

密级:

论文编号:



中国农业科学院

学位论文

具有高效基因编辑能力的 MDBK 细胞系的构建

硕 士 研 究 生: 沃莉婧

学 号: 82101212419

指 导 教 师: 尹鑫

申 请 学 位 类 别: 农学硕士

专 业: 预防兽医学

研 究 方 向: 动物传染病病原学与流行病学

培 养 单 位: 哈尔滨兽医研究所

研究生院

2024 年 6 月

Secrecy:

No.

Chinese Academy of Agricultural Sciences Thesis

Development of an Engineered MDBK Cell Line for Enhanced Gene Editing Capabilities

Candidate: Wo Lijing

Student ID: 82101212419

Supervisor: Professor Yin Xin

**Degree Type: Master of Science in Preventive
Veterinary Medicine**

Major: Preventive Veterinary Medicine

**Research Field: Etiology and Epidemiology for
Animal Infectious Diseases**

Institution: Harbin Veterinary Research Institute

Graduate School

June 2024

摘 要

牛肾细胞 (MDBK) 是少有的牛传代细胞系, 对如牛病毒性腹泻病毒 (BVDV)、牛传染性鼻气管炎病毒 (IBRV)、牛副流感病毒 3 型 (BPIV-3)、牛结节性皮肤病病毒 (LSDV) 等多种病毒易感, 是用于牛病毒性传染病病原的分离和鉴定, 及研究病毒与细胞互作的良好模型。然而, 由于 MDBK 细胞体外转染效率低, 很大程度上限制了人们探究宿主蛋白对病毒生命周期的影响。近年来, 基于人类免疫缺陷病毒 (HIV) 的慢病毒已被广泛应用于哺乳动物的基因编辑, 其优势在于可以实现外源基因在细胞中的稳定表达, 适用于分裂细胞和非分裂细胞高通量基因功能的研究。因此, 慢病毒感染的方式越来越多的被用于构建目的基因稳定过表达或敲除的细胞系, 以研究目的蛋白对病毒生命周期的影响。然而, 在使用慢病毒感染 MDBK 细胞的过程中, 人们发现 MDBK 细胞的慢病毒转导效率也非常低。这可能是由于在牛源细胞中的 TRIM5 α 蛋白可以通过与慢病毒衣壳蛋白相互作用, 促进慢病毒解聚, 从而限制慢病毒的感染等。

在本研究中, 我们首先通过 siRNA 对 MDBK 细胞中的慢病毒限制因子 TRIM5 α 进行敲降, 发现 TRIM5 α 的敲降可以明显提升基于 HIV-1 的慢病毒在 MDBK 细胞中的转导效率。在此过程中, 为了对细胞内的 TRIM5 α 蛋白表达进行鉴定, 我们制备了牛源 TRIM5 α 兔多克隆抗体, 发现制备抗体具有良好反应原性。进一步, 我们构建了诱导型 Cas9 过表达的 MDBK 细胞系 (MDBK-iCas9), 以适用于 CRISPR/Cas9 介导的基因编辑系统。在此基础上, 我们通过结合 sgRNA 转染和单克隆细胞分选, 在没有额外基因组插入的前提下构建了 TRIM5 α 敲除的 MDBK 细胞系 (MDBK-iCas9^{TRIM5 α -/-})。我们发现, 与亲本细胞相比, HIV-1 慢病毒在 MDBK-iCas9^{TRIM5 α -/-} 细胞中表现出了更强的感染性, 而两种细胞株对几种牛病毒的易感性相似。值得注意的是, 亲环蛋白 A (CypA) 的免疫抑制剂环孢菌素 A (CsA), 可通过竞争性阻断 CypA-CA 的相互作用, 降低猴细胞中 CypA 对 HIV-1 的限制作用, 从而提高 HIV-1 的感染。与之相似的, 在 TRIM5 α 敲除和 MDBK 细胞中使用 CsA 处理均可以显著恢复 HIV-1 的感染, 这表明 CsA 的处理与 TRIM5 α 的敲除可以协同促进慢病毒在 MDBK 细胞中的转导。综上所述, 本研究为基因编辑 MDBK 细胞提供了一种很有前途的基因工程策略, 有助于克服牛病毒及其宿主细胞之间相互作用研究中的重大障碍。所构建的细胞系为体外研究牛源病原体 and 宿主的互作提供了一个方便的模型。

关键词: 牛肾细胞, CRISPR/Cas9, TRIM5 α

Abstract

MDBK cells are a rare bovine cell line that can be infected by various viruses such as bovine viral diarrhea virus (BVDV), infectious bovine rhinotracheitis virus (IBRV), bovine parainfluenza virus type 3 (BPIV-3), and bovine sarcomatous dermatosis virus (LSDV). Currently, they are widely used for the isolation and identification of viral pathogens in bovine viral infectious diseases and can also serve as a useful model for studying the interaction between bovine viruses and host cells. However, the transfection efficiency in MDBK cells is low, which greatly limits the exploration of the impact of host proteins on the life cycle of bovine viruses. In recent years, lentiviruses transduction based on human immunodeficiency virus (HIV) have been widely used in gene editing in mammalian cells given the advantage of stably expression of foreign genes in transduced cells, which is suitable for the investigation of host gene functions in dividing and non-dividing cells. Therefore, utilization of lentiviral transduction is increasingly being used to construct cell lines with stable overexpression or knockout of target genes to study the impact of target proteins on the viral life cycles. However, it was found that the transduction efficiency in MDBK cells by lentivirus was also limited. This may be due to the fact that TRIM5 α protein in bovine cells could promote lentivirus depolymerization by interacting with lentivirus capsid proteins, thereby limiting the infection of lentivirus.

In this study, we firstly knocked down the lentiviral restriction factor TRIM5 α in MDBK cells by siRNA, and found that depletion of TRIM5 α in MDBK cells can significantly enhance the transduction efficiency of HIV-1-based lentivirus in MDBK cells. In addition, to identify the expression of TRIM5 α protein in cells, we generated rabbit anti-TRIM5 α polyclonal antibodies. Next, we constructed an inducible Cas9 protein overexpression MDBK cell line (MDBK-iCas9) which suitable for CRISPR/Cas9-mediated gene editing. On this basis, we constructed a *TRIM5 α* knockout MDBK cell line (MDBK-iCas9^{*TRIM5 α* -/-}) by combining sgRNA transfection and single-cell cloning without any additional genomic insertion. We found that compared to parental cells, MDBK-iCas9^{*TRIM5 α* -/-} cells showed greater permissiveness to HIV-1 lentiviral infection, while the susceptibility of both cell lines to several bovine viruses was similar. Notably, the immunosuppressant cyclosporine A (CsA), an inhibitor of CypA, can reduce the restriction of HIV-1 by competitive blocking the CypA-CA interaction in monkey cells, thereby increasing the infectivity of HIV-1. Similarly, in both *TRIM5 α* knockout and MDBK cells, CsA treatment can significantly restore the infectivity of HIV-1, suggesting that cyclosporine A treatment and *TRIM5 α* knockout can synergistically promote lentiviral transduction in MDBK cells. In summary, this study provides a promising genetic engineering strategy for bovine cells that can overcome major obstacles in the interaction between bovine viruses and their host cells. The constructed cell line provides a convenient model for studying the interaction between pathogens and hosts in vitro.

Keywords: MDBK, CRISPR/Cas9, TRIM5 α

目 录

第一章 绪论.....	1
1.1 MDBK 细胞概述.....	1
1.2 CRISPR/Cas9 基因编辑技术.....	1
1.2.1 基因编辑技术概述.....	1
1.2.2 CRISPR/Cas9 介导的基因编辑.....	2
1.2.3 CRISPR/Cas9 系统的递送载体.....	3
1.3 慢病毒和慢病毒载体.....	3
1.3.1 慢病毒.....	3
1.3.2 HIV-1 的蛋白与功能.....	4
1.3.3 基于 HIV-1 的慢病毒载体.....	5
1.4 TRIM5 α 蛋白概述.....	6
1.4.1 TRIM5 α 蛋白的发现.....	6
1.4.2 TRIM5 α 蛋白结构与功能.....	7
1.4.3 TRIM5 α 的抗病毒机制.....	7
1.5 研究目的与意义.....	8
第二章 TRIM5 α 蛋白的表达,纯化及其多抗制备	9
2.1 实验材料.....	9
2.1.1 细胞、病毒和质粒载体.....	9
2.1.2 实验试剂.....	9
2.1.3 仪器设备.....	9
2.2 实验方法.....	9
2.2.1 总 RNA 的提取和反转录.....	9
2.2.2 质粒构建.....	10
2.2.3 TRIM5 α 重组蛋白的制备及鉴定.....	10
2.2.4 动物免疫.....	10
2.2.5 抗体纯化.....	11
2.2.6 Western blot 检测.....	11
2.3 结果.....	11
2.3.1 TRIM5 α 蛋白的表达与纯化.....	11
2.3.2 TRIM5 α 抗体的 Western blot 检测结果	11
2.4 讨论.....	12
第三章 具有高效基因编辑能力的 MDBK 细胞系的构建和鉴定	14
3.1 实验材料.....	14
3.1.1 细胞、病毒和质粒载体.....	14

3.1.2 实验试剂.....	14
3.1.3 仪器设备.....	14
3.2 实验方法.....	14
3.2.1 siRNA 的转染.....	14
3.2.2 实时荧光定量 PCR 检测.....	15
3.2.3 质粒构建.....	15
3.2.4 慢病毒的包装及感染.....	15
3.2.5 荧光素酶报告基因的检测.....	16
3.2.6 Cas9 过表达细胞系的筛选.....	16
3.2.7 sgRNA 有效性的鉴定.....	16
3.2.8 TRIM5 α 敲除细胞系的筛选.....	17
3.2.9 细胞系的测序鉴定.....	17
3.2.10 细胞系的 Western blot 鉴定.....	18
3.2.11 细胞活性检测.....	18
3.3 结果.....	18
3.3.1 敲降 TRIM5 α 可以提高基于 HIV-1 的慢病毒的转导效率.....	18
3.3.2 诱导型 Cas9 过表达细胞系的构建与鉴定.....	19
3.3.3 真核表达 TRIM5 α 蛋白及 sg RNA 有效性鉴定.....	20
3.3.4 TRIM5 α 敲除的 MDBK-i Cas9 细胞系的筛选与鉴定.....	21
3.4 讨论.....	22
第四章 具有高效基因编辑能力的 MDBK 细胞系的应用.....	24
4.1 实验材料.....	24
4.1.1 细胞、病毒和质粒载体.....	24
4.1.2 实验试剂.....	24
4.1.3 仪器设备.....	24
4.2 实验方法.....	24
4.2.1 慢病毒感染.....	24
4.2.2 基于 MDBK-iCas9 ^{TRIM5α-/-} 的 A 基因敲除细胞系的构建.....	24
4.2.3 基于 MDBK-iCas9 ^{TRIM5α-/-} 的 A 基因敲除细胞系的测序鉴定.....	25
4.2.4 其它 MDBK 细胞易感病毒感染 MDBK-iCas9 ^{TRIM5α-/-} 细胞.....	25
4.2.5 间接免疫荧光检测.....	25
4.2.6 实时荧光定量 PCR 检测.....	25
4.3 结果.....	26
4.3.1 TRIM5 α 敲除提高了慢病毒的转导效率.....	26
4.3.2 MDBK-iCas9 ^{TRIM5α-/-} 细胞具有更高的基因编辑效率.....	28
4.3.3 TRIM5 α 敲除对其它 MDBK 易感病毒的感染性没有显著影	

响	29
4.4 讨论	29
第五章 结论	31
参考文献	32

主要符号对照表

英文缩写	英文全称	中文名称
AAV	Adeno-associated virus	腺病毒相关病毒
BHV-1	Bovine herpesvirus 1	牛疱疹病毒一型
BVDV	Bovine viral diarrhea virus	牛病毒性腹泻病毒
BPIV3	Bovine parainfluenza virus 3	牛副流感三型
CypA	Cyclophilin A	亲环蛋白 A
FIV	Feline immunodeficiency virus	猫免疫缺陷病毒
HEK-293T	Human embryonic kidney 293T	人胚胎肾细胞
HIV-1	Human immunodeficiency virus-1	人类免疫缺陷病毒
JSRV	Jaagsiekte sheep retrovirus	绵羊肺腺瘤病毒
LV	Lentivirus	慢病毒
MDBK	Madin-Darby bovine kidney cells	牛肾细胞
SIV	Simian immunodeficiency virus	灵长类慢病毒
TRIM5 α	tripartite motif protein 5 α	三重基序蛋白

第一章 绪论

1.1 MDBK 细胞概述

牛肾细胞 (Madin darby bovine kidney, MDBK) 是牛少有的传代细胞系, 能被多种病毒如牛病毒性腹泻病毒 (Bovine viral diarrhea virus, BVDV), 牛传染性鼻气管炎病毒 (Infectious Bovine rhinotracheitis virus, IBRV), 牛副流感病毒 3 型 (Bovine parainfluenza virus-3, BPIV-3), 牛结节性皮肤病病毒 (Bovine lump skin disease virus, LSDV) 等感染, 目前被大量用于牛病毒性传染病病原的分离和鉴定, 同时可以作为研究病毒与细胞互作的良好模型。然而已有研究发现, MDBK 细胞的转染效率非常低 (OSORIO and BIONAZ, 2017), 这对于通过转染等方式对目的基因进行过表达或降低表达从而实现对病毒与宿主相互作用的研究造成了阻碍。近年来, 人们尝试通过 CRISPR/Cas9 技术对 MDBK 细胞进行基因编辑, 以实现目的基因的稳定敲除/过表达。然而, 基于质粒转染方式的 CRISPR/Cas9 技术由于低转染效率, 成功率很低; 基于慢病毒感染方式的 CRISPR/Cas9 技术由于慢病毒在 MDBK 细胞上的低转导效率, 成功率也很低。这种低转染效率和低转导效率对牛易感病毒和宿主细胞蛋白互作的体外研究造成了巨大阻碍。

1.2 CRISPR/Cas9 基因编辑技术

1.2.1 基因编辑技术概述

随着高通量测序技术和生物信息学的快速发展, 研究人员在基因功能定位方面取得了长足的进步。然而, 研究人员当前面临的一个主要挑战是如何揭示基因影响表型具体分子的机制。其中, 阐明某一基因功能的最好方式是在细胞或生物体中降低或提高其表达, 进而研究该改变对表型的影响。(BANGA and BOYD, 1992; GLOOR et al., 1991; RONG and GOLIC, 2000)。自上个世纪起, 基因编辑工具就随着科学家的探索不断更新迭代。随着 1996 年出现的锌指核酸酶基因编辑技术 (Zinc-finger nucleases, ZFN), 到 2009 年的类转录激活因子效应物核酸酶基因编辑技术 (Transcription activator-like effector nucleases, TALEN), 再到 2013 年, 一种名为“成簇的规律间隔的短回文重复序列系统”(Clustered regularly interspersed short palindromic repeats, CRISPR/Cas9) 的新基因编辑方法出现, 将基因编辑技术推向了高潮。ZFN 是广泛应用的工程核酸酶之一 (BHAKTA et al., 2013; CATHOMEN and KEITH JOUNG, 2008; GONZALEZ et al., 2010; KIM et al., 2011; KIM et al., 1996)。ZFNs 包含一种共有的 Cys2-His2 DNA 结合结构域和一个 FokI 限制性核酸内切酶的 DNA 切割结构域 (KIM et al., 1996), 通过核酸内切酶对 DNA 进行切割。同样使用蛋白介导 DNA 切割的还包括 TALEN 基因编辑技术 (BOCH et al., 2009; BRIGGS et al., 2012; CERMAK et al., 2011; DENG et al., 2012; MOSCOU and BOGDANOVE, 2009; REYON et al., 2012; SCHMID-BURGK et al., 2013)。TALENs 在植物病原菌黄单胞菌的天然蛋白中被发现, 其 DNA 结合域由 33-35 个保守的氨基酸重复序列组成, 每个重复序列都能识别非特异性核苷酸; 通过对其进行编辑, TALENs 可以靶向特异性的 DNA 序列。而最新出现的 CRISPR/Cas9 为基因编辑技术提供了更便捷的方法。与蛋白质引导的 ZFN 和 TALEN 的 DNA 切割不同, CRISPR/Cas9 系统依

赖于小 RNA 进行序列特异性切割 (JINEK et al., 2012)。该技术只需要对目标 RNA 序列进行编辑, 就可以实现基因编辑。由于 CRISPR/Cas9 技术的快捷性和便利性, 该技术已被有效的用于多种用途, 例如基因敲除/过表达、染色体位点的活细胞标记和高通量基因筛选等。

1.2.2 CRISPR/Cas9 介导的基因编辑

在细菌和古细菌中, CRISPR/Cas 被发现是一种基于 CRISPR RNA (crRNA) 的 DNA 识别和 Cas 核酸酶介导的 DNA 切割, 在细菌内, 该系统是用于对抗病毒和噬菌体的获得性免疫系统 (GRISSA et al., 2007)。CRISPR 基因座由一系列保守的重复序列组成, 这些序列由不同的非重复序列间隔, 称为间隔区。在 CRISPR/Cas 系统中, 入侵的外源 DNA 被 Cas 核酸酶加工成小 DNA 片段, 然后作为间隔物插入间隔区。再次被该病毒或噬菌体感染时, 细菌以间隔物为转录模板产生 crRNA, 引导核酸酶切割入侵的病毒和噬菌体的靶序列, 从而抵抗该病毒或噬菌体的感染。

与细菌抗病毒和噬菌体原理相似, CRISPR/Cas9 介导的基因编辑依赖于双链断裂 (Double-strand break, DSB) 的产生和随后的细胞 DNA 修复过程。在内源性 CRISPR/Cas9 系统中, 成熟的 crRNA 与反式激活的 crRNA (Transactivating crRNA, TracrRNA) 被转录出来, 组成了双链 RNA 并与 Cas9 编码蛋白组装成一个复合体。该复合体将定位至含有前间隔序列邻近基序 (Protospacer adjacent motif, PAM) 靶位点。与靶位点结合后, Cas9 蛋白对 DNA 进行切割。这种切割所产生的 DSB 将触发细胞 DNA 修复过程, 包括非同源末端连接 (Nonhomologous end-joining, NHEJ) 介导的 DNA 修复 (GRATZ et al., 2013)。该修复方式可以快速连接断裂的双链 DNA, 但会产生小插入和基因突变, 这些插入或突变会破坏或消除靶基因或基因组元件的功能 (如图 1-1)。与 ZFN 和 TALEN 方式需要蛋白质引导 DNA 切割的复杂和耗时的步骤相比, CRISPR/Cas9 只需要一个短的可编程的 gRNA, 具有相对便宜且易于设计和生产的特点。同时, 通过使用具有不同靶位点的多个 gRNA, CRISPR/Cas9 能够在多个独立位点同时诱导基因编辑 (CONG et al., 2013)。

