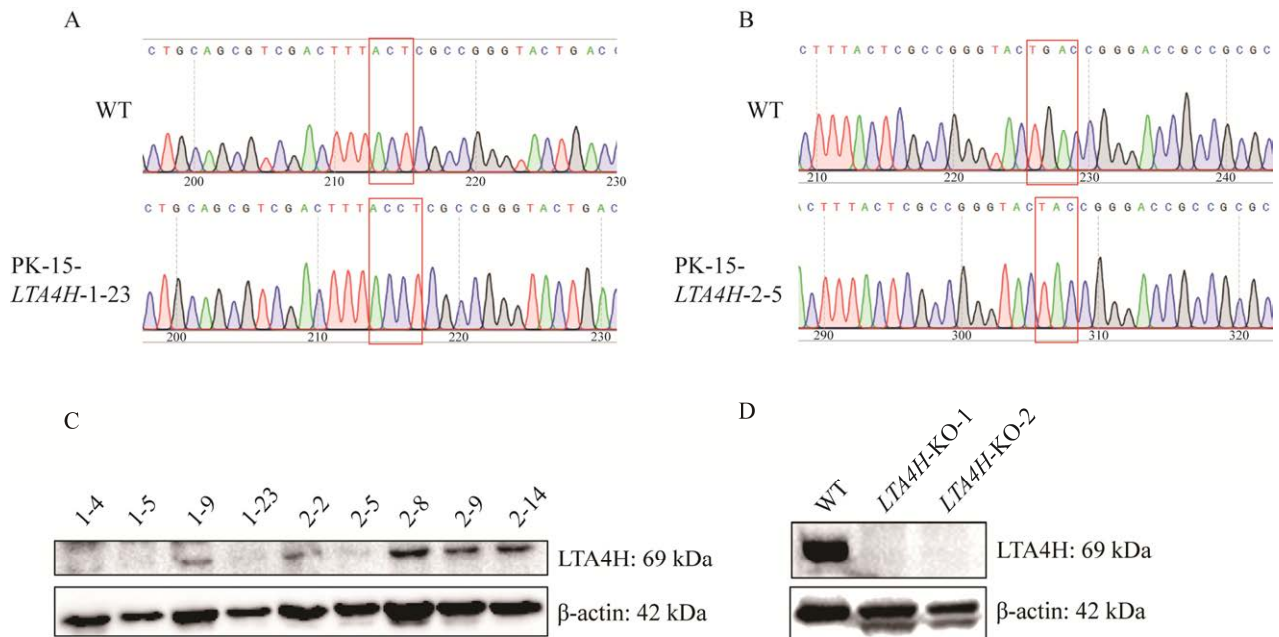


图 2 *LTA4H* 基因敲除细胞系的构建与鉴定 A: *LTA4H*-KO-1 细胞系基因缺失突变型分析图. B: *LTA4H*-KO-2 细胞系基因缺失突变型分析图. C: Western blotting 筛选 *LTA4H* 敲除图. D: Western blotting 检测敲除细胞系中 *LTA4H* 基因的蛋白水平

Figure 2 Construction and identification of *LTA4H* knockout cell lines. A: Analysis of gene deletion mutant types in *LTA4H*-KO-1 cell lines. B: Analysis of gene deletion mutant types in *LTA4H*-KO-2 cell lines. C: *LTA4H* knockdown map screened by Western blotting. D: Protein levels of the *LTA4H* gene in the knockdown cell lines were determined by Western blotting.

