

RIG-I 敲除 293T 细胞系的建立及其对 B 型流感病毒复制的影响

田璐^{1,2}, 焦鹏涛^{1,3}, 侯力丹⁴, 李芸¹, 宋正宇⁵, 刘文军^{1,2}, 范文辉^{1,2}, 孙蕾^{1,2}

1 中国科学院微生物研究所 病原微生物与免疫学重点实验室, 北京 100101

2 中国科学院大学, 北京 100049

3 广西大学 动物科学技术学院, 广西 南宁 530004

4 中国兽医药品监察所, 北京 100081

5 北京师范大学附属中学, 北京 100052

田璐, 焦鹏涛, 侯力丹, 等. RIG-I 敲除 293T 细胞系的建立及其对 B 型流感病毒复制的影响. 生物工程学报, 2020, 36(1): 109-121.

Tian L, Jiao PT, Hou LD, et al. Establishment of RIG-I knockout 293T cell line and its effect on the replication of influenza B virus. Chin J Biotech, 2020, 36(1): 109-121.

摘要: CRISPR/Cas9 基因编辑技术是通过人工设计的单向导 RNA(Single-guide RNA, sgRNA)指导 Cas9 蛋白对目的基因靶位点进行特异性的识别、结合和切割后, 通过细胞的非同源末端连接或同源末端重组修复机制来完成对基因组的敲除与敲入的编辑技术。RIG-I 是机体的一种模式识别受体, 能够识别胞质中的含 5'-三磷酸基团的 RNA, 并通过与下游信号分子 MAVS 相互作用, 激活 IRF3/7 和 NF- κ B, 从而启动 I 型干扰素和炎症因子的表达。已有研究表明, B 型流感病毒(IBV)在感染早期能够上调 RIG-I 的表达水平。为了探索 RIG-I 是否为 B 型流感病毒激活抗病毒天然免疫信号通路的主要受体及其对 IBV 复制的影响, 本研究利用 CRISPR-Cas9 技术对 293T 细胞中的 RIG-I 基因进行了敲除, 经嘌呤霉素压力筛选到了一株稳定敲除 RIG-I 基因的 293T (*RIG-I*^{-/-} 293T)细胞系。Western blotting 检测发现, IBV 或仙台病毒感染后该细胞系中 RIG-I 不再表达, 说明该敲除细胞系构建成功。IBV 感染 *RIG-I*^{-/-} 293T 细胞后, 干扰素、炎症因子及干扰素刺激基因的转录水平与野生型 293T 细胞相比明显下降, 并且在 *RIG-I*^{-/-} 293T 细胞中检测不到 p65 和 IRF3 磷酸化, 表明 IBV 感染早期细胞因子的表达主要依赖于 RIG-I 信号通路的激活。IBV 在野生型及 *RIG-I*^{-/-} 293T 细胞中的多步生长曲线表明, RIG-I 可抑制 IBV 的复制。以上结果表明, RIG-I 敲除的 293T 细胞系构建成功, RIG-I 是 IBV 激活下游抗病毒天然免疫信号通路的主要受体之一, 且对 IBV 的复制具有负调控作用, 该研究为探索 IBV 的感染机制奠定了基础。

关键词: CRISPR/Cas9, RIG-I, 基因敲除, B 型流感病毒

Received: May 7, 2019; **Accepted:** September 3, 2019

Supported by: National Natural Science Foundation of China (No. 31672531), National Science and Technology Major Project (No. 2018ZX10101004).

Corresponding authors: Lei Sun. Tel: +86-10-64807503; E-mail: sunlei362@im.ac.cn

Wenhui Fan. Tel: +86-10-64807503; E-mail: fanwenhui78@aliyun.com

国家自然科学基金 (No. 31672531), 国家科技重大专项 (No. 2018ZX10101004) 资助。

网络出版时间: 2019-09-18

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20190918.1016.001.html>

Establishment of RIG-I knockout 293T cell line and its effect on the replication of influenza B virus

Lu Tian^{1,2}, Pengtao Jiao^{1,3}, Lidan Hou⁴, Yun Li¹, Zhengyu Song⁵, Wenjun Liu^{1,2}, Wenhui Fan^{1,2}, and Lei Sun^{1,2}

1 Key Laboratory of Pathogenic Microbiology and Immunology, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

2 University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

3 College of Animal Science and Technology, Guangxi University, Nanning 530004, Guangxi, China

4 China Institute of Veterinary Drug Control, Beijing 100081, China

5 The High School Affiliated to Beijing Normal University, Beijing 100052, China

Abstract: The CRISPR/Cas9 gene editing technology directs Cas9 protein to recognize, bind and cleave the target site specifically by using artificial single-guide RNA (sgRNA), through non-homologous end joining or homologous end-recombinant repair mechanisms of cells, which can be engineered to knockout or knock-in of genomes. RIG-I is a pattern recognition receptor that recognizes the 5'-triphosphate-containing RNA in the cytoplasm and activates IRF3/7 and NF- κ B by interacting with the downstream signaling molecule MAVS, thus initiating the expression of type I interferons and inflammatory factors. Previous studies found that influenza B virus (IBV) can up-regulate the expression of RIG-I. In the present study, to explore whether RIG-I is the major receptor for IBV to active the antiviral innate immune response and its effect on IBV replication, RIG-I gene in 293T cells was knocked out by CRISPR-Cas9 system, and a stable RIG-I knockout 293T (*RIG-I*^{-/-} 293T) cell line was screened by puromycin pressure. The results of Western blotting showed that RIG-I was not expressed in this cell line after IBV or Sendai virus (SeV) infection, indicating that the *RIG-I*^{-/-} 293T cell line was successfully constructed. The transcription levels of interferons, inflammatory factors and interferon-stimulated genes in *RIG-I*^{-/-} 293T cells which were infected by IBV decreased significantly compared with those in wild-type 293T cells. Moreover, the phosphorylation of p65 and IRF3 were not detected in IBV or SeV infected *RIG-I*^{-/-} 293T cells. It is indicated that the expression of cytokines mainly depends on the RIG-I-mediated signaling pathway at the early stage of IBV infection. Furthermore, the multi-step growth curves of IBV in the wild type and *RIG-I*^{-/-} 293T cells showed that RIG-I inhibited the replication of IBV. Collectively, the RIG-I knockout 293T cell line was successfully constructed. We found that RIG-I is the main receptor for IBV to active the antiviral innate immune response and is critical for inhibiting IBV replication, which lays the foundation for further study of IBV infection mechanism.

Keywords: CRISPR/Cas9, RIG-I, gene knockout, influenza B virus

CRISPR (Clustered regularly interspaced short palindromic repeats)/Cas 系统是广泛存在于细菌与古菌中的具有抗感染作用的串联重复 DNA 序列, 对防御外来噬菌体或质粒的入侵发挥着重要作用^[1]。CRISPR 最早在 1987 年由日本科学家于大肠杆菌的碱性磷酸酶基因侧翼中首次发现^[2], 直到 2002 年科学家们才将其正式命名为 CRISPR^[3]。已鉴定的 CRISPR-Cas 系统有 3 种, 其中以 II 型最简单且研究得最为透彻深入^[4-5]。CRISPR 中的重复序列一般为 21–48 bp, 间隔序列一般为 21–72 bp (一般来源于外界入侵的 DNA), CRISPR 基因座在转录后进行加工生成成熟的

crRNA。而编码具有核酸酶和解旋酶活性的 Cas 蛋白的基因则位于临近 CRISPR 的区域, Cas 蛋白在 crRNA 的介导下识别靶向的 DNA 序列, 对其进行切割, 发挥免疫防御的功能^[6-7]。基于 CRISPR/Cas 系统的作用原理, 研究人员开发了通过人工合成 sgRNA 序列介导 Cas 蛋白对目的基因进行识别并剪辑的精准基因编辑技术。由于该技术具有高效性、廉价性且易于操作, 目前已经被用于多种生物及细胞的基因编辑^[8,12]。

