

梅彦, 杨化强, 吴珍芳. CRISPR/Cas13b 系统对猪流行性腹泻病毒增殖的抑制作用 [J]. 华南农业大学学报, 2019, 40(6): 1-7.

MEI Yan, YANG Huaqiang, WU Zhenfang. Interference effect of CRISPR/Cas13b on porcine epidemic diarrhea virus[J]. Journal of South China Agricultural University, 2019, 40(6): 1-7.

CRISPR/Cas13b 系统对猪流行性 腹泻病毒增殖的抑制作用

梅彦¹, 杨化强^{1,2}, 吴珍芳^{1,2}

(1 华南农业大学 动物科学学院, 广东 广州 510642; 2 温氏研究院, 广东 云浮 527400)

摘要:【目的】猪流行性腹泻是由猪流行性腹泻病毒 (Porcine epidemic diarrhea virus, PEDV) 引起的一种对养猪业造成巨大损失的高致死率的传染性疫病。CRISPR/Cas13b 系统精准切割和编辑 RNA 的功能提供了一种靶向抑制 RNA 病毒的策略。本研究尝试利用 CRISPR/Cas13b 的 RNA 干扰功能对 PEDV 的基因组 RNA 进行切割, 以探索一种新型的 PEDV 病毒抑制策略。【方法】设计了 4 对靶向 PEDV 基因组不同区域的 CRISPR RNA (crRNA) 位点, 构建了 CRISPR/Cas13b 打靶载体, 以打靶载体转染 Vero 细胞, 并利用 PEDV 感染转染细胞, 检测 PEDV 在 CRISPR/Cas13b 转染细胞内的增殖情况。【结果】CRISPR/Cas13b 系统对 PEDV 在 Vero 细胞的增殖具有明显的抑制作用。打靶载体 U6-crRNA3 和 U6-crRNA4 转染组相较于正常细胞组, 病毒免疫荧光试验中荧光团明显减少; 定量 PCR 结果显示, 打靶载体转染组在细胞水平抑制 50% 以上病毒增殖量。【结论】本研究构建的 CRISPR/Cas13b 系统能有效抑制 PEDV 增殖, 为开发有效的 RNA 病毒防控手段、建立抗病动物模型提供了新的研究策略。

关键词: 猪; 猪流行性腹泻病毒; CRISPR/Cas13b 系统; 打靶质粒; RNA 病毒; 基因编辑

中图分类号: S813.3

文献标志码: A

文章编号: 1001-411X(2019)06-0001-07

Interference effect of CRISPR/Cas13b on porcine epidemic diarrhea virus

MEI Yan¹, YANG Huaqiang^{1,2}, WU Zhenfang^{1,2}

(1 College of Animal Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China;

2 Wens' Institute, Yunfu 527400, China)

Abstract: 【Objective】 Porcine epidemic diarrhea, caused by porcine epidemic diarrhea virus (PEDV), is a highly contagious viral disease and results in high mortality of pigs and huge lost of pig industry. The CRISPR/Cas13b system can mediate a highly efficient cleavage or editing to target RNA, thereby offering a novel strategy for interfering the infection of RNA viruses. We here tried to use the CRISPR/Cas13b system to cleave the PEDV RNA genome, in order to explore a novel strategy to inhibit PEDV infection. 【Method】 We designed four CRISPR RNA (crRNA) sequences which respectively recognize four regions in the PEDV genome. The CRISPR/Cas13b targeting vectors were constructed and transfected into Vero cells. The transfected cells were infected by PEDV, and then we analyzed the viral load of PEDV in cultured cells.

【Result】 The CRISPR/Cas13b system significantly inhibited PEDV propagation in Vero cells. In the viral

收稿日期: 2018-11-14 网络首发时间: 2019-10-28 09:20:16

网络首发地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/44.1110.s.20191025.0844.010.html>

作者简介: 梅彦 (1995—), 女, 硕士研究生, E-mail: meiyan1995_1@163.com; 杨化强 (1981—), 男, 副研究员, 博士,

E-mail: yhq@scau.edu.cn; 通信作者: 吴珍芳 (1970—), 男, 教授, 博士, E-mail: wzfq@scau.edu.cn

基金项目: 广东省科技计划项目 (2017B020201009)

immunofluorescence assay, the transfected cells with targeting vectors U6-crRNA3 and U6-crRNA4 had obviously fewer fluorophores compared with normal cells. The quantitative PCR results showed that CRISPR/Cas13b decreased PEDV load in cultured cells by above 50%. 【Conclusion】 The constructed CRISPR/Cas13b system can effectively interfere the propagation of PEDV. This study provides an alternative approach for effective RNA virus prevention and control, and creation of disease-resistant pig models.

