

郭承意, 董钰蓓, 温家成, 等. 宿主细胞敲除 G3BP2 基因对塞内卡病毒复制的影响 [J]. 畜牧与兽医, 2025, 57 (1): 91-97.

GUO C Y, DONG Y B, WEN J C, et al. Effect of G3BP2 gene knockout on Seneca Valley virus replication in the cells [J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2025, 57 (1): 91-97.

## 宿主细胞敲除 G3BP2 基因对塞内卡病毒复制的影响

郭承意<sup>1</sup>, 董钰蓓<sup>1</sup>, 温家成<sup>1</sup>, 延君芳<sup>1</sup>, 高雁恧<sup>1,2</sup>, 姜平<sup>1,2</sup>, 白娟<sup>1,2\*</sup>

(1. 南京农业大学动物医学院, 江苏 南京 210095;

2. 农业农村部动物细菌学重点实验室, 江苏 南京 210095)

**摘要:** 利用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术构建 Ras GTP 酶激活蛋白 SH3 结构域结合蛋白 2 (G3BP2) 基因敲除的 293T 细胞系, 并初步探讨了 G3BP2 基因缺失对于塞内卡病毒 A (Senecavirus A, SVA) 增殖的影响。采用激光共聚焦显微镜观察病毒感染是否引起应激颗粒的产生; 设计、构建靶向 G3BP2 基因的 px459-sgRNA 表达载体并转染进 293T 细胞; 通过嘌呤霉素压力筛选以及亚克隆得到细胞株, 经过 Western blot、基因测序的方式鉴定细胞株; CCK-8 法测定细胞增殖速度; Western blot、RT-qPCR、噬斑试验分别检测 SVA 感染后病毒蛋白 VP1 的表达水平、VP1 的拷贝数和细胞上清液的病毒滴度; 设计并构建 SVA 核糖体进入位点 (IRES) 的双荧光素酶报告系统, 双荧光素酶报告试验测定病毒启动子的启动活性。结果: 病毒感染引起应激颗粒的产生; 筛选得到 1 株 G3BP2 基因缺失 10 bp 的 293T 细胞系 (HEK 293T G3BP2<sup>-/-</sup>), 其细胞活力与未敲除细胞相比无显著差异; Western blot、RT-qPCR、噬斑试验均显示 G3BP2 敲除后显著抑制了病毒的增殖; 双荧光素酶报告试验表明 G3BP2 敲除后下调了病毒的翻译启动活性。综上, 本研究获得了 1 株 HEK 293T G3BP2<sup>-/-</sup> 细胞系, 该细胞通过下调病毒的启动活性抑制病毒的增殖, 为进一步探讨 G3BP2 对 SVA 复制的影响奠定基础。

**关键词:** G3BP2 基因; 基因敲除; 塞内卡病毒 A; 复制

中图分类号: S852.65

文献标志码: A

文章编号: 0529-5130(2025)01-0091-07

## Effect of G3BP2 gene knockout on Seneca Valley virus replication in the cells

GUO Chengyi<sup>1</sup>, DONG Yubei<sup>1</sup>, WEN Jiacheng<sup>1</sup>, YAN Junfang<sup>1</sup>,

GAO Yanni<sup>1,2</sup>, JIANG Ping<sup>1,2</sup>, BAI Juan<sup>1,2\*</sup>

(1. College of Veterinary Medicine, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China;

2. Key Laboratory of Animal Bacteriology, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Nanjing 210095, China)

**Abstract:** In This study, we used the CRISPR/CAS9 gene editing technology to construct a G3BP2 gene knockout 293T cell line and initially explored the impact of G3BP2 gene deletion on the proliferation of Senecavirus A (SVA). Laser confocal microscopy was employed to see whether virus infection induced the formation of stress granules. The px459-sgRNA expression vector targeting the G3BP2 gene was designed and constructed, and transfected into 293T cells. Cell lines were obtained through puromycin pressure screening and subcloning, and were identified by western blot and gene sequencing. Cell proliferation rates were determined using the CCK-8 assay. Western blot, RT-qPCR, and plaque assay were used to detect the expression level of viral protein VP1, the copy number of VP1, and the virus titer in the cell supernatant after SVA infection. A dual luciferase reporter system targeting the SVA IRES was designed and constructed, and the promoter activity of the virus was measured using a dual luciferasereporter assay. The results showed that virus infection induced the formation of stress granules. A G3BP2 gene knockout 293T cell line (HEK 293T G3BP2<sup>-/-</sup>) with a 10 bp deletion was obtained, and there was no significant difference in cell viability, compared with non-knockout cells. Western blot, RT-qPCR, and plaque assay all demonstrated that G3BP2 knockout significantly inhibited virus proliferation. The dual luciferase reporter assay indicated that G3BP2 knockout downregulated virus promoter activity. In summary, this study obtained a HEK 293T G3BP2<sup>-/-</sup> cell line that inhibits virus proliferation by downregulating virus promoter activity, which laid a foundation for further exploring the impact of G3BP2 on SVA replication.

