

董钰蓓, 郭承意, 吴雨晴, 等. CRISPR/Cas9 介导的 Bcl2l1 基因敲除细胞系的建立及对塞内卡病毒复制的影响 [J]. 畜牧与兽医, 2025, 57 (10): 116-122.

DONG Y B, GUO C Y, WU Y Q, et al. Establishment of CRISPR/Cas9-mediated Bcl2l1 knockout cell lines and their effect on Senecavirus replication [J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2025, 57 (10): 116-122.

CRISPR/Cas9 介导的 Bcl2l1 基因敲除细胞系的建立及对塞内卡病毒复制的影响

董钰蓓, 郭承意, 吴雨晴, 马梓承, 蒋珽, 高雁妮, 姜平, 白娟*

(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, 江苏 南京 210014)

摘要: 基于 CRISPR/Cas9 基因编辑平台, 对仓鼠肾细胞 (BHK-21) 及猪睾丸细胞 (ST) 这 2 种细胞系实施 Bcl2l1 基因定向敲除, 为探究 B 细胞淋巴瘤 2 类似蛋白 1 (Bcl2l1) 基因编码的 Bcl-xL 蛋白在塞内卡病毒 A (SVA) 感染鼠源和猪源细胞中的作用及分子机制提供试验材料。首先设计并合成 5 条靶向 Bcl2l1 基因的 sgRNA, 分别连接到慢病毒载体 Lenti CRISPR v2 上; 将构建好的慢病毒质粒转染至人胚胎肾细胞 (HEK293T), 获得重组慢病毒并感染 BHK-21 和 ST 细胞; 再经嘌呤霉素筛选和有限稀释法获得 Bcl2l1 基因敲除的细胞株; 通过实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 和 Western blot 验证 Bcl2l1 基因的敲除情况; 通过 CCK8 法分别检测 Bcl2l1 基因敲除对 BHK-21 和 ST 细胞活性的影响。结果: 筛选得到 5 株 Bcl2l1 基因缺失的细胞系, 即 3 株 Bcl2l1 基因敲除鼠源细胞系 (Bcl2l1^{-/-}BHK-21) 和 2 株 Bcl2l1 基因敲除猪源细胞系 (Bcl2l1^{-/-}ST); RT-qPCR 及 Western blot 结果显示, 与野生型细胞系相比, Bcl2l1 基因敲除细胞系的 mRNA 和蛋白表达水平均显著降低 ($P < 0.001$); CCK8 试验结果显示, Bcl2l1 基因敲除的 BHK-21 细胞系在增殖能力方面与野生型相比未出现明显变化。在 ST 细胞系中, Bcl2l1 基因的缺失导致了显著的增殖能力下降, 与野生型 ST 细胞形成鲜明对比; Western blot 和 RT-qPCR 试验均显示, Bcl2l1 基因敲除后显著抑制了 SVA 的增殖 ($P < 0.0001$)。综上, 本研究利用 CRISPR/Cas9 系统成功构建了敲除 Bcl2l1 基因的 BHK-21 细胞系和 ST 细胞系, 并证实 Bcl2l1 基因在 SVA 复制中发挥着重要作用, 为深入研究 Bcl2l1 基因的功能提供了理想的细胞模型。

关键词: Bcl2l1 基因; 基因敲除; BHK-21 细胞; ST 细胞; 塞内卡病毒 A

中图分类号: S852.65 文献标志码: A 文章编号: 0529-5130(2025)10-0116-07

Establishment of CRISPR/Cas9-mediated Bcl2l1 knockout cell lines and their effect on Senecavirus replication

DONG Yubei, GUO Chengyi, WU Yuqing, MA Zicheng, JIANG Ting,
GAO Yanni, JIANG Ping, BAI Juan*

(College of Veterinary Medicine, Nanjing Agricultural University/Key Laboratory of Animal Bacteriology,
Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Nanjing 210014, China)

Abstract: In this study, targeted knockdown of Bcl2l1 gene was implemented in BHK-21 (hamster kidney cells) and ST (porcine testis cells) cell lines based on the CRISPR/Cas9 gene editing platform in order to provide experimental materials to investigate the role and molecular mechanism of the Bcl-xL protein (encoded by Bcl2l1 gene) in Senecavirus A (SVA) infection of murine and porcine cells. Firstly, five sgRNAs targeting the Bcl2l1 gene were designed and synthesized, and ligated to the lentiviral vector Lenti CRISPR v2 respectively; and the constructed lentiviral plasmids were transfected into human embryonic kidney cells (HEK293T) to obtain recombinant lentiviruses and were infected with BHK-21 and ST cells. Then, the Bcl2l1 knockdown was obtained using the puromycin screen and limited dilution method. Finally, the cell lines were obtained by puromycin screening and limited dilution, the knockdown of Bcl2l1 gene was verified by RT-qPCR and Western blot, and the effects of Bcl2l1 knockdown on the activity of BHK-21 and ST cells were detected by CCK8 assay, respectively. The results showed that five Bcl2l1 gene-deficient cell lines were obtained from the screening, i. e., three Bcl2l1 knockdown murine-derived cell lines (Bcl2l1^{-/-}BHK-21) and two Bcl2l1 knockdown porcine-derived cell lines (Bcl2l1^{-/-}ST). The RT-qPCR and Western blot