蛋白水平鉴定, 收集不同细胞克隆进行制样, 利用 Western blotting 检测 *LTA4H* 的蛋白水平表达, 初步筛选出 3 株疑似敲除细胞如图 2C 所示, 转染重组质粒 pX459-*LTA4H*-gRNA-1 筛选到的细胞分别命名为: PK-15-*LTA4H*-1-5、PK-15-*LTA4H*-1-23; 转染重组质粒 pX459-*LTA4H*-gRNA-2 筛选到的细胞命名为: PK-15-*LTA4H*-2-5。将上述细胞进行传代培养, 待细胞状态稳定, 再次进行蛋白水平检测, 结果如图 2D 所示, 最终选定 2 株细胞: PK-15-*LTA4H*-1-23、PK-15-*LTA4H*-2-5 为敲除细胞, 重新命名为: *LTA4H*-KO-1、*LTA4H*-KO-2, 且细胞系中均检测不到 *LTA4H* 的蛋白表达。Western blotting 检测时使用 *LTA4H* 的抗体, 上述结果表明, *LTA4H*

基因敲除 PK-15 细胞系构建成功。

2.3 细胞活力检测

将 WT 型 PK-15 细胞、*LTA4H*-KO-1 和 *LTA4H*-KO-2 细胞接种至 96 孔板, 培养 12 h 后, 加 CCK-8 溶液 10 μ L/孔, 放温箱继续培养 1-4 h, 用酶标仪测定每孔的 OD_{450} , 分析数据。结果显示, *LTA4H* 基因敲除 PK-15 细胞与野生型 PK-15 细胞的细胞活力相似(图 3A)。重新消化 *LTA4H*-KO 细胞和 WT 细胞, 铺 96 孔板, 培养一定时间后, 加 CCK-8 溶液, 分别于 0、2、4、6、8、10、12 h 用酶标仪测定每孔的 OD_{450} 。结果显示 *LTA4H*-KO 细胞和 WT 细胞的生长速率相同, 表明 *LTA4H* 基因的敲除并不影响宿主细胞的正常生长(图 3B)。

2.4 敲除 *LTA4H* 基因对 FMDV 复制的影响

将 *LTA4H* 基因敲除 PK-15 细胞系细胞 *LTA4H*-KO-1、*LTA4H*-KO-2 与野生型 PK-15 细胞(WT)感染 FMDV，于不同时间点收样，提取 RNA 反转录，做 RT-qPCR 试验。以 *GAPDH* 作为内参基因，对 FMDV 的相对表达水平进行定量。结果如图 4 所示，敲除 *LTA4H* 之后会显著抑制 FMDV 复制。

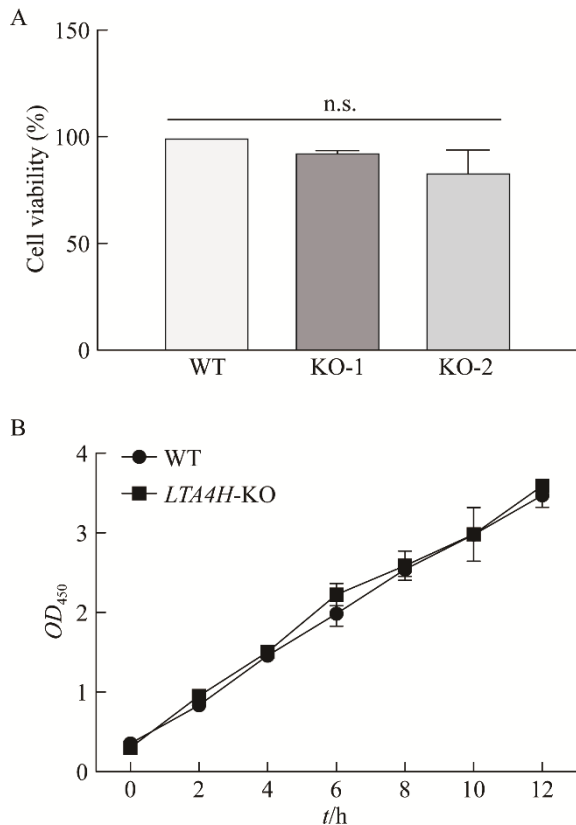


图 3 *LTA4H* 基因功能缺失细胞系 *LTA4H*-KOs 细胞活力检测 A: *LTA4H*-KOs 细胞系细胞活力检测. B: *LTA4H*-KOs 细胞系细胞生长速率图

Figure 3 Cell viability assay of *LTA4H*-deficient cell line *LTA4H*-KOs. A: Cell viability assay of *LTA4H*-KOs cell line. B: Plot of cell growth rate of the *LTA4H*-KOs cell line. The “n.s.” in the plot represent there was no significant difference with the WT ($P>0.05$).

