

• 生物技术与方法 •

应用 CRISPR-Cas9 技术构建 *RIG-I* 基因敲除的 HEK293 细胞系

陈姿亦, 吴怡蓉, 张雨婷, 高有领*

浙江万里学院 生物与环境学院, 浙江 宁波 315100

陈姿亦, 吴怡蓉, 张雨婷, 高有领. 应用 CRISPR-Cas9 技术构建 *RIG-I* 基因敲除的 HEK293 细胞系[J]. 生物工程学报, 2024, 40(11): 4254-4265.

CHEN Ziyi, WU Yirong, ZHANG Yuting, GAO Youling. Knockout of *RIG-I* in HEK293 cells by CRISPR/Cas9[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(11): 4254-4265.

摘 要: 为了揭示维甲酸诱导基因 I (retinoic acid inducible-gene I, *RIG-I*) 基因敲除对 I 型干扰素信号通路中关键因子的影响, 本研究利用 CRISPR/Cas9 技术构建了 *RIG-I* 基因敲除的 HEK293 细胞。首先设计了 3 条针对靶标基因的单向导 RNA (single guide RNA, sgRNA), 并构建了 pX459 重组载体。重组载体转染 HEK293 细胞后, 通过嘌呤霉素筛选细胞株, 再以聚肌苷酸-聚胞苷酸(polyinosinic acid-polycytidylic acid, poly I:C) 为病毒模拟物转染细胞, 通过基因测序、荧光定量 PCR、免疫印迹和免疫荧光的方法检测 *RIG-I* 基因的敲除情况, 同时对 I 型干扰素信号通路中的黑色素瘤分化相关基因 5 (melanoma differentiation-associated protein 5, MDA5)、干扰素 β 1 (interferon β 1, IFN β 1) 和核转录因子 kappa B p65 [nuclear transcription factor kappa B p65, NF- κ B(p65)] 等关键因子以及细胞活力进行分析。实验结果表明, 本研究成功构建了 2 株稳定敲除 *RIG-I* 基因的 HEK293 细胞株(S1 和 S3), *RIG-I* 在 S1 和 S3 中的基因转录水平和蛋白质表达水平均显著低于野生型细胞($P < 0.05$)。S1 和 S3 细胞株的 MDA5 和 IFN β 1 基因转录水平和 S3 细胞株的 NF- κ B(p65) 蛋白质水平显著低于野生细胞株($P < 0.05$); 细胞免疫荧光分析结果表明, poly I:C 转染细胞后, 与野生型相比, S1 细胞株核外存在较多的 NF- κ B(p65) 蛋白。此外, poly I:C 转染细胞 48 h 后, 显著降低了野生型和 S1 细胞株的活力($P < 0.05$), 但是不影响 S3 细胞株的活力。综上所述, 本实验通过 CRISPR/Cas9 系统成功构建了 2 株 *RIG-I* 基因敲除的 HEK293 细胞, 为进一步研究 I 型干扰素信号通路的机制提供了稳定的细胞模型。

关键词: CRISPR/Cas9; 维甲酸诱导基因 I (*RIG-I*); 基因敲除; HEK293 细胞; 干扰素

资助项目: 浙江省基础公益研究计划(LGN22C190028)

This work was supported by the Zhejiang Province Basic Public Welfare Research Program (LGN22C190028).

*Corresponding author. E-mail: gaoyl@zww.edu.cn

Received: 2024-02-22; Accepted: 2024-05-08; Published online: 2024-05-16

Knockout of *RIG-I* in HEK293 cells by CRISPR/Cas9

CHEN Ziyi, WU Yirong, ZHANG Yuting, GAO Youling*

College of Biological and Environmental Sciences, Zhejiang Wanli University, Ningbo 315100, Zhejiang, China

Abstract: We knocked out the retinoic acid-inducible gene I (*RIG-I*) in HEK293 cells *via* CRISPR/Cas9 to reveal the effects of *RIG-I* knockout on the key factors in the type I interferon signaling pathway. Three single guide RNAs (sgRNAs) targeting *RIG-I* were designed, and the recombination vectors were constructed on the basis of the pX459 vector and used to transfect HEK293 cells, which were screened by puromycin subsequently. Furthermore, a mimic of virus, poly I:C, was used to transfect the cells screened out. *RIG-I* knockout was checked by sequencing, real-time quantitative PCR, Western blotting, and immunofluorescence assay. Meanwhile, the expression levels of key factors of type I interferon signaling pathway such as melanoma differentiation-associated gene 5 (MDA5), interferon β 1 (IFN β 1), and nuclear factor-kappa B p65 [NF- κ B(p65)], as well as cell viability, were determined. The results showed that two HEK293 cell lines (S1 and S3) with *RIG-I* knockout were obtained, which exhibited lower mRNA and protein levels of *RIG-I* than the wild type HEK293 cells ($P < 0.05$). The mRNA levels of *MDA5* and *IFN β 1* in S1 and S3 cells and the protein level of NF- κ B(p65) in S3 cells were lower than those in the wild type ($P < 0.05$). More extranuclear NF- κ B(p65) protein was detected in S1 cells than in the wild type after transfection with poly I:C. Plus, the wild-type and S1 cells transfected with poly I:C for 48 h showcased reduced viability ($P < 0.05$), while S3 cells did not display the reduction in cell viability. In summary, the present study obtained two HEK293 cell lines with *RIG-I* knockout *via* CRISPR/Cas9, which provided a stable cell model for exploring the mechanism of type I interferon signaling pathway.

Keywords: CRISPR/Cas9; retinoic acid-inducible gene I (*RIG-I*); gene knockout; HEK293 cell; interferon

成簇的规则间隔短回文重复序列(clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR)系统是细菌内的串联重复 DNA 序列, 具有防御噬菌体或质粒入侵的作用, CRISPR 阵列为其基本单位, 由前导序列(富含 AT)、间隔序列和散布于其中的重复核苷酸序列(20–50 bp)组成。一段外源基因进入细菌后, 以间隔序列的形式整合至 CRISPR 阵列, 细菌以此为标记预防相同噬菌体或质粒入侵^[1]。目前基因编辑时广泛采用 II 型 CRISPR 系统, Cas9 蛋白、CRISPR RNA

和 Trans-activating RNA 为核心元件, 后两者融合为一条单向导 RNA (single guide RNA, sgRNA), 并介导 Cas9 蛋白识别前间区序列临近基序(proto-spacer adjacent motif, PAM)并进行靶向剪切^[2]。