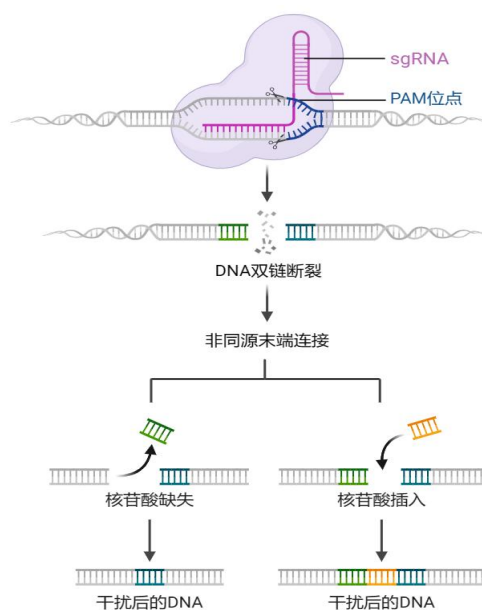


图 1-1 CRISPR/Cas9 介导的基因编辑 (图片绘自网站 <https://www.biorender.com/>)

Fig. 1-1 CRISPR/cas9 mediated gene editing (picture drawn from the website <https://www.biorender.com/>)

1.2.3 CRISPR/Cas9 系统的递送载体

将 CRISPR/Cas9 复合体递送到细胞内的目的基因区域是实现 CRISPR/Cas9 系统功能行使的前提。将 Cas9 引入细胞内或动物体内后,必须将其递送至细胞核内,同时避免被细胞内或体内的保护机制所清除或降解。选择合适的递送载体可提高在这些阶段中 CRISPR/Cas9 复合体的递送效率。目前常用的几种递送方式可分为病毒载体和非病毒载体两类。

病毒载体在入侵细胞和诱导宿主非天然蛋白质表达方面有非常大的优势 (KAY et al., 2001)。由于慢病毒可以感染分裂细胞和非分裂细胞,且能够将其基因组整合到宿主基因组中的特性,使得慢病毒载体在病毒载体中非常有优势。慢病毒载体可以在多种细胞类型中提供有效的细胞转导,并缩短细胞转染所需要的培养时间 (NALDINI, 2011)。与另一种常见的病毒载体腺病毒载体 (Adeno-associated virus, AAV) 相比,慢病毒载体拥有 10 kb 的承载能力和基因持续表达能力 (CONSIGLIO et al., 2001; GENTNER et al., 2009; NALDINI et al., 2016)。在用于体外转导时,慢病毒在临床研究中已被证明优于其它载体。两种基于慢病毒的体外基因疗法 Kymriah 和 Zynteglo 已经分别获得了美国食品和药物管理局 (Food and drug administration, FDA) 和欧洲药品管理局 (European medicines agency, EMA) 的批准 (HIGH, 2020)。目前,慢病毒载体已经被广泛应用于 CRISPR/Cas9 系统介导的基因编辑中。

非病毒载体主要包括物理递送和化学递送两种方式。物理递送方式主要是体外使用的递送方式,通过破坏如阻碍 CRISPR/Cas9 复合体到达目的基因的物理屏障。这种破坏是通过将细胞暴露于温和的物理条件中以暂时在细胞膜上打开用于进入的通道。其中,电穿孔是一种在细胞膜上施加强电场的技术。这种技术能够暂时重组细胞膜,增加的渗透性能够使原本被细胞膜排斥的大生物分子得以通过。这种技术已经在体外应用中成功的传递了 DNA、RNA 甚至 RNPs (HASHIMOTO and TAKEMOTO, 2015; KIM et al., 2014; NELSON et al., 2016)。然而,这种方式不适用于治疗病人,同时,这种方式也不适用于肌肉和神经细胞等容易对电脉冲产生反应的细胞类型。因而,这种方式仅适用于部分体外实验。

化学递送方式分为两种,一种是对递送物进行化学修饰,如在递送前对蛋白质添加核定位序列 (Nuclear localization sequences NLSs),使递送物能够达到细胞核中;另一种方式是使用脂质体等物质对递送物进行包裹,从而保护递送物免受酶降解或免疫反应的降解 (LI et al., 2017; ZURIS et al., 2015)。化学递送方式在实验室的体外实验中非常常见,但它们通常不具有良好的扩展性,因此不适用于高通量应用或体内传递。

1.3 慢病毒和慢病毒载体

1.3.1 慢病毒

随着人类免疫缺陷病毒 (Human immunodeficiency virus-1, HIV-1) 作为人类艾滋病病原体的发现,慢病毒 (Lentivirus, LV) 也逐渐成为研究最为深入的病毒之一。慢病毒属于逆转录病毒科慢病毒属成员,所有慢病毒感染宿主后都具有许多共同的临床特征:潜伏期长、持续时间长等。根据对不同宿主细胞的趋向性,慢病毒主要被分为两类:第一类是以马传染性贫血病病毒 (Equine

infectious anaemia virus, EIAV)、绵羊肺腺瘤病毒 (Jaagsiekte sheep retrovirus, JSRV) 等为代表的慢病毒。该类慢病毒主要在巨噬细胞中复制；另一类是能够感染人类，猿猴等动物的慢病毒，该类慢病毒主要在淋巴细胞和巨噬细胞中复制。尽管两种病毒的细胞嗜性不同，但感染和发病机制却非常相似 (CLEMENTS and ZINK, 1996)。

慢病毒的感染过程主要分为四个步骤：第一步是病毒侵入，即慢病毒通过识别细胞上的特异性受体蛋白如 CD4 或共受体通过膜融合的方式进入易感细胞 (DALGLEISH et al., 1984)；第二步是反转录与整合。在慢病毒侵入细胞后，衣壳和核衣壳蛋白在细胞质中因脱壳作用而解离，病毒核酸在由基质蛋白 (p17)、逆转录酶、整合酶 Vpr 组成的整合前复合物 (Preintegration complex, PIC) (MILLER et al., 1997) 介导下合成病毒 DNA 后主动输入细胞核，并整合到宿主基因组中。第三步是转录和翻译。整合后的病毒 DNA 类似于其他多外显子细胞基因，并利用宿主细胞机制进行复制、表达和蛋白质翻译。第四步是病毒的组装和释放，即病毒 RNA 与翻译的蛋白组装为新病毒，并通过出芽的方式释放 (PUFFER et al., 1997)。在多种慢病毒中，目前被研究的最多的即为 HIV-1。

1.3.2 HIV-1 的蛋白与功能

HIV-1 病毒粒子呈球形，直径约为 100 nm (如图 1-2)。病毒粒子的核心由核蛋白与两条约 9 kb 的 RNA 分子和 RNA 依赖性 DNA 聚合酶复合而成 (WANG et al., 2000)。在 HIV-1 基因组中，已鉴定出至少 10 个开放阅读框的产物；然而，只有三个基因是所有逆转录病毒的共同基因。其中，Gag 和 Env 基因编码结构蛋白，而 Pol 基因编码病毒蛋白的逆转录、整合和蛋白水解所必须的酶促蛋白。

HIV-1 基因组

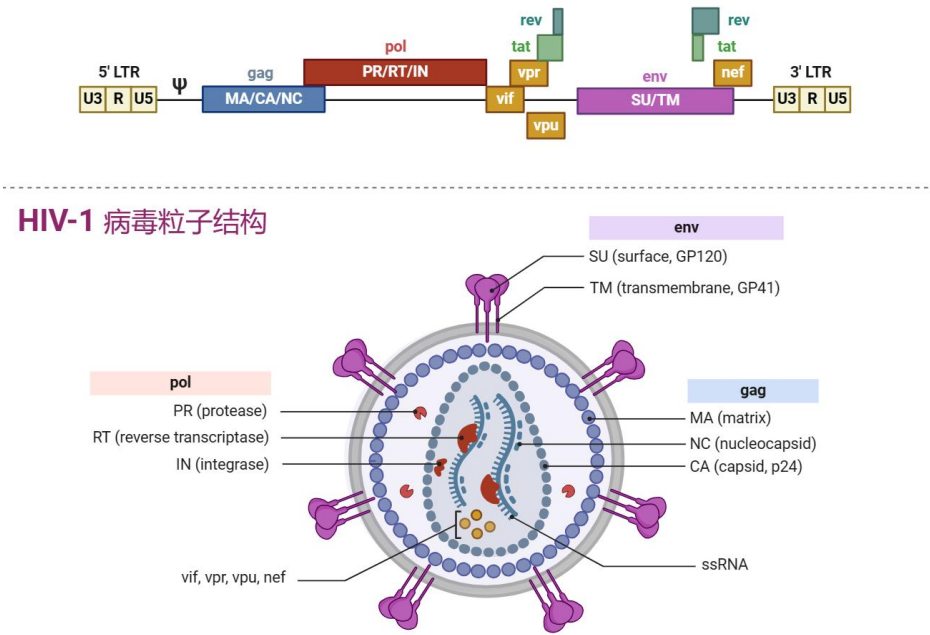


图 1-2 HIV-1 基因组和病毒结构 (图片绘自网站 <https://www.biorender.com/>)

Fig. 1-2 HIV-1 genome and viral structure (picture drawn from the website <https://www.biorender.com/>)

Gag 基因编码的是一种约为 55 kDa 的多蛋白，它在被切割和修饰后形成成熟的衣壳蛋白基质 MA、CA、NC 和较小的核心蛋白 p1、p2 和 p6。CA 蛋白和 NC 蛋白共同构成了病毒核心的主要成分，其中 CA 蛋白构成衣壳蛋白，NC 蛋白构成了核衣壳蛋白（WANG et al., 2000）。MA 是一种肉豆蔻酰化蛋白，有助于 HIV-1 病毒粒子靶向宿主细胞膜，并促进 Gag 蛋白和 Pol 蛋白与出芽的后代病毒粒子结合（BRYANT and RATNER, 1990; GÖTTLINGER et al., 1989）。最后，一种富含脯氨酸的小蛋白 p6 是 Gag 蛋白 C 端切割产物，它可能有助于分离成熟的病毒颗粒和病毒粒子内其他病毒蛋白的包装。

Pol 基因编码高度保守的蛋白质，这些蛋白质发挥 HIV-1 DNA 合成所需的酶的功能。包括反转录酶（RT）、蛋白酶（PR）和整合酶（IN）（STEVENSON et al., 1992）。Pol 蛋白的 mRNA 是一种未剪接的基因组 mRNA，首先被翻译成 Gag-Pol 融合蛋白（WANG et al., 2000）。Pol 和 Gag 都由同一 mRNA 编码，但在开放阅读框中不同位点起始翻译而翻译成不同的蛋白（WANG et al., 2000）。RT 蛋白负责将病毒 RNA 反转录为 DNA（GOFF, 1990）、PR 蛋白主要催化形成 Gag-Pol 前体，而 IN 在病毒 DNA 整合至宿主染色体过程中起关键作用（GOFF, 1992; MAERTENS et al., 2022）。

Env 基因编码一种糖基化的前体蛋白（gp160），该前体蛋白被切割成参与识别和结合靶细胞受体的细胞外糖蛋白（gp120），以及参与膜融合的较小疏水跨膜蛋白（gp41）。这些蛋白质对于病毒粒子识别、受体结合和进入靶细胞至关重要（LIN et al., 1993; YANG et al., 2005）。

HIV-1 病毒生命周期的其他调控因子由编码在六个重叠开放阅读框中的非结构蛋白指导，称为辅助基因（见表 1-1）。这些蛋白质在病毒生命周期中也起着重要作用。其中一些基因产物还具有可以促进病毒持续性感染的功能。然而，这些新基因在病毒生命周期中的作用尚不完全清楚。其中两个辅助基因（Tat 和 Rev）是所有宿主细胞复制所必须的（DEFORGES et al., 2012; SODROSKI et al., 1986）。其它四个基因突变后对病毒复制周期具有不同影响，但其作用目前不甚明确。

表 1-1 HIV-1 的辅助蛋白

Table 1-1 Accessory proteins of HIV-1

基因名称	基因编辑产物	功能
Tat	转录激活因子	转录激活剂，上调所有病毒蛋白表达
Rev	病毒蛋白表达的调节因子	核 RNA 输出因子，促进未剪接和单剪接的病毒 mRNA 输出到细胞质
Nef	多功能因子	多种效应功能：下调细胞表面 CD4 和 MHC-1；增强病毒粒子传染性；对细胞信号转导和激活的影响
Vpr	病毒蛋白 R	弱反转录激活剂；促进 DNA 入细胞核；阻滞细胞 G2 周期
Vif	病毒粒子传染性因子	增强病毒粒子的传染性
Vpu	病毒蛋白 U	增强病毒粒子从细胞中释放；内质网中 CD4 的选择性降解

1.3.3 基于 HIV-1 的慢病毒载体

由于慢病毒能够将自身基因组整合到宿主基因组，同时，慢病毒可转导分裂细胞和非分裂细胞的感染特性使得慢病毒载体被广泛应用和研究。近年来，慢病毒载体也被广泛开发，用于体外和体内外源基因导入的有力工具。而基于 HIV-1 的慢病毒是目前被开发和应用最广泛的慢病毒载体。

第一代 HIV-1 慢病毒载体是通过将三种不同的质粒瞬时转染到 293T 细胞中生产的(NALDINI et al., 1996)。三种质粒分别为一个带有外源基因的穿梭质粒、一个包膜质粒和一个包装质粒。Env 病毒能够表达与细胞表面受体结合的病毒糖蛋白，在包膜质粒中，使用 VSV-G 替换了 Env 基因，从而提高病毒颗粒的稳定性和慢病毒载体的细胞嗜性；在包装质粒中，使用了强启动子 CMV、Gag、Pol 和调节蛋白，从而产生病毒颗粒。其中，穿梭质粒和包膜质粒去掉了 LTR 和包装信号基因 Ψ 以减少复制性慢病毒的产生。

第二代慢病毒删除了辅助基因 Vif、Vpu、Vpr 和 Nef，降低了 HIV-1 的毒性，提高了慢病毒系统的安全性。第三代慢病毒系统将包装质粒分为了两个，一个质粒编码 Rev 蛋白，另一个质粒编码 Gag 蛋白和 Pol 蛋白。同时，穿梭质粒上使用与 CMV 嵌合的 5'-LTR 替换掉了 Tat 序列，因此该系统不再使用 Tat 序列启动外源基因的表达，从而进一步提高了慢病毒载体的安全性 (BLESCH, 2004; SAKUMA et al., 2012)。因此，当前慢病毒系统使用四个独立质粒产生，包括一个带有外源基因的穿梭质粒、一个表达 VSV-G 蛋白的包膜质粒和分别表达 Rev 基因和表达 Gag、Pol 基因的两种包装质粒。

尽管目前已经开发了一些其他用于生产慢病毒的稳定生产细胞系 (FARSON et al., 2001; KLAGES et al., 2000; PACCHIA et al., 2001)，但最广泛使用的是通过对 293T 细胞进行瞬时转染来生产含有重组慢病毒载体的上清。同时，也开发了其他基于猫免疫缺陷病毒 (Feline immunodeficiency virus, FIV) (POESCHLA et al., 1998)、猿猴免疫缺陷病毒 (Simian immunodeficiency virus, SIV) (WHITE et al., 1999)、牛免疫缺陷病毒 (Bovine immunodeficiency virus, BIV) (BERKOWITZ et al., 2001)、和马传染性贫血病毒的慢病毒转导系统 (Equine infectious anaemia virus, EIAV) (MITROPHANOUS et al., 1999)，但最广泛使用的是基于 HIV-1 的慢病毒转导系统。

慢病毒载体是体外和体内基因转导的有力工具。使用慢病毒转导系统可以在几乎任何细胞类型中进行有效的基因转导，包括过去非常难以靶向的非分裂组织和细胞。慢病毒载体的不断进展和完善有助于阐明基因功能，为基因治疗等方向开辟新的领域。目前，慢病毒系统被广泛应用于基于 CRISPR/Cas9 技术的各种细胞系的基因敲除或过表达、RNA 干扰、microRNA 研究以及活体动物实验中 (BUKRINSKY et al., 1993; LIU and BERKHOUT, 2014; SAKUMA et al., 2012)。

1.4 TRIM5 α 蛋白概述

1.4.1 TRIM5 α 蛋白的发现

TRIM5 α 和 TRIM-Cyp (统称为 Tripartite motif protein 5, TRIM5) 的限制活性首先在 HIV-1 和 SIV 病毒的感染性研究中被发现。这些研究发现，HIV 在感染新世界猴细胞时感染性比 SIV 更强，而在旧世界猴细胞中则相反 (HOFMANN et al., 1999; SHIBATA et al., 1995)。这项研究揭示

了细胞中的 TRIM5 蛋白具有一种前所未有的非自我识别机制,从而在细胞免受逆转录病毒跨物种传播中发挥着重要的作用(SAYAH et al., 2004; STREMLAU et al., 2004)。目前研究已发现, TRIM5 通过与保护病毒核心的衣壳蛋白结合来识别和拦截进入细胞的逆转录病毒。

1.4.2 TRIM5 α 蛋白结构与功能

作为 TRIM 蛋白家族的成员, TRIM5 蛋白自氨基末端(N 末端)分别为由 RING、B-box 区域和 coiled-coil (MERONI and DIEZ-ROUX, 2005) 结构域组成的 RBCC 区域, 该区域后连接了 TRIM5 α 蛋白中的 SPRY 区域和 TRIM-Cyp 中的亲环蛋白 A (Cyclophilin A, CypA) (如图 1-3)。RING 结构域位于蛋白 N 端, 主要参与蛋白-蛋白互作, 同时具有泛素连接酶活性, 已有研究证明, TRIM5 α 能以依赖 RING 结构域的方式使自身泛素化, 缺失或突变 RING 结构域会严重影响泛素连接酶活性(DIAZ-GRIFFERO et al., 2006a; LI et al., 2006); B-BOX 结构域可以形成二聚体和三聚体, 三聚体可将多个 TRIM5 α 蛋白连接成一个六边形网状结构, 从而实现 TRIM5 α 蛋白与逆转录病毒衣壳的结合(DIAZ-GRIFFERO et al., 2007); Coiled-coil 区域由多个 α -螺旋结构域组成, 参与蛋白-蛋白互作, 这种互作可以产生同/异源多聚体(PEREZ-CABALLERO et al., 2005a), 缺失该区域可使 TRIM5 α 完全丧失对逆转录病毒的抗病毒活性(MAILLARD et al., 2010; REYMOND et al., 2001); SPRY 结构域为 TRIM5 α 蛋白所独有, 该区域决定了 TRIM5 α 蛋白对逆转录病毒限制的特异性; TRIM5 α 蛋白在形成稳定的二聚体后可通过 SPRY 区域介导的直接相互作用来识别逆转录病毒的衣壳蛋白(KUTLUAY et al., 2013; REYMOND et al., 2001)。