2.5 敲除 *LTA4H* 基因对蛋白表达的影响

在 *LTA4H*-KO 细胞和 WT 细胞分别感染 FMDV 后，分别于 0、6、12、24 h 收取样品，进行 Western blotting 分析，并对结果进行灰度扫描，结果如图 5 所示，在细胞感染 FMDV 后收取的样品中，与 WT 细胞相比表达在 6、12 和 24 h 分别下降 87%、83%和 58%。在病毒感

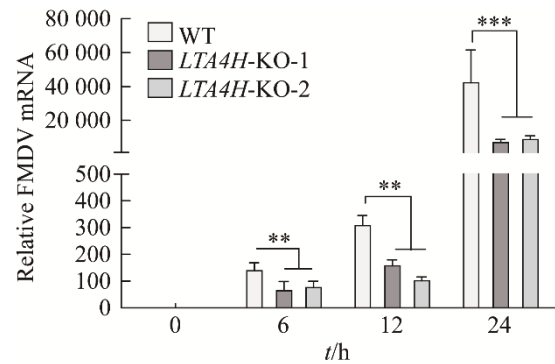


图 4 相对定量检测 FMDV 在 WT 和 *LTA4H*-KOs 细胞中的复制

Figure 4 Relative quantification of FMDV replication in WT and *LTA4H*-KOs cells. The “**” in the plot represent significant difference compared with the WT ($P<0.01$); The “***” in the plot represent a very significant difference from the WT ($P<0.001$).

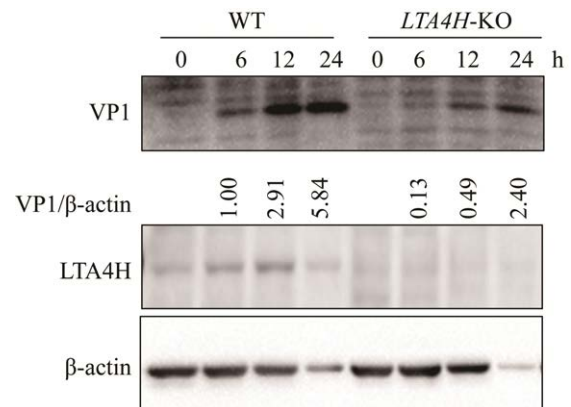


图 5 Western blotting 检测 FMDV 在 WT 和 *LTA4H*-KO 细胞中的蛋白水平

Figure 5 FMDV protein levels in WT and *LTA4H*-KO cells measured by Western blotting.

染 24 h 后, 细胞病变严重, 脱落, 收集到的细胞量较少, 导致内参蛋白表达量明显下降。

2.6 敲除 *LTA4H* 基因对病毒滴度的影响

将 FMDV 分别感染 *LTA4H*-KO 和 WT 细胞, 不同时间点收取病毒液, 反复冻融 3 次并离心后, 测定 TCID₅₀。结果如图 6 所示, 在感染 FMDV 接毒后收取的样品中, 与 WT 细胞相比, *LTA4H* 基因敲除引起病毒滴度降低。在 12 h 时, 病毒滴度降低约 14.7%; 24 h 时, 病毒滴度降低约 21.1%。说明 *LTA4H* 基因功能缺失单克隆细胞系能够显著抑制 FMDV 的复制。

2.7 FMDV 在敲除 *LTA4H* 细胞上的一步生长曲线

将 *LTA4H*-KO 细胞和野生型 PK-15 细胞 (WT) 感染 FMDV, 在 0、4、8、12 h 分别收取细胞上清, 测定病毒滴度。结果如图 7 所示, *LTA4H*-KO 细胞的病毒滴度显著低于野生型细胞。