维甲酸诱导基因 I (retinoic acid-inducible gene I, *RIG-I*)是一种胞浆受体, 由 925 个氨基酸残基组成, 主要识别胞浆中病毒感染过程中产生的双链 RNA (double-stranded RNA, dsRNA)^[3], *RIG-I* 几乎在所有组织中均有表达^[4], 静息状态

下处于自身抑制状态,不与下游因子发生信号级联,病毒感染宿主细胞时,RIG-I 识别 5'-三磷酸 dsRNA 和短链 dsRNA (<1 kb^[5])。RIG-I 激活后,经过信号级联转导,诱导具有抗病毒作用的 I 型干扰素的生成^[6]。此外,激活的 RIG-I 能够活化核转录因子 kappa B (nuclear factor kappa B, NF- κ B),形成二聚体并进入细胞核调节促炎因子和趋化因子的产生^[7],因此,RIG-I 在 I 型干扰素信号通路中发挥着重要的作用。鉴于 RIG-I 的重要性,有必要针对其机制开展更为深入的研究,构建 *RIG-I* 基因敲除的细胞是一种有效的研究手段,目前已有构建成功 *RIG-I* 基因敲除细胞系^[8-11],包括猪肾细胞(PK-15 细胞)^[8]、犬肾上皮细胞(MDCK 细胞)^[9]、人肾上皮细胞衍生株(HEK293T 细胞)^[10]和山羊原代培养细胞^[11],这些细胞系为 *RIG-I* 基因功能研究提供了材料,基因功能具有细胞特异性,提供更加丰富的细胞类型,有助于更为全面的理解 *RIG-I* 基因的功能。因此,本研究的目的是采用 CRISPR/Cas9 技术构建 *RIG-I* 基因敲除人肾上皮细胞(HEK293 细胞),并在此基础上初步揭示 *RIG-I* 基因敲除对 I 型干扰素信号通路中关键因子的影响,为进一步研究 I 型干扰素信号通路提供优质细胞模型。

1 材料与方法

1.1 细胞及试剂

HEK293 细胞购自中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心;D-Hanks 缓冲液、DMEM 高糖培养基、RIPA 裂解液、去内毒素质粒小量提取试剂盒、Hoechst 33342 染色液、嘌呤霉素、CCK-8 细胞增殖及毒性检测试剂盒、RIG-I 抗体和 Alexa Fluor 532 标记的羊抗兔 IgG 均购自北京索莱宝科技有限公司;0.25%胰蛋白消化酶、Opti-MEMTM I 培养基、LipofectaminTM

3000 转染试剂和 cDNA 第一链合成试剂盒 RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit 试剂盒均购自 ThermoFisher 公司;胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)购自 Bovogen 公司;CRISPR/Cas 系统载体 pX459[pSpCas9(BB)-2A-Puro]质粒购自长沙优宝生物科技有限公司;基因组抽提试剂盒、*Bbs* I 内切酶和 T4 DNA 连接酶购自 NEB 公司;GAPDH 抗体购自 Abclonal 公司;NF- κ B(p65)购自武汉赛维尔生物科技有限公司;辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)标记的山羊抗兔 IgG 由生工生物工程(上海)股份有限公司提供;SDS-PAGE 凝胶快速配制试剂盒和 QuickBlockTM免疫染色封闭液购自碧云天生物科技有限公司;poly I:C 购自 Sigma 公司;E.Z.N.A.TM Fastfilter[®] Plasmid Mini Kit II 质粒提取试剂盒购自 Omega 公司;DNU332 通用型 DNA 微量提取试剂盒购自佛山奥维生物科技有限公司;RNA 提取试剂盒 FastPure Cell/Tissue Total RNA Isolation Kit V2 试剂盒购自 Vazyme 公司;UltraSYBR Mixture 试剂购自北京康为世纪生物科技有限公司。PCR 引物委托生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

1.2 单向导 RNA (sgRNA)设计

从 NCBI 下载人 *RIG-I* 基因组序列(GenBank 登录号: NG_046918)并利用麻省理工学院的 CRISPR Design 网站(<http://crispr.mit.edu>)在线设计针对靶标基因的 sgRNA 序列,根据分数的高低选取合适的指导序列,并加上与载体互补部分(forward oligo: 5'-cacc+引导序列-3'; reverse oligo: 5'-aaac+反向指导序列-3'),合成正反向寡核苷酸。将设计的序列(表 1)提交至生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

1.3 重组载体构建

采用 *Bbs* I 内切酶对 pX459 载体进行线性化酶切(附图 1,国家微生物科学数据中心,登录

号: NMDCX0000284), 再进行电泳(1%琼脂糖凝胶)鉴定和割胶回收。sgRNA 寡核苷酸引物先用双蒸水稀释至 20 $\mu\text{mol/L}$, 沸水浴 10–15 min, 迅速放至冰上 2–5 min, 随后退火, 保存于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。连接双链 sgRNA 至 pX459 载体, 连接体系如下: 0.6 μL 双链 sgRNA 片段(20 $\mu\text{mol/L}$), 0.2 μL 线性化 pX459 载体(0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$), 0.5 μL T4 DNA 连接酶, 1 μL 10 \times DNA 连接酶缓冲液和 7.7 μL ddH₂O, 16 $^{\circ}\text{C}$ 条件下连接过夜, 将连接产物转化至 DH5 α 感受态细胞, 涂布于具有氨苄青霉素的 LB 平板。在 37 $^{\circ}\text{C}$ 的条件下将平板倒置过夜培养后, 挑取单克隆进行振荡培养, 阳性克隆采用菌液 PCR 和 1%琼脂糖凝胶电泳进行鉴定, 委托杭州擎科生物科技有限公司对鉴定后的阳性克隆进行测序(测序引物: 5'-TGGACTATCATATGCTTACC-3')。测序正确后采用 E.Z.N.A.TM Fastfilter[®] Plasmid Mini Kit II 试剂盒进行质粒抽提, 按说明书进行操作。

1.4 *RIG-I* 稳定敲除细胞系的筛选

采用含 10%胎牛血清的 DMEM 培养基培养 HEK293 细胞, 经 0.25%胰酶(含 EDTA)消化后按 1:3 比例进行传代培养。转染时, 细胞接种于

12 孔板, 待长至 80%时, 培养基更换成含有 2%血清的 DMEM 培养基, 并依据 LipofectaminTM 3000 说明书对 HEK293 细胞进行重组载体转染操作, 转染 12 h 后更换为 10%胎牛血清的 DMEM 培养基, 转染 24 h 再更换为含有 3 $\mu\text{g/mL}$ 嘌呤霉素的新鲜培养基(10%胎牛血清)来筛选转染有效的 HEK293 细胞, 每隔 24 h 更换培养基并连续 7 d 进行阳性细胞的筛选。嘌呤霉素连续筛选后挑取单克隆接种于 96 孔板, 待孔板里长出单克隆细胞群落, 采用 DNU332 通用型 DNA 微量提取试剂盒提取基因组, 并以此为模板进行 PCR, 将 PCR 产物切胶回收连接 T 载体, 得到测序结果后与原基因组序列比对, 验证敲除效果, 所用测序引物序列见表 2。另一部分经

