

刘吉, 郝思源, 关飞虎, 等. CRISPR/Cas9 基因编辑技术在禽流感病毒研究中的应用进展 [J]. 畜牧与兽医, 2025, 57 (9): 126-132.

LIU J, HAO S Y, GUAN F H, et al. Progress in the application of CRISPR/Cas9 gene editing technology in research on avian influenza virus [J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2025, 57 (9): 126-132.

CRISPR/Cas9 基因编辑技术在禽流感病毒研究中的应用进展

刘吉¹, 郝思源¹, 关飞虎^{1,2}, 宋亚芬¹, 张乾义^{1*}

(1. 中国兽药药品监察所, 北京 102600;

2. 石河子大学动物科技学院, 新疆 石河子 832000)

摘要: CRISPR/Cas9 基因编辑技术是基于原核生物抵御外来病毒及质粒 DNA 适应性免疫系统发展而来的技术, 通过 sgRNA 和 Cas9 核酸酶对 DNA 进行敲除、插入或替换, 以达到对基因组进行编辑的目的, 因其操作简便、高效、特异性强和成本低廉等优点, CRISPR/Cas9 技术在病毒基因组编辑、抗病毒治疗和疫苗开发等多个领域得到了广泛应用。禽流感病毒 (AIV) 因其广泛的宿主范围、高频的毒株变异以及跨物种传播能力, 对全球家禽养殖业和公共卫生造成了重大威胁。近年来, CRISPR/Cas9 技术在 AIV 复制机制研究、宿主因子功能解析以及新型疫苗研发等领域中发挥了重要作用。本文系统梳理了 CRISPR/Cas9 基因编辑技术的发展历程和作用机制, 重点介绍了 CRISPR/Cas9 文库筛选技术的原理及其应用, 并阐述了 CRISPR/Cas9 技术在 AIV 研究中的应用进展, 为 AIV 的研究和疫病防控提供理论支持和技术参考。

关键词: CRISPR/Cas9; 禽流感病毒; 文库筛选; 宿主因子

中图分类号: S855 文献标志码: A 文章编号: 0529-5130(2025)09-0126-07

Progress in the application of CRISPR/Cas9 gene editing technology in research on avian influenza virus

LIU Ji¹, HAO Siyuan¹, GUAN Feihu^{1,2}, SONG Yafen¹, ZHANG Qianyi^{1*}

(1. China Institute of Veterinary Drugs Control, Beijing 102600, China;

2. School of Animal Science and Technology, Shihezi University, Shihezi 832000, China)

Abstract: The CRISPR/Cas9 gene editing technology is developed based on the adaptive immune system of prokaryotes against foreign viruses and plasmid DNA. It uses single guide RNA and the Cas9 nuclease to knockout, or knockin DNA, effectively editing the genome. Due to its simplicity, high efficiency, strong specificity and low cost, CRISPR/Cas9 has been widely applied in various fields, including viral genome editing, antiviral therapy and vaccine development. AIV poses a major threat to the global poultry industry and public health due to its broad host range, high frequency of strain variation, and cross-species transmission capabilities. In recent years, the CRISPR/Cas9 technology has played an important role in the study of AIV replication mechanisms, functional analysis of host factors and research on and development of novel vaccines. This paper systematically reviews the development process and mechanism of the CRISPR/Cas9 gene editing technology, focusing on the principle and application of the CRISPR/Cas9 library screening technology, and its application progress in AIV research. It aims to provide theoretical support and technical reference for AIV research and disease prevention and control.

Keywords: CRISPR/Cas9; AIV; library screening; host factors

禽流感病毒 (AIV) 属于正黏病毒科甲型流感病毒, 是一种单股负链 RNA 病毒, 基因组由 8 个分节段的 RNA 组成, 根据病毒表面血凝素 (HA) 和神经氨酸酶 (NA) 抗原的差异性可将 AIV 分为 18 个 HA 亚型和 11 个 NA 亚型。AIV 由于存在宿主范围广泛、毒株变异频繁、跨物种传播能力强等特点, 使得疫苗

研发和疫病防控尤为困难, 不仅对家禽养殖行业造成巨大损失, 而且给全球公共卫生安全带来重大挑战。

CRISPR/Cas9 基因编辑技术自 2012 年被发现以来, 因其高效、精准和简便的特点, 在生命科学领域得到了广泛应用^[1]。这项技术不仅推动了基因组编辑的发展, 还在治疗包括 β -地中海贫血、镰状细胞贫血等遗传性疾病以及癌症研究方面做出突出贡献^[2], 在农业领域常应用于提高作物抗病性、耐旱性和产量等方面^[3], 在病毒领域的应用主要包括病毒感染机制研究、基因功能研究和新型基因工程疫苗开发等^[4]。由 CRISPR/Cas9 基因编辑技术发展而来

收稿日期: 2024-12-24; 修回日期: 2025-07-14

基金项目: 国家重点研发计划重点专项 (2022YFD1800601)

第一作者: 刘吉, 女, 硕士研究生

* 通信作者: 张乾义, 博士, 正高级兽医师, 从事动物病毒生物

学研究, E-mail: zhangqy114@126.com。

的 CRISPR 文库筛选技术, 依靠高通量测序与生物信息学分析成为大规模基因筛选的最佳方案^[5-7], 尤其是应用于筛选鉴定肿瘤细胞必需基因, 快速筛选潜在的药物靶点或药物耐药性相关基因和揭示病毒复制和传播的分子机制, 为相关研究提供了新方法、新思路。目前, CRISPR/Cas9 基因编辑技术已被广泛应用于对 AIV 复制至关重要的宿主基因、受体和其他细胞成分的研究^[8], 在快速生成重组流感疫苗和新型疫苗方面展现出巨大潜力^[9-10]。本文将详细描述 CRISPR/Cas9 基因编辑技术在 AIV 宿主因子筛选、抗病毒策略、疫苗研发中的研究和应用, 深入认识和理解 CRISPR/Cas9 基因编辑技术在 AIV 研究领域的突破与挑战。