Key words: pig; porcine epidemic diarrhea virus; CRISPR/Cas13b system; targeting plasmid; RNA virus; gene editing

猪流行性腹泻病毒 (Porcine epidemic diarrhea virus, PEDV) 是 α 冠状病毒属的成员, 是一种具有高感染性的单股正义链 RNA 病毒。其可以导致猪发生急性水样腹泻、呕吐、脱水等临床症状, 尤其对新生仔猪具有高致死率^[1]。1978—2018 年近 40 年的时间内, PEDV 严重危害了全球养殖业, 仅在 2010 年冬就造成了我国南方近 100 万头仔猪的死亡, 给我国猪业造成了不可估量的损失^[2]。到 2013 年, 美国 17 个州爆发 PEDV, 近 10% 的仔猪死亡, 随即病毒在接下来的几年传播到欧洲国家, PEDV 迅速地遍及全世界^[3-4]。对于 PEDV 防控和治疗, 现有研究主要以接种疫苗的方式防控, 但是由于疫苗的有效性、安全性和毒株的变异性等问题^[5-6], 仍然不能使仔猪完全避免 PEDV 的影响。开发有效的 PEDV 防控手段对养猪业良性发展具有重要意义。

基因编辑是利用基因编辑工具对生物体基因组进行修改, 以产生相应表型的一种精确基因修饰手段。其中簇状规律性短回文重复序列结合蛋白 (Clustered regularly interspaced palindromic repeats/CRISPR-associated proteins, CRISPR/Cas) 系统是一种在细菌和古细菌里发现的天然适应性免疫系统, 由 CRISPR 序列 (间隔区) 和侧翼的 *Cas* 基因组成。基于参与切割的 *Cas* 蛋白将该系统分为 2 类: 一类是多个亚单位蛋白复合发挥作用的 I 类系统, 包含 type I, type III 和 type IV 蛋白; 另一类主要是以单一蛋白发挥功能的 type II (Cas9), type V (Cpf1、C2c1、C2c3) 和 type VI (Cas13a、Cas13b、Cas13c、Cas13d) 型 CRISPR 系统^[7-8]。近年研究发现, CRISPR/Cas 系统是是唯一可以靶向 RNA 切割的免疫系统, Cas13 蛋白含有 2 个高等真核生物和原核生物核苷酸结合域, 可以介导对 RNA 的精准靶向切割^[9]。该系统通过 CRISPR 阵列转录成成熟的 CRISPR RNA (crRNA), 与 Cas13 蛋白形成 Cas13-crRNA 复合物靶向切割目标 RNA 序列。迄今为止 Cas13 蛋白家族中, Cas13a 和 Cas13b 是已证明可以靶向切割 RNA 的有力工具^[10-11]。Cox 等^[10] 的结

果显示 Cas13b 拥有比 Cas13a 更高效的 RNA 抑制效率。Rashid 等^[12] 利用 Cas13a 系统成功干扰芜菁花叶病毒 (Turnip mosaic virus, TuMV) 的感染, 首次证实了该系统对植物 RNA 病毒的抑制能力。基于这些对 CRISPR/Cas13 系统的研究, 本研究以 CRISPR/Cas13b 系统为基础, 根据 PEDV 基因组的保守区域设计多个 CRISPR/Cas13b 系统打靶 crRNA, 旨在筛选出有效的 crRNA 以实现 PEDV 体外增殖的有效抑制。本研究为后续开发有效的 PEDV 治疗手段, 建立 PEDV 抗性动物提供了一种新的候选研究手段。

1 材料与方法

1.1 材料

质粒: CRISPR/Cas13b 基因编辑载体 pC0043-PspCas13b crRNA backbone (Addgene 编号: 103854)、pC0046-EF1a-PspCas13b-NES-HIV (Addgene 编号: 103862) 购于 Addgene 公司, 无 PEDV 污染的 Vero 细胞由温氏研究院保存; PEDV ST2 毒株由温氏研究院分离保存。