表 1 单向导 RNA (sgRNA) 序列

Table 1 Single guide RNA (sgRNA) sequence

sgRNA	Sequence (5'→3')
hRig-I-sgRNA1-F	caccGGGTCTTCCGGATATAATCC
hRig-I-sgRNA1-R	aaacGGATTATATCCGGAAGACCC
hRig-I-sgRNA2-F	caccgTTGCAGGCTGCGTCGCTGCT
hRig-I-sgRNA2-R	aaacAGCAGCGACGCAGCCTGCAAc
hRig-I-sgRNA3-F	caccgATGCCTTCTCAGATCAGACA
hRig-I-sgRNA3-R	aaacTGTCTGATCTGAGAAGGCATc

表 2 引物序列

Table 2 Primer sequences

Genes	Primer name	Sequences (5'→3')	Purpose
<i>RIG-I</i>	hRig-I-1&2 check-F	TAGTTGCACTTTTCGATTTTCCC	Knockout check
	hRig-I-1&2 check-R	GAGATCTTACCACAAACCTGGG	
<i>RIG-I</i>	hRig-I-3 check-F	TGCTCTACTAAGGGGATGATGG	
	hRig-I-3 check-R	GGTCTCGCGTTAGAGATGTAGC	
<i>GAPDH</i>	hGAPDHf-249-F	GCACCGTCAAGGCTGAGAAC	Real-time qPCR
	hGAPDHR-368-R	TGGTGAAGACGCCAGTGGA	
<i>RIG-I</i>	hRIG-f496-F	GTGGAATGCCTTCTCAGATCAGAC	
	hRIG-r767-R	CAGGCAAAGCAAGCTCTAATTGGT	
<i>MDA5</i>	hMDA5-f601-F	ACAATTGAAGACAGAAACCGGAT	
	hMDA5-r873-R	TCCATGCCCCAGACCTCC	
<i>IFNβ1</i>	hIFNB1-f101-F	GCTCTCCTGTTGTGCTTC	
	hIFNB1-r388-R	CATTAGCCAGGAGGTTCTCA	

poly I:C 转染后, 采用 Western blotting 对 RIG-I 的蛋白表达水平进行检测, 挑取 2 个经 Western blotting 验证和测序验证为阳性的单克隆细胞株进行亚克隆, 为确保敲除效果, 再次对长成群落的亚克隆细胞株进行 Western blotting 验证, 最后, 将未检测到 RIG-I 蛋白表达的单克隆细胞扩大培养, 并将培养得到的细胞株命名为 S1 和 S3。

1.5 Poly I:C 转染细胞

实验采用 12 孔板进行, 铺板数量为 2.5×10^5 细胞/孔, 在细胞长到 80% 时进行 poly I:C ($2 \mu\text{g/mL}$) 转染操作。实验设置为 4 组 3 个重复, 分别为: 野生型 HEK293 细胞(wild type), 野生型细胞转染 poly I:C (wild+poly I:C), 单克隆细胞株转染 poly I:C (S1+poly I:C 和 S3+poly I:C)。经 24 h 和 48 h 转染后收集细胞进行 Western blotting 和荧光定量 PCR 检测。用于 Western blotting 的细胞处理方法为: 每孔去除培养基, 加入 $100 \mu\text{L}$ RIPA 裂解液并置于冰上, 在摇床上裂解处理 30 min, 之后转移裂解液至 EP 管中并加入 $20 \mu\text{L}$ 5× SDS-PAGE 上样缓冲液, 100°C 金属浴处理 10 min, 离心($12\ 000 \text{ r/min}$, 4°C) 5 min 后吸取上清液; 用于荧光定量 PCR 的细胞处理方法为: 每孔去除培养基后, 添加 $100 \mu\text{L}$ RNA 提取裂解液并按试剂盒说明书进行总 RNA 提取。

1.6 免疫印迹(western blotting)

免疫印迹操作参考陈姿亦等^[12]建立的方法进行。

1.7 细胞免疫荧光分析

采用 12 孔板并放置 15 mm 细胞爬片, 铺板数量为 5.0×10^4 细胞/孔。待细胞贴壁后进行 poly I:C 转染($2 \mu\text{g/mL}$)。实验设置 4 组, 分别为: 野生型 HEK293 细胞(wild type), 野生型细胞转染 poly I:C (wild+poly I:C), 单克隆细胞系转染 poly I:C (S1+poly I:C 和 S3+poly I:C), 处理时长为 24 h。之后弃去培养液, PBS 漂洗 2 次后加入 4% 中性

多聚甲醛溶液室温固定 30 min, 用含 0.1% Triton X-100 的 PBS 洗涤 2 遍, 再加入含 0.25% Triton X-100 的 PBS 室温透膜 20 min。采用 QuickBlockTM 免疫染色封闭液封闭 1 h, 再加入以封闭液稀释的一抗, 4°C 孵育过夜。用含 0.1% Triton X-100 的 PBS 洗涤 3 遍, 每遍室温孵育 10 min。之后加入以封闭缓冲液稀释的荧光标记第二抗体, 室温孵育 30 min。使用含 0.1% Triton X-100 的 PBS 洗涤 3 遍, 每遍室温孵育 10 min。再用 PBS 稀释的 Hoechst 33342 ($30 \mu\text{g/mL}$) 室温孵育 5 min 染核, 之后用含 0.1% Triton X-100 的 PBS 洗涤 3 遍, 最后滴加抗荧光衰减封片剂封片, 荧光显微镜观察。

1.8 荧光定量 PCR

采用 FastPure Cell/Tissue Total RNA Isolation Kit V2 试剂盒提取总 RNA 直接用于下游实验或保存于 -80°C , 并由 RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit 试剂盒反转录合成 cDNA 第一链, 反转录时的总 RNA 量为 $4 \mu\text{L}$ 。以甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 为内参基因, 采用 MyiQ2 Two Color 实时荧光定量 PCR 仪 (Bio-Rad) 和 UltraSYBR Mixture 试剂, 测定 RIG-I、黑色素瘤分化相关基因 5 (melanoma differentiation-associated protein 5, MDA5) 和干扰素 $\beta 1$ (interferon $\beta 1$, IFN $\beta 1$) 相对表达量。引物序列见表 2。