CypA 与 HIV-1 之间的关系被在各种细胞中都被广泛研究。CypA 是一种肽基脯氨酰异构酶, 可对蛋白中的脯氨酸肽键进行顺/反式异构化。在人类细胞中, CypA 可与 HIV-1 感染细胞中的 Gag 蛋白相互作用, 导致其被募集到新生 HIV-1 病毒粒子中(FRANKE et al., 1994; THALI et al., 1994)。这种作用能够提高 HIV-1 衣壳蛋白的稳定性, 从而提高病毒的感染性。相反的是, 在旧世界猴子细胞中, CypA 蛋白可通过募集 TRIM5 α 蛋白到 HIV-1 的衣壳蛋白上, 从而抑制 HIV-1 的感染(BERTHOUX et al., 2005; KECKESOVA et al., 2006; STREMLAU et al., 2006)。令人惊讶的是, 在新世界物种鼻猴细胞中, CypA 假基因插入到了 TRIM5 的编码区, 取代了部分 SPRY 编码区, 从而产生了一种名为 TRIM-Cyp 的蛋白分子(NISOLE et al., 2004; SAYAH et al., 2004)。该限制因子通过 CypA 结构域和衣壳蛋白间的相互作用, 将病毒衣壳招募到 RBCC 区域, 从而强烈限制 HIV-1、SIVagm 和 FIV 的活性(DIAZ-GRIFFERO et al., 2006b; LIN and EMERMAN, 2006; ZHANG et al., 2006)。使用 CypA 的免疫抑制剂环孢菌素 A (Cyclosporine A, CsA), 通过竞争性阻断 CypA-CA 的相互作用, 可降低 CypA 对 HIV-1 的限制作用, 提高 HIV-1 的感染性。

1.4.3 TRIM5 α 的抗病毒机制

TRIM5 α 蛋白以三聚体的形式识别和覆盖 HIV-1 的衣壳蛋白, 并在病毒的衣壳蛋白表面形成网状结构, 包裹和捕获病毒(如图 1-3)。一些研究表明, TRIM5 α 蛋白与衣壳蛋白的结合可以诱导病毒提前脱壳, 无法释放成熟的核酸(BLACK and AIKEN, 2010; LANGELIER et al., 2008; PEREZ-CABALLERO et al., 2005b; PERRON et al., 2007; ZHAO et al., 2011), 从而导致病毒逆转录过程失败。另一些研究表明, TRIM5 α 蛋白诱导提前脱壳需要蛋白酶体的泛素化和募集

(ANDERSON et al., 2006; CAMPBELL et al., 2016; WU et al., 2006)。蛋白酶体的募集也可以导致核心失活后的病毒被清除。此外，还有一些研究通过称为“病毒吞噬”的精确自噬机制来清除病毒，其中 TRIM5 α 将结合的逆转录病毒核心引导至溶酶体进行降解 (MANDELL et al., 2014)。

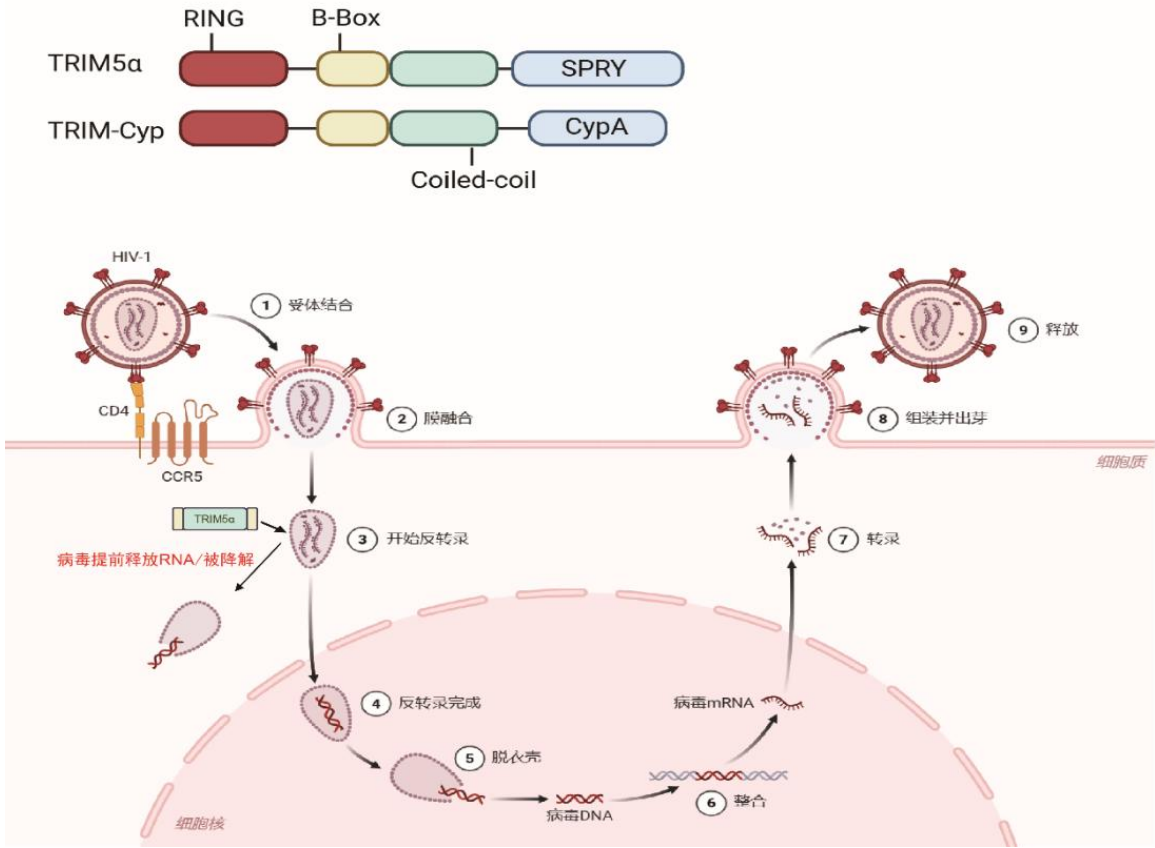


图 1-3 TRIM5 α 的结构和 TRIM5 α 的抗 HIV-1 功能 (图片绘自网站 <https://www.biorender.com/>)

Fig. 1-3 The structure of TRIM5 α and the anti-HIV-1 function of TRIM5 α (picture drawn from the website <https://www.biorender.com/>)

1.5 研究目的与意义

基于 HIV-1 慢病毒载体的 CRISPR/Cas9 基因编辑技术是目前被广泛应用于哺乳动物细胞的基因编辑。MDBK 细胞难转染和慢病毒难转导的特性使得 MDBK 细胞的基因编辑非常困难。本研究构建了诱导性 Cas9 过表达 MDBK 细胞系以提高 CRISPR/Cas9 技术基因编辑的效率，在此基础上，以 CRISPR/Cas9 技术在不插入外源基因的前提下对 MDBK 细胞中的 TRIM5 α 基因进行了敲除，从而提高了基于 HIV-1 慢病毒的转导效率，构建了具有高效基因编辑能力的 MDBK 细胞系。

第二章 TRIM5 α 蛋白的表达, 纯化及其多抗制备

由于牛目前用于检测牛 TRIM5 α 蛋白的抗体较少, 因此本研究通过构建原核表达载体的方式原核表达牛 TRIM5 α 蛋白, 并通过切胶纯化的方式对牛 TRIM5 α 蛋白进行了纯化。将纯化的蛋白免疫大耳兔, 得到了含有抗牛 TRIM5 α 蛋白的血清, 通过对血清中的 IgG 进行纯化, 获得了兔抗牛 TRIM5 α 多克隆抗体。

2.1 实验材料

2.1.1 细胞、病毒和质粒载体

牛肾细胞(Madin-Darby bovine kidney cells, MDBK)、人胚胎肾细胞(Human Embryonic Kidney, HEK-293T) 均由本实验室保存。pCold-MBP 质粒由本实验室保存。

2.1.2 实验试剂

DMEM 高糖细胞培养基及 Opti-MEM 无血清细胞培养基均购自 Gibco 公司; 胎牛血清购自 Sigma 公司; PrimeScript II 反转录酶、KOD 聚合酶及 In-Fusion® HD Cloning Kit 购自 TaKaRa 公司; 凝胶回收试剂盒购自 Thermo Fisher 公司; 感受态 BL21 购自唯地生物公司; 弗氏完全佐剂和弗氏不完全佐剂购自 Sigma 公司; Protein G 亲和层析介质及高亲和力和巯基偶联树脂购自 GenScript 公司; 蛋白酶抑制剂购自 beyotime 公司; 蛋白 Marker、5 $\times$ 蛋白上样缓冲液(β -巯基乙醇) 购自 YEASEN 公司; QuickBlue 快速染胶液购自博奥龙公司; 硝酸纤维素膜(NC 膜) 购自 pall 公司; 封闭液 Blocking Buffer 购自 LI-COR 公司。

鼠源 His 单克隆抗体(mAb)和鼠源 β -actin 单克隆抗体(mAb)购自 proteintech 公司; IRDye® 680RD 山羊抗小鼠二抗和 IRDye® 800RD 山羊抗兔二抗购自 LI-COR 公司。

2.1.3 仪器设备

超净工作台(北京东联哈尔仪器制造有限公司); CO₂ 培养箱、超低温冰箱、NanoDrop 微量分光光度计(Thermo Fisher 公司); 冰箱(Haier); 冷冻离心机(Beckman Coulter 公司); 快速湿转仪(GenScript 公司); Odyssey CLX 近红外荧光扫描成像系统(LI-COR 公司); 高压细胞破碎仪(Homogenising Systems Ltd); 蛋白电泳仪(BIO-RAD 公司)。

2.2 实验方法

2.2.1 总 RNA 的提取和反转录

本研究均使用 Thermo Fisher 公司的 TRIzol 试剂提取细胞或病毒液总 RNA, 操作参照使用指南, 获得总 RNA, 反转录或保存于-80℃冰箱。

使用 PrimerScript II 反转录试剂将提取的 MDBK 总 RNA 反转录为 cDNA, 操作参照试剂盒使用说明书, 反转录后的 cDNA 直接用于后续 PCR 实验或保存于-20°C冰箱。

2.2.2 质粒构建

将提取的 MDBK 细胞 RNA 反转录为 cDNA, 使用特异性引物 pCold-TRIM5 α -MBP-F/R 扩增牛源 TRIM5 α 基因 (GenBank 登录号: NC_037342.1) (引物序列见表 2-1)。将原核表达载体 pCold-MBP 同时经相应限制酶酶切后, 使用 In-Fusion 无缝克隆技术构建重组质粒, 连接产物转化至 DH5 α 感受态中, 于 37°C培养箱中培养 12 h 后进行单克隆挑菌测序, 对测序正确的质粒进行提取后, 将该质粒转化至表达感受态 BL21 中, 于 37°C培养箱中培养 12-14 h 后进行单克隆挑菌测序, 定义测序正确的质粒为 pCold-TRIM5 α -MBP。

表 2-1 本章中所用引物

Table 2-1 Primers used in this chapter

引物名称	序列 (5'-3')
pCold-TRIM5 α -MBP-F	TGGAGCTCGGTACCATGGCTTCAGGAATCCTG
pCold-TRIM5 α -MBP-R	ATTACCTATCTAGATCAACAGCTTGGTGAGCA

2.2.3 TRIM5 α 重组蛋白的制备及鉴定

TRIM5 α 重组蛋白的表达: 将测序正确的单克隆菌落接种于 LB 培养基, 37°C摇床继续培养 16-20 h。继续将菌液按照 1: 100 的比例接种至新鲜的 LB 培养基, 37°C摇床培养大约 3 h, 当菌落 OD 值达到 0.6 时, 加入 IPTG, 使其终浓度为 0.4 mmol/L, 继续于 12°C摇床诱导培养 16 h。

TRIM5 α 重组蛋白的纯化: 将诱导培养后的菌液于 4°C, 12000 rpm/min 离心 2 min, 去除上清, 使用 1/10 体积的 PBS 重悬, 使用高压细胞破碎仪破碎后, 将破碎产物于 4°C, 12000 rpm/min 离心 30 min, 使用 1/100 的 PBS 重悬沉淀。在沉淀产物中加入 Loading Buffer, 98°C变性 10 min, 进行 SDS-PAGE 凝胶电泳。使用 0.3 M/L KCL 溶液染色 5-10 min 后, 将目的条带切下并使用 PBS 清洗染色至透明; 将含有目的条带的凝胶碾碎后加入 500 μ L PBS 重悬, 并于-80°C和 80°C反复冻融 3 次。将样品于 100°C煮沸 20 min 后, 置于 4°C离心机中, 12000 rpm/min 离心 5 min, 吸取上清, 得到所需蛋白。

TRIM5 α 重组蛋白的鉴定: 将获得的蛋白加入 Loading buffer, 98°C变性 10 min 后进行 SDS-PAGE 凝胶电泳和 Western blot 鉴定。

2.2.4 动物免疫

选择 2 只日龄为 6-8 周的大白兔, 首次免疫前对耳缘静脉采血作为阴性血清对照。免疫原为纯化后的 TRIM5 α 蛋白。首次免疫将 0.5 mg TRIM5 α 蛋白与等体积完全弗氏佐剂乳化后, 皮下多点注射进行免疫, 免疫间隔时间为 14 天; 第二、三次免疫剂量分别为 0.5 mg/只和 0.3mg/只, 使用等体积不完全弗氏佐剂与 TRIM5 α 蛋白进行乳化, 通过皮下多点注射进行免疫, 共免疫 3 次; 三次免疫后 10 天通过心脏采血方法获得兔抗 TRIM5 α 蛋白血清。

2.2.5 抗体纯化

纯化方法采取 IgG 亲和层析纯化。

溶液配制:

平衡缓冲液: 20 mM Na₂HPO₄, 0.15 M NaCl, pH 7.0;

洗脱缓冲液: 0.1 M glycine, pH 2.5;

中和缓冲液: 1 M Tris, pH 8.5。

纯化步骤 (0.5 ml 柱体积):

- (1) 使用与血清等体积的平衡缓冲液稀释含有抗体的兔血清;
- (2) 预先在层析柱中加入 1 mL 平衡缓冲液, 然后再吸取 1 mL 混匀后的树脂至该层析柱中。
- (3) 向层析柱中加入 5 mL 平衡缓冲液, 以约 1 mL/min 的流速流出。
- (4) 按照约 1 mL/min 的流速将样品加入层析柱中, 流出液用于后续测定抗体结合树脂的能力。
- (5) 用 30 mL 的平衡缓冲液洗涤树脂。
- (6) 将 10-15 mL 洗脱缓冲液以 1 mL/min 的流速洗脱抗体, 并立即在洗脱的免疫球蛋白中加入 1/10 体积的中和缓冲液, 对得到的免疫球蛋白进行 SDS-PAGE 验证。

2.2.6 Western Blot 检测

将细胞裂解产物或蛋白样品中加入 Loading Buffer, 98℃煮沸 10 min, 进行 SDS-PAGE 电泳, 120 V, 1.5 h。使用快速转膜仪将蛋白转至 NC 膜。NC 膜置于封闭液 (Blocking buffer) 中室温封闭 1 h, 置于相应使用封闭液稀释的一抗中, 于 4℃摇床上过夜孵育; 使用 PBST 洗涤 NC 膜 3 次, 每次 5 min; 将 NC 膜置于使用封闭液稀释的二抗中, 室温避光孵育 1 h; PBST 避光洗涤 3 次, 每次 5 min。使用近红外荧光扫膜仪器扫描 NC 膜。

2.3 结果

2.3.1 TRIM5 α 蛋白的表达与纯化

为了对牛源 TRIM5 α 的蛋白表达量进行鉴定, 我们制备了牛 TRIM5 α 兔多克隆抗体。通过对 IPTG 诱导后的大肠杆菌进行破碎处理后分别对上清和包涵体中表达的蛋白进行鉴定, 我们发现 TRIM5 α 主要表达在包涵体中 (图 2-1A), 因此我们采取切胶纯化的方式对包涵体中的 TRIM5 α 蛋白进行纯化, 对纯化后的蛋白进行 SDS-PAGE 和 Western blot 验证, 确定目的蛋白成功被纯化, 分子量大小约为 105 kDa (图 2-1B)。

2.3.2 TRIM5 α 抗体的 Western blot 检测结果

为了进一步提高抗体的特异性，我们对兔抗牛 TRIM5 α 多克隆抗体进行进一步亲和纯化，获得纯化的抗体溶液，并对抗体进行 SDS-PAGE 验证（图 2-1C）。纯化后的兔 IgG 重链大小约为 50 kDa，轻链约为 20-25 kDa，该结果与预期目的大小相符。通过与对纯化后的抗体进行 1: 1000 稀释后对 MDBK 细胞及转染了靶向 TRIM5 α 的 siRNA 的 MDBK 细胞进行 Western blot 验证（图 2-1D），验证结果表明，纯化后的牛 TRIM5 α 兔多克隆抗体抗体为一抗可以检测到牛细胞中的 TRIM5 α 蛋白。这些结果说明兔源 TRIM5 α 抗体具有较好的反应性和特异性。

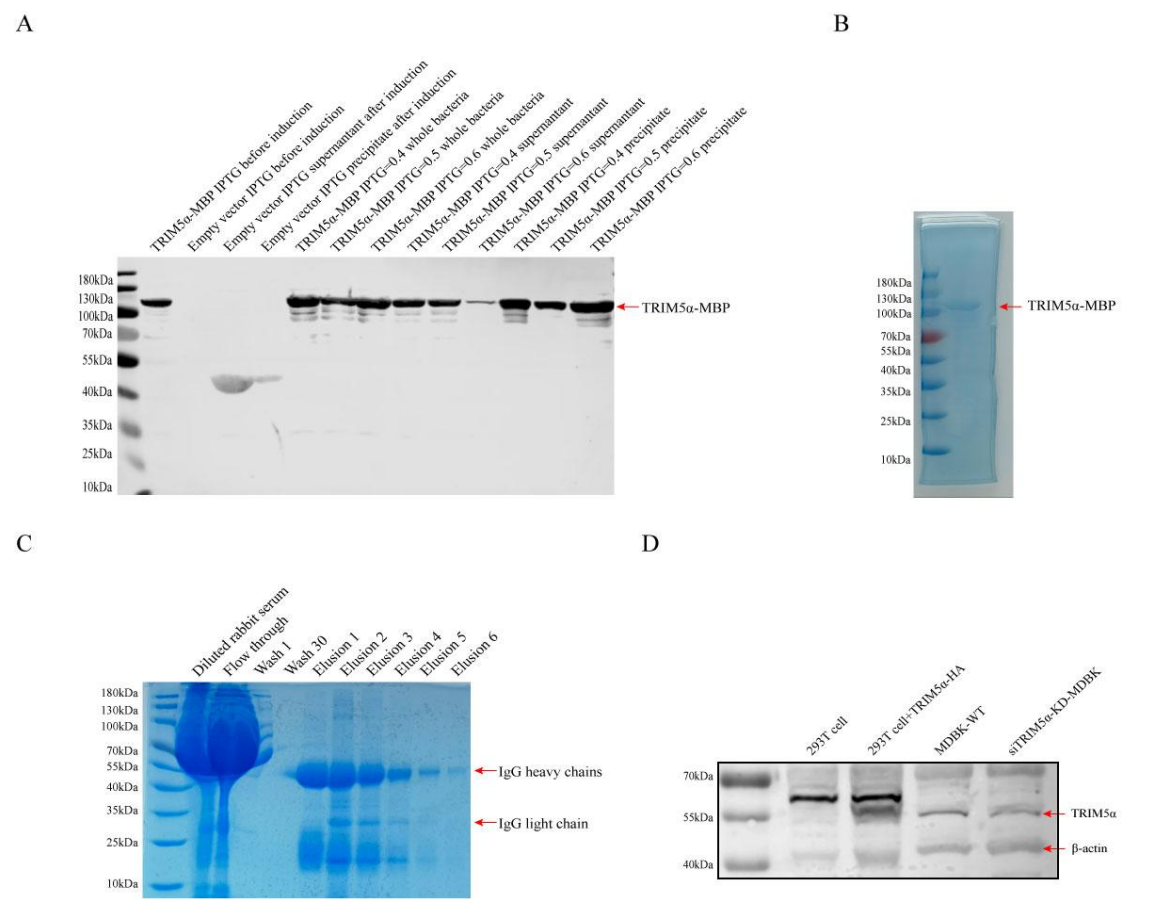


图 2-1 TRIM5 α 蛋白的表达、纯化和多抗制备

Fig.2-1 TRIM5 α Protein expression, purification and polyclonal antibody preparation

