

张金熔, 邹艳丽, 王筱真, 等. I 型干扰素敲除 MDBK 细胞系的构建及其对牛结节性皮肤病病毒增殖的促进作用 [J]. 畜牧与兽医, 2025, 57 (11): 54-61.

ZHANG J R, ZOU Y L, WANG X Z, et al. Construction of an MDBK type I interferon knockout cell line and its role in increasing LSDV titer [J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2025, 57 (11): 54-61.

## I 型干扰素敲除 MDBK 细胞系的构建及其对牛结节性皮肤病病毒增殖的促进作用

张金熔<sup>1</sup>, 邹艳丽<sup>2</sup>, 王筱真<sup>2</sup>, 孙凡琪<sup>1</sup>, 余李龙<sup>1</sup>, 冯春燕<sup>3</sup>, 蒋珽<sup>1</sup>,  
屈海龙<sup>2</sup>, 李金明<sup>2\*</sup>, 王志亮<sup>2\*</sup>, 杨振<sup>1\*</sup>

- 南京农业大学动物医学院/农业农村部动物细菌学重点实验室/“一带一路”国际重大跨境动物疫病诊断与免疫专业科技创新院, 江苏 南京 210014;
- 中国动物卫生与流行病学中心, 外来病监测与研究中心, 山东 青岛 266032;
- 中国检验检疫科学研究院, 北京 100000)

**摘要:** 旨在提高牛结节性皮肤病病毒 (LSDV) 毒株在细胞中的增殖水平。通过比对 LSDV XJ201901 毒株在不同细胞中的增殖情况, 发现牛肾细胞 (MDBK) 是其敏感细胞系。为了进一步优化病毒增殖条件, 利用 CRISPR/Cas9 技术构建了 I 型干扰素 (IFN-I) 敲除的 MDBK 细胞系, 并通过实时荧光定量 PCR (qPCR)、半数组织细胞感染量 (TCID<sub>50</sub>) 和 Western blot 试验对野生型与 IFN-I 敲除 MDBK 细胞系中的病毒含量和蛋白表达量进行了评估。基因测序结果显示, IFN-I 敲除细胞系中存在碱基缺失导致的移码突变, 证实基因敲除成功; qPCR、TCID<sub>50</sub> 和 Western blot 试验结果显示, IFN-I 敲除 MDBK 细胞系可以显著促进 LSDV XJ201901 毒株的复制。该研究为 LSD 疫苗的研发和病毒与细胞互作机制的探索奠定了基础。

**关键词:** CRISPR/Cas9; I 型干扰素; MDBK; 牛结节性皮肤病病毒

中图分类号: S855.3 文献标志码: A 文章编号: 0529-5130(2025)11-0054-08

## Construction of an MDBK type I interferon knockout cell line and its role in increasing LSDV titer

ZHANG Jinrong<sup>1</sup>, ZOU Yanli<sup>2</sup>, WANG Xiaozhen<sup>2</sup>, SUN Fanqi<sup>1</sup>, YU Lilong<sup>1</sup>, FENG Chunyan<sup>3</sup>, JIANG Ting<sup>1</sup>,  
QU Hailong<sup>2</sup>, LI Jinming<sup>2\*</sup>, WANG Zhiliang<sup>2\*</sup>, YANG Zhen<sup>1\*</sup>

- College of Veterinary Medicine/Key Laboratory of Animal Bacteriology, Ministry of Agriculture and Rural Affairs/Professional Sci-Tech Innovation Institute of the Belt and Road International Transboundary Animal Disease Diagnosis and Immunization, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210014, China;
- Center for Surveillance and Research on Exotic Diseases, China Animal Health and Epidemiology Center, Qingdao 266032, China;
- China Academy of Inspection and Quarantine, Beijing 100000, China)

**Abstract:** To improve the proliferation level of lumpy skin disease virus (LSDV) in cells, this study compared the proliferation of the LSDV XJ201901 strain in different cells, and the results showed that MDBK cells were its sensitive cell line. In order to further optimize the viral proliferation conditions, a type I interferon (IFN-I) knockdown MDBK cell line was constructed in this experiment using the CRISPR/Cas9 technology, and the wild-type and IFN-I knockdown MDBK cell lines were analyzed by qPCR, TCID<sub>50</sub> and Western blot.

收稿日期: 2025-01-16; 修回日期: 2025-08-29

基金项目: 国家重点研发计划项目 (2022YFD1800500)

第一作者: 张金熔, 女, 硕士研究生

\* 通信作者: 杨振, 副教授, 主要从事跨境动物传染病和家畜群体医学方面的研究, E-mail: yangzhen@njau.edu.cn; 王志亮, 研究员, 博士生导师, 主要从事重大外来动物疫病综合防控技术研究, E-mail: wangzhiliang@cahec.cn; 李金明, 研究员, 博士生导师, 主要从事重大外来动物疫病综合防控技术研究, E-mail: lijiming@cahec.cn。

The viral content and protein expression in wild-type and IFN- $\text{I}$  knockdown MDBK cell lines were evaluated by qPCR, TCID<sub>50</sub> and Western blot assays. The results of the gene sequencing showed the presence of shifted code mutations due to base deletions in the IFN- $\text{I}$  knock-out cell lines, confirming the success of the gene knockout. The results of the qPCR, TCID<sub>50</sub> and Western blot assays showed that the IFN- $\text{I}$  knockdown MDBK cell line could significantly promote the replication of the LSDV XJ201901 strain. This study laid a foundation for development of LSD vaccines and exploration of virus-cell interaction mechanisms.

**Keywords:** CRISPR/Cas9; type I interferon; MDBK; lumpy skin disease virus

牛结节性皮肤病 (LSD) 是由痘病毒科 (Poxviridae) 山羊痘病毒属 (*Capripoxvirus*) 的牛结节性皮肤病病毒 (LSDV) 引起的一种牛的急性、亚急性传染病<sup>[1]</sup>。感染牛的临床病症主要表现为发烧, 皮肤出现数量不等的明显结节<sup>[1-2]</sup>。值得注意的是, 近年来 LSDV 已经逐渐从非洲和中东地区蔓延到欧洲和亚洲<sup>[3]</sup>, 我国在 2019 年首次在新疆发现了该病<sup>[4]</sup>。目前, LSD 无特效药, 在疫病流行区, 防控 LSD 唯一可行的手段就是疫苗免疫, 所以生产安全有效的疫苗是十分必要的<sup>[5]</sup>。国内目前还没有商品化 LSD 疫苗, 现国外有市售的主要是预防 LSD 的两类弱毒活疫苗, 一类是基于 LSDV Neethling 株、KSGP-180/240 株的同源疫苗<sup>[6]</sup>, 另一类是基于山羊痘病毒 (GTPV)、绵羊痘病毒 (SPPV) 的异源疫苗<sup>[7-8]</sup>。除此之外, 还有一些关于 LSD 灭活苗和重组疫苗的研究已经发表<sup>[9-11]</sup>, 但是这些疫苗需要作进一步的研究。在我国, 根据《牛结节性皮肤病防治技术规范》要求, 受疫情威胁区县采用山羊 5 倍剂量免疫山羊痘弱毒活疫苗。