模式识别受体中的 RIG-I 样受体是定位于细胞质中的一类 RNA 解旋酶, 它们可以识别入侵的含 5'-三磷酸基团病毒 RNA, 触发下游信号分子

的活化,进而导致干扰素及炎性因子的产生,以抵抗病毒的入侵。RIG-I 的结构包括 N 端的 2 个 CARD 结构域 (Caspase recruiting domain, CARD)、中间的 1 个 DExD/H 解旋酶结构域和 C 端的 1 个抑制区域 (Repressor domain, RD)。RIG-I 的 3 个结构域对维持 RIG-I 的功能都具有重要作用, CARD 结构域负责下游信号的转导, DExD/H 结构域具有 ATPase 活性和 RNA 解旋酶功能,而 RD 结构域则负责与病毒 RNA 的 5'-三磷酸基团结合^[13-14]。在没有 5'-三磷酸基团存在的情况下, RIG-I 以“静息”的状态存在,其 CARD 结构域和 RD 结构域“绑定”在一起。而当病毒 RNA 的 5'-三磷酸基团与 RIG-I 的 C 端的 RD 结构域结合后, RIG-I 构象则发生改变, CARD 与 RD 分开, RIG-I 变为开放状态,开放的 RIG-I 与其接头蛋白 MAVS 结合,诱导下游的 IFN 等因子表达^[15-16]。RIG-I 可识别多种病毒的 RNA,其中仙台病毒 (Sendai virus, SeV) 是经典的通过激活 RIG-I 信号通路介导大量干扰素产生的模式病毒^[17, 24]。

研究表明 RIG-I 识别 A 型流感病毒的 ssRNA 后,引发 RIG-I 与 MAVS 结合,引起干扰素调节因子 IFN3/7 的活化和 NF- κ B 的入核,最终诱导干扰素及炎性因子等产生,从而抑制病毒的复制与传播^[18, 25-26]。前期研究发现, B 型流感病毒 (IBV) 在感染早期能上调细胞中 RIG-I 的蛋白表达水平,为了探索 RIG-I 是否为 B 型流感病毒激活下游信号通路的主要受体及其对 IBV 复制的影响,我们构建并使用 RIG-I 敲除的 293T 细胞系证明了 RIG-I 信号通路是宿主抵抗 IBV 感染的主要天然免疫通路之一, RIG-I 基因敲除后对 IBV 在 293T 细胞中的复制具有促进作用,为探索 IBV 的感染机制奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株和质粒

293T 细胞系和 MDCK 细胞系均由本实验室

保存, UCATM CRISPR/Cas9 快速构建及活性检测试剂盒购自北京百奥赛图生物技术有限公司, 大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞由本实验室自制和保存, B 型流感病毒 (B/Shanghai/PD114/2018, Yamagata lineage, IBV) 于 2018 年分离自上海浦东的一位 B 型流感病毒患者,由国家流感中心的王大燕教授馈赠。仙台病毒 (Sendai Virus, SeV) 由本实验室保存。

1.1.2 实验试剂

NEB buffer2 与限制性内切酶 *Bbs* I 购自 New England Biolabs 公司。转染试剂 Lipofectamine 2000 Reagent 及琼脂糖购自 Invitrogen 公司。寡核苷酸回收试剂盒购自北京艾莱德生物技术有限公司。胎牛血清及 DMEM 培养基购自 Gibco 公司。高保真 DNA 聚合酶购自北京博迈德生物技术有限公司。质粒提取试剂盒、血液/细胞/组织基因组 DNA 提取试剂盒购自北京天根生物技术有限公司。Anti-RIG-I (D14G6) mAb、anti-IRF3 mAb 和 anti-P-IRF3 Ab 购自 Cell Signaling Technology 公司, anti-p65 mAb 和 anti-P-p65 mAb 购自 Santa Cruz 公司, Trizol Reagent 购自 Life Technology 公司, SYBR[®] Premix Ex *Taq*[™] kit 购自 TaKaRa 公司。

1.1.3 引物合成及 PCR 检测产物的测序

所有引物合成及 PCR 产物测序均由北京博迈德生物技术有限公司完成。

1.2 实验方法

1.2.1 sgRNA 的设计与寡核苷酸链的合成

从 GenBank 数据库中下载人类的 RIG-I (Gene ID 登录号: 23586) 全基因序列,并标识出其基因编码区 (Coding sequence, CDS)。利用 DNA Star 软件对 CDS 区域进行 GG(N)18NGG 基序的查找,以查找到的符合要求的基序作为 sgRNA 的正链,且在其正链的 5'端添加 CACC,在其负链的 5'端添加 AAAC,以便与 *Bbs* I 酶切后的载体上的粘性末端互补, sgRNA 的核苷酸序列如表 1 所示。

表 1 sgRNA 的核苷酸序列

Table 1 Nucleotide sequences of sgRNAs

Name	Sequence (5'-3')
Hu-RIG-I-sgRNA1-F	ACCGGATTATATCCGGAAGACCC
Hu-RIG-I-sgRNA1-R	AAACGGGTCTCCGGATATAATCC
Hu-RIG-I-sgRNA2-F	CACCGGCAGGTGCAGAGAAATTGG
Hu-RIG-I-sgRNA2-R	AAACCCAATTCTCTGCACCTGCC
Hu-RIG-I-sgRNA3-F	CACCGGAACAAGTTCAGTGAAGTGC
Hu-RIG-I-sgRNA3-R	AAACCAGTTCAGTGAAGTTC

1.2.2 重组 Hu-RIG-I-sgRNA-pCS-1 载体构建

将合成的单链 sgRNA 序列退火,使其形成粘末端双链。退火体系为: Hu-RIG-I-sgRNA-F 20 μ L, Hu-RIG-I-sgRNA-R 20 μ L, NEB buffer 2 10 μ L; 退火条件为:于 PCR 仪中 97 $^{\circ}$ C 作用 7 min,然后关机,自动降温 1 h 后取出样品进行利用寡核苷酸回收试剂盒进行胶回收纯化。将回收后具粘性末端的双链片段与 *Bbs* I 内切酶线性化后的 pCS-1 质粒 1–2 μ g 在 16 $^{\circ}$ C 下连接 4 h,连接体系为:双链片段 6 μ L, pCS-1 质粒 2 μ L, T4 DNA 连接酶 1 μ L, T4 DNA 连接酶缓冲液 1 μ L。将连接产物转化至感受态 *E. coli* DH5 α 中,氨苄抗性筛选阳性克隆并挑取阳性单克隆接种氨苄抗性的液体 LB 培养基,利用质粒提取试剂盒进行质粒提取并测序验证是否为正确的重组质粒。

1.2.3 重组 pUCA(Luc)-target 载体的构建

以 293T 细胞基因组 DNA 为模板,利用高保真 DNA 聚合酶扩增 sgRNA 靶位点上下游间的一段长约 400–500 bp 的序列作为 target,扩增引物如表 2 所示。PCR 产物测序验证后与线性化的 precut pUCA (Luc) 质粒连接,构建重组载体 pUCA (Luc)-target,以用于 Hu-RIG-I-sgRNA-pCS-1 的向导及切割 (sgRNA/Cas9) 活性检测。连接体系如下:纯化的 PCR 片段 (target) 4 μ L, precut pUCA(Luc)质粒 1 μ L, T4 DNA 连接酶 1 μ L, T4 DNA 连接酶缓冲液 1 μ L, ddH₂O 3 μ L。连接条件为 16 $^{\circ}$ C 连接过夜。将连接产物转化至感受态细胞 *E. coli* DH5 α 中,卡那抗性筛选阳性克隆并接种至卡那抗性的液体 LB 培养基,利用质粒提取试剂盒进行质粒提取并测序验证是否为正确的重组质粒。

表 2 扩增 Target 序列的引物

Table 2 Primers for target segments amplification

Primer name	Primer sequence (5'-3')
Targeting-sgRNA1-F	TAAAGCTAGTGAGGCACAGCCT
Targeting-sgRNA1-R	CACCTCGCTGGAAGTTCAGTTT
Targeting-sgRNA2+sgRNA3-F	CATGGATATGACCCACTGAGCT
Targeting-sgRNA2+sgRNA3-R	CTTTGGGCCAGATGGGCTAAT

