

密级:

论文编号:

# 中国农业科学院 学位论文

## 利用 CRISPR/Cpf1 系统构建 DDX21 基因敲除 模型及功能初步研究

**Preliminary Study on Constructing DDX21 Gene Knockout  
Model and Function by CRISPR/Cpf1 System**

硕士研究生: 鲁国涛

指导教师: 孟庆文研究员

申请学位类别: 兽医硕士

专业领域名称: 兽医

培养单位: 哈尔滨兽医研究所

研究生院

2019年6月

密级:

论文编号:

# 中国农业科学院 学位论文

## 利用 CRISPR/Cpf1 系统构建 DDX21 基因敲除 模型及功能初步研究

Preliminary Study on Constructing DDX21 Gene Knockout  
Model and Function by CRISPR/Cpf1 System

硕士研究生: 鲁国涛

指导教师: 孟庆文研究员

申请学位类别: 兽医硕士

专业领域名称: 兽医

培养单位: 哈尔滨兽医研究所

研究生院

2019 年 6 月

Secrecy:

No.

# **Chinese Academy of Agricultural Sciences Dissertation**

## **Preliminary Study on Constructing DDX21 Gene Knockout Model and Function by CRISPR/Cpf1 System**

**M.S. Candidate: Lu Guotao**

**Supervisor: Professor Meng Qingwen**

**Degree: Master of Veterinarian**

**Specialty: Veterinary medicine**

**June 2019**

## 独创性声明

本人声明所呈交的论文是我个人在导师指导下进行的研究工作及取得的研究成果。尽我所知，除了文中特别加以标注和致谢的地方外，论文中不包含其他人已经发表或撰写过的研究成果，也不包含为获得中国农业科学院或其它教育机构的学位或证书而使用过的材料。与我一同工作的同志对本研究所做的任何贡献均已在论文中作了明确的说明并表示了谢意。

研究生签名： 鲁国涛

时间： 2019年5月30日

## 关于论文使用授权的声明

本人完全了解中国农业科学院有关保留、使用学位论文的规定，即：中国农业科学院有权保留送交论文的复印件和磁盘，允许论文被查阅和借阅，可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存、汇编学位论文。同意中国农业科学院可以用不同方式在不同媒体上发表、传播学位论文的全部或部分内容。

研究生签名： 鲁国涛

时间： 2019年5月30日

导师签名： 孟庆文

时间： 2019年5月30日

# 中国农业科学院

## 硕士学位论文评阅人、答辩委员会签名表

论文题目		利用 CRISPR/Cpf1 系统构建 DDX21 基因敲除模型及功能初步研究				
论文作者		鲁国涛	专业领域	兽医	研究方向	不区分研究方向
指导教师		孟庆文 研究员		培养单位(研究所、中心)		哈尔滨兽医研究所
姓名		职称	硕(博)导师	单 位	专 业	签 名
评 阅 人	高玉龙	研究员	硕导 <input type="checkbox"/> 博导 <input checked="" type="checkbox"/>	哈尔滨兽医研究所	预防兽医学	/
	王宁	教授	硕导 <input type="checkbox"/> 博导 <input checked="" type="checkbox"/>	东北农业大学	动物遗传 育种与繁殖	
答 辩 主 席	李一经	教授	硕导 <input type="checkbox"/> 博导 <input checked="" type="checkbox"/>	东北农业大学	预防兽医学	李一经
答 辩 委 员	吴英杰	教授	硕导 <input type="checkbox"/> 博导 <input checked="" type="checkbox"/>	大连医科大学	生物化学与 分子生物学	吴英杰
	任文陟	教授	硕导 <input type="checkbox"/> 博导 <input checked="" type="checkbox"/>	吉林大学	实验动物学	任文陟
	李海	研究员	硕导 <input type="checkbox"/> 博导 <input checked="" type="checkbox"/>	哈尔滨兽医研究所	预防兽医学	李海
	田志军	研究员	硕导 <input type="checkbox"/> 博导 <input checked="" type="checkbox"/>	哈尔滨兽医研究所	预防兽医学	田志军
	高玉龙	研究员	硕导 <input type="checkbox"/> 博导 <input checked="" type="checkbox"/>	哈尔滨兽医研究所	预防兽医学	高玉龙
	王玉娥	研究员	硕导 <input type="checkbox"/> 博导 <input checked="" type="checkbox"/>	哈尔滨兽医研究所	预防兽医学	王玉娥
会议记录(秘书)			赵丽丽			
论文答辩时间地点			2019年5月21日 哈尔滨兽医研究所兽医学院十教室			

## 摘要

CRISPR/Cpf1 是 2015 年张峰小组报道的新型 CRISPR 系统, 研究证实该系统具有更简单、更精准实现基因组编辑的潜能。解旋酶 DDX21 不仅能够参与信使 RNA (Messenger RNA, mRNA) 前体加工、RNA 的转运和降解、核糖体的生成等多种生物学过程, 而且在禽流感病毒 (Avian influenza virus, AIV)、登革热病毒 (Dengue virus, DENV)、人类免疫缺陷病毒 (Human Immunodeficiency Virus, HIV) 等病毒的增殖及信号传导过程中也发挥了重要作用。本研究首先利用 CRISPR/Cpf1 技术敲除哺乳动物 HEK293 细胞 DDX21 基因并感染 H9N2 亚型 AIV, 在细胞水平验证了 CRISPR/Cpf1 系统的活性及 DDX21 介导 AIV 感染的天然免疫应答机制; 进一步探索了 CRISPR/Cpf1 慢病毒系统在鸡 DF-1 细胞和鸡体上的基因编辑, 为揭示 DDX21 基因功能、病毒致病机制研究奠定了基础。

CRISPR/Cpf1 系统编辑哺乳动物细胞: 以 DDX21 为靶向基因, 利用在线软件 chopchop 筛选靶位点, 分别构建 pU6-Lb-crRNA-DDX21 打靶载体和 pcDNA3.1-hLbCpf1-RFP 报告载体。将两个载体共同转染 HEK293 细胞, 流式细胞仪分选阳性细胞, T7E1 酶切法检测 Cpf1 核酸酶切割活性为 56.8%, 经筛选后获得 2 株 DDX21 基因稳定敲除的 HEK293 细胞株, 成功建立以 CRISPR/Cpf1 系统介导基因稳定敲除的新方法。

以构建的 HEK293-DDX21<sup>-/-</sup>为细胞模型, H9N2 亚型 AIV 感染后测定病毒滴度, 荧光定量 PCR 检测模式识别受体、细胞因子、抗病毒蛋白的 mRNA 表达水平, 进一步验证及揭示敲除 DDX21 基因的功能变化。结果显示: TLR-3、MDA-5 的 mRNA 表达水平上调, TLR-7 表达水平无明显差异, IFN- $\alpha$ 、IFN- $\beta$ 、IL-6 及 OAS 的 mRNA 表达水平下调, TCID<sub>50</sub> 差异最高可达到 WT 的 3.01 倍, 表明 DDX21 基因敲除后可能引起 DDX21-TRIF-MyD88 信号通路受阻, 抑制 I 型干扰素、炎症因子和抗病毒蛋白表达, 促进流感病毒复制。

CRISPR/Cpf1 系统编辑鸡 DF-1 细胞: 根据设计原则, 在鸡 DDX21 基因第 2 外显子筛选 4 个靶点, 分别将重新构建的 4 个打靶载体与报告载体共同转染 DF-1 细胞, T7E1 酶切和 TA 克隆测序发现靶点 1 切割效率最高为 33.3% (10/30), 靶点处存在 5~48bp 的缺失。包装 Lenti-Cpf1-DDX21 慢病毒感染 DF-1 细胞, 嘌呤霉素筛选富集阳性细胞, 通过流式细胞仪分选至 96 孔板中, 经测序鉴定后, 成功获得 2 株 DDX21 基因敲除的 DF-1 细胞株。

基因编辑鸡的探索: 慢病毒表达载体与相应的包装质粒按照一定的比例混合后转染至 293T 细胞, 通过 ELISA 方法测定慢病毒滴度为  $2.5 \times 10^7$  Tu/mL; 采用赤道面开窗法, 将包装的慢病毒显微注射到 527 枚新生种蛋的胚盘下腔, 孵化得到 83 只雏鸡, 孵化率为 15.86%; 凝胶电泳鉴定, 外源基因整合至鸡基因组中的效率为 22.9% (19/83)。

本研究成功建立 CRISPR/Cpf1 介导的 HEK293 及 DF-1 细胞的基因敲除方法, 通过 H9N2 亚型 AIV 感染实验验证 DDX21 参与的信号通过程, 探索了 CRISPR/Cpf1 慢病毒系统在鸡体内的基因编辑, 对利用 CRISPR/Cpf1 建立细胞、动物模型和研究基因功能等具有重要的应用价值。

**关键词:** CRISPR/Cpf1, 慢病毒, DF-1 细胞, 基因编辑, DDX21

## Abstract

CRISPR/Cpf1 is the new CRISPR system reported by Zhang Feng Group in 2015. The research proves that the system has the potential of simpler and more accurate genome editing. The helicase DDX21 can not only participate in a variety of biological processes such as messenger RNA (mRNA) precursor processing, RNA transport and degradation, ribosome production, but also in Avian influenza virus (AIV), dengue fever. Virus (Dengue virus, DENV), human immunodeficiency virus (HIV) and other viruses also play an important role in the proliferation and signal transduction process. This study firstly knocked out the DDX21 gene of mammalian HEK293 cells and infected H9N2 subtype AIV by CRISPR/Cpf1 technology, and verified the activity of CRISPR/Cpf1 system and the natural immune response mechanism of DDX21-mediated AIV infection at the cellular level; further explored CRISPR The gene editing of the /Cpf1 lentiviral system in chicken DF-1 cells and chickens laid the foundation for revealing the function of DDX21 gene and the pathogenesis of the virus.

Editing mammalian cells by CRISPR/Cpf1 system: In this study, DDX21 was used as a target gene, and the target site was screened by online software chopchop to construct pU6-Lb-crRNA-DDX21 targeting vector and pcDNA3.1-hLbCpf1-RFP reporter vector, respectively. The two vectors were co-transfected into HEK293 cells and the positive cells were sorted by flow cytometry. The Cpf1 nuclease cleavage activity was 56.8% by T7E1 digestion, and two DDX21 gene-stable HEK293 cell lines were obtained after screening. A new method for gene-stable gene knockout mediated by the CRISPR/Cpf1 system was successfully established.

Using the constructed HEK293-DDX21<sup>-/-</sup> as the cell model, the virus titer was determined after H9N2 subtype AIV infection, and the mRNA expression level of pattern recognition receptor, cytokine and antiviral protein was detected by real-time PCR, and the knockout was further verified and revealed. Functional changes in the DDX21 gene. The results showed that the mRNA expression levels of TLR-3 and MDA-5 were up-regulated, and the expression level of TLR-7 was not significantly different. The mRNA expression levels of IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , IL-6 and OAS were down-regulated, and the difference in TCID50 was the highest. 3.01 times, indicating that the DDX21 gene knockout may cause DDX21-TRIF-MyD88 signaling pathway to be blocked, inhibit the expression of type I interferon, inflammatory factors and antiviral proteins, and promote influenza virus replication.

Editing chicken DF-1 cells by CRISPR/Cpf1 system: According to the design principle, four targets were screened in the second exon of chicken DDX21 gene, and the four reconstituted targeting vectors were co-transfected with DF-1 cells with the reporter vector. T7E1 digestion and TA clone sequencing showed that the target 1 cleavage efficiency was up to 33.3% (10/30), and there was a 5~48 bp deletion at the target site. The Lenti-Cpf1-DDX21 lentivirus was packaged to infect DF-1 cells, and the positive cells were enriched by puromycin. The cells were sorted into 96-well plates by flow cytometry. After sequencing, two DDX21 gene knockouts were successfully obtained. DF-1 cell line.

Exploration of genetically edited chicken: The lentiviral expression vector was mixed with the

corresponding packaging plasmid in a certain ratio and then transfected into 293T cells, and the lentivirus titer was determined by ELISA method to be  $2.5 \times 10^7$  Tu/mL; The packaged lentivirus was microinjected into the blastoderm of 527 newborn eggs, and 83 chicks were hatched, the hatching rate was 15.86%. The efficiency of lentivirus integration into the chicken genome was 22.9% (19/83).

This study successfully established CRISPR/Cpf1-mediated knockout technology of HEK293 and DF-1 cells, and verified the signaling pathway involved in DDX21 by H9N2 subtype AIV infection assay, and explored the genes of CRISPR/Cpf1 lentiviral system in chickens. The editor has important application value for establishing cell and animal models and studying gene function by using CRISPR/Cpf1.

**Key words:** CRISPR/Cpf1, Lentivirus, DF-1 cells, Gene editing, DDX21

# 目 录

第一章 引 言 .....	1
1.1 CRISPR/Cas 系统.....	1
1.1.1 CRISPR/Cas 系统的组成及分类 .....	1
1.1.2 CRISPR/Cas 系统作用机制 .....	2
1.1.3 CRISPR/Cas 系统在家禽中的应用 .....	3
1.2 慢病毒载体.....	5
1.2.1 慢病毒的结构 .....	5
1.2.2 慢病毒侵染细胞的机制 .....	6
1.2.3 慢病毒载体的发展 .....	6
1.2.4 慢病毒载体的应用 .....	7
1.3 DExD/H-box 蛋白家族 .....	8
1.3.1 DExD/H-box 家族的结构.....	8
1.3.2 DExD/H-box 家族的分类.....	8
1.3.3 DExD/H-box 家族 DDX21 蛋白功能简介 .....	9
1.4 研究目的和意义.....	10
第二章 CRISPR/Cpf1 系统介导哺乳动物细胞的基因组编辑 .....	11
2.1 材料.....	11
2.1.1 质粒和细胞 .....	11
2.1.2 主要试剂和仪器 .....	11
2.2 方法.....	11
2.2.1 靶点的选择及设计 .....	11
2.2.2 CRISPR/Cpf1 打靶载体的构建 .....	12
2.2.3 CRISPR/Cpf1 报告载体的构建 .....	13
2.2.4 细胞的培养及转染 .....	15
2.2.5 CRISPR/Cpf1 载体对靶基因的编辑 .....	15
2.2.6 脱靶检测 .....	17

2.2.7 细胞接毒 .....	17
2.2.8 模式识别受体、细胞因子及抗病毒蛋白 mRNA 表达水平检测.....	17
2.2.9 统计分析 .....	18
2.3 结果.....	18
2.3.1 CRISPR/Cpf1 打靶及报告载体的鉴定 .....	18
2.3.2 CRISPR/Cpf1 核酸酶活性检测 .....	19
2.3.3 稳定敲除 DDX21 的 HEK293 细胞系的建立 .....	20
2.3.4 脱靶检测结果 .....	21
2.3.5 病毒生长曲线 .....	21
2.3.6 模式识别受体、细胞因子及抗病毒蛋白 mRNA 表达水平检测.....	21
2.4 讨论.....	23
第三章 CRISPR/Cpf1 系统介导鸡 DF-1 及鸡体中的基因组编辑.....	25
3.1 材料.....	25
3.1.1 种蛋、质粒和细胞 .....	25
3.1.2 主要试剂和仪器 .....	25
3.2 方法.....	25
3.2.1 gRNA 寡核苷酸链的合成及载体构建.....	25
3.2.2 DF-1 细胞的转染.....	25
3.2.3 gRNA 活性检测.....	26
3.2.4 重组慢病毒载体构建 .....	26
3.2.5 慢病毒的包装 .....	27
3.2.6 慢病毒滴度测定 .....	27
3.2.7 敲除细胞株的建立 .....	28
3.2.8 鸡胚慢病毒注射 .....	28
3.3 结果.....	29
3.3.1 gRNA 表达载体的鉴定.....	29
3.3.2 双质粒转染 DF-1 细胞.....	30
3.3.3 敲除效率检测 .....	31

3.3.4 慢病毒载体的构建 .....	31
3.3.5 CRISPR/Cpf1 靶向编辑 DF-1 细胞 .....	32
3.3.6 注射慢病毒种蛋的检测 .....	33
3.4 讨论 .....	34
第四章 全文结论 .....	37
参考文献 .....	38
致 谢 .....	44
作者简历 .....	45

## 英文缩略表

英文缩写	英文全称	中文名称
E.coli	Escherichia coli	大肠埃希氏菌
NC	Nitrocellulose	硝酸纤维素
PGC	Primordial germ cell	原始生殖细胞
SDS	Sodium dodecyl sulfate	十二烷基硫酸钠
LV	lentivirus	慢病毒
PCR	polymerase chain reaction	聚合酶链式反应
dsRNA	double-stranded RNA	双链 RNA
WT	Wild Type	野生型
CRISPR	clustered regularly interspaced short palindromic repeats	规律成簇的间隔短回文重复序列
OD	optical density	光密度
PBS	Phosphate-buffered saline	磷酸盐缓冲液
kDa	kilodalton	千道尔顿
DEPC	Diethy pyrocarbonate	焦碳酸二乙酯
PAMPs	pathogen-associated molecular patterns	病原相关分子模式
DMSO	Dimethyl sulfoxide	二甲基亚砷
PMSF	Phenylmethanesulfonyl fluoride	苯甲基磺酰氟
RNase	Ribonuclease	核糖核酸酶
SDS-PAGE	SDS-polyacrylamide gel electrophoresis	十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺电泳
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay	酶联免疫吸附试验

# 第一章 引言

## 1.1 CRISPR/Cas 系统

### 1.1.1 CRISPR/Cas 系统的组成及分类

1987年, Ishino 等首次在大肠杆菌中发现拥有特殊结构的“串联重复序列”,但功能未知(Ishino et al., 1987)。随后,研究者发现该序列是广泛存在于细菌和古细菌基因组中的一种获得性免疫系统,并将该序列命名为“成簇规律间隔短回文重复序列”(clustered regularly interspaced short palindromic repeats,CRISPR) (Jansen et al., 2002; Mojica et al., 2000)。完整的 CRISPR 位点由一系列编码 Cas 蛋白的基因和 CRISPR 序列两部分组成,其中 CRISPR 序列由前导区、短回文重复序列(repeat)和间隔区(spacer)构成的。Cas 基因具有丰富的多态性,能够编码多种具有核酸酶功能的蛋白;前导区可作为 CRISPR 序列的启动子,激活下游 CRISPR 序列的转录;CRISPR 序列中的回文重复序列长度一般为 21~48bp,可形成发卡结构;间隔区由细菌捕获的外源 DNA 组成,当噬菌体或病毒再次入侵时可立即识别并产生应答,引起机体的获得性免疫反应(Barrangou et al., 2007)。

根据 Cas 基因组成和效应蛋白的差异,CRISPR/Cas 系统可分 class1 和 class2 两种类型(图 1.1) (Makarova et al., 2015)。1 类 CRISPR/Cas 系统(包括 I、III 和 IV 型)由多个效应蛋白复合物发挥功能,免疫机制复杂,限制了其在基因工程中的应用;而 2 类(包括 II、V 和 VI 型)可利用单一效应蛋白干扰靶基因而发挥功能,是目前机制研究最清晰、应用最广泛的 CRISPR/Cas 系统。

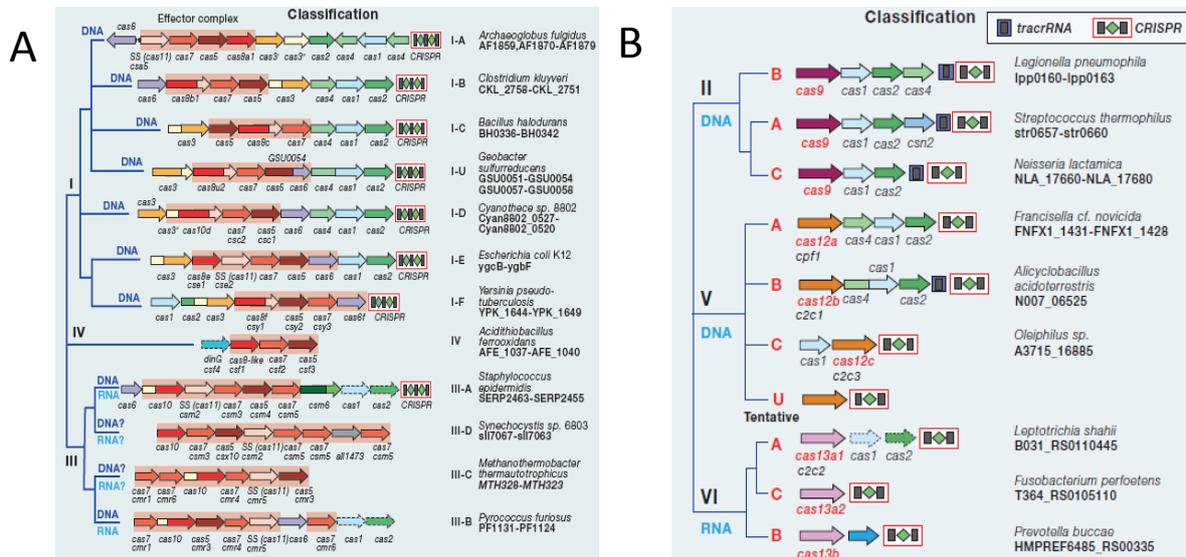


图1.1 CRISPR/Cas系统的组成及分类

Fig.1.1 The composition and classification of CRISPR/Cas system

图A为1类CRISPR/Cas 系统 (Makarova et al., 2017);图B为2类CRISPR/Cas 系统 (Makarova et al., 2017b)