1.9 细胞活力

采用 CCK-8 检测试剂盒测定细胞活力, 操作和计算按说明书进行。在 96 孔板铺板数量为 5.0×10^4 细胞/孔, 设置 6 组, 每组设 6 个重复。分别为野生型 HEK293 细胞(wild type), 2 组单克隆细胞系(S1 和 S3), 野生型细胞转染 $2.0 \mu\text{g/mL}$ poly I:C (wild+poly I:C), 单克隆细胞系转染 $2.0 \mu\text{g/mL}$ poly I:C (S1+poly I:C 和 S3+poly I:C)。

在培养箱内培养 24 h 后添加 CCK-8 溶液, 继续孵育 4 h 并用酶标仪测定 450 nm 处的 OD 值, 最后算出细胞活力值。

1.10 计算和统计

采用 Image-J(V1.8)量化 Western blotting 图像条带灰度值, 实时荧光定量 PCR 数据采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算^[13]。采用 GraphPad Prism (V8.0.2) 软件对数据进行方差分析并作图, 图中的统计结果表示为: 平均值 \pm 标准误(mean \pm SE), 多重比较方法为 Tukey, 显著水平为 $P<0.05$ 。

2 结果与分析

2.1 重组质粒载体构建

Bbs I 酶切后的质粒载体 pX459 与双链的 sgRNA 连接并转化至 DH5 α 感受态细胞, 挑取的阳性单克隆测序结果表明 2 个 sgRNA 片段成功插入 pX459 载体, 分别为 hRig-I-sgRNA1 和 hRig-I-sgRNA3 (附图 2, 国家微生物科学数据中心, 登录号: NMDCX0000284)。hRig-I-sgRNA1 靶向 *RIG-I* 基因的 Exon 1, hRig-I-sgRNA3 靶向 *RIG-I* 基因的 Exon 4 (图 1), 两个重组质粒载体分别命名为 RIG-I-sgRNA-1 和 RIG-I-sgRNA-3, 除了可转录靶向目的基因的 sgRNA, 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, 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 *RIG-I* 基因稳定敲除 HEK293 细胞系构建

重组载体 RIG-I-sgRNA-1 和 RIG-I-sgRNA-3 转染至 HEK293 细胞之后, 经嘌呤霉素筛选获得 2 个阳性单克隆细胞株, 分别命名为 S1 和 S3。测序结果表明细胞株 S1 在位点 5 200 开始缺失 21 个核苷酸, S3 在位点 38 845 至 38 851 缺失 7 个核苷酸(图 2)。细胞免疫荧光分析结果表明, HEK293 野生型细胞经 poly I:C 转染 24 h 后, RIG-I 蛋白表达量显著增加(图 3B), 同时 poly I:C 转染 S1 和 S3 细胞株 24 h 之后, 未检测到 RIG-I 蛋白的表达(图 3C、3D)。Western blotting 结果也是同样的趋势, 野生型 HEK293 细胞转染 poly I:C 24 h 和 48 h 后(图 4), RIG-I 蛋白表达水平显著增加, 但是 S1 和 S3 细胞株转染 poly I:C 后均未检测到 RIG-I 蛋白的表达。荧光定量 PCR 结果表明 poly I:C 转染野生型 HEK293 细胞(wild+poly I:C)显著提高了 *RIG-I* 基因的转录水平, 但是 S1 和 S3 细胞株的 *RIG-I* 基因的转录水平不受 poly I:C 转染的影响(图 5)。综上所述, 从蛋白表达和基因转录水平分析, S1 和 S3 细胞株的 *RIG-I* 基因已经成功敲除。

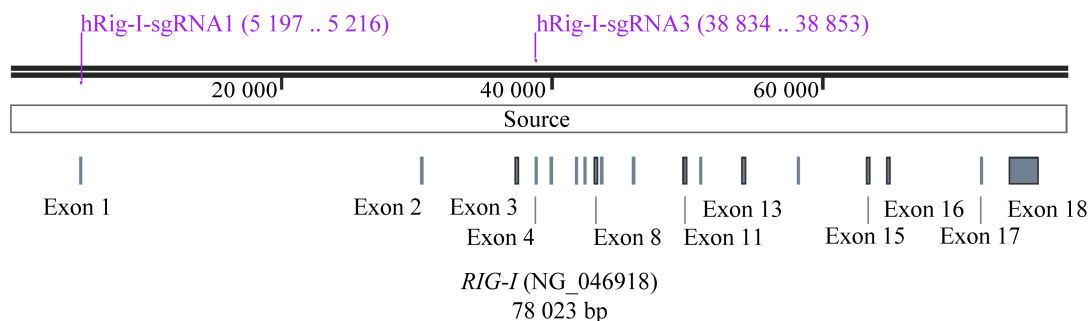


图 1 hRig-I-sgRNA1 和 hRIG-I-sgRNA 3 靶向 *RIG-I* 基因的位置

Figure 1 Target of hRig-I-sgRNA1 and hRig-I-sgRNA3 to *RIG-I*.



图2 RIG-I-sgRNA-1 和 RIG-I-sgRNA-3 基因敲除细胞株的 *RIG-I* 基因测序结果 A: hRIG-I-sgRNA1 基因敲除. B: hRIG-I-sgRNA3 基因敲除

Figure 2 Sequencing result of *RIG-I* in HEK293 cell strains knockout by RIG-I-sgRNA-1 and RIG-I-sgRNA-3. A: hRig-I-sgRNA1 knockout. B: hRig-I-sgRNA3 knockout.

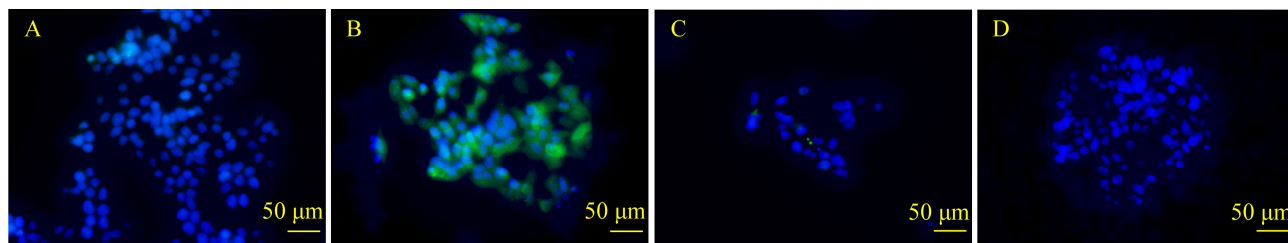


图3 RIG-I 蛋白质的细胞免疫荧光分析 A: HEK293 野生型细胞. B: HEK293 野生型细胞转染 poly I:C 24 h. C: HEK293 细胞 S1 株转染 poly I:C 24 h. D: HEK293 细胞 S3 株转染 poly I:C 24 h. 图中蓝色荧光为细胞核, 绿色荧光为 RIG-I 蛋白

Figure 3 Immunofluorescence assay of RIG-I protein in HEK293 cells. A: Wild type cells. B: Wild type cells transfected with poly I:C for 24 h. C: S1 cells transfected with poly I:C for 24 h. D: S3 cells transfected with poly I:C for 24 h. Blue fluorescence represents nucleus; green fluorescence represents RIG-I protein.