1.2.4 Hu-RIG-I-sgRNA-pCS-1 的活性检测

将生长状态良好的 293T 细胞分至 96 孔板,待细胞汇合度达到 80% 时换液至 OPTI-MEM 培养基中,1–2 h 后转染 Hu-RIG-I-sgRNA-pCS-1 和 Seq-sgRNA-pUCA (Luc) 质粒,转染量分别为 80 ng/孔和 20 ng/孔,所用转染试剂为 Lipofectamine 2000 Reagent,质粒与转染试剂的比例为 1:2.5,同时设立空白对照、阴性对照和阳性对照,空白对照不加任何质粒,阴性对照组只加 pUCA (Luc)-target 质粒,阳性对照加 pUCA (Luc)-target 和 pCS-positive 质粒,每组设立 3 个重复孔。转染后 4–6 h 换液至含 10% FBS 的 DMEM 培养基进行培养,24 h 后进行荧光素酶活性检测,具体步骤按试剂盒说明书进行,Luc 反应液及参数设置按说明书进行配制及设定。

1.2.5 293T 细胞的嘌呤霉素药物致死浓度筛选

将生长状态良好的 293T 细胞分至 24 孔板,待细胞长至 100% 汇合度时加入不同浓度的嘌呤霉素进行药物致死浓度的筛选。所用药物浓度梯度为:0、0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、4.5、5.0、6.0 μ g/mL,每个浓度设立 2 个孔。每天观察细胞死亡情况,挑取导致细胞在 5 d 内全部死亡的最低剂量的药物浓度作为本实验的药物筛选浓度。

1.2.6 高活性 Hu-RIG-I-sgRNA-pCS-1 质粒的细胞转染

将生长状态良好的 293T 细胞分至 6 孔板,待细胞长至 80% 汇合度时换液至 OPTI-MEM 中,1–2 h 后转染活性较高的 Hu-RIG-I-sgRNA-pCS-1 质粒,

每孔的转染量为 2 μg ，所用转染试剂为 Lipofectamine 2000 Reagent，其与质粒的比例为 1:2.5，同时转染 pCS-1 空载体作为阴性对照。转染后 4–6 h 换液至含 10% FBS 的 DMEM 培养基进行培养。

1.2.7 药物筛选及单克隆培养

将转染后换液至 10% FBS 的 DMEM 培养基中的 293T 继续培养 12 h 后开始在培养基中加入嘌呤霉素进行筛选，每 24 h 更换 1 次培养基。筛选 3 d 后嘌呤霉素的用量减半，继续筛选 3 d 后更换为无嘌呤霉素的含 10% FBS 的 DMEM 培养基，根据细胞生长情况继续培养 2–3 d 后利用流式细胞仪进行单细胞分选至 96 孔板，每孔 150 μL 培养基。7–10 d 后，将细胞单克隆消化分至 24 孔板，并逐渐扩大培养，以便下一步 PCR 鉴定阳性克隆。

1.2.8 PCR 鉴定阳性克隆

将得到的单克隆用基因组提取试剂盒进行基因组 DNA 的提取作为模板，PCR 扩增 sgRNA 靶位点上下游区间的 DNA 序列，检测敲除效果。PCR 扩增所用引物序列见表 2。PCR 反应体系为：模板 DNA 5 μL ，Taq Mix 12.5 μL ，Primer-F 1 μL ，Primer-R 1 μL ，ddH₂O 5.5 μL 。PCR 反应程序为：94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min；94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s，58 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s，72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min，40 个循环；然后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min；4 $^{\circ}\text{C}$ 下保存。PCR 结束后取 10 μL 的反应产物进行琼脂糖凝胶电泳检测。

1.2.9 Western blotting 鉴定阳性克隆

将 PCR 鉴定阳性的单克隆及野生型(wild type, WT)的 293T 细胞分至 6 孔板，待细胞铺满后，换液至无血清的 DMEM 培养基中，用 IBV 及 SeV 进行感染，MOI=0.5，于 0、4、8、12、24 h 定点取样，以细胞裂解液进行裂解，裂解产物采用 BCA 法蛋白定量后进行 Western blotting，检测 RIG-I 蛋白的表达情况。

1.2.10 RIG-I 对 IBV 诱导的干扰素、炎性因子及干扰素刺激基因的影响

将生长状态良好的 WT 及 *RIG-I*^{-/-} 293T 细胞

铺至 12 孔板，待细胞密度达到 100% 时感染 IBV，MOI 为 0.5。分别于感染后 0、4、8、12 h 取样，每孔加入 Trizol Reagent 500 μL 裂解细胞并进行 RNA 提取及反转录。反转录体系为：RNA 模板 5 μL ，10 mmol/L dNTPs 1 μL ，Oligo(dT) 1 μL ，RRI 1 μL ，MLV 反转录酶 1 μL ，10 \times 缓冲液 2 μL ，ddH₂O 9 μL ；反应条件为：RNA 模板与 Oligo(dT) 混匀在 70 $^{\circ}\text{C}$ 下作用 5 min，冰浴 5 min，再加入其他成分，42 $^{\circ}\text{C}$ 作用 60 min，80 $^{\circ}\text{C}$ 条件下 10 min 即可。将所得 DNA 模板置于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中冻存备用。Real-time qPCR 的详细操作步骤按 SYBR[®] Premix Ex Taq[™] kit 说明书进行，所用引物如表 3 所示。

表 3 细胞因子的 Real-time PCR 引物

Table 3 Real-time PCR primers for detecting cytokines

Primer name	Primer sequence (5'-3')
IFN- α -F	CTGAATGACTTGGAAGCCTG
IFN- α -R	ATTTCTGCTCTGACAACCTC
IFN- β -F	TAGCACTGGCTGGAATGAGA
IFN- β -R	TCCTTGGCCTTCAGGTAA TG
IFN- λ 2-F	CTCAGGTTGCATGACTGGTGG
IFN- λ 2-R	GAGGCC TCTGTACCTTCAAC
IFN- λ 3-F	CAGCTGCAGGTGAGGGAGCGCCCCG
IFN- λ 3-R	GGTGGCCTCCAGAACCTT
IFN- λ 1-F	GGACGCCTTGG AAGAGTCACT
IFN- λ 1-R	AGAAGCCTCAGGTCCCAATC
IL-6-F	AGCCACTCACCTCTTCAGAACGAA
IL-6-R	CAGTGCCTCTTTGCTGCTTTCACA
TNF- α -F	TGGGCTCCCTCTCATCAGTTC
TNF- α -R	TCCGCTTGGTGGTTTGCTAC
CXCL10-F	CCAAGTGCTGCCGTCAATTTTC
CXCL10-R	GGCTCGCAGGGATGATTCAA
MxA-F	GGTGGCTGAGAACAACCTGT
MxA-R	GGTCTGCTCCACACCTAG A
IFIT2-F	AAGCACCTCAAAGGGCAAAC
IFIT2-R	TCGGCCCATGTGATAGTAGAC
IFIT3-F	TCAGAAGTCTAGTCACTTGGGG
IFIT3-R	ACACCTTCGCCCTTTCATTTTC
ISG20-F	CGACACGTCCACTGACAGGCTGTTG
ISG20-R	TCCATCGTTGCCCTCGCATCTTC

1.2.11 RIG-I 对 IBV 感染后 p65、磷酸化 P65、IRF3 及磷酸化 IRF3 表达的影响

将生长状态良好的 WT 及 *RIG-I*^{-/-} 293T 细胞铺至 6 孔板, 待细胞密度达到 100% 时感染 IBV, 同时以 SeV 感染作为对照, MOI 均为 0.5。分别于感染后 0、4、8、12、24 h 时用细胞裂解液裂解细胞, 利用相应抗体对裂解液中的 p65、P-p65、IRF3 及 P-IRF3 蛋白进行 Western blotting 检测。

1.2.12 RIG-I 对 IBV 生长曲线的影响

将生长状态良好的 WT 及 *RIG-I*^{-/-} 293T 细胞铺至 12 孔板, 待细胞密度达到 100% 时感染 IBV, MOI 为 0.5。分别于感染后 0、12、24、36、48、60、72 h 收取细胞上清, 进行病毒 TCID₅₀ 的测定。简要步骤如下: 将生长状态良好的 MDCK 细胞铺至 96 孔板; 用无血清 DMEM 4 倍梯度稀释不同时间点的细胞上清; 待 MDCK 细胞密度达到 100% 时, 弃去培养基, 用 PBS 洗涤, 然后将稀释后的细胞上清加入孔中, 每孔 200 μL, 每个稀释度 10 个重复孔, 同时设立阴性对照孔(只加无血清 DMEM); 培养 72 h 后观察细胞病变情况, 计算不同时间点收取的细胞上清的 TCID₅₀, 绘制并比较 IBV 在两种细胞系上的生长曲线。