收稿日期: 2025-02-16; 修回日期: 2025-07-20

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: 董钰蓓, 女, 硕士研究生

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

results showed that, compared with the wild-type cell line, the results of RT-qPCR and Western blot showed that the mRNA and protein expression levels of the Bcl2l1 knockdown cell line were significantly reduced, compared with the wild-type cell line ($P < 0.001$). The results of the CCK8 assay showed that the BHK-21 cell line with Bcl2l1 knockdown did not show any significant change in proliferative ability, compared with the wild-type. In ST cell lines, deletion of the Bcl2l1 gene resulted in a significant decrease in proliferative capacity, in contrast to the wild-type ST cells. Both Western blot and RT-qPCR assays showed that Bcl2l1 knockdown significantly inhibited the proliferation of SVA ($P < 0.0001$). In summary, in this study, BHK-21 cell line and ST cell line with knockdown of Bcl2l1 gene were successfully constructed using the CRISPR/Cas9 system and it was confirmed that Bcl2l1 gene played an important role in SVA replication, which might serve as an ideal cell model for in-depth study of the functional mechanism of Bcl2l1 gene.

Keywords: Bcl2l1 gene; gene knock; BHK-21 cells; ST cells; Senecavirus A

塞内卡病毒 A (Senecavirus A, SVA) 在分类学上归属于微 RNA 病毒科 (Picornaviridae), 其病毒粒子呈二十面体对称结构且缺乏脂质包膜。病毒基因组为线性单链正链 RNA (+ssRNA), 全长约 7.3 kb, 具有典型微 RNA 病毒基因组结构特征: 5'端非翻译区 (5'-UTR) 与 3'端非翻译区 (3'-UTR) 分别位于基因组两端, 3'末端携带 poly (A) 尾链, 中央区段为单一开放阅读框 (ORF), 可编码翻译成多聚蛋白前体, 经病毒编码蛋白酶介导的逐级切割最终产生 12 种成熟功能蛋白 (符合“L-4-3-4”结构域划分模式)^[1]。由于 SVA 在传播过程中持续发生遗传变异^[2-3], 现有预防措施 (如疫苗开发) 和抗病毒治疗方案的有效性受到严重挑战。因此, 研究 SVA 与宿主的相互作用尤为重要。

B 细胞淋巴瘤 2 类似蛋白 1 (B-cell lymphoma 2-like protein 1, Bcl2l1) 属于 Bcl-2 蛋白家族, 具有调节细胞凋亡, 即程序性细胞死亡, 促进细胞存活的功能^[4]。Bcl-2 家族的蛋白质通过抑制或促进凋亡来影响细胞的生死, 在细胞增殖、分化以及病毒复制过程中发挥关键作用。可促进分化胰腺细胞与人多能干细胞的存活^[5], 而且 Bcl2l1 对病毒增殖有一定的影响, 不同的病毒及宿主细胞也会有不同的效果, 如乙型肝炎病毒 (HBV)^[6]、丙型肝炎病毒 (HCV)^[7-8]、人类免疫缺陷病毒 (HIV)^[9]、甲型流感病毒 (IAV)^[10-11] 和冠状病毒 (CoV)^[12] 等。本实验室前期研究发现, 通过筛选得到的抗 SVA 药物在抑制 SVA 增殖复制中, 均会使 Bcl2l1 表达下调, 猜想在 SVA 复制中, Bcl2l1 可能发挥某些作用。

本研究基于 CRISPR/Cas9 基因编辑平台, 构建了 Bcl2l1 基因敲除的仓鼠肾细胞 (BHK-21) 和猪睾丸细胞 (ST) 两种哺乳动物细胞系, 通过 Western blot、实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 对 SVA 感染 Bcl2l1 敲除细胞后病毒蛋白的表达水平与病毒基因组的复制水平进行系统性评估。研究结果为深入研究 Bcl2l1 基因的功能机制奠定重要基础, 并且提供可靠的试验平台, 为深入阐明 SVA 的增殖过程及与宿主细胞的关系奠定基础, 对深入解析 SVA 的致病机理

和宿主抗病毒防御机制具有重要的科学价值。

1 材料与方法

1.1 主要试验材料

BHK-21、ST、人类胚胎肾脏细胞 (HEK 293T)、Lenti CRISPR v2 质粒均由本实验室保存; SVA VP1 蛋白单克隆抗体由本实验室制备; SVA 毒株 SVV-CH-SD (GenBank: MH779611) 为本实验室分离。Bcl-xL、actin、不同种属的二抗均购自 Proteintech 公司; DH5 α 购自吐露港生物科技股份有限公司; T4 PNK、BsmBI 购自 NEB 公司; T4 DNA 连接酶购自赛默飞世尔科技; 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; DNA 提取试剂盒购自 Omega 公司; PEI 购自翌圣生物科技 (上海) 股份有限公司; CCK-8 试剂盒购自碧云天生物科技股份有限公司; 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 均购自诺唯赞生物科技股份有限公司; DMEM 培养基和胎牛血清均购自 Gibco 公司。

1.2 慢病毒质粒 (Lenti CRISPR-Bcl2l1-sgRNA) 构建

1.2.1 设计 sgRNA 序列

在 NCBI 网站上查找仓鼠 (Gene ID: 101834682) 和猪 (Gene ID: 397536) Bcl2l1 基因编码区 (CDS) 序列; 通过 Benchling 网站 (<https://benchling.com/>) 输入 Bcl2l1 基因的 CDS 序列, 设计靶向 Bcl2l1 的 sgRNA, 根据 sgRNA 序列加入酶切位点, 形成最终引物序列, 详见表 1。引物由金斯瑞生物科技股份有限公司负责合成。