A. TRIM5 α 蛋白的表达；B. 对 TRIM5 α 蛋白进行切胶纯化后进行 SDS-PAGE 验证；C. 对兔抗 TRIM5 α 血清进行 IgG 亲和纯化；D. 对纯化后的兔抗 TRIM5 α 抗体进行 Western blot 验证

A. Expression of TRIM5 α protein; B. SDS-PAGE verification of TRIM5 α protein after gel purification; C. IgG affinity purification of rabbit anti-TRIM5 α serum; D. Western blot verification of purified rabbit anti-TRIM5 α antibody

2.4 讨论

制备抗体是示踪牛 TRIM5 α 基因表达的的前提，由于多克隆抗体制备的简便、成本低廉等特点，使其在免疫学上拥有广泛的应用空间。由于市面上无商品化的抗牛 TRIM5 α 抗体，为了识别

MDBK 细胞中的牛 TRIM5 α 蛋白, 本研究制备了牛 TRIM5 α 兔多抗。首先, 使用原核表达质粒 pCold-MBP 在大肠杆菌中成功表达了牛 TRIM5 α 蛋白, SDS-PAGE 结果显示, 表达的 TRIM5 α -MBP 蛋白分子量大小约为 105kDa, 主要存在于包涵体中。因此, 本研究对包涵体中的蛋白进行了切胶纯化, 得到了较纯的牛 TRIM5 α 蛋白。将纯化后的 TRIM5 α -MBP 蛋白对大耳兔进行免疫, 并通过亲和层析对含有抗体的血清进行了进一步柱纯化, 从而提高抗体的效价。纯化后的抗体可以用于 Western blot 识别 MDBK 细胞中的 TRIM5 α 蛋白, Western blot 结果表明该抗体识别 MDBK 细胞, 以及 HEK-293T 细胞中过表达的牛 TRIM5 α 蛋白, 证明该多抗具有良好的反应原性。由于牛 TRIM5 α 蛋白和人 TRIM5 α 蛋白具有较高的同源性, 因此本抗体也可能识别了人 TRIM5 α 蛋白。本实验中免疫大耳兔的蛋白为线性化的 TRIM5 α -MBP 蛋白, 故制备出的抗体仅具备识别变性后 TRIM5 α 蛋白的线性化表位的能力, 不能用于间接免疫荧光识别具有空间结构的 TRIM5 α 蛋白多聚体。

第三章 具有高效基因编辑能力的 MDBK 细胞系的构建和鉴定

为了提高基于 CRISPR/Cas9 技术在 MDBK 细胞上的基因编辑效率,本研究通过 TetOn 系统构建了诱导型 Cas9 过表达细胞系(MDBK-iCas9)。同时,通过对 MDBK 细胞中的 TRIM5 α 进行 siRNA 介导的敲降,发现 TRIM5 α 蛋白是限制慢病毒转导的一种重要细胞因子。因此本研究对 MDBK-iCas9 细胞系中的 TRIM5 α 蛋白进行了敲除,从而提高慢病毒在 MDBK-iCas9 细胞系中的感染效率。

3.1 实验材料

3.1.1 细胞、病毒和质粒载体

慢病毒载体 pLVX-TetOn-Blasticidin 由本实验室保存,表达荧光素酶的慢病毒质粒 pNL4-3-Luc. R-E-delta Env 由哈尔滨兽医研究所汤艳东副研究员提供,表达绿色荧光蛋白的慢病毒质粒 LentiCRISPRV₂EGFP 及慢病毒包装质粒 pVSVg 和 psPAX2 由本实验室保存。pCAGGS-HA 载体购自 Addgene 公司。

3.1.2 实验试剂

siRNA 由吉玛公司合成;siRNA 转染试剂 Lipofectamine RNAiMAX 购自 Thermo Fisher 公司;DMEM 高糖细胞培养基及 Opti-MEM 无血清细胞培养基均购自 Gibco 公司;胎牛血清购自 Sigma 公司;转染试剂 Lipofectamine 3000 购自 Thermo Fisher 公司;转染试剂 PEI MAX® - Transfection Grade Linear Polyethylenimine Hydrochloride (MW 40,000)购自 Polysciences 公司;T4 PNK 酶、PNK Buffer、*Esp3I* 内切酶及 T4 DNA 连接酶均购自 NEB 公司;总 DNA 提取试剂盒购自 TIANGEN 公司;荧光定量 PCR 试剂盒购自 Vazyme 公司;荧光素酶活性检测试剂盒购自 Promega 公司;杀稻瘟菌素 Blasticidin 购自 beyotime 公司;多西环素 Doxycycline 购自 MCE 公司;聚凝胺 Polybrene 购自 Biosharp 公司;CCK-8 试剂盒购自 APE×BIO 公司;其他同 2.1.2。

3.1.3 仪器设备

凝胶成像扫膜仪 (SAGECREATION 公司);EVOS 倒置荧光显微镜 (Thermo Fisher 公司);超速流式细胞分选系统 (贝克曼);恒温离心机 (Eppendorf 公司);超速离心机 (Beckman Coulter 公司);小型振荡器 (SCILOGEX 公司);酶标仪 (Envision 公司);荧光定量 PCR 仪 (Thermo Fisher 公司);其他同 2.1.3。

3.2 实验方法

3.2.1 siRNA 的转染

本研究靶向牛 *TRIM5 α* 的 siRNA 由吉玛公司合成,见表 3-1, siRNA-TRIM5 α 、siRNA-NC。

将 MDBK 细胞以 5×10^4 /孔的密度接种于 24 孔板中, 继续于 37°C 培养箱中过夜培养, 待细胞密度约为 70% 至 80% 时, 弃去上清, 替换为 500 μL Opti-MEM。在冰上融化 siRNA, 分别取 2 个 1.5 mL EP 管, 按照每孔 50 μL 加入 Opti-MEM, 在两个 EP 管中分别加入 60 pmol siRNA 和 6 μL Lipofectamine RNAiMAX, 将两管中的液体轻轻混匀后, 静置 5 min, 加入细胞孔内。每条 siRNA 做 3 个复孔。

3.2.2 实时荧光定量 PCR 检测

本研究采用相对荧光定量 PCR (Relative Quantification Real-time PCR) 方法检测 *TRIM5 α* 基因的 mRNA 表达水平。首先按照步骤 2.2.2 提取细胞内总 RNA, 并反转录成 cDNA, 采用荧光定量 PCR 方法检测 *TRIM5 α* 基因的 mRNA 表达情况, 20 μL 的体系为 10 μL SYBR® qPCR Master Mix、0.4 μL 上游引物、0.4 μL 下游引物、2 μL cDNA 和 7.2 μL ddH₂O。反应条件为: 95°C 30 s; 60°C 5 s、 55°C 30 s、 72°C 30 s, 共 40 个循环; 溶解曲线反应条件为: 95°C 15 s、 60°C 1 min、 95°C 15 s。每个样品设置 3 次重复, 并以细胞内参基因 β -actin 作为对照, 利用 Applied Biosystems 进行 PCR 程序及数据收集, 使用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 公式计算 *TRIM5 α* 基因的 mRNA 表达水平。*TRIM5 α* 基因和 β -actin 基因的特异性引物见表 3-1, qPCR-*TRIM5 α* -F/R、qPCR- β -actin-F/R。

3.2.3 质粒构建

从 NCBI 上查询牛源 *TRIM5 α* 基因序列, 并针对 *TRIM5 α* 转录本的第二个外显子上设计 3 对引导 RNA (sgRNA) (sgRNA 序列见表 3-1, *TRIM5 α* -sgRNA1-3), sgRNA 正义链 5'端加 CACCG, 反义链 5'端加 AAAC, 3'端加 C。将 sgRNA 克隆至 LentiCRISPRV₂EGFP 载体中, 转化至 Stable3 感受态细胞, 于 12 h-24 h 后对单菌落克隆进行挑菌并鉴定。将测序正确的质粒命名为 LentiCRISPRV₂EGFP-*TRIM5 α* -sgRNA1-3。

依据 Cas9 基因的序列设计特异性引物 (见表 3-1, pLVX-TetOn-Cas9-F/R), 于质粒 LentiCRISPRV₂EGFP 中扩增 Cas9 基因, 并对质粒 pLVX-TetOn-Blasticidin 进行酶切, 最后通过无缝克隆将扩增的 Cas9 片段克隆至 pLVX-TetOn-Blasticidin 载体中, 转化至 Stable3 感受态细胞, 于 12 h-24 h 后对单菌落克隆进行挑菌并测序。命名测序正确的 Cas9 真核表达质粒为 pLVX-TetOn-Cas9-Blasticidin。

依据 *TRIM5 α* 基因序列设计特异性引物 (见表 3-1, pCAGGS-*TRIM5 α* -F/R), 使用该引物自 MDBK 细胞 cDNA 中扩增 *TRIM5 α* 基因, 并对质粒 pCAGGS-HA 进行酶切, 最后通过无缝克隆将扩增的 *TRIM5 α* 片段克隆至 pCAGGS-HA 载体中, 转化至 DH5 α 感受态中, 培养 12 h 后挑取单克隆菌落测序, 定义测序正确的 *TRIM5 α* 蛋白真核表达质粒为 pCAGGS-*TRIM5 α* -HA。

3.2.4 慢病毒的包装及感染

将 HEK-293T 细胞以 5×10^6 的密度接种于 150mm 的平皿中, 继续于 37°C 培养箱中过夜培养, 待细胞密度约为 80% 时, 将慢病毒表达质粒 (LentiCRISPRV₂EGFP 或 pNL4-3. Luc. R-E-delta Env) 和慢病毒包装质粒 psPAX2 和 pVSVg 分别以 3:3:1 的比例以转染试剂 PEI 共转染至 HEK-293T 细

胞中, 分别于 24 h、48 h、72 h 收取含有重组慢病毒的上清, 并于 4°C 超速离心机中以 20000 g/min 离心 2 h。弃去上清后, 使用无血清培养基对慢病毒进行重悬, 并置于 4°C 摇床中继续重悬 12 h。重悬后的慢病毒用于感染细胞或储存于 -80°C 冰箱。

将待感染的 HEK-293T 细胞或 MDBK 细胞以 5×10^4 /孔的密度接种于 24 孔板中, 继续于 37°C 培养箱中过夜培养, 待细胞密度约为 70% 至 80% 时, 使用重悬后的慢病毒感染细胞。以 1: 1000 的比例在加入了慢病毒的培养基中加入聚凝胺 (Polybrene, PB) 以提高感染效率。在 37°C 培养箱中培养继续培养 4 h 后, 对细胞进行换液。

3.2.5 荧光素酶报告基因的检测

将包装好的慢病毒感染 MDBK 细胞, 并于 48 h 后, 采用 Luciferase reporter assay kit 对荧光素酶进行检测。弃去待测细胞孔内的培养基, 在每个孔内加入 PBS, 并将细胞板置于摇床上洗涤 3 次; 在每个孔内加入 250 μ L 1 $\times$ PLB 裂解液 (以 12 孔板为例), 在室温轻缓晃动培养板 15 min; 在荧光素酶检测板中加入 100 μ L LARII, 再吸取 20 μ L 细胞裂解上清至孔中, 混合后使用微孔板化学发光检测仪检测 Luciferase 的荧光值。

3.2.6 Cas9 过表达细胞系的筛选

将 HEK-293T 细胞以 5×10^6 的密度接种于 150 mm 的平皿中, 继续于 37°C 培养箱中过夜培养, 待细胞密度约为 60%-70% 时, 将慢病毒质粒 pLVX-TetOn-Cas9-Blasticidin 和包装质粒 psPAX2 和 pVSVg 以 3:3:1 的比例以转染试剂 PEI 共转染至 HEK-293T 细胞中, 分别于 24 h, 48 h, 72 h 收取含有重组慢病毒的上清, 并于 4°C 超速离心机中以 20000 g/min 离心 2 h。弃去上清后, 使用无血清培养基对慢病毒进行重悬, 并置于 4°C 摇床中继续重悬 12 h。重悬后的慢病毒用于感染细胞或储存于 -80°C 冰箱。

将待感染的 MDBK 细胞以 5×10^5 /孔的密度接种于六孔板中, 继续于 37°C 培养箱中过夜培养, 待细胞密度约为 70% 时, 使用重悬后的慢病毒感染细胞。在 37°C 培养箱中培养继续培养 4 h 后, 对细胞进行换液。在感染 48 h 后, 加入终浓度为 6 μ g/ml 的杀稻瘟菌素 (Blasticidin), 每隔 48 h 更换含有 Blasticidin 的新鲜培养基, 继续培养 5-7 天至对照组细胞全部死亡。最终存活的实验组细胞命名为 MDBK-iCas9 细胞系。

3.2.7 sgRNA 有效性的鉴定

将 HEK-293T 细胞以 5×10^5 /孔的密度接种于六孔板中, 继续于 37°C 培养箱中过夜培养, 待细胞密度约为 60%-70% 时, 使用 PEI 转染试剂将质粒 LentiCRISPRV2-EGFP-TRIM5 α -sgRNA1-3 和 pCAGGS-TRIM5 α -HA 以 1: 2 的比例分别共转染至 HEK-293T 细胞中。转染后 48 h 使用加入了蛋白酶抑制剂的 IP 裂解液于 4°C 摇床裂解细胞 30 min, 12000 rpm/min 离心 10 min 后, 吸取上清, 加入适量 Loading Buffer, 98°C 变性 10 min, 对蛋白进行 SDS-PAGE 凝胶电泳, 并将蛋白转至 NC 膜上, 使用 HA 抗体检测 TRIM5 α 蛋白的表达水平, 以 TRIM5 α 表达量反映 sgRNA 的有效性。

3.2.8 TRIM5 α 敲除细胞系的筛选

将 MDBK-iCas9 细胞以 5×10^5 /孔的密度接种于六孔板中，于 37℃ 培养箱中过夜培养，待细胞密度约为 80% 时，使用转染试剂 Lipofectamine 3000 转染将质粒 LentiCRISPRV₂EGFP-TRIM5 α -sgRNA 转染至 MDBK-iCas9 细胞中。转染后 60 h，使用胰酶消化细胞，并加入含有 10% 血清的培养基终止消化，将含有细胞的培养基于 1000 rcf/min 离心 10 min 后，使用 PBS 对细胞进行重悬后 1000 rcf/min 离心 10 min，重复三次。弃去上清后，使用流式细胞分选培养基（Sorting Media）对细胞进行重悬，并对表达 EGFP 的细胞进行流式细胞分选。在 96 孔板中按照每孔 220 μ L 加入流式细胞分选收集培养基（Collection Media），将单克隆细胞以每孔一个细胞分选至 96 孔板中。

Sorting Media 成分：含有 10%FBS 的细胞培养基；1%BSA；20 mM HEPES（PH=7.2）。

Collection Media 成分：贴壁细胞培养基上清：新培养基上清=1：1；2%双抗；20 mM HEPES。

3.2.9 细胞系的测序鉴定

利用 DNA 提取试剂盒提取单克隆细胞的 DNA，使用 Taq 酶和特异性引物（见表 3-1）扩增 TRIM5 α 包含 sgRNA 位置的基因。对 PCR 产物进行胶收纯化后，将 TRIM5 α 片段连接至 pMD18-T 载体，并转化至 DH5 α 感受态。挑取单克隆菌落并使用 T 载体引物进行测序鉴定。鉴定正确的细胞命名为 MDBK-iCas9^{TRIM5 α -/-}。

表 3-1 本章中所用引物

Table 3-1 Primers used in this chapter

引物名称	序列（5'-3'）
siRNA-TRIM5 α	CAUGAUAGAACCACCAAUATT
siRNA-NC	UUCUCCGAACGUGUCACGUTT
qPCR- TRIM5 α -F	ATCCAATGACCAACGCTC
qPCR- TRIM5 α -R	TTTTCACCACATACCCCC
qPCR- β -actin-F	TGCTTCTAGGCGGACTGTTAG
qPCR- β -actin -R	CGCAAGTTAGGTTTTGTCAAGA
TRIM5 α -sgRNA1	CACCG-AGTGATACAGGCTTGACAGA
TRIM5 α -sgRNA2	CACCG-AATCCATAATTGGCCAAGAG
TRIM5 α -sgRNA3	CACCG-GCAGAGGCTCCGAGAGGTTA
pLVX-TetOn-Cas9-F	TCCTACCCCTCGTAAAGAATTCGCCACCATGGACAAGAAGT
pLVX-TetOn-Cas9-R	CAGGGGAGGTGGTCTGGATCCTCACTTATCGTCATCGTCTTTGTAAT
pCAGGS-TRIM5 α -F	CAGATTACGCTGAATTCATGGCTTC
pCAGGS-TRIM5 α -R	CAGATTACGCTGAATTCATGGCTTC
TRIM5 α -KO 鉴定-F	CCTTGATTCTAGATAACTAGTG

表 3-1 （续）

Table 3-1 (continue)