Fig A was class 1 CRISPR/Cas system;Fig B was class 2 CRISPR/Cas system

### 1.1.2 CRISPR/Cas 系统作用机制

虽然不同类型的 CRISPR/Cas 系统在发挥功能时所涉及的 Cas 蛋白的种类和数目不同,但无论哪一类型的 CRISPR 系统,其抵御外来遗传物质入侵的免疫防御过程都可分为 3 个阶段(图 1.2) (Carter and Wiedenheft, 2015) :

(1) 外源 DNA 获取 当噬菌体和质粒 DNA 首次入侵时, Cas1 和 Cas2 形成蛋白复合体识别原间隔序列的紧邻基序(proto-spacer adjacent motif,PAM), 从外源 DNA 中获取序列原间隔序列(proto-spacer), 插入到两段重复序列中形成新的间隔序列;

(2) crRNA 的加工 前导区激活 CRISPR 序列的转录, 生成单链的前体 RNA(pre-crRNA), 再由核糖核酸酶和(或) Cas 蛋白进一步加工形成成熟的 crRNA;

(3) 靶向干扰 当外源 DNA 再次进入宿主细菌时, 成熟的 crRNA 与相应特异性效应蛋白形成复合体, 识别与 crRNA 互补的外源 DNA, 引起 DNA 双链断裂(Double-strand breaks,DSB), 并激活同源重组或非同源末端连接修复方式, 造成靶基因的删除(knock out, KO)、敲入(knock in) 及特定碱基或序列的突变, 从而实现靶基因的精准修饰。

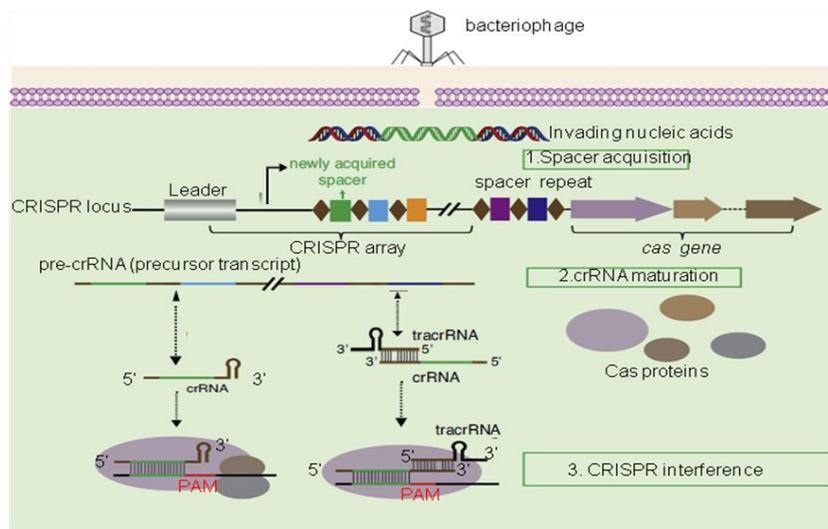


图1.2 CRISPR/Cas作用的三个阶段 (Jiang and Doudna, 2015)

Fig.1.2 Three stages of CRISPR/Cas action

CRISPR/Cpf1 (也称为 CRISPR/Cas12a) 与 CRISPR/Cas9 系统都属于 2 类 CRISPR 系统, 是目前应用最多、研究最为清楚的 2 种 CRISPR/Cas 类别。原理都是在 crRNA 或 sgRNA 的引导下, Cpf1 (Zetsche et al., 2015) 与 Cas9 (Savic and Schwank, 2016) 效应蛋白与靶基因结合, 实现靶基因的定向修饰。两者作用原理虽然相似(图 1.3), 但也存在各自特征(表 1-1)。

表1-1 CRISPR/Cas9和CRISPR/Cpf1的比较

Table 1-1 The comparison between CRISPR/Cas9 and CRISPR/Cpf1

类型	CRISPR/Cas9	CRISPR/Cpf1
蛋白大小	950~1600个氨基酸	1200~1300个氨基酸
功能结构域	RuvC-like和HNH结构域	RuvC-like结构域
内切酶活性	只含有DNA内切酶活性	含DNA和RNA内切酶活性

(续表1-1)

类型	CRISPR/Cas9	CRISPR/Cpf1
Pre-crRNA加工方式	需要Cas9及RNase III等加工成熟	由Cpf1加工成熟
Guide RNA	crRNA, tracrRNA	crRNA
PAM序列	G-rich, 5'-NGG-3'	T-rich, 5'-KYIV-3', 5'-TTTN-3'
DNA剪切复合体	Cas9-crRNA-tracrRNA(sgRNA-Cas9)核糖核蛋白复合体	Cpf1-crRNA核糖核蛋白复合体
DNA识别位点	前间隔序列5'端的PAM序列	前间隔序列3'端的PAM序列
末端类型	平末端	粘性末端

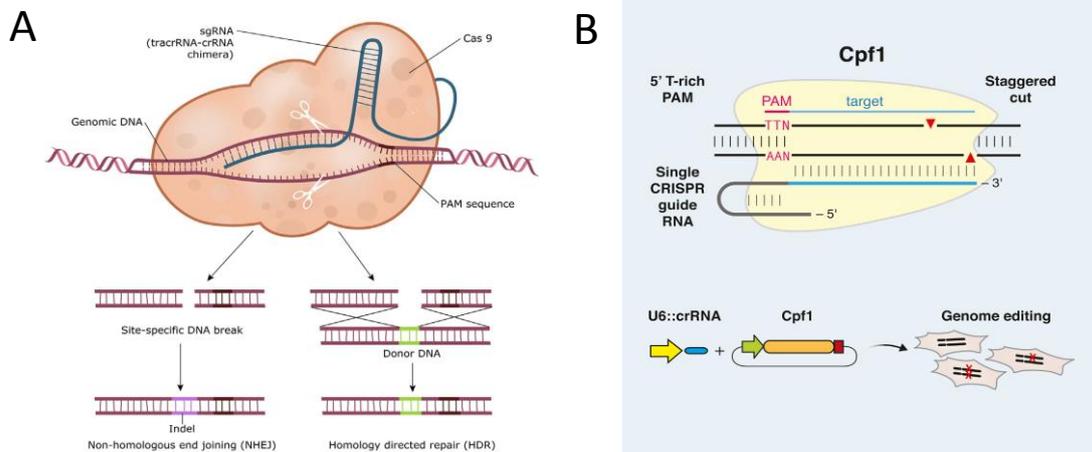


图1.3 CRISPR/Cas系统介导的基因组编辑

Fig.1.3 CRISPR/Cas-mediated genome editing

### 1.1.3 CRISPR/Cas 系统在家禽中的应用

鸡作为重要的农业经济动物，具有来源广、繁殖率高、生长速度快和经济实用等优点，为人类饮食提供了丰富的肉蛋产品；同时，鸡也是免疫学、发育生物学、遗传学、动物育种、农业、营养学等领域研究重要的实验模型。除基础研究外，转基因鸡技术在制药、农业和工业中同样具有许多重要的应用。如抗流感鸡的产生可以为人类健康带来巨大利益（Enserink, 2011; Lyall et al., 2011）；利用卵清蛋白特异性启动子驱动蛋白表达的转基因母鸡，可以极大的节约时间和成本，实现制药工业中珍贵蛋白的大规模生产（Kwon et al., 2018; Oishi et al., 2018）。然而，由于缺乏强大的基因组编辑技术及家禽特殊的生殖生理特性，使得鸡作为脊椎动物模型处于明显的劣势，限制该物种的广泛研究及应用。近年来，随着基因组编辑技术的快速发展，以 CRISPR/Cas 系统为代表的新型基因编辑技术的快速发展为促进畜禽重要经济性状的遗传改良、遗传育种和基因功能研究提供了新的途径和方法（Abu-Bonsrah et al., 2016; Park et al., 2014; Wang et al., 2017）。CRISPR/Cpf1 作为一种新型的 CRISPR/Cas 类型，具有更简单、更精准实现基因组编辑的潜能，但是该系统在家禽细胞和鸡体中的应用尚未见报道。

(1) 基因功能研究 与锌指核酸酶（Zinc-finger nucleases, ZFN）和转录激活因子样效应因子核酸酶（transcription activator-like effector nucleases, TALEN）技术相比，CRISPR/Cas 系统具有

构建简单、周期短、效率高及可同时编辑多个基因等优点, 迅速应用于研究的各个领域, 成为揭示家禽基因功能的有效遗传工具。Veron 等利用 CRISPR 与电穿孔技术靶向转录因子 PAX7, 实现了 PAX7 大片段的稳定敲除, 证明 CRISPR 介导的基因打靶是一种适合鸡体细胞基因组编辑的方法, 为进一步研究 PAX7 基因在调控发育中的分子机制奠定了基础 (Veron et al., 2015)。Zuo 等通过构建靶向 C1EIS (Chromosome1 Expression in SSC) 的 CRISPR/Cas9 载体, 利用 T7E1 酶切和 TA 克隆测序检测, Cas9/gRNA 载体转染鸡成纤维细胞 (DF-1) 的敲除效率约为 40%, 验证了 C1EIS 基因在雄性生殖细胞分化过程中起重要作用, 表明 CRISPR/Cas9 能够稳定介导鸡 DF-1 细胞的基因敲除 (Zuo et al., 2017)。Zhang 等利用荧光素酶-SSA、T7E1、qRT-PCR、FCSC 及细胞形态学等多种方法证明 CRISPR/Cas9 系统可以实现鸡细胞中 Stra8 基因稳定编辑, Stra8 基因敲除能够抑制 ECS 向 SSC 的分化 (Zhang et al., 2017)。Lee 等在鸡 DF-1 细胞中, 使用 CRISPR/Cas9 基因组编辑技术靶向 B 型肿瘤病毒基因, 建立具有抗病毒感染的新鸡细胞系 (Lee et al., 2017)。国内学者, 王飞等构建了 3 个 Cas9/gRNA 表达载体, 采用脂质体法转染鸡 DF-1 细胞和鸡胚干细胞 (ESCs), 发现 Cas9/gRNA1 载体在 DF-1 细胞和 ESCs 中的效率分别为 37% 和 25%, 且未发现脱靶 (王飞, 等, 2017)。DMRT1 (Double sex and Mab-3 related transcription factor 1) 是影响鸡性腺分化及发育的关键基因, 杨秀荣等利用 CRISPR/Cas9 系统在 DF-1 细胞上对 DMRT1 基因进行敲除效率验证, 为进一步揭示该基因功能提供了良好的细胞模型 (杨秀荣, 等, 2017)。张琦等在 RB1 基因的 2 个外显子共设计了 3 个 gRNA, 证明 CRISPR/Cas9 系统能够有效造成该基因移码突变, 且敲除 RB1 基因能减缓前脂肪细胞的增殖速度 (张琦, 等, 2016)。

(2) 发育模型的建立 Oishi 等利用 CRISPR/Cas9 系统和抗生素富集筛选卵清蛋白 (OVA) 和卵类黏蛋白 (OVM) 基因敲除的 PGCs 细胞后, 重新注射至鸡胚血管中, 成功获得嵌合体转基因公鸡, 通过进一步杂交 OVM<sup>+/+</sup> 突变鸡, 获得 OVM<sup>-/-</sup> 后代, 这是首例利用 CRISPR/Cas9 系统获得基因敲除鸡的报道 (Oishi et al., 2016)。Cooper 等利用精子作为传递基因编辑载体的方法 (sperm transfection assisted gene editing, STAGE), 通过 CRISPR/Cas9 系统产生 GFP 基因敲除的胚胎和鸡, 并获得 DMRT1 基因突变的胚胎, 为生产基因编辑鸡提供了新的途径和方法 (Cooper et al., 2017)。此外, Luiza 等通过 Percoll 离心和电穿孔的组合方法进行 PGCs 细胞的纯化, 成功获得表达 hIFN $\alpha$ 2a/乙型肝炎病毒表面抗原 (HBsAg) 的 G0 转基因鸡 (Chojnacka-Puchta et al., 2015)。Abu-bonsrah 等利用 CRISPR/Cas9 系统在两个鸡细胞系对多个基因进行敲除, 验证了 CRISPR/Cas9 介导鸡胚内体细胞的定向修饰功能, 为应用 CRISPR/Cas9 系统对鸡胚基因组的精确靶向遗传操作奠定了基础 (Abu-Bonsrah et al., 2016)。此外, Dimitrov 等使用 CRISPR/Cas9 系统通过体外修饰 PGCs 细胞中免疫球蛋白重链基因座获得转基因的后代, 为鸟类的有效遗传修饰开辟了新的道路 (Dimitrov et al., 2016)。目前在其他禽类物种已有成功应用的案例, 如 Jinsoo 等将两种禽类特异性启动子, 鹌鹑 7SK (q7SK) 启动子和 CBh 启动子 (巨细胞病毒和鸡  $\beta$ -肌动蛋白启动子的杂合形式) 克隆到 CRISPR 慢病毒载体中, 用于分别表达向导 RNA 和 Cas9 蛋白, 转染靶向鹌鹑 MLPH 基因的 QM7 细胞系, 成功实现鹌鹑细胞基因的高效靶向敲除 (Ahn et al., 2017)。

(3) 性状改良 靶向基因组 DNA 编辑技术的出现, 为治疗性蛋白质的大规模生产及抗流感病毒等转基因鸡的产生提供了宝贵工具。Bai 等通过 CRISPR/Cas9 和 SSA-RPG 双荧光报告系统, 对鸡 DF-1 细胞中过氧化物酶体增殖物激活受体- $\gamma$  (PPAR- $\gamma$ ), ATP 合酶  $\epsilon$  亚基 (ATP5E) 和卵

清蛋白(OVA)基因进行敲除,为后续应用CRISPR系统进行性状改良提供了方法(Bai et al., 2016)。胡曼等在鸡肌肉生长抑制素基因(Myostatin, MSTN)的第1、2外显子分别设计筛选多个靶点,利用CRISPR/Cas9基因编辑技术成功实现了该基因的敲除,为畜禽瘦肉率的改良、肉质性状的改善奠定基础(胡曼等., 2016)。

## 1.2 慢病毒载体

慢病毒(lentivirus)属于逆转录病毒科慢病毒属,是一种RNA病毒。与其他病毒载体相比,慢病毒载体能够将外源基因稳定整合至宿主基因组中,整合效率明显高于普通随机整合(约 $10^{8-12}$ 倍)(Robl et al., 2007)。此外,慢病毒可以侵染分裂期和非分裂期细胞,近年来已成为生命科学领域中重要的工具。本研究中利用的类型为HIV-1的复制缺陷型慢病毒载体,以下将重点介绍此类慢病毒载体。

### 1.2.1 慢病毒的结构

HIV病毒粒子呈20面体对称的球形,直径为80~120nm。最外层为双层脂质膜构成的包膜,包膜上的糖蛋白呈刺突状结构,可以识别宿主细胞受体并与之结合。病毒核衣壳呈半锥形,由两条正义单链RNA、病毒复制所需的酶和结构蛋白构成。HIV-1基因组包含9个开放阅读框(图1.4),长度为9~10kb,由tat、rev调节基因,gag、pol、env编码结构蛋白基因和vpr、vif、vpu和nef辅助基因组成。其中,gag、pol、env基因分别编码病毒的结构蛋白(包括基质蛋白、衣壳蛋白和核衣壳蛋白)、病毒复制所需的酶(整合酶、逆转录酶和裂解酶)和病毒包膜蛋白(Env,由gp120亚基和gp41亚基组成);另外,tat调节基因编码的调控蛋白可促进病毒转录的增加,而rev蛋白对mRNA的出核具有重要作用;4个辅助基因参与病毒的装配、病毒周期及病毒颗粒的释放过程,以上结构都位于长末端重复序列LTR(long terminal repeats, LTRs)之中。此外,LTR还内含病毒复制过程中所需的供体与受体连接位点、包装信号、二聚化信号、TAT激活域(TAT activation region, TAR)、引物结合位点(primer binding site, PBS)、Rev响应元件(Rev-responsive element, RRE)以及中央和末端多嘌呤序列(the central and terminal polypurine tracts, PPT)等多个顺式作用元件(Sinn et al., 2005)。这些基因编码形成的前体复合物,可通过核定位信号进入细胞核,这是慢病毒可以侵染分裂期和非分裂期细胞的主要机制。

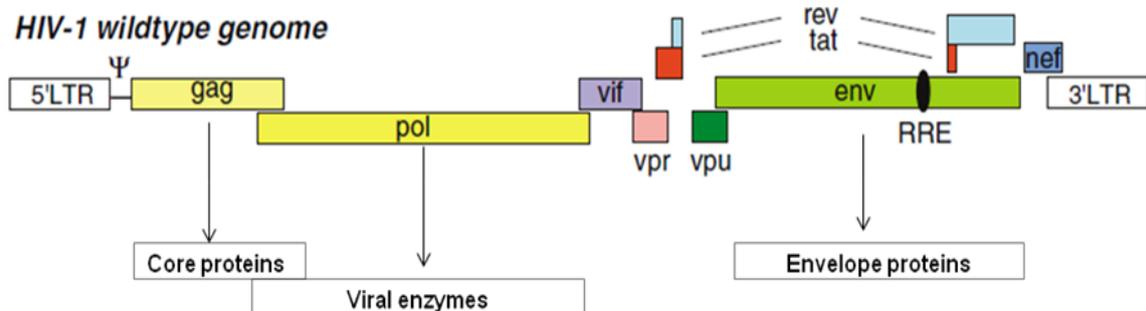


图1.4 HIV-1慢病毒基因结构图

Fig.1.4 HIV-1 Lentiviral Gene Structure

### 1.2.2 慢病毒侵染细胞的机制

当 HIV-1 感染细胞后, 病毒包膜糖蛋白 gp120 首先与细胞表面 CD4 受体结合, 引起包膜糖蛋白构象改变, 在 CCR5、CXCR4 辅助受体的共同作用下, 病毒包膜与细胞膜融合, 病毒核衣壳穿过细胞膜进入细胞, 脱去衣壳蛋白释放病毒核心; 随后, 在 DNA 多聚酶和核糖核酸酶 H 的作用下, 病毒 RNA 通过反转录酶最终形成双链 DNA 分子。部分反转录形成的 DNA 会在整合酶的作用下插入宿主细胞的基因组中; 另一部分 DNA 会以游离形式分布于胞浆中, 转录成 mRNA, 利用被感染细胞本身的原料完成子代病毒颗粒组装, 释放到细胞外 (图 1.5)。

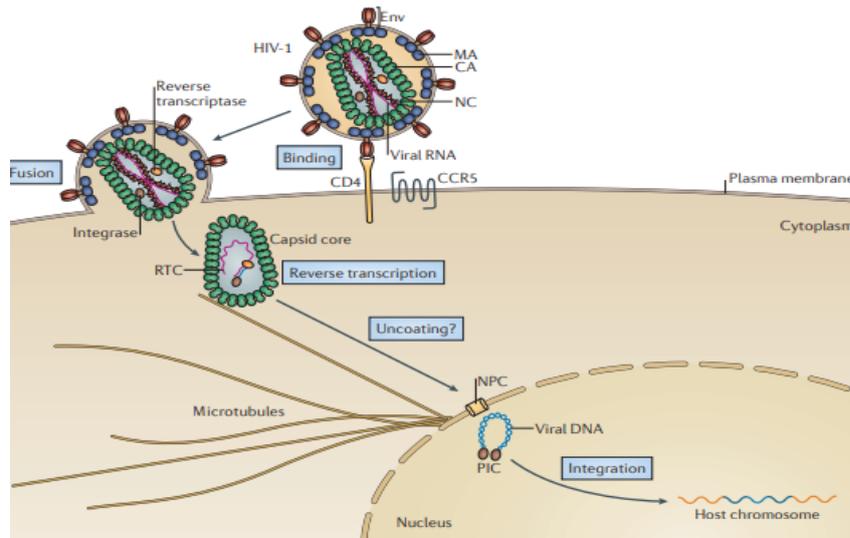


图1.5 HIV侵染宿主细胞的机制 (Campbell and Hope, 2015)

Fig.1.5 The mechanism of HIV infecting cells

### 1.2.3 慢病毒载体的发展

慢病毒载体作为一种遗传物质转移和动物细胞永久性修饰的有效工具, 目前已经经历了四代系统的优化, 不仅显著提高了病毒包装的滴度, 而且具有更高的生物安全性。人们常用的优化方法主要是通过删除 HIV-1 基因组中非必须元件, 并将慢病毒包装所需要的顺式和反式作用序列分离。