1.2.2 sgRNA 退火

退火体系为: Bcl2l1-CRISPR 上下游引物 (100 $\mu\text{mol/L}$) 各 1.25 μL , 10 \times T4 Ligation Buffer 2 μL , T4 PNK (NEB) 0.5 μL , ddH₂O 15 μL 。体系涡旋离心后, 以 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 60 min, 95 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 5 min, 随后以 5 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 速率冷却至 10 $^{\circ}\text{C}$ 的程序在 PCR 仪中进行 sgRNA 退火。

表 1 引物信息

| 引物名称 | 引物序列 (5' → 3') |
|-----------------------|---------------------------|
| mus-Bcl2l1-1_CRISPR-F | CACCGTCAGAGCAACCGGGAGCTAG |
| mus-Bcl2l1-1_CRISPR-R | AAACCTAGCTCCCGGTTGCTCTGAC |
| mus-Bcl2l1-2_CRISPR-F | CACCGGAGTCGGATTGCAAGTTGGA |
| mus-Bcl2l1-2_CRISPR-R | AAACTCCAACCTGCAATCCGACTCC |
| mus-Bcl2l1-3_CRISPR-F | CACCGCCATCAATGGCAACCCATCC |
| mus-Bcl2l1-3_CRISPR-R | AAACGGATGGGTTGCCATTGATGGC |
| sus-Bcl2l1-1_CRISPR-F | CACCGGAAAGTCAACCACCAGCTCC |
| sus-Bcl2l1-1_CRISPR-R | AAACGGAGCTGGTGGTTGACTTTC |
| sus-Bcl2l1-2_CRISPR-F | CACCGTCAGAGCAACCGGGAGCTGG |
| sus-Bcl2l1-2_CRISPR-R | AAACCCAGCTCCCGGTTGCTCTGAC |
| Bcl2l1-F | AGGCAGGCAGAGTTACCGGC |
| Bcl2l1-R | ATTGAGGTAGGTGGCCATCC |

1.2.3 Lenti CRISPR v2 载体线性化

使用 *BsmBi* 高保真酶对载体进行酶切, 酶切体系为: Lenti CRISPR v2 质粒 (19 μ L) 4 μ g, *BsmBi* 高保真酶 1 μ L, 10 \times NEB Buffer 4 μ L, ddH₂O 16 μ L。55 $^{\circ}$ C 酶切消化 3 h。使用胶回收试剂盒对核酸电泳得到的 Lenti CRISPR v2 的胶块进行纯化回收。

1.2.4 载体连接

连接反应体系如下: Lenti CRISPR v2 线性片段 2.3 μ L, sgRNA 退火片段 2 μ L, 10 \times T4 DNA Ligase Buffer 1 μ L, T4 DNA Ligase 1 μ L, ddH₂O 3.7 μ L。连接反应完成后, 通过热激转化法将重组质粒导入 DH5 α 感受态细胞, 随后均匀涂布于含氨苄青霉素 (Amp) 的 LB 固体培养基平板, 37 $^{\circ}$ C 孵育 12~16 h。挑取单克隆菌落进行扩大培养, 并采用菌落特异性 PCR 扩增筛选策略, 对呈现预期扩增条带的候选菌株进行 Sanger 测序验证。最终获得 sgRNA 靶向序列完全匹配的重组质粒, 按照种属的不同对其进行命名。

1.3 慢病毒包装与收集纯化

使用 psPAX2、Lenti CRISPR-Bcl2l1-sgRNA 和 pMD2.G 质粒 (1:1:1) 与 PEI 以 1 μ g:3 μ L 的比例转染进 HEK293T 细胞后, 48 h 后收集慢病毒, -40 $^{\circ}$ C 冻存备用。

1.4 BHK-21 和 ST 细胞耐受嘌呤霉素最佳浓度的筛选

将 1×10^5 的 BHK-21/ST 细胞铺入 12 孔板中, 置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 的培养箱内培养, 当 BHK-21 细胞和 ST 细胞的细胞密度达到 70% 时, 分别加入含嘌呤霉素的完全培养基 (浓度为 0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 μ g/mL)。24 h 后, 将细胞死亡率高

于 95% 时所使用的嘌呤霉素浓度作为最佳药物筛选浓度。

1.5 慢病毒转导的 Bcl2l1 稳定敲除的 BHK-21 和 ST 细胞系构建

将经慢病毒载体转导的 BHK-21/ST 细胞以适宜密度接种于 6 孔培养板中, 同时设立未经病毒处理的 BHK-21 和 ST 细胞作为平行对照。转导 24 h 后, 更换添加有 4 μ g/mL 嘌呤霉素的完全培养基 (DMEM+10% FBS), 置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 条件下进行为期 48~72 h 的药物筛选。待对照组的细胞存活率降至零后, 对成功转导的 BHK-21 和 ST 细胞进行常规传代操作, 采用有限稀释法分离单克隆细胞群, 并将其转移至 96 孔板中进行单克隆扩增培养。最终通过基因组测序验证 Bcl2l1 基因编辑效率, 筛选获得基因敲除效率达标的 BHK-21/ST 细胞系, 并进行大规模扩增以建立稳定的细胞系。