在 LSDV 培养方面, 使用反刍动物来源的原代细胞进行病毒增殖仍然面临一些问题, 如制备过程复杂、耗时, 以及存在病毒传播风险<sup>[12]</sup>和动物福利问题<sup>[13-14]</sup>, 需要寻找更有效的解决方案。原代细胞, 如羔羊睾丸细胞 (LT)、胎牛肌肉细胞、胎牛皮肤细胞、羊肾细胞和胎牛肺细胞, 虽然被用作生产疫苗的基础, 但它们存在性能不稳定、易出现假阳性结果的风险, 并且可能因复发性病毒或细胞异质性而受影响<sup>[13-15]</sup>。Vero 细胞因其生长速度快、传代稳定且易于操作而备受关注。虽然 Vero 细胞在多种病毒疫苗生产中表现出色<sup>[16]</sup>, 但在山羊痘病毒疫苗生产中的应用效果并不理想<sup>[17-18]</sup>, 这主要是因为山羊痘病毒在 Vero 细胞中的复制能力有限。因此, 为了提升 LSD 疫苗的生产效率和效果, 需要进一步探索和研究更合适的细胞系和生产技术。

干扰素 (IFN) 是一种由细胞基因组控制产生的糖蛋白, 具有抗病毒、抗肿瘤和免疫调节等多种生物活性<sup>[19]</sup>。干扰素主要分为 3 类, 即 I、II 和 III 型。I 型干扰素有多种亚型且各亚型间都具有一定的结构同源性, 包括 IFN- $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\delta$ 、 $\epsilon$ 、 $\kappa$ 、 $\tau$  等<sup>[20]</sup>。II 型

干扰素由单基因家族 IFN- $\gamma$  构成<sup>[21]</sup>。研究表明, 痘病毒科经典模式病毒痘苗病毒 (VACV) 在感染宿主过程中会被细胞内环鸟腺苷酸合成酶 (cGAS) 识别, 进而刺激下游 IFN- $\text{I}$  转录, 激活宿主抗病毒反应<sup>[22]</sup>, 这一发现揭示了 IFN- $\text{I}$  通路在宿主防御痘病毒感染中的关键作用。有研究表明, IFN- $\alpha$  具有抗水疱性口炎病毒、口蹄疫病毒、牛病毒性腹泻等多种病毒的作用<sup>[5]</sup>。

目前, 本实验室已成功分离出 LSDV XJ201901 毒株<sup>[23]</sup>。然而, 以往研究结果显示, LSDV 在培养过程中滴度最终保持在  $10^5$  TCID<sub>50</sub>/mL<sup>[24-27]</sup>。由于其在培养过程中展现出较差的细胞适应性和较低的毒价, 所以阻碍了 LSDV 相关基础研究工作的开展, 同时也增加了其作为疫苗株的生产成本。为了解决该问题, 本研究从牛肾细胞 (MDBK)、乳仓鼠肾细胞 (BHK-21) 和肺癌人类肺泡基底上皮细胞 (A549) 中筛选 LSDV 敏感细胞系, 通过 CRISPR/Cas9 技术构建了 MDBK IFN- $\alpha$  敲除细胞系, 为 LSDV 病原学研究和疫苗研发提供有用材料和工具。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试剂

Lenti CRISPR V2、pspAX2、pMD2.G 由本实验室保存; HEK-293T、MDBK、A549 和 BHK-21 细胞由本实验室保存; LSDV ORF104 多克隆抗体由本实验室保存; LSDV XJ201901 毒株和带有 mCherry 报告基因的重组病毒 rLSDV 由本实验室保存; DMEM 细胞培养基及胎牛血清购自 Gibco 公司; 大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态细胞购自北京全式金生物技术股份有限公司; 转染试剂 Lipofectamine 3000、T4 连接酶购自赛默飞生物有限公司; 测序和引物由生工生物工程 (上海) 股份有限公司完成; T4 PNK 酶和 *Bsm*BI 酶购自美国 NEB 公司; 嘌呤霉素购自北京索莱宝科技有限公司; *Taq* 酶、DNA Marker、CCK-8 试剂盒、PAGE 凝胶快速制备试剂盒和蛋白 Marker 购自南京诺唯赞公司; DNA 提取试剂盒购自 OMEGA 公司; Polyberene、细胞裂解液购自碧云天公司; 羊抗兔 IgG-HRP 购自 PROTEINTECH 公司; 曝光液 (Tanon-ECL) 购自上海天能生命科学有限公司。

## 1.2 LSDV 敏感细胞系的筛选

将 A549、BHK-21 与 MDBK 三种细胞按每孔  $4 \times 10^5$  个细胞的密度接种至 24 孔板中, 12 h 后接种感染复数 (MOI) = 0.01 的 LSDV XJ201901 毒株, 分别在感染后 24、48、72 和 96 h 收集病毒样品与 DNA 样品, 通过测定样品中病毒的半数组织细胞感染量 (TCID<sub>50</sub>) 与病毒 DNA 拷贝水平绘制病毒生长曲线; 同时, 接种 MOI=0.01 的 rLSDV 毒株, 于感染后 48、72 和 96 h 通过荧光显微镜观察病毒在细胞中的增殖情况。

## 1.3 病毒生长曲线绘制

将 MDBK 细胞铺于 96 孔细胞板中, 12 h 后弃去营养液, 用 PBS 洗 3 次, 将收集的病毒样品反复冻融 3 次, 取 100  $\mu$ L 样品用 DMEM (不含血清与双抗) 进行 10 倍倍比稀释, 共做 8 个稀释度; 取 100  $\mu$ L 稀释后的病毒液加入 96 孔板中, 每个稀释度做 8 个重复孔, 同时设置阴性对照组。将细胞板置于温箱中, 2 h 后弃去病毒液, 加入维持液 (含 2% FBS, 1% 双抗的 DMEM) 继续培养, 第 5 天时统计病变孔数, 利用 Reed-Muench 法计算样品 TCID<sub>50</sub>, 根据 TCID<sub>50</sub> 测定结果绘制病毒生长曲线。