3 讨论与结论

本研究采用基因编辑技术 (CRISPR/Cas9) 成功构建了 *LTA4H* 基因敲除的 PK-15 细胞系。

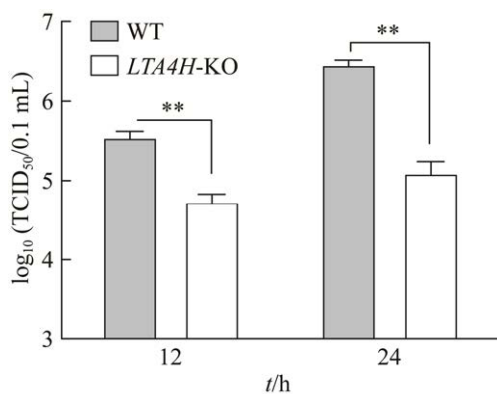


图 6 *LTA4H*-KO 细胞中口蹄疫病毒的病毒滴度检测

Figure 6 Viral titer determination of foot-and-mouth disease virus in *LTA4H*-KO cells. The “***” in the plot represent significant difference compared with the WT ($P < 0.01$).

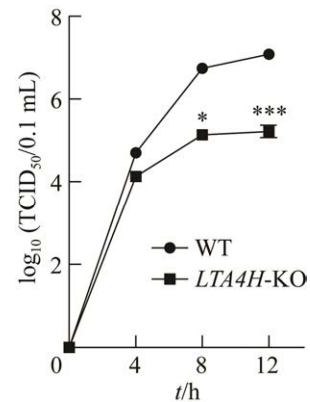


图 7 FMDV 在 *LTA4H*-KO 细胞上的一步生长曲线图

Figure 7 One-step growth profile of FMDV on *LTA4H*-KO cells. The “*” in the plot represent significant difference compared with the control ($P < 0.05$); the “***” in the plot represent a very significant difference from the WT ($P < 0.001$).

构建重组质粒 pX459-*LTA4H*-gRNA-1 和 pX459-*LTA4H*-gRNA-2, 转染 PK-15 细胞后, 使用嘌呤霉素加压筛选, 剔除了大量 pX459-*LTA4H*-gRNA-1 和 pX459-*LTA4H*-gRNA-2 阴性细胞, 用有限稀释法获得单克隆细胞系, 在候选细胞系中提高了靶基因的敲除效率。通过测序和蛋白表达水平鉴定, 成功获得了 *LTA4H* 基因敲除细胞系。对野生型细胞和敲除细胞进行细胞活力检测, 结果表明, 敲除细胞系细胞生长状态和生长速率与野生型细胞相比无显著差异, 以保证后续相关试验的有效性, 为进一步研究 *LTA4H* 基因敲除细胞系的病毒感染及蛋白水平检测奠定了一定的基础。本试验中利用 *LTA4H* 敲除细胞系, 在感染 FMDV 后, 与野生型 PK-15 细胞相比, mRNA 转录水平、蛋白表达水平及病毒滴度在不同时间点均显著降低, 表明 *LTA4H* 对 FMDV 的复制具有重要的调控作用。

CRISPR/Cas9 系统对基因的定向识别和剪切是由 sgRNA 和 Cas9 实现的, sgRNA 决定了 Cas9 的靶向性, 也决定了 Cas9 的切割活性^[22]。