**第一代慢病毒系统:** 1996 年, Naldini 等开发了由包装质粒、转移质粒和包膜质粒构成的第一代慢病毒系统 (Naldini et al., 1996b)。其中, 转移质粒由 5'-LTR、3'-LTR、引物结合位点 (PBS)、包装信号、Rev 应答元件以及携带启动子的外源基因组成, 这样的转移质粒增加了外源基因的载量, 保证了其高效性。在包装质粒中, 删除了包装信号、PBS、包膜蛋白 Env、辅助蛋白和调节蛋白等元件, 同时 5'-LTR 被人类巨细胞病毒立即早期启动子 (Cytomegalovirus immediate early promoter, CMV) 或 RSV 替代, 5'-LTR 由 SV40 或 PolyA 位点取代 (Naldini et al., 1996a)。原 HIV-1 包膜质粒 gp120 蛋白被受体分子广、结构稳定的水疱性口炎病毒糖蛋白 (VSV-G) 替代, 不仅提高了包装病毒的滴度, 而且进一步扩展了慢病毒载体的宿主范围。

**第二代慢病毒系统:** 虽然第一代慢病毒系统能够保证高的病毒滴度, 但仍保留了 Rev 等反应元件, 依然存在形成具有复制能力的致病性病毒的风险。为了提高慢病毒载体的安全性, Zufferey 等在保证慢病毒具有较强病毒滴度和感染力的前提下, 删除了包装质粒上表达具有毒性蛋白的 4

个辅助基因，降低了对细胞的毒性，提高了包装系统安全稳定性，获得第二代慢病毒载体系统（Zufferey et al., 1997）。

第三代慢病毒载体系统：随后的研究中，通过将其他来源的强启动子取代原病毒载体中的 *tat* 基因，进一步降低了病毒重组的几率。同时包装质粒由两个分别表达 *gag*、*pol* 和独立表达 *Rev* 的质粒构成，形成四质粒系统（图 1.6），进一步降低同源重组的可能（Westerman et al., 2007）。

第四代慢病毒系统中添加了可诱导性基因，控制反应条件影响目的基因的表达。例如，插入四环素诱导系统后，目的基因只能在四环素或衍生物刺激的条件下才能表达。同时，研究者用人类核蛋白 *sam68*、猴病毒的组成性转运元件、脾坏死病毒转录后控制元件替代原 HIV 病毒 *RRE* 元件，增加了转录的稳定性（Reddy et al., 1999; Roberts and Boris-Lawrie, 2000）。

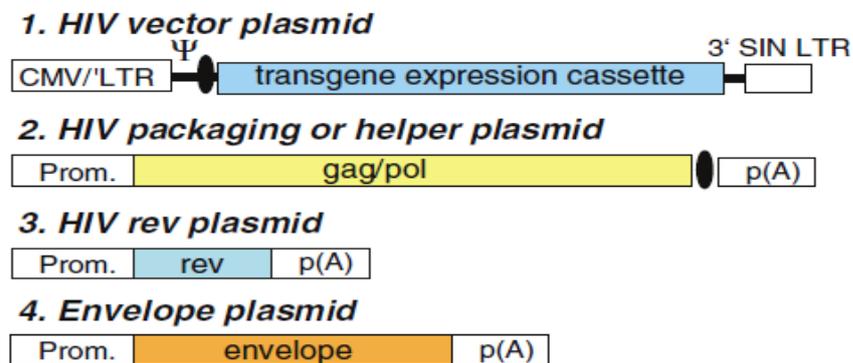


图1.6 第三代慢病毒载体系统（Sinn et al., 2005）

Fig.1.6 The third generation lentiviral vector system

#### 1.2.4 慢病毒载体的应用

慢病毒作为一种感染效率高、宿主范围广且稳定表达外源基因的逆转录病毒载体，已广泛应用于基因治疗、药物研发、基因功能研究、转基因动物模型建立等研究领域。

(1) 基因治疗：基因治疗是将正常基因或者具有治疗作用的目的基因导入靶细胞，以纠正或补偿缺陷和异常基因引起的先天或者后天疾病。基因治疗载体分为病毒性载体和非病毒性载体，病毒性载体中慢病毒载体具有感染效率高、可感染分裂和非分裂期细胞等优势，已有大量研究应用慢病毒载体在地中海贫血症、镰刀状细胞贫血症、帕金森病、阿尔茨海默病等疾病治疗中取得良好的效果（Brown et al., 2007; Lo Bianco et al., 2004; Puthenveetil et al., 2004）。例如 Poeschla 等构建含 *GDNF* 基因的重组慢病毒载体转到患有帕金森病（Parkinson's disease, PD）的大鼠，结果显示 *GDNF* 基因的稳定表达可促进损伤神经细胞的修复、防止多巴胺神经元退化，减轻 PD 神经症状，改善动物的行为异常（Lo Bianco et al., 2004）。

(2) 介导 RNA 干扰研究：RNA 干扰（RNA interference, RNAi）是一种利用高度保守 dsRNA 诱发同源 mRNA 高效特异性降解的现象。RNAi 基因沉默技术与慢病毒载体结合即可以特异性抑制或阻断目的基因的表达探索目的基因功能，还可利用慢病毒稳定表达的特性建立人类疾病模型用于基因治疗。刘彬等将构建靶向 *LOX-1* 基因的 RNAi 慢病毒载体转染大鼠心肌细胞，结果显示抑制凝集素样氧化性低密度脂蛋白受体的表达能减轻  $H_2O_2$  诱导的心肌细胞凋亡，说明 *LOX-1* 对  $H_2O_2$  诱导的心肌细胞损伤具有重要作用（刘彬等，2012）。Pfeifer 等利用慢病毒载体介导的 siRNA

转入小鼠受精卵中，成功获得特定基因表达沉默的小鼠，为相关疾病机制及特定基因缺失后对细胞功能研究提供了有效的动物模型（Pfeifer and Hofmann, 2009）。

（3）转基因动物生产：转基因动物是指通过遗传操作将外源基因整合到宿主基因组中而且能够遗传给后代的一类动物。2002年，Lois等利用HIV-1来源的病毒载体，携带由全身性表达的启动子控制的GFP基因，由VSV-G包装成假型病毒颗粒，侵染小鼠单细胞胚胎，高效制备了转基因小鼠(80%)，并在G1代检测到了GFP的表达（Lois et al., 2002）。2004年，McGrew用马传染性贫血病毒制备转基因鸡，结果表明转基因的生殖传递效率可高达45%（McGrew et al., 2004）。与此同时，Chapman利用慢病毒第一次实现了外源基因GFP在鸡中进行全身性表达，且GFP在鸡的G1~G4代稳定表达，不发生基因沉默（Chapman et al., 2005）。国内众多学者也利用该方法在制备转基因鸡的研究中取得了很大进展。2015年，刘同新等通过慢病毒载体的方法，成功获得了在蛋清中表达HNP4的转基因鸡，并且外源基因HNP4能够在G1和G2代转基因鸡中稳定表达（刘同新, 2015）。同年，曹代楠等通过显微注射方法，将包装好的携带人溶菌酶基因慢病毒注射至鸡胚盘下腔，成功获得G0代转基因鸡，G1代蛋清中人溶菌酶基因高水平表达（曹代楠, 2015）。2017年，陈忠毅等利用顿端注射慢病毒方法获得了表达LTF的转基因鸡，并且探讨了封口方式、开口位置及不同病毒滴度对孵化率的影响（陈忠毅, 2017）。

### 1.3 DExD/H-box 蛋白家族

#### 1.3.1 DExD/H-box 家族的结构

DExD/H-box 家族蛋白是一类广泛存在于原核生物、真核生物、古细菌和病毒等物种中，参与RNA或核糖核蛋白（RNP）复合物结构重塑的RNA解旋酶，属于RNA解旋酶超级家族2型（SF2）。该家族蛋白含保守解旋酶核心结构（图1.7），由两个RecA样球状结构域（DOMAINS 1和2）组成（Jankowsky, 2011）。在三维结构中，结构域1和结构域2通过柔性接头连接形成保守的折叠结构，并激活与解旋酶活性相关的蛋白。在该解旋酶核心内，至少12个特征基序（基序Q, I, Ia, Ib, Ic, II, III, IV, V, Va, Vb和VI），在不同家族这些基序的保守水平存在差异。核心结构保证了RNA解旋酶以依赖ATP供能的方式实现对RNA解旋或RNP结构重组的可能性，核心结构域两端为可变的辅助结构域，羧基末端区域和氨基末端区域在家族内或家族之间通常不保守。

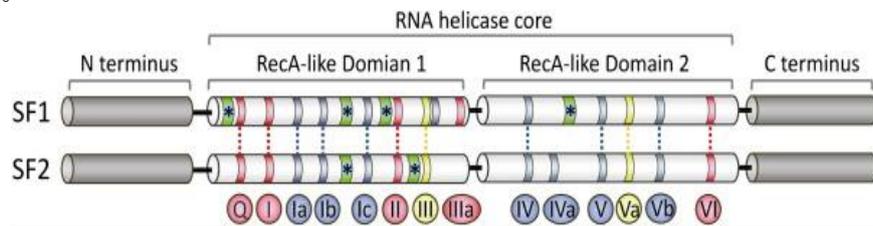


图1.7 SF1和SF2蛋白中RNA解旋酶核心结构（Jankowsky, 2011）

Fig.1.7. Structure of RNA helicase core in SF1 and SF2 proteins

#### 1.3.2 DExD/H-box 家族的分类

DExD/H 因含有特征性的天冬氨酸-谷氨酸-x-天冬氨酸/组氨酸的残基而得名，“x”代表任意氨

基酸。根据保守解旋酶基序 II 中氨基酸序列的不同, DExD/H 家族可分为 DEAD-box、DEAH-box、Ski2-like-box、RIG-I-like-box、NS3 等亚家族(图 1.8)(Fullam and Schroder, 2013)。研究证实, DExD/H RNA 解旋酶几乎参与了所有涉及 RNA 代谢相关的细胞过程, 如 mRNA 前体加工、转录、翻译和 RNA 降解。近年来, 越来越多的研究发现 DExD/H-box 解旋酶除了传统的功能外, 在不同类型肿瘤的发生发展、参与炎症反应或者作为病毒核酸的感受器参与下游信号传递, 在多种病毒复制过程中也起到非常重要作用。



图1.8 DExD/H-box家族蛋白的保守基序

Fig.1.8 The conserved motif of DExD/H-box family

### 1.3.3 DExD/H-box 家族 DDX21 蛋白功能简介

各种病原微生物会对受感染的细胞产生不同程度的应激, 在感染期间, 机体免疫细胞可在多种受体的作用下对病原分子进行检测, 这些受体所识别的病原体保守分子结构称为病原体相关分子模式 (pathogen-associated molecular pathogen-associated molecular patterns, PAMP)。源自病原体的核酸, 包括 RNA、基因组 DNA 以及复制中间体和双链 RNA, 都可作为 PAMP 被多种细胞受体蛋白检测并激活下游信号传导, 诱导抗病毒干扰素 (Interferon, IFN) 的产生并引发一系列免疫应答反应。DDX21 (DExD-box helicase 21, DDX21) 是由 Flores-Rozas 等首次从 HeLa 细胞的核提取物中鉴定的解旋酶 (Flores-Rozas and Hurwitz, 1993)。研究证实, 其不仅参与 mRNA 前体加工、核糖体的生成、RNA 的转运和降解等多种生物学过程, 而且在参与机体的天然免疫应答、调控 IAV、HIV 和 DENV 等多种病毒的增殖及信号传导也发挥了重要功能 (Calo et al., 2015; Fullam and Schroder, 2013; 谢立兰 et al., 2017)。

DDX21 作为核仁蛋白可参与 rRNA 的加工, DDX21 的下调能够抑制非洲爪蟾卵母细胞中 20sRNA 到 18sRNA 的加工, 并导致 28sRNA 的降解。Henning 和 Zhang 等研究发现沉默细胞中 DDX21 基因表达, 能够抑制细胞中 18s 和 28sRNA 产生并减缓细胞增殖, 提示 DDX21 可能与细胞生长和增殖因子相互作用, 参与细胞的增殖过程 (Henning et al., 2003; Zhang et al., 2014)。DDX21 的羧基端结构域可以与转录因子 c-jun 的氨基端转录激活区相互作用, 参与 c-jun 介导的靶基因激活过程。2015 年, Calo 等发现 DDX21 可以感知 RNA 聚合酶(pol)I 和 II 的转录状态, 广泛结合 pol I、pol II 及编码核糖核蛋白复合物的非编码 RNA, 调控人类细胞中核糖体生物合成的转录等过程 (Calo et al., 2015)。

此外, 在甲型流感病毒感染过程, DDX21-TRIF-S100A9-TLR4-MyD88 复合物作为一种新型

信号传导“网络”，可调节病毒感染过程中的促炎反应 (Tsai et al., 2014)。在流感病毒感染早期，DDX21 与病毒 PB1 蛋白结合并抑制聚合酶的合成，从而抑制流感病毒的复制，而在感染后期，病毒的 NS1 蛋白可竞争性的与 DDX21 结合，释放 PB1 蛋白解除 DDX21 对病毒复制的抑制作用 (Chen et al., 2014)。2016 年，Dong 等研究小组发现在登革热病毒(Dengue virus,DENV)感染的细胞中，DDX21 从细胞核转移到细胞质以激活天然免疫反应，在感染早期抑制 DENV 的复制，后期 DDX21 被病毒 NS2B-NS3 蛋白酶复合物降解，从而破坏宿主天然免疫系统促进 DENV 在宿主细胞中的复制 (Dong et al., 2016)。刘永军等利用生物素标记 poly(I:C)和蛋白 pull-down 实验证明，在髓样树突状细胞中，DDX21 可以与 DDX1 和 DHX36 形成 DDX1-DDX21-DHX36 复合物结合 poly(I:C)。此外，DDX21 和 DHX36 分别通过 DUF 和 PRK 结构域与 TRIF 的 TIR 结构域结合，介导下游信号传导。通过 shRNA 沉默 DDX1、DDX21、DHX36 以及 TRIF 都可抑制 I 型干扰素和细胞因子的产生，说明 DDX1 识别 dsRNA 后通过 DDX21、DHX36 将信号传递给 TRIF，激活下游信号传导过程 (Zhang et al., 2011)，信号通路如图 1.9 所示。

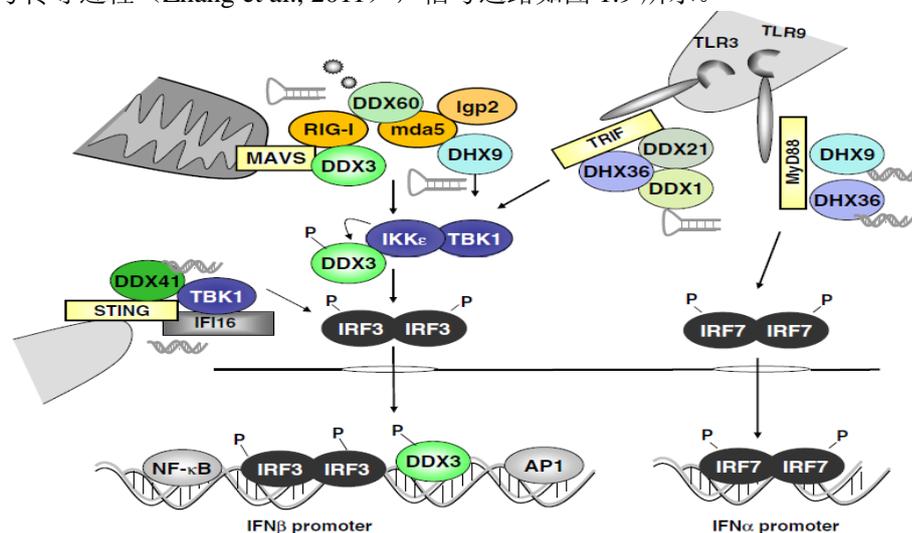


图 1.9 DExD/H-box RNA 解旋酶分子信号通路图 (Fullam, 2013)

Fig.1.9 DExD/H-box RNA helicases signal pathway

## 1.4 研究目的和意义

基因编辑技术是研究基因功能的重要方法，CRISPR/Cpf1 作为一种新型的基因编辑技术，具有更简单、更精准实现基因组编辑的潜能，但是利用该方法在哺乳动物细胞是否具有更高的编辑效率、能否应用在家禽细胞和鸡体中的修饰尚未见报道。本文利用多种分子生物学实验技术，从多个角度证明了 CRISPR/Cpf1 可以有效实现哺乳动物细胞和禽源细胞中的基因组编辑，并且与已报道的 CRISPR/Cas9 系统存在相似的编辑效率；在此基础上构建了稳定敲除 DDX21 基因的 HEK293 和鸡 DF-1 细胞株，探索了利用慢病毒系统介导鸡体上的基因组修饰。此外，以构建的 HEK293-DDX21<sup>-/-</sup>为细胞模型，通过 H9N2 亚型 AIV 感染实验对 DDX21 基因的生物学功能进行了研究。本研究建立了应用于哺乳动物细胞和禽源细胞的基因组定点修饰的 CRISPR/Cpf1 系统，为研究 DDX21 的作用机制提供了理想的细胞模型，为进一步揭示基因功能、动物传染性病原感染的天然免疫应答及病毒致病机制等具有重要的意义。

## 第二章 CRISPR/Cpf1 系统介导哺乳动物细胞的基因组编辑

### 2.1 材料

#### 2.1.1 质粒和细胞

pU6-Lb-crRNA (#78957)、pY106 (pcDNA3.1-hLbCpf1 #69988) 质粒由哈尔滨工业大学黄志伟教授惠赠；pCMV-hAsCpf1-RFP 质粒由中国科学院动物研究所提供；HEK293 细胞、大肠杆菌 (*Escherichia coli*, *E. coli*) DH5 $\alpha$  由本实验室保存。

#### 2.1.2 主要试剂和仪器

DMEM 培养基、胎牛血清购自 Gibco 公司；青链霉素、PBS (Phosphate Buffer Saline) 磷酸盐缓冲溶液、胰酶均购自哈尔滨兽医研究所动物疫病诊断及技术服务中心；pMD18-T 载体、5 $\times$ Loading Buffer 蛋白上样缓冲液、Marker、6 $\times$ 核酸上样缓冲液购自 Takara 公司；各种限制性内切酶、T4 DNA 连接酶购自 NEB 公司；无内毒素质粒大提试剂盒、细胞/组织基因组 DNA 提取试剂盒购自 TIAGEN 公司；PCR 清洁试剂盒、胶回收试剂盒购自 AXYGENT 公司；抗  $\beta$ -actin 兔单克隆抗体、抗 DDX21 兔多克隆抗体购自 OmnimAbs 公司；转染试剂购自 Invitrogen 公司；各种引物由哈尔滨博仕生物技术有限公司合成。

小型台式离心机、恒温冷冻离心机、PCR 仪购自德国 Eppendorf 公司；垂直电泳槽、半干转膜仪购自 Bio-Rad 公司；细胞培养箱、细菌培养箱、生物安全柜购自 Thermo scientific 公司；倒置荧光显微镜购自德国 Leica 公司。

### 2.2 方法

#### 2.2.1 靶点的选择及设计

在 NCBI 中检索人源 DDX21 基因 (Gene ID:9188)，利用网络工具 chopchop ([http:// chop chop.cbu.uib.no/](http://chopchop.cbu.uib.no/)) 筛选 gRNA 序列；选择位于第 15 外显子特异性较高的靶点 DDX21-gRNA 序列，分别在编码链的 5' 端添加 AGAT，非编码链的 5' 端添加 AAAA，使其与 pU6-Lb-crRNA (图 2.1) 酶切后形成的粘性末端互补。根据靶点位置设计相应的测序引物 (基因组相对位置为 26551-26795) 及鉴定引物 (基因组相对位置为 26119-26730)，产物大小分别为 245bp 和 612bp (表 2-1)。

表2-1 DDX21-gRNA及检测引物寡核苷酸序列

Table 2-1 The oligo sequences of DDX21-gRNA and detection primers		
引物名称	序列 (5'-3')	PCR产物大小
DDX21-gRNA	TTGCCACCTCCTGATCGCTGTCCT AGGACAGCGATCAGGAGGTGGCAA	
Short-chain primer of DDX21	F: GGGACGGAAACAGAAGAT R: TCAAAAAGGAGGCACAATG	245bp
Long-chain primer of DDX21	F: TGTTTTATTACCTTTGGCT R: ACATCATCTCTTTTTGCT	612bp