**Keywords:** G3BP2 gene; gene knockout; Senecavirus A; replication

收稿日期: 2024-02-28; 修回日期: 2024-11-10

基金项目: 国家重点研发计划项目 (2022YFD1800800); 现代农业产业技术体系专项 (CARS-35)

第一作者: 郭承意, 男, 硕士研究生

\* 通信作者: 白娟, 教授, 研究方向为动物传染病, E-mail: baijuan@njau.edu.cn。

塞内卡病毒又称塞内卡病毒 A (Senecavirus A, SVA), 属于微 RNA 病毒科, 为无囊膜的正股单链 RNA 病毒<sup>[1]</sup>。2015 年首次在我国发现, 该病毒会引起母猪的水疱病与新生仔猪的急性死亡<sup>[2-3]</sup>。其基因组全长约 7.3 kb, 由核糖体进入位点 (internal ribosomal entry site, IRES) 启动翻译并编码 1 个多聚蛋白, 由自身编码的酶蛋白切割成 12 个成熟蛋白<sup>[4-5]</sup>。为了能更有效地防控 SVA 感染, 有必要研究其致病机制。

真核细胞为了规避热应激、渗透压应激、氧化应激以及病毒感染等环境压力所带来的损害, 会精细地调节细胞内的各个生理过程。对于蛋白翻译过程, 细胞内的多种真核翻译起始因子 (eIF) 2 $\alpha$  磷酸化激酶会依据当前所面对的应激快速完成活化, 如 HRI (氧化应激、热应激), GCN2 (饥饿、紫外照射), PKR (dsRNA) 和 PERK (内质网应激), 磷酸化 eIF2 $\alpha$  引起后续的信使核糖核蛋白体 (mRNP) 组装失败与翻译停滞, 导致 48S mRNPs 大量的积聚并形成动态致密的颗粒, 称之为应激颗粒<sup>[6]</sup>。面对病毒感染, 应激颗粒是先天免疫中的重要一环。病毒在长期的对抗过程中也进化出多种多样的应对策略。微 RNA 病毒有着独特的翻译启动方式, 它不依赖常规的帽启动, 而是借助 IRES 作为自身的启动子执行自身的蛋白翻译启动, 因此在一定程度上可以逃逸 eIF2 $\alpha$  磷酸化所引起的翻译阻滞<sup>[7]</sup>。除了改变翻译启动方式, 病毒也进化出多种调控应激颗粒形成的机制。埃博拉病毒 (EBOV) 的多功能蛋白 VP35 可以结合病毒的 dsRNA, 从而阻碍 PKR 对 dsRNA 的识别, 无法完成 PKR 的激活, 进一步抑制 eIF2 $\alpha$  的磷酸化, 最终阻止应激颗粒的形成<sup>[8]</sup>; 寨卡病毒 (ZIKV) 感染可以促进 eIF2 $\alpha$  的去磷酸化, 破坏 eIF2 $\alpha$  与 eIF2 $\beta$  的结合, 使 48S mRNPs 积聚减少从而抑制了应激颗粒的产生<sup>[9]</sup>; eIF4GI 通过与 Ras GTP 酶激活蛋白 SH3 结构域结合蛋白 (G3BP) 1 的 RBD 区结合对于典型应激颗粒的形成至关重要, 肠道病毒 71 型 (EV71) 的 2A 蛋白可以对 eIF4GI 进行切割, 破坏 eIF4GI - G3BP1 的相互作用, 进一步影响后续应激颗粒的组装<sup>[10]</sup>; 在脊髓灰质炎病毒 (PV) 感染的早期阶段, 该病毒会诱导应激颗粒的形成, 然而随着感染进入晚期, PV 会利用其 3C 蛋白酶来剪切 G3BP1, 不仅抑制应激颗粒的进一步形成, 还能直接使现有的应激颗粒发生解聚<sup>[11]</sup>; 猪流行性腹泻病毒 (PEDV) 通过诱

导细胞凋亡激活 Cspase-8, Cspase-8 可以对 G3BP1 进行切割, 进而导致应激颗粒的解聚<sup>[12]</sup>。

本研究采用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术构建得到 G3BP2 基因敲除的 293T 细胞系, 通过 Western blot、RT-qPCR 和噬斑试验探究 G3BP2 缺失对 SVA 增殖的影响, 并构建 SVA IRES 启动相关的双荧光素酶报告系统, 探究 G3BP2 对 SVA 启动的影响, 为进一步研究 SVA 与应激颗粒的作用关系奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试验材料

HEK 293T 细胞、BHK 细胞, px459、pGL3 以及 pRL-TK 质粒, 均由本实验室保存。SVA VP1 蛋白单抗为本实验室制备, SVA 毒株 SVV-CH-SD (GenBank: MH779611) 为本实验室分离保存。引物均由金斯瑞生物科技股份有限公司合成。

G3BP2 兔多抗、actin 鼠多抗、羊抗鼠 488 与羊抗兔 596 购自 Proteintech 公司; T4 PNK、Bbs I 购自 NEB 公司; 大肠杆菌 DH5 $\alpha$  购自吐露港生物科技股份有限公司; T4 连接酶、Xho I、Bgl II 购自赛默飞世尔科技公司; 胶回收、质粒提取试剂盒购自康为世纪生物科技股份有限公司; Lipofectamine 3000 转染试剂购自 Invitrogen 公司; DNA 提取试剂盒购自 Omega 公司; CCK-8 和双荧光素酶报告基因试剂盒购自碧云天生物科技股份有限公司; DMEM 培养基购自 Gibco 公司; 共聚焦小皿购自白鲨生物科技股份有限公司; 多聚赖氨酸购自 Solarbio 公司; 低熔点琼脂购自 Mdbio 公司; RNA 提取试剂盒、2  $\times$  Phanta Max Master Mix、2  $\times$  Taq Plus Master Mix、HiScript Q RT SuperMix for qPCR 和 AceQ qPCR SYBR Green Master Mix 购自诺唯赞生物科技股份有限公司。