CRISPR/Cas9 技术具有操作方便、成本低、靶向效率高等优点, 广泛应用于基因功能研究、疾病治疗和制药行业^[23]。同时, 利用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术可以实现基因敲入、敲除、沉默等多种形式的靶基因的高效编辑^[24-26], 克服了以往基因编辑技术遇到的障碍与瓶颈。目前, 詹群美^[27]已通过 CRISPR-Cas9 技术制备了肌肉生成抑制素(myostatin, MSTN)基因编辑巴马香猪, 显著提高了巴马香猪的生长速率和瘦肉百分率。在疫病防治方面, 使用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术可以有效预防和治疗 HYAL2 基因功能丧失后的羊肺腺癌综合征^[28]。有团队通过 CRISPR-Cas9 制备出了同时抗猪繁殖与呼吸综合征、猪传染性胃肠炎病毒、猪德尔塔冠状病毒等 3 种重大疫病的基因猪。Sato 等^[29]利用 CRISPR/Cas9 系统成功敲除了猪的 *GGTA1* 基因, 消除了猪和人的异种器官移植免疫排斥问题。冉乾东等^[30]也通过 CRISPR-Cas9 技术成功构建了 *KLHL34* 基因敲除的 PK-15 细胞系, 显著促进 FMDV 的复制, 以提高病毒滴度和抗原产量。可见, 随着基因编辑技术的发展和新的疾病有效靶点的不断认识, 人们通过编辑有效的致病基因或突变来治疗疾病在临床上已成为可能。本研究基于 CRISPR/Cas9 技术成功构建获得 *LTA4H* 基因敲除 PK-15 细胞, 为今后深入研究 *LTA4H* 基因在猪源疾病感染中的作用机理提供了技术支撑。

RNA 结合代谢酶 LTA4H 是癌症化学预防和化疗的新靶^[2]。*LTA4H* 基因在有丝分裂细胞周期、DNA 修复、RNA 剪接相关通路和 RNA 代谢通路中显著富集, 这说明 *LTA4H* 具有肿瘤相关的可变剪接调控功能^[9]。最近的研究表明, *LTA4H* 在喉鳞状细胞癌(squamous cell carcinoma of the larynx, LSCC)中的表达增加促进了肿瘤的增殖、迁移和转移^[31]。Wan 等开发了一种酶

激活的荧光探针, 通过将 *LTA4H* 的特定识别单元与红色荧光团结合, 用于癌症诊断中 *LTA4H* 的活性检测^[32]。*LTA4H* 是一种双功能锌金属酶, 它通过环氧化物水解酶活性处理 *LTA4*, 也能够通过其氨基肽酶活性一次从 N 端肽底物中剪裁一个氨基酸, 来确定 *LTA4H* 的氨基肽酶特异性, 发现 *LTA4H* 识别的最佳蛋白质生成氨基酸是精氨酸, 可以用于设计这种酶的有效抑制剂^[33]。然而, LYS006 作为 *LTA4H* 的一种抑制剂, 不仅可以减少促炎 LTB₄, 还可以诱导脂质介质类型从促炎到促溶解的转换, 从而有助于慢性炎症的解决^[34]。目前关于 *LTA4H* 基因与病毒关系的研究并不多, 且相关基因调控的具体分子生物学机制还不清楚, 需要进一步研究。本研究成功构建了 *LTA4H* 基因敲除细胞系, 表明敲除细胞相比未敲除 *LTA4H* 的细胞, 可以抑制病毒复制及病毒毒力增强。因此, RNA 结合代谢酶 *LTA4H* 可以促进 FMDV 复制。根据试验结果猜测宿主蛋白 *LTA4H* 与病毒蛋白 3B 相互作用, 并且通过稳定 3B 蛋白来促进 FMDV 复制。因此, 利用 *LTA4H* 蛋白抑制剂研发小分子药物, 为未来预防或抑制 FMDV 感染提供一种可行策略。

综上所述, 本研究利用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术实现了 *LTA4H* 基因的高效编辑, 为其他基因敲除细胞系的建立提供了参考。*LTA4H* 基因敲除细胞系的建立能为 *LTA4H* 调控 FMDV 复制的研究奠定基础, 也能够为进一步开展 *LTA4H* 调控其他病毒复制的机制研究提供思路, 也能够为预防或治疗 FMDV 提供一个新的药物靶标。

参考文献

- [1] QIN R, WANG H, YAN A. Classification and QSAR models of leukotriene A4 hydrolase (LTA4H) inhibitors by machine learning methods[J]. SAR and QSAR in Environmental Research, 2021, 32(5): 411-431.