引物名称	序列（5'-3'）
TRIM5α-KO 鉴定-R	GCCAGGTAATTAAAGTCCAATGCA

3.2.10 细胞系的 Western blot 鉴定

详细步骤同 2.2.6。

3.2.11 细胞活性检测

本研究采用 APE×BIO 公司的 CCK-8 细胞活性检测试剂盒对 MDBK-iCas9^{TRIM5α}-/-细胞进行增殖活性检测，操作如下：将 MDBK-iCas9^{TRIM5α}-/-细胞按照 1000 个/孔的密度接种于 96 孔板中，每孔中加入 100 μL 培养液，于 37℃培养 12 h。分别于 24 h, 36 h, 48 h, 60 h, 72 h, 96 h 在每孔中加入 10 μL CCK-8 试剂，继续于 37℃培养箱中培养 2 h，使用酶标仪在 450 nm 处测定吸光值，每个时间点做 3 个复孔。

3.3 结果

3.3.1 敲降 TRIM5α可以提高基于 HIV-1 的慢病毒的转导效率

为了确定基于 HIV-1 的慢病毒在 MDBK 上的转导效率，本研究在 HEK-293T 细胞和 MDBK 细胞中，分别感染了不同剂量的表达绿色荧光蛋白（EGFP）（图 3-1A）的慢病毒，并于感染后 72 h 进行绿色荧光拍照。我们发现，在慢病毒感染后，MDBK 细胞中的绿色荧光表达量为 HEK-293T 细胞的 1/5；同时，在两种细胞中，分别感染了不同剂量的表达荧光素酶（luciferase）的慢病毒（图 3-1B），于感染后 72 h 进行荧光素酶的检测。相似地，我们发现，在慢病毒感染后，MDBK 细胞中荧光素酶的表达量为 HEK-293T 细胞的 1/10 左右。这些结果表明，基于 HIV-1 的慢病毒在 MDBK 细胞上的转导效率较低。

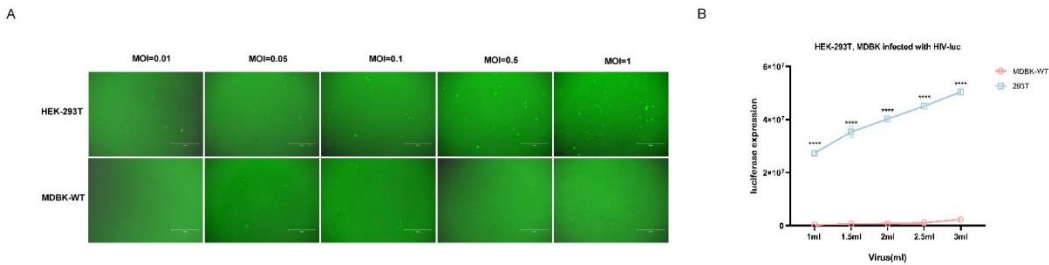


图 3-1 HEK-293T 细胞和 MDBK 细胞分别感染表达绿色荧光蛋白的慢病毒和荧光素酶的慢病毒

Fig. 3-1 HEK-293T cells and MDBK cells were infected with lentiviruses expressing green fluorescent protein and luciferase, respectively

A. HEK-293T 细胞和 MDBK 细胞感染不同 MOI 表达绿色荧光蛋白的慢病毒；B. HEK-293T 细胞和 MDBK 细胞感染不同 MOI 表达荧光素酶的慢病毒

A. HEK-293T cells and MDBK cells infected with lentivirus expressing green fluorescent protein at different MOIs; B. HEK-293T cells and MDBK cells infected with lentivirus expressing luciferase at different MOIs

为了探究 TRIM5α蛋白在慢病毒感染中的作用，本研究将靶向牛 *TRIM5α* 的 siRNA 和作为阴性对照的 siRNA (siRNA-NC) 转染至 MDBK 细胞中，48 h 后感染不同 MOI 表达 EGFP 和 luciferase 的慢病毒，感染后 72 h 用实时荧光定量 PCR 方法和 Western bolt 测定 TRIM5α 的 mRNA 和蛋白的表达水平；同时分别对绿色荧光拍照并对荧光素酶进行检测，以确定慢病毒在两种细胞中的表达水平。首先，通过 Western blot 和实时荧光定量 PCR 的检测，我们发现，在转染靶向牛 *TRIM5α* 的 siRNA 后，TRIM5α mRNA 的表达水平为转染了 siRNA-NC 的 MDBK 细胞的 1/4（图 3-2A），而 TRIM5α 蛋白的表达水平为转染了 siRNA-NC 的 MDBK 细胞的 1/3（图 3-2B）。在此基础上，对绿色荧光和荧光素酶的检测发现，在对 TRIM5α 蛋白进行敲降后，基于 HIV-1 的慢病毒的绿色荧光表达量较 NC 组有提高（图 3-2C），荧光素酶的表达量提高了 5-6 倍（图 3-2D），该结果证明，MDBK 细胞中的 TRIM5α 能够抑制基于 HIV-1 慢病毒的转导效率。

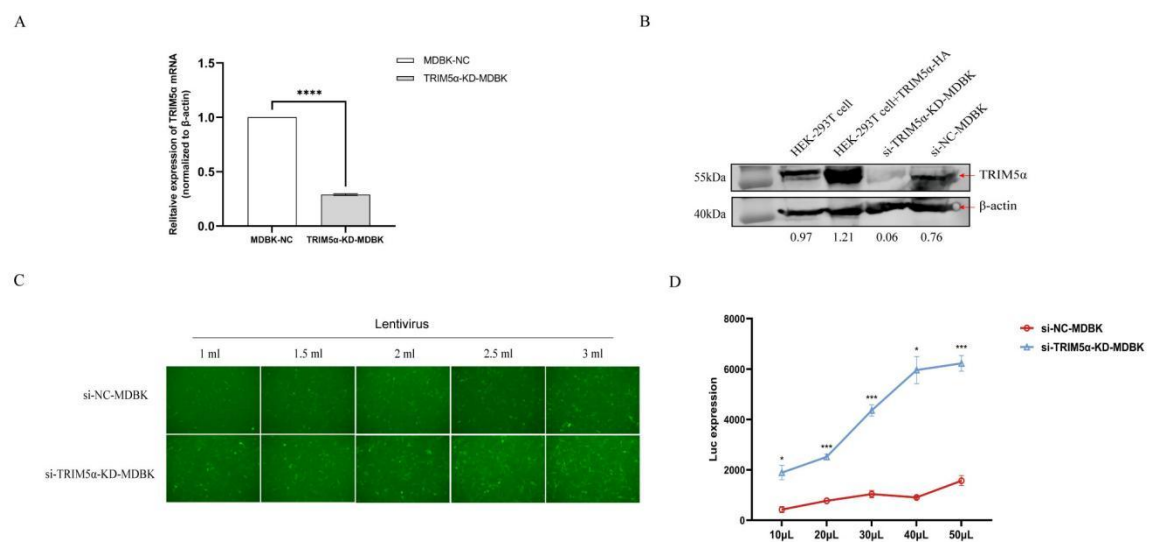


图 3-2 siRNA 介导的 TRIM5α敲降和敲降 TRIM5α后慢病毒的感染

Fig. 3-2 siRNA-mediated knockdown of TRIM5α and infection of lentivirus after knockdown of TRIM5α

A. 荧光定量 PCR 检测 siRNA 敲降后 TRIM5α的细胞内表达量；B. Western blot 检测 siRNA 敲降后 TRIM5α 的胞内表达量；C. siRNA 敲降 TRIM5α后感染不同 MOI 表达绿色荧光蛋白的慢病毒；D. siRNA 敲降 TRIM5α后感染不同 MOI 表达荧光素酶的慢病毒

A. Quantitative Real-time RT-PCR to detect the intracellular expression level of TRIM5α after siRNA knockdown; B. Western blot to detect the intracellular expression level of TRIM5α after siRNA knockdown; C. Infecting lentivirus expressing green fluorescent protein at different MOIs after knocking down TRIM5α by siRNA; D. Infecting lentiviruses expressing luciferase at different MOIs after knocking down TRIM5α by siRNA

3.3.2 诱导型 Cas9 过表达细胞系的构建与鉴定

为了提高后续基于 CRISPR/Cas9 技术进行基因编辑的效率，本研究首先构建了 Cas9 过表达 MDBK 细胞系。通过对野生型 MDBK 细胞（MDBK-WT）感染包装后的慢病毒，从而将可诱导表达的 Cas9 基因插入 MDBK 细胞基因组中。首先，我们进行了细胞筛选药物杀稻瘟菌素（Blasticidin）及 Cas9 蛋白诱导药物多西环素（Doxycycline）终浓度的摸索，最终确定当 Blasticidin 终浓度为 6 $\mu\text{g/mL}$ 时，在培养 7 天后未处理的 MDBK 细胞全部死亡，故选择 Blasticidin 的终浓度为 6 $\mu\text{g/mL}$ （见表 3-2）；而 3-12 $\mu\text{g/mL}$ 的 Doxycycline 对 MDBK 细胞状态不产生影响，故选择 Doxycycline 终浓度为 3 $\mu\text{g/mL}$ （见表 3-3）。基于以上实验结果，我们在感染了慢病毒的 MDBK 细胞中加入终浓度为 6 $\mu\text{g/mL}$ 的 Blasticidin 进行药物筛选，并在筛选后的细胞中加入了终浓度为 3 $\mu\text{g/mL}$ 的 Doxycycline，诱导 Cas9 蛋白的表达，并进行了 Western blot 验证（图 3-3A）。结果表明，该细胞系在加入药物 Doxycycline 后能够表达 Cas9 蛋白，故 Cas9 诱导过表达 MDBK 细胞系（MDBK-inducible Cas9 overexpression cell line）被成功构建，定义为 MDBK-iCas9。

表 3-2 杀稻瘟菌素浓度梯度摸索

Table 3-2 Exploring the concentration gradient of blasticidin

Blasticidin ($\mu\text{g/mL}$)	24h	48h	72h	96h
0	++++	++++	++++	++++
3	++++	++++	+++	++
6	++++	+++	+	-
9	+++	++	-	-
12	++	+	-	-

注：++++代表存活率 100%，+++代表存活率 75%，++代表存活率 50%，+代表存活率 25%，-代表存活率 0。

表 3-3 多西环素浓度梯度摸索

Table 3-3 Exploring the concentration gradient of doxycycline

Doxycycline ($\mu\text{g/mL}$)	24h	48h	72h	96h
0	++++	++++	++++	++++
3	++++	++++	++++	++++
6	++++	++++	++++	++++
9	++++	++++	++++	++++
12	++++	++++	++++	++++

注：++++代表存活率 100%，+++代表存活率 75%，++代表存活率 50%，+代表存活率 25%，-代表存活率 0。

3.3.3 真核表达 TRIM5 α 蛋白及 sgRNA 有效性鉴定

利用同源重组技术构建 *TRIM5 α* 基因的真核表达质粒 pCAGGS-HA-TRIM5 α ，对获得的重组质粒进行 PCR 鉴定，结果如图 3-3B 显示，我们获得了约为 1.5 kB 的 *TRIM5 α* 基因片段，与预期相符，而空载体未扩增出相应条带。扩增基因片段的序列测定以及开放阅读框分析均与预期相符，表明 pCAGGS-HA-TRIM5 α 表达质粒构建正确。将构建的 pCAGGS-HA-TRIM5 α 与

LentiCRISPRV₂EGFP-TRIM5 α -sgRNA1-3 质粒以 2:1 的比例共转染 HEK-293T 细胞, 共转染 6 μ g 质粒, 并在转染后 48 h 收取细胞样品进行 Western bolt 检测, 结果如图 3-2C 所示, 在 55 kDa 出现特异性条带。从 Western bolt 结果 (图 3-3A) 可看出, 与共转染了 pCAGGS-HA-TRIM5 α 和 LentiCRISPRV₂EGFP 质粒的 TRIM5 α 表达量相比, 共转染了 pCAGGS-HA-TRIM5 α 与 LentiCRISPRV₂EGFP-TRIM5 α -sgRNA2 的细胞内 TRIM5 α 表达量和共转染了 pCAGGS-HA-TRIM5 α 与 LentiCRISPRV₂EGFP-TRIM5 α -sgRNA3 的细胞内 TRIM5 α 表达量有明显降低, 而共转染了 pCAGGS-HA-TRIM5 α 与 LentiCRISPRV₂EGFP-TRIM5 α -sgRNA1 的细胞内 TRIM5 α 表达量未发生明显降低。由此表明, LentiCRISPRV₂EGFP-TRIM5 α -sgRNA2 和 LentiCRISPRV₂EGFP-TRIM5 α -sgRNA3 对 TRIM5 α 的敲除效果最好。

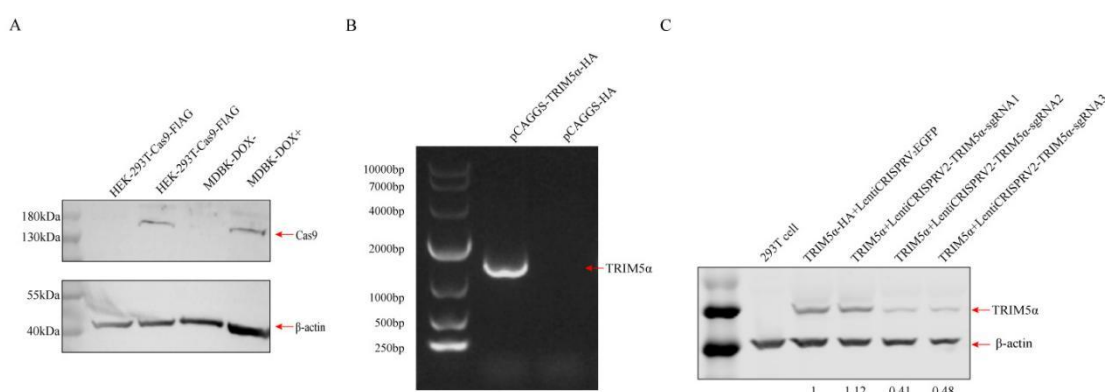


图 3-3 诱导型 Cas9 过表达细胞系的鉴定及 sgRNA 的筛选

Fig. 3-3 Identification of inducible Cas9 overexpression cell lines and screening of sgRNA

A. Western blot 检测四环素诱导后 Cas9 过表达细胞系中 Cas9 蛋白的表达; B. pCAGGS-TRIM5 α -HA 质粒的酶切鉴定; C. Western blot 检测与 sgRNA 共转染至 293T 细胞中的牛 TRIM5 α 蛋白的表达量

A. Western blot identification of Cas9 protein expression in Cas9 overexpression cell line after doxycycline induced; B. pCAGGS-TRIM5 α -HA plasmid identification by enzyme digestion; C. Western blot detection of bovine TRIM5 α of 293T cells that co-transfected with sgRNA and pCAGGS-TRIM5 α -HA plasmid

3.3.4 TRIM5 α 敲除的 MDBK-iCas9 细胞系的筛选与鉴定

将成功构建的含有特异性识别 TRIM5 α 的 LentiCRISPRV₂EGFP-TRIM5 α -sgRNA3 重组质粒转染至 MDBK-iCas9 细胞, 在细胞内以 Cas9 导向 RNA 识别靶位点并对靶位点进行剪切, 继而对转染细胞进行流式细胞单克隆分选。培养至 48 孔板后, 提取单克隆细胞 DNA, 对 TRIM5 α 靶点区域片段进行 PCR 扩增, 对 PCR 产物 TA 克隆后测序, 并与 MDBK-WT 细胞中的 TRIM5 α 序列进行比对。结果如图 3-4A 所示, 与野生型 MDBK 相比, 44 号单克隆在靶点区域等位基因发生了 5 bp 的缺失, 由此造成了基因的移码突变, 使 TRIM5 α 蛋白无法正常表达。同时, 我们对该单克隆细胞与 MDBK-WT 细胞进行了 Western blot 鉴定, 以验证 TRIM5 α 敲除细胞的 TRIM5 α 蛋白表达情况 (图 3-4B)。根据 Western blot 结果我们可以看出, TRIM5 α 敲除单克隆细胞中的 TRIM5 α 表达量要显著低于 MDBK-WT 细胞, 因此, 本实验成功构建了 TRIM5 α 敲除细胞系, 定义该细胞系为 MDBK-iCas9^{TRIM5 α -/-}。同时,

我们对 MDBK-iCas9^{TRIM5α} 细胞进行了细胞增殖活性检测。结果显示, *TRIM5α* 的敲除不影响 MDBK 细胞的增殖活性 (图 3-4C)。

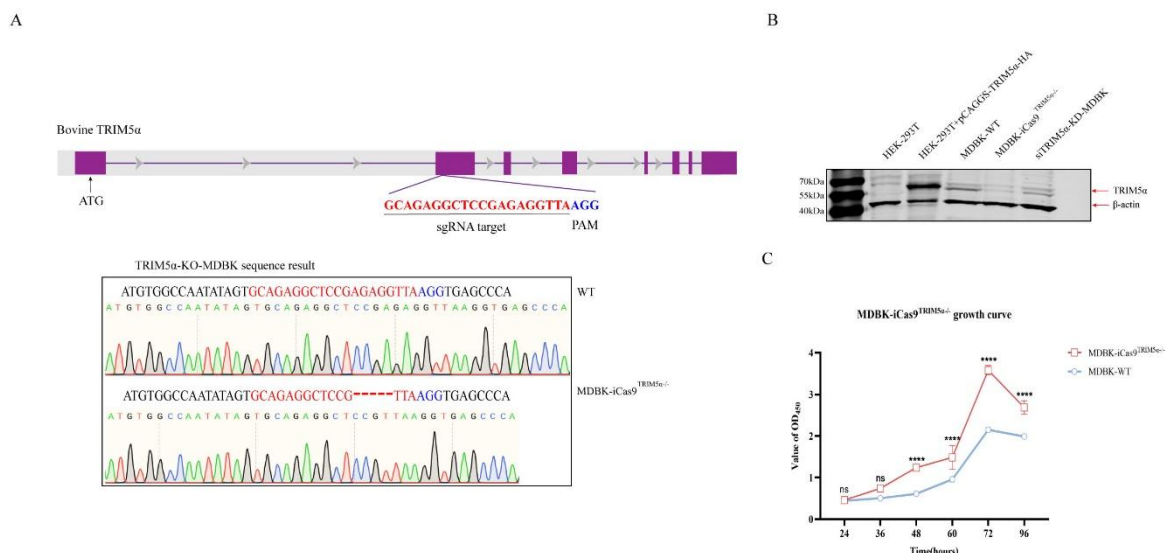


图 3-4 *TRIM5α* 敲除的 MDBK-iCas9 细胞系的鉴定

Fig. 3-4 Identification of *TRIM5α* knockout in MDBK-iCas9 cell line

A. *TRIM5α* 敲除细胞系的测序结果; B. Western blot 检测 *TRIM5α* 敲除 MDBK 细胞系中 *TRIM5α* 蛋白的表达量; C. *TRIM5α* 敲除细胞系的细胞增殖活性检测

A. Sequencing results of the *TRIM5α* knockout cell lines; B. Detection of the *TRIM5α* expression level of the *TRIM5α* knockout cell line; C. Detection of the proliferation activity of the *TRIM5α* knockout cell line