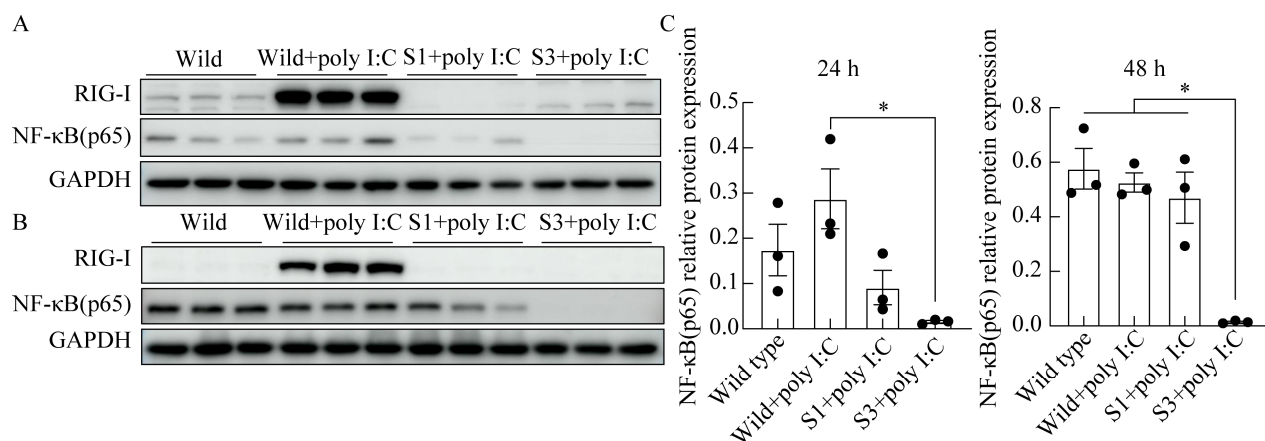


图 4 Poly I:C 转染对野生型和 *RIG-I* 基因敲除型 HEK293 细胞蛋白表达的影响 A: Poly I:C 转染 24 h 样品的蛋白质印迹图. B: Poly I:C 转染 48 h 样品的蛋白质印迹图. C: NF-κB(P65)条带灰度值统计图
Figure 4 Protein expression of wild type and *RIG-I* knockout HEK293 cells transfected with poly I:C. A: Western blotting of samples with 24 h poly I:C transfection. B: Western blotting of samples with 48 h poly I:C transfection. C: Gray density of NF-κB(p65) bands. *: $P < 0.05$.

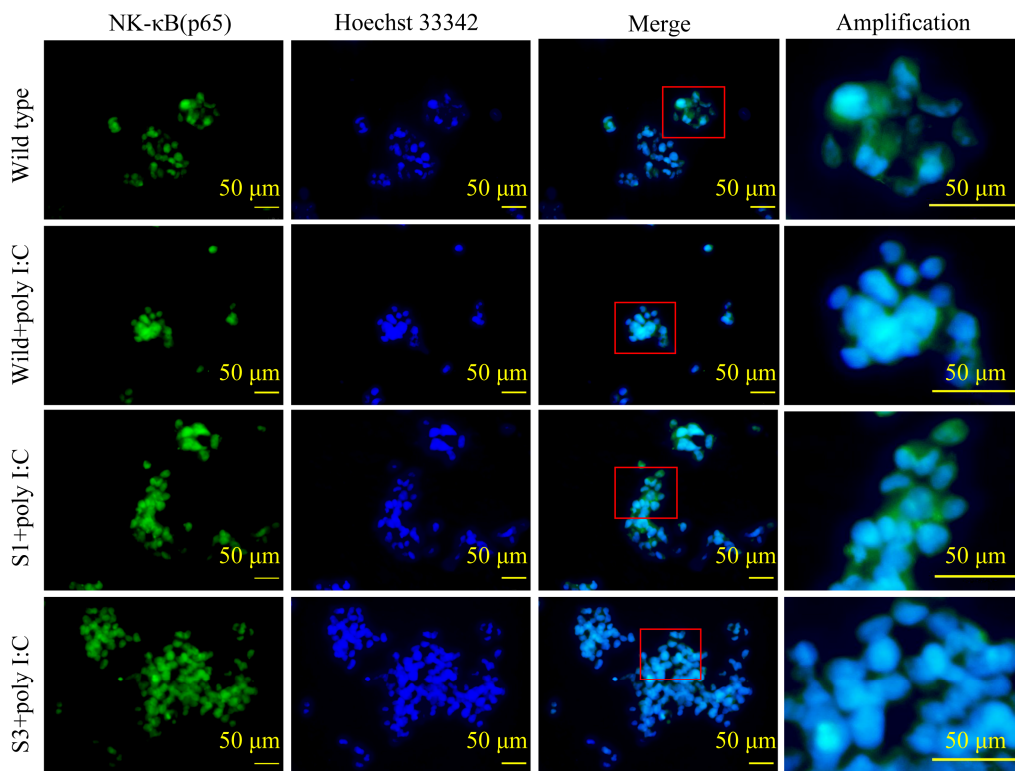


图 5 Poly I:C 转染对 HEK293 细胞 NF-κB(p65)蛋白质定位的影响 图中红框表示图片放大位置
Figure 5 Analysis of localization of NF-κB(p65) protein of HEK293 cells transfected with poly I:C. The red square indicates the amplification position.