- [2] VO TTL, JANG WJ, JEONG CH. Leukotriene A4 hydrolase: an emerging target of natural products for cancer chemoprevention and chemotherapy[J]. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2018, 1431(1): 3-13.
- [3] HE R, CHEN Y, CAI Q. The role of the LTB4-BLT1 axis in health and disease[J]. *Pharmacological Research*, 2020, 158: 104857.
- [4] HAEGGSTRÖM JZ. Leukotriene biosynthetic enzymes as therapeutic targets[J]. *Journal of Clinical Investigation*, 2018, 128(7): 2680-2690.
- [5] OH DY, OLEFSKY JM. G protein-coupled receptors as targets for anti-diabetic therapeutics[J]. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2016, 15(3): 161-172.
- [6] 闫鸿斌. 四种绦虫蛋白酶及其抑制剂的系统挖掘与功能分析[D]. 北京: 中国农业科学院博士学位论文, 2013.
- YAN HB. Systematic mining and functional analysis of four tapeworm proteases and their inhibitors[D]. Beijing: Doctoral Dissertation of Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2013 (in Chinese).
- [7] 汪文斐, 朱宇珍, 崔淑俊, 段艳辉, 张福萍, 张洁云, 陈心春, 黄功华, 张明霞. LTA4H 基因单核苷酸多态性与肺结核易感性的相关性研究[J]. *新发传染病电子杂志*, 2017, 2(4): 202-204.
- WANG WF, ZHU YZ, CUI SJ, DUAN YH, ZHANG FP, ZHANG JY, CHEN XC, HUANG GH, ZHANG MX. Association between *LTA4H* gene polymorphism and susceptibility to tuberculosis[J]. *Electronic Journal of Emerging Infectious Diseases*, 2017, 2(4): 202-204 (in Chinese).
- [8] 袁荣荣, 张宏, 陈静, 周畅, 姚倩倩, 张晨. *LTA4H* 基因多态性及吸烟对动脉粥样硬化型脑梗死发生影响[J]. *青岛大学医学院学报*, 2014, 50(6): 512-515.
- YUAN RR, ZHANG H, CHEN J, ZHOU C, YAO QQ, ZHANG C. Influence of *LTA4H* gene polymorphism and smoking on atherosclerotic cerebral infarction[J]. *Journal of Qingdao University (Medical Sciences)*, 2014, 50(6): 512-515 (in Chinese).
- [9] REN TJ, WANG S, ZHANG B, ZHOU W, WANG CS, ZHAO XR, FENG J. LTA4H extensively associates with mRNAs and lncRNAs indicative of its novel regulatory targets[J]. *PeerJ*, 2023, 11: e14875.
- [10] OI N, YAMAMOTO H, LANGFALD A, BAI RH, LEE MH, BODE AM, DONG ZG. LTA4H regulates cell cycle and skin carcinogenesis[J]. *Carcinogenesis*, 2017, 38(7): 728-737.