3.4 讨论

慢病毒转导是基因编辑的一种重要方式, 目前广泛应用于哺乳动物细胞。然而, 通过对 HEK-293T 细胞和 MDBK 细胞感染不同滴度的慢病毒, 我们发现, 基于 HIV-1 的慢病毒在 MDBK 细胞上的转导效率非常低。为了探究 *TRIM5α* 蛋白是否是 MDBK 细胞中抑制慢病毒复制的蛋白, 我们通过靶向 *TRIM5α* 的 siRNA 降低了 *TRIM5α* 蛋白的表达, 并分别通过 mRNA 定量检测和 Western blot 进行了验证。在对敲降 *TRIM5α* 的 MDBK 细胞和 MDBK-WT 细胞感染基于 HIV-1 的慢病毒后, 我们发现, 与 MDBK-WT 细胞上的转导效率相比, 敲降 *TRIM5α* 的 MDBK 细胞中的慢病毒 EGFP 表达量和 Luciferase 表达量都有了显著提高。因此, *TRIM5α* 是 MDBK 细胞中抑制慢病毒转导的一个重要蛋白, 后续实验中, 可以通过对 *TRIM5α* 进行基因敲除来进一步提高慢病毒在 MDBK 细胞上的转导效率, 从而提高基因编辑的效率。

目前基于慢病毒的 CRISPR-Cas9 技术已被有效的用于多种用途, 例如基因敲除、内源性基因表达调控、染色体位点的活细胞标记, 单链 RNA 的编辑和高通量基因筛选等 (MANGHWAR et al., 2019; NAKAYAMA and SHIODA, 2010)。因此, 为了提高基于慢病毒的 CRISPR/Cas9 基因编辑技术在 MDBK 细胞上的编辑效率, 我们首先构建了可用 Doxycycline 诱导的 Cas9 过表达 MDBK 细胞系。由于 Cas9 蛋白的大小约为 180kDa, 因此稳定过表达 Cas9 蛋白可能导致细胞活力的下降,

而诱导过表达 Cas9 蛋白的细胞系则避免了影响细胞的增殖活性，同时，在慢病毒感染前或表达 sgRNA 的质粒转染前使用 Doxycycline 处理可以提高基因编辑的效率。

2004 年，TRIM5 α 被确定为是对于 HIV-1 感染具有有效的阻断作用，且这种作用发生于病毒进入细胞后，因此近些年来 TRIM5 α 蛋白对于抗慢病毒方面的功能被广泛研究(Nakayama, 2010 #166)。前期通过 siRNA 试验，我们也发现 TRIM5 α 是 MDBK 细胞中抑制慢病毒转导的一个重要蛋白，为了提高基于 HIV-1 的慢病毒在 MDBK 细胞上的转导效率，本研究通过 CRISPR/Cas9 技术，对 MDBK-iCas9 细胞中 *TRIM5 α* 的基因进行了敲除。首先，我们在 *TRIM5 α* 基因的第二条外显子上设计了三条 sgRNA，并将 sgRNA 与带有 HA 标签的牛 TRIM5 α 蛋白真核表达质粒共转染至 HEK-293T 细胞中，并以 TRIM5 α 蛋白的表达水平反应 sgRNA 的有效性。可看出在三条 sgRNA 中，有两条 sgRNA 有效。在此基础上，通过将靶向 *TRIM5 α* 基因的 LentiCRISPRV₂EGFP-TRIM5 α -sgRNA 质粒转染至细胞中，使用流式细胞分选对表达绿色荧光蛋白的 MDBK 细胞进行单克隆筛选，经测序鉴定，得到了 TRIM5 α 敲除的 MDBK 单克隆细胞系。以慢病毒转导的方式构建细胞系会导致靶向 TRIM5 α 的 sgRNA 整合到 MDBK 细胞的基因组中，影响后续的基因编辑。而本研究通过转染的方式构建 TRIM5 α 敲除细胞系避免了 sgRNA 的插入，因此该细胞系适用于后续基因编辑。

第四章 具有高效基因编辑能力的 MDBK 细胞系的应用

在构建了 MDBK-iCas9^{TRIM5 α -/-}细胞系后,本研究使用表达 EGFP 和 Luciferase 蛋白的慢病毒对 MDBK-iCas9^{TRIM5 α -/-}细胞系进行了感染,以检测 TRIM5 α 敲除对慢病毒转导效率产生的影响。本研究发现,在对 TRIM5 α 进行敲除后,慢病毒的转导效率提升了 10 倍以上;同时,我们使用小分子药物 CsA 对 MDBK-iCas9^{TRIM5 α -/-}细胞系进行了处理,进一步提高了慢病毒在 MDBK-iCas9^{TRIM5 α -/-}细胞系中的转导效率。同时,为了确定该细胞系在实际基因编辑中的效率,本研究在 MDBK 细胞系和 MDBK-iCas9^{TRIM5 α -/-}细胞系对无关基因 A 进行敲除,比较两者的基因编辑效率。该实验证明本细胞系具有更高的基因编辑效率。最后,为了确定 TRIM5 α 敲除是否导致 MDBK 细胞对其他易感病毒的感染性发生改变,本研究使用不同 MDBK 细胞的易感病毒分别感染 MDBK 细胞和 MDBK-iCas9^{TRIM5 α -/-}细胞,证明了本研究构建的 MDBK-iCas9^{TRIM5 α -/-}细胞系对多数病毒在其上的易感性不产生明显改变。

4.1 实验材料

4.1.1 细胞、病毒和质粒载体

BVDV 毒株 1c, BPIV3 和 BHV-1 由本实验室保存, BVDV 毒株 2a-HLJ-10 由东北农业大学高明春教授提供。慢病毒载体 LentiCRISPRV₂Puro 由本实验室储存。

4.1.2 实验试剂

嘌呤霉素 (Puromycin) 购自 Sigma 公司; 环孢霉素 A (CsA) 购自 MCE 公司; 4%多聚甲醛购自 Biosharp 公司; 鼠源 BVDV-E2 抗体 (mAb) 和兔源 BPIV3 多克隆抗体 (pAb) 购自 VMRD 公司; DAPI 购自碧云天公司。

4.1.3 仪器设备

Elx808 酶标仪 (BioTek 公司)。

4.2 实验方法

4.2.1 慢病毒感染

详细步骤同 3.2.4。

4.2.2 基于 MDBK-iCas9^{TRIM5 α -/-}的 A 基因敲除细胞系的构建

将 HEK-293T 细胞以 5×10^6 的密度接种于 150mm 的平皿中,继续于 37°C 培养箱中过夜培养,待细胞密度约为 60%-70%时,将慢病毒质粒 LentiCRISPRV₂Puro-geneA-sgRNA (sgRNA 序列见表 3-1, 基因 A sgRNA) 和包装质粒 psPAX2 和 pVSVg 以 3:3:1 的比例以转染试剂 PEI 共转染至

HEK-293T 细胞中, 分别于 24 h, 48 h, 72 h 收取含有重组慢病毒的上清, 并于 4°C 超速离心机中以 20000 g/min 离心 2 h。弃去上清后, 使用无血清培养基对慢病毒进行重悬, 并置于 4°C 摇床中继续重悬 12 h。重悬后的慢病毒用于感染细胞或储存于 -80°C 冰箱。

将待感染的 MDBK-iCas9^{TRIM5α}^{-/-}细胞以 5×10^5 /孔的密度接种于六孔板中, 继续于 37°C 培养箱中过夜培养, 待细胞密度约为 70% 时, 使用重悬后的慢病毒感染细胞。在 37°C 培养箱中培养继续培养 4 h 后, 对细胞进行换液。在感染 48 h 后, 对细胞进行消化并转入新的六孔板中继续培养, 在生长密度约为 60% 时向感染了慢病毒的细胞孔和作为对照的未处理细胞孔中加入终浓度为 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的嘌呤霉素 (Puromycin), 每隔 48 h 更换含有 Puromycin 的新鲜培养基, 继续培养 48 h 至对照组细胞全部死亡。

4.2.3 基于 MDBK-iCas9^{TRIM5α}^{-/-}的 A 基因敲除细胞系的测序鉴定

利用 DNA 提取试剂盒提取筛选后细胞群的 DNA, 使用 Taq 酶和特异性引物扩增基因 A 包含 sgRNA 位置的 DNA (引物见表 3-1, 基因 A-KO 鉴定引物-F/R)。对 PCR 产物进行胶收纯化后, 将基因 A 片段连接至 pMD18-T 载体, 并转化至 DH5 α 感受态。挑取单克隆菌落并使用 T 载体引物进行测序鉴定。

4.2.4 其它 MDBK 细胞易感病毒感染 MDBK-iCas9^{TRIM5α}^{-/-}细胞

将待感染的 MDBK-iCas9^{TRIM5α}^{-/-}细胞和 MDBK-WT 细胞按照 5×10^4 /孔的密度接种于 24 孔板中, 继续在 37°C 培养箱中培养至细胞长满单层后, 弃去细胞原培养基, 使用 PBS 洗涤细胞 3 次, 换成含有 2% FBS 的细胞培养基, 将 BPIV3 和 BHV-1 以 MOI=0.1 感染细胞, 或换成含有 2% 马血清的细胞培养基, 将 BVDV 以 MOI=0.1 感染细胞, 37°C 培养 2 h 后, 弃去含有病毒的细胞培养基, 将细胞继续在培养箱中培养, 并于感染后 48h 使用 4% 多聚甲醛室温固定细胞 30 min, 或放置于 -80°C 冰箱用于后续实验。

4.2.5 间接免疫荧光检测

将使用 4% 多聚甲醛固定的细胞使用 PBS 洗涤 3 次; 使用 0.2% Triton X-100 在室温下静置透膜 10 min, 使用 PBS 洗涤 3 次; 加入含有 1% BSA 和 10% 山羊血清的 PBS 室温封闭 1 h, 使用 PBS 洗涤 3 次; 加入稀释好的兔抗 BPIV3 多抗 (1: 200 稀释) 或鼠抗 BVDV-E2 单抗 (1: 1000 稀释) 分别于 37°C 孵育 1 h, 使用 PBS 洗涤 3 次; 分别以 488 标记羊抗兔 IgG 二抗或 488 标记羊抗鼠 IgG 二抗避光条件下室温孵育 1 h, 使用 PBS 洗涤 3 次; 最后用 DAPI 避光孵育 10 min, PBS 洗 3 次, 置于倒置荧光显微镜下进行荧光拍照。

4.2.6 实时荧光定量 PCR 检测

本研究采用实时荧光定量 PCR 方法检测病毒基因组的复制水平。首先按照 2.2.4 中的方法提取总 RNA, 直接使用 RNA 进行荧光定量 PCR。20 μL 的体系为 10 μL 2 $\times$ One Step U+ Mix、1 μL One Step U+ Enzyme Mix、0.4 μL 50 $\times$ ROX Reference Dye 1、0.4 μL 上游引物、0.4 μL 下游引物、

0.2 μ L 探针、1 μ L 模板 RNA、其余用 ddH₂O 补齐。反应条件为：55°C 15 min、95°C 30 sec；95°C 10 sec、54°C 30 sec，共 45 个循环。每个样品 4 个重复，利用 Applied Biosystems 进行 PCR 程序及数据收集，使用标准曲线计算病毒基因组的含量（特异性引物序列见表 4-1，qPCR 引物）。

表 4-1 本章中所用引物

Table 4-1 Primers used in this chapter

引物名称	序列 (5'-3')
基因 A sgRNA	GATGAAGACGATGAGAGCAG
基因 A-KO 鉴定引物-F	TCCATGGAATTCTCTAGGCAAGAATA
基因 A-KO 鉴定引物-R	GGGAAGCTAGAAGAATCTGATAAGG
qPCR-BVDV-F	TCGAGATGCCACGTGGAC
qPCR-BVDV-R	ATGTGCCATGTACAGCAGA
qPCR-BVDV-Pro	CY5-ACCCTATCAGGCTGT-MGB
qPCR-BHV-1-F	CCGCCAATAACAGCGTAGA
qPCR-BHV-1-R	CCGTTGTACTGCAGCACAA
qPCR-BHV-1-Pro	FAM-CCTCCGGGCTTTAC-MGB
qPCR-BPIV3-F	CAGGAACCTCCTACAAGCCGC
qPCR-BPIV3-R	CATGGGTACAGTTCAGGTTTAATG
qPCR-BPIV3-Pro	VIC-CTATCATCTCCGTGGC-MGB

4.3 结果

4.3.1 TRIM5 α 敲除提高了慢病毒的转导效率

为了检测 TRIM5 α 对慢病毒转导效率的影响，我们对 MDBK-iCas9^{TRIM5 α -/-}细胞和 MDBK-WT 细胞分别感染了表达绿色荧光蛋白和荧光素酶的慢病毒，并在感染后 48 h 对细胞进行拍照、流式细胞分析和荧光素酶检测。由倒置荧光显微镜在慢病毒感染后 48 h 拍照结果显示（图 4-1A），MDBK-iCas9^{TRIM5 α -/-}细胞的绿色荧光蛋白的表达量要高于 MDBK-WT 细胞，且对其进行流式细胞分析后也可以看出 MDBK-iCas9^{TRIM5 α -/-}细胞的绿色荧光蛋白表达量约比 MDBK-WT 细胞高 10 倍以上（图 4-1B）；对荧光素酶检测值结果进行分析（图 4-1C），MDBK-iCas9^{TRIM5 α -/-}细胞的荧光素酶表达量在 24 h 和 60 h 是 MDBK-WT 细胞的 20 倍；在 36 和 48 h 的表达量是 MDBK-WT 细胞的 100 倍以上；在 72 h 的表达量是 MDBK-WT 的 60 倍。因此，TRIM5 α 的敲除可以大幅度提高慢病毒的转导效率。为了进一步提高慢病毒在 MDBK-iCas9^{TRIM5 α -/-}细胞上的转导效率，我们使用了慢病毒抑制蛋白 CypA 的竞争性抑制药物 CsA 以 2 μ M/mL 的浓度对 MDBK 细胞和 MDBK-iCas9^{TRIM5 α -/-}细胞进行预处理，并感染了表达绿色荧光蛋白和荧光素酶的慢病毒，并于并在感染后 48 h 对细胞进行拍照、流式细胞分析和荧光素酶检测。由图 4-1A, B 的绿色荧光蛋白分析结果可以看出，CsA 的预处理使 MDBK-iCas9^{TRIM5 α -/-}细胞及 MDBK-WT 细胞的绿色荧光蛋白的表达量都增加了 2-3 倍左右。通过对荧光素酶的检测（图 4-1C），我们发现经过 CsA 预处理的

MDBK-WT 细胞在 24 h、60 h 和 72 h 的荧光素酶的表达量约增加了 2-3 倍；在 36 h 和 48 h 增加了约 10 倍，经过 CsA 预处理的 MDBK-iCas9^{TRIM5a}-/- 细胞在 24 h 和 48 h 的荧光素酶的表达量约提高了 4 倍；在感染后 36 h、60 h、和 72 h 的荧光素酶表达量提高了 6-10 倍。上述结果表明，在使用 CsA 对细胞进行预处理后，可以提高 *TRIM5a* 敲除 MDBK 细胞和 MDBK-WT 细胞的慢病毒转导效率。

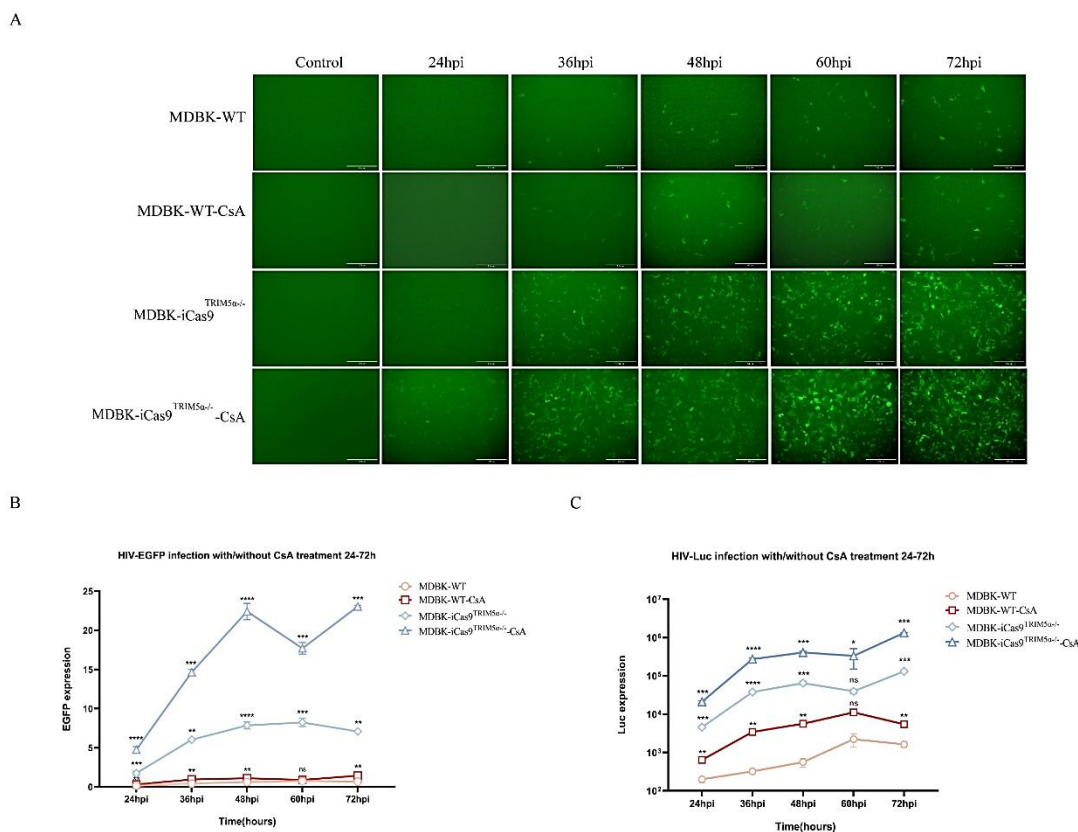


图 4-1 使用表达绿色荧光蛋白的慢病毒感染 MDBK-iCas9^{TRIM5a}-/- 细胞和 MDBK-WT 细胞

Fig. 4-1 Infect MDBK-iCas9^{TRIM5a}-/- cells and MDBK-WT cells with lentivirus expressing green fluorescent protein

A. 使用表达绿色荧光蛋白的慢病毒感染 CsA 预处理或未处理过的 MDBK-iCas9^{TRIM5a}-/- 细胞和 MDBK-WT 细胞 24 h、36 h、48 h、60 h、72 h 后，使用倒置荧光显微镜对绿色荧光蛋白进行检测；B. 使用表达绿色荧光蛋白的慢病毒感染 CsA 预处理或未处理过的 MDBK-iCas9^{TRIM5a}-/- 细胞和 MDBK-WT 细胞 24 h、36 h、48 h、60 h、72 h 后，使用流式细胞术对绿色荧光蛋白进行检测；C. 使用表达荧光素酶的慢病毒感染 CsA 预处理或未处理过的 MDBK-iCas9^{TRIM5a}-/- 细胞和 MDBK-WT 细胞 24 h、36 h、48 h、60 h、72 h 后，使用酶标仪对荧光素酶进行检测