2 结果与分析

2.1 重组载体 Hu-RIG-I-sgRNA-pCS-1 的构建

RIG-I 的 CARD 结构域负责下游信号的转导, 对 RIG-I 功能的发挥具有至关重要的作用, 若对 CARD 结构域基因进行缺失, RIG-I 信号转导通路则被阻断。而 CARD 结构域的基因位于 Exon1-Exon4 上, 于是我们针对 Exon1 和 Exon4 设计 3 个不同的 sgRNA 寡核苷酸单链(Hu-RIG-I-sgRNA1-3), 其中 Hu-RIG-I-sgRNA1 位于 Exon1 上, Hu-RIG-I-sgRNA2-3 位于 Exon4 上。合成的寡核苷酸单链被引入了 *Bbs* I 酶切位点, 因此可通过退火形成具有粘性末端的双链, 然后与经过 *Bbs* I 酶切的 pCS-1 载体连接, 构成重组质粒 Hu-RIG-I-sgRNA-pCS-1, 构建示意图如图 1 所示。

重组质粒 Hu-RIG-I-sgRNA-pCS-1 可转录靶向目的基因的 sgRNA, 同时该质粒还可表达 Cas9 蛋白, 因此该质粒可同时完成靶向与切割的功能。pCS-1 载体骨架中的嘌呤霉素抗性基因可用于阳性克隆的筛选。

2.2 Hu-RIG-I-sgRNA-pCS-1 向导及切割活性的检测

如图 2A 所示, pUCA(Luc) 是 sgRNA 的报告基因质粒, 其中的荧光素酶(Luciferase, Luc) 基因内部含有终止密码子和 CRISPR/Cas9 的靶位点序列。终止密码子和靶位点序列两端的“er”为荧光素酶的互补重复序列。终止密码子可导致荧光素酶的翻译提前终止, 表达无功能的荧光素酶。但若 CRISPR/Cas9 对靶位点进行了切割, 则可引发基于 SSA (Single strand annealing) 的 DNA 同源重组修复机制, 互补重复序列“er”通过同源重组而形成了完整的荧光素酶编码序列, 从而表达有

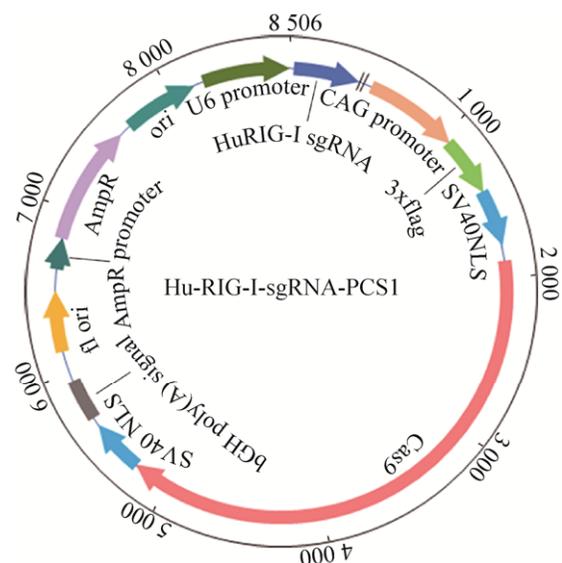


图 1 靶向 Hu-RIG-I 基因重组载体 Hu-RIG-I-sgRNA-pCS-1 的构建示意图

Fig. 1 Construction of Hu-RIG-I-targeting recombinant plasmid Hu-RIG-I-sgRNA-pCS-1. sgRNA which had the ends of *Bbs* I enzymatically digested fragments was cloned into pCS-1 vector which had the same ends with sgRNA.

功能的荧光素酶, 荧光素酶的活性与 sgRNA/ Cas9 的活性呈正相关。同时转染 pUCA(Luc)-target 与 Hu-RIG-I-sgRNA-pCS-1 质粒, 通过荧光素酶活性判断 Hu-RIG-I-sgRNA-pCS-1 质粒的 sgRNA/ Cas 活性。在进行活性检测时, 会使用阳性对照质粒 (pCS-Positive 质粒, 该质粒可表达一段已验证过具有活性的 positive-sgRNA, 序列为: 5'-GGC TAATAACTTAATCGTGG-scaffold-3') 作为参考。precut pUCA (Luc) 质粒的“er”序列间具有 positive-sgRNA 的靶位点序列, 且克隆为环状质粒后仍然存在。因此在转染实验中, 转染 pUCA (Luc)-target 和 pCS-Positive 质粒即可作为活性检测实验的阳性对照, 活性检测流程如图 2B 所示。荧光素酶活性检测结果如图 2C 所示, 从图 2C 可以看出, Hu-RIG-I-sgRNA2-pCS-1 的活性最高。

2.3 重组载体 Hu-RIG-I-sgRNA2-pCS-1 可高效切割靶位点造成 RIG-I 基因部分缺失

选取导致 293T 细胞在 5 d 全部死亡的嘌呤霉素浓度 3.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 作为本实验的药物筛选浓度。然后根据 2.2 实验结果, 挑取 sgRNA 活性最高的重组质粒 Hu-RIG-I-sgRNA2-pCS-1 转染 293T 细胞, 并于加入嘌呤霉素后开始每天观察细胞的死亡情况。结果表明, 细胞于加入嘌呤霉素后 3 d 开始出现大量的死亡, 5 d 后嘌呤霉素的浓度降为 1.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 再筛选 3 d 后撤除嘌呤霉素压力, 继续培养 5-7 d 后可明显看到细胞形成白色单克隆, 将细胞进行消化后制成悬液, 用流式细胞仪进行单细胞分选, 获得单克隆。对获得的单克隆进行 PCR 鉴定, 结果表明, 重组质粒 Hu-RIG-I-sgRNA2-pCS-1 转染至 293T 细胞后, 可对细胞基因组靶位