## 1.4 实时荧光定量 PCR (qPCR)

根据 DNA 提取试剂盒说明书提取样品 DNA, 参考伍子昂等<sup>[28]</sup>描述的方法对病毒 DNA 含量进行绝对定量, 配制 20  $\mu$ L 反应体系: Probe Master Mix 10  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 8.4  $\mu$ L, 标准模板 0.6  $\mu$ L, 上游引物 (5'-TTACTATCACTATCACTATTAC-3') 0.1  $\mu$ L, 下游引物 (5'-AACGTGTTACATTGTTAGAT-3') 0.1  $\mu$ L, 探针 (5'-FAM-TATCATTAGCACCATCAC-CATCACCA-BHQ1-3') 0.4  $\mu$ L 和 ROX 0.4  $\mu$ L。反应条件: 95  $^{\circ}$ C 5 min; 95  $^{\circ}$ C 15 s, 60  $^{\circ}$ C 35 s, 共 40 次循环。所有样品设置 3 个重复。根据 qPCR 测定结果绘制病毒生长曲线。

## 1.5 rLenti CRISPR V2 质粒的构建与慢病毒包装

根据 NCBI 中牛 IFN- $\alpha$  的基因序列 (表 1), 利用 CRISPR direct 在线网站 (<http://crispr.dbcls.jp/>) 设计 4 对 gRNA 引物 (表 2)。

退火体系: 上下游引物 (10  $\mu$ mol/L) 各 1  $\mu$ L, T4 PNK 酶 0.5  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 7.5  $\mu$ L。退火步骤: 水浴锅中 37  $^{\circ}$ C 孵育 30 min, 95  $^{\circ}$ C 孵育 5 min, 然后关闭水浴锅待其降至室温, 形成双链 DNA。根据 BsmB I 酶使用说明书酶切 Lenti CRISPR V2 质粒; 使用胶回收试剂盒回收酶切产物。使用 T4 连接酶将胶回收产物与退火产物连接, 然后转化到 DH5 $\alpha$  感受态细胞中, 涂布于氨苄抗性的固体 LB 平板中培养, 挑选单克隆菌进行 PCR 鉴定阳性菌落。PCR 反应体系: Taq

酶 12.5  $\mu$ L, 菌液 1  $\mu$ L, 上游引物 1  $\mu$ L, 下游引物 1  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 9.5  $\mu$ L。PCR 反应程序: 98  $^{\circ}$ C 预变性 30 s; 98  $^{\circ}$ C 变性 10 s, 55  $^{\circ}$ C 退火 5 s, 72  $^{\circ}$ C 延伸 60 s, 35 个循环; 72  $^{\circ}$ C 延伸 10 min。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳。最后经测序鉴定获得重组的 rLenti CRISPR V2 质粒。

表 1 牛 IFN- $\alpha$  基因序列信息

基因名称	登录号
IFN- $\alpha$ -A	M10952.1
IFN- $\alpha$ -B	M10953.1
IFN- $\alpha$ -C	M10954.1
IFN- $\alpha$ -D	M10955.1

表 2 gRNA 序列信息

序列名称	引物序列 (5'→3')
gRNA1-F	CACCGTCATTTCTGTCTGCAGGC
gRNA1-R	AAACGCCTGCAGGACAGAAATGAC
gRNA2-F	CACCGTGGCTTGAGCCTTCTGCAAC
gRNA2-R	AAACGTTGAGAAGGCTCAAGCCAC
gRNA3-F	CACCGTATTTCTCACAGCCAGGC
gRNA3-R	AAACGCCTGGCTGTGAGGAAATAC
gRNA4-F	CACCGACACAGCCCTTGTGCCTGGG
gRNA4-R	AAACCCAGGCACAAGGGCTGTGTC

将 HEK-293T 细胞铺于 6 孔细胞板, 12 h 后按照 Lipofectamine 3000 说明书操作, 将 rLenti CRIS-PR V2、pspAX2 和 pMD2.G 质粒按照质量比 4 : 3 : 2 转染至 HEK-293T 细胞, 总质量为 3  $\mu$ g, 转染后 48 h 收获上清液病毒, 4  $^{\circ}$ C 3 000 r/min 离心 10 min, 取上清液保存于 -80  $^{\circ}$ C 备用。

## 1.6 IFN- $\alpha$ 敲除 MDBK 细胞系构建

将 MDBK 细胞铺于 24 孔细胞板, 每孔  $5 \times 10^4$  个细胞。12 h 后向 200  $\mu$ L 慢病毒液中加入终浓度为 10  $\mu$ g/mL 的 Polyberene, 用混合物感染 MDBK 细胞 4 h 后, 将营养液换为生长培养基 (含 10% FBS 和 1% 双抗) 继续培养, 48 h 后用含 2  $\mu$ g/mL 嘌呤霉素的生长培养基进行药筛。用鼠原代腹腔巨噬细胞作为饲养层细胞对药筛 7 d 后的 MDBK 细胞进行单克隆筛选, 将细胞稀释至 7 个/mL, 铺于 96 孔细胞板, 每孔 100  $\mu$ L。1 周后, 挑选每孔只有 1 个细胞团的孔进行传代, 将细胞传至 24 孔板中, 并收集细胞 DNA。使用细胞 DNA 提取试剂盒提取细胞株总 DNA, 根据牛染色体 8 号基因 (NC\_037335.1) 设计测序引物 (表 3), 使用 PCR 扩增目的片段并进行胶回收, 对回收

产物进行测序鉴定。

表3 扩增 Bo IFN- $\alpha$  片段引物序列

引物名称	引物序列 (5'→3')
Bo IFN-F	GGGAAACATGAAAAAAAAAGATTGAGAAATAC
Bo IFN-R	TTGACATGGCAGCACAGGAGGACG

### 1.7 不同细胞对 LSDV 增殖效果的影响

MDBK IFN- $\alpha$  敲除细胞系和 MDBK 细胞铺于 2 个 24 孔板, 其中 1 个 24 孔板 12 h 后接种 MOI=0.01 的 LSDV XJ201901, 在感染后 24、48、72 和 96 h 时收集样品, 检测样品中 TCID<sub>50</sub> 含量, qPCR 评估病毒基因拷贝数, 以 LSDV ORF104 多克隆抗体为一抗进行 Western blot 评估 ORF104 蛋白表达量。另外 1 个 24 孔板 12 h 后接种 MOI=0.01 的 rLSDV, 在感染后 48、72 和 96 h 时观察细胞荧光强度并拍摄照片。