### 1.2 sgRNA 及相关鉴定引物设计

sgRNA 引物设计, 根据 NCBI 人源 G3BP2 (GenBank: NM\_001400004.1) 基因组序列信息, 选取第 2 个外显子区域作为靶向区, 利用 sgRNA 在线设计网站 Benchling 设计 3 条 sgRNA, 在上下游 5' 端分别添加 CACC 与 AAAC。依据基因测序特点, 在作用靶点前后 100 bp 处设计检测引物。以人源 G3BP2、SVV-CH-SD 和 GAPDH (GenBank: NM\_001256799.3) 的序列信息为模板, 通过 SnapGene 设计 G3BP2 检测、qG3BP2、SVA IRES、qVP1、qGAPDH 的引物。详见表 1。

表1 引物序列

基因名称	上游引物 (5'→3')	下游引物 (5'→3')
G3BP2-sgRNA	CACCGAGTGTGAGTGGAGTAGTTGTCC	AAACGGACAACACTACTCCATCACTC
G3BP2 检测	CTTGAGTTCTACTAGTTGGTGC	TTGTTCTCTTCTACTTCATCTTCTGATTC
qG3BP2	AAAATGCTAACACTGGTACTATGAAGCT	GTGGTTCTTGTGGCAGAGAAACAG
SVA IRES	CGGGGTACCTTTGAAATGGGGGCTGGGC	GGAAGATCTTTACGTCTTCAAAGTGCCAGAG
qVP1	GCTTATGTTTCTCTCAACCATCCCT	GTAGGGCACATATGCGTCTGAG
qGAPDH	ATGGCACCCGTC AAGGCTGAGAAC	ATGTTGCTGAAGACGCCACTGG

### 1.3 激光共聚焦试验

采用多聚赖氨酸浸润共聚焦小皿 5 min, 随后将 HEK 293T 细胞以  $2 \times 10^5$  铺入处理过的共聚焦小皿, 24 h 后 SVA 以 10 MOI (感染比) 接种于 HEK 293T 细胞 6 h 作为试验组, 阳性对照采用 200  $\mu\text{mol/L}$  的亚砷酸钠处理 1 h, 采用无菌 PBS 润洗 3 次; 用 4% 的多聚甲醛室温固定 30 min, PBS 洗去多聚甲醛; 用 0.1% Triton 室温透膜 15 min, PBS 洗去透膜液; 用 5% 的牛血清白蛋白 (BSA) 室温封闭 30 min, PBS 洗去封闭液; G3BP2 与 VP1 按照 1 : 200 配制一抗孵育液, 4  $^{\circ}\text{C}$  过夜孵育, 回收一抗并用 PBS 洗去残留的一抗; 采用羊抗鼠 488 与羊抗兔 596 以 1 : 200 配制二抗孵育液, 室温避光孵育 1 h, 用 PBS 洗去二抗; 最后用 DAPI 孵育 10 min, 用 PBS 洗净残留的 DAPI。使用激光共聚焦显微镜观察结果。

### 1.4 px459-G3BP2-sgRNA 质粒的构建与鉴定

将合成的 G3BP2-sgRNA 上下游引物稀释为 100  $\mu\text{mol}$ , 退火体系共 20  $\mu\text{L}$ : 上下游引物各 1.25  $\mu\text{L}$ , 2  $\mu\text{L}$  10 $\times$ T4 DNA Ligase Buffer、0.5  $\mu\text{L}$  T4 PNK、15  $\mu\text{L}$  ddH<sub>2</sub>O。退火程序为: 37  $^{\circ}\text{C}$  孵育 60 min, 95  $^{\circ}\text{C}$  5 min, 随后以 5  $^{\circ}\text{C}/\text{min}$  降至 10  $^{\circ}\text{C}$ 。采用 *Bbs*I 线性化 px459, 以 1% 的琼脂糖凝胶进行分离, 切胶进行片段的回收。酶切产物与退火产物按照 1 : 7 的比例, 16  $^{\circ}\text{C}$  过夜连接。将连接产物转化进入 DH5 $\alpha$  感受态细胞中。37  $^{\circ}\text{C}$  摇床复壮 1 h, 将所有菌体涂布于含有氨苄青霉素的 LB 固体培养基, 37  $^{\circ}\text{C}$  倒置培养 15 h。挑取菌落进行扩大培养, 提取质粒进行测序验证, 测序正确的质粒命名为 px459-G3BP2-sgRNA。

### 1.5 HEK 293T G3BP2<sup>-/-</sup>细胞系的筛选与鉴定

绘制 HEK 293T 细胞上嘌呤霉素的杀灭曲线, 明确嘌呤霉素浓度后, 将 HEK 293T 细胞以  $3 \times 10^5$  铺入 6 孔板, 待细胞长至 60% ~ 70%, 利用 Lipofectamine 3000 将 px459-G3BP2-sgRNA 转染进 HEK 293T 细胞, 转染 px459 作为阴性对照, 并设置不转染组作为 MOCK 组。转染 24 h 后, 依据筛选得到的浓度进行细胞筛选, 待不转染组细胞全部死亡后, 将剩下的细胞通过有限稀释法, 按照 1 孔 1 个细胞铺入 96 孔板,