1 CRISPR/Cas9 基因编辑技术

1.1 CRISPR/Cas9 基因编辑技术的发展

1987 年, 日本科学家在大肠杆菌基因序列中偶然发现了一种重复串联间隔序列^[11], 直到 2002 年, Jansen 实验室将这种新型 DNA 序列家族正式命名为“clustered regularly interspaced short palindromic repeats” (CRISPR)^[12]。在后续研究中 Barrangou 等^[13]首次证明 CRISPR 系统在外源 DNA 或者噬菌体入侵细菌时发挥作用, Cas 蛋白可以将外源基因剪切成小片段并整合到自身的基因组中存储, 当噬菌体再次入侵时 Cas 蛋白对其切割。2008 年, Marraffini 等^[14]证明了 Cas 核酸酶介导的 DNA 靶点切割特异性。2011 年, Delcheva 等^[15]发现反式激活 RNA (tracrRNA) 参与指导 CRISPR RNA (crRNA) 的成熟。2012 年, Jennifer 和 Emmanuelle 等^[16]发现了 CRISPR/Cas9 系统, 团队将 tracrRNA 和 crRNA 合并成一条单链向导 RNA (sgRNA), 简化了 CRISPR/Cas9 系统, 至此基于 CRISPR/Cas9 系统的基因编辑工具初见雏形。

2013 年, 科学家将 CRISPR/Cas9 系统从细菌应用到真核细胞中^[17-18], 这一突破标志着 CRISPR/Cas9 技术作为新兴基因编辑工具进入新时代。后续研究对 Cas9 蛋白的特异性和效率不断改进^[19], 还开发出了多种基于 CRISPR/Cas9 系统的衍生技术, 比如 CRISPR 干扰和 CRISPR 激活技术等, 并且利用 CRISPR/Cas9 系统开发高通量文库筛选技术^[20-21]。

1.2 CRISPR/Cas9 基因编辑技术原理

CRISPR/Cas9 系统由 II 型 Cas9 核酸酶和 sgRNA 组成。Cas9 与 sgRNA 形成的复合体能识别带有前间隔序列邻近基序 (PAM) 信息的互补序列, 继而对

DNA 进行特异性切割。CRISPR/Cas9 诱导的 DNA 双链断裂可以通过非同源末端连接 (NHEJ) 的易错过程进行修复, 也可以通过使用同源重组修复 (homologous recombination, HDR) 的途径精确修复。NHEJ 修复过程不依赖任何模板, 直接将双链断裂的末端连接起来, 易产生插入或缺失致使移码突变, 导致目标基因功能丧失, NHEJ 修复机制是基因敲除的重要手段, 但它通常不适用于需要精确插入或替换基因序列的应用, 而 HDR 机制可以引入特定位置的突变或外源序列, 实现基因的精确插入或替换^[12]。

1.3 CRISPR 文库筛选原理

CRISPR 敲除 (CRISPRko) 文库筛选利用机算法设计全基因组 sgRNA 文库并克隆到 CRISPR/Cas9 表达载体构建慢病毒文库, 以低病毒感染复数感染细胞, 保证每个细胞仅进入 1 个慢病毒, 依据试验目的, 采用药物处理、细胞表型或其他压力筛选法, 富集特定表型细胞群体, 构建基因缺失细胞文库, 经高通量测序分析 sgRNA 分布与丰度, 结合生物信息学工具识别与特定表型相关基因, 实现对应基因筛选, 用于鉴定基因生物学功能以及其在细胞及生物学过程中的作用等^[22-23]。CRISPR 激活 (CRISPRa) 文库筛选将无内切酶活性的 dCas9 与转录激活因子融合^[24-25], 再结合靶向基因启动子的 sgRNA 文库开发出可进行基因组规模功能获得性筛选的系统, 筛选方法与敲除文库一致, CRISPR 激活文库筛选可以揭示正常情况下沉默或低表达基因在生物体中的潜在功能与机制, 对于基因组中的一些冗余基因, 在代谢网络中起缓冲作用, 但其单突变表型弱, 难以用基因功能缺失筛选发现, 而 CRISPR 激活在冗余基因功能筛选上具有明显优势^[24]。与 CRISPR 激活系统相似, CRISPR 干扰 (CRISPRi) 系统将 dCas9 与转录抑制蛋白融合^[26], 结合 sgRNA 抑制基因转录实现基因沉默, 该过程不破坏基因结构故不会造成细胞死亡或生长停滞, 可用于研究必需基因功能, 且因不涉及 DNA 切割, CRISPRi 脱靶效应较低^[27-28]。病原体编程的 Cas9 转录调控 (TRPPC) 结合病毒反向遗传学与 CRISPR 技术^[29], 改造病毒表达靶向宿主基因的 sgRNA, 因 sgRNA 由病毒表达, 仅在病毒转录开始后的受感染细胞中筛选, 激活促病毒因子的病毒有复制优势, 激活抗病毒因子的则迅速丢失, 在动态筛选场景中展现出独特价值。上述 4 种 CRISPR 文库筛选技术各具特色与优势 (表 1), 研究人员需综合考虑筛选目标, 依据试验场景选择最适方法。