试剂: 质粒小提试剂盒 (Biomiga, 广州), 胶回收试剂盒 (OMEGA, 广州), 病毒 RNA 抽提试剂盒 (Magen, 上海), Premix Ex Taq DNA 聚合酶、SYBR Green Ex Taq 酶、Primer Script RT Master Mix (Takara Biotechnology, 大连), T4 连接酶 (New England Biolabs, 美国), *Bbs*I 内切酶 (Thermo Fisher, 美国), 感受态细胞 TOP10 (唯地生物, 上海), Lipofetamine 3000 转染试剂、Alexa Fluor 594 标记羊抗兔二抗 (Invitrogen, 美国), PEDV 单克隆抗体 (JENO, 韩国), 无 EDTA 胰酶、Opti-MEM、DMEM、FBS 等细胞培养试剂 (Gibco, 美国)。

1.2 试验方法

1.2.1 crRNA 的设计与合成 通过查找近年国内流行 PEDV 的序列, 进行多重比对, 寻找其保守序列, 设计出多条基于 Cas13b 打靶系统的 crRNA。crRNA 长度 28 nt, 无特定 PAM 位点需求。将所设计的 crRNA 序列及其互补链序列分别加上与 *Bbs*I 酶切

位点相匹配的黏性末端,合成相应的寡聚核苷酸。

1.2.2 CRISPR/Cas13b系统打靶质粒的制备 用 *BbsI* 酶切 crRNA 骨架质粒。酶切体系为: *BbsI* 酶 2 μL , 10 \times buffer 2 μL , 质粒 (717 ng/ μL) 3 μL , 无菌水补至 20 μL , 37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下反应 2 h。酶切产物经电泳鉴定酶切完全后,切胶回收线性化载体片段用于下游连接。

合成的 crRNA 寡聚核苷酸经过退火复性形成双链 DNA。退火体系和程序如下: 互补寡聚核苷酸 (10 nmol/L) 各取 5 μL 混合, 95 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 10 $^{\circ}\text{C}$ 3 min, 3 个循环; 95 $^{\circ}\text{C}$ 3 min。退火后形成的双链 DNA 与 *BbsI* 酶切后线性化的骨架质粒以 T4 连接酶进行连接, 反应体系如下: T4 连接酶 1 μL , 线性化载体 1 μL , 退火双链 2 μL , 补充无菌水至 10 μL , 16 $^{\circ}\text{C}$ 条件下连接过夜。连接后的质粒转化感受态

细胞 Top10, 挑取单菌落扩大培养后进行鉴定。由于 crRNA 片段很短, 无法通过酶切进行鉴定, 因此我们采用合成的 crRNA 作为一侧引物, 并在载体上设计一段序列作为另一侧引物, 采用二者进行 PCR 扩增时, 阳性质粒可以扩增出片段。我们通过菌液 PCR 鉴定质粒是否构建正确, 菌液 PCR 鉴定引物如表 1, PCR 反应体系如下: 菌液 1 μL , 上下游引物 (10 nmol/L) 各 0.6 μL , 2 \times Ex *Taq* 酶 10 μL , 补充无菌水至 20 μL , 引物序列如表 1 所示。PCR 反应程序: 94 $^{\circ}\text{C}$ 5 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 20 s, 58 $^{\circ}\text{C}$ 20 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 20 s, 30 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$, 5 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存, 菌液 PCR 鉴定为阳性的菌落进行序列测定以确定质粒序列是否正确。阳性质粒分别命名为 U6-crRNA1、U6-crRNA2、U6-crRNA3 和 U6-crRNA4。大量抽提质粒用于后续转染试验。

表 1 用于 PCR 鉴定 crRNA 插入的引物序列

Table 1 Primer sequences for identifying positive crRNA insertion in PCR

靶点 Target	正向引物序列(5'→3') Forward primer sequence	反向引物序列(5'→3') Reverse primer sequences
crRNA1	GAGGGCCTATTTCCCATGATT	CAACACTGCTAGTGAAGCCGTCTCATACTATTCT
crRNA2	GAGGGCCTATTTCCCATGATT	CAACCCAATACATGTGTGGCGCTGACGGGAAACC
crRNA3	GAGGGCCTATTTCCCATGATT	CAACCCAGAAGGTTTTAGTTTTAATAATTGGTTT
crRNA4	GAGGGCCTATTTCCCATGATT	CAACATGGTAACTCTCGTTGTAAACAATTACTC