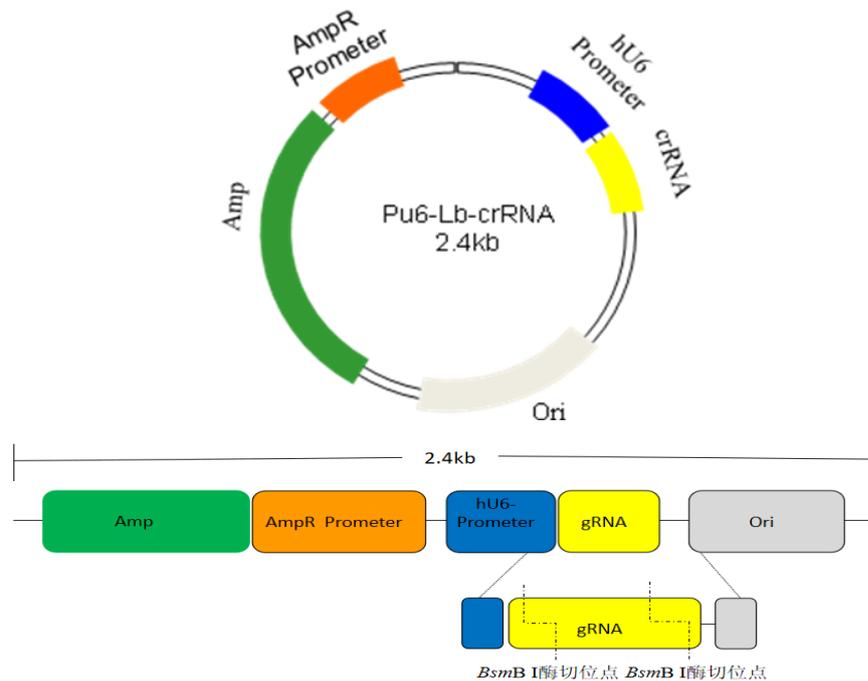


图2.1 pU6-Lb-crRNA质粒图谱

Fig.2.1 schematic of pU6-Lb-crRNA plasmid

## 2.2.2 CRISPR/Cpf1 打靶载体的构建

### 2.2.2.1 载体骨架的获取

本研究所利用的 Cpf1 双质粒表达系统，分别为 U6 启动子启动 gRNA 的表达(图 2.1)，人源的 CMV 启动子启动 Cpf1 的表达。pU6-Lb-crRNA 打靶载体骨架的获取：按照表 2-2 中的体系，用 *BsmB I* 酶于 37°C 水浴锅中单酶切 pU6-Lb-crRNA 载体 1h，酶切产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳 30min，通过凝胶成像系统可以清晰观察到大小 2409bp 的目的条带，切下条带，利用凝胶回收试剂盒说明书操作对目的片段进行回收纯化，即得到 pU6-Lb-crRNA 的载体骨架。

表2-2 pU6-Lb-crRNA骨架酶切体系

Tab 2-2 Digestion system of pU6-Lb-crRNA backbone	
试剂	用量
pU6-Lb-crRNA质粒	2 $\mu$ g
<i>BsmB I</i> 酶	2 $\mu$ L
Buffer	3 $\mu$ L
ddH <sub>2</sub> O	补至30 $\mu$ L

### 2.2.2.2 Oligo 退火形成双链 DNA

将合成的引物稀释浓度至 100 $\mu$ mol/L，取等量上下游链混合的正反链 Oligo 溶液进行退火，：95°C 5 min，-1°C/s 降温至 25°C。反应体系如表 2-3：

表2-3 退火反应体系

名称	体积
正链Oligo (100 $\mu$ mol)	10 $\mu$ L
反链Oligo (100 $\mu$ mol)	10 $\mu$ L
Buffer	5 $\mu$ L
ddH <sub>2</sub> O	25 $\mu$ L

### 2.2.2.3 DNA 的连接

纯化后的酶切载体骨架与退火的寡核苷酸双链以 1:3 的摩尔数比进行连接反应，于 16 $^{\circ}$ C 金属浴连接过夜，连接体系如表 2-4:

表2-4 连接反应体系

试剂	用量
T4连接酶	1 $\mu$ L
10xBuffer	1 $\mu$ L
pU6-Lb-crRNA	2 $\mu$ L
退火产物	6 $\mu$ L

### 2.2.2.4 质粒 DNA 的转化

- (1) 将上述连接产物加入到 DH5 $\alpha$  感受态细胞中，轻轻混匀；
- (2) 冰中静置孵育数分钟后，42 $^{\circ}$ C 水浴 90 s，迅速置于冰上 3 min；
- (3) 加入 800  $\mu$ L 无抗生素的 LB 液体培养基，37 $^{\circ}$ C 恒温摇床 200 r/min 孵育 1 h，室温 3000 g/min 离心 5 min 收集细胞；
- (4) 200  $\mu$ L 培养基悬浮 EP 管底菌体混匀，均匀涂布于 LB 平板（氨苄抗性，100 ng/ $\mu$ L），正面向上放置 10 min 后，于 37 $^{\circ}$ C 恒温培养箱倒置培养 12~16 h；
- (5) 挑取单菌落于氨苄抗性的 LB 液体培养基中，培养 12~16 h 后，按照质粒小提或大提试剂盒说明书提取质粒并测序验证，命名测序正确的质粒为 pU6-Lb-crRNA-DDX21。

### 2.2.3 CRISPR/Cpf1 报告载体的构建

本研究利用的 CRISPR/Cpf1 表达载体 pY106 (pcDNA3.1-hLbCpf1) 包含 G-418 报告基因，为进一步提高获得阳性细胞的效率，构建含 RFP 的荧光报告载体，因此可以利用流式细胞仪或者添加 G-418 筛选阳性细胞，提高筛选效率。

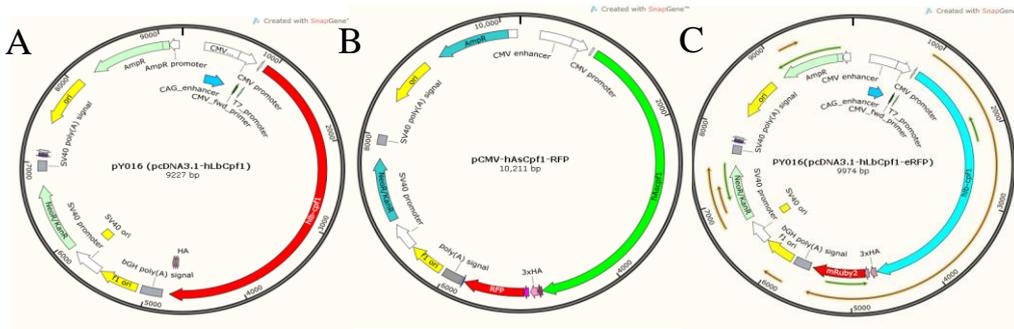


图2.2 质粒图谱

Fig.2.2 Schematic of plasmid

图A为pY106 (pcDNA3.1-hLbCpf1) 表达载体图谱; 图B为pCMV-hAsCpf1-RFP表达载体图谱;

图C为pcDNA3.1-LbCpf1-RFP表达载体图谱

Fig A was the map of pY106 (pcDNA3.1-hLbCpf1) expression vector; Fig B was the map of pCMV-hAsCpf1-RFP expression vector; Fig C was the map of pcDNA3.1-LbCpf1-RFP expression vector

CRISPR/Cpf1 骨架获取: 按照表 2-5 的反应体系, 在 37°C 水浴锅中用 *EcoR I/Xba I* 对 pcDNA3.1-hLbCpf1 载体 (图 2.2A) 及 pCMV-hAsCpf1-RFP 载体 (图 2.2B) 分别酶切 1.5 h, 经 1% 琼脂糖凝胶电泳, 通过紫外凝胶成像系统可以观察到 9189 bp 和 789 bp 的目的条带, 分别对目的条带回收并进行纯化。

表2-5 pY106 (pcDNA3.1-hLbCpf1) 及RFP片段酶切体系

Tab 2-5 Digestion system of pY106 (pcDNA3.1-hLbCpf1) and RFP Fragment

试剂	用量
pcDNA3.1-hLbCpf1	各2 μg
pCMV-hAsCpf1-RFP	
<i>EcoR I</i>	2 μL
<i>Xba I</i>	2 μL
Buffer	5 μL
ddH <sub>2</sub> O	20 μL

如表 2-6 所示, 将纯化后的 pcDNA3.1-hLbCpf1 载体骨架和纯化回收的 789bp 的 RFP 片段用超微量分光光度计测定 DNA 浓度后, 按照骨架/片段摩尔质量比=1:3 的比例, 利用 T4 DNA 连接酶, 16°C 连接过夜。

表2-6 CRISPR/Cpf1 表达载体连接反应体系

Table 2-6 Ligation reaction system for CRISPR/Cpf1 expression vector

试剂	用量
pcDNA3.1-hLbCpf1 骨架	1.5 μL
T4连接酶	1 μL
RFP片段	0.4 μL
10xBuffer	1 μL
退火产物	6.1 μL

将连接产物转化于大肠杆菌 DH5α 感受态细胞中, 利用无抗培养基重悬菌体细胞沉淀, 均匀

涂于 Amp 抗性 LB 培养板, 放置于 37°C 恒温培养箱过夜培养。挑取单菌落培养 14~16 h 后小提质粒。经 *EcoR* I/*Xba* I 双酶切后, 经 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定后, 将酶切正确的质粒送至吉林省库美生物测序公司进行测序, 命名测序正确的质粒为 pcDNA3.1-hLbCpf1-RFP (图 2.2C), 大提质粒, -20°C 保存。

## 2.2.4 细胞的培养及转染

### 2.2.4.1 细胞的冻存与复苏

细胞的冻存: 选择生长状态良好的细胞, 用 0.25% 胰酶消化处理, 待细胞间出现间隙或者逐渐变圆皱缩后, 吸弃胰酶, 加入 DMEM 完全培养基, 将细胞轻轻地从瓶壁吹下, 1000 g 离心 5 min, 弃去培养基, 含有 DMSO 的细胞冻存液将细胞重悬, 分装至细胞冻存管中, 标注细胞名称、冻存日期等信息, 放入细胞冻存盒中梯度降温后, 液氮保存。

细胞的复苏: 从液氮灌中取出冻存的细胞, 快速置于 37°C 恒温水浴锅中迅速解冻。轻轻吸取细胞悬液于离心管中, 1000 g 离心 5 min, 弃去上清。用 1 mL 含 10% FBS 培养基轻轻重悬细胞, 接种至细胞培养瓶, 加入 5 mL 新鲜培养基, 轻轻晃动培养瓶, 使细胞在培养瓶中均匀分布, 置于 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 细胞培养箱中培养。

### 2.2.4.2 细胞的培养及传代

待贴壁细胞密度生长至 80%~90% 时, 在超净工作台内, 弃去旧培养基, 加入 2 mL 灭菌的 PBS 溶液, 轻轻摇晃洗涤 3 次。加入 1 mL 胰酶消化, 轻轻摇晃细胞培养瓶, 使消化液均匀分布培养瓶底部, 培养箱中消化 1~3 min, 至细胞逐渐变圆或观察到少量细胞脱落时, 迅速立起细胞培养瓶, 吸弃胰酶, 加入 2 mL 新鲜培养基终止细胞消化, 轻轻吹打数次, 调整合适的细胞密度进行传代培养。

### 2.2.4.3 细胞的瞬时转染

(1) 选择生长状态良好的细胞, 细胞生长密度达 80%~90% 时, 弃掉细胞培养基, 灭菌的 PBS 漂洗 3 次, 用胰蛋白酶消化后, 使用新鲜 DMEM 重悬细胞, 调整细胞密度, 按照  $5 \times 10^5$ /孔接种 6 孔培养板;

(2) 转染前 1 h 更换无血清培养基, 细胞贴壁融合度达 60% 时, 按照说明书操作进行细胞转染, 将 pcDNA3.1-hLbCpf1-RFP 和 pU6-Lb-crRNA-DDX21 载体各 1  $\mu$ g 加入至含 200  $\mu$ L Opti-MEM 的 1.5 mL EP 管中, 按照质粒 ( $\mu$ g): 转染试剂 ( $\mu$ L) = 1:2 比例, 加入转染试剂, 充分混匀, 静置 20min 后加至细胞中, 继续培养 6~8 h;

(3) 根据细胞状态的变化, 选择吸弃转染复合物, 用 DMEM 培养基洗涤 2 次, 加入完全培养基, 放入培养箱中继续培养, 转染 24~48 h 后, 在荧光倒置显微镜下观察细胞红色荧光蛋白的表达情况。

## 2.2.5 CRISPR/Cpf1 载体对靶基因的编辑

细胞转染 48h 后, 收集转染组及对照组各一个重复的细胞提取细胞基因组 DNA, 其余用浓度为 1  $\mu$ g/mL G-418 的培养基进行筛选, 每天更换含 G-418 的培养基, 经过连续筛选 2 天后, 利用流式细胞仪继续筛选表达红色荧光蛋白的单克隆细胞至 96 孔细胞培养板, 连续传代至 24 孔板,

密度达到 90% 开始收集部分细胞继续传代，部分细胞按照细胞组织基因组 DNA 提取试剂盒说明书提取基因组。

### 2.2.5.1 靶基因的扩增

以转染组及对照组的基因组 DNA 为模板，以 Long-chain primer of DDX21 为引物 PCR 扩增 612 bp 的目的片段，反应体系如表 2-7 所示，反应程序为：95 °C 预变性 5 min，95 °C 变性 30 s，50 °C 退火 30 s，72 °C 延伸 1 min，共 30 个循环；72 °C 延伸 5 min，4 °C 保存。

表2-7 PCR反应体系

试剂	用量
基因组DNA	2 $\mu$ L
Ex Taq 酶	25 $\mu$ L
上游引物	0.5 $\mu$ L
下游引物	0.5 $\mu$ L
ddH <sub>2</sub> O	补至50 $\mu$ L

### 2.2.5.2 T7E1 酶切鉴定

T7E1 实验分析步骤：用 PCR 清洁试剂盒纯化 PCR 产物，纯化后的产物退火并测定浓度，加入 T7E1 核酸酶，37 °C 水浴 2 h，酶切产物经 2 % 琼脂糖凝胶电泳鉴定。利用软件 Image J 分析条带灰度值，并通过公式计算切割效率： $\text{Indel}(\%) = 100 \times [1 - (1 - \text{切割产生的新条带的灰度值} / \text{总条带的灰度值})^{1/2}]$ 。

表2-8 T7E1检测反应体系

反应试剂	用量
T7E1核酸酶	1 $\mu$ L
纯化的PCR产物	2.5 ng
10xBuffer 2	5 $\mu$ L
ddH <sub>2</sub> O	补至50 $\mu$ L

### 2.2.5.3 构建敲除 DDX21 基因的 HEK293 细胞株

提取流式细胞仪分选细胞的基因组 DNA，用 Short-chain primer of DDX21 引物进行 PCR 扩增，通过聚丙烯酰胺凝胶电泳进行初步分析，PCR 产物与 PMD-18T 载体 16 °C 连接过夜，然后将连接产物加入大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态细胞，冰浴 30min，42 °C 热激 90s，冰浴 3min，将转化产物均匀涂布含氨苄抗性 (Amp, 100 ng/ $\mu$ L) LB 固体培养基中，37 °C 过夜培养，测序鉴定。

表2-9 TA克隆反应体系

反应试剂	用量
PMD-18T载体	1 $\mu$ L
纯化的PCR产物	2 $\mu$ L
Solution I	1 $\mu$ L
ddH <sub>2</sub> O	补至50 $\mu$ L

#### 2.2.5.4 SDS-PAGE

选取造成 DDX21 基因移码突变的细胞，一部分细胞用于传代保存，另一部分与正常细胞培养同时提取细胞蛋白，RIPA 冰上裂解细胞 30min，加入 5×SDS loading buffer 混匀，沸水浴 10min，待检样品进行聚丙烯酰胺凝胶电泳，电泳后转移到硝酸纤维素膜，5%脱脂奶粉封闭 1h，PBST 洗涤 5 min×3 次，用小鼠抗人  $\beta$ -actin(1: 15000)，小鼠抗人 DDX21 (1: 2000)，室温孵育 1h；PBST 洗涤 10 min×3 次，用山羊抗小鼠 IgG(1: 10 000)，室温孵育 2h；PBST 洗涤 5 min×3 次，PBS 洗涤 5min×3 次，化学发光法检测蛋白条带。

#### 2.2.6 脱靶检测

用在线分析软件(<http://chopchop.cbu.uib.no/>)选择了 3 个潜在的脱靶位点 SCHLAP1、RP11、FAM135B 如表 2-10 所示。分别设计相应的检测引物扩增出 436 bp、636 bp、444 bp 的 PCR 产物，进行 DNA 的纯化，程序性退火后，利用 T7E1 酶切方法进行检测。

表2-10 DDX21潜在脱靶位点

Table 2-10 The potential off-target site of DDX21

基因名称	脱靶序列(5'→3')	检测引物	产物大小
SCHLAP1	CTACCACCTCTTGATCACTGTCC	F:TAATGAGGCTAAAAATGG R:CTCTAGAAATCCTGGGTG	436bp
RP11	ATGCCACATCCTGAGCTCTGTCC	F:CAGGTCGTGTGGAAGTGA R:GACAAAGATAGAAATGGG	636bp
FAM135B	TTTCCACATCCTGATGGCTGTCT	F:ATTAGGGAAGTAGAACAG R:CATAACCAACGATATGAG	444bp

#### 2.2.7 细胞接毒

H9N2 亚型禽流感病毒 (HA 为 1: 128,  $TCID_{50}=10^{-5.5}$ )，以 MOI=1 的量接种细胞，37℃培养箱中培养，6 h、12 h、18 h、24 h、36 h 不同时间点收取上清，检测  $TCID_{50}$ ，绘制病毒在 HEK293 细胞上的生长曲线。

#### 2.2.8 模式识别受体、细胞因子及抗病毒蛋白 mRNA 表达水平检测

在不同时间点收取 WT 对照组及敲除组接毒细胞上清，每个样品设置 3 个平行样本，提取 RNA，反转录成 cDNA；荧光定量 PCR 检测 TLR-3、TLR-7、MDA-5、IFN- $\alpha$ 、IFN- $\beta$ 、IL-6、OAS 基因表达量，以 GAPDH 为内参基因，采用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法进行计算。

表2-11 HEK293细胞荧光定量PCR引物

Table 2-11 Fluorescent PCR primers for HEK293 cells

引物名称	序列(5'→3')	产物大小
TLR3	F: GAAGTACTTGACCTGGGCCT R: CTTCGGAGCATCAGTCGTTG	167 bp
TLR7	F: CCCATCAGAGGCTCATGGAT R: GAAGTATGGGTGAGCTTGCG	155 bp

(续表2-11)

引物名称	序列(5'→3')	产物大小
MDA5	F: AGGGCCAGGGTGAAAATGTA R: TTCAACTGCCTGCATGTTCC	126 bp
IFN- $\alpha$	F: GTCCTCCATGAGCTGATCCA R: GTTTCTCCCACCCTCTCCTC	161 bp
IFN- $\beta$	F: TGCTCTCCTGTTGTGCTTCT R: AAGCCTCCCATTCAATTGCC	121 bp
IL-6	F: TACCCCCAGGAGAAGATTCC R: TTTTCTGCCAGTGCCTCTTT	175 bp
OAS	F: TGGGATCTTCTCCCACACTC R: AGCTGCTGCTGCTTTTTAGG	180 bp
GAPDH	F: GAGTCAACGGATTTGGTCGT R: TTGATTTTGGAGGGATCTCG	208 bp

### 2.2.9 统计分析

利用 Graphpad prism 6.0 软件进行实验数据统计分析, Tukey's test 用于各组数据差异分析, P 值<0.05(\*)表示差异显著; P 值<0.01(\*\*)表示差异极显著。

## 2.3 结果

### 2.3.1 CRISPR/Cpf1 打靶及报告载体的鉴定

原载体 pU6-Lb-crRNA 和重组载体 pU6-Lb-crRNA-DDX21 只有 24bp gRNA 不同, 其余部分相同。酶切 pU6-Lb-crRNA 后 (图 2.3A) 与 gRNA 退火产物连接, 将重组载体 pU6-Lb-crRNA-DDX21 转化大肠杆菌感受态细胞, 挑取单克隆至菌液中扩增, 提取质粒通过测序鉴定, 测序结果与预期的序列一致(图 2.3B), 表明打靶载体 pU6-Lb-crRNA-DDX21 构建成功。

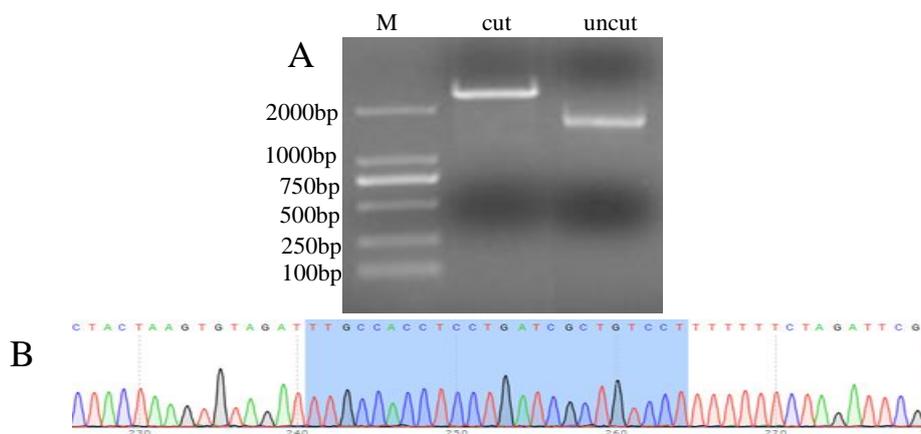


图2.3 打靶载体的鉴定

Fig.2.3 Identification of expression vector

图A为pU6-Lb-crRNA载体酶切结果检测; 图B为打靶载体靶点测序结果

Fig A was the enzyme digestion for pU6-Lb-crRNA; Fig B was the sequencing results of target sites in expression vector