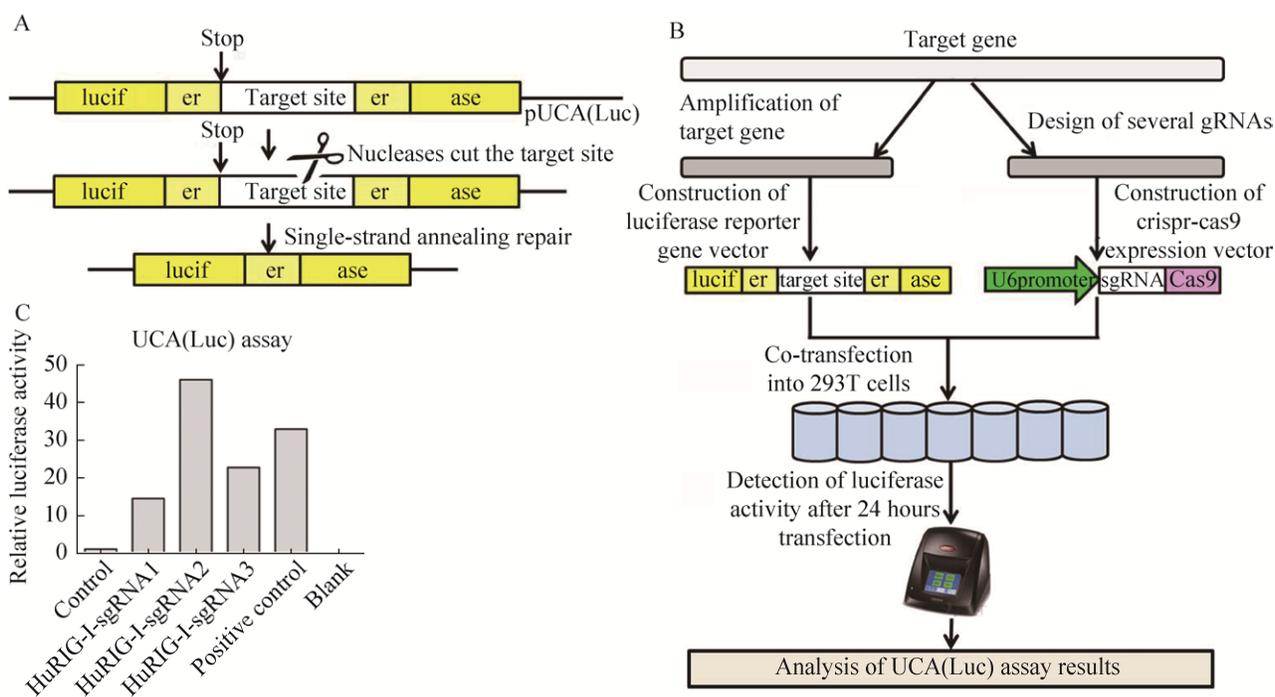


图 2 检测 Hu-RIG-I-sgRNA-pCS-1 活性的原理示意图及其荧光素酶活性检测

Fig. 2 Schematic diagram and process of HuRIG-I-sgRNA-pCS-1 activity detection. (A) Schematic diagram of sgRNA activity assay. (B) Process of HuRIG-I-sgRNA-pCS-1 activity detection. (C) The activity of Hu-RIG-I-sgRNA-pCS-1 by luciferase reporter assay. The results showed that Hu-RIG-I-sgRNA2-pCS-1 possessed higher level of sgRNA activity than Hu-RIG-I-sgRNA1-pCS-1 and Hu-RIG-I-sgRNA 3-pCS-1.

点进行高效切割,造成全部或部分等位基因的基因敲除。对筛选到的 22 株单克隆进行基因组 DNA 提取和 PCR 检测,共筛选到 8 株疑似阳性克隆,如图 3 所示。从图中可以看出,1 号克隆出现两条较对照小的目的条带,可能是因为不同的等位基因发生删减的长度不同。而 4、5、6、7、8 号克隆也出现了大小不同的两条带,经测序发现,分子量较大的条带序列与野生型 293T 细胞的序列相同,没有发生删减。2、3 号克隆均为单一条带,与野生型 293T 细胞的序列相比,明显变小,说明所有等位基因均发生了相同的敲除,经测序发现 2、3 号克隆缺失序列均为 CDS 区域的第 464–552 位核苷酸,共 89 个核苷酸,而氨基酸的密码子则从 155 位开始移码并发生缺失突变,且突变后的核苷酸序列中提前出现了终止密码子(第 166 位氨基酸)。由此推断 2、3 号克隆无法表达具有正常生物学功能的 RIG-I 蛋白,挑取 2 号克隆用于后续实验,命名为 *RIG-I*^{-/-} 293T 细胞,并进行功能实验验证。

2.4 IBV 及 SeV 感染 *RIG-I*^{-/-} 293T 细胞后 RIG-I 蛋白表达缺失

通常 RIG-I 在绝大多数组织的细胞中有少量表达,在病毒的刺激下其表达会迅速上调^[26]。用细胞裂解液对 IBV 感染后不同时间的细胞进行裂解,以 Anti-RIG-I 的单抗(以 RIG-I 蛋白 C 端的 652–925 位氨基酸部分作为抗原进行免疫获得)进行 RIG-I 蛋白的 Western blotting 检测。SeV 作为经典研究 RIG-I 信号通路的模式病毒,其感染后可激活细胞中 RIG-I 介导的 RLR 相关天然免疫通路,引起 RIG-I 蛋白表达上调及各种细胞因子的表达^[27],因此选用 SeV 感染作为参考,检测 *RIG-I*^{-/-} 293T 细胞中 RIG-I 的内源性表达情况。结果如图 4 所示,无论是 IBV 还是 SeV,病毒感染后 *RIG-I*^{-/-} 293T 细胞中均检测不到 RIG-I 蛋白的表达,而野生型 293T 细胞在二者感染后的 4–24 h 均可检测到不同程度的 RIG-I 蛋白的表达,表明 *RIG-I*^{-/-} 293T 细胞中 RIG-I 基因敲除成功。

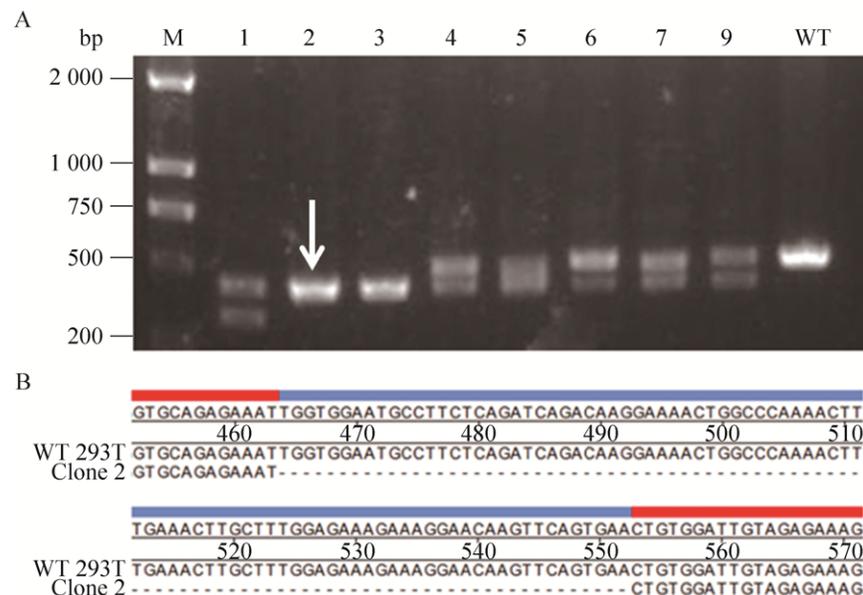


图 3 单克隆细胞的 PCR 鉴定及其与 WT 293T 细胞的序列比对

Fig. 3 Identification of monoclonal cells by PCR and DNA sequence alignment. (A) Identification of monoclonal cells by PCR. Number 2 and 3 samples were positive clones. (B) The DNA alignment of number 2 clone and wild type (WT) 293T cells. The alignment showed that a 89 nucleotides deletion was found between 464–552 sites in the CDS region.

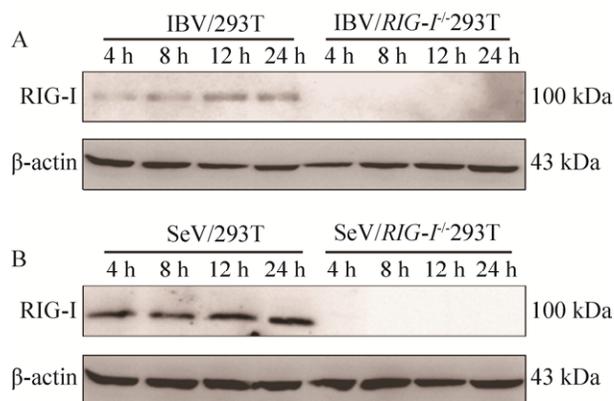


图 4 IBV 和 SeV 感染不能诱导 *RIG-I*^{-/-} 293T 细胞中 RIG-I 的表达

Fig. 4 The expression of RIG-I could not be detected in IBV or SeV infected *RIG-I*^{-/-} 293T cells. The WT or *RIG-I*^{-/-} 293T cells were infected with IBV and SeV at a MOI of 0.5. Cell lysates were harvested at indicated times followed by immunoblot analysis with anti-RIG-I and anti- β -actin antibodies. The results showed that the expression of RIG-I could not be detected in IBV or SeV infected *RIG-I*^{-/-} 293T cells.