A. Using lentivirus expressing green fluorescent protein to infect the CsA-pretreated or non-pretreated MDBK-iCas9^{TRIM5a}-/- cells and MDBK-WT cells for 24 h, 36 h, 48 h, 60 h, and 72 h, and detecting green fluorescent protein using inverted fluorescence microscopy; B. After using lentivirus expressing green fluorescent protein to infect the CsA-pretreated or untreated MDBK-iCas9^{TRIM5a}-/- cells and MDBK-WT cells for 24 h, 36 h, 48 h, 60 h, and 72 h, the green fluorescent protein was detected using flow cytometry; C. After using lentivirus expressing luciferase to infect the

CsA-pretreated or non-pretreated MDBK-iCas9^{TRIM5a-/-} cells and MDBK-WT cells for 24 h, 36 h, 48 h, 60 h, and 72 h, the luciferase was detected using a microplate reader

4.3.2 MDBK-iCas9^{TRIM5a-/-}细胞具有更高的基因编辑效率

为了检测 MDBK-iCas9^{TRIM5a-/-}细胞在基于 HIV-1 的慢病毒进行的基因编辑中的实际效率，我们构建了以 MDBK-iCas9^{TRIM5a-/-}细胞和 MDBK-WT 细胞为基础的基因 A 敲除细胞系，并对基因编辑效率进行对比。对测序结果（图 4-2）进行分析，我们发现基于 MDBK-WT 细胞构建敲除细胞系后，每 10 个单克隆菌落有 7 株成功敲除，故敲除效率约为 70%；而基于 MDBK-iCas9^{TRIM5a-/-}细胞系加入浓度为 3 μg/mL 的 Doxycycline 处理后构建敲除细胞系，每 10 个单克隆菌落有 10 株成功敲除，敲除效率约为 100%。因此，本研究构建的 MDBK-iCas9^{TRIM5a-/-}细胞系可以极大的提高慢病毒转导效率和基于 CRISPR/Cas9 技术的基因编辑效率。



图 4-2 以 MDBK-iCas9^{TRIM5a-/-} 细胞和 MDBK-WT 细胞为基础构建基因 A 敲除细胞系

Fig. 4-2 Construction of gene A knockout cell line based on the MDBK-iCas9^{TRIM5α} cell line and the MDBK-WT cell line

4.3.3 *TRIM5α* 敲除对其它 MDBK 易感病毒的感染性没有显著影响

为了检测 *TRIM5α* 对其他病毒感染的影响，我们对 MDBK-iCas9^{TRIM5α} 细胞和 MDBK-WT 细胞分别以 MOI=0.1 感染牛疱疹病毒 1 型病毒（Bovine Herpes Virus 1, BHV-1）和牛副流感 3 型病毒（Bovine Parainfluenza Virus 3, BPIV3），以及 MOI=0.1 感染不同基因亚型的牛病毒性腹泻病毒（Bovine Viral Diarrhea Virus, BVDV），并在接种后 48 h 对细胞进行间接免疫荧光 IFA 检测和 qPCR 检测。在病毒感染后 48 h 进行间接免疫荧光并于倒置显微镜下拍照（图 4-3A），并通过 qPCR 确定病毒的 mRNA 水平（图 4-3B）。比较发现 MDBK-iCas9^{TRIM5α} 细胞和 MDBK-WT 细胞在 BHV-1, BPIV-3 和不同亚型的 BVDV 在感染后于细胞形态以及细胞病变程度方面均未发现明显差异。

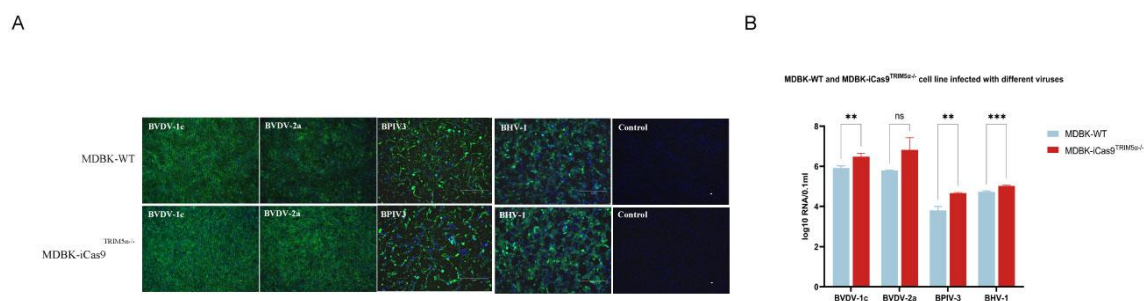


图 4-3 使用不同病毒感染 MDBK-iCas9^{TRIM5α} 细胞和 MDBK-WT 细胞

Fig. 4-3 MDBK-iCas9^{TRIM5α} cells and MDBK-WT cells infected with different viruses

- A. 对 MDBK-iCas9^{TRIM5α} 细胞和 MDBK-WT 细胞分别感染不同病毒后 48 h 进行 IFA 鉴定；B. 对 MDBK-iCas9^{TRIM5α} 细胞和 MDBK-WT 细胞分别感染不同病毒后 48 h 的 qPCR 鉴定
- A. IFA identification of MDBK-iCas9^{TRIM5α} cells and MDBK-WT cells that infected with different viruses 48 h; B. qPCR identification of MDBK-iCas9^{TRIM5α} cells and MDBK-WT cells that infected with different viruses 48 h

4.4 讨论

通过对 MDBK-iCas9^{TRIM5α} 细胞和 MDBK-WT 细胞感染表达绿色荧光蛋白和荧光素酶的慢病毒，我们发现，绿色荧光蛋白的表达量在 MDBK-iCas9^{TRIM5α} 细胞中最高提高了 15 倍，荧光素酶的表达量提高了 100 倍。这说明 MDBK 细胞中的 HIV-1 慢病毒的感染主要受到了 *TRIM5α* 的阻断。同时，也有研究证明牛 *TRIM5α* 还可以限制包括 FIV 和 EIAV 在内的多种慢病毒（MORIZAKO et al., 2022）的感染。在本实验中我们通过 CRISPR-Cas9 技术对 MDBK 细胞中的 *TRIM5α* 进行了敲除，为后续研究后续病毒与宿主蛋白互作构建了体外模型，同时为其他牛源细胞系 *TRIM5α* 的敲除提供了敲除靶点。

同时，为了进一步提高慢病毒的转导效率，我们使用 CypA 竞争性抑制药物 CsA 对 MDBK-iCas9^{TRIM5α} 细胞和 MDBK-WT 细胞进行预处理，并感染了表达 EGFP 和 Luciferase 的慢病毒。在猴细胞中，药物 CsA 可以通过与 CypA 竞争性结合，从而抑制 CypA 的抗病毒活性，提高

慢病毒的转导效率。我们发现在使用 CsA 对 MDBK 细胞进行处理后, 绿色荧光蛋白和荧光素酶的表达量能够在 MDBK-iCas9^{TRIM5 α -/-}细胞和 MDBK-WT 细胞的原有表达量上进一步提高 2-3 倍。值得关注的是, 药物 CsA 在人类细胞 HEK-293T 中能够限制 HIV-1 病毒的感染, 而在猴细胞 Vero-E6 中能够提高 HIV-1 病毒的感染(Zhao et al., 2023)(Towers et al., 2003)。这是因为猴细胞中的 *CypA* 基因组被整合到了 *TRIM5 α* 基因中, 因而能够与 TRIM5 α 共同发挥对 HIV-1 病毒的抑制作用, 因而 CsA 通过与 *CypA* 的结合, 抑制了猴细胞中 TRIM5 α 和 *CypA* 对 HIV-1 病毒的阻断; 而人细胞中 *CypA* 能够通过与 HIV-1 病毒 CA 蛋白结合, 提高 HIV-1 的稳定性, 从而促进 HIV-1 病毒的感染。CsA 通过与 *CypA* 结合, 抑制了人细胞中 *CypA* 对慢病毒的促进作用。而对于 MDBK 细胞和 *TRIM5 α* 敲除的 MDBK 细胞, CsA 仍能提高基于 HIV-1 慢病毒的转导效率; 该现象与猴细胞 Vero-E6 中的现象相似, 说明 MDBK 细胞中的 TRIM5 α 蛋白和 *CypA* 蛋白能够共同抑制 MDBK 细胞中 HIV-1 慢病毒的感染, 同时, 由于对 TRIM5 α 的敲除未影响 *CypA* 的表达, 说明 *CypA* 不依赖于 TRIM5 α 蛋白发挥抗病毒功能。

为了确定 MDBK-iCas9^{TRIM5 α -/-}细胞在实际基因编辑中的慢病毒转导效率, 我们通过慢病毒感染的方式构建了慢病毒无关基因 *A* 的敲除细胞系。通过 TA 克隆的方式对药筛后细胞群的 DNA 进行测序的方式, 避免了敲除细胞系的单克隆细胞株因活性不同导致测序结果不够均一的问题。通过对测序结果的分析, 我们发现, 使用西四环素诱导 Cas9 过表达的 MDBK-iCas9^{TRIM5 α -/-}细胞系能够大幅度提高基于慢病毒的基因编辑效率。该细胞系的成功构建为后续对牛 MDBK 细胞进行基因编辑, 研究病毒与宿主互作提供了效率极高的体外模型, 为后续的研究奠定了基础。

由于 *TRIM5 α* 在慢病毒感染过程中可以通过调控 *AP-1* 和 *NF- κ B* 信号通路间接发挥抗病毒作用(Aiken, 2011 #179), *TRIM5 α* 的缺失可能会导致这些信号通路的失衡, 从而影响细胞增殖或对其他病毒的易感性产生变化。因此本文对 MDBK-iCas9^{TRIM5 α -/-}细胞系进行了 CCK-8 细胞增殖活性检测来检测细胞的生长增殖活性, 并使用不同能够感染 MDBK 细胞的病毒, 包括 BVDV、BHV-1、BPIV-3 对 MDBK-iCas9^{TRIM5 α -/-}细胞进行了感染实验, 实验结果证明, MDBK-iCas9^{TRIM5 α -/-}细胞株与 MDBK-WT 细胞均未发现明显差别, 因此 MDBK-iCas9^{TRIM5 α -/-}单克隆细胞株可以用于作为后续基因编辑和研究病毒与宿主互作的体外模型。然而, 由于 *TRIM5 α* 敲除可能会对某些先天免疫通路产生影响, 因此, 该细胞系对于不同病毒感染实验的机制研究需要首先使用 MDBK-WT 细胞作为对照感染组, 确保感染实验无差异后进行。

第五章 结论

1. 对 MDBK 细胞中的 HIV-1 慢病毒限制因子 TRIM5 α 敲除后可以大幅度提高慢病毒的转导效率；
2. MDBK 细胞中的 TRIM5 α 和 CypA 蛋白可能都发挥抑制慢病毒的作用；
3. MDBK-iCas9^{TRIM5 α -/-}细胞系有更高的基因编辑效率，且 TRIM5 α 敲除对（除慢病毒以外的）其他 MDBK 易感病毒的感染性没有显著影响。

参考文献

- ANDERSON J L, CAMPBELL E M, WU X, VANDEGRAAFF N, ENGELMAN A, HOPE T J, 2006. Proteasome inhibition reveals that a functional preintegration complex intermediate can be generated during restriction by diverse TRIM5 proteins. *J Virol*, 80(19):9754-9760. DOI: 10.1128/jvi.01052-06.
- BANGA S S, BOYD J B, 1992. Oligonucleotide-directed site-specific mutagenesis in *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89(5):1735-1739. DOI: 10.1073/pnas.89.5.1735.
- BERKOWITZ R, ILVES H, LIN W Y, ECKERT K, COWARD A, TAMAKI S, VERES G, PLAVEC I, 2001. Construction and molecular analysis of gene transfer systems derived from bovine immunodeficiency virus. *J Virol*, 75(7):3371-3382. DOI: 10.1128/jvi.75.7.3371-3382.2001.
- BERTHOUX L, SEBASTIAN S, SOKOLSKAJA E, LUBAN J, 2005. Cyclophilin A is required for TRIM5 $\{\alpha\}$ -mediated resistance to HIV-1 in Old World monkey cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(41):14849-14853. DOI: 10.1073/pnas.0505659102.
- BHAKTA M S, HENRY I M, OUSTEROUT D G, DAS K T, LOCKWOOD S H, MECKLER J F, WALLEN M C, ZYKOVICH A, YU Y, LEO H, XU L, GERSBACH C A, SEGAL D J, 2013. Highly active zinc-finger nucleases by extended modular assembly. *Genome Res*, 23(3):530-538. DOI: 10.1101/gr.143693.112.
- BLACK L R, AIKEN C, 2010. TRIM5 α disrupts the structure of assembled HIV-1 capsid complexes in vitro. *J Virol*, 84(13):6564-6569. DOI: 10.1128/jvi.00210-10.
- BLESCH A, 2004. Lentiviral and MLV based retroviral vectors for ex vivo and in vivo gene transfer. *Methods*, 33(2):164-172. DOI: 10.1016/j.ymeth.2003.11.005.
- BOCH J, SCHOLZE H, SCHORNACK S, LANDGRAF A, HAHN S, KAY S, LAHAYE T, NICKSTADT A, BONAS U, 2009. Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III effectors. *Science*, 326(5959):1509-1512. DOI: 10.1126/science.1178811.
- BRIGGS A W, RIOS X, CHARI R, YANG L, ZHANG F, MALI P, CHURCH G M, 2012. Iterative capped assembly: rapid and scalable synthesis of repeat-module DNA such as TAL effectors from individual monomers. *Nucleic Acids Res*, 40(15):e117. DOI: 10.1093/nar/gks624.
- BRYANT M, RATNER L, 1990. Myristoylation-dependent replication and assembly of human immunodeficiency virus 1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87(2):523-527. DOI: 10.1073/pnas.87.2.523.
- BUKRINSKY M I, HAGGERTY S, DEMPSEY M P, SHAROVA N, ADZHUBEL A, SPITZ L, LEWIS P, GOLDFARB D, EMERMAN M, STEVENSON M, 1993. A nuclear localization signal within HIV-1 matrix protein that governs infection of non-dividing cells. *Nature*, 365(6447):666-669. DOI: 10.1038/365666a0.
- CAMPBELL E M, WEINGART J, SETTE P, OPP S, SASTRI J, O'CONNOR S K, TALLEY S, DIAZ-GRIFFERO F, HIRSCH V, BOUAMR F, 2016. TRIM5 α -Mediated Ubiquitin Chain

- Conjugation Is Required for Inhibition of HIV-1 Reverse Transcription and Capsid Destabilization. *J Virol*, 90(4):1849-1857. DOI: 10.1128/jvi.01948-15.
- CATHOMEN T, KEITH JOUNG J, 2008. Zinc-finger Nucleases: The Next Generation Emerges. *Mol Ther*, 16(7):1200-1207. DOI: 10.1038/mt.2008.114.
- CERMAK T, DOYLE E L, CHRISTIAN M, WANG L, ZHANG Y, SCHMIDT C, BALLER J A, SOMIA N V, BOGDANOVA A J, VOYTAS D F, 2011. Efficient design and assembly of custom TALEN and other TAL effector-based constructs for DNA targeting. *Nucleic Acids Res*, 39(12):e82. DOI: 10.1093/nar/gkr218.
- CLEMENTS J E, ZINK M C, 1996. Molecular biology and pathogenesis of animal lentivirus infections. *Clin Microbiol Rev*, 9(1):100-117. DOI: 10.1128/cmr.9.1.100.
- CONG L, RAN F A, COX D, LIN S, BARRETTO R, HABIB N, HSU P D, WU X, JIANG W, MARRAFFINI L A, ZHANG F, 2013. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*, 339(6121):819-823. DOI: 10.1126/science.1231143.
- CONSIGLIO A, QUATTRINI A, MARTINO S, BENSADOUN J C, DOLCETTA D, TROJANI A, BENAGLIA G, MARCHESINI S, CESTARI V, OLIVERIO A, BORDIGNON C, NALDINI L, 2001. In vivo gene therapy of metachromatic leukodystrophy by lentiviral vectors: correction of neuropathology and protection against learning impairments in affected mice. *Nat Med*, 7(3):310-316. DOI: 10.1038/85454.
- DALGLEISH A G, BEVERLEY P C, CLAPHAM P R, CRAWFORD D H, GREAVES M F, WEISS R A, 1984. The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus. *Nature*, 312(5996):763-767. DOI: 10.1038/312763a0.
- DEFORGES J, CHAMOND N, SARGUEIL B, 2012. Structural investigation of HIV-1 genomic RNA dimerization process reveals a role for the Major Splice-site Donor stem loop. *Biochimie*, 94(7):1481-1489. DOI: 10.1016/j.biochi.2012.02.009.
- DENG D, YAN C, PAN X, MAHFOUZ M, WANG J, ZHU J K, SHI Y, YAN N, 2012. Structural basis for sequence-specific recognition of DNA by TAL effectors. *Science*, 335(6069):720-723. DOI: 10.1126/science.1215670.
- DIAZ-GRIFFERO F, KAR A, PERRON M, XIANG S H, JAVANBAKHT H, LI X, SODROSKI J, 2007. Modulation of retroviral restriction and proteasome inhibitor-resistant turnover by changes in the TRIM5 α B-box 2 domain. *J Virol*, 81(19):10362-10378. DOI: 10.1128/jvi.00703-07.
- DIAZ-GRIFFERO F, LI X, JAVANBAKHT H, SONG B, WELIKALA S, STREMLAU M, SODROSKI J, 2006a. Rapid turnover and polyubiquitylation of the retroviral restriction factor TRIM5. *Virology*, 349(2):300-315. DOI: 10.1016/j.virol.2005.12.040.
- DIAZ-GRIFFERO F, VANDEGRAAFF N, LI Y, MCGEE-ESTRADA K, STREMLAU M, WELIKALA S, SI Z, ENGELMAN A, SODROSKI J, 2006b. Requirements for capsid-binding and an effector function in TRIM5-mediated restriction of HIV-1. *Virology*, 351(2):404-419. DOI: 10.1016/j.virol.2006.03.023.