为了便于后续实验中阳性细胞的筛选富集,节省人力、物力等资源,本研究通过 *Xba* I/*Bam*H I 双酶切载体 pCMV-hAsCpf1-RFP 和 pcDNA3.1-hLbCpf1 分别获得 876bp 的 RFP 片段(图 2.4A) 及 9335bp 的 CRISPR-Cpf1 骨架(图 2.4B)。

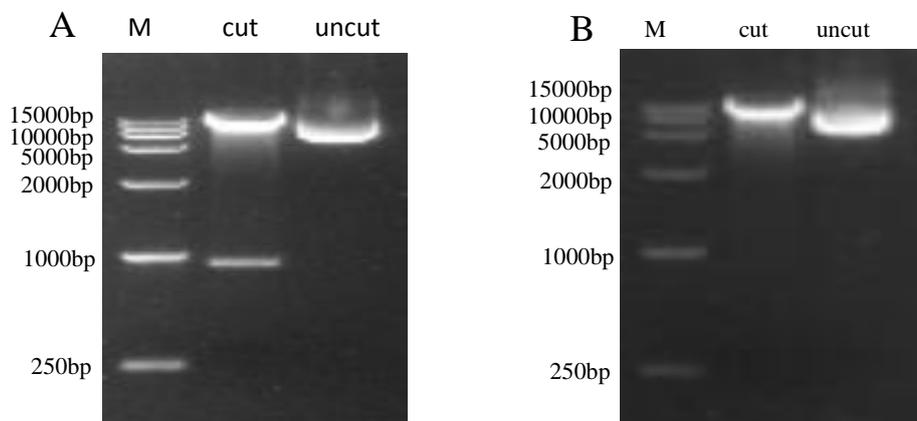


图 2.4 pCMV-hAsCpf1-RFP 和 pcDNA3.1-hLbCpf1 载体酶切检测结果

Fig.2.4 The results of the enzyme digestion of pCMV-hAsCpf1-RFP and pcDNA3.1-hLbCpf1 vector

连接转化的重组载体通过 *Xba* I/*Bam*H I 酶切以及将 CRISPR/Cpf1 载体转染至 HEK293 细胞中鉴定。重组载体经双酶切可产生与预期大小相同的目的条带(图 2.5A);同时,在倒置荧光显微镜下可观察到细胞表达红色荧光,说明 RFP 序列插入骨架载体中,成功构建 pcDNA3.1-hLbCpf1-RFP 表达载体(图 2.5B)。

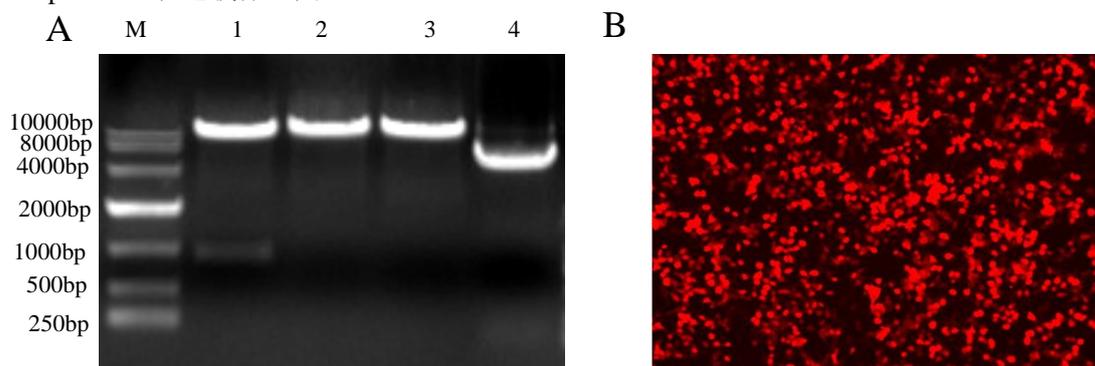


图2.5 pcDNA3.1-hLbCpf1-RFP载体检测结果

Fig.2.5 The results of the enzyme digestion of pcDNA3.1-hLbCpf1-RFP

图A泳道1为*Xba* I/*Bam*H I 酶切载体; 图A泳道2为*Bam*H I 酶切载体;

图A泳道3为*Xba* I 酶切载体; 图A泳道4为空白对照

Fig A line 1 was *Xba* I/*Bam*H I double digested vector;Fig A line2 was *Bam*H I digested vector;

Fig A line 3 was *Xba* I digested vector;Fig A line 4 was control

### 2.3.2 CRISPR/Cpf1 核酸酶活性检测

为验证 CRISPR/Cpf1 系统在 HEK293 细胞靶向 DDX21 基因的编辑效率,本研究通过 T7E1 核酸酶进行切割鉴定。PCR 扩增转染及 G-418 筛选后的细胞及对照组的基因组 DNA,并检测 PCR 产物特异性; PCR purification Kit 纯化 DNA 片段,经 2% 琼脂糖凝胶电泳分析 gRNA 有较高的打

靶效率，分析条带灰度值计算 gRNA 打靶效率约为 56.8 % (图 2.6)

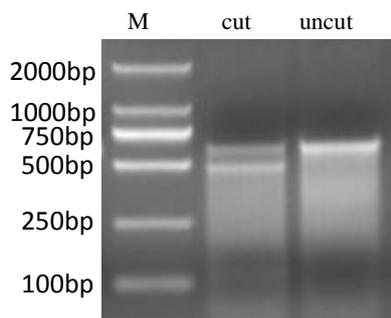


图2.6 T7E1检测gRNA切割效率

Fig.2.6 T7E1 detects gRNA cleavage efficiency

### 2.3.3 稳定敲除 DDX21 的 HEK293 细胞系的建立

为了进一步验证 CRISPR/Cpf1 系统靶向 DDX21 基因的突变效率，将流式细胞仪分选后分选的细胞，PAGE 凝胶电泳进行初步鉴定，检测结果发现 1~6 号样品疑似发生敲除 (图 2.7)。相应 PCR 产物与 pMT-18T 载体连接转化后送公司测序，4 号、6 号分别缺失 16 bp、26 bp，其余样品发生单染色体缺失或缺失碱基数未能造成移码突变，以上结果表明 CRISPR/Cpf1 系统能够对介导哺乳动物 HEK293 细胞的基因组编辑。

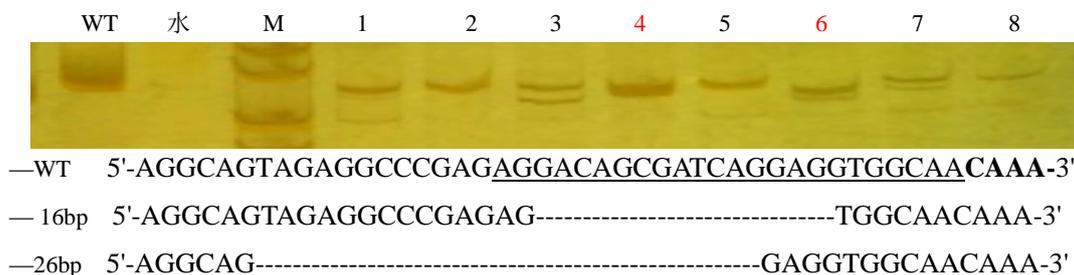


图2.7 在gRNA位点缺失突变的单克隆细胞

Fig.2.7 The deleted mutation of the monoclonal cells at the gRNA site

下划线序列为所设计gRNA; 加粗字体为PAM序列; “-”为突变后缺失的碱基

The gRNA target site was the underline sequence; The PAM was labeled in overstriking; “-”was the deleted base after the mutation

对 DDX21 基因缺失 16 bp (KO-16)、26 bp (KO-26) 细胞及正常的 HEK293 提取总蛋白，Western blot 检测结果显示获得 2 株敲除 DDX21 基因的 HEK293 细胞 (图 2.8)。

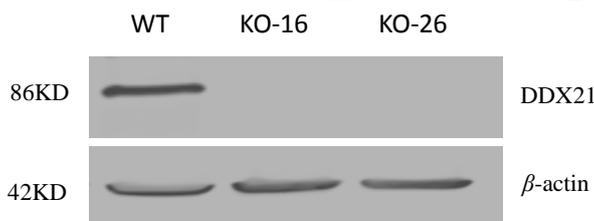


图2.8 Western blot检测DDX21-gRNA的靶向敲除效果

Fig.2.8 The targeted knockout effect of DDX21-gRNA measured by Western blot

### 2.3.4 脱靶检测结果

脱靶效应同样存在于 CRISPR/Cpf1 系统中, 为了检测本研究中 CRISPR/Cpf1 系统的特异性, 利用在线软件筛选得分最高的三个潜在脱靶位点, 以敲除组及对照组细胞基因组 DNA 为模板分别扩增 436 bp SCHLAP1 (图 2.9A)、636 bp RP11 (图 2.9B) 和 444 bp FAM135B (图 2.9C) 的片段, 通过 T7E1 酶切检测, 未检测到脱靶效应。

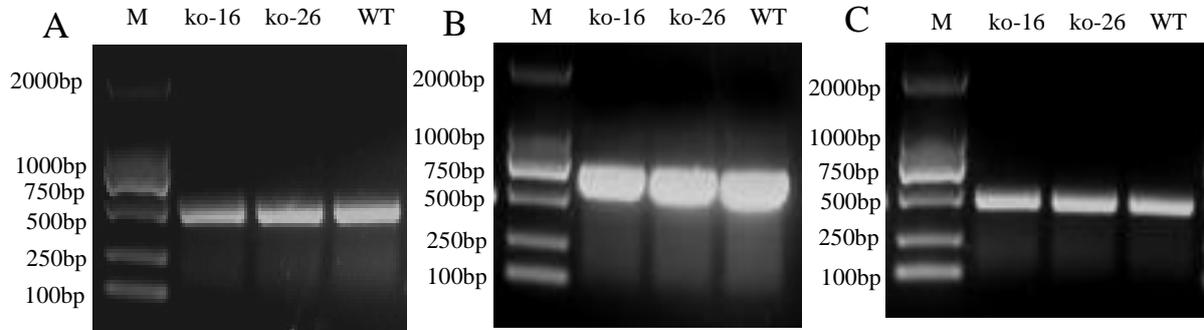


图2.9 敲除细胞株脱靶效应检测

Fig.2.9 The detection Knockout cell lines off-target effect

### 2.3.5 病毒生长曲线

由图 2.10 可知: 病毒感染早期复制较快, 6~36 h 变化范围为 1.17~3.01 倍, 其中在 24 h 达到峰值 ( $P < 0.01$ ), 36h 时敲除组与对照组差异显著 ( $P < 0.05$ )。结果表明: HEK293-DDX21<sup>-26bp</sup> 细胞显著提高了流感病毒产量。

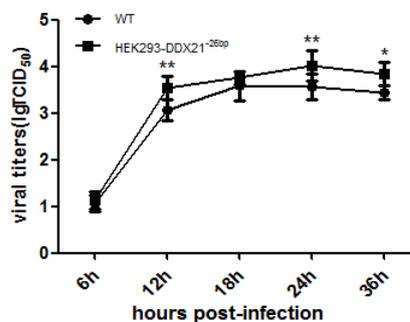


图2.10 病毒在HEK293细胞上的生长曲线

Fig.2.10 Growth curve of virus on HEK293 cell

### 2.3.6 模式识别受体、细胞因子及抗病毒蛋白 mRNA 表达水平检测

荧光定量 PCR 检测模式识别受体、细胞因子及抗病毒蛋白 mRNA 表达水平, 结果显示: 敲除组 TLR3 mRNA 表达水平在 6~12 h 低于对照组, 18 h 时达到峰值 ( $p < 0.01$ ) (图 2.11A), TLR-7 基因表达变化不明显(图 2.11B), MDA-5 表达水平为对照组的 2.04 倍 ( $p < 0.01$ ) (图 2.11C); 而 OAS mRNA 及细胞因子 IFN- $\alpha$ 、IFN- $\beta$  表达水平明显低于对照组 ( $p < 0.01$ ) (图 2.11D-2.11F), IL-6 呈先升高后降低趋势, 但表达水平低于对照组(图 2.11G), 表明 DDX21 基因敲除阻断 DDX21-TRIF-MyD88 信号通路, 抑制 I 型干扰素、炎症因子和抗病毒蛋白表达。

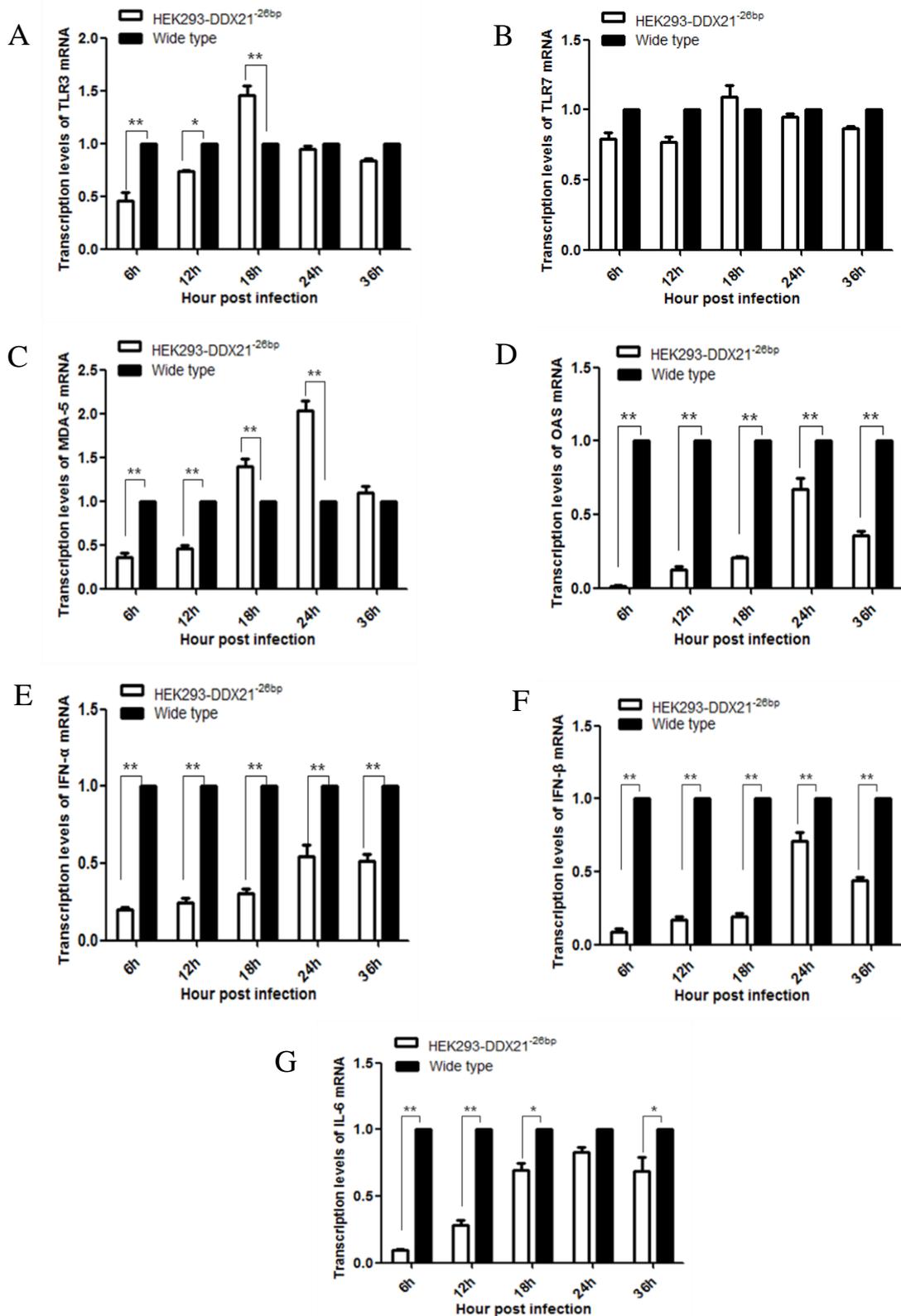


图2.11 H9N2感染后HEK293-DDX21<sup>-26bp</sup>细胞系

TLR-3、TLR7、MDA-5、OAS、IFN-α、IFN-β及IL-6 mRNA变化

Fig.2.11 The Changes of TLR-3, TLR7, MDA-5, OAS, IFN-α, IFN-β and IL-6 mRNA after H9N2 infects

HEK293-DDX21<sup>-26bp</sup> cell line

## 2.4 讨论

CRISPR/Cpf1 系统是目前发现的最简单的一种 CRISPR 系统, 自出现以来, 已经在多个不同物种中实现了基因编辑, 成为与 CRISPR/Cas9 相互补充的基因编辑工具。在微生物学和植物学研究中, 研究者利用 CRISPR/Cpf1 系统实现了包括蓝细菌、大肠杆菌、谷氨酸棒状杆菌和耻垢分枝杆菌以及烟草、水稻、大豆和玉米等的基因编辑(肖婧 等., 2018)。在真核细胞和哺乳动物领域, 已有多项利用 Cpf1 基因编辑技术精准靶向人类细胞、小鼠胚胎、家蚕、果蝇、家兔以及猪等不同基因的遗传修饰报道, 这为揭示基因功能、建立良好的细胞及动物模型提供了有效的工具(Hur et al., 2016; Kleinstiver et al., 2016; Tak et al., 2017; Ma et al., 2017; Wu; et al., 2018)。研究证实, Cpf1 不仅具有良好的切割活性, 而且具有高度的特异性。2016 年, Jin-Soo Kim 等利用 Digenome-seq 技术证明 Cpf1 对 crRNA 与靶 DNA 之间的碱基错配比 Cas9 更加敏感, 且 Cpf1 的脱靶效应比 Cas9 低(Kim et al., 2016)。同年, J. Keith Joung 研究团队利用 GUIDE-seq 对 AsCpf1、LbCpf1 与 SpCas9 在人体基因组中的脱靶位点及突变频率进行比较分析, 结果显示 Cpf1 潜在脱靶位点数量明显低于 spCas9, 且在绝大多数脱靶位点中, 发生插入缺失(Indel)的频率低于 0.1%(Kleinstiver et al., 2016)。

为了验证 Cpf1 核酸酶活性, 本研究首先构建了表达 gRNA 和 Cpf1 的双质粒表达系统, 并在 HEK293 细胞中敲除 DDX21 基因进行分析。在 gRNA 表达载体中, U6 启动子可以控制 gRNA 的转录, 构建时需将 gRNA 克隆至 U6 启动子下游的 *BsmBI* 两个酶切位点之中, pU6-Lb-crRNA 载体经 *BsmBI* 酶切成线性化产生无法自环化的粘性末端。因此, gRNA 寡核苷酸序列的设计时在末端添加与粘性末端互补的碱基, 经程序性退火之后可与线性化 pU6-Lb-crRNA 连接、克隆。研究中利用的 pcDNA3.1-hLbCpf1-RFP 报告载体同时带有红色荧光报告基因和 G-418 药物筛选基因, 红色荧光蛋白的表达不仅能够指示质粒转染细胞的效率, 同时也为 G-418 药物筛选提供了选择的时机。而通过药物筛选存活的细胞基本都为 CRISPR/Cpf1 靶向的阳性细胞, 报告基因和药物筛选基因的同时选择, 大大提高了靶向敲除 DDX21 基因的成功率, 减少了后续阳性细胞的筛选工作。本研究利用以上特点, 将克隆成功的双质粒转染 HEK293 细胞, 经 G-418 和流式细胞仪筛选, 通过基因测序、Western 印迹检测显示获得 2 株 DDX21 基因稳定敲除的 HEK293 细胞株, 说明 CRISPR/Cpf1 基因编辑技术是一种可以实现目的基因敲除的有效方法。同时, 本研究充分考虑了脱靶问题, 如图 2.9 所示, 对 3 个与 gRNA 存在个别碱基错配的潜在脱靶位点进行 T7E1 酶切分析。结果显示敲除 DDX21 基因的 HEK293 细胞通过 T7E1 酶切后未检测到脱靶效应, 为进一步利用 CRISPR/Cpf1 系统介导禽类细胞及鸡体研究提供了技术支持和理论依据。

流感病毒感染后, DDX21 与下游接头蛋白 TRIF 相互作用, 促进 S100 蛋白家族基因 S100A9 表达, 并激活 TLR4-MyD88 途径(Tsai et al., 2014)。荧光定量 PCR 结果显示, 敲除 DDX21 基因后, 模式识别受体 TLR-3、MDA-5 的 mRNA 表达水平上调, IFN- $\alpha$ 、IFN- $\beta$ 、IL-6 及抗病毒蛋白 OAS 的 mRNA 表达水平下调; 推测敲除 DDX21 基因可能阻断 DDX21-TRIF-MyD88 信号通路, 引起上游 TLR-3、MDA-5 的累积, 抑制下游 IFN- $\alpha$ 、IFN- $\beta$ 、OAS 及 IL-6 的表达, 从而影响其引发的炎症反应, 其调节炎症反应的作用机制仍需进一步研究。TCID<sub>50</sub> 测定结果显示, 差异最高可达到 WT 的 3.01 倍, 表明 DDX21 基因敲除后流感病毒复制增加, 该细胞系可作为流感病毒疫苗生产的候选细胞株。本研究建立了 DDX21 基因敲除的 HEK293 细胞模型, 为从细胞水平探究