### 1.8 不同细胞感染 LSDV 后 ORF104 蛋白表达量

#### 1.8.1 蛋白样品收集

将病毒感染后 24、48、72 和 96 h 的细胞弃去培养液, 用 PBS 洗涤 3 次后加入细胞裂解液收取蛋白样品。溶解细胞裂解液, 混匀; 取适当量的裂解液, 在使用前数分钟内加入 PMSF, 使 PMSF 的最终浓度为 1 mmol/L, 或者根据试验需要加入适当的上述蛋白磷酸酶抑制剂混合物。去除培养液, 用 PBS 洗 3 次。6 孔板中每孔加入 100~200  $\mu$ L 裂解液。用枪吹打数下, 使裂解液和细胞充分接触。充分裂解后, 7 720 r/min 离心 5 min, 取上清液进行煮样。处理后的样品放入 -20  $^{\circ}$ C 保存。

#### 1.8.2 SDS-PAGE 分析

按试剂盒步骤制备 15% 分离胶和 5% 浓缩胶。待上层胶凝固后移出梳子, 放入电泳槽, 加入适量 1 $\times$  Tris-甘氨酸电泳缓冲液。每孔加入 10  $\mu$ L 样品。接通电源, 80 V 电压电泳至溴酚蓝指示剂跑到分离胶

后调到 120 V, 至电泳结束, 卸下凝胶, 进行考马斯亮蓝染色。

#### 1.8.3 Western blot 分析

SDS-PAGE 结束后, 取下电泳后的凝胶, 切去浓缩胶及其他多余部分, 按照正极至负极的顺序依次放置海绵、滤纸、NC 膜、蛋白胶、滤纸、海绵, 置于湿转装置中转印。280 mA 恒流转印 1.5 h。转印结束后, 将 NC 膜置于配制好的 5% 脱脂乳中 (PBST 配制) 进行封闭, 60 r/min, 室温封闭 1 h; 洗涤后, 用制备的纯化多克隆抗体 (ORF104) 作为一抗, 4  $^{\circ}$ C 过夜孵育; 洗涤, 加入 HRP 标记的羊抗兔 IgG 二抗, 室温摇床孵育 1 h; ECL 化学发光, Tanon5200 上曝光观察目的蛋白表达情况, 对 MDBK 和 MDBK IFN- $\alpha$  敲除细胞上 LSDV 的增殖情况进行 Western blot 分析。

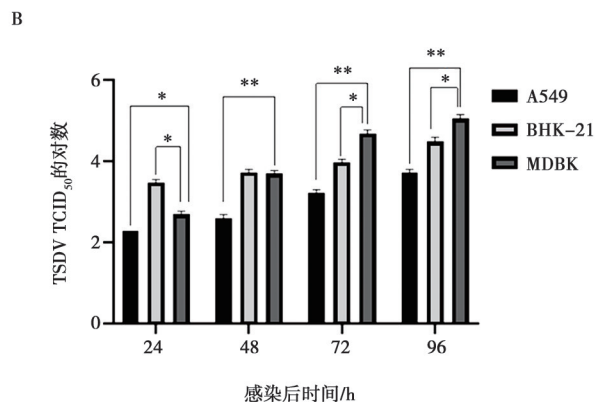
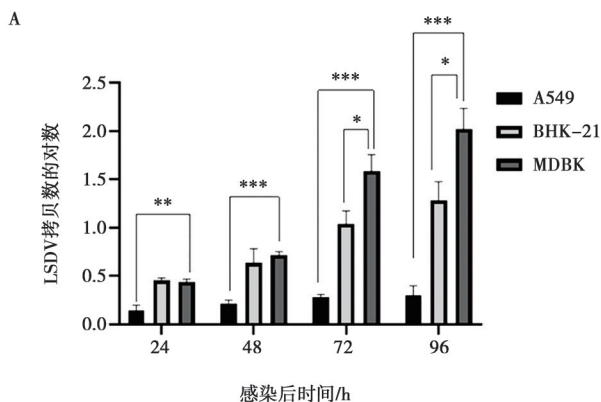
### 1.9 统计分析

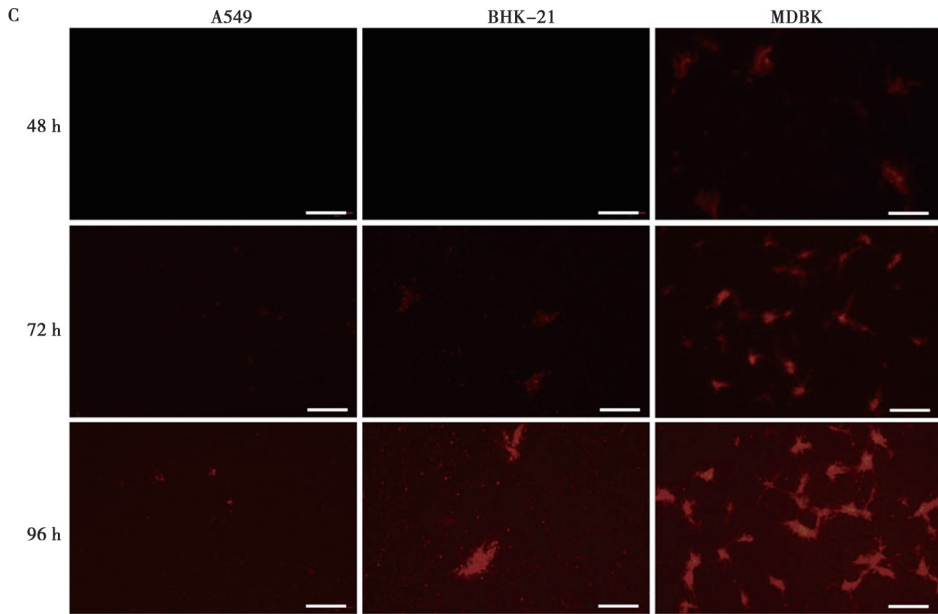
试验数据使用 GraphPad Prism 8.0 软件, 通过统计学方法进行数据分析并作图。同一时间点重复 3 次试验, 使用 *t* 检验法进行显著性差异分析。试验数据以“平均值 $\pm$ 标准差”表示。