1.2.3 PEDV 病毒培养和 TCID₅₀ 测定病毒滴度 PEDV 在 Vero 细胞上以含 7%(ϕ) 胰酶的无血清 DMEM 培养, 至细胞完全病变后收取全部上清和细胞, 反复冻融 3 次以促进病毒释放, 再分装后冻存于 -80 $^{\circ}\text{C}$ 备用。测定病毒滴度时, 将长势良好的 Vero 细胞接种于 96 孔板, 加入 100 μL 以含 7%(ϕ) 胰酶的无血清 DMEM 培养基进行 10 倍梯度稀释的 PEDV 病毒液, 病毒液稀释梯度为 10^{-1} ~ 10^{-7} , 每个稀释度接种 5 孔, 观察一周的病变情况, 应用 Reed-Muench 法计算病毒的 TCID₅₀。

1.2.4 CRISPR/Cas13b 转染 Vero 细胞在转染前 1 天消化铺板。将长势良好的细胞消化后均匀铺至 24 孔板, 用含 10%(ϕ)FBS 的 DMEM 培养基在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、CO₂ 体积分数为 5% 的培养箱中培养, 待细胞汇合度达到 70%~90% 时, 弃掉原有培养皿中的培养液, 每孔加入 300 μL 新鲜培养液以备转染。按照 Lipofectamine 3000 转染试剂说明书以如下步骤转染: 将 1.5 μL Lipofectamine 3000 用 25 μL Opti-MEM 稀释, 另取 25 μL Opti-MEM 稀释转染质粒 (每孔 500 ng) 和 P3000 (每孔 1 μL), 将二者混合后室温下静置 10~15 min, 混合物加入含 300 μL 培养基的 24 孔板中, 混匀后

静置培养。其中构建好的打靶质粒 U6-crRNA 和 Cas13b 质粒共转染 Vero 细胞为试验组, 对照组则转入空白 crRNA 和 Cas13b 质粒, 每个转染组重复 3 孔。

1.2.5 病毒感染 转染 48 h 后, 弃掉含脂质体培养液并用 PBS 缓冲液清洗转染细胞 3 遍, 以每孔 400 μL 含有感染复数 (Multiplicity of infection, MOI)=0.001 的 PEDV 病毒液接种细胞, 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中感染 1 h, 然后弃去病毒液, 以 PBS 缓冲液洗涤细胞 3 遍, 加入 500 μL 含胰酶的 DMEM 培养基继续培养。

1.2.6 免疫荧光试验 病毒感染细胞 24 h 后, 以免疫荧光 (Immunofluorescence assay, IFA) 检测病毒的增殖情况。用体积分数为 4% 的多聚甲醛溶液固定细胞 10 min, PBS 缓冲液清洗 3 次, 每次 5 min。用体积分数为 0.3% 的 Triton 溶液透化细胞 10 min, PBS 缓冲液清洗 3 次, 每次 5 min。以 3 g/mL BSA 溶液室温封闭 2 h, 然后加入 PEDV 抗体于 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下孵育过夜。次日弃去抗体液, 用 PBS 缓冲液清洗 3 次, 每次 5 min, 而后加入以 PBS 缓冲液按 1:500 的体积比稀释的 Alexa Fluor 594 标记二抗,

于室温孵育 2 h, PBS 缓冲液漂洗后于荧光显微镜下观察病毒的感染情况。

1.2.7 荧光定量 PCR 检测细胞上清病毒含量 病毒感染 24 h 的细胞上清按照 Magen 病毒 RNA 抽提试剂盒抽提病毒 RNA, 抽提相同体积上清液的病毒以保证后续定量操作的一致性。以反转录试剂盒反转录成 cDNA, 反转录程序为: 37 °C 15 min, 85 °C 5 s。cDNA 用无菌水稀释 10 倍后用于相对荧光定量 PCR, 根据 Miller 等^[13] 的报道设计 PEDV 检测用 PCR 引物:

PEDV-Forward: GAATTCCCAAGGGCGA
AAAT;

PEDV-Reverse: TTTTCGACAAATTCCGC
ATCT。

定量 PCR 反应体系为: SYBR Green Ex *Taq* 酶

10 μL, 上下游引物 (10 nmol/L) 各 0.8 μL, ROX 0.4 μL, cDNA 2 μL, 无菌水补充至 20 μL。定量 PCR 程序为: 95 °C 30 s; 95 °C 15 s, 60 °C 1 min, 40 个循环。同时设置无菌水为阴性对照。定量结果用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算相对病毒 RNA 含量。