2.3 *RIG-I* 基因敲除对 I 型干扰素信号通路相关因子的影响

野生型 HEK293 细胞和 *RIG-I* 基因敲除的细胞株 S1 和 S3 经 poly I:C 转染处理 24 h 后(图 4), 野生型细胞中 NF- κ B(p65)蛋白的表达与 S1 细胞株无显著差异, 但显著高于 S3 细胞株 ($P<0.05$)。poly I:C 转染处理 48 h 后(图 4), S3 细胞的 NF- κ B(p65)蛋白表达水平显著低于野生型和 S1 细胞株 ($P<0.05$)。免疫荧光分析结果表明, 野生型细胞的核外有 NF- κ B(p65)蛋白质存在, poly I:C 转染后, S1 细胞株核外 NF- κ B(p65)蛋白量明显多于野生型细胞和 S3 细胞株, 且野生型细胞和 S3 细胞株的 NF- κ B(p65)蛋白质分

布无明显差异(图 5)。荧光定量 PCR 结果(图 6)表明, poly I:C 转染 48 h 后, S1 和 S3 的 *MDA5* 基因和 *IFN β 1* 基因转录水平显著低于野生型细胞株 ($P<0.05$)。

2.4 细胞活力鉴定

细胞活力鉴定结果表明, S1 和 S3 细胞株的活力在 24 h 时显著高于野生型 ($P<0.05$), 但是在 48 h 时, 3 种细胞类型之间无显著差异。poly I:C 转染细胞 24 h 后, 降低了 HEK293 野生型细胞的活力, 也降低了 S1 和 S3 的细胞活力, 但是没有统计学差异。poly I:C 转染细胞 48 h 后, 显著降低了野生型细胞和 S1 细胞株的活力 ($P<0.05$), 但是不影响 S3 细胞株的活力(图 7)。

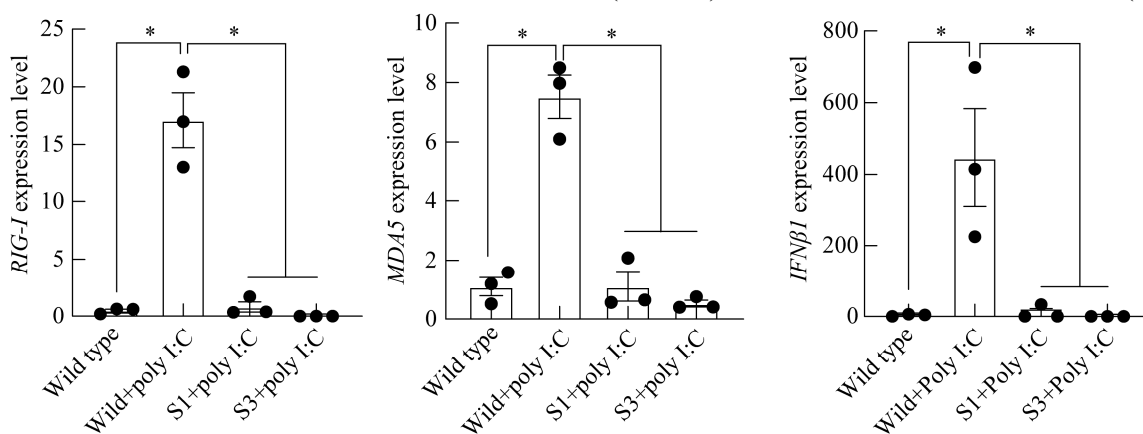


图 6 Poly I:C 转染 48 h 对 HEK293 细胞相关基因表达水平的影响

Figure 6 Gene expression level of HEK293 cells transfected with poly I:C for 48 h. *: $P<0.05$.

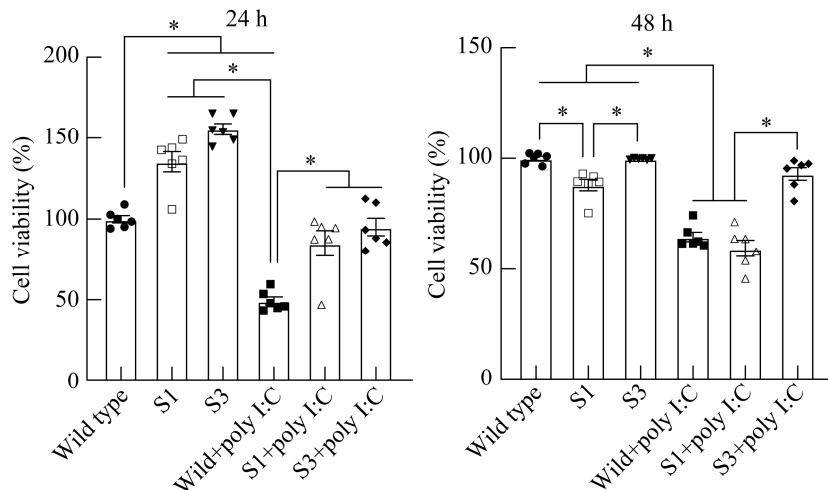


图 7 HEK293 的细胞活力

Figure 7 Viability of HEK293 cells. *: $P<0.05$.

3 讨论与结论

本实验设计的 sgRNA 的靶向位点为 *RIG-I* 基因的 Exon1 和 Exon4, 该 2 处位点是 *RIG-I* 基因 CARD 结构所在的位置, 对 *RIG-I* 功能起着关键的作用, 因此若该结构域基因有缺失, 则会阻断 *RIG-I* 信号转导通路。本实验结果证实了设计的 2 个 sgRNA 能够成功靶向这 2 个基因位点并对基因序列进行编辑并影响基因功能。田璐等^[10]也针对 *RIG-I* 基因的相同外显子设计了 sgRNA, 并成功获得了 *RIG-I* 基因敲除的细胞株。也有研究仅针对 Exon1 设计 sgRNA, 同样成功构建了 *RIG-I* 基因敲除的细胞株^[8-9]。

RIG-I 识别病毒的 dsRNA 并诱导 I 型干扰素的生成, 进而抑制病毒 dsRNA 的复制^[14]。本实验中 *RIG-I* 基因证实敲除以后, I 型干扰素生成通路中的 *IFN β 1* 和 *MDA5* 的基因转录水平均受到抑制, *IFN β 1* 为 β 干扰素基因, 转录水平的抑制意味着 β 干扰素生成可能也受到抑制。*MDA5* 和 *RIG-I* 都可以识别病毒 dsRNA 并发生构象上的改变, 其中 *RIG-I* 识别 5'-三磷酸 dsRNA 和短链 dsRNA, *MDA5* 识别长链 dsRNA^[5]。本实验中, *MDA5* 基因转录水平也受到 *RIG-I* 敲除的抑制, 该结果与 Yap 等^[15]的结果相一致, 该研究采用 5'-三磷酸 dsRNA 转染 *RIG-I* 基因敲除的 A549 细胞, 发现 *RIG-I* 敲除显著抑制了 *MDA5* 的基因转录水平。上述结果也表明 *RIG-I* 和 *MDA5* 在激活 I 型干扰素信号通路的过程中存在着关联作用, 而这种作用较为复杂并通过上下游的共同节点因子来实现^[16]。要全面地评价 *RIG-I* 基因敲除对 *MDA5* 的影响, 后续则需进一步从蛋白质水平上分析其变化情况。