横向编号为 1~12, 纵向编号为 A~H。10 d 后单细胞团成型, 对其进行扩大培养。采用 Western blot 鉴定扩大培养后的细胞团是否敲除干净。对敲除干净的细胞进行 DNA 的提取, 利用检测引物扩增目的片段, 测序分析缺失类型。

### 1.6 细胞增殖速度分析

将 HEK 293T 细胞和 HEK 293T G3BP2<sup>-/-</sup>细胞以  $1 \times 10^4$  铺入 96 孔板进行连续培养, 以 24 h 为间隔, 按照 CCK-8 说明书测定 24、48、72 和 96 h 这 4 个时间点的吸光值, 以此反映不同细胞系的增殖速度。

### 1.7 病毒基因组拷贝数的测定

将 HEK 293T 细胞和 HEK 293T G3BP2<sup>-/-</sup>细胞以  $1 \times 10^5$  铺入 12 孔板, 待细胞长满单层, 以 1 MOI 进行接毒, 6 h 后弃上清液, 用 PBS 小心润洗细胞, 用 RL buffer 裂解细胞, 按照试剂盒说明书提取细胞中的总 RNA。按照说明书配置体系 1, 即: 1  $\mu\text{g}$  总 RNA, 4  $\mu\text{L}$  4 $\times$ gDNA wiper Mix, RNase free ddH<sub>2</sub>O 补至 16  $\mu\text{L}$ , 42  $^{\circ}\text{C}$  孵育 2 min; 随后配置反应体系 2, 即: 在体系 1 中加入 4  $\mu\text{L}$  5 $\times$ HiScript II RT SuperMix, 反转录程序为 50  $^{\circ}\text{C}$  15 min、85  $^{\circ}\text{C}$  5 s。

荧光定量 PCR (RT-qPCR) 扩增体系: cDNA 模板 2  $\mu\text{L}$ , 上下游引物各 0.4  $\mu\text{L}$ , 50  $\times$  ROX Reference Dye 0.4  $\mu\text{L}$ , 2 $\times$  AceQ qPCR SYBR Green Master Mix 10  $\mu\text{L}$ , ddH<sub>2</sub>O 6.8  $\mu\text{L}$ 。反应条件: 95  $^{\circ}\text{C}$  预变性 5 min; 95  $^{\circ}\text{C}$  10 s, 60  $^{\circ}\text{C}$  30 s, 40 个循环。得到 VP1 与 GAPDH 的 Ct 值后计算基因的相对含量。

### 1.8 病毒蛋白表达量的测定

将 HEK 293T 细胞和 HEK 293T G3BP2<sup>-/-</sup>细胞以  $1 \times 10^5$  铺入 12 孔板, 待细胞长满单层, 以 1 MOI 进行接毒, 6 h 后弃上清液, 用预冷的 PBS 小心润洗细胞, 每孔加入 100  $\mu\text{L}$  RIPA, 在冰上裂解 10 min, 收集进入离心管, 12 000 r/min 4  $^{\circ}\text{C}$  离心 10 min, 收集上清液进入新的离心管, 加入 25  $\mu\text{L}$  5 $\times$ Loading Buffer 后, 煮样器上 100  $^{\circ}\text{C}$  处理样品 10 min。采用 10% 的聚丙烯酰胺凝胶进行蛋白分离, 随后用半干转印仪进行转印。完成转印后, 采用 5% 脱脂乳封闭 2 h, PBST 洗涤 3 次, 每次 5 min; 按 1 : 5 000 稀释 G3BP2、

VP1 和 actin 抗体, 在摇床上室温孵育 2 h, 回收一抗 PBST 洗涤 3 次, 加入对应的种属源的二抗, 摇床上室温孵育 45 min, PBST 洗涤 3 次, 随后在蛋白曝光仪下进行曝光分析。

### 1.9 病毒滴度测定

将 HEK 293T 细胞和 HEK 293T G3BP2<sup>-/-</sup> 细胞以  $1 \times 10^5$  铺入 12 孔板, 待细胞长满单层, 以 1 MOI 进行接毒, 6 h 后无菌收取细胞培养液备用。将 BHK 细胞以  $3 \times 10^5$  铺入 6 孔板, 待细胞长满单层, 弃去上清液, 将收取的细胞液用 DMEM 进行倍比稀释, 每孔接种 1 mL, 做 3 个重复组。37 °C 5% CO<sub>2</sub> 温箱孵育 2 h, 弃去孵育液后加入 2 mL 含 2% 营养液的低熔点琼脂, 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 温箱继续培养 2~3 d, 统计产生的噬斑个数, 计算病毒滴度 (PFU/mL)。

### 1.10 SVA IRES 双荧光素酶报告系统构建及鉴定

按照 TRIzol 法, 提取病毒全长 RNA, 进行反转录得到 cDNA, 配置 Phanta 体系: 2 μL cDNA, 上下游引物各 1 μL, 2×Phanta Max Master Mix 25 μL, ddH<sub>2</sub>O 19 μL。反应程序: 95 °C 预变性 3 min; 95 °C 15 s, 56 °C 15 s, 72 °C 30 s, 35 个循环; 72 °C 10 min。1% 的琼脂糖凝胶电泳分离目的片段, 胶回收片段。将胶回收的 DNA 片段与 pGL3 同时进行酶切, 酶切产物再通过胶回收, 使用 T4 连接酶 16 °C 进行过夜连接, 载体与片段的摩尔比为 1:7。随后将连接产物转化进入 DH5α 感受态细胞中, 37 °C 复壮 1 h, 涂布于含氨苄青霉素的 LB 固体培养基, 37 °C 倒置培养 15 h。挑取菌落进行菌落 PCR, 鉴定阳性菌落, 随后扩大培养阳性菌落, 提取质粒并进行测序, 确定序列正确性, 将质粒命名为 pGL3-SVA IRES。