1.6 敲除 Bcl2l1 基因的 BHK-21 和 ST 细胞系的鉴定

1.6.1 Western blot 分析

将 Bcl2l1^{-/-}BHK-21、BHK-21、Bcl2l1^{-/-}ST 和 ST 细胞按试验需求铺入 12 孔培养板中。采用 SDS-PAGE 分离制备蛋白样品, 电泳条件为 80 V 30 min, 120 V 90 min; 转膜条件为 23 V 45 min。PBST 溶液稀释的 5% 脱脂乳室温封闭 2 h。用 1:5 000 稀释的 Bcl-xL 抗体 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜; 再用兔源二抗室温孵育 1 h。利用化学发光底物进行测定, 并借助高分辨率成像设备对样本进行扫描和图像捕捉。

1.6.2 RT-qPCR

在 37 $^{\circ}$ C 恒温、5% CO₂ 的培养箱中, 分别接种 Bcl2l1^{-/-}BHK-21、BHK-21、Bcl2l1^{-/-}ST 和 ST 细胞。加入 350 μ L TRK 溶液裂解细胞, 提取 RNA 并进行反转录获得 cDNA。通过 RT-qPCR 检测其 mRNA 水平的变化, 得到的数据通过 GraphPad Prism 8.0.2 进行分析。引物序列见表 2。

表 2 qPCR 引物信息

| 引物名称 | 引物序列 (5' → 3') |
|----------------|--------------------------|
| mBcl2l1-q-F1 | TGTGGCCTTTTCTCCTTCG |
| mBcl2l1-q-R1 | AACTTGAATCCGACTGACC |
| SVA VP1-qPCR-F | CACCGACAACGCCGAGAC |
| SVA VP1-qPCR-R | GAGATCGATCAAACAGGAAGTTCG |
| sBcl2l1-q-F1 | GGGAGCTGGTGGTTGACTTT |
| sBcl2l1-q-R1 | CTTCTGGGGCCTCAGTCTCG |

1.7 敲除 Bcl2l1 基因对 SVA 复制的影响

1.7.1 病毒基因组拷贝数的测定

将感染比 (MOI) = 0.01 的 SVA 分别感染上述细胞, 每组设置 3 个重复。在感染 24 h 后, 提取病毒 RNA 并进行逆转录反应, RT-qPCR 检测计算病毒基因拷贝数。具体引物信息参见表 2。

1.7.2 病毒蛋白表达量的测定

将 MOI=0.01 的 SVA 分别感染上述细胞, 每组设置 3 个重复, 在感染 24 h 后, 对细胞进行裂解处理。将细胞裂解处理得到的样品进行 Western blot, 分析 SVA 结构蛋白 VP1 的表达水平。

1.8 细胞活性检测

收集 Bcl2l1^{-/-}BHK-21 细胞、野生型 BHK-21 细胞、Bcl2l1^{-/-}ST 细胞和野生型 ST 细胞, 以 1×10^4 的密度分别铺板至 96 孔细胞培养板中进行培养, 应用 CCK-8 细胞增殖检测试剂盒连续 3 d 动态监测细胞增殖活性, 每 24 h 用酶标仪测定 450 nm 处 OD 值进行定量分析。分析数据, 计算细胞存活率, 通过细胞存活率评价敲除 Bcl2l1 基因对 BHK 细胞和 ST 细胞生长的影响。

1.9 数据统计学和分析

所有试验均经过 3 次独立生物学重复验证, 数据结果以“平均数 ± 标准差”表示。借助 GraphPad Prism 8.0.2 软件对数据进行处理分析。组间差异显著性评估采用双尾 Student's *t* 检验方法 ($\alpha=0.05$)。

2 结果

2.1 Lenti CRISPR-Bcl2l1-sgRNA 的构建与验证

将设计好的 sgRNA 引物退火成双链, 与使用 *BsmBi* 酶切得到的 Lenti CRISPR v2 (图 1 A) 在 16 °C 连接过夜, 之后进行转化涂板。待琼脂平板内单克隆菌落出现, 将其置于加入 Amp 的 LB 培养基中, 摇床培养 6 h, 通过 U6 引物和设计得到的 sgRNA 下游引物进行菌液 PCR 扩增检测目的片段大小。核酸电泳结果显示, 与预期的条带大小 (252 bp) 一致 (图 1 B)。对提取的质粒进行测序鉴定, 目的基因正确, 将其按照种属进行命名, 鼠源为: L-m-B-sg1、L-m-B-sg2 和 L-m-B-sg3; 猪源为 L-s-B-sg1 和 L-s-B-sg2。