表 1 CRISPR 文库筛选方法

方法类型	作用原理	适用场景	优点	缺点
CRISPR/Cas9 敲除文库 (CRISPRko)	使用 sgRNA 引导 Cas9 切割 DNA, 通过 NHEJ 或 HDR 实现基因敲除	功能缺失筛选、必需基因筛选、药物靶点筛选、肿瘤基因研究等	敲除效率较高、表型明显、脱靶效应较小	不可逆敲除
CRISPR/Cas9 激活文库 (CRISPRa)	使用 dCas9 结合转录激活因子, 激活目标基因表达	耐药基因筛选、增强子功能研究、信号通路分析等	可逆转录激活、支持非编码区调控、操作简便	受限于 PAM 序列、活性依赖于 dCas9 与转录因子的融合蛋白, 可能影响基因表达稳定性
CRISPR/Cas9 抑制文库 (CRISPRi)	使用 dCas9 结合转录抑制因子, 抑制目标基因表达	功能抑制筛选、疾病机制研究、毒性基因研究等	可逆转录抑制、避免基因破坏、操作简便	受限于 PAM 序列、抑制效果可能受细胞类型和环境条件影响
病原体编程的 Cas9 转录调控 (TRPPC)	将 sgRNA 的基因整合到病毒基因组中, 主动调节宿主基因的表达	病毒致病机制研究、抗病毒药物靶点筛选	赖于病原体自身的适应性选择与病毒感染紧密关联、动态监测	试验设计和操作较为复杂, 需要特定的病毒株和宿主细胞系

2 CRISPR/Cas9 技术在 AIV 研究中的应用

2.1 CRISPR/Cas9 技术在 AIV 相关宿主因子研究中的应用

宿主因子在病毒感染中扮演着至关重要的角色, 是病毒感染和复制过程中不可或缺的组成部分, 了解宿主因子在病毒感染中的作用有助于新的治疗靶点的发现。Han 等^[30]利用 CRISPR/Cas9 敲除系统在人肺上皮细胞 (A549) 中生成了一个全基因组范围的 CRISPR 敲除 (GeCKO) 文库, 并用 H5N1 毒株对 GeCKO 文库进行了 5 轮致命感染, 对富集的 sgRNA 群体进行深度测序分析, 鉴定出许多参与唾液酸生物合成和糖基化途径以及细胞内在免疫调节的基因, 包括唾液酸转运蛋白 SLC35A1 和一种 DNA 转录抑制因子 Capicua (CIC)。后有研究人员使用相同的筛选方法证明了 SLC35A1 是猪德尔塔冠状病毒感染相关的宿主因子^[31]。Yi 等^[32]利用筛选策略鉴定了 204 个与 H7N9 AIV 增殖相关的宿主基因, 进一步验证了 14 个在病毒吸附、入侵、转录和复制等不同阶段发挥作用的宿主基因, 包括胞质黏蛋白 2 (CYTH2)、四肽重复蛋白 24 (TTC24) 和 N-乙酰神经氨酸合酶 (NANS) 等。除在同一载体上表达 Cas9 蛋白和 sgRNA 敲除靶基因外, 还可构建稳定表达 Cas9 蛋白的 A549-Cas9 细胞系^[33], 将 sgRNA 克隆到慢病毒表达载体, 用慢病毒文库感染该细胞系构建基因缺失细胞系, 这种方法可以提高编辑效果, 还可针对试验目的快速更换不同的 sgRNA 文库来筛选不同的基因。Li 等^[34]采用此方法筛选出多个影响甲型流感病毒感染的宿主相关基因, 如 V-ATP 酶组装因子 WDR7、CCDC115 和 TMEM19, 人 2'-O-核糖帽甲基转移酶 (CMTR1) 等。近几年 Song 等^[35]使用高致病性 H5N1 对 A549 细胞进行全基因组基因敲除筛选,

发现其中 DCC 亚类成员 4 (IGDCC4) 显著降低病毒在 A549 细胞中的复制, IGDCC4 是一类具有免疫球蛋白结构域的跨膜蛋白, 参与细胞识别、结合和粘附过程, 与病毒血凝素蛋白相互作用促进病毒内化到宿主细胞中, IGDCC4 基因的敲除显著提高了小鼠抵抗流感病毒感染的能力。Ma 等^[36]筛选鉴定出葡萄糖胺 (UDP-N-乙酰基)-2-差向异构酶/N-乙酰甘露糖胺激酶 (GNE) 是促进 AIV 吸附和内吞作用的关键宿主因子。