DDX21 基因功能提供了良好的实验材料,为研究 DDX21 基因在 H9N2 亚型 AIV 病毒感染过程中引发的天然免疫应答反应及病毒致病的分子机制研究奠定了基础。

## 第三章 CRISPR/Cpf1 系统介导鸡 DF-1 及鸡体中的基因组编辑

### 3.1 材料

#### 3.1.1 种蛋、质粒和细胞

DH5 $\alpha$  感受态细胞、DF-1 细胞由本实验室保存；pU6-Lb-crRNA 由哈尔滨工业大学黄志伟教授惠赠；pcDNA3.1-hLbCpf1-RFP 质粒由本实验室构建（见 2.2.3）；慢病毒表达载体（pY108-lenti-AsCpf1 #84739、pY109-lenti-LbCpf1 #84740）购自 Addgene 公司；包装质粒 pMD2.G（#12259）、psPAX2（#12260）质粒由哈尔滨兽医研究所王晓钧研究员惠赠；种蛋购自哈尔滨益农禽业有限公司。

#### 3.1.2 主要试剂和仪器

慢病毒 ELISA 滴度测试试剂盒、慢病毒浓缩试剂和助感染试剂购自北京博奥龙免疫技术有限公司；牙科钻购自韩国精密仪器公司；冷光源灯购自南京亚南特种照明电器厂；其余试剂和仪器见 2.1.2。

### 3.2 方法

#### 3.2.1 gRNA 寡核苷酸链的合成及载体构建

根据鸡 DDX21 基因 CDS 序列（Gene ID: 768898），选择第二外显子进行靶向筛选，经过网站（<http://chopchop.cbu.uib.no/>）设计 4 个靶位点核苷酸序列（表 3-1），分别命名为 C-DDX21-gRNA1、C-DDX21-gRNA2、C-DDX21-gRNA3 和 C-DDX21-gRNA4，并通过 BLAST 进行序列比对，避免脱靶效应的产生。

表3-1 gRNA靶位点核苷酸序列

Table 3-1 Nucleotide sequence of gRNA target sites

名称	gRNA序列 (5'-3')
C-DDX21-gRNA1	ACTCGCCAGAAGGAGAAGAAAGAG
C-DDX21-gRNA2	AGTCTGAAGAGGAGTGCAGCTCAC
C-DDX21-gRNA3	GCAGCTACCAAAGCTCAAGAAAG
C-DDX21-gRNA4	CGCCAGGCTGTCTTCTGTCAAGTGC

采用同 2.2.2 的方法，构建靶向鸡 DDX21 基因的打靶载体 C-pU6-Lb-crRNA-DDX21，载体 pU6-Lb-crRNA 和重组载体 C-pU6-Lb-crRNA-DDX21 除 gRNA 序列不同，其余部分均相同，连接产物转化 DH5 $\alpha$  感受态细胞后，挑取单克隆培养送公司测序验证。

#### 3.2.2 DF-1 细胞的转染

DF-1 细胞的转染：转染前 24 h，取细胞  $5 \times 10^5$ /孔接种到 6 孔板培养，待细胞融合度达到 60%~80% 时进行细胞转染，分为：WT（阴性对照组）、C-DDX21-gRNA-gRNA1-4 转染组。将

相应的敲除质粒共 2  $\mu\text{g}$  (pcDNA3.1-hLbCpf1-eRFP: gRNA=2:1), 按照转染试剂操作方法转染至 DF-1 细胞, 利用流式细胞仪分选阳性细胞, 提取部分细胞基因组 DNA。

### 3.2.3 gRNA 活性检测

根据选择的靶位点在基因组中的位置, 设计包含 4 个靶位点扩增长度为 480 bp 左右的片段(表 3-2)。PCR 扩增相关靶点基因, 反应体系 25  $\mu\text{L}$ , 反应程序为: 95 $^{\circ}\text{C}$  5 min, 95 $^{\circ}\text{C}$  30 s, 56 $^{\circ}\text{C}$  5min, 72 $^{\circ}\text{C}$  1 min, 30 个循环, 72 $^{\circ}\text{C}$  5 min, 4 $^{\circ}\text{C}$  保存。纯化后的 PCR 产物进行 T7E1 酶切鉴定, 凝胶成像系统拍照分析条带灰度, 根据公式计算切割效率。

表3-2 DDX21引物序列

名称	引物序列	产物大小
DDX21-F	GTAGGGGCTAAGGTGGAGAT	480bp
DDX21-R	TGTAGGCTGACTGTAATGCG	

转染 DF-1 细胞 48h 后, 利用流式细胞仪筛选表达红色荧光蛋白的阳性细胞, 提取细胞基因组 DNA, PCR 产物与 T 载体 16 $^{\circ}\text{C}$  连接过夜(表 3-3)。连接产物转化 DH5 $\alpha$  感受态细胞, 37 $^{\circ}\text{C}$  培养箱培养 14h 后挑取单克隆, 按照质粒小提试剂盒说明书提取质粒, 测序并与 NCBI 公布的基因序列进行比对。

表3-3. 连接反应体系

反应试剂	用量
pMD-18T载体	1 $\mu\text{L}$
PCR产物	2 $\mu\text{L}$
T4连接酶	1 $\mu\text{L}$
10 $\times$ T4 DNA连接酶Buffer	1 $\mu\text{L}$
ddH <sub>2</sub> O	5 $\mu\text{L}$

### 3.2.4 重组慢病毒载体构建

按照 2.2.2 的方法, *BsmB* I 限制性核酸内切酶酶切慢病毒载体 pY108-lenti-AsCpf1、pY109-lenti-LbCpf1 (图 3.1), 回收慢病毒载体骨架, 同 C-DDX21-gRNA1 退火后的双链寡核苷酸序列连接(表 3-4), 转化后挑菌细菌单克隆培养, 提取质粒 DNA 送公司测序。

表3-4 T4 DNA连接酶连接体系

试剂	用量
线性化慢病毒载体	100 ng
退火产物	2 $\mu\text{L}$
T4 DNA连接酶	1 $\mu\text{L}$
T4 DNA连接酶buffer	1 $\mu\text{L}$

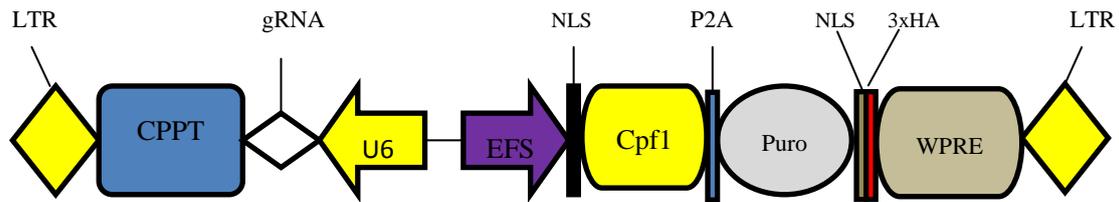


图3.1 慢病毒载体图谱

Fig.3.1 Schematic of lentivirus

### 3.2.5 慢病毒的包装

#### 3.2.5.1 慢病毒细胞转染 293T 细胞

(1) 转染前一天, 选择生长状态良好的 293T 细胞, 接种至 15 cm 的细胞培养皿中, 置于 37℃ 细胞培养箱中, 细胞密度生长达到 70%~80% 时用于转染;

(2) 转染前 1 h, 添加无血清培养基;

(3) 取 1.5 mL EP 管加入重组慢病毒载体 20 μg、pMD2.G 载体 10 μg、psPAX2 载体 15 μg, 加入 Opti-DMEM 培养基共 2.5 mL, 轻轻吹打混匀;

(4) 另取 1 个 1.5 mL EP 管, 加入 80 μL 转染试剂和 2.4 mL Opti-DMEM 培养基, 充分混合均匀;

(5) 混合两只离心管样品, 轻轻混匀, 室温孵育 20 min;

(6) 将上述混合液添加至 293T 培养液中, 轻轻混匀, 于 37℃, 5% CO<sub>2</sub> 恒温培养箱中继续培养;

(7) 转染 6~8 h 后, 弃去培养基, 加入 10% FBS 的新鲜培养基, 培养型中继续培养 48 h。

#### 3.2.5.2 慢病毒收集及浓缩

(1) 分别收集转染 48 h 和 72 h 的细胞上清液, 4℃, 12000 g 离心 10 min, 收集上清用 0.45 μm 滤器过滤, 去除细胞和碎片;

(2) 将慢病毒上清液与浓缩试剂按照 4: 1 的体积比混合均匀, 静置于 4℃ 冰箱, 每隔 30 min 混匀, 4℃ 孵育 2 h 或过夜孵育;

(3) 4℃, 4000 g 离心 30 min;

(4) 小心去除上清, 收集白色沉淀, 用 1/100 原上清体积的 DMEM 重悬病毒颗粒, 重悬后分装, -80℃ 冰箱保存。

### 3.2.6 慢病毒滴度测定

#### 3.2.6.1 慢病毒载体快速检测卡测定

(1) 将检测卡平放至细胞生物安全柜台面上;

(2) 用微量移液器吸取 10 倍稀释的病毒浓缩液 100 μL, 滴加到样品孔 (S) 中;

(3) 静置 10~15 min 后, 通过与比色卡比较, 读取结果。

#### 3.2.6.2 ELISA 法检测慢病毒滴度

(1) 用去离子水将 20× 洗涤液稀释至 1× (现用现配);

(2) 将 HIV-1 P24 抗原的阳性对照 (PC) 按照表 3-5 方法进行倍比稀释;

表3-5 标准样品稀释

P24 浓度 (ng/mL)	编号	编号标准品 (mL)	稀释液 (mL)
80 pg/mL	1	0.15 mL of PC	0.45
40 ng/mL	2	0.3 mL#1	0.3
20 ng/mL	3	0.3 mL#2	0.3
10 ng/mL	4	0.3 mL#3	0.3
5 ng/mL	5	0.3 mL#4	0.3

(3) 将样品对应孔编号, 设置 3 个阴性对照孔、2 个阳性对照孔、1 个空白对照;

(4) 取出酶标板, 每个反应孔中加入 25  $\mu$ L 裂解液;

(5) 将 100  $\mu$ L 待检样品或标准对照样品加入到反应孔中, 振荡混匀, 37 $^{\circ}$ C 孵育 60min;

(6) 洗板数次, 在吸水纸上拍干后, 每孔加入 125 $\mu$ L 的酶结合物, 37 $^{\circ}$ C 孵育 60min;

(7) 洗板数次, 拍干后每孔加入 125 $\mu$ L 底物 (显色液 A 和显色液 B 等体积混匀), 37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min;

(8) 每孔加入 50 $\mu$ L 终止液终止反应, 用酶标仪于波长 450nm 读数。

### 3.2.7 敲除细胞株的建立

#### 3.2.7.1 嘌呤霉素的最适剂量

(1) 将生长状态良好的 DF-1 细胞接种于 24 孔板;

(2) 待贴壁细胞融合度为后 70~80% 后, 设置浓度梯度为 0.5  $\mu$ g/mL、1.0  $\mu$ g/mL、1.5  $\mu$ g/mL、2.0  $\mu$ g/mL、2.5  $\mu$ g/mL;

(3) 每天更换含嘌呤霉素的培养基, 48 h 后导致细胞全部死亡的最低浓度即为后续稳定株筛选的药物浓度。

#### 3.2.7.2 细胞的筛选及鉴定

(1) 待细胞融合度达到 60%~70% 时更换新鲜培养基, 加入 1 mL 病毒上清液至状态良好的 DF-1 细胞, 转染 6 h~8 h 后更换新鲜培养基。

(2) 48 h 后加入 1.5  $\mu$ g/mL 的嘌呤霉素, 每天更换相同浓度的嘌呤霉素, 连续更换 7 天, 筛选的阳性克隆, 分选至 96 孔板;

(3) 分选一周后, 显微镜下观察细胞, 继续传代扩大培养;

(4) 提取部分待检细胞的基因组 DNA, PCR 扩增含靶位点的鸡的 DDX21 基因序列;

(5) PCR 产物与 pMD-18T 载体连接, 转化后挑取单克隆培养, 测序后与野生型基因组对比, 分析 DDX21 基因是否发生敲除。

### 3.2.8 鸡胚慢病毒注射

(1) 消毒: 使用去离子水清洗种蛋表面, 再用新洁尔灭擦拭消毒, 避免过程避免剧烈晃动, 将种蛋平放于蛋托中, 静置数小时;

(2) 种蛋的开窗: 用铅笔标记出胚盘位置 (水平放置时胚盘漂浮在于赤道面顶端), 使用

牙科钻打开直径 4~6mm 的开口，打磨过程中，用酒精棉轻轻擦拭开口位置，清除打磨后的蛋壳粉末。用镊子缓慢夹起蛋壳，取出卵壳膜，查找胎盘所处位置；

(3) 显微注射：利用显微注射针将 pY109-lenti-LbCpf1 慢病毒注射至胚盘下腔，注意注射时的力度及距离，避免扎穿胚盘；

(4) 封闭：用酒精棉轻轻擦拭开口附近位置，剪取适当大小的封口膜进行封闭；

(5) 孵化：将封闭好的种蛋标注注射类型、日期等信息，放于温度为 37.8℃，湿度为 70% 的孵化箱内进行孵化，具体流程见图 3.2。

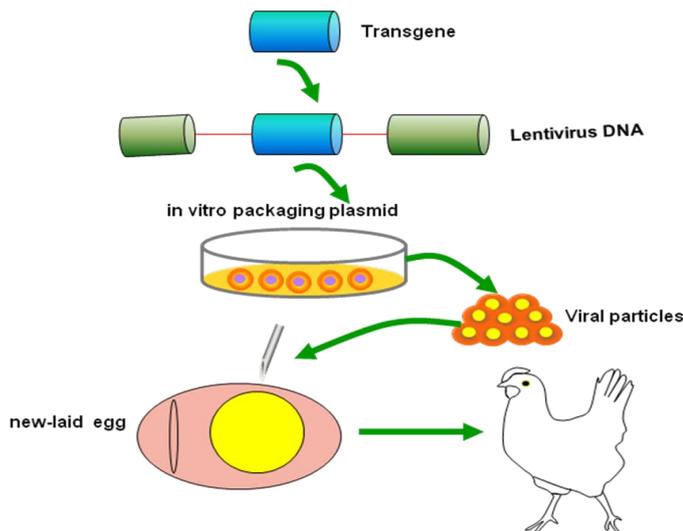


图3.2 慢病毒载体法制备转基因鸡的基本流程

Fig.3.2 Preparation and transduction into the chick embryo of lentiviral vectors

在鸡胚孵化的过程中，收集孵化 8 天以后死亡的鸡胚，按照基因组提取试剂盒说明书，分别提取出孵化雏鸡及死亡鸡胚的基因组 DNA，PCR 扩增靶基因，同时设立空白对照、野生型鸡基因组 DNA 为阴性对照，聚丙烯酰胺凝胶电泳、测序分析是否发生基因敲除及外源基因的整合。

表3-6 检测引物寡核苷酸序列

Table 3-6 The oligo sequences of detection primers

引物名称	序列	用途
zhenghe-F	ACTGGGAAAGTGATGTCG	检测外源基因整合， 产物大小559bp
zhenghe-R	CGTGTCTCTTATTGATGG	
C-DDX21-F	CTGTCTGACGGCCTTGTT	检测靶位点序列， 产物大小178bp
C-DDX21-R	GTGCCCATCTGTTTTCC	

### 3.3 结果

#### 3.3.1 gRNA 表达载体的鉴定

选择特异性良好的 gRNA 靶点序列（表 3-1），经程序性退火后利用 T4DNA 连接酶连接载体转化，挑取单克隆，提取质粒。每个靶点选择 2 个克隆进行测序鉴定，质粒 DNA 测序结果表

明 gRNA1-4 已经完整的连入载体中 (图 3.3)。表明获得 4 个靶向鸡 DDX21 基因的打靶载体 C-pU6-Lb-crRNA-DDX21-1-4。

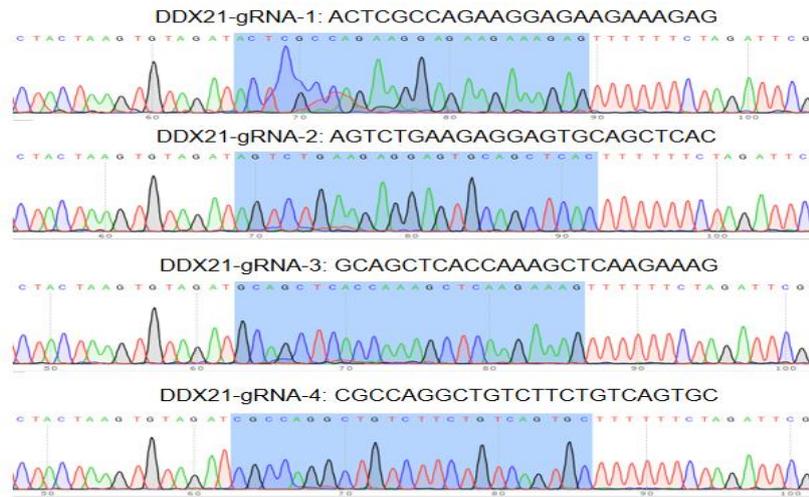


图3.3 C-pU6-Lb-crRNA-DDX21-1-4测序结果

Fig.3.3 Sequencing of C-pU6-Lb-crRNA-DDX21-1-4

### 3.3.2 双质粒转染 DF-1 细胞

待细胞融合度达到 60%左右时, 将 Cpf1 表达载体和 4 个打靶载体 C-pU6-Lb-crRNA-DDX21 转染 DF-1 细胞中。转染 48 h 后, 倒置荧光显微镜下观察, 结果如图 3.4 所示: 转染组观察到表达红色荧光蛋白的阳性细胞, 对照组无红色荧光表达; 流式细胞仪分析结果显示, 阳性率在 14.18~17.94%之间。

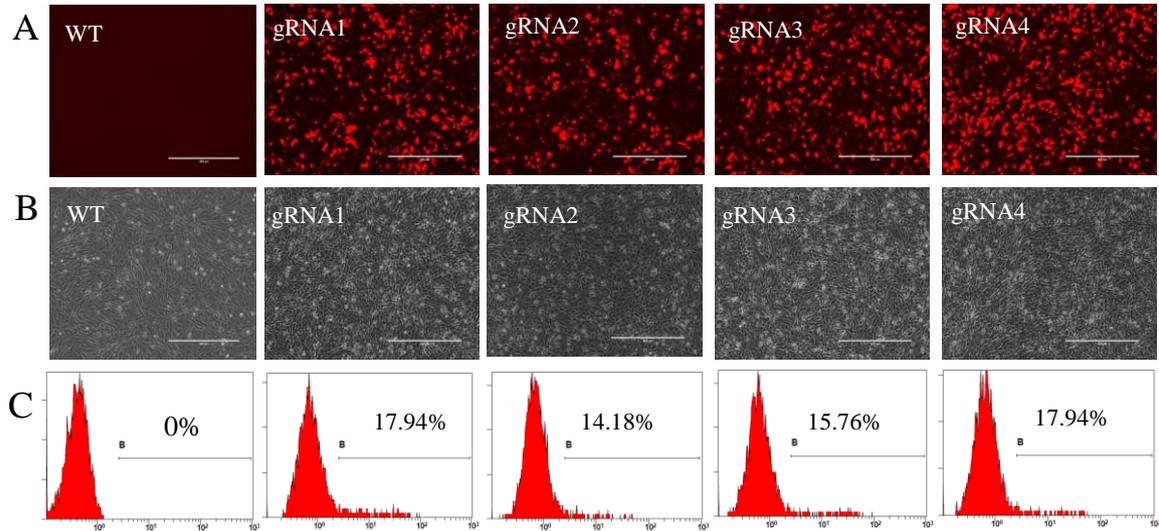


图3.4 质粒转染DF1细胞

Fig.3.4 Plasmid transfected DF-1 cells

图A为荧光下视野(400×); 图B为明场下视野(400×); 图C为流式分析结果

Fig A was the microscopy under fluorescent field (400×); Fig B was the microscopy under bright field (400×);

Fig C was the flow analysis results

### 3.3.3 敲除效率检测

为了进一步验证 CRISPR/Cpf1 能否对 DF-1 细胞的基因组有效切割, 本研究利用 T7E1 核酸内切酶进行验证。将转染实验组与阴性对照组细胞的基因组 DNA 为模板, 分别扩增包含靶位点大小为 480bp 的目的片段, 纯化后的 PCR 产物分别进行 T7E1 酶切和 TA 克隆测序检测。T7E1 检测结果如图 3.5 所示: T7E1 酶不能切开 WT 组细胞的 PCR 产物; 实验组中 4 个打靶载体中 gRNA 1 在酶切后产生 3 条带, 即 T7E1 酶发挥作用将杂合链切断后产生了大小不一的目的条带, 说明 CRISPR/Cpf1 系统能够有效介导鸡基因组的编辑, 且计算得靶点 1 敲除效率最高为 30.0%。