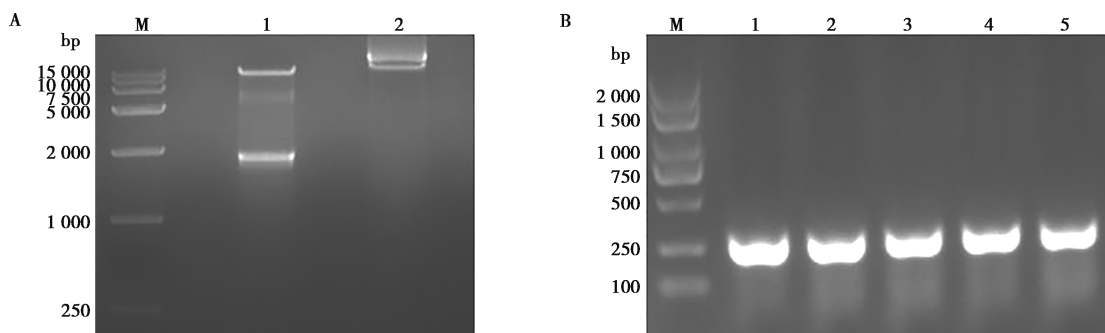


图 1 Lenti CRISPR-Bcl2l1-sgRNA 的电泳结果
A. Lenti CRISPR-v2 酶切, 其中: M 为 DNA 分子量标准 (DL15000), 1 为 Lenti CRISPER v2 digested *BsmBi*, 2 为 Lenti CRISPER -v2 空载;
B. sgRNA PCR 检测, 其中: M 为 DNA 分子量标准 (DL2000), 1~3 分别为 L-m-B-sg1~3, 4~5 分别为 L-s-B-sg1~2。

图 1 Lenti CRISPR-Bcl2l1-sgRNA 的电泳结果

2.2 Bcl2l1 基因 sgRNA 载体敲除效果验证

2.2.1 Western blot 分析

利用 PEI 将 L-m-B-sg1、L-m-B-sg2、L-m-B-sg3、L-s-B-sg1 和 L-s-B-sg2 表达质粒转染进 HEK 293T 中, 48 h 后获得重组慢病毒, 分别感染 BHK-21/ST 细胞 1 d, 之后使用 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 嘌呤霉素进行筛选。对筛选得到的细胞进行 Western blot 验证。如图 2A 所示, 与野生型 BHK-21 细胞系和野生型 ST 细胞系相比, 经慢病毒感染后的 BHK-21 细胞和 ST 细胞内, Bcl2l1 基因编码的 Bcl-xL 蛋白表达水平降低, 证明 L-m-B-sg1、L-m-B-sg2、L-m-B-sg3、L-s-B-sg1 和 L-s-B-sg2 均发挥作用, 其中 L-m-B-sg1

和 L-s-B-sg1 的敲降效果尤为明显。

2.2.2 RT-qPCR

选取 CRISPR/Cas9 系统介导的 L-m-B-sg1 与 L-s-B-sg1 重组慢病毒转导组 (敲除效率最优组), 加入 700 μL TRK 细胞裂解缓冲液进行样本前处理。通过 RNA 提取试剂盒提取总 RNA 并完成 cDNA 文库构建。采用 RT-qPCR 技术检测靶基因 (Bcl2l1) 转录本丰度变化。如图 2B 所示, 相较于野生型 BHK-21 与 ST 细胞对照组, 慢病毒转导组的 BHK-21 细胞内 Bcl2l1 基因转录水平显著降低 ($P < 0.001$), ST 细胞内 Bcl2l1 基因转录水平极显著降低 ($P < 0.0001$), 证实上述 sgRNA 组合可有效介导 BHK-21 及 ST 细胞

系中 Bcl211 基因的特异性敲除。

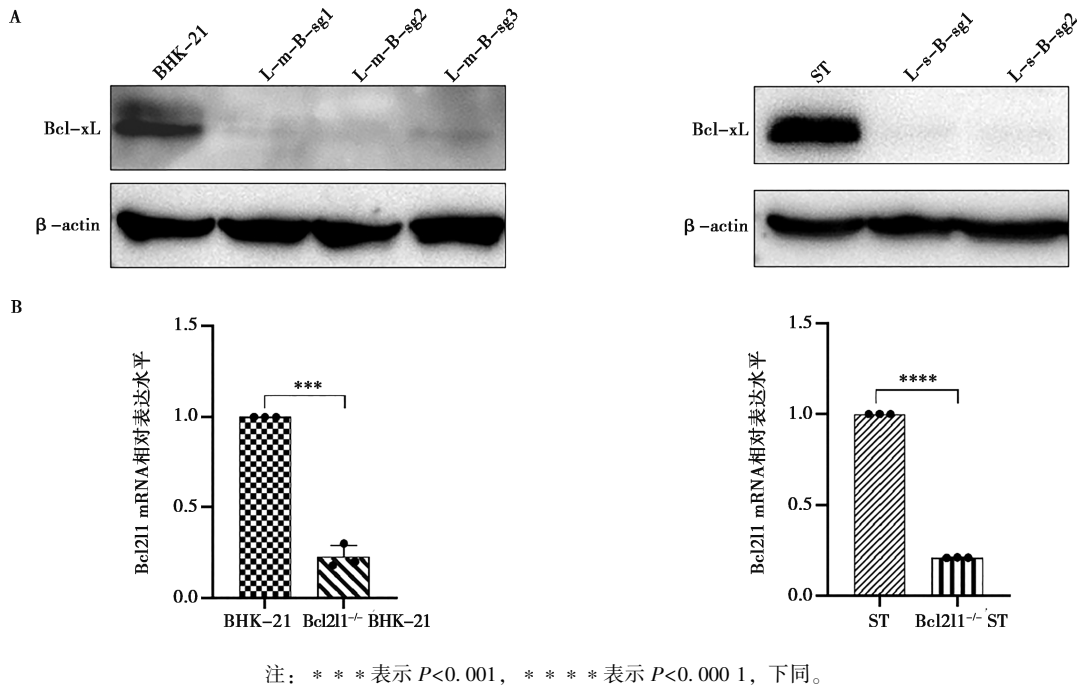
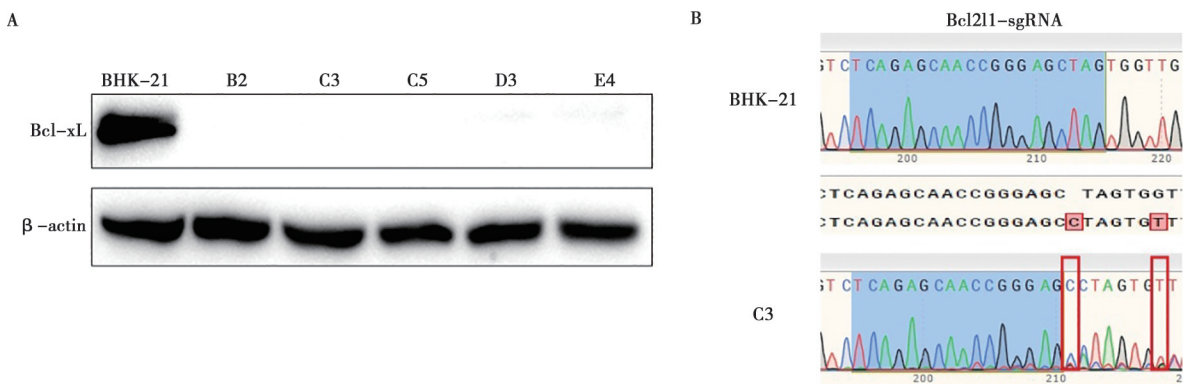