1.2.8 数据分析 试验数据利用 “SPSS for Windows 21.0” 统计软件进行了数据差异性检验, 采用 Duncan's 法进行组间的多重比较分析。

2 结果与分析

2.1 U6-crRNA 载体构建

根据病毒基因组设计的 crRNA 序列和位点见表 2, 其中靶点 1 和 2 靶向 PEDV *polI* 基因, 靶点 3 和 4 靶向 *S* 基因。

表 2 CRISPR/Cas13b 靶向 PEDV 病毒 RNA 的 crRNA 序列
Table 2 The crRNA sequences of CRISPR/Cas13b targeting PEDV RNA

靶点编号 Target number	对应 PEDV 基因组位点/bp Corresponding genomic loci of PEDV	crRNA 序列(5'→3') crRNA sequence
1	364~392	ACTGCTAGTGAAGCCGTCTCATACTATTCT
2	645~674	CCAATACATGTGTGGCGCTGACGGGAAACC
3	21 395~21 424	CCAGAAGGTTTTAGTTTTAATAATTGGTTT
4	23 085~23 114	ATGGTAACTCTCGTTGTAAACAATTACTCA

将 crRNA 序列经过复性后形成带 2 个黏性末端的双链 DNA, 和 *Bbs*I 酶切线性化后的 U6-crRNA 骨架质粒 (图 1) 进行连接构建 U6-crRNA1、U6-crRNA2、U6-crRNA3 和 U6-crRNA4 载体 (分别对应靶点 1~4)。重构质粒

经菌落 PCR 鉴定正确 (图 2)。测序结果如图 3 所示, 显示插入 crRNA 序列正确。

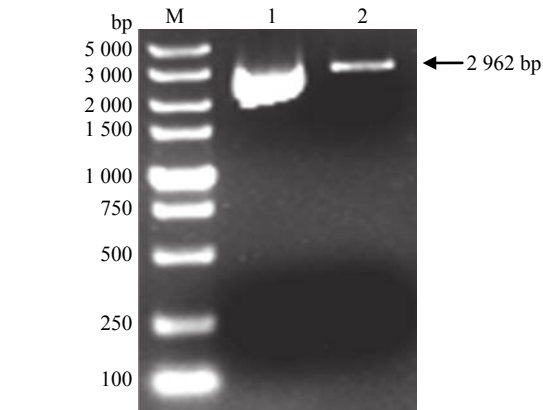


图 1 *Bbs*I 酶切 U6-crRNA 骨架载体电泳图谱

M: DNA Marker 5000; 1: U6-crRNA backbone plasmid; 2: *Bbs*I digestion of U6-crRNA backbone plasmid

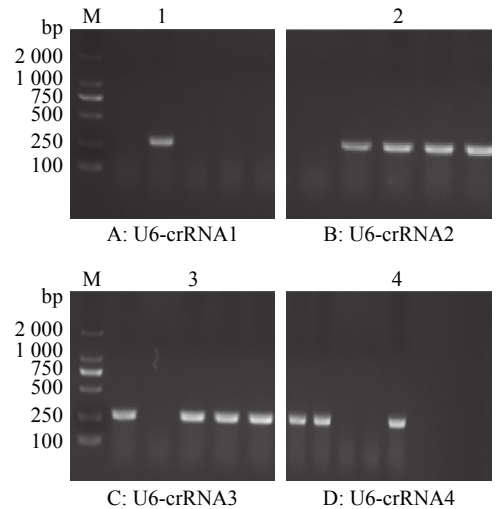


图 2 crRNA 连接入骨架载体的阳性质粒 PCR 鉴定

M: DNA Marker 2000; Positive PCR band indicates U6-crRNA vector with successful crRNA insertion; Clone 1, 2, 3 and 4 are four crRNA vectors selected for subsequent cell experiments

将 crRNA 序列经过复性后形成带 2 个黏性末端的双链 DNA, 和 *Bbs*I 酶切线性化后的 U6-crRNA 骨架质粒 (图 1) 进行连接构建 U6-crRNA1、U6-crRNA2、U6-crRNA3 和 U6-crRNA4 载体 (分别对应靶点 1~4)。重构质粒