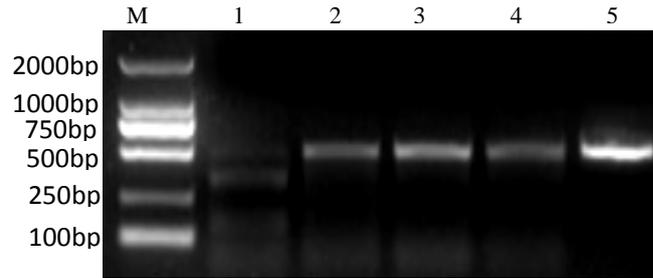


图3.5 T7E1酶切检测结果

Fig.3.5 The result of T7E1 enzyme digestion

泳道1-4为转染C-pU6-Lb-crRNA-DDX21-1-4载体; 泳道5为阴性对照

Line 1-4 were transfection of C-pU6-Lb-crRNA-DDX21-1-4 vectors; Line 5 was negative control

选择 C-pU6-Lb-crRNA-DDX21-1 组纯化的 PCR 产物与 pMD-18T 载体连接, 转化 DH5 $\alpha$  感受态细胞, 37 $^{\circ}$ C 培养 14 h 后挑菌测序。测序结果表明: 30 个测序样品中有 10 管菌液发生突变, 初步计算 C-pU6-Lb-crRNA-DDX21-1 基因敲除效率为 33.3% (图 3.6)。

5'-GTTGCTTTTGACTCGCCAGAAGGAGAAGAAAGAGAAGAAATCCAAGCGGC-3' (WT)  
 GTTGCTTTTGACTCGCCAGAA-----GAAAGAGAAGAAATCCAAGCGGC (-5)  
 GTTGCTTTTGACTCGCCAGAAGGAGA-----GAAGAAATCCAAGCGGC (-7) x2  
 GTTGCTTTTGACTCGCCAGAAGGA-----AGAAATCCAAGCGGC (-10)  
 GTTGCTTTTGACTCGCCAGAAGGA-----AGAAATCCAAGCGGC (-11) x2  
 GTTGCTTTTGACTCGCCAGAAG-----AAGAAATCCAAGCGGC (-12)  
 GTTGCTTTTGACTCG-----GAAGAAATCCAAGCGGC (-18)  
 GTTGCTTTTGACTCGCCAG-----CGGC (-27)  
 G-----C (-48)

图3.6 TA克隆测序

Fig.3.6 Sequencing of TA clone

### 3.3.4 慢病毒载体的构建

通过 T4 DNA 连接酶连接 C-DDX21-gRNA1 退火产物和回收后的线性化慢病毒载体骨架 (图 3.7A), 构建重组慢病毒表达载体, 测序结果表明成功构建 Lenti-Cpf1-DDX21 慢病毒表达载体 (图 3.7B)。

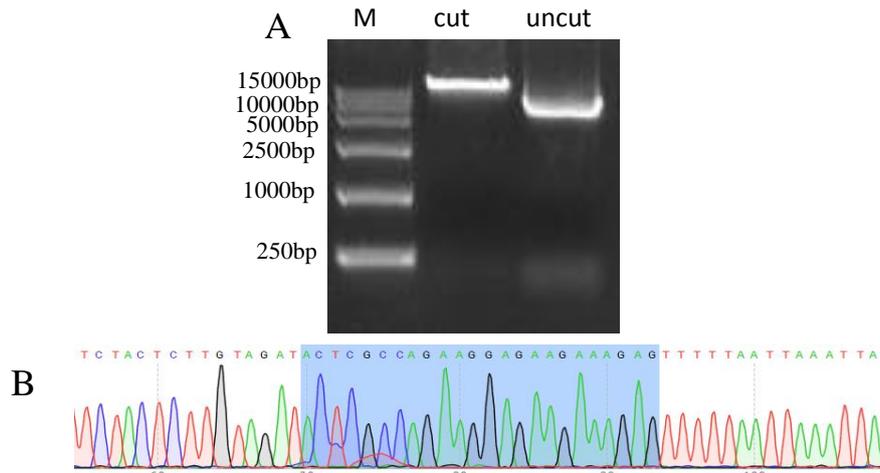


图3.7 Lenti-Cpf1-DDX21慢病毒表达载体的构建

Fig.3.7 Construction of Lenti-Cpf1-DDX21 lentiviral expression vector

图A为慢病毒载体酶切结果检测;图B为插入DNA序列测序图

Fig A was Enzyme digestion for lentiviral vector;Fig B was Insertion DNA sequence sequencing

### 3.3.5 CRISPR/Cpf1 靶向编辑 DF-1 细胞

#### 3.3.5.1 最适嘌呤霉素剂量的确定

不同细胞对嘌呤霉素的敏感性不同,为了确定 DF-1 细胞嘌呤霉素药物筛选的最适浓度,本研究将正常培养的 DF-1 细胞传代至 6 孔板中,以 0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、1.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  和 2.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的浓度梯度筛选(图 3.8A~E),每天更换含嘌呤霉素的培养基并观察细胞状态。结果显示当浓度为 0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  和 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时,细胞对其不敏感,而当浓度提高到 1.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时,48 h 后细胞全部死亡,所以将 1.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  作为细胞筛选的最适嘌呤霉素浓度。

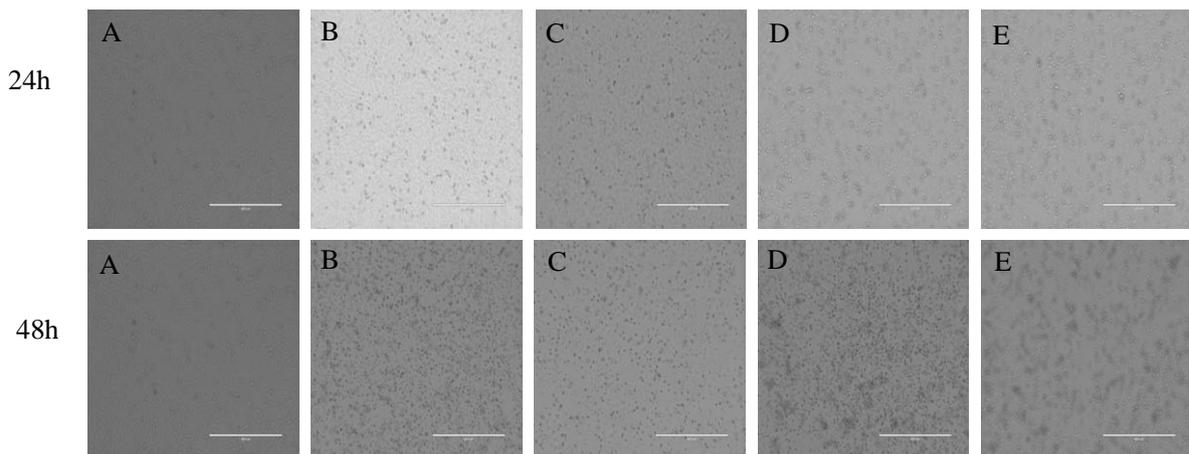


图3.8 不同puromycin 药物浓度对细胞杀害效果

Fig.3.8 Cell killing effect of different puromycin drug concentration

#### 3.3.5.2 慢病毒滴度

利用慢病毒载体快速检测卡对 10 倍稀释的慢病毒进行检测,通过与比色卡比较,结果显示慢病毒滴度为  $1.25 \times 10^{6-7} \text{Tu}/\text{mL}$ (图 3.9A)。ELISA 方法检测 HIV-1 P24 抗原,得到  $R^2$  达到 0.99

的标准曲线（图 3.9B），可用于相关样品检测，酶标仪测定其 OD 值，计算慢病毒滴度为  $2.5 \times 10^7$  TU/mL。

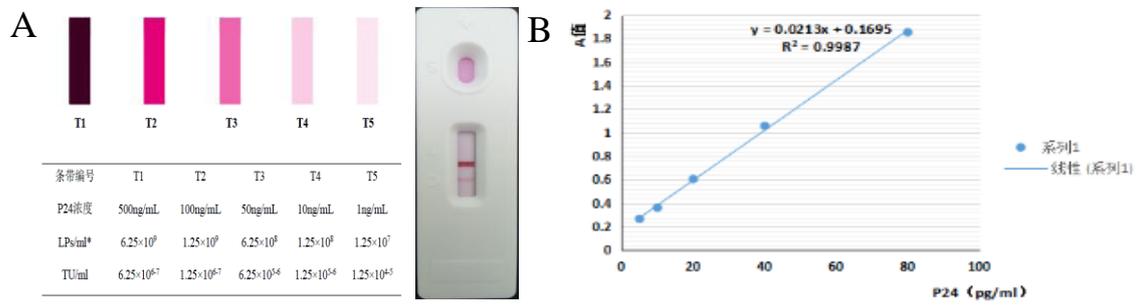


图3.9 慢病毒滴度测定

Fig.3.9 The determination of lentiviral titer

### 3.3.5.3 DDX21 基因敲除的 DF-1 细胞株的建立

将慢病毒表达载体转染至 DF-1 细胞，T7E1 酶切检测靶点效率为 4.3%（图 3.10A）。通过嘌呤霉素筛选阳性细胞，提取细胞基因组，测序结果表明获得两株分别缺失 28bp 和 34bp 的 DF-1 敲除细胞株（图 3.10B），说明 CRISPR/Cpf1 慢病毒系统能够介导鸡 DF-1 细胞的基因组编辑。

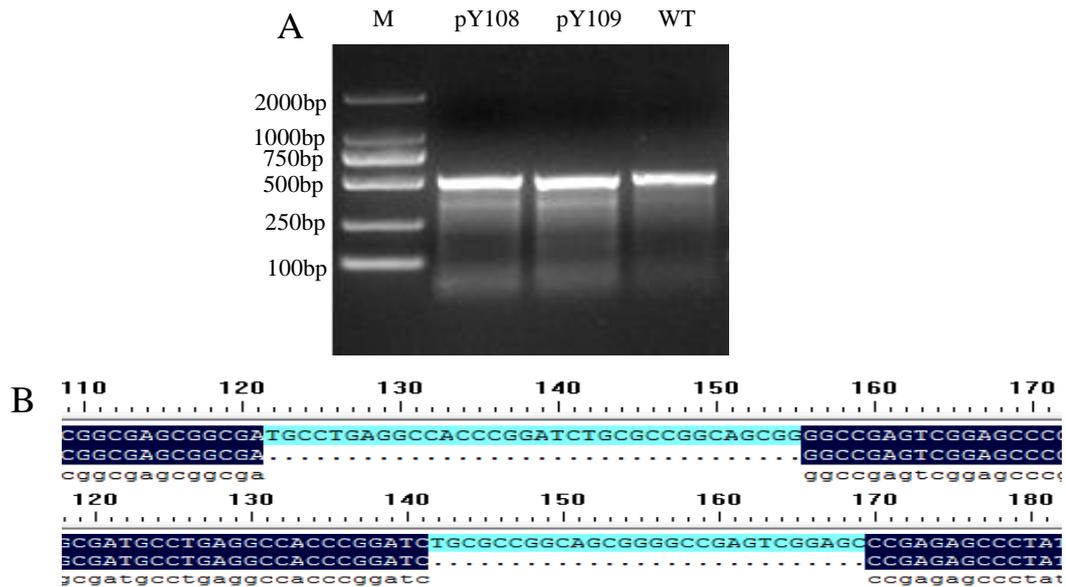


图3.10 敲除DDX21基因的DF-1细胞株的建立

Fig.3.10 Establishment of DDX21 gene knock-out DF-1 cell line

图A为T7E1酶切鉴定慢病毒载体的活性；图B为基因敲除细胞株的测序分析

Fig A was identification of lentiviral vector activities by T7E1 cutting; Fig B was sequencing analysis of gene knockout cell lines

### 3.3.6 注射慢病毒种蛋的检测

鸡胚正常发育时间为 21 d，本研究利用赤道开窗法，将包装的重组慢病毒显微注射至受精种蛋胚盘，为避免实验操作对鸡胚发育的影响，故将孵化时间延长至 24 d，孵化结束后，对所有种

蛋发育情况进行统计（表 3-7）。结果显示正常孵化组孵化率为 93.3 %；开窗对照组孵化率低于正常孵化组，出雏率为 63.3 %，慢病毒注射组孵化率明显降低，说明注射慢病毒及注射过程对鸡胚发育有较大影响。

表3-7 注射慢病毒的鸡胚发育情况

组别	入孵数量	出雏数量	出雏率
pY109-lenti-LbCpf1 实验组	527	83	15.86%
开窗对照组	30	17	63.3%
正常孵化组	30	28	93.3%

为了检测慢病毒系统能否对靶基因进行基因编辑以及显微注射的慢病毒是否整合到基因组中，提取发育终止鸡胚（发育停止在 8~21d）及出雏鸡组织的基因组 DNA，PCR 扩增含靶点序列的目的片段，通过聚丙烯酰胺凝胶检测基因未检测到目的片段的缺失（图 3.11），基因测序结果同样未检测到 DDX21 基因的移码突变。



图3.11 聚丙烯酰胺凝胶电泳结果

Fig.3.11 The result of Polyacrylamide gel electrophoresis

泳道 1-23 为待检样品；Line 1-23 were samples to be tested

琼脂糖凝胶鉴定慢病毒整合情况，对 83 只孵化出的雏鸡检测发现，待检样品中有 19 只个体存在外源基因的整合，整合效率为 22.9%（图 3.12）。

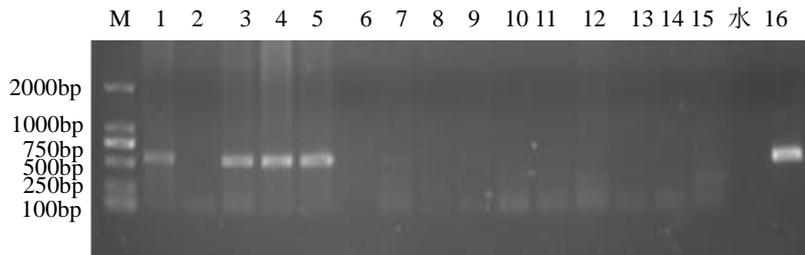


图3.12 PCR检测慢病毒载体

Fig.3.12 The detection of lentivirus vector via PCR

泳道1-15为待检样品；16为阳性对照；Line 1-15 were samples to be tested;16 was positive control

### 3.4 讨论

DF-1 细胞作为一种稳定的、可连续传代的鸡成纤维细胞系，目前被广泛应用于细胞转染、病毒研究、疫苗研发等领域。为验证 CRISPR/Cpf1 系统能否介导家禽基因组的定点编辑，实现目的基因的精准敲除，为后续利用慢病毒载体实现细胞和鸡体的基因编辑提供操作依据。本研究以

DF-1 细胞为试验材料, 利用 T7E1 酶切、TA 克隆测序方法验证了 CRISPR/Cpf1 系统介导鸡 DF-1 细胞的基因敲除情况。结果显示 CRISPR/Cpf1 系统对 DDX21 基因实现了基因编辑, 敲除效率为 30.0%~33.3%, 造成 5~48bp 不同数量的小片段缺失, 以上结果表明 CRISPR/Cpf1 系统能够介导鸡 DF-1 细胞的基因组编辑。

本研究选择敲除 DF-1 细胞中的 DDX21 基因为靶向基因, 针对该基因第 2 外显子共设计 4 对特异性良好的 gRNA 序列, T7E1 酶切结果显示只有 gRNA1 具有较高的敲除效率为 30.0%, 而其他 3 对 gRNA 未能达到预期的效果, 原因可能是: (1) 利用双质粒系统时, 需要两种质粒同时转染至同一细胞中才有可能发挥编辑功能; (2) T7E1 酶切方法进行敲除效率检测, 存在灵敏度可能导致实验误差的产生; (3) gRNA 本身存在活性高低, 并非选择的靶点都具有活性 (Tak et al., 2017; 左其生 等., 2016); (4) 本研究利用人源 U6 启动子启动 gRNA 的表达, 可能在禽类细胞中存在一定的种属特异性。

目前, 转基因鸡的获取主要通过两种方法, 一种是基于病毒性载体的方法, 第二种是非病毒性系统, 主要包括脂质体转染和电穿孔等方法, 通常利用修饰后的 PGCs、ES 细胞直接转移到受体胚胎 (Motono et al., 2010; Sid and Schusser, 2018)。与慢病毒载体法相比, PGCs 转移法等可以将体外修饰后的 PGCs 细胞转移到受体胚胎中, 从而获得精准修饰的后代 (Naito et al., 2015; Yu et al., 2019)。然而, 从一个胚胎只能分离得到数量有限的 PGCs 细胞, 为了有效地利用 PGCs, 必须经历体外培养的过程。PGCs 细胞体外培养、基因修饰以及转移至受体胚胎过程不仅费时费力、需要极高的技术要求, 而且 PGCs 培养条件在不同物种之间存在较大的差异, 难以实现广泛应用。慢病毒具有感染效率高、感染类型广、外源基因可长期稳定表达等优点。对于没有 PGC 培养物的物种, 直接体内注射方法是可能产生编辑禽类有限数量的方法之一。本课题组早期已利用慢病毒法制备了表达 GFP、RIG-I、流感病毒 HA 蛋白基因的转基因鸡模型 (孟庆文, 等, 2015; 李亚芳, 等, 2018), 建立了慢病毒法制备转基因鸡的技术平台, 所以本研究利用复制缺陷型的慢病毒系统构建 DDX21 基因敲除的细胞株和鸡模型。

利用筛选到的活性较高的 gRNA1 核苷酸序列构建 Lenti-Cpf1-DDX21 慢病毒表达载体, 转染细胞后能够表达相应的 Cpf1 核酸酶 (Zetsche et al., 2015)。T7E1 酶切检测发现, 未经嘌呤霉素富集筛选, gRNA1 靶点的切割效率为 4.3%, 包装慢病毒测定病毒滴度后感染 DF-1 细胞, 测序鉴定, 获得 2 株 DDX21 基因敲除的 DF-1 细胞株。本研究结合慢病毒系统的稳定转染功能及 CRISPR/Cpf1 系统的基因敲除功能, 成功建立了共表达 Cpf1 和 gRNA 的慢病毒系统, 证明 CRISPR/Cpf1 慢病毒系统同样能够介导鸡 DF-1 细胞基因组的编辑, 这为接下来利用该系统构建敲除鸡模型提供了理论基础和科学依据。

近年来, 多项研究已经证实通过胚胎注射慢病毒的方法可以产生转基因鸡, 说明通过慢病毒胚胎注射途径是产生转基因鸡的有效途径 (Kawabe et al., 2008; Motono et al., 2010; Park and Han, 2012; Smith et al., 2009)。本研究利用表达 Cpf1 基因的慢病毒载体验证其活性, 并探索了是否能够介导鸡体上的基因组编辑, 总共注射 527 枚种蛋, 最终孵化出 83 只雏鸡, 孵化率为 15.86%, 与已报道的结果相似 (Koo et al., 2006; McGrew et al., 2004)。通过对这 83 只雏鸡组织样品提取基因组 DNA, 分析慢病毒载体元件是否发生整合, 结果发现 19 只出雏鸡发生外源基因的整合, 整合效率为 22.9%。聚丙烯酰胺凝胶电泳及基因组测序检测均未发现靶基因的编辑。原因可能是:

(1) 利用直接体内注射方法不能富集修饰的 PGC 群体, 使用该方法产生来自性腺嵌合修饰的公鸡后代存在一定的概率 (Park and Han, 2015); (2) CRISPR/Cpf1 作为新型基因编辑技术, 其编辑效率仍有很大的提升空间。鸡是世界范围内重要的蛋白质来源, 也是研究脊椎动物发育生物学的重要模型。未来利用多靶点进行基因编辑以及继续开发用于递送精准修饰工具的技术, 例如高效便捷的 PGC 培养修饰法和 STAGE 精子载体法, 都将有望为更多的禽类物种基因组编辑开辟的新道路。

## 第四章 全文结论

- 1、CRISPR/Cpf1 系统能够介导哺乳动物细胞的基因组编辑，获得 2 株 HEK293-DDX21<sup>-/-</sup>细胞株；
- 2、CRISPR/Cpf1 双质粒系统和慢病毒系统能够介导鸡 DF-1 细胞的基因组编辑，获得 2 株 DF-1-DDX21<sup>-/-</sup>细胞株；
- 3、探索了 CRISPR/Cpf1 慢病毒系统介导鸡体上的基因组修饰，获得 19 只外源基因整合的鸡，但未检测到基因组编辑；
- 4、H9N2 亚型 AIV 感染 HEK293-DDX21<sup>-/-</sup>实验证明：敲除 DDX21 基因，抑制了 I 型干扰素、炎症因子 IL-6 和抗病毒蛋白 OAS 等的表达，可能引起 DDX21-TRIF-MyD88 信号通路受阻，促进 AIV 在细胞上的增殖。

## 参考文献

1. 曹代楠. 基于慢病毒的输卵管特异表达人溶菌酶转基因鸡制备. [博士学位论文]. 北京: 中国农业大学, 2015.
2. 陈忠毅. 应用慢病毒介导生产转基因鸡的初步研究. [硕士学位论文]. 南宁: 广西大学, 2017.
3. 胡曼, 康倩倩, 胡晓湘, 等. CRISPR/Cas9 系统在鸡 MSTN 上的效率验证. 中国家禽, 2016, 38(7): 5-9.
4. 刘彬, 黄佳城, 周迎春, 等. 慢病毒介导 LOX-1 基因 RNA 干扰抑制氧化应激诱导心肌细胞凋亡. 南方医科大学学报, 2012, 32(2): 165-168.
5. 李亚芳, 赵颖慧, 刘赛宝, 等. 鸡 OV 启动子表达 HA 对禽流感病毒攻击提供完全保护. 生物工程杂志, 2018, 38(7): 67-74.
6. 刘同新. 输卵管特异性表达人防御素 4 基因转基因鸡的制备. [博士学位论文]. 北京: 中国农业大学, 2015.
7. 孟庆文, 周长良, 王伟, 等. RIG-I 遗传修饰鸡模型的抗病毒天然免疫机制研究. 第十届全国免疫学学术大会, 2015.
8. 王飞, 何娜娜, 王颖洁, 等. CRISPR/Cas9 介导 CPED1 基因敲除载体活性的验证. 中国家禽, 2017, 39(7): 11.
9. 谢立兰, 安康, 陈力, 等. 猪 DDX21 基因的克隆、序列分析及原核表达. 华北农学报, 2017, 32(3): 42-47.
10. 肖婧, 张宗德. CRISPR 技术: 一个新型基因编辑工具所引发的革命. 华西医学, 2018, 33(8): 28-34.
11. 徐世勇. 慢病毒载体法高效转基因鸡制备技术研究. [博士学位论文]. 南京: 南京农业大学, 2007.
12. 杨秀荣, 邓继贤, 赵德彪, 等. 鸡 DMRT1 基因 CRISPR/Cas9 载体构建及打靶效率的检测. 中国家禽, 2017, 39(2): 6-9.
13. 张琦, 黄娇娇, 杨彩侠, 等. CRISPR/Cas9 介导 RB1 基因敲除及其在鸡前脂肪细胞分化、增殖中的功能研究. 畜牧兽医学报, 2016, 47(9): 1775-1784.
14. 左其生, 王颖洁, 赵瑞丰, 等. CRISPR/Cas 技术可有效介导家鸡基因敲除. 畜牧兽医学报, 2016, 47(6): 1266-1271.
15. Abu-Bonsrah K D, Zhang D, Newgreen D F. CRISPR/Cas9 Targets Chicken Embryonic Somatic Cells In Vitro and In Vivo and generates Phenotypic Abnormalities. Scientific Reports, 2016, 6: 34524.
16. Ahn J, Lee J, Park J Y, et al. Targeted genome editing in a quail cell line using a customized CRISPR/Cas9 system. Poultry Science, 2017, 96(5): 1445-1450.
17. Bai Y, He L, Li P, et al. Efficient Genome Editing in Chicken DF-1 Cells Using the CRISPR/Cas9 System. G3-Genes Genomes Genetics, 2016, 6(4): 917-923.
18. Barrangou R, Fremaux C, Deveau H, et al. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. Science, 2007, 315(5819): 1709-12.