## 2 结果与分析

### 2.1 LSDV 在不同细胞中的增殖情况

为了研究 LSDV 在 A549、BHK-21、MDBK 3 种细胞中的增殖情况, 分别在细胞感染 MOI=0.01 的 LSDV XJ201901 后, 24、48、72 和 96 h 收集细胞样品测定其 TCID<sub>50</sub> 和基因拷贝数。结果显示, 在不同时间点, LSDV XJ201901 毒株在 MDBK 细胞中的基因拷贝数 (图 1A) 与 TCID<sub>50</sub> (图 1B) 均高于其他细胞系。使用 rLSDV 毒株也得到同样的结果, 如图 1C 所示, rLSDV 在 MDBK 细胞中增殖的荧光信号均强于其他细胞系。





A. TCID<sub>50</sub>检测 LSDV 在不同细胞中的增殖情况；B. qPCR 检测 LSDV 在不同细胞中的增殖情况；C. rLSDV 在 A549、BHK-21 和 MDBK 细胞中的增殖情况（标尺 = 400 μm）。\* 表示  $P < 0.05$ ，\*\* 表示  $P < 0.01$ ，\*\*\* 表示  $P < 0.001$ ，下同。

图 1 LSDV 在不同细胞中的增殖情况

## 2.2 IFN-α 敲除 MDBK 细胞系的构建与鉴定

为了进一步提高 LSDV 在体外细胞培养中的病毒滴度，利用 CRISPR/Cas9 技术构建了 IFN-α 敲除 MDBK 细胞系。为了鉴定单克隆细胞系的基因敲除情况，提取单克隆细胞的 DNA 样品，并对目的片段进行 PCR 扩增和 Sanger 测序，结果如图 2 所示，在

gRNA3 附近存在 40 bp 的基因缺失，该片段缺失会引起基因的移码突变。经过细胞连续传代，将第 10 代和第 20 代单克隆细胞基因测序后显示 gRNA3 附近 40 bp 基因依旧缺失，表明敲除细胞系敲除效果稳定。

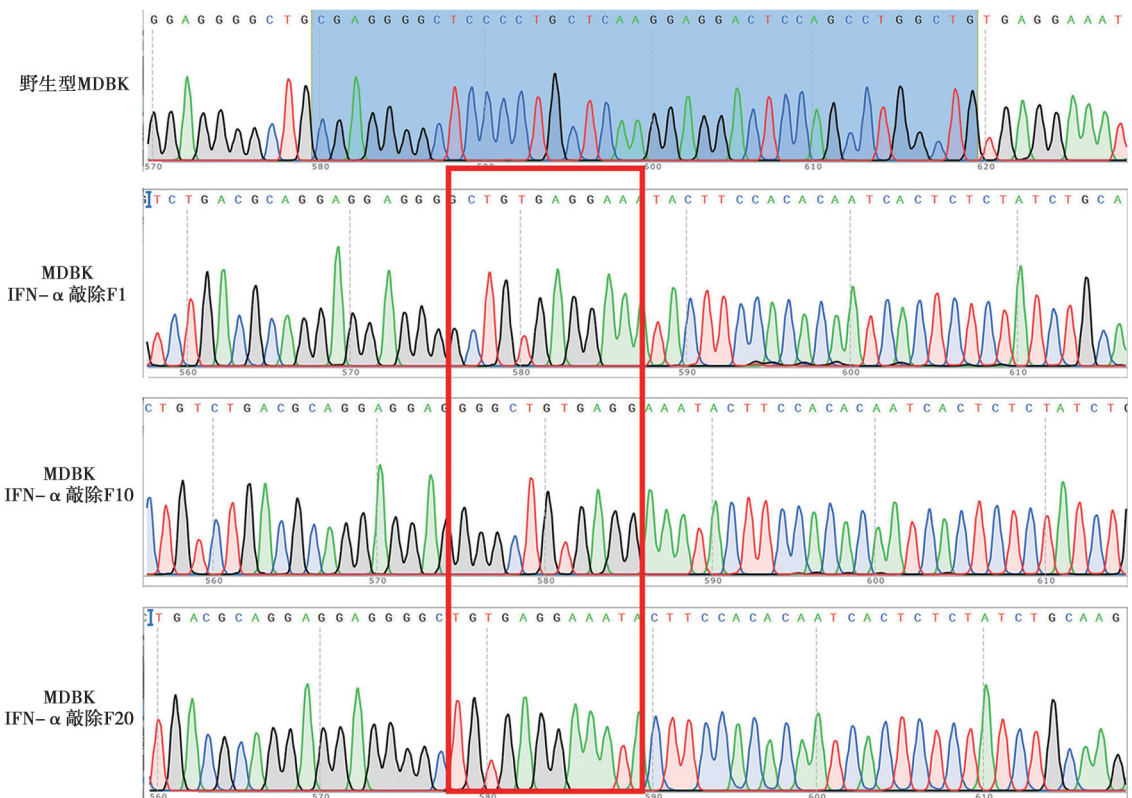


图 2 测序鉴定 MDBK IFN-α 敲除单克隆细胞系基因组

为了研究 IFN- $\alpha$  敲除对细胞状态的影响，分别将  $2 \times 10^5$  个野生型细胞和敲除细胞系铺至 24 孔板中，于铺板后的 12、24 和 48 h 对细胞形态进行观察。结