经菌落 PCR 鉴定正确 (图 2)。测序结果如图 3 所示, 显示插入 crRNA 序列正确。

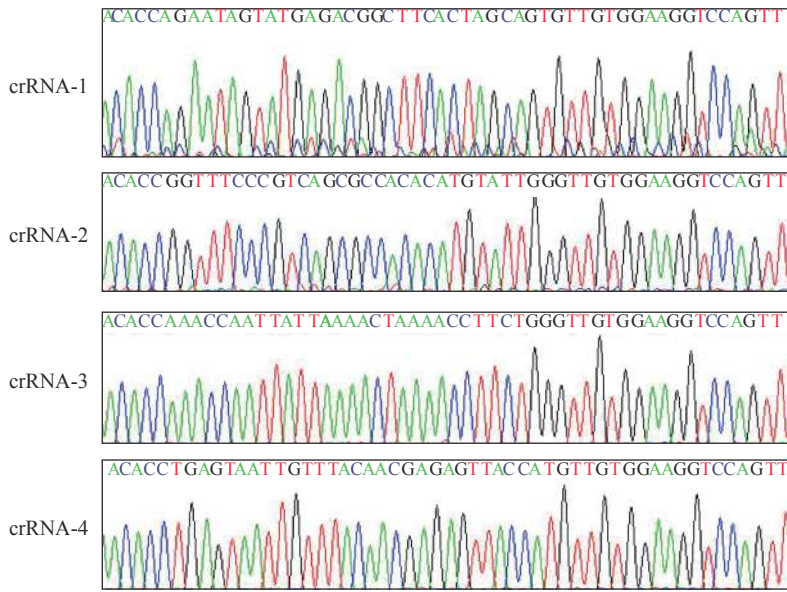


图 3 U6-crRNA 靶向质粒测序结果

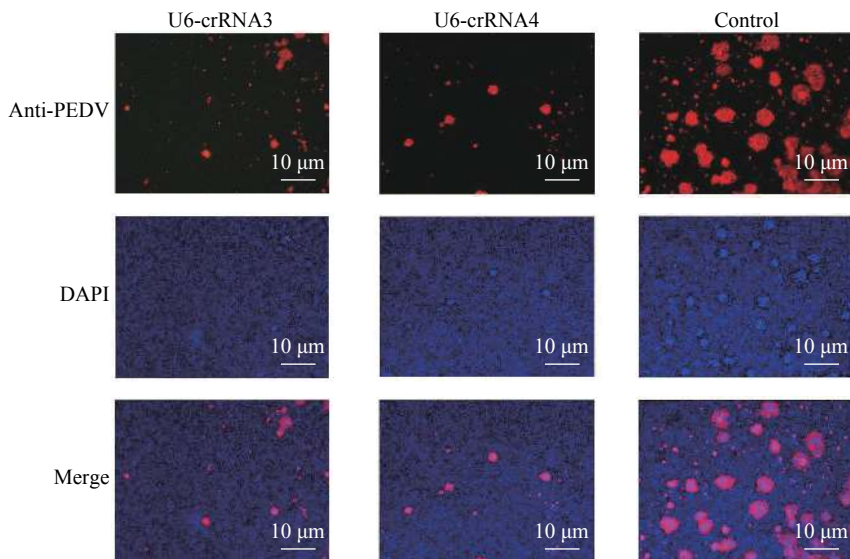
Fig. 3 Sequencing results of U6-crRNA targeting plasmids

2.2 U6-crRNA 和 Cas13b 质粒共转染 Vero 细胞抑制 PEDV 的增殖

2.2.1 IFA 检测细胞中 PEDV 增殖情况 由于 Vero 细胞转染效率有限, 我们在预试验中以相同大小的带荧光蛋白的质粒进行脂质体共转染, 确定优化的转染参数。然后我们以相同的转染条件对 U6-crRNA 和 Cas13b 质粒进行 Vero 细胞共转染。将 PEDV ST2($10^{-3.6}$ TCID₅₀/mL) 以 MOI=0.001 的稀释度接种于转染 48 h 后的 Vero 细胞, 24 h 后用 IFA 检测细胞的病毒感染情况。结果显示在 24 h 后, 转染 U6-crRNA3 和 U6-crRNA4 打靶质粒的细

胞中红色荧光团 (代表 PEDV 感染细胞) 与对照组 (转染空白 crRNA 和 Cas13b 质粒细胞) 相比明显减少 (图 4), 而 U6-crRNA1 和 U6-crRNA2 组的荧光强度则和对照组差异不大。