2.5 RIG-I 可上调 IBV 诱导的干扰素、炎症因子及其干扰素刺激基因的转录

当带有 5'-三磷酸基团的病毒 RNA 作为配体与 RIG-I 结合后, RIG-I 被激活, 进而与其下游的接头蛋白 MAVS 结合, 接着通过一系列的信号转导诱导 I 型干扰素的产生^[28]。干扰素与细胞表面的干扰素受体结合后则启动 JAK-STAT 途径, 起始干扰素诱导基因的转录表达, 发挥抗病毒作用^[29]。为了验证 RIG-I 是否为 IBV 激活天然免疫通路的主要受体和 RIG-I 对 IBV 感染后干扰素、炎症因子及干扰素刺激基因表达的影响, 我们将 IBV 对 WT 及 *RIG-I*^{-/-} 293T 同时进行了感染, 并检测干扰素、炎症因子及干扰素刺激基因的转录水平在两种细胞中的差异。如图 5 所示, 在 IBV 感染后的 *RIG-I*^{-/-} 293T 细胞中, IFN- β 、IFN- λ 1、IFN- λ 2、IL-6、TNF- α 、MxA、IFIT2 和 ISG20 的转录水平明显低于野生型 293T 细胞, 而 IFN- α 、IFN- λ 3、CXCL-10 和 IFIT3 的转录水平与未感染时比, 虽然有一定程度的上调 (可能是 RIG-I 信号通路被阻断后, 其他信号通路进行了部分代偿), 但仍明

显低于野生型 293T 细胞, 说明 RIG-I 是介导 IBV 诱导的干扰素、炎症因子及干扰素刺激基因大幅上调的主要受体。

RNA 病毒感染细胞后, 可引起较高水平的 I 型干扰素表达^[30], 而在本实验中发现, IBV 诱导后, 野生型 293T 细胞中还检测到较高水平的 III 型干扰素的 mRNA 的转录水平 (即 IFN- λ 1、IFN- λ 2 和 IFN- λ 3), 暗示了 III 型干扰素在机体抵抗病毒 IBV 入侵的过程中也发挥着相当重要的作用。

2.6 RIG-I 是 IBV 激活抗病毒天然免疫信号通路的主要受体之一

RIG-I 介导信号转导的一个关键的步骤是 IRF3/7 和 NF- κ B 的磷酸化^[28]。p65 是 NF- κ B 蛋白家族的一个重要成员, p65 与 p50 的二聚体形式是最常见的 NF- κ B 二聚形式, 因此 p65 的磷酸化是 NF- κ B 活性形式的基础。在本研究中, 将 IBV 对 WT 及 *RIG-I*^{-/-} 293T 进行感染并检测 p65、P-p65、IRF3 及 P-IRF3 的表达 (图 6B), 同时采用 SeV 感染作为参考 (图 6A)。从图中可以看出, IBV 及 SeV 诱导的 p65 及 IRF3 在 WT 及 *RIG-I*^{-/-} 293T 细胞系中的表达没有明显差异, 而 P-p65 及 P-IRF3 在野生型 293T 细胞中可以检出, 在 *RIG-I*^{-/-} 293T 细胞中完全没有表达, 说明 RIG-I 敲除后并不影响 p65 及 IRF3 的表达, 但可抑制二者的磷酸化。不管病毒感染与否, *RIG-I*^{-/-} 293T 细胞中都检测不到 P-p65 及 P-IRF3 的发生, 表明 IBV 与 SeV 相似, 其感染诱导的干扰素、炎症因子及其干扰素刺激基因的产生与 RIG-I 介导的抗病毒天然免疫反应密切相关。

2.7 RIG-I 抑制 IBV 在 293T 细胞中的复制

通过 2.5 的结果可知, RIG-I 可上调 IBV 诱导的干扰素、炎症因子和干扰素刺激基因等细胞因子在 293T 细胞中的转录水平, 而这些细胞因子对宿主抵抗病毒的入侵具有非常重要的作用, 这说明 RIG-I 在宿主细胞抵抗 IBV 感染的过程中发挥着重要作用。为了进一步探索 RIG-I 对 IBV 的生长复制的影响, 我们绘制了 IBV 在野生型及

RIG-I^{-/-}293T 细胞中的多步生长曲线(图 7)。从图中可以看出, IBV 在 *RIG-I*^{-/-} 293T 细胞中的 IgTCID₅₀ 显著高于其在野生型 293T 细胞中的

IgTCID₅₀, 这说明 RIG-I 对 IBV 在 293T 细胞中的复制具有抑制作用, 敲除 RIG-I 基因可提高 IBV 在 293T 细胞中的复制水平。

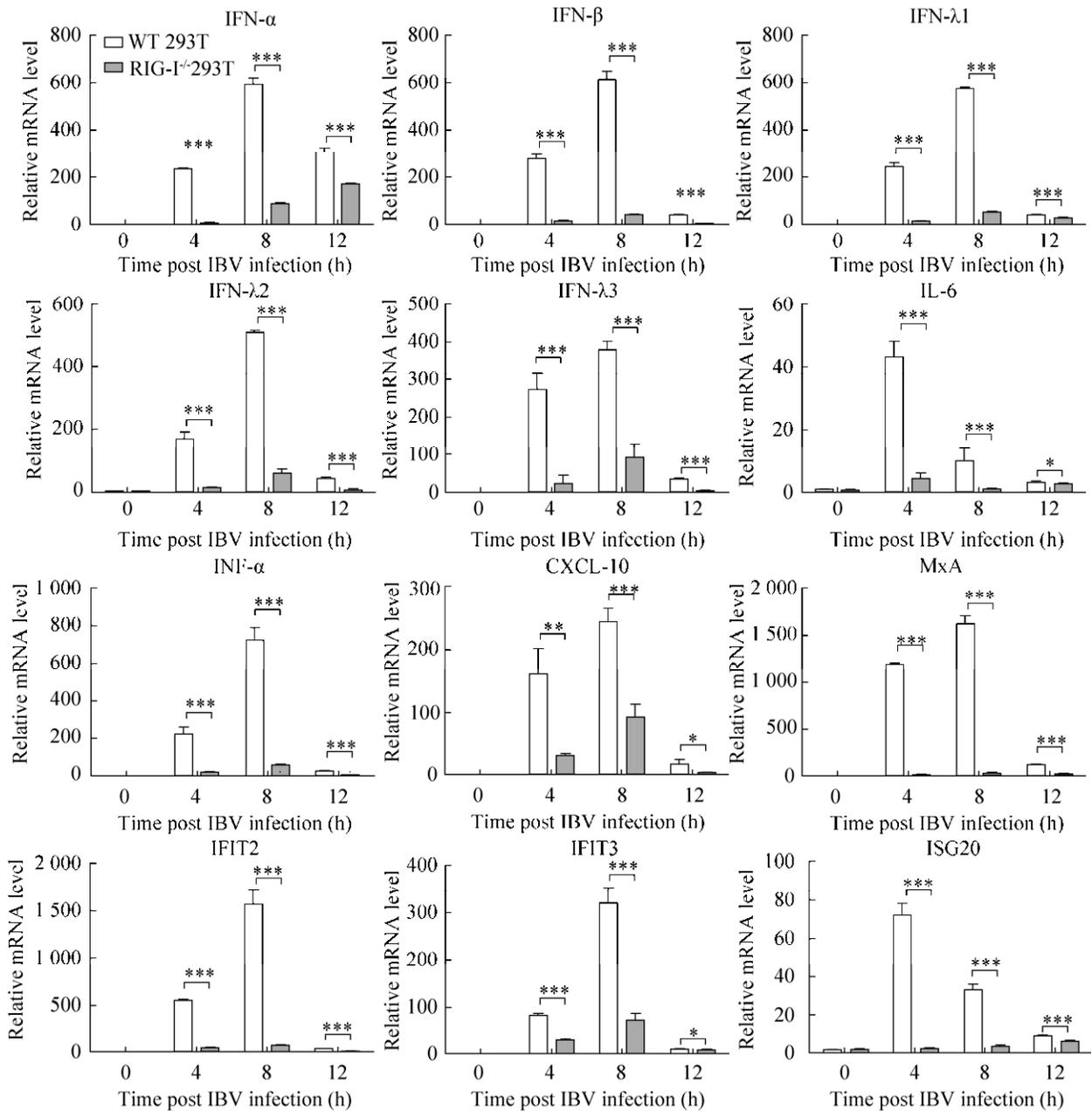


图 5 RIG-I 介导 IBV 诱导的干扰素、炎性因子及干扰素刺激基因的产生

Fig. 5 RIG-I mediates the production of interferons, inflammation factors and interferon-stimulated genes (ISGs) triggered by IBV. Cells were infected with IBV. The relative mRNA expression levels of IFN- α , IFN- β , IFN- λ 1, IFN- λ 2, IFN- λ 3, IL-6, TNF- α , CXCL-10, MxA, IFIT2, IFIT3, and ISG20 were detected by Real-time PCR in WT or *RIG-I*^{-/-} 293T cells infected by IBV. The data are presented as $\bar{x} \pm s$ ($n=3$). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ (unpaired, two-tailed Student's t -test). The results showed that the relative mRNA expression levels were significantly higher in WT 293T cells than those in *RIG-I*^{-/-} 293T cells, indicating that RIG-I mediates the production of interferons, inflammation factors and ISGs against IBV infection.