果如图 3 所示，2 种细胞系在细胞形态（图 3A）及活性（图 3B）上均无明显差别。

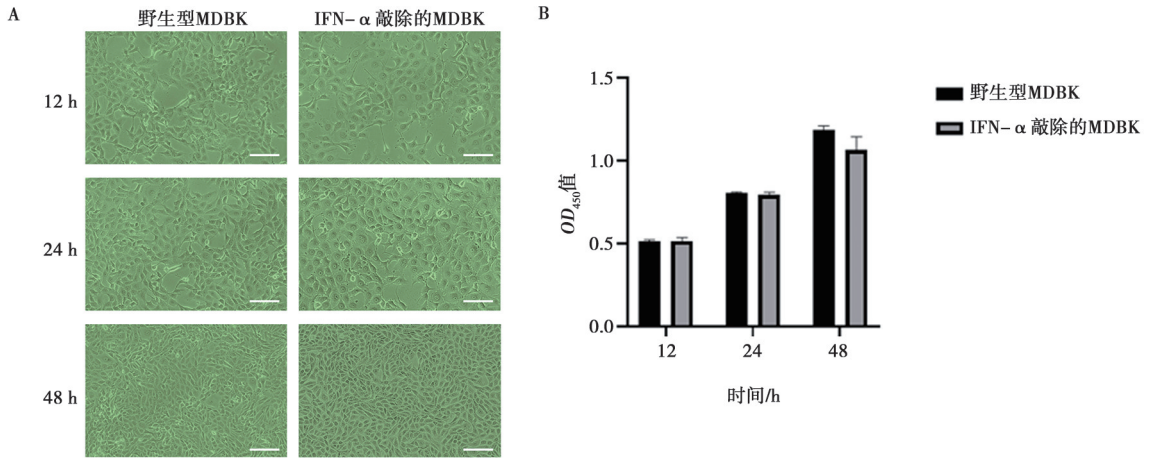
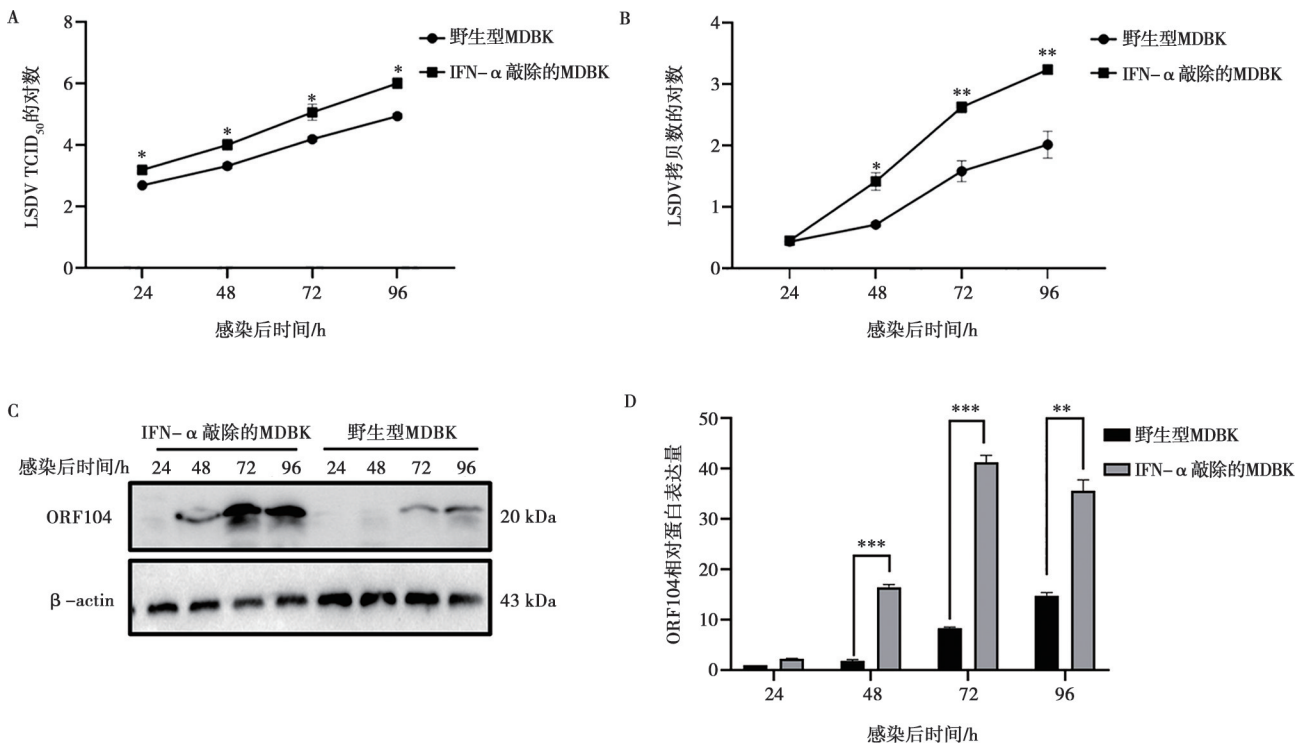


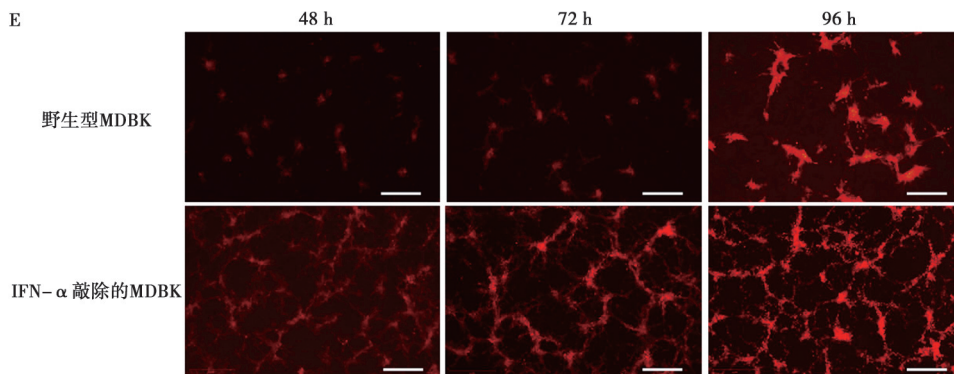
图 3 野生型 MDBK 与其 IFN- $\alpha$  敲除细胞系的形态 (A) 与活性 (B) 对比 (标尺=400  $\mu\text{m}$ )

### 2.3 敲除 IFN- $\alpha$ 基因的 MDBK 细胞系对 LSDV 增殖的影响

为了研究敲除 IFN- $\alpha$  的 MDBK 细胞对 LSDV 增殖的影响，采用 TCID<sub>50</sub>、qPCR、Western blot 检测了 LSDV 在野生型细胞系和敲除细胞系中的增殖情况。如图 4A 和 4B 所示，敲除细胞系中病毒滴度在 96 h 时稳定在  $10^6$  TCID<sub>50</sub>/mL，而野生型细胞系中病毒滴度在 96 h 时稳定在  $10^{4.9}$  TCID<sub>50</sub>/mL；不同时间点，敲除细胞系样品中病毒的 TCID<sub>50</sub> 和基因拷贝数均高于野

生型细胞系。图 4C 和 4D 结果显示，在感染病毒后 48、72 和 96 h 敲除细胞系样品中的蛋白表达量明显高于野生型细胞系，说明 MDBK 中 IFN- $\alpha$  敲除促进了 LSDV 增殖，提高了 LSDV 的病毒滴度。为了更加直观地观察 2 种细胞对于 LSDV 增殖的影响，利用带有红色荧光标签的 rLSDV 分别感染 2 种细胞。结果如图 4E 所示，不同时间点 rLSDV 在敲除细胞系中增殖的荧光信号均强于野生型细胞系。