将 HEK 293T 细胞和 HEK 293T G3BP2<sup>-/-</sup> 细胞以  $1 \times 10^5$  铺入 12 孔板, 待细胞长至 60%~70%, 利用 Lipofectamine 3000 将 pGL3-SVA IRES 转入以上 2 种细胞, 进行 3 个重复。24 h 后按照说明书室温裂解细胞, 添加对应荧光素并测定其化学发光情况。

### 1.11 数据统计分析

所有试验至少重复 3 次, 结果相同。使用 GraphPad Prism 9.01 软件进行数据分析, 所有数据均表示为来自 3 个独立试验的“平均值±标准差”。

## 2 结果

### 2.1 SVA 感染后宿主蛋白 G3BP2 的表达变化

为了探究 G3BP2 蛋白在 SVA 感染中的作用, 检测内源性 G3BP2 蛋白是否受 SVA 感染的影响, 本研

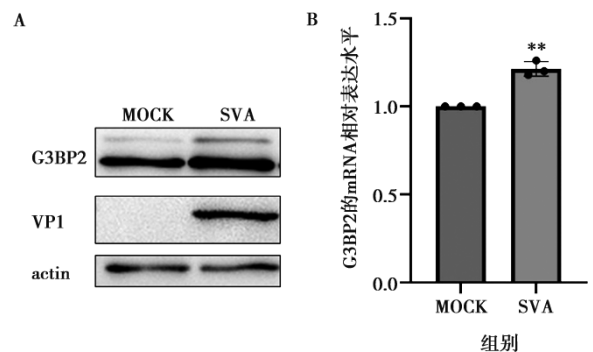
究采用 SVA (MOI = 1) 感染长满单层的 HEK 293T 细胞 6 h, Western blot 和 qPCR 试验分别检测蛋白表达水平与 mRNA 的拷贝数, 结果显示 SVA 接毒 6 h 后 G3BP2 的蛋白水平与 mRNA 的含量均显著提升 (图 1 A、B)。

### 2.2 SVA 感染后宿主蛋白 G3BP2 的聚集形态变化

SVA (MOI=10) 感染 HEK 293T 细胞 6 h, 未接毒组作为阴性对照, 亚砷酸钠处理组作为阳性对照, 通过共聚焦观察应激颗粒是否形成。结果显示 (图 2A), 未接毒组 G3BP2 呈现弥散分布, 亚砷酸钠处理后, G3BP2 明显聚集成点状的应激颗粒, SVA 感染同样可以引起细胞内 G3BP2 聚集成点状的应激颗粒。与阴性对照组相较而言, 应激颗粒形成显著增多, 统计分析 SVA 感染显著引起 HEK 293T 细胞产生应激颗粒 (图 2B)。

### 2.3 HEK 293T G3BP2<sup>-/-</sup> 细胞系的构建、筛选和鉴定

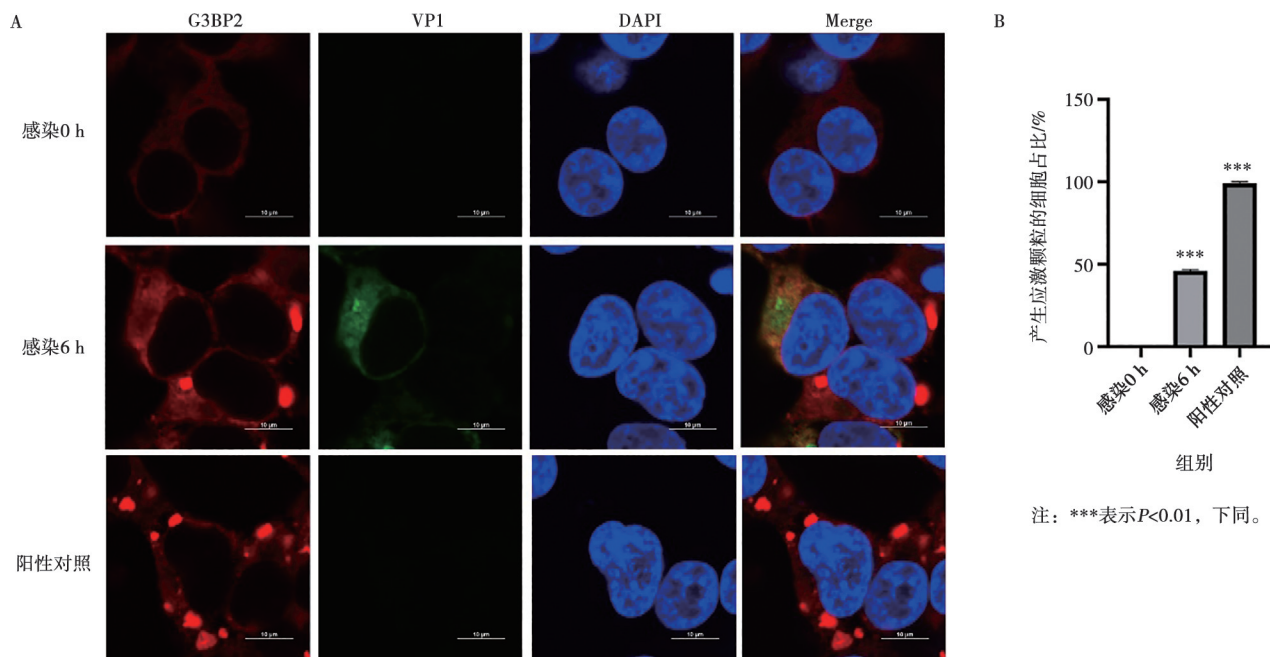
按照退火程序进行 sgRNA 退火, 将其与线性化的 px459 进行连接构建重组质粒, 测序结果表明, 重组质粒 px459-G3BP2-sgRNA 构建成功 (图 3A)。将亚克隆得到的细胞与 HEK 293T 以及转染 px459 空载的 HEK 293T 细胞进行裂解, 结果显示 D5、E3 细胞株无 G3BP2 蛋白表达 (图 3B), 取 D5 细胞与 HEK 293T 细胞进行 DNA 提取, 采用检测引物扩增, 测序结果显示 HEK 293T G3BP2<sup>-/-</sup> 细胞 2 号细胞株中 G3BP2 缺失 10 bp, 造成基因的移码突变 (图 3C), 成功得到 1 株 G3BP2 基因敲除细胞株。CCK-8 法结果表明, HEK 293T 细胞与 HEK 293T G3BP2<sup>-/-</sup> 细胞在增殖速度上没有显著差异 (图 3D), 说明 G3BP2 基因的缺失不影响 HEK 293T 的细胞活力。