Heaton 等^[37]使用 dCas9-SAM 激活系统进行全基因组过表达筛选, 筛选并鉴定出 AIV 的限制因子 $\beta 1$, 4-N-乙酰氨基半乳糖转移酶 2 (B4GALNT2), 通过修饰 $\alpha - 2, 3$ -连接唾液酸的聚糖, 从而抑制病毒与细胞结合, 试验显示当 B4GALNT2 过表达时, 抵御了包括 H5N9、H7N2、H9N2 和 H10N4 毒株等测试 AIV 株的感染。由于 B4GALNT2 不存在于鸡的基因组中, 研究人员利用 CRISPR/Cas9 技术, 在 DF-1 细胞中过表达 B4GALNT2, 在 H5N8、H9N2 亚型 AIV 和新城疫病毒感染后, DF-1 克隆的存活率显著高于野生型 DF-1 细胞, B4GALNT2 显著增强了禽类对多种病毒的抵抗力^[38]。King 等^[29]将 CRISPR 与病毒反向遗传操作系统结合开发了一种病原体编程的 Cas9 转录调控技术, 能够识别出在 AIV 感染中后期阶段对病毒复制至关重要的宿主因子 3' 修复核酸外切酶 1 (TREX1)。TREX1 通过降解细胞质中的 DNA 来防止不适当的天然免疫激活。这项研究为开发新的抗病毒治疗策略提供了重要的基础, 填补了之前研究的空白, 因为大多数现有的筛选技术主要集中在病毒感染的早期阶段。TRPPC 推动了对流感病毒与宿主相互作用的理解, 也为未来的抗病毒研究和治疗提供了新的方向。

GASDERMINS 是成孔效应蛋白家族, 可引起膜

透化和焦亡,导致强烈的炎症反应^[39]。使用 CRISPR/Cas9 技术敲除 GASDERMIN E (GSDME) 使 A549 细胞和人原代肺泡上皮细胞在 H7N9 病毒感染后的死亡方式由焦亡转变为凋亡^[40],且 GSDME 敲除小鼠在 H7N9 病毒致死性感染后存活,这一发现揭示 GSDME 激活是 H7N9 病毒感染的肺细胞因子风暴和致命结果的关键和独特机制,从而为抗 H7N9 病毒的抗病毒药物的研发打开了新的大门。酸性核磷蛋白 (ANP32) 在禽流感病毒复制中起关键作用,包括 ANP32A、ANP32B 和 ANP32E,其中 ANP32A 被认

为是 AIV 聚合酶的重要辅助因子并影响病毒跨宿主传播,Zhang 等^[41]使用 CRISPR/Cas9 技术构建了一系列 ANP32 基因敲除 293T 细胞系,并利用该细胞系筛选确定了 ANP32A 和 ANP32B 是决定甲型流感病毒聚合酶活性的关键宿主因子且可以独立恢复病毒聚合酶活性。表 2 归纳总结了近几年通过 CRISPR 文库筛选鉴定出的与 AIV 感染相关的宿主因子,以及这些宿主因子在病毒入侵、复制、免疫逃逸等过程中发挥的具体功能。

表 2 禽流感病毒相关宿主因子

宿主因子	鉴定方法	病毒	宿主细胞	宿主因子功能
SLC35A1	敲除	H5N1	A549	参与糖基化修饰,转运唾液酸至细胞表面,缺失会抑制病毒与受体的结合
CIC	敲除	H5N1	A549	通过其转录阻遏因子活性抑制抗病毒基因表达,缺失会抑制病毒增殖
CYTH2	敲除	H7N9	A549	调控细胞膜运输和囊泡形成,促进病毒粒子内吞或释放
IGDCC4	敲除	H5N1	A549	与细胞黏附、信号传导和免疫调节相关
GSDME	敲除	H7N9	A549	介导细胞焦亡,释放促炎因子
ANP32A	敲除	H1N1/H7N9/H9N2	293T	病毒依赖 ANP32A 维持其 RNA 聚合酶活性,促进病毒基因组复制
GNE	敲除	H1N1/H3N2/H9N2	A549	唾液酸合成的关键酶,影响禽流感病毒 HA 蛋白的识别和结合
干扰素调节因子 7 (IRF7)	敲除	H1N1	MDCK	激活干扰素应答,诱导抗病毒蛋白表达,抑制病毒复制
膜联蛋白 A6 (AnxA6)	敲除	H1N1	HEK293FT	影响脂筏形成和病毒囊膜组装,抑制病毒出芽
干扰素诱导跨膜蛋白 3 (IFITM3)	敲除	H1N1/H3N2	WI-38 VA13	阻断病毒囊膜与内体膜的融合,抑制禽流感病毒进入细胞质
输入蛋白 $\alpha 7$ (Importin- $\alpha 7$)	敲除	H1N1/H9N2	A549	核转运蛋白,促进病毒复制
B4GALNT2	激活	H7N2/H9N2/ H5N9/H10N4	DF-1	参与宿主细胞表面聚糖结构的形成,影响禽流感病毒 HA 蛋白的受体结合
TREX1	TRPPC	H1N1	A549	降解细胞质中的异常 DNA,调控先天免疫

2.2 CRISPR/Cas9 技术在抗病毒策略研究中的应用

CRISPR/Cas9 技术可以通过敲除或敲低特定宿主基因,评估其在病毒复制中的作用,从而为开发抗病毒药物提供潜在的靶点。Yi 等^[32]利用 A549 细胞 CRISPR/Cas9 全基因组敲除文库鉴定了流感病毒增殖必需宿主基因 CYTH2, CYTH2 参与流感病毒的内吞,通过敲除 CYTH2 可以抑制 H7N9 的感染, CYTH2 拮抗剂 SecinH3 在体内也可减弱流感病毒感染,为宿主定向抗 AIV 药物提供新靶点。AIV 进入细胞后需要克服核膜形成的屏障到细胞核内进行转录和复制, Importin- $\alpha 7$ 在核输入过程中起到关键作用,通过敲除 Importin- $\alpha 7$ 基因,发现 Importin- $\alpha 7$ 对人流感 H1N1、禽流感 H9N2 和猪流感 H1N1 等病毒的生