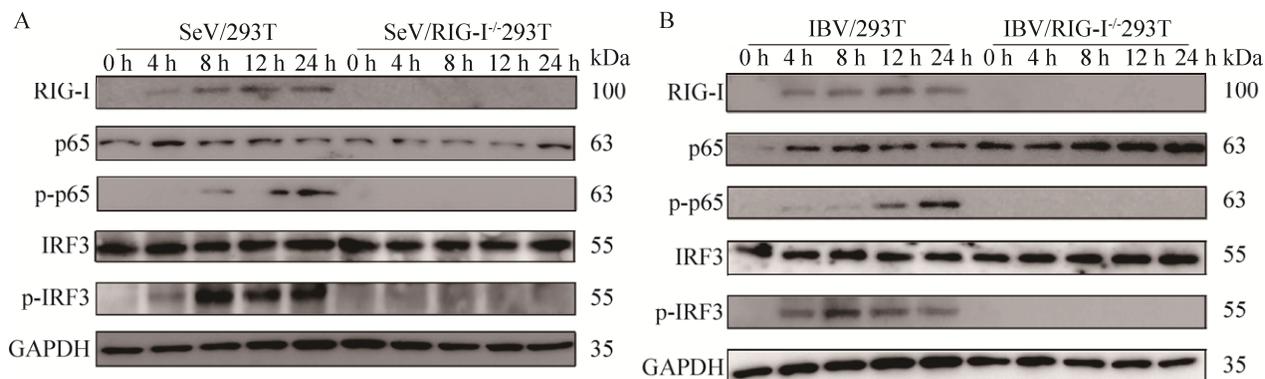


图 6 RIG-I 介导 IBV 感染后转录因子的激活

Fig. 6 RIG-I mediates the activation of transcriptional factors triggered by IBV and SeV. The WT or *RIG-I*^{-/-} 293T cells were infected with IBV or SeV at a MOI of 0.5. Cell lysates were harvested at indicated times followed by Immunoblot analysis with anti-RIG-I, anti-p65, anti-P-p65, anti-IRF3, anti-P-IRF3, and anti-GAPDH antibodies. P-p65 and P-IRF3 were not detected in *RIG-I*^{-/-} 293T cells, suggesting that RIG-I mediates the activation of p65 and IFR3.

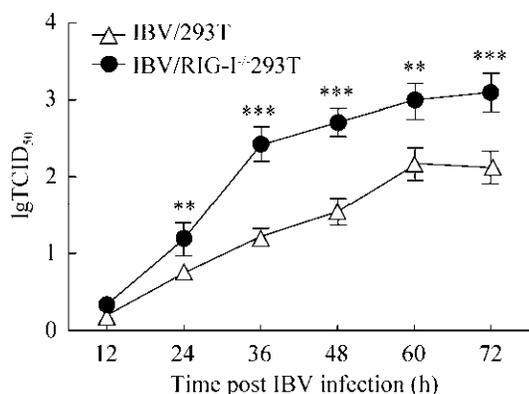


图 7 RIG-I 抑制 IBV 在 293T 细胞中的复制

Fig. 7 RIG-I inhibits the growth of IBV in 293T cells. The WT or *RIG-I*^{-/-} 293T cells were infected with IBV at a MOI of 0.5, cell supernatant were harvested at indicated times, and the growth curves were tested by TCID₅₀ assay in MDCK cells. The percentages of cell death were manually observed and recorded for each dilution, and the TCID₅₀ values are calculated according to Reed-Muench method. The data are presented as $\bar{x} \pm s$ ($n=3$). ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ (unpaired, two-tailed Student's *t*-test). The results showed that the titers of IBV in *RIG-I*^{-/-} 293T cells were significantly higher than those of in WT 293T cells.

3 讨论

高效精准的基因编辑技术是研究基因功能的重要工具, CRISPR/Cas9 基因编辑技术是基于细菌 CRISPR/Cas9 免疫系统的可在基因组特定位点进

行靶向编辑 (缺失或插入) 的新技术^[11-12]。CRISPR/Cas9 免疫系统的作用机制分为 CRISPR 间隔序列的获得、crRNA 前体的转录与加工、crRNA、tracrRNA 及 Cas9 蛋白形成复合体对外源性 DNA 进行剪切加工^[5, 31]。以该机制为基础, 研究人员开发出 CRISPR/Cas9 介导的基因编辑技术, 根据成熟 crRNA 和其互补 tracrRNA 的二聚体结构设计出 sgRNA, 使之与 Cas9 蛋白结合, 引导 Cas9 蛋白与目的基因位点结合并进行剪辑^[31]。该设计将 CRISPR/Cas9 免疫系统简化为 sgRNA 与 Cas 蛋白的复合体, 将该复合体导入细胞即可对完成对目的基因的切割。针对不同的靶点只需替换 20 多个碱基长短的 sgRNA 即可, 使得基因编辑易于操作, 大大地简化了工作流程。该技术简单快捷、高效精准, 已应用于多种细胞及哺乳动物 (大鼠、小鼠、恒河猴等) 的基因编辑, 为人类疾病 (如癌症等) 及基因未知功能的研究提供了大大的便利^[32, 35]。

IBV 最早于 1940 年分离到, 属于具囊膜的单股负链 RNA 病毒, 其基因组由 8 个节段组成, 可引起局部流感的发生^[36-37]。IBV 的自然宿主为人, 在海洋哺乳动物海豹中也曾检测到^[38]。IBV 基因组的变异率及重组率均低于 A 型流感病毒 (IAV), 因此学界一直认为 IBV 的危害要远远小于 IAV,

因此关于 IBV 的研究相对较少。但近年来, IBV 在某些特定的环境下也造成了不亚于 IAV 的危害, 例如 2013–2014 年 IBV 在北美特别是美国造成了大规模的疫情, 2017 年冬至 2018 年春, IBV 的 Yamagata 谱系与 Victoria 谱系在中国的南北方交替流行, 造成了数万人感染及沉重的疾病负担^[39]。因此 IBV 的致病性是不可低估的, 研究 IBV 的致病机理也是刻不容缓的, 并且本实验中所用毒株为 2017 年 B 型流感暴发时收集的临床毒株, 从而使本实验更具有临床研究意义, 并对今后的 B 型流感的相关研究及预测打下基础。

为了探索 RIG-I 是否为 IBV 激活下游信号通路的主要受体及其对 IBV 复制的影响, 我们进行了 RIG-I 敲除的 293T 细胞系的构建。在分析了 RIG-I 的不同结构域的不同功能之后, 设计了针对 RIG-I 蛋白 N 端的 CARD 结构域的 sgRNA, 这样可以使切割发生在 RIG-I 的 N 端, 加上可能发生移码突变, 使 RIG-I 蛋白表达受阻, 达到敲除的目的。本研究针对 RIG-I 基因的敲除发生在 CARD 结构域, 共有 89 个核苷酸的删减, 且造成了氨基酸从 155 位开始移码, 且终止于第 166 位氨基酸, 使得细胞无法表达 RIG-I 蛋白, 为研究 RIG-I 是否为 B 型流感病毒激活下游信号通路的主要受体及其对 IBV 复制的影响提供了基础。

目前关于 B 型流感病毒与天然免疫通路的关系的研究主要集中在 NS1 蛋白对宿主细胞 IFN 产生的影响上, 而关于哺乳动物细胞天然免疫系统是如何对抗 B 型流感病毒的研究尚少。我们通过实验发现 IBV 感染哺乳动物细胞后, RIG-I 的表达迅速上调, 且可诱导 IFN 等细胞因子的快速产生, 而敲除细胞中的 RIG-I 基因后, IFN 等细胞因子的转录水平显著下降, 该结果说明 IBV 诱导的 IFN 等细胞因子的产生具有一定程度的 RIG-I 信号通路依赖性。进一步研究发现, IBV 感染后, RIG-I 敲除导致其信号通路下游的转录因子 IRF3 及 NF- κ B 的亚基 p65 无法发生磷酸化, 同时 IBV 的复制效率提高, 说明 RIG-I 介导的抗病毒天然免