- [11] 张瑛, 郝飞. 白三烯 B4 及其受体与肿瘤的关系[J]. *实用皮肤病学杂志*, 2009, 2(1): 28-30.
- ZHANG Y, HAO F. Relationship between leukotriene B4 and its receptor and tumor[J]. *Journal of Practical Dermatology*, 2009, 2(1): 28-30 (in Chinese).
- [12] 杨景卉. 白三烯 A4 水解酶基因多态性与中国人结核易感性的相关性研究[D]. 上海: 复旦大学硕士学位论文, 2012.
- YANG JH. Association between leukotriene A4 hydrolase gene polymorphism and susceptibility to tuberculosis in Chinese[D]. Shanghai: Master's Thesis of Fudan University, 2012 (in Chinese).
- [13] EL-NAGGAR MH, MIRA A, ABDEL BAR FM, SHIMIZU K, AMER MM, BADRIA FA. Synthesis, docking, cytotoxicity, and LTA4H inhibitory activity of new gingerol derivatives as potential colorectal cancer therapy[J]. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2017, 25(3): 1277-1285.
- [14] KUMAR SS, SOLOMON R, GAUTAM P, INBARAJ LR, SIVADASAN A, MICHAEL JS, KARTHIK R, VARGHESE GM, CHRISTUDASS CS, SAMUEL P, MANESH A. Leukotriene A4 hydrolase (LTA4H rs17525495) gene polymorphisms and paradoxical reactions in extrapulmonary tuberculosis[J]. *Scientific Reports*, 2023, 13: 3746.
- [15] GIERSE JK, LUCKOW VA, ASKONAS LJ, DUFFIN KL, AYKENT S, BILD GS, RODI CP, SULLIVAN PM, BOURNER MJ, KIMACK NM, KRIVI GG. High-level expression and purification of human leukotriene A4 hydrolase from insect cells infected with a baculovirus vector[J]. *Protein Expression and Purification*, 1993, 4(5): 358-366.
- [16] FANG MQ, TANG XP, ZHANG J, LIAO ZY, WANG G, CHENG RM, ZHANG ZY, ZHAO HW, WANG J, TAN ZX, KAMAU PM, LU QM, LIU Q, DENG GH, LAI R. An inhibitor of leukotriene-A4 hydrolase from bat salivary glands facilitates virus infection[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2022, 119(10): e2110647119.
- [17] 梁剑平, 陈积红, 尚若峰, 崔颖, 王学红, 华兰英, 罗永江. 光与氧对金丝桃蛋白复合物抗口蹄疫病毒的活性的影响[J]. *中国动物保健*, 2005, 7(11): 29-30.
- LIANG JP, CHEN JH, SHANG RF, CUI Y, WANG XH, HUA LY, LUO YJ. Influence of light and oxygen on the activity of hypericum protein complex against FMD virus[J]. *China Animal Health*, 2005, 7(11): 29-30 (in Chinese).
- [18] LI KL, WANG CC, YANG F, CAO WJ, ZHU ZX,