长有显著抑制效果^[42]。除此之外, GSDME、IGDCC4、GNE 等也是 AIV 的关键宿主因子,为开发新的抗病毒策略和药物提供了科学依据。虽然以 AIV 必需宿主因子为靶点的抗病毒药物开发具有巨大潜力,但同时也伴随宿主因子通常参与多个生物学过程,靶向这些因子可能会影响正常细胞功能,导致不良反应或副作用,在实际应用中需要考虑病毒的生命周期涉及多个阶段,包括吸附、入侵、复制和释放,单一靶点可能无法完全控制病毒的复制且 AIV 有高度变异性,极易产生药物的耐药性,降低治疗效果。

CRISPR/Cas9 技术除用于抗病毒靶点的筛选鉴定外,也通过基因编辑增强家禽对 AIV 的抵抗力。Alewo 等^[43]利用 CRISPR/Cas9 技术在鸡的基因组中

对 ANP32A 基因进行编辑, 培育了对 AIV 具有抗性的鸡, 该鸡种在感染 AIV 后, 表现出较低的病毒载量和传播能力, 为未来 AIV 的预防和控制提供了新的可能性; 或是在鸡中过表达 B4GALNT2^[31] 等产生抗 AIV 的家禽种, 从而减少病毒在禽类种群中的传播。

2.3 CRISPR/Cas9 技术在禽流感疫苗研究中的应用

就 AIV 而言, 疫苗接种是预防和控制最有效的策略。家禽养殖行业内最常用的疫苗是灭活全病毒疫苗, 通常采用鸡胚繁殖疫苗毒为原料制备灭活疫苗。与传统鸡胚疫苗毒相比, 细胞生产疫苗毒具有很多优势, 突破了鸡胚疫苗存在的一些局限^[44]。目前, 基于细胞培养的疫苗毒生产方法已经广泛应用, 但是由于细胞的先天免疫反应, 细胞生产病毒的滴度较低, 通常需要延长传代时间才能达到可接受的病毒繁殖水平, 导致生产成本增高^[45], 而 CRISPR/Cas9 技术为生产病毒的细胞提供了新的改造工具和方法。犬肾细胞系 (MDCK) 目前已被批准用于生产流感疫苗, 因干扰素在调节抗病毒机制和消灭病毒方面起重要作用, 病毒在细胞中的增殖受到严重限制。有研究人员使用 CRISPR/Cas9 技术开发了干扰素调节因子 7 (IRF7) 敲除型 MDCK 细胞 (IRF7^{-/-} MDCK)^[46]。IRF7^{-/-} MDCK 细胞对流感病毒具有更高的容量和效率。Eshchenko 等^[47] 也利用 CRISPR/Cas9 在 WI-38 VA13 细胞上获得了干扰素诱导跨膜蛋白 3 (IFITM3) 敲除的单克隆细胞系, IFITM3 的敲除使得该细胞系对各种亚型甲型流感病毒的感染更加敏感。研究人员通过 CRISPR/Cas9 介导的 AnxA6 基因敲除修饰了 HEK293T 细胞, 获得了几个 ANXA6 基因缺陷的克隆, 增加人类细胞系对 AIV 感染的易感性^[48]。这些改良后的细胞不仅有助于提高疫苗生产效率, 还能提高从临床样本中分离的 AIV 滴度, 从而加快疫苗种子病毒的制备过程。

CRISPR/Cas9 基因编辑技术通过靶向编辑特定基因序列, 能够快速、高效地生成新型多价病毒载体疫苗。Zou 等^[49] 利用 CRISPR/Cas9 技术编辑了鸭病毒性肠炎病毒 (DEV) 基因组, 在 DEV 基因组中插入了 H5N1 亚型 AIV 的 HA 基因和鸭坦布苏病毒前膜蛋白及包膜糖蛋白 (E) 基因, 成功开发针对 H5N1 亚型高致病性 AIV、鸭坦布苏病毒和鸭病毒性肠炎的三价疫苗候选毒株。与 Zou 使用 HDR 方法插入基因片段不同, Peng 等^[50] 利用 NHEJ 依赖性 CRISPR/Cas9 将 HA 基因插入 DEV 基因组, 制备禽流感病毒二价鸭肠炎病毒疫苗。Tang 等^[51] 也利用 CRISPR/Cas9 技术, 在火鸡疱疹病毒 (HVT) 基因组的不同位置插入其他病毒蛋白基因, 成功开发出一种稳定的

抗 H9N2 AIV、传染性喉气管炎病毒和传染性法氏囊病病毒三价重组 HVT 疫苗候选毒株。CRISPR/Cas9 技术在活病毒载体中插入多个外源基因, 并保持了载体病毒的稳定性和免疫原性, 这不仅提高了疫苗开发的效率, 还可能为未来其他病毒疫苗的开发提供了新的方法。此外, CRISPR/Cas9 技术结合红细胞吸附法也被用于快速生成重组 HVT-H7N9HA 候选疫苗株^[52], 该联合筛选的方法成本低、速度快, 可应用于表达大多数 AIV 的 HA 的重组病毒。