注: \*\*表示  $P < 0.01$ , 下同。

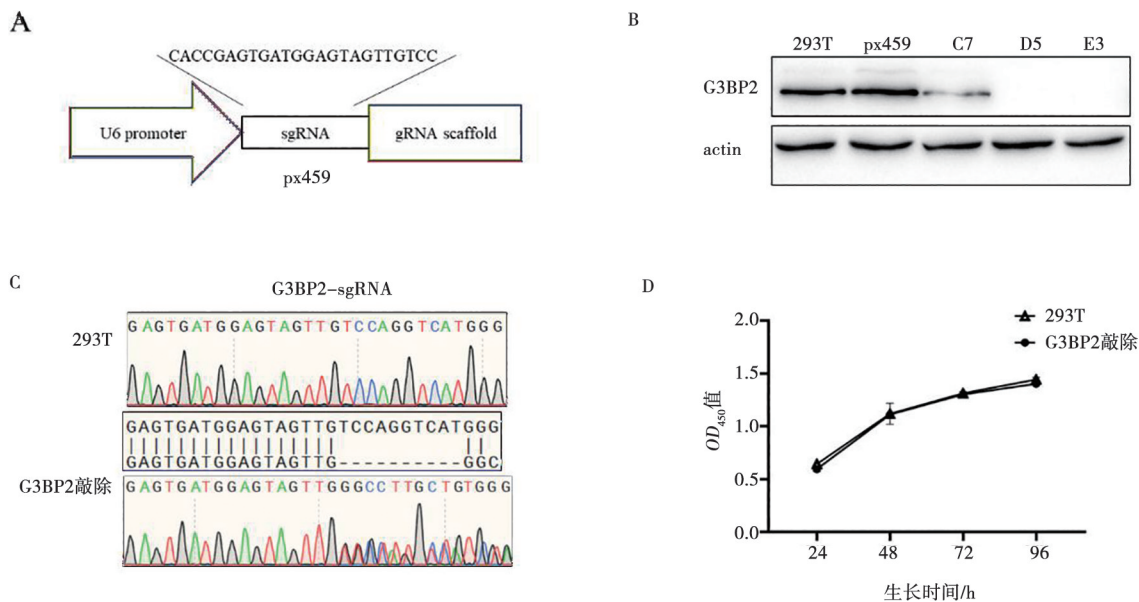
A. Western blot 检测 VP1 与 G3BP2 的表达; B. RT-qPCR 检测 G3BP2 的 mRNA 相对表达水平。

图 1 SVA 感染后宿主蛋白 G3BP2 的表达变化



A. 激光共聚焦检测 SVA 感染引起应激颗粒产生情况 (比例尺 = 10 μm); B. 统计分析应激颗粒产生情况。

图 2 SVA 感染引起应激颗粒产生



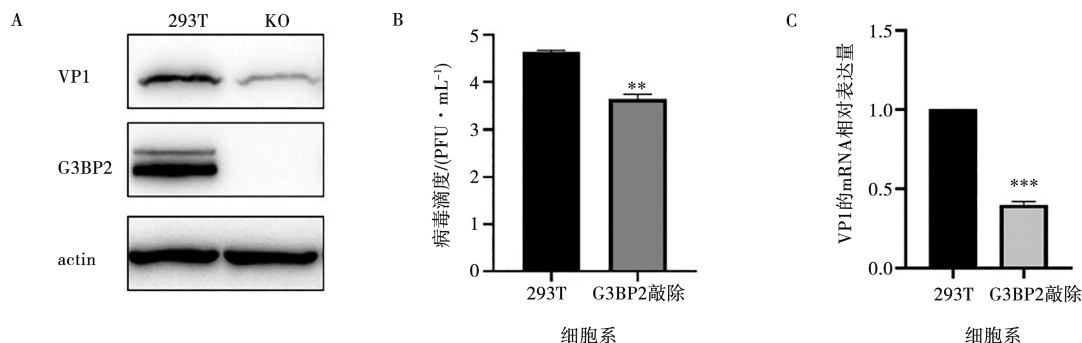
A. px459-G3BP2-sgRNA 质粒构建; B. Western blot 检测 G3BP2 蛋白表达; C. D5 细胞株基因测序; D. CCK-8 测定细胞活力。