- ZHENG HX. Virus-host interactions in foot-and-mouth disease virus infection[J]. *Frontiers in Immunology*, 2021, 12: 571509.
- [19] LI SF, GONG MJ, SUN YF, SHAO JJ, ZHANG YG, CHANG HY. Antiviral activity of brequinar against foot-and-mouth disease virus infection *in vitro* and *in vivo*[J]. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2019, 116: 108982.
- [20] JENSEN MK. Design principles for nuclease-deficient CRISPR-based transcriptional regulators[J]. *FEMS Yeast Research*, 2018, 18(4): foy039.
- [21] ZHANG W, WANG Q, YANG F, ZHU ZX, DUAN YY, YANG Y, CAO WJ, ZHANG KS, MA JW, LIU XT, ZHENG HX. JMJD6 negatively regulates cytosolic RNA induced antiviral signaling by recruiting RNF₅ to promote activated IRF₃ K48 ubiquitination[J]. *PLoS Pathogens*, 2021, 17(3): e1009366.
- [22] 刘宽. CRISPR/Cas9 介导的转录激活系统的建立及其体外实验研究[D]. 西安: 陕西师范大学硕士学位论文, 2016.
- LIU K. Establishment of transcription activation system mediated by CRISPR/Cas9 and its experimental study *in vitro*[D]. Xi'an: Master's Thesis of Shaanxi Normal University, 2016 (in Chinese).
- [23] 詹长生, 夏小雨. 基于 CRISPR-Cas9 技术的基因治疗研究进展[J]. *生物工程学报*, 2016, 32(7): 861-869.
- ZHAN CS, XIA XY. Research progress of CRISPR-Cas9 system for gene therapy[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2016, 32(7): 861-869 (in Chinese).
- [24] LIU SC, FENG YL, SUN XN, CHEN RD, LIU Q, XIAO JJ, ZHANG JN, HUANG ZC, XIANG JF, CHEN GQ, YANG Y, LOU C, LI HD, CAI Z, XU SM, LIN H, XIE AY. Target residence of Cas9-sgRNA influences DNA double-strand break repair pathway choices in CRISPR/Cas9 genome editing[J]. *Genome Biology*, 2022, 23(1): 165.
- [25] XU H, XIAO TF, CHEN CH, LI W, MEYER CA, WU Q, WU D, CONG L, ZHANG F, LIU JS, BROWN M, LIU XS. Sequence determinants of improved CRISPR sgRNA design[J]. *Genome Research*, 2015, 25(8): 1147-1157.
- [26] JINEK M, CHYLINSKI K, FONFARA I, HAUER M, DOUDNA JA, CHARPENTIER E. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity[J]. *Science*, 2012, 337(6096): 816-821.
- [27] 詹群美. 利用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术生产 *MSTN* 基因敲除巴马香猪[D]. 佛山: 佛山科学技术学院硕士学位论文, 2020.
- ZHAN QM. Production of *MSTN* gene knockout Bama minipigs by CRISPR/Cas9 gene editing technology[D]. Foshan: Master's Thesis of Foshan Institute of Science and Technology, 2020 (in Chinese).
- [28] WHITE LAW B. Abstracts from the UC Davis transgenic animal research conference IX[J]. *Transgenic Research*, 2014, 23(1): 187-210.
- [29] SATO M, MIYOSHI K, NAGAO Y, NISHI Y, OHTSUKA M, NAKAMURA S, SAKURAI T, WATANABE S. The combinational use of CRISPR/Cas9-based gene editing and targeted toxin technology enables efficient biallelic knockout of the α -1,3-galactosyltransferase gene in porcine embryonic fibroblasts[J]. *Xenotransplantation*, 2014, 21(3): 291-300.
- [30] 冉乾东, 杨帆, 张伟, 曹伟军, 郑海学, 蔺国珍. CRISPR/Cas9 介导的 *KLHL34* 基因敲除细胞系的建立及其应用[J]. *中国兽医科学*, 2023, 53(7): 851-857.
- RAN QD, YANG F, ZHANG W, CAO WJ, ZHENG HX, LIN GZ. Establishment and application of *KLHL34* gene knockout cell line mediated by CRISPR/Cas9[J]. *Chinese Veterinary Science*, 2023, 53(7): 851-857 (in Chinese).
- [31] WU YG, LI XY, PANG TZ, LI WM, PAN XL. MiR-370 targeted FoxM1 functions as a tumor suppressor in laryngeal squamous cell carcinoma (LSCC)[J]. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2014, 68(2): 149-154.
- [32] WAN XX, WANG H, SHI B, GUO Y, LIU SY, WANG X. An enzyme activated fluorescent probe for LTA4H activity sensing and its application in cancer screening[J]. *Talanta*, 2023, 253: 123887.
- [33] BYZIA A, HAEGGSTRÖM JZ, SALVESEN GS, DRAG M. A remarkable activity of human leukotriene A₄ hydrolase (LTA4H) toward unnatural amino acids[J]. *Amino Acids*, 2014, 46(5): 1313-1320.
- [34] MARKERT C, THOMA G, SRINIVAS H, BOLLBUCK B, LÜÖND RM, MILTZ W, WÄLCHLI R, WOLF R, HINRICHS J, BERGSDORF C, AZZAOU K, PENNO CA, KLEIN K, WACK N, JÄGER P, HASLER F, BEERLI C, LOETSCHER P, DAWSON J, WIECZOREK G, et al. Discovery of LYS006, a potent and highly selective inhibitor of leukotriene A₄ hydrolase[J]. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2021, 64(4): 1889-1903.