- FARSON D, WITT R, MCGUINNESS R, DULL T, KELLY M, SONG J, RADEKE R, BUKOVSKY A, CONSIGLIO A, NALDINI L, 2001. A new-generation stable inducible packaging cell line for lentiviral vectors. *Hum Gene Ther*, 12(8):981-997. DOI: 10.1089/104303401750195935.
- FRANKE E K, YUAN H E, LUBAN J, 1994. Specific incorporation of cyclophilin A into HIV-1 virions. *Nature*, 372(6504):359-362. DOI: 10.1038/372359a0.
- GENTNER B, SCHIRA G, GIUSTACCHINI A, AMENDOLA M, BROWN B D, PONZONI M, NALDINI L, 2009. Stable knockdown of microRNA in vivo by lentiviral vectors. *Nat Methods*, 6(1):63-66. DOI: 10.1038/nmeth.1277.
- GLOOR G B, NASSIF N A, JOHNSON-SCHLITZ D M, PRESTON C R, ENGELS W R, 1991. Targeted gene replacement in *Drosophila* via P element-induced gap repair. *Science*, 253(5024):1110-1117. DOI: 10.1126/science.1653452.
- GOFF S P, 1990. Retroviral reverse transcriptase: synthesis, structure, and function. *J Acquir Immune Defic Syndr* (1988), 3(8):817-831.
- GOFF S P, 1992. Genetics of retroviral integration. *Annu Rev Genet*, 26:527-544. DOI: 10.1146/annurev.ge.26.120192.002523.
- GONZALEZ B, SCHWIMMER L J, FULLER R P, YE Y, ASAWAPORN MONGKOL L, BARBAS C F, 3rd, 2010. Modular system for the construction of zinc-finger libraries and proteins. *Nat Protoc*, 5(4):791-810. DOI: 10.1038/nprot.2010.34.
- GÖTTLINGER H G, SODROSKI J G, HASELTINE W A, 1989. Role of capsid precursor processing and myristoylation in morphogenesis and infectivity of human immunodeficiency virus type 1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 86(15):5781-5785. DOI: 10.1073/pnas.86.15.5781.
- GRATZ S J, CUMMINGS A M, NGUYEN J N, HAMM D C, DONOHUE L K, HARRISON M M, WILDONGER J, O'CONNOR-GILES K M, 2013. Genome engineering of *Drosophila* with the CRISPR RNA-guided Cas9 nuclease. *Genetics*, 194(4):1029-1035. DOI: 10.1534/genetics.113.152710.
- GRISSA I, VERGNAUD G, POURCEL C, 2007. The CRISPRdb database and tools to display CRISPRs and to generate dictionaries of spacers and repeats. *BMC Bioinformatics*, 8:172. DOI: 10.1186/1471-2105-8-172.
- HASHIMOTO M, TAKEMOTO T, 2015. Erratum: Electroporation enables the efficient mRNA delivery into the mouse zygotes and facilitates CRISPR/Cas9-based genome editing. *Sci Rep*, 5:12658. DOI: 10.1038/srep12658.
- HIGH K A, 2020. Turning genes into medicines-what have we learned from gene therapy drug development in the past decade? *Nat Commun*, 11(1):5821. DOI: 10.1038/s41467-020-19507-0.
- HOFMANN W, SCHUBERT D, LABONTE J, MUNSON L, GIBSON S, SCAMMELL J, FERRIGNO P, SODROSKI J, 1999. Species-specific, postentry barriers to primate immunodeficiency virus infection. *J Virol*, 73(12):10020-10028. DOI: 10.1128/jvi.73.12.10020-10028.1999.

- JINEK M, CHYLINSKI K, FONFARA I, HAUER M, DOUDNA J A, CHARPENTIER E, 2012. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*, 337(6096):816-821. DOI: 10.1126/science.1225829.
- KAY M A, GLORIOSO J C, NALDINI L, 2001. Viral vectors for gene therapy: the art of turning infectious agents into vehicles of therapeutics. *Nat Med*, 7(1):33-40. DOI: 10.1038/83324.
- KECKESOVA Z, YLINEN L M, TOWERS G J, 2006. Cyclophilin A renders human immunodeficiency virus type 1 sensitive to Old World monkey but not human TRIM5 alpha antiviral activity. *J Virol*, 80(10):4683-4690. DOI: 10.1128/jvi.80.10.4683-4690.2006.
- KIM S, KIM D, CHO S W, KIM J, KIM J S, 2014. Highly efficient RNA-guided genome editing in human cells via delivery of purified Cas9 ribonucleoproteins. *Genome Res*, 24(6):1012-1019. DOI: 10.1101/gr.171322.113.
- KIM S, LEE M J, KIM H, KANG M, KIM J S, 2011. Preassembled zinc-finger arrays for rapid construction of ZFNs. *Nat Methods*, 8(1):7. DOI: 10.1038/nmeth0111-7a.
- KIM Y G, CHA J, CHANDRASEGARAN S, 1996. Hybrid restriction enzymes: zinc finger fusions to Fok I cleavage domain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93(3):1156-1160. DOI: 10.1073/pnas.93.3.1156.
- KLAGES N, ZUFFEREY R, TRONO D, 2000. A stable system for the high-titer production of multiply attenuated lentiviral vectors. *Mol Ther*, 2(2):170-176. DOI: 10.1006/mthe.2000.0103.
- KUTLUAY S B, PEREZ-CABALLERO D, BIENIASZ P D, 2013. Fates of retroviral core components during unrestricted and TRIM5-restricted infection. *PLoS Pathog*, 9(3):e1003214. DOI: 10.1371/journal.ppat.1003214.
- LANGELIER C R, SANDRIN V, ECKERT D M, CHRISTENSEN D E, CHANDRASEKARAN V, ALAM S L, AIKEN C, OLSEN J C, KAR A K, SODROSKI J G, SUNDQUIST W I, 2008. Biochemical characterization of a recombinant TRIM5alpha protein that restricts human immunodeficiency virus type 1 replication. *J Virol*, 82(23):11682-11694. DOI: 10.1128/jvi.01562-08.
- LI B, ZHAO W, LUO X, ZHANG X, LI C, ZENG C, DONG Y, 2017. Engineering CRISPR-Cpf1 crRNAs and mRNAs to maximize genome editing efficiency. *Nat Biomed Eng*, 1(5). DOI: 10.1038/s41551-017-0066.
- LI X, LI Y, STREMLAU M, YUAN W, SONG B, PERRON M, SODROSKI J, 2006. Functional replacement of the RING, B-box 2, and coiled-coil domains of tripartite motif 5alpha (TRIM5alpha) by heterologous TRIM domains. *J Virol*, 80(13):6198-6206. DOI: 10.1128/jvi.00283-06.
- LIN T Y, EMERMAN M, 2006. Cyclophilin A interacts with diverse lentiviral capsids. *Retrovirology*, 3:70. DOI: 10.1186/1742-4690-3-70.
- LIN X, DASHTI A, SCHINAZI R F, TANG J, 1993. Intracellular diversion of glycoprotein GP160 of human immunodeficiency virus to lysosomes as a strategy of AIDS gene therapy. *Faseb j*, 7(11):1070-1080. DOI: 10.1096/fasebj.7.11.8370478.

- LIU Y P, BERKHOUT B, 2014. HIV-1-based lentiviral vectors. *Methods Mol Biol*, 1087:273-284. DOI: 10.1007/978-1-62703-670-2_22.
- MAERTENS G N, ENGELMAN A N, CHEREPANOV P, 2022. Structure and function of retroviral integrase. *Nat Rev Microbiol*, 20(1):20-34. DOI: 10.1038/s41579-021-00586-9.
- MAILLARD P V, ECCO G, ORTIZ M, TRONO D, 2010. The specificity of TRIM5 alpha-mediated restriction is influenced by its coiled-coil domain. *J Virol*, 84(11):5790-5801. DOI: 10.1128/jvi.02413-09.
- MANDELL M A, JAIN A, ARKO-MENSAH J, CHAUHAN S, KIMURA T, DINKINS C, SILVESTRI G, MÜNCH J, KIRCHHOFF F, SIMONSEN A, WEI Y, LEVINE B, JOHANSEN T, DERETIC V, 2014. TRIM proteins regulate autophagy and can target autophagic substrates by direct recognition. *Dev Cell*, 30(4):394-409. DOI: 10.1016/j.devcel.2014.06.013.
- MANGHWAR H, LINDSEY K, ZHANG X, JIN S, 2019. CRISPR/Cas System: Recent Advances and Future Prospects for Genome Editing. *Trends Plant Sci*, 24(12):1102-1125. DOI: 10.1016/j.tplants.2019.09.006.
- MERONI G, DIEZ-ROUX G, 2005. TRIM/RBCC, a novel class of 'single protein RING finger' E3 ubiquitin ligases. *Bioessays*, 27(11):1147-1157. DOI: 10.1002/bies.20304.
- MILLER M D, FARNET C M, BUSHMAN F D, 1997. Human immunodeficiency virus type 1 preintegration complexes: studies of organization and composition. *J Virol*, 71(7):5382-5390. DOI: 10.1128/jvi.71.7.5382-5390.1997.
- MITROPHANOUS K, YOON S, ROHLL J, PATIL D, WILKES F, KIM V, KINGSMAN S, KINGSMAN A, MAZARAKIS N, 1999. Stable gene transfer to the nervous system using a non-primate lentiviral vector. *Gene Ther*, 6(11):1808-1818. DOI: 10.1038/sj.gt.3301023.
- MORIZAKO N, BUTLERTANAKA E P, TANAKA Y L, SHIBATA H, OKABAYASHI T, MEKATA H, SAITO A, 2022. Generation of a bovine cell line for gene engineering using an HIV-1-based lentiviral vector. *Sci Rep*, 12(1):16952. DOI: 10.1038/s41598-022-20970-6.
- MOSCOU M J, BOGDANOVA A J, 2009. A simple cipher governs DNA recognition by TAL effectors. *Science*, 326(5959):1501. DOI: 10.1126/science.1178817.
- NAKAYAMA E E, SHIODA T, 2010. Anti-retroviral activity of TRIM5 alpha. *Rev Med Virol*, 20(2):77-92. DOI: 10.1002/rmv.637.
- NALDINI L, 2011. Ex vivo gene transfer and correction for cell-based therapies. *Nat Rev Genet*, 12(5):301-315. DOI: 10.1038/nrg2985.
- NALDINI L, BLÖMER U, GAGE F H, TRONO D, VERMA I M, 1996. Efficient transfer, integration, and sustained long-term expression of the transgene in adult rat brains injected with a lentiviral vector. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93(21):11382-11388. DOI: 10.1073/pnas.93.21.11382.
- NALDINI L, TRONO D, VERMA I M, 2016. Lentiviral vectors, two decades later. *Science*, 353(6304):1101-1102. DOI: 10.1126/science.aah6192.

- NELSON C E, HAKIM C H, OUSTEROUT D G, THAKORE P I, MOREB E A, CASTELLANOS RIVERA R M, MADHAVAN S, PAN X, RAN F A, YAN W X, ASOKAN A, ZHANG F, DUAN D, GERSBACH C A, 2016. In vivo genome editing improves muscle function in a mouse model of Duchenne muscular dystrophy. *Science*, 351(6271):403-407. DOI: 10.1126/science.aad5143.
- NISOLE S, LYNCH C, STOYE J P, YAP M W, 2004. A Trim5-cyclophilin A fusion protein found in owl monkey kidney cells can restrict HIV-1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(36):13324-13328. DOI: 10.1073/pnas.0404640101.
- OSORIO J S, BIONAZ M, 2017. Plasmid transfection in bovine cells: Optimization using a realtime monitoring of green fluorescent protein and effect on gene reporter assay. *Gene*, 626:200-208. DOI: 10.1016/j.gene.2017.05.025.
- PACCHIA A L, ADELSON M E, KAUL M, RON Y, DOUGHERTY J P, 2001. An inducible packaging cell system for safe, efficient lentiviral vector production in the absence of HIV-1 accessory proteins. *Virology*, 282(1):77-86. DOI: 10.1006/viro.2000.0787.
- PEREZ-CABALLERO D, HATZIIOANNOU T, YANG A, COWAN S, BIENIASZ P D, 2005a. Human tripartite motif 5alpha domains responsible for retrovirus restriction activity and specificity. *J Virol*, 79(14):8969-8978. DOI: 10.1128/jvi.79.14.8969-8978.2005.
- PEREZ-CABALLERO D, HATZIIOANNOU T, ZHANG F, COWAN S, BIENIASZ P D, 2005b. Restriction of human immunodeficiency virus type 1 by TRIM-CypA occurs with rapid kinetics and independently of cytoplasmic bodies, ubiquitin, and proteasome activity. *J Virol*, 79(24):15567-15572. DOI: 10.1128/jvi.79.24.15567-15572.2005.
- PERRON M J, STREMLAU M, LEE M, JAVANBAKHT H, SONG B, SODROSKI J, 2007. The human TRIM5alpha restriction factor mediates accelerated uncoating of the N-tropic murine leukemia virus capsid. *J Virol*, 81(5):2138-2148. DOI: 10.1128/jvi.02318-06.
- POESCHLA E M, WONG-STAAAL F, LOONEY D J, 1998. Efficient transduction of nondividing human cells by feline immunodeficiency virus lentiviral vectors. *Nat Med*, 4(3):354-357. DOI: 10.1038/nm0398-354.
- PUFFER B A, PARENT L J, WILLS J W, MONTELARO R C, 1997. Equine infectious anemia virus utilizes a YXXL motif within the late assembly domain of the Gag p9 protein. *J Virol*, 71(9):6541-6546. DOI: 10.1128/jvi.71.9.6541-6546.1997.
- REYMOND A, MERONI G, FANTOZZI A, MERLA G, CAIRO S, LUZI L, RIGANELLI D, ZANARIA E, MESSALI S, CAINARCA S, GUFFANTI A, MINUCCI S, PELICCI P G, BALLABIO A, 2001. The tripartite motif family identifies cell compartments. *Embo j*, 20(9):2140-2151. DOI: 10.1093/emboj/20.9.2140.
- REYON D, TSAI S Q, KHAYTER C, FODEN J A, SANDER J D, JOUNG J K, 2012. FLASH assembly of TALENs for high-throughput genome editing. *Nat Biotechnol*, 30(5):460-465. DOI: 10.1038/nbt.2170.

- RONG Y S, GOLIC K G, 2000. Gene targeting by homologous recombination in *Drosophila*. *Science*, 288(5473):2013-2018. DOI: 10.1126/science.288.5473.2013.
- SAKUMA T, BARRY M A, IKEDA Y, 2012. Lentiviral vectors: basic to translational. *Biochem J*, 443(3):603-618. DOI: 10.1042/bj20120146.
- SAYAH D M, SOKOLSKAJA E, BERTHOUX L, LUBAN J, 2004. Cyclophilin A retrotransposition into TRIM5 explains owl monkey resistance to HIV-1. *Nature*, 430(6999):569-573. DOI: 10.1038/nature02777.
- SCHMID-BURGK J L, SCHMIDT T, KAISER V, HÖNING K, HORNING V, 2013. A ligation-independent cloning technique for high-throughput assembly of transcription activator-like effector genes. *Nat Biotechnol*, 31(1):76-81. DOI: 10.1038/nbt.2460.
- SHIBATA R, SAKAI H, KAWAMURA M, TOKUNAGA K, ADACHI A, 1995. Early replication block of human immunodeficiency virus type 1 in monkey cells. *J Gen Virol*, 76 (Pt 11):2723-2730. DOI: 10.1099/0022-1317-76-11-2723.
- SODROSKI J, GOH W C, ROSEN C, TARTAR A, PORTETELLE D, BURNY A, HASELTINE W, 1986. Replicative and cytopathic potential of HTLV-III/LAV with *src* gene deletions. *Science*, 231(4745):1549-1553. DOI: 10.1126/science.3006244.
- STEVENSON M, BUKRINSKY M, HAGGERTY S, 1992. HIV-1 replication and potential targets for intervention. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 8(2):107-117. DOI: 10.1089/aid.1992.8.107.
- STREMLAU M, OWENS C M, PERRON M J, KIESSLING M, AUTISSIER P, SODROSKI J, 2004. The cytoplasmic body component TRIM5 α restricts HIV-1 infection in Old World monkeys. *Nature*, 427(6977):848-853. DOI: 10.1038/nature02343.
- STREMLAU M, SONG B, JAVANBAKHT H, PERRON M, SODROSKI J, 2006. Cyclophilin A: an auxiliary but not necessary cofactor for TRIM5 α restriction of HIV-1. *Virology*, 351(1):112-120. DOI: 10.1016/j.virol.2006.03.015.
- THALI M, BUKOVSKY A, KONDO E, ROSENWIRTH B, WALSH C T, SODROSKI J, GÖTTLINGER H G, 1994. Functional association of cyclophilin A with HIV-1 virions. *Nature*, 372(6504):363-365. DOI: 10.1038/372363a0.
- WANG W K, CHEN M Y, CHUANG C Y, JEANG K T, HUANG L M, 2000. Molecular biology of human immunodeficiency virus type 1. *J Microbiol Immunol Infect*, 33(3):131-140.
- WHITE S M, RENDA M, NAM N Y, KLIMATCHEVA E, ZHU Y, FISK J, HALTERMAN M, RIMEL B J, FEDEROFF H, PANDYA S, ROSENBLATT J D, PLANELLES V, 1999. Lentivirus vectors using human and simian immunodeficiency virus elements. *J Virol*, 73(4):2832-2840. DOI: 10.1128/jvi.73.4.2832-2840.1999.
- WU X, ANDERSON J L, CAMPBELL E M, JOSEPH A M, HOPE T J, 2006. Proteasome inhibitors uncouple rhesus TRIM5 α restriction of HIV-1 reverse transcription and infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(19):7465-7470. DOI: 10.1073/pnas.0510483103.

- YANG Q E, STEPHEN A G, ADELSBERGER J W, ROBERTS P E, ZHU W, CURRENS M J, FENG Y, CRISE B J, GORELICK R J, REIN A R, FISHER R J, SHOEMAKER R H, SEI S, 2005. Discovery of small-molecule human immunodeficiency virus type 1 entry inhibitors that target the gp120-binding domain of CD4. *J Virol*, 79(10):6122-6133. DOI: 10.1128/jvi.79.10.6122-6133.2005.
- ZHANG F, HATZIOANNOU T, PEREZ-CABALLERO D, DERSE D, BIENIASZ P D, 2006. Antiretroviral potential of human tripartite motif-5 and related proteins. *Virology*, 353(2):396-409. DOI: 10.1016/j.virol.2006.05.035.
- ZHAO G, KE D, VU T, AHN J, SHAH V B, YANG R, AIKEN C, CHARLTON L M, GRONENBORN A M, ZHANG P, 2011. Rhesus TRIM5 α disrupts the HIV-1 capsid at the inter-hexamer interfaces. *PLoS Pathog*, 7(3):e1002009. DOI: 10.1371/journal.ppat.1002009.
- ZURIS J A, THOMPSON D B, SHU Y, GUILINGER J P, BESSON J L, HU J H, MAEDER M L, JOUNG J K, CHEN Z Y, LIU D R, 2015. Cationic lipid-mediated delivery of proteins enables efficient protein-based genome editing in vitro and in vivo. *Nat Biotechnol*, 33(1):73-80. DOI: 10.1038/nbt.3081.