核转录因子(NF- κ B)家族包括 5 个转录因子: P50、P52、P65、RelB 和 c-Rel^[17-18]。一些刺激物会诱导 NF- κ B 的激活, 包括病原微生物

的衍生物、炎症细胞因子和酶类^[19]。静息状态下, 细胞质中的 I κ B 因子抑制 NF- κ B 的活性, 当上游信号激活 I κ B 激酶(I κ B kinase, IKK)后, 活化的 IKK 介导 I κ B 泛素化和磷酸化, 使得 NF- κ B 的 2 个转录因子 P50 和 P65 活化, 形成二聚体, 并从细胞质转移到细胞核内, 调节促炎因子和趋化因子的产生^[7,20]。本实验中, poly I:C 转染后, S3 细胞株的 NF- κ B(p65)蛋白水平的表达低于野生型 HEK293 细胞, 说明 S3 细胞株 *RIG-I* 基因敲除对 NF- κ B(p65)蛋白的生成产生抑制作用, 敲除 *RIG-I* 基因对 NF- κ B(p65)蛋白的表达产生抑制, 这一结果也在田璐等^[10]的研究中得到证实, 但是否影响下游的促炎因子和趋化因子的产生, 还需要进一步分析 *RIG-I* 基因敲除对 NF- κ B(p65)磷酸化和入核的影响。本实验中, S3 细胞株在转染 poly I:C 后, NF- κ B(p65)均在细胞核区域出现, 表明 S3 细胞株的 *RIG-I* 基因敲除对于 NF- κ B(p65)进入细胞核并无明显的影响, 与之相反, S1 细胞株在转染 poly I:C 后, 有部分 NF- κ B(p65)蛋白质在细胞质中发现, 说明 S1 细胞株的 *RIG-I* 基因敲除抑制了 NF- κ B(p65)进入细胞核, 可能会抑制通路下游相关促炎因子和趋化因子的生成。Poly I:C 转染后, S1 和 S3 细胞株在 NF- κ B(p65)蛋白的生成和进入细胞核方面存在着差异的原因较为复杂, 需要后续进一步的实验来进行验证, 但或许与 2 个 sgRNA (hRIG-I-sgRNA1 和 hRIG-I-sgRNA3)靶向 *RIG-I* 基因的位置(图 1)有关, hRIG-I-sgRNA1 靶向位点为第 5 197 个核苷酸, 而 hRIG-I-sgRNA3 的靶向位点为第 38 834 个核苷酸, 理论上, 经过 hRIG-I-sgRNA3 编辑以后, 前端的 38 834 个核苷酸仍然能翻译成截短的 *RIG-I* 蛋白, 截短的 *RIG-I* 蛋白可能保留着部分功能, 这些功能与调控 NF- κ B(p65)进入细胞核有关。而经过 hRIG-I-sgRNA1 编辑以后, 前端的 5 197 个核苷酸

只能翻译成由少量氨基酸构成的截短的 RIG-I 蛋白, 该蛋白质可能失去了调控 NF- κ B(p65)进入细胞核的活性, 因此, 导致 S1 细胞株在转染 poly I:C 后, 部分 NF- κ B(p65)蛋白质仍存在于细胞质中。

细胞活力结果表明在 poly I:C 转染处理 48 h 后, 野生型细胞和 S1 细胞的活力显著降低, 但是 S3 细胞活力不受影响。细胞活力指标的下降表明细胞分化的抑制和细胞凋亡的增加。RIG-I 在激活 I 型干扰素信号通路的同时, 具有促进受病毒感染细胞凋亡作用^[21], 近来的研究表明, RIG-I 在细胞核内与嘌呤嘧啶核酸内切酶 1 (apurinic/apyrimidinic endodeoxyribonuclease 1, APEX1) 的前 20 个氨基酸互作, 抑制 APEX1 的抗凋亡作用, 从而促进的凋亡^[22]。这也意味着 *RIG-I* 基因敲除的细胞, 当感染病毒时, 可能不会出现明显的凋亡现象。Prokhorova 等^[23]证实当甲型流感病毒(influenza A virus, IAV)感染 *RIG-I* 敲除的 A549 细胞时, 细胞活力不受影响, 但是对照组 A549 细胞活力却显著降低, 这证实了 RIG-I 对于细胞凋亡的调节作用。该结果与本实验中 S3 株的细胞活力结果相一致, 表明 S3 细胞缺少 RIG-I 的调节, 符合 RIG-I 调节功能缺失细胞的特征。但是 S1 的细胞活力仍然受 poly I:C 转染影响的原因需进一步确认, 可能同样也是因为 hRig-I-sgRNA1 和 hRig-I-sgRNA3 靶向 *RIG-I* 基因位置的不同, 从而引起敲除效果的差异。

综上所述, 本实验通过 CRISPR/Cas9 系统成功构建了 2 株 *RIG-I* 基因敲除的 HEK293 细胞; 证实了 *RIG-I* 基因敲除抑制了 *MDA5* 和 *IFN β 1* 基因转录水平, 抑制核转录因子 NF- κ B(p65)蛋白的表达和进入细胞核, 并对细胞活力产生影响。