3 讨论与展望

CRISPR/Cas9 技术作为一个强大的基因编辑工具, 以其效率高、设计简单和应用广泛等特点为生命科学提供了有力的工具。在病毒基因功能的研究方面, 已有报道通过敲除疱疹病毒、马立克病病毒、猪传染性胃肠炎病毒、非洲猪瘟病毒等 DNA 病毒的相关毒力基因, 深入了解病毒的生命周期和致病机制^[53]。AIV 作为 RNA 病毒, CRISPR/Cas9 技术在其研究中主要还是用于宿主因子的筛选和鉴定, 并不能直接靶向病毒基因组进行编辑。不过随着分子生物学的不断发展, CRISPR 基因编辑技术在 RNA 病毒上应用也有新的突破, CRISPR-Cas13 系统因其准确的 RNA 靶向能力从 CRISPR-Cas 家族中脱颖而出, 不仅用于开发快速高效的 RNA 病毒检测方法, 还因其特异性切割靶标 RNA 抑制病毒复制的能力而被广泛应用于抗病毒治疗, 如甲型流感病毒、冠状病毒、HIV 等^[54]。此外, Nemudraia 等^[55] 利用 III 型 CRISPR 系统成功对 RNA 病毒辛德贝斯病毒 (SINV) 进行了基因组编辑, 这种创新的 RNA 编辑技术不仅提高了编辑效率, 还为研究 RNA 病毒的毒性和开发新型疗法提供了新的可能性。CRISPR/Cas9 技术已在禽类基因组编辑中取得突破, 例如通过敲除病毒宿主因子 ANP32A 培育抗 AIV 的基因编辑鸡, 这表明基于 CRISPR/Cas9 的基因编辑技术在提高禽类的抗病性方面具有巨大的潜力。值得关注的是基因编辑鸡虽然显示出对禽流感的抗性, 但在高剂量病毒感染下, 病毒能够通过突变适应并感染这些鸡, 这说明基因编辑鸡存在潜在的病毒变异感染风险, 研究人员在设计基因编辑策略时需要考虑病毒的进化潜力。

尽管 CRISPR/Cas9 技术在禽流感病毒研究与防控中展现出巨大潜力, 但是在禽类细胞和个体水平上, CRISPR/Cas9 的编辑效率仍有待提高, 以实现更广泛、更高效的基因编辑, 且 CRISPR/Cas9 系统在禽类中的应用仍面临脱靶效应和免疫反应的风险, 脱靶编辑可能导致非预期的基因突变, 研究表明通过选择性表达 Cas9 变体和优化递送系统, 可以减少脱

靶效应并提高安全性^[56-57]。未来的研究应继续探索新型 CRISPR 系统和 Cas 变体, 开发高效的递送方法, 并结合 AI、大数据等技术, AI 算法能预测 CRISPR/Cas9 脱靶效应、优化 sgRNA 设计以提供精准基因编辑策略^[58], 还可分析细胞和组织特性, 选择适配递送载体提升递送效率^[59]。此外, AI 在预测抗原表位和宿主因子等方面^[60], 为 AIV 疫苗设计和病毒靶向治疗提供指导。研究者应充分利用 CRISPR 基因编辑技术对 AIV 的基因组进行精准编辑和分析, 建立病毒变异监测体系, 检测病毒的进化趋势和潜在的致病风险, 根据地区、禽类品种和流行毒株的特点设计出具有针对性的疫苗, 提高疫苗的防控效果, 将 CRISPR 技术与传统的抗病毒药物结合, 通过不同治疗手段的协同作用, 提高禽流感的治疗效果, 减少病毒耐药性的产生, 以此推动 CRISPR/Cas9 技术在禽流感病毒防控中的应用。

参考文献:

- [1] PACESA M, PELEA O, JINEK M. Past, present, and future of CRISPR genome editing technologies [J]. *Cell*, 2024, 187 (5): 1076-1100.
- [2] MONDAL R, BRAHMBHATT N, SANDHU S K, et al. Applications of clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR) as a genetic scalpel for the treatment of cancer: a translational narrative review [J]. *Cureus*, 2023, 15 (12): e50031.
- [3] CHEN K, WANG Y, ZHANG R, et al. CRISPR/cas genome editing and precision plant breeding in agriculture [J]. *Annu Rev Plant Biol*, 2019, 70: 667-697.
- [4] 许立慧, 刘莹玉, 崔珍珍, 等. CRISPR/Cas9 技术在动物病毒和疫苗研究中的应用 [J]. *中国兽医科学*, 2023, 53 (12): 1570-1578.
- [5] PUSCHNIK A S, MAJZOUB K, OOI Y S, et al. A CRISPR toolbox to study virus-host interactions [J]. *Nat Rev Microbiol*, 2017, 15 (6): 351-364.
- [6] SHALEMO, SANJANA N E, HARTENIAN E, et al. Genome-scale CRISPR-Cas9 knockout screening in human cells [J]. *Science*, 2014, 343 (6166): 84-87.
- [7] 周磊, 李东旭, 冒魏佳, 等. Cas9 和 PE 介导湖羊骨骼肌卫星细胞 MSTN 基因敲除的研究 [J]. *南京农业大学学报*, 2025, 48 (2): 419-426.
- [8] VILELA J, ROHAIM M A, MUNIR M. Application of CRISPR/Cas9 in understanding avian viruses and developing poultry vaccines [J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2020, 10: 581504.
- [9] PROKHOROVA D, ZHUKOVA ESCHENKO N, LEMZA A, et al. Application of the CRISPR/Cas9 system to study regulation pathways of the cellular immune response to influenza virus [J]. *Viruses*, 2022, 14 (2): 437.
- [10] VILELA J, MUNIR M. Development of CRISPR/Cas9-based novel vaccines against poultry viruses [J]. *Access Microbiol*, 2022, 4 (5): 1-12.
- [11] CHANG P, SADEYEN J R, SEALY J, et al. The application of CRISPR/Cas9 system in the generation of viral vectored avian influenza vaccines [J]. *Access Microbiol*, 2019, 1 (1A): 11-18.
- [12] 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 [J]. *J Bacteriol*, 1987, 169 (12): 5429-5433.
- [13] JANSEN R, VAN EMBDEN J D A, GAASTRA W, et al. Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes [J]. *Mol Microbiol*, 2002, 43 (6): 1565-1575.
- [14] BROUNS S J J, JORE M M, LUNDGREN M, et al. Small CRISPR RNAs guide antiviral defense in prokaryotes [J]. *Science*, 2008, 321 (5891): 960-964.
- [15] MARRAFFINI L A, SONTHEIMER E J. CRISPR interference limits horizontal gene transfer in staphylococci by targeting DNA [J]. *Science*, 2008, 322 (5909): 1843-1845.
- [16] DELTCHEVA E, CHYLINSKI K, SHARMA C M, et al. CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III [J]. *Nature*, 2011, 471 (7340): 602-607.
- [17] JINEK M, CHYLINSKI K, FONFARA I, et al. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity [J]. *Science*, 2012, 337 (6096): 816-821.
- [18] CONG L, RAN F A, COX D, et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems [J]. *Science*, 2013, 339 (6121): 819-823.
- [19] MALI P, YANG L, ESVELT K M, et al. RNA-guided human genome engineering via Cas9 [J]. *Science*, 2013, 339 (6121): 823-826.
- [20] SLAYMAKER I M, GAO L, ZETSCHKE B, et al. Rationally engineered Cas9 nucleases with improved specificity [J]. *Science*, 2016, 351 (6268): 84-88.
- [21] WANG T, WEI J J, SABATINI D M, et al. Genetic screens in human cells using the CRISPR-Cas9 system [J]. *Science*, 2014, 343 (6166): 80-84.
- [22] 荆耀彬, 汪伟, 张维绮, 等. CRISPR/Cas9 全基因组筛选在生命科学中的应用 [J]. *生命科学*, 2018, 30 (9): 994-1002.
- [23] 杜欣娜, 戚家峰, 张虎. 基于 CRISPR-Cas9 的筛选文库的类型与应用 [J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2019, 35 (9): 931-938.
- [24] QI L S, LARSON M H, GILBERT L A, et al. Repurposing CRISPR as an RNA-guided platform for sequence-specific control of gene expression [J]. *Cell*, 2013, 152 (5): 1173-1183.
- [25] KONERMANN S, BRIGHAM M D, TREVINO A E, et al. Genome-scale transcriptional activation by an engineered CRISPR-Cas9 complex [J]. *Nature*, 2015, 517 (7536): 583-588.
- [26] AI Y. A comparative analysis of CRISPR screening technologies [J]. *OJGen*, 2023, 13 (4): 115-124.
- [27] GUNA A, PAGE K R, REPLOGLE J M, et al. A dual sgRNA library design to probe genetic modifiers using genome-wide CRISPRi screens [J]. *BMC Genomics*, 2023, 24 (1): 651.
- [28] LI Z, HAJIAN C, GREENE W C. Identification of unrecognized host factors promoting HIV-1 latency [J]. *PLoS Pathog*, 2020, 16 (12): e1009055.
- [29] KING C R, LIU Y, AMATO K A, et al. Pathogen-driven CRISPR screens identify TREX1 as a regulator of DNA self-sensing