19. Bassett A R, Tibbit C, Ponting C P, et al. Highly efficient targeted mutagenesis of *Drosophila* with the CRISPR/Cas9 system. *Cell Reports*, 2013, 4(1): 220-8.
20. Brown B D, Cantore A, Annoni A, et al. A microRNA-regulated lentiviral vector mediates stable correction of hemophilia B mice. *Blood*, 2007, 110(13): 4144-52.
21. Calo E, Flynn R A, Martin L, et al. RNA helicase DDX21 coordinates transcription and ribosomal RNA processing. *Nature*, 2015, 518(7538): 249-53.
22. Campbell E M, Hope T J. HIV-1 capsid: the multifaceted key player in HIV-1 infection. *Nature Reviews Microbiology*, 2015, 13(8): 471-83.
23. Carter J, Wiedenheft B. SnapShot: CRISPR-RNA-guided adaptive immune systems. *Cell*, 2015, 163(1): 260-260.e1.
24. Chapman S C, Lawson A, Macarthur W C, et al. Ubiquitous GFP expression in transgenic chickens using a lentiviral vector. *Development*, 2005, 132(5): 935-40.
25. Chen G, Liu C H, Zhou L, et al. Cellular DDX21 RNA helicase inhibits influenza A virus replication but is counteracted by the viral NS1 protein. *Cell Host Microbe*, 2014, 15(4): 484-93.
26. Chojnacka-Puchta L, Sawicka D, Lakota P, et al. Obtaining chicken primordial germ cells used for gene transfer: in vitro and in vivo results. *Journal of Applied Genetics*, 2015, 56(4): 493-504.
27. Cooper C A, Challagulla A, Jenkins K A, et al. Generation of gene edited birds in one generation using sperm transfection assisted gene editing (STAGE). *Transgenic Research*, 2017, 26(3): 331-347.
28. Dimitrov L, Pedersen D, Ching K H, et al. Germline Gene Editing in Chickens by Efficient CRISPR-Mediated Homologous Recombination in Primordial Germ Cells. *PLoS One*, 2016, 11(4): e0154303.
29. Dong Y, Ye W, Yang J, et al. DDX21 translocates from nucleus to cytoplasm and stimulates the innate immune response due to dengue virus infection. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2016, 473(2): 648-53.
30. Endo A, Masafumi M, Kaya H, et al. Efficient targeted mutagenesis of rice and tobacco genomes using Cpf1 from *Francisella novicida*. *Scientific Reports*, 2016, 6: 38169.
31. Enserink M. Avian influenza. Transgenic chickens could thwart bird flu, curb pandemic risk. *Science*, 2011, 331(6014): 132-3.
32. Eszter T, N ́ra W, Bencsura P, et al. Cpf1 nucleases demonstrate robust activity to induce DNA modification by exploiting homology directed repair pathways in mammalian cells. *Biology Direct*, 2016, 11(1):46.
33. Flores-Rozas H, Hurwitz J. Characterization of a new RNA helicase from nuclear extracts of HeLa cells which translocates in the 5' to 3' direction. *Journal of Biological Chemistry*, 1993, 268(28): 21372-83.
34. Fullam A, Schroder M. DExD/H-box RNA helicases as mediators of anti-viral innate immunity and essential host factors for viral replication. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2013, 1829(8):

- 854-65.
35. Henning D, So R B, Jin R, et al. Silencing of RNA helicase II/Gualpha inhibits mammalian ribosomal RNA production. *Journal of Biological Chemistry*, 2003, 278(52): 52307-14.
  36. Hur J K, Kim K, Been K W, et al. Targeted mutagenesis in mice by electroporation of Cpf1 ribonucleoproteins. *Nature Biotechnology*, 2016, 34(8): 807-8.
  37. Ishino Y, Shinagawa H, Makino K, et al. Nucleotide sequence of the iap gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. *Journal of Bacteriology*, 1987, 169(12): 5429-33.
  38. Jankowsky E. RNA helicases at work: binding and rearranging. *Trends in Biochemical Sciences*, 2011, 36(1): 19-29.
  39. Jansen R, Embden J D, Gaastra W, et al. Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. *Molecular Microbiology*, 2002, 43(6): 1565-75.
  40. Jiang F, Doudna J A. The structural biology of CRISPR-Cas systems. *Current Opinion Structural Biology*, 2015, 30: 100-111.
  41. Kawabe Y, Naka T, Komatsu H, et al. Retroviral gene transduction into chicken embryo gonads through blood circulation. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2008, 106(6): 598-601.
  42. Kim D, Kim J, Hur J K, et al. Genome-wide analysis reveals specificities of Cpf1 endonucleases in human cells. *Nature Biotechnology*, 2016, 34(8): 863-8.
  43. Kleinstiver B P, Tsai S Q, Prew M S, et al. Genome-wide specificities of CRISPR-Cas Cpf1 nucleases in human cells. *Nature Biotechnology*, 2016, 34(8): 869-74.
  44. Koo B C, Kwon M S, Choi B R, et al. Production of germline transgenic chickens expressing enhanced green fluorescent protein using a MoMLV-based retrovirus vector. *Faseb journal*, 2006, 20(13): 2251-60.
  45. Kwon M S, Koo B C, Kim D, et al. Generation of transgenic chickens expressing the human erythropoietin (hEPO) gene in an oviduct-specific manner: Production of transgenic chicken eggs containing human erythropoietin in egg whites. *PLoS One*, 2018, 13(5): e0194721.
  46. Lee H J, Lee K Y, Park Y H, et al. Acquisition of resistance to avian leukosis virus subgroup B through mutations on tvb cysteine-rich domains in DF-1 chicken fibroblasts. *Veterinary Research*, 2017, 48(1): 48.
  47. Lee S H, Gupta M K, Ho Y T, et al. Transgenic chickens expressing human urokinase-type plasminogen activator. *Poultry Science*, 2013, 92(9): 2396-403.
  48. Lo Bianco C, Schneider B L, Bauer M, et al. Lentiviral vector delivery of parkin prevents dopaminergic degeneration in an alpha-synuclein rat model of Parkinson's disease. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America U S A*, 2004, 101(50): 17510-5.
  49. Lois C, Hong E J, Pease S, et al. Germline transmission and tissue-specific expression of transgenes delivered by lentiviral vectors. *Science*, 2002, 295(5556): 868-72.
  50. Lyall J, Irvine R M, Sherman A, et al. Suppression of avian influenza transmission in genetically

- modified chickens. *Science*, 2011, 331(6014): 223-6.
51. Makarova K S, Wolf Y I, Alkhnbashi O S, et al. An updated evolutionary classification of CRISPR-Cas systems. *Nature Review Microbiology*, 2015, 13(11): 722-36.
  52. Ma S , Liu Y, Liu Y, et al. An integrated CRISPR, *Bombyx mori*, genome editing system with improved efficiency and expanded target sites. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2017, 83:13-20.
  53. Makarova K S, Zhang F , Koonin E V. SnapShot: Class 1 CRISPR-Cas Systems. *Cell*, 2017a, 168(5): 946-946.e1.
  54. Makarova K S, Zhang F , Koonin E V. SnapShot: Class 2 CRISPR-Cas Systems. *Cell*, 2017b, 168(1-2): 328-328.e1.
  55. Mali P, Yang L, Esvelt K M, et al. RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science*, 2013, 339(6121): 823-6.
  56. McGrew M J, Sherman A, Ellard F M, et al. Efficient production of germline transgenic chickens using lentiviral vectors. *EMBO Reports*, 2004, 5(7): 728-33.
  57. Mojica F J, Diez-Villasenor C, Soria E, et al. Biological significance of a family of regularly spaced repeats in the genomes of Archaea, Bacteria and mitochondria. *Molecular Microbiology*, 2000, 36(1): 244-6.
  58. Motono M, Yamada Y, Hattori Y, et al. Production of transgenic chickens from purified primordial germ cells infected with a lentiviral vector. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2010, 109(4): 315-21.
  59. Naito M, Harumi T, Kuwana T. Long-term culture of chicken primordial germ cells isolated from embryonic blood and production of germline chimaeric chickens. *Animal Reprod Sci*, 2015, 153: 50-61.
  60. Naldini L, Blomer U, Gage F H, et al. Efficient transfer, integration, and sustained long-term expression of the transgene in adult rat brains injected with a lentiviral vector. *Proc Natl Acad Science U S A*, 1996a, 93(21): 11382-8.
  61. Naldini L, Blomer U, Gallay P, et al. In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science*, 1996b, 272(5259): 263-7.
  62. Oishi I, Yoshii K, Miyahara D, et al. Targeted mutagenesis in chicken using CRISPR/Cas9 system. *Scientific Reports*, 2016, 6: 23980.
  63. Oishi I, Yoshii K, Miyahara D, et al. Efficient production of human interferon beta in the white of eggs from ovalbumin gene-targeted hens. *Scientific Reports*, 2018, 8(1): 10203.
  64. Park T S, Han J Y. piggyBac transposition into primordial germ cells is an efficient tool for transgenesis in chickens. *Proceeding of the National Academy Sciences U S A*, 2012, 109(24): 9337-41.
  65. Park T S, Han J Y. Non-viral Transgenesis via direct in Ovo Lipofection in quail. *Korean Journal of Poultry Science*. 2015;42:239-45.

66. Park T S, Lee H J, Kim K H, et al. Targeted gene knockout in chickens mediated by TALENs. *Proceeding of the National Academy Sciences U S A*, 2014, 111(35): 12716-21.
67. Pfeifer A and Hofmann A. Lentiviral transgenesis. *Methods Molecular Biology*, 2009, 530: 391-405.
68. Puthenveetil G, Scholes J, Carbonell D, et al. Successful correction of the human beta-thalassemia major phenotype using a lentiviral vector. *Blood*, 2004, 104(12): 3445-53.
69. Reddy T R, Xu W, Mau J K, et al. Inhibition of HIV replication by dominant negative mutants of Sam68, a functional homolog of HIV-1 Rev. *Nature Medicine*, 1999, 5(6): 635-42.
70. Roberts T M, Boris-Lawrie K. The 5' RNA terminus of spleen necrosis virus stimulates translation of nonviral mRNA. *Journal of Virology*, 2000, 74(17): 8111-8.
71. Robl J M, Wang Z, Kasinathan P, et al. Transgenic animal production and animal biotechnology. *Theriogenology*, 2007, 67(1): 127-33.
72. Savic N, Schwank G. Advances in therapeutic CRISPR/Cas9 genome editing. *Translational Research*, 2016, 168: 15-21.
73. Shen B, Zhang J, Wu H, et al. Generation of gene-modified mice via Cas9/RNA-mediated gene targeting. *Cell Research*, 2013, 23(5): 720-3.
74. Sid H and Schusser B. Applications of Gene Editing in Chickens: A New Era Is on the Horizon. *Frontiers in Genetics*, 2018, 9: 456.
75. Singh V, Gohil N, Ramirez Garcia R, et al. Recent Advances in CRISPR-Cas9 Genome Editing Technology for Biological and Biomedical Investigations. *Journal of Cellular Biochemistry*, 2018, 119(1): 81-94.
76. Sinn P L, Sauter S L, McCray P B, Jr. Gene therapy progress and prospects: development of improved lentiviral and retroviral vectors--design, biosafety, and production. *Gene Therapy*, 2005, 12(14): 1089-98.
77. Smith C A, Roeszler K N, Sinclair A H. Robust and ubiquitous GFP expression in a single generation of chicken embryos using the avian retroviral vector, RCASBP. *Differentiation*, 2009, 77(5): 473-82.
78. Tak Y E, Kleinstiver B P, Nunez J K, et al. Inducible and multiplex gene regulation using CRISPR-Cpf1-based transcription factors. *Nature Methods*, 2017, 14(12): 1163-1166.
79. Tsai S Y, Segovia J A, Chang T H, et al. DAMP molecule S100A9 acts as a molecular pattern to enhance inflammation during influenza A virus infection: role of DDX21-TRIF-TLR4-MyD88 pathway. *PLoS Pathogens*, 2014, 10(1): e1003848.
80. Veron N, Qu Z, Kipen P A, et al. CRISPR mediated somatic cell genome engineering in the chicken. *Developmental Biology*, 2015, 407(1): 68-74.
81. Wang L, Yang L, Guo Y, et al. Enhancing Targeted Genomic DNA Editing in Chicken Cells Using the CRISPR/Cas9 System. *PLoS One*, 2017, 12(1): e0169768.
82. Westerman K A, Ao Z, Cohen E A, et al. Design of a trans protease lentiviral packaging system

- that produces high titer virus. *Retrovirology*, 2007, 4: 96.
83. Wu H, Liu Q, Shi H, et al. Engineering CRISPR/Cpf1 with tRNA promotes genome editing capability in mammalian systems. *Cellular Molecular Life Sciences*, 2018, 75(19): 3593-3607.
  84. Yu F, Zhu Z, Chen X, et al. Isolation, characterization and germline chimera preparation of primordial germ cells from the Chinese Meiling chicken. *Poultry Science*, 2019, 98(2): 566-572.
  85. Zetsche B, Gootenberg J S, Abudayyeh O O, et al. Cpf1 is a single RNA-guided endonuclease of a class 2 CRISPR-Cas system. *Cell*, 2015, 163(3): 759-71.
  86. Zhang Y, Baysac K C, Yee L F, et al. Elevated DDX21 regulates c-Jun activity and rRNA processing in human breast cancers. *Breast Cancer Research*, 2014, 16(5): 449.
  87. Zhang Y, Wang Y, Zuo Q, et al. CRISPR/Cas9 mediated chicken Stra8 gene knockout and inhibition of male germ cell differentiation. *PLoS One*, 2017, 12(2): e0172207.
  88. Zhang Z, Kim T, Bao M, et al. DDX1, DDX21, and DHX36 helicases form a complex with the adaptor molecule TRIF to sense dsRNA in dendritic cells. *Immunity*, 2011, 34(6): 866-78.
  89. Zufferey R, Nagy D, Mandel R J, et al. Multiply attenuated lentiviral vector achieves efficient gene delivery in vivo. *Nature Biotechnology*, 1997, 15(9): 871-5.
  90. Zuo Q, Jin K, Wang Y, et al. CRISPR/Cas9-Mediated Deletion of C1EIS Inhibits Chicken Embryonic Stem Cell Differentiation Into Male Germ Cells (*Gallus gallus*). *Journal of Cellular Biochemistry*, 2017, 118(8): 2380-2386.

## 致 谢

时间如白驹过隙，三年的研究生学习已接近尾声，三年的兽研生活经历丰富而充实，回首过去，生活、学习的场景仍历历在目。在此毕业之际，我想对指导过我的老师、帮助过我的同学以及背后默默鼓励支持我的家人和朋友道一声感谢。

首先特别感谢我的指导老师孟庆文研究员，感谢您对我实验上的悉心指导，对我实验细节及实验关键环节上的把控；感谢您在生活上对我的宽容及谅解，教会我做人做事的原则；您严谨的教学态度、冷静的处事风格、高效的工作效率都是值得我学习的，感谢孟老师给我这样的学习机会，谢谢您。

同时，感谢团队首席陈洪岩老师对我们的鼓励和支持，感谢实验动物与比较医学团队王玉娥老师、韩凌霄老师、陆涛峰老师对我实验上的给予的指导及帮助，感谢高彩霞老师、王伟老师在实验耗材、实验仪器方面付出的努力和保障、感谢赵丽丽老师、张圆圆老师、郑立伟秘书对我们生活上的关心和付出。感谢师兄师姐庞中兵、孙海洋、刘赛宝、姜雪婷、李亚芳、霍红、张贺、尹海畅、徐丽晶、马芹、周妍、刁晨曦对我实验中的具体指导和帮助、是你们教会我关键的实验操作技能，让我的研究得以顺利进行。感谢我的同门王辉、曾为俊、邵玉乐、许曼、辛畅、王怡平、肖春婷、徐嘉宇、孟兴，以及师弟师妹闫文卓、蒲路莎、李昂、王喜伟、张子博、田璐、吴兴华给予的支持与陪伴，是你们让我在遇到困难时保持积极乐观向上的心态迎接挑战，你们给予的温暖我会牢记在心。

此外，感谢中国农业科学院研究生院给我们提供的优良环境和学习氛围，感谢中国农业科学院生物技术国家重点实验室、实验动物与比较医学重点实验室提供优质的实验平台，感谢中国农业科学院哈尔滨兽医研究所公共仪器室老师对我实验上的帮助，也要感谢哈尔滨工业大学黄志伟教授和哈尔滨兽医研究所王晓钧研究员赠予的质粒，感谢中国农业科学院 2016 级全体同学的帮助、支持和付出，没有你们，我不可能顺利完成硕士课题的研究，谢谢你们。

最后，感谢父母对我信任和支持，感谢你们二十多年的辛勤付出，你们的支撑是我前进的动力和源泉，我会继续朝着我的梦想出发，不辜负你们的期望，同时希望天下所有父母身体健康，笑口常开，阖家欢乐。

## 作者简介

鲁国涛，男，汉族，出生于1993年1月，籍贯山东省青州市。2012年9月至2016年6月，就读于聊城大学农学院动物医学专业，获得农学学士学位；2016年9月至2019年6月，在中国农业科学院哈尔滨兽医研究所预防兽医学专业攻读硕士学位。

硕士期间发表文章：

1.鲁国涛，王辉，曾为俊，邵玉乐，许曼，陈洪岩，孟庆文\* 利用CRISPR/Cpf1技术构建HEK293细胞DDX21基因稳定敲除株及功能鉴定[J].中国兽医学报, (已录用)

2.王辉,鲁国涛,许曼,曾为俊,邵玉乐,赵丽丽,陈洪岩,刘建华\*,孟庆文\*.CRISPR/Cas9构建TLR4<sup>-/-</sup>DF1细胞系及新城疫病毒感染的初步研究.中国预防兽医学报,(已录用)

3.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细胞系建立及功能研究[J].中国家禽(已录用)

4.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PK-15细胞系的建立及PCV2感染的研究[J].中国动物传染病学报(已录用)

5.姜雪婷,黄立平,王伟,危艳武,刘赛宝,鲁国涛,刘长明,孟庆文,陈洪岩.利用ICR小鼠模型对PCV2感染中TLR3信号通路的研究[J].中国预防兽医学报,2017(10):48-53.