图 2 sgRNA 敲除 Bcl211 后 BHK-21/ST 细胞中 Bcl-xL 蛋白 (A) 和 Bcl211 mRNA (B) 表达水平

2.3 Bcl211 敲除单克隆株的鉴定

对亚克隆筛选得到的 Bcl211^{-/-} BHK-21 细胞和 BHK-21 细胞分别进行裂解处理, 通过 Western blot 检测细胞中 Bcl211 基因编码的 Bcl-xL 蛋白表达水平。结果显示, 挑取的 5 株 Bcl211^{-/-} BHK-21 单克隆细胞株中均未检测到 Bcl211 蛋白 (图 3A)。进一步选取

C3 单克隆株提取基因组 DNA, 利用 Bcl211-F 和 Bcl211-R 进行 PCR 扩增, 经 Sanger 测序及序列比对分析发现: Bcl211^{-/-} BHK-21 细胞 C3 株基因组靶向区域插入了 1 个碱基, 且有 1 个碱基发生突变, 成功获得了 1 株 Bcl211 基因敲除鼠源细胞系 (图 3B)。



A. Western blot 检测 Bcl211 蛋白表达; B. C3 细胞株基因测序。

图 3 Bcl211 敲除细胞系的鉴定

2.4 BHK-21 与 Bcl211^{-/-} BHK-21、ST 与 Bcl211^{-/-} ST 细胞增殖速度的比较

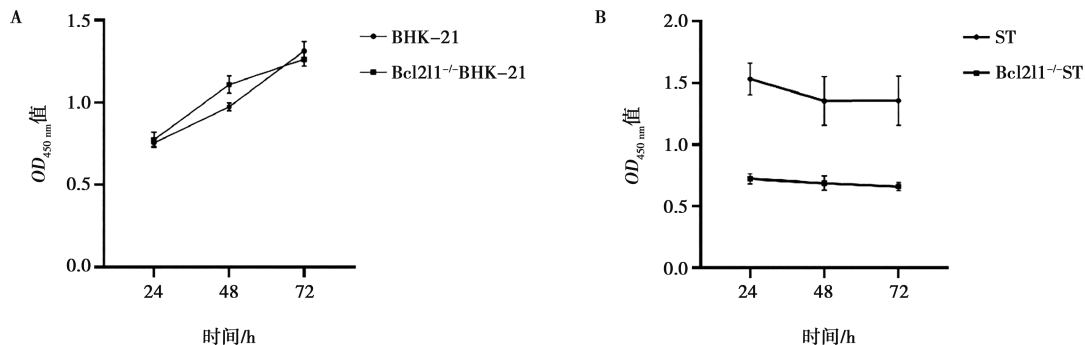
应用 CCK-8 细胞增殖检测试剂盒连续 3 d 动态监测细胞增殖活性, 每 24 h 测定 $OD_{450\text{nm}}$ 值进行定量分析。结果显示, Bcl211^{-/-} BHK-21 细胞与野生型

BHK-21 细胞的生长速度未观察到显著差异 (图 4A), 表明 Bcl211 基因敲除后未对 BHK-21 细胞的正常增殖功能产生显著影响。

与未经过基因改造的原始 ST 细胞系相比较, 经 Bcl211 基因编辑处理的 ST 细胞系在体外培养过程中,

其增殖动力学参数呈现出统计学意义上的显著差异。具体而言，通过 CRISPR/Cas9 介导的靶向基因缺失试验组，单位时间内的细胞密度增幅亦未达到野生型基准水平，采用 CCK-8 法检测其细胞活性，发现敲

除细胞活性低于 65% (图 4B)，并且这种生长表型的改变在连续传代培养中持续存在。提示该基因的缺失可能通过影响细胞周期调控网络，导致 G1/S 检测点激活阈值发生根本性改变，不宜进行后续试验。