A. TCID<sub>50</sub>法检测 LSDV 在 MDBK 及其 IFN- $\alpha$  敲除细胞系中的增殖情况; B. qPCR 法检测 LSDV 在 MDBK 及其 IFN- $\alpha$  敲除细胞系中的增殖情况; C. Western blot 法检测 LSDV 在 MDBK 及其 IFN- $\alpha$  敲除细胞系中的增殖情况; D. 图 C 的灰度值分析; E. rLSDV 在 MDBK 及其 IFN- $\alpha$  敲除细胞系中增殖的荧光图 (标尺 = 400  $\mu$ m)。

图 4 IFN- $\alpha$  敲除增强 LSDV 在 MDBK 中的复制水平

### 3 讨论

自 2019 年 LSD 传入我国以来, 不同地区均出现了 LSD 疫情, 这些毒株与最初报道的 LSDV XJ201901 毒株在基因组上具有高度的同源性, 因此成为我国目前主要的流行毒株<sup>[23,26,29-30]</sup>。广泛使用适当的疫苗是预防和根除该病毒的关键。目前, 大多数市面上销售的是 LSDV 减毒活疫苗。然而, 使用同源增强的 LSD 疫苗进行免疫后, 动物可能会出现一些不良反应, 如接种部位的过敏反应、典型的皮肤结节以及泌乳的减少等<sup>[8]</sup>。因此, 在疫苗生产工艺等方面亟待改进和提升, 其中提高病毒滴度对于降低生产成本和提高疫苗免疫保护效果尤为关键。然而, 我国目前流行毒株在不同细胞系中的适应性较差<sup>[31-33]</sup>, 病毒滴度均保持在  $10^5$  TCID<sub>50</sub>/mL 的较低水平<sup>[24-26]</sup>, 这给病毒扩增、纯化以及作为疫苗株的生产带来诸多挑战。综上所述, 针对 LSDV 在我国流行毒株的低毒价问题, 需要采取一系列策略来提高病毒的扩增效率、纯度和产量。这不仅有助于推动 LSDV 的基础研究工作, 还可以降低疫苗生产成本, 为防控 LSD 疫情提供有力支持。

本研究对 LSDV XJ201901 毒株在不同细胞系 (BHK-21、A549 和 MDBK) 中的增殖情况进行了对比, 从病毒滴度、基因拷贝数和荧光强度三个方面对比发现 LSDV 在 MDBK 细胞中增殖时能达到相对较高的病毒滴度。先前研究也表明, MDBK 细胞系是增殖和研究牛结节性皮肤病病毒的合适选择<sup>[27]</sup>。然而, 尽管如此, 利用 MDBK 细胞系扩增的 LSDV 毒价仍然未能达到理想水平<sup>[27]</sup>。研究表明 IFN- $\alpha$  通路在宿主防御痘病毒感染中的关键作用<sup>[22]</sup>。为了更深入地理

解这一机制, 研究人员利用 CRISPR/Cas9 技术来敲除宿主细胞中的 IFN- $\alpha$  通路相关基因<sup>[34-36]</sup>, 从而探究这些基因在病毒感染过程中的作用。通过该研究方法有望揭示病毒感染与宿主细胞 IFN- $\alpha$  通路之间的复杂关系, 为未来的病毒防治和免疫治疗提供重要的理论依据。本研究采用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术, 成功构建了 IFN- $\alpha$  基因敲除 MDBK 细胞系。随后通过 qPCR、TCID<sub>50</sub> 和 Western blot 试验, 验证了 IFN- $\alpha$  敲除 MDBK 细胞系对 LSDV XJ201901 毒株增殖的显著促进作用。以往研究发现, 无论是野生型毒株还是疫苗毒株, 在感染 MDBK 细胞 96 h 病毒滴度达到最高峰, 随后开始下降, 但是能够稳定保持在 96 h 时的病毒滴度水平<sup>[24-25,27]</sup>。本试验结果显示, 将 MOI = 0.01 的 LSDV XJ201901 接种于 MDBK 细胞 96 h 后滴度达到  $10^{4.9}$  TCID<sub>50</sub>/mL, 符合以往研究结果<sup>[24-27]</sup>; 而 IFN- $\alpha$  敲除细胞系中的病毒滴度在 96 h 达到  $10^6$  TCID<sub>50</sub>/mL, 显著高于野生型细胞系, 说明 IFN- $\alpha$  敲除细胞系显著促进了 LSDV 的增殖, 表明 IFN- $\alpha$  在抑制病毒增殖中发挥重要作用, 这一发现为 LSDV 疫苗的优化提供了新思路。

### 参考文献:

- [1] TUPPURAINEN E S M, OURA C A L. Review: lumpy skin disease: an emerging threat to Europe, the middle east and Asia [J]. *Transbound Emerg Dis*, 2012, 59 (1): 40-48.
- [2] BABIUK S, BOWDEN T R, BOYLE D B, et al. Capripoxviruses: an emerging worldwide threat to sheep, goats and cattle [J]. *Transbound Emerg Dis*, 2008, 55 (7): 263-272.
- [3] 袁丽萍, 宋建德. 2013—2016 年全球牛结节性皮肤病流行状况分析 [J]. *中国动物检疫*, 2017, 34 (9): 19-22, 49.
- [4] LU G, XIE J, LUO J, et al. Lumpy skin disease outbreaks in Chi-