- during influenza virus infection [J]. *Cell Host Microbe*, 2023, 31 (9): 1552–1567.
- [30] HAN J, PEREZ J T, CHEN C, et al. Genome-wide CRISPR/Cas9 screen identifies host factors essential for influenza virus replication [J]. *Cell Rep*, 2018, 23 (2): 596–607.
- [31] WANG X, JIN Q, XIAO W, et al. Genome-wide CRISPR/Cas9 screen reveals a role for SLC35A1 in the adsorption of porcine delta-coronavirus [J]. *J Virol*, 2022, 96 (24): e0162622.
- [32] YI C, CAI C, CHENG Z, et al. Genome-wide CRISPR-Cas9 screening identifies the CYTH2 host gene as a potential therapeutic target of influenza viral infection [J]. *Cell Rep*, 2022, 38 (13): 110559.
- [33] SGRO A, CURSONS J, WARYAH C, et al. Epigenetic reactivation of tumor suppressor genes with CRISPRa technologies as precision therapy for hepatocellular carcinoma [J]. *Clin Epigenetics*, 2023, 15 (1): 73.
- [34] LI B, CLOHISEY S M, CHIA B S, et al. Genome-wide CRISPR screen identifies host dependency factors for influenza A virus infection [J]. *Nat Commun*, 2020, 11 (1): 164.
- [35] SONG Y, HUANG H, HU Y, et al. A genome-wide CRISPR/Cas9 gene knockout screen identifies immunoglobulin superfamily DCC subclass member 4 as a key host factor that promotes influenza virus endocytosis [J]. *PLoS Pathog*, 2021, 17 (12): e1010141.
- [36] MA T, NIU S, WU Z, et al. Genome-wide CRISPR screen identifies GNE as a key host factor that promotes influenza A virus adsorption and endocytosis [J]. *Microbiol Spectr*, 2023, 11 (6): e01643–23.
- [37] HEATON B E, KENNEDY E M, DUMM R E, et al. A CRISPR activation screen identifies a pan-avian influenza virus inhibitory host factor [J]. *Cell Rep*, 2017, 20 (7): 1503–1512.
- [38] PARK J S, WOO S J, SONG C S, et al. Modification of surface glycan by expression of beta-1, 4-N-acetyl-galactosaminyltransferase (B4GALNT2) confers resistance to multiple viruses infection in chicken fibroblast cell [J]. *Front Vet Sci*, 2023, 10: 1160600.
- [39] BROZ P, PELEGRÍN P, SHAO F. The gasdermins, a protein family executing cell death and inflammation [J]. *Nat Rev Immunol*, 2020, 20 (3): 143–157.
- [40] WAN X, LI J, WANG Y, et al. H7N9 virus infection triggers lethal cytokine storm by activating gasdermin E-mediated pyroptosis of lung alveolar epithelial cells [J]. *Natl Sci Rev*, 2021, 9 (1): nwab137.
- [41] ZHANG H, ZHANG Z, WANG Y, et al. Fundamental contribution and host range determination of ANP32A and ANP32B in influenza A virus polymerase activity [J]. *J Virol*, 2019, 93 (13): e00174–19.
- [42] 刘素丽, 朱闻斐, 舒跃龙. 利用 CRISPR/Cas9 基因敲除技术研究 Importin- α 7 对流感病毒生长特性的影响 [J]. *病毒学报*, 2017, 33 (6): 829–835.
- [43] IDOKO-AKOH A, GOLDHILL D H, SHEPPARD C M, et al. Creating resistance to avian influenza infection through genome editing of the ANP32 gene family [J]. *Nat Commun*, 2023, 14 (1): 6136.
- [44] WOLFF M W, REICHL U. Downstream processing: from egg to cell culture-derived influenza virus particles [J]. *Chem Eng Technol*, 2008, 31 (6): 846–857.
- [45] IWASAKI A, PILLAI P S. Innate immunity to influenza virus infection [J]. *Nat Rev Immunol*, 2014, 14 (5): 315–328.
- [46] MAYURAMART O, POOMIPAK W, RATTANABURI S, et al. IRF7-deficient MDCK cell based on CRISPR/Cas9 technology for enhancing influenza virus replication and improving vaccine production [J]. *Peer J*, 2022, 10: e13989.
- [47] ESHCHENKO N, SERGEEVA M, ZHURAVLEV E, et al. A knockout of the IFITM3 gene increases the sensitivity of WI-38 VA13 cells to the influenza A virus [J]. *Int J Mol Sci*, 2024, 25 (1): 625.
- [48] KOMISSAROV A, SERGEEVA M, ZHURAVLEV E, et al. CRISPR-Cas9 mediated knockout of AnxA6 gene enhances influenza A virus replication in low-permissive HEK293FT cell line [J]. *Gene*, 2022, 809: 146024.
- [49] ZOU Z, HUANG K, WEI Y, et al. Construction of a highly efficient CRISPR/Cas9-mediated duck enteritis virus-based vaccine against H5N1 avian influenza virus and duck Tembusu virus infection [J]. *Sci Rep*, 2017, 7 (1): 1478.
- [50] CHANG P, YAO Y, TANG N, et al. The application of NHEJ-CRISPR/Cas9 and cre-lox system in the generation of bivalent duck enteritis virus vaccine against avian influenza virus [J]. *Viruses*, 2018, 10 (2): 81.
- [51] TANG N, ZHANG Y, SADIGH Y, et al. Generation of a triple insert live avian herpesvirus vectored vaccine using CRISPR/Cas9-based gene editing [J]. *Vaccines (Basel)*, 2020, 8 (1): 97.
- [52] CHANG P, AMEEN F, SEALY J E, et al. Application of HDR-CRISPR/Cas9 and erythrocyte binding for rapid generation of recombinant Turkey herpesvirus-vectored avian influenza virus vaccines [J]. *Vaccines (Basel)*, 2019, 7 (4): 192.
- [53] HU Y, PATRA P, PISANTY O, et al. Multi-Knock-a multi-targeted genome-scale CRISPR toolbox to overcome functional redundancy in plants [J]. *Nat Plants*, 2023, 9 (4): 572–587.
- [54] XUE Y, CHEN Z, ZHANG W, et al. Engineering CRISPR/Cas13 system against RNA viruses: from diagnostics to therapeutics [J]. *Bioengineering (Basel)*, 2022, 9 (7): 291.
- [55] NEMUDRAIA A, NEMUDRYI A, WIEDENHEFT B. Repair of CRISPR-guided RNA breaks enables site-specific RNA excision in human cells [J]. *Science*, 2024, 384 (6697): 808–814.
- [56] CHOJNACKA-PUCHTA L, SAWICKA D. CRISPR/Cas9 gene editing in a chicken model: current approaches and applications [J]. *J Appl Genet*, 2020, 61 (2): 221–229.
- [57] KHWATENGE C N, NAHASHON S N. Recent advances in the application of CRISPR/Cas9 gene editing system in poultry species [J]. *Front Genet*, 2021, 12: 627714.
- [58] 张子悦, 周欣智, 吕斌. 人工智能驱动的基因编辑技术及其应用 [J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2025, 41 (4): 522–532.
- [59] DIXIT S, KUMAR A, SRINIVASAN K, et al. Advancing genome editing with artificial intelligence: opportunities, challenges, and future directions [J]. *Front Bioeng Biotechnol*, 2024, 11: 1335901.
- [60] 杨亚龙, 杨森, 姚树森, 等. H5N8 高致病性禽流感病毒 HA 蛋白 T 细胞抗原表位的预测 [J]. *中国病毒病杂志*, 2024, 14 (3): 260–266.