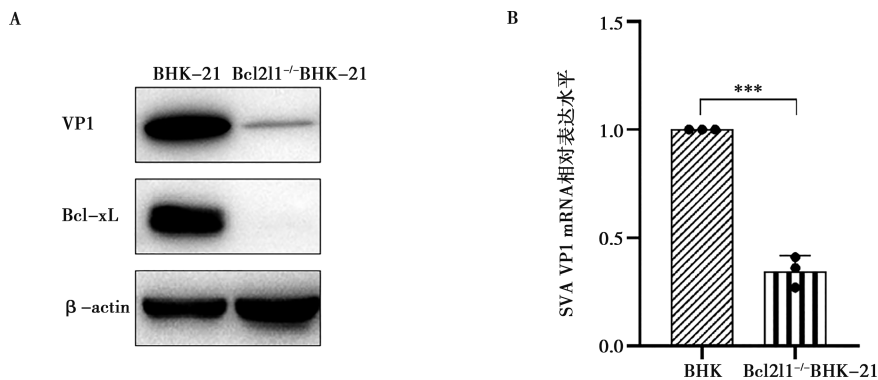
A. 野生型 BHK-21 细胞与 Bcl211^{-/-}BHK-21; B. 野生型 ST 细胞与 Bcl211^{-/-}ST。

图 4 CCK8 细胞活力检测

2.5 检测敲除 Bcl211 基因对 SVA 复制的影响

结果显示，野生型 BHK-21 细胞中 VP1 蛋白表达量明显高于 Bcl211^{-/-}BHK-21 细胞 (图 5A)，并且

野生型 BHK-21 细胞中 SVA 基因组复制水平也显著高于 Bcl211^{-/-}BHK-21 细胞 (图 5B)。



A. Western blot 检测病毒蛋白 VP1 的表达; B. RT-qPCR 检测病毒 VP1 基因 mRNA 水平。

图 5 敲除 Bcl211 对 SVA 增殖的影响

3 讨论

Bcl211 是 Bcl-2 蛋白家族的一员，Bcl-2 蛋白家族是一组参与内源性细胞凋亡通路调节的分子。Bcl-2 家族有促凋亡因子和抗凋亡因子两类，Bcl211 编码的 Bcl-xL 蛋白属于抗凋亡蛋白，Bcl-xL 蛋白在病毒复制中起着关键作用。因此，基于 CRISPR/Cas9 基因编辑平台，对 BHK-21 及 ST 细胞系实施 Bcl211 基因定向敲除，为探究 Bcl-xL 蛋白在 SVA 感染鼠源和猪源细胞中的作用及分子机制提供重要物质基础。借助在线工具 Benchling，依据 sgRNA 设计的基本原则，分别设计了 3 条精准靶向鼠源 Bcl211 基因序列的

sgRNA 和 2 条精准靶向猪源 Bcl211 基因序列的 sgRNA。对脱靶效应进行分析，这 5 条 sgRNA 无脱靶现象，表明其具有高度特异性，确保了 Cas9 酶能够精确靶向 Bcl211 蛋白。通过琼脂糖凝胶电泳、测序及 Bcl-xL 蛋白表达水平检测，成功筛选出一个稳定遗传的 Bcl211 基因敲除细胞株，并证实多次传代后细胞增殖功能未受影响，最终获得了 Bcl211 基因敲除的 BHK-21 细胞系。这一成果为深入研究 SVA 的复制机制及其与宿主的相互作用提供了细胞模型。

有研究发现抑制 Bcl-xL 蛋白功能会激活 caspase-3/7，诱导聚合酶-多聚腺苷酸核糖酶 (PARP) 分裂，加速细胞死亡^[13]，但同样能感染卡波氏肉瘤相

关疱疹病毒 (KSHV) 的 BCBL-1 细胞在敲除掉 Bcl-xL 后, 其存活率没有受到太大的影响^[13]。这一发现表明, Bcl2l1 基因可能具有细胞依赖性。本研究探讨了敲除 BHK-21 或 ST 细胞中的 Bcl2l1 基因对细胞存活的影响, 结果显示, Bcl2l1^{-/-}ST 细胞生长速度缓慢及存活率较低, 而 Bcl2l1^{-/-}BHK-21 细胞的活性与正常细胞相比, 没有显著变化。这说明 Bcl2l1 基因存在细胞依赖性, 可能源于不同细胞系中 Bcl2l1 基因的功能特异性或其参与的调控网络的多样性。

研究发现, Bcl2l1 基因编码的 Bcl-xL 蛋白, 其功能会根据病毒的不同产生不同的影响。Kong 等^[14]对 HBV 阳性肝细胞癌 (HCC) 的研究表明, 乙型肝炎病毒的 X 蛋白 (HBX) 可以通过白介素 34 (IL-34) 诱导细胞外调节蛋白激酶 (ERK) 以及信号转导和转录激活因子 3 (STAT3) 通路的活性, 促进骨髓细胞瘤癌基因 (c-Myc) 和 Bcl-xL 的表达。Bcl-xL 的下调可能在细胞内 HCV 感染和发病机制中起重要作用^[7]。另一方面, Bcl-xL 也可能对 HCV 诱导的肿瘤发生负有共同责任。Guo 等^[15]对感染 HCV 的人胎儿干细胞 (hFLSCs) 进行的研究发现, 在感染后期, Bcl-xL 的上调可抵消 HCV 诱导的细胞凋亡, 促进细胞存活。在筛选抗 SVA 药物的过程中, 通过 RNA 测序发现其在抑制 SVA 复制中, 均会使 Bcl2l1 表达下调。因此, Bcl-xL 蛋白可能在 SVA 复制中发挥某些作用。