REFERENCES

- [1] WRIGHT AV, NUÑEZ JK, DOUDNA JA. Biology and applications of CRISPR systems: harnessing nature's toolbox for genome engineering[J]. Cell, 2016, 164(1/2): 29-44.
- [2] SINGH A, CHAKRABORTY D, MAITI S. CRISPR/Cas9: a historical and chemical biology perspective of targeted genome engineering[J]. Chemical Society Reviews, 2016, 45(24): 6666-6684.
- [3] LI SJ, YANG J, ZHU YY, WANG H, JI XY, LUO J, SHAO Q, XU YL, LIU XL, ZHENG WL, MEURENS F, CHEN NH, ZHU JZ. Analysis of porcine RIG-I like receptors revealed the positive regulation of RIG-I and MDA5 by LGP2[J]. Frontiers in Immunology, 2021, 12: 609543.
- [4] SCHLEE M, HARTMANN G. Discriminating self from non-self in nucleic acid sensing[J]. Nature Reviews Immunology, 2016, 16: 566-580.
- [5] TAKEUCHI O, AKIRA S. Pattern recognition receptors and inflammation[J]. Cell, 2010, 140(6): 805-820.
- [6] HOU FJ, SUN LJ, ZHENG H, SKAUG B, JIANG QX, CHEN ZJ. MAVS forms functional prion-like aggregates to activate and propagate antiviral innate immune response[J]. Cell, 2011, 146(3): 448-461.
- [7] BELGNAOUI SM, PAZ S, HISCOTT J. Orchestrating the interferon antiviral response through the mitochondrial antiviral signaling (MAVS) adapter[J]. Current Opinion in Immunology, 2011, 23(5): 564-572.
- [8] 许曼, 黄立平, 邵玉乐, 夏德利, 曾为俊, 王辉, 鲁国涛, 刘长明, 陈洪岩, 王金泉, 孟庆文. 敲除 RIG-I 基因的 PK-15 细胞系的建立及 RIG-I 对猪圆环病毒 2 型感染的作用[J]. 中国动物传染病学报, 2019, 27(5): 14-21.
XU M, HUANG LP, SHAO YL, XIA DL, ZENG WJ, WANG H, LU GT, LIU CM, CHEN HY, WANG JQ, MENG QW. Establishment of PK-15 cell line via knockout of *RIG-I* gene and evaluation of porcine circovirus type 2 infection[J]. Chinese Journal of Animal Infectious Diseases, 2019, 27(5): 14-21 (in Chinese).
- [9] 曾为俊, 许曼, 王辉, 鲁国涛, 邵玉乐, 陈洪岩, 刘建华, 孟庆文. 敲除 RIG-I 基因流感病毒高产 MDCK 细胞系的建立及功能研究[J]. 中国家禽, 2019, 41(11): 12-17.
ZENG WJ, XU M, WANG H, LU GT, SHAO YL, CHEN HY, LIU JH, MENG QW. Establishment and functional study of *RIG-I* gene knockout influenza virus high-yield MDCK cell line[J]. China Poultry, 2019, 41(11): 12-17 (in Chinese).
- [10] 田璐, 焦鹏涛, 侯力丹, 李芸, 宋正宇, 刘文军, 范文辉, 孙蕾. *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[J]. 生物工程学报, 2020, 36(1): 109-121.
- TIAN L, JIAO PT, HOU LD, LI Y, SONG ZY, LIU WJ, FAN WH, SUN L. Establishment of *RIG-I* knockout 293T cell line and its effect on the replication of influenza B virus[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2020, 36(1): 109-121 (in Chinese).
- [11] MALPOTRA S, VATS A, KUMAR S, GAUTAM D, de S. Generation of genomic deletions (of *Rig-I* gene) in goat primary cell culture using CRISPR/CAS9 method[J]. Animal Biotechnology, 2018, 29(2): 142-152.
- [12] 陈姿亦, 何盛盛, 闫晶男, 吴怡蓉, 张雨婷, 高有领. 宽体金线蛭提取物对 HEK293 细胞维甲酸诱导基因蛋白样受体(RLRs)通路的影响[J]. 浙江农业学报, 2023, 35(12): 2830-2843.
- CHEN ZY, HE SS, YAN JN, WU YR, ZHANG YT, GAO YL. Extract of *Whitmania pigra* on the retinoic acid-inducible gene I-like receptors (RLRs) signaling pathway of HEK293 cell[J]. Acta Agriculturae Zhejiangensis, 2023, 35(12): 2830-2843 (in Chinese).
- [13] STEPHENSON FH. Calculations for Molecular Biology and Biotechnology a Guide to Mathematics in the Laboratory[M]. 2nd ed. Amsterdam: Elsevier/Academic Press, 2010.
- [14] XU XX, WAN H, NIE L, SHAO T, XIANG LX, SHAO JZ. RIG-I: a multifunctional protein beyond a pattern recognition receptor[J]. Protein & Cell, 2018, 9(3): 246-253.
- [15] YAP GLR, SACHAPHIBULKIJ K, FOO SL, CUI JZ, FAIRHURST AM, LIM LHK. Annexin-A1 promotes RIG-I-dependent signaling and apoptosis *via* regulation of the IRF3-IFNAR-STAT1-IFIT1 pathway in A549 lung epithelial cells[J]. Cell Death & Disease, 2020, 11: 463.
- [16] BRISSE M, LY H. Comparative structure and function analysis of the RIG-I-like receptors: rig-I and MDA5[J]. Frontiers in Immunology, 2019, 10: 1586.
- [17] TANG Y, WANG C, CHEN SS, LI L, ZHONG X, ZHANG J, FENG YL, WANG L, CHEN J, YU MD, WANG F, WANG L, LI GS, HE YR, LI Y. Dimethyl fumarate attenuates LPS induced septic acute kidney injury by suppression of NF κ B p65 phosphorylation and macrophage activation[J]. International Immunopharmacology, 2022, 102: 108395.
- [18] YUE PJ, JING LJ, ZHAO XY, ZHU HC, TENG JF. Down-regulation of taurine-up-regulated gene 1 attenuates inflammation by sponging miR-9-5p *via* targeting NF- κ B1/p50 in multiple sclerosis[J]. Life Sciences, 2019, 233: 116731.
- [19] BASAK S, KIM H, KEARNS JD, TERGAONKAR V, O'DEA E, WERNER SL, BENEDICT CA, WARE CF, GHOSH G, VERMA IM, HOFFMANN A. A fourth IkappaB protein within the NF-kappaB signaling module[J]. Cell, 2007, 128(2): 369-381.
- [20] CHEN LL, DENG HD, CUI HM, FANG J, ZUO ZC, DENG JL, LI YL, WANG X, ZHAO L. Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs[J]. Oncotarget, 2017, 9(6): 7204-7218.
- [21] REHWINKEL J, GACK MU. RIG-I-like receptors: their regulation and roles in RNA sensing[J]. Nature Reviews Immunology, 2020, 20: 537-551.
- [22] WANG C, ZHOU WK, LIU Y, XU Y, ZHANG X, JIANG CY, JIANG MH, CAO XT. Nuclear translocation of RIG-I promotes cellular apoptosis[J]. Journal of Autoimmunity, 2022, 130: 102840.
- [23] PROKHOROVA D, ZHUKOVA ESCHENKO N, LEMZA A, SERGEEVA M, AMIRKHANOV R, STEPANOV G. Application of the CRISPR/Cas9 system to study regulation pathways of the cellular immune response to influenza virus[J]. Viruses, 2022, 14(2): 437.

(本文责编 郝丽芳)