- na, since 3 August 2019 [J]. *Transbound Emerg Dis*, 2021, 68 (2): 216–219.
- [5] 何菊, 罗元宇. 牛结节性皮肤病疫苗研究进展 [J]. *中国奶牛*, 2024 (6): 27–31.
- [6] VAN SCHALKWYK A, BYADOVSKAYA O, SHUMILOVA I, et al. Estimating evolutionary changes between highly passaged and original parental lumpy skin disease virus strains [J]. *Transbound Emerg Dis*, 2022, 69 (4): e486–e496.
- [7] MOUDGIL G, CHADHA J, KHULLAR L, et al. Lumpy skin disease: insights into current status and geographical expansion of a transboundary viral disease [J]. *Microb Pathog*, 2024, 186: 106485.
- [8] TUPPURAINEN E, DIETZE K, WOLFF J, et al. Review: vaccines and vaccination against lumpy skin disease [J]. *Vaccines*, 2021, 9 (10): 1136.
- [9] ES-SADEQY Y, BAMOUH Z, ENNAHLI A, et al. Development of an inactivated combined vaccine for protection of cattle against lumpy skin disease and bluetongue viruses [J]. *Vet Microbiol*, 2021, 256: 109046.
- [10] MATSIELA M S, NAICKER L, DIBAKWANE V S, et al. Improved safety profile of inactivated Neethling strain of the Lumpy Skin Disease Vaccine [J]. *Vaccine X*, 2022, 12: 100209.
- [11] DOUGLASS N, MUNYANDUKI H, OMAR R, et al. Influence of the viral superoxide dismutase (SOD) homologue on lumpy skin disease virus (LSDV) growth, histopathology and pathogenicity [J]. *Vaccines*, 2020, 8 (4): 664.
- [12] MERTEN O W. Virus contaminations of cell cultures – A biotechnological view [J]. *Cytotechnology*, 2002, 39 (2): 91–116.
- [13] HOUSE J A, WILSON T M, EL NAKASHLY S, et al. The isolation of lumpy skin disease virus and bovine herpesvirus-4 from cattle in Egypt [J]. *J Vet Diagn Invest*, 1990, 2 (2): 111–115.
- [14] BINPAL Y S, ONGADI F A, CHEPKWONY J C. Alternative cell lines for the propagation of lumpy skin disease virus [J]. *Onderstepoort J Vet Res*, 2001, 68 (2): 151–153.
- [15] BARBAS A S. *Kidney transplantation, bioengineering, and regeneration: kidney transplantation in the regenerative medicine era* Edited by Giuseppe Orlando Giuseppe Remuzzi David Williams London, UK: Academic Press, 2017, 1252 pages [J]. *Am J Transplant*, 2020, 20 (2): 610.
- [16] KIESSLICH S, KAMEN A A. Vero cell upstream bioprocess development for the production of viral vectors and vaccines [J]. *Bio-technol Adv*, 2020, 44: 107608.
- [17] GARI G, ABIE G, GIZAW D, et al. Evaluation of the safety, immunogenicity and efficacy of three capripoxvirus vaccine strains against lumpy skin disease virus [J]. *Vaccine*, 2015, 33 (28): 3256–3261.
- [18] ZEIN ELABDEEN MAHMOUD A, IBRAHIM KHALAFALLA A, MAGZOB ABDELLATIF M. An epidemiological study of sheep and goat pox outbreaks in the Sudan [J]. *Food Biol*, 2016, 5: 1–5.
- [19] QUINTANA M E, CARDOSO N P, PEREYRA R, et al. Interferon lambda protects cattle against bovine viral diarrhoea virus infection [J]. *Vet Immunol Immunopathol*, 2020, 230: 110145.
- [20] LEAMAN D W, ROBERTS R M. Genes for the trophoblast interferons in sheep, goat, and musk ox and distribution of related genes among mammals [J]. *J Interferon Res*, 1992, 12 (1): 1–11.
- [21] ZEUZEM S. Heterogeneous virologic response rates to interferon-based therapy in patients with chronic hepatitis C: who responds less well [J]. *Ann Intern Med*, 2004, 140 (5): 370–381.
- [22] SCHOGGINS J W, MACDUFF D A, IMANAKA N, et al. Pan-viral specificity of IFN-induced genes reveals new roles for cGAS in innate immunity [J]. *Nature*, 2014, 505 (7485): 691–695.
- [23] LI L, WANG Z, QI C, et al. Genetic analysis of genome sequence characteristics of two lumpy skin disease viruses isolated from China [J]. *BMC Vet Res*, 2022, 18 (1): 426.
- [24] MA J, YUAN Y, SHAO J, et al. Genomic characterization of lumpy skin disease virus in Southern China [J]. *Transbound Emerg Dis*, 2022, 69 (5): 2788–2799.
- [25] 周祉玉, 杜吉革, 莘若兰, 等. 中国三株牛结节性皮肤病病毒的分离鉴定及其 GPCR 基因分析 [J]. *畜牧兽医学报*, 2024, 55 (12): 5620–5630.
- [26] WANG J, XU Z, WANG Z, et al. Isolation, identification and phylogenetic analysis of lumpy skin disease virus strain of outbreak in Guangdong, China [J]. *Transbound Emerg Dis*, 2022, 69 (5): e2291–e2301.
- [27] FAY P C, COOK C G, WIJESIRIWARDANA N, et al. Madin-Darby bovine kidney (MDBK) cells are a suitable cell line for the propagation and study of the bovine poxvirus lumpy skin disease virus [J]. *J Virol Meth*, 2020, 285: 113943.
- [28] 伍子昂, 南文龙, 吴晓东, 等. 牛结节性皮肤病病毒 TaqMan 实时荧光定量 PCR 方法的建立与应用 [J]. *畜牧与兽医*, 2022, 54 (11): 100–105.
- [29] WEI Y R, MA W G, WANG P, et al. Retrospective genomic analysis of the first Lumpy skin disease virus outbreak in China (2019) [J]. *Front Vet Sci*, 2022, 9: 1073648.
- [30] REN S, CHEN H, YUAN L, et al. Phylogenetic and pathogenic characterization of lumpy skin disease virus circulating in China [J]. *Virology*, 2023, 585: 127–138.
- [31] RHAZI H, SAFINI N, MIKOU K, et al. Comparative sensitivity study of primary cells, Vero, OA3. Ts and ESH-L cell lines to lumpy skin disease, sheeppox, and goatpox viruses detection and growth [J]. *J Virol Methods*, 2021, 293: 114164.
- [32] HOSAMANI M, NANDI S, MONDAL B, et al. A Vero cell-attenuated Goatpox virus provides protection against virulent virus challenge [J]. *Acta Virol*, 2004, 48 (1): 15–21.
- [33] BABIUK S, PARKYN G, COPPS J, et al. Evaluation of an ovine testis cell line (OA3. Ts) for propagation of capripoxvirus isolates and development of an immunostaining technique for viral plaque visualization [J]. *J Vet Diagn Invest*, 2007, 19 (5): 486–491.
- [34] 黎嘉豪. 利用 CRISPR/Cas9 技术构建 I 型干扰素受体基因敲除的 Vero 细胞系及其对 PEDV 增殖特性影响的研究 [D]. 广州: 华南农业大学, 2018.
- [35] 邵科宇, 张爽, 段利芳, 等. 猪肾上皮细胞 I 型干扰素受体 1 敲除对伪狂犬病毒复制的影响 [J]. *解剖学报*, 2019, 50 (6): 741–746.
- [36] 邵科宇. I 型干扰素受体 1 (IFNAR1) 基因敲除猪肾上皮细胞系构建 [D]. 郑州: 河南农业大学, 2019.