图 3 HEK 293T G3BP2<sup>-/-</sup>细胞系的构建、筛选和鉴定

### 2.4 G3BP2 缺失对 SVA 复制的影响

Western bolt 结果说明敲除 G3BP2 后, SVA 在 HEK 293T G3BP2<sup>-/-</sup>细胞系中的 VP1 蛋白表达量显著下调 (图 4A)。统计噬斑发现, HEK 293T 中的病毒滴度达到  $2.9 \times 10^4$  PFU/mL, 而 HEK 293T G3BP2<sup>-/-</sup>

中的病毒滴度为  $2.6 \times 10^3$  PFU/mL, 两者相差 11 倍 (图 4B)。RT-qPCR 检测发现 G3BP2 敲除后下调了 VP1 的 mRNA 水平 (图 4C)。上述结果说明 G3BP2 的缺失能抑制 SVA 在宿主细胞中的复制。



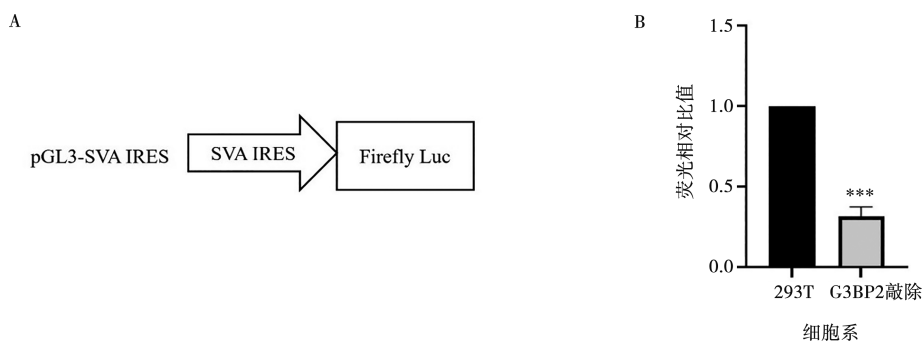
A. Western blot 检测病毒蛋白 VP1 的表达情况；B. 噬斑试验检测病毒滴度；C. RT-qPCR 检测病毒 VP1 基因 mRNA 水平。

图 4 敲除 G3BP2 对 SVA 增殖的影响

## 2.5 敲除 G3BP2 基因对 SVA 启动活性的影响

PCR 扩增重组质粒 IRES 片段经凝胶电泳分离进行胶回收，将 IRES 片段和 pGL3 用 *Xho* I 和 *Bgl* II 进行双酶切，过夜连接，扩大培养阳性菌落，随后将质粒进行测序，结果显示插入的片段与 IRES 参考序列一致，将构建的重组质粒命名为 pGL3-SVA IRES

(图 5A)；将该质粒分别转染进入 HEK 293T 细胞与 HEK 293T G3BP2<sup>-/-</sup> 细胞，24 h 后双荧光素酶报告试验表明，G3BP2 敲除下调了 SVA 的 IRES 启动活性 (图 5B)。结果说明 G3BP2 可能通过下调 SVA 的启动活性来抑制病毒的增殖。



A. pGL3-SVA IRES 质粒构建；B. 双荧光素酶报告试验检测 SVA IRES 启动活性。

图 5 敲除 G3BP2 对 SVA IRES 启动活性的影响

## 3 讨论

SVA 是我国新发现的猪水疱病病原体，因其感染症状与口蹄疫相似，大大提升了防治难度；同时作为微 RNA 病毒，易发生突变，疫苗研制推进缓慢。当前缺乏对应的疫苗用于疾病防控，因此对于 SVA 的致病机理的探索显得尤为重要。

应激颗粒作为先天免疫的一部分，在应激颗粒形成时，RNA 结合蛋白可以结合正在执行翻译的 mRNA，进而阻滞蛋白的翻译；同时募集大量先天免疫信号分子，并提供良好的抗病毒反应平台；还可以将病毒颗粒进行隔离。本研究首先证明 SVA 感染会引起 HEK 293T 细胞产生应激颗粒。有研究发现，G3BP 家族蛋白在应激颗粒的形成过程中起着关键的

调控作用<sup>[13]</sup>，因此针对应激颗粒骨架蛋白 G3BP2 设计并构建了 px459-sgRNA，转染进 HEK 293T，通过嘌呤霉素压力筛选以及有限稀释法进行亚克隆，最终筛选得到 1 株 G3BP2 基因移码突变的细胞株，且细胞活力与未敲除细胞系没有显著差异。这为进一步研究 SVA 的复制机制及其与应激颗粒相互作用奠定了基础。

应激颗粒的产生通常会抑制病毒的增殖，但也存在病毒可以通过募集 G3BP 蛋白进入其复制核心，阻碍正常应激颗粒的形成而形成杆状的非经典应激颗粒，并促进自身的复制<sup>[14]</sup>。本研究通过比较 SVA 在敲除细胞系与未敲除细胞系中的增殖，发现敲除细胞系中胞内的 VP1 蛋白的表达量与 mRNA 水平均显著降低，胞外的病毒滴度也显著降低，表明 G3BP2 基