疫信号通路的激活对 IBV 的复制具有抑制作用。以上研究为揭示 IBV 天然免疫学特征奠定了基础。

REFERENCES

- [1] Wiedenheft B, Sternberg SH, Doudna JA. RNA-guided genetic silencing systems in bacteria and archaea. *Nature*, 2012, 482(7385): 331–338.
- [2] Ishino Y, Shinagawa H, Makino K, et al. Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. *J Bacteriol*, 1987, 169(12): 5429–5433.
- [3] Jansen R, Embden JD, Gaastra W, et al. Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. *Mol Microbiol*, 2002, 43(6): 1565–1575.
- [4] Deltcheva E, Chylinski K, Sharma CM, et al. CRISPR RNA maturation by *trans*-encoded small RNA and host factor RNase III. *Nature*, 2011, 471(7340): 602–607.
- [5] Garneau JE, Dupuis MÈ, Villion M, et al. The CRISPR/Cas bacterial immune system cleaves bacteriophage and plasmid DNA. *Nature*, 2010, 468(7320): 67–71.
- [6] Deveau H, Garneau JE, Moineau S. CRISPR/Cas system and its role in phage-bacteria interactions. *Annu Rev Microbiol*, 2010, 64: 475–493.
- [7] Kunin V, Sorek R, Hugenoltz P. Evolutionary conservation of sequence and secondary structures in CRISPR repeats. *Genome Biol*, 2007, 8(4): R61.
- [8] Sturino JM, Klaenhammer TR. Engineered bacteriophage-defence systems in bioprocessing. *Nat Rev Microbiol*, 2006, 4(5): 395–404.
- [9] Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, et al. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*, 2012, 337(6096): 816–821.
- [10] Magadán AH, Dupuis MÈ, Villion M, et al. Cleavage of phage DNA by the *Streptococcus thermophilus* CRISPR3-Cas system. *PLoS ONE*, 2012, 7(7): e40913.
- [11] Cong L, Ran FA, Cox D, et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*, 2013, 339(6121): 819–823.
- [12] Mali P, Yang LH, Esvelt KM, et al. RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science*, 2013, 339(6121): 823–826.
- [13] Jiang F, Ramanathan A, Miller MT, et al. Structural basis of RNA recognition and activation by innate immune receptor RIG-I. *Nature*, 2011, 479(7373): 423–427.

- [14] Kowalinski E, Lunardi T, McCarthy AA, et al. Structural basis for the activation of innate immune pattern-recognition receptor RIG-I by viral RNA. *Cell*, 2011, 147(2): 423–435.
- [15] Cui S, Eisenächer K, Kirchhofer A, et al. The C-terminal regulatory domain is the RNA 5'-triphosphate sensor of RIG-I. *Mol Cell*, 2008, 29(2): 169–179.
- [16] Wang F, Gao XJ, Barrett JW, et al. RIG-I mediates the co-induction of tumor necrosis factor and type I interferon elicited by myxoma virus in primary human macrophages. *PLoS Pathog*, 2008, 4(7): e1000099.
- [17] Kato H, Sato S, Yoneyama M, et al. Cell type-specific involvement of RIG-I in antiviral response. *Immunity*, 2005, 23(1): 19–28.
- [18] Kato H, Takeuchi O, Sato S, et al. Differential roles of MDA5 and RIG-I helicases in the recognition of RNA viruses. *Nature*, 2006, 441(7089): 101–105.
- [19] Loo YM, Fornek J, Crochet N, et al. Distinct RIG-I and MDA5 signaling by RNA viruses in innate immunity. *J Virol*, 2008, 82(1): 335–345.
- [20] Plumet S, Herschke F, Bourhis JM, et al. Cytosolic 5'-triphosphate ended viral leader transcript of measles virus as activator of the RIG I-mediated interferon response. *PLoS ONE*, 2007, 2(3): e279.
- [21] Habjan M, Andersson I, Klingström J, et al. Processing of genome 5' termini as a strategy of negative-strand RNA viruses to avoid RIG-I-dependent interferon induction. *PLoS ONE*, 2008, 3(4): e2032.
- [22] Luthra P, Sun DY, Silverman RH, et al. Activation of IFN- β expression by a viral mRNA through RNase L and MDA5. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108(5): 2118–2123.
- [23] Hornung V, Ellegast J, Kim S, et al. 5'-Triphosphate RNA is the ligand for RIG-I. *Science*, 2006, 314(5801): 994–997.
- [24] Jiang JW, Li J, Fan WH, et al. Robust Lys63-linked ubiquitination of RIG-I promotes cytokine eruption in early influenza B virus infection. *J Virol*, 2016, 90(14): 6263–6275.
- [25] Mäkelä SM, Österlund P, Westenius V, et al. RIG-I signaling is essential for influenza B virus-induced rapid interferon gene expression. *J Virol*, 2015, 89(23): 12014–12025.
- [26] Loo YM, Gale Jr M. Immune signaling by RIG-I-like receptors. *Immunity*, 2011, 34(5): 680–692.
- [27] Okano S, Yonemitsu Y, Shirabe K, et al. Provision of continuous maturation signaling to dendritic cells by RIG-I-stimulating cytosolic RNA synthesis of Sendai virus. *J Immunol*, 2011, 186(3): 1828–1839.
- [28] Chen HH, Jiang ZF. The essential adaptors of innate immune signaling. *Protein Cell*, 2013, 4(1): 27–39.
- [29] Sadler AJ, Williams BRG. Interferon-inducible antiviral effectors. *Nat Rev Immunol*, 2008, 8(7): 559–568.
- [30] Gack MU, Albrecht RA, Urano T, et al. Influenza A virus NS1 targets the ubiquitin ligase TRIM25 to evade recognition by the host viral RNA sensor RIG-I. *Cell Host Microbe*, 2009, 5(5): 439–449.
- [31] Wiedenheft B, Lander GC, Zhou KH, et al. Structures of the RNA-guided surveillance complex from a bacterial immune system. *Nature*, 2011, 477(7365): 486–489.
- [32] Fujii W, Onuma A, Sugiura K, et al. Efficient generation of genome-modified mice via offset-nicking by CRISPR/Cas system. *Biochem Biophys Res Commun*, 2014, 445(4): 791–794.
- [33] Ma YW, Chen W, Zhang X, et al. Increasing the efficiency of CRISPR/Cas9-mediated precise genome editing in rats by inhibiting NHEJ and using Cas9 protein. *RNA Biol*, 2016, 13(7): 605–612.
- [34] Chen YC, Zheng YH, Kang Y, et al. Functional disruption of the dystrophin gene in rhesus monkey using CRISPR/Cas9. *Hum Mol Genet*, 2015, 24(13): 3764–3774.
- [35] Shi JW, Wang E, Milazzo JP, et al. Discovery of cancer drug targets by CRISPR-Cas9 screening of protein domains. *Nat Biotechnol*, 2015, 33(6): 661–667.
- [36] Almond JW, Haymerle HA, Felsenreich VD, et al. The structural and infected cell polypeptides of influenza B virus. *J Gen Virol*, 1979, 45(3): 611–621.
- [37] Fernandes EG, de Souza PB, de Oliveira MEB, et al. Influenza B outbreak on a cruise ship off the Sao Paulo Coast, Brazil. *J Travel Med*, 2014, 21(5): 298–303.
- [38] Osterhaus ADME, Rimmelzwaan GF, Martina BEE, et al. Influenza B virus in seals. *Science*, 2000, 288(5468): 1051–1053.
- [39] Jiao PT, Fan WH, Sun YP, et al. Research advance of influenza B viruses. *Chin J Biotech*, 2018, 34(6): 821–831 (in Chinese).
焦鹏涛, 范文辉, 孙业平, 等. B 型流感病毒研究进展. *生物工程学报*, 2018, 34(6): 821–831.

(本文责编 郝丽芳)