Bcl-xL 一般抑制病毒的增殖, 但也存在 Bcl-xL 与 HCV 的 HBX 蛋白共同作用影响细胞膜 Ca²⁺ 水平来促进 HCV 复制的方式。本研究检测 SVA 在 Bcl2l1^{-/-}BHK-21 细胞与 BHK-21 细胞中的增殖水平, 结果显示敲除细胞系中胞内的 VP1 蛋白表达量与基因拷贝数均显著降低, 表明 Bcl2l1 基因的缺失抑制了 SVA 的增殖, 这说明 SVA 存在借助 Bcl-xL 蛋白促进自身复制的策略。

本研究基于 CRISPR/Cas9 基因编辑平台, 成功构建了 Bcl2l1 基因敲除的 BHK-21 细胞系, 为解析 Bcl2l1 基因的功能奠定了坚实的细胞模型基础。SVA 感染 Bcl2l1^{-/-}BHK-21 细胞系后, 通过检测病毒 VP1 mRNA 和蛋白表达水平, 初步探究了 Bcl2l1 对 SVA 复制的影响, 但 Bcl2l1 基因抑制 SVA 感染的具体机制还有待研究。在今后的试验中, 将继续利用构建的 Bcl2l1 敲除细胞系去研究 SVA 的复制机制, 为 SVA 感染的防治提供新思路。

参考文献:

[1] ADAMS M J, LEFKOWITZ E J, KING A M Q, et al. Ratification

vote on taxonomic proposals to the International Committee on Taxonomy of Viruses (2016) [J]. Arch Virol, 2016, 161 (10): 2921-2949.

[2] VENKATARAMAN S, PRASAD B V L S, SELVARAJAN R. RNA dependent RNA polymerases: insights from structure, function and evolution [J]. Viruses, 2018, 10 (2): 76.

[3] ZHANG X, XIAO J, BA L, et al. Identification and genomic characterization of the emerging Senecavirus A in southeast China, 2017 [J]. Transbound Emerg Dis, 2018, 65 (2): 297-302.

[4] ADAMS J M, CORY S. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival [J]. Science, 1998, 281 (5381): 1322-1326.

[5] LOO L S W, SOETEDJO A A P, LAU H H, et al. BCL-xL/BCL2L1 is a critical anti-apoptotic protein that promotes the survival of differentiating pancreatic cells from human pluripotent stem cells [J]. Cell Death Dis, 2020, 11 (5): 378.

[6] GENG X, HUANG C, QIN Y, et al. Hepatitis B virus X protein targets Bcl-2 proteins to increase intracellular calcium, required for virus replication and cell death induction [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2012, 109 (45): 18471-18476.

[7] JAVED F, MANZOOR S. HCV non-structural NS4A protein of genotype 3a induces mitochondria mediated death by activating Bax and the caspase cascade [J]. Microb Pathog, 2018, 124: 346-355.

[8] JOYCE M A, WALTERS K A, LAMB S E, et al. HCV induces oxidative and ER stress, and sensitizes infected cells to apoptosis in SCID/Alb - uPA mice [J]. PLoS Pathog, 2009, 5 (2): e1000291.

[9] PETROVAS C, MUELLER Y M, DIMITRIOU I D, et al. HIV-specific CD8⁺ T cells exhibit markedly reduced levels of Bcl-2 and Bcl-xL [J]. J Immunol, 2004, 172 (7): 4444-4453.

[10] KAKKOLA L, DENISOVA O V, TYNELL J, et al. Anticancer compound ABT-263 accelerates apoptosis in virus-infected cells and imbalances cytokine production and lowers survival rates of infected mice [J]. Cell Death Dis, 2013, 4 (7): e742.

[11] LEE S, HIROHAMA M, NOGUCHI M, et al. Influenza a virus infection triggers pyroptosis and apoptosis of respiratory epithelial cells through the type I interferon signaling pathway in a mutually exclusive manner [J]. J Virol, 2018, 92 (14): e00396-18.

[12] YANG Y, XIONG Z, ZHANG S, et al. Bcl-xL inhibits T-cell apoptosis induced by expression of SARS coronavirus E protein in the absence of growth factors [J]. Biochem J, 2005, 392 (Pt 1): 135-143.

[13] MOORE L N, HOLMES D L, SHARMA A, et al. Bcl-xL is required to protect endothelial cells latently infected with KSHV from virus induced intrinsic apoptosis [J]. PLoS Pathog, 2023, 19 (5): e1011385.

[14] KONG F, ZHOU K, ZHU T, et al. Interleukin-34 mediated by hepatitis B virus X protein via CCAAT/enhancer-binding protein α contributes to the proliferation and migration of hepatoma cells [J]. Cell Prolif, 2019, 52 (6): e12703.

[15] GUO X, LIU W L, YANG D, et al. Hepatitis C virus infection induces endoplasmic reticulum stress and apoptosis in human fetal liver stem cells [J]. J Pathol, 2019, 248 (2): 155-163.