因的缺失抑制了 SVA 的增殖, 这说明 SVA 存在借助 G3BP2 蛋白促进自身复制的策略。

为了逃逸应激颗粒, 许多病毒进化出了多种利用 G3BP 蛋白协助自身增殖的方式。例如, 猪繁殖与呼吸综合征病毒 (PRRSV) 利用病毒复制酶蛋白 NSP1 $\beta$  劫持 G3BP1 来抑制 PKR 激活, 使得形成的应激颗粒无法促进 I 型干扰素通路的激活, 而无法抑制病毒<sup>[15]</sup>; 新型冠状病毒 SARS-CoV-2 则是通过 N 蛋白促进 G3BP2 与 TRIM25 的相互作用, 形成 TRIM25-G3BP2-N 蛋白复合物, 抑制 TRIM25 泛素化 RIG-I, 进而影响干扰素通路的传导<sup>[16]</sup>; 诺如病毒 (norovirus) 甚至需要通过 G3BP1 蛋白才能完成 VPg 与核糖体蛋白的组装, 在 G3BP1 敲除细胞系中诺如病毒的复制受到显著抑制<sup>[17]</sup>。本研究探讨了 G3BP2 是否通过促进 SVA 的翻译启动影响病毒复制, 设计并构建了 pGL3-SVA IRES 重组质粒, 双荧光素酶报告试验结果显示, G3BP2 的敲除下调了 SVA IRES 的启动活性, 这说明 G3BP2 通过调控 SVA IRES 启动活性促进病毒的增殖。本研究尚未进行更为深入的机制探讨, 今后将继续利用构建的 G3BP2 敲除细胞系研究 SVA 如何利用 G3BP2 调控 IRES 的翻译机制, 以期为 SVA 感染的防治提供新思路。

## 参考文献:

- [1] VENKATARAMAN S, REDDY S P, LOO J, et al. Structure of Seneca Valley virus-001: an oncolytic picornavirus representing a new genus [J]. *Structure*, 2008, 16 (10): 1555-1561.
- [2] RESENDE T P, LUND L M, ROSSOW S, et al. Next-generation sequencing coupled with in situ hybridization: a novel diagnostic platform to investigate swine emerging pathogens and new variants of endemic viruses [J]. *Frontiers in Veterinary Science*, 2019, 6: 403.
- [3] SUN Y, CHENG J, WU R T, et al. Phylogenetic and genome analysis of 17 novel Senecavirus A isolates in Guangdong Province, 2017 [J]. *Frontiers in Veterinary Science*, 2018, 5: 314.
- [4] STRAUSS M, JAYAWARDENA N, SUN E, et al. Cryo-electron microscopy structure of Seneca Valley virus procapsid [J]. *Journal of Virology*, 2018, 92 (6): e01927-17.
- [5] WILLCOCKS M M, LOCKER N, GOMWALK Z, et al. Structural features of the Seneca Valley virus internal ribosome entry site (IRES) element: a picornavirus with a pestivirus-like IRES [J]. *Journal of Virology*, 2011, 85 (9): 4452-4461.
- [6] PROTTER D S W, PARKER R. Principles and properties of stress granules [J]. *Trends in Cell Biology*, 2016, 26 (9): 668-679.
- [7] JACKSON R J, HELLEN C U T, PESTOVA T V. The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation [J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2010, 11 (2): 113-127.
- [8] LE SAGE V, CINTI A, MCCARTHY S, et al. Ebola virus VP35 blocks stress granule assembly [J]. *Virology*, 2017, 502: 73-83.
- [9] AMORIM R, TEMZI A, GRIFFIN B D, et al. Zika virus inhibits eIF2 $\alpha$ -dependent stress granule assembly [J]. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 2017, 11 (7): e0005775.
- [10] YANG X D, HU Z L, ZHANG Q, et al. SG formation relies on eIF4G1-G3BP interaction which is targeted by picornavirus stress antagonists [J]. *Cell Discovery*, 2019, 5: 1.
- [11] YANG X D, HU Z L, FAN S S, et al. Picornavirus 2A protease regulates stress granule formation to facilitate viral translation [J]. *PLoS Pathogens*, 2018, 14 (2): e1006901.
- [12] SUN L M, CHEN H, MING X, et al. Porcine epidemic diarrhea virus infection induces caspase-8-mediated G3BP1 cleavage and subverts stress granules to promote viral replication [J]. *Journal of Virology*, 2021, 95 (9): e02344-20.
- [13] YANG P G, MATHIEU C, KOLAITIS R M, et al. G3BP1 is a tunable switch that triggers phase separation to assemble stress granules [J]. *Cell*, 2020, 181 (2): 325-345.
- [14] GÖTTE B, PANAS M D, HELLSTRÖM K, et al. Separate domains of G3BP promote efficient clustering of Alphavirus replication complexes and recruitment of the translation initiation machinery [J]. *PLoS Pathogens*, 2019, 15 (6): e1007842.
- [15] GAO P, LIU Y Y, WANG H, et al. Viral evasion of PKR restriction by reprogramming cellular stress granules [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2022, 119 (29): e2201169119.
- [16] YANG Z N, LI J, LI J L, et al. Engagement of the G3BP2-TRIM25 interaction by nucleocapsid protein suppresses the type I interferon response in SARS-CoV-2-infected cells [J]. *Vaccines*, 2022, 10 (12): 2042.
- [17] HOSMILLO M, LU J, MCALLASTER M R, et al. Noroviruses subvert the core stress granule component G3BP1 to promote viral VPg-dependent translation [J]. *Elife*, 2019, 8: e46681.