2.2.2 定量 PCR 检测细胞上清中病毒增殖情况 细胞转染 48 h 后以 MOI=0.001 的 PEDV 感染, 24 h 后收取上清用定量 PCR 检测细胞上清中的病毒增殖情况。定量 PCR 结果显示转染 U6-crRNA3 和 U6-crRNA4 打靶质粒的细胞组其 PEDV Ct 值明显大于对照组 Ct 值, 显示了有效的 PEDV 抑制效果; 而 U6-crRNA1 和 U6-crRNA2 组 Ct 值与对照组无



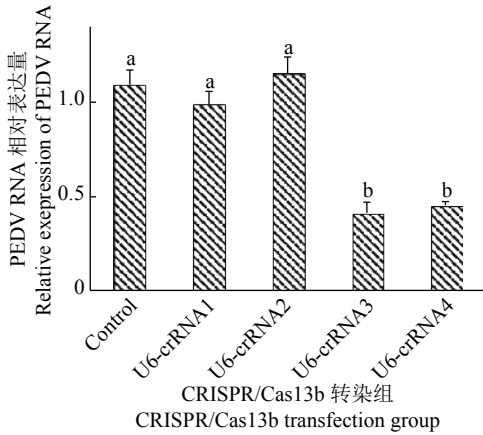
Vero 细胞与 PEDV 抗体和红色荧光标记的二抗反应 (红色), 并以 DAPI 进行细胞核复染 (蓝色)

Vero cells were labelled with anti-PEDV antibody and further incubated with red fluorescence conjugated secondary antibody (Red); Cell nuclei were counter stained with DAPI (Blue)

图 4 PEDV 感染 Vero 细胞 24 h 的病毒免疫荧光检测

Fig. 4 Viral immunofluorescence assay of Vero cells infected with PEDV for 24 h

明显差异。通过 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算, 如图 5 所示, U6-crRNA3、U6-crRNA4 组和对照组相比, PEDV 病毒含量减少了约 50%, 差异显著 ($P < 0.05$); U6-crRNA1 和 U6-crRNA2 组与对照组病毒含量差异不显著 ($P > 0.05$)。



柱子上方的不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$, Duncan's 法)

Different lowercase letters on bars indicate significant difference ($P < 0.05$, Duncan's test)

图 5 病毒感染细胞上清中 PEDV 病毒 RNA 定量 PCR 检测

Fig. 5 Quantitative PCR result of PEDV RNA in the supernatant of cells infected by the virus

3 讨论与结论

3.1 CRISPR/Cas13b 系统

在 CRISPR/Cas13 可编辑 RNA 的功能未被发现之前, RNAi 被广泛使用在基因沉默中, 即可以通过靶向同源 mRNA 实现真核生物靶基因沉默的方式^[14], 但是其脱靶率高一直被广为诟病, 而 Cas13b 酶可以在高效敲低 RNA 表达量的同时实现零脱靶效率, Cox 等^[10]指出 Cas13b 与 shRNA 干扰相比, 前者零脱靶, 后者的脱靶位点近 200 个。Cas13 酶与 Cas9、Cpf1 酶等相比, DNA 编辑会造成细胞基因组彻底的改变, 而 Cas13 酶则拥有可以敲低 RNA 而不改变基因组的特性^[15], 且相较于 RNA 干扰具有更特异更高效的优势, 这为我们在研究各种 RNA 病毒引起的疾病时提供了新的技术选择。但 Cox 等^[10]发现 Cas13a 的打靶效率不如 Cas13b 效果高, 通过设计双荧光素酶报告基因法, 将荧光素酶表达载体、Cas13a/crRNA 和荧光素酶表达载体、Cas13b/crRNA 分别转入 293 细胞中, 探测 Cas13a 和 Cas13b 对荧光信号的敲低作用, 结果表明, PspCas13b 的平均敲低率为 92.3%, LwaCas13a 的平均敲低率为 40.1%。在此基础上, 为了了解 Cas13a 和 Cas13b 在靶向内源转录物上的差异, 设计了靶向 293 细胞

KRAS 基因的 crRNA, PspCas13b 的敲低率在 60% 以上。Wolter 等^[16]认为是因为 Cas13b 在与核输出信号 (Nuclear export signal, NES) 结合后打靶效率更高, 因为 NES 调节许多来自细胞核的蛋白质的输出^[17]。近来也有 Cas13a 系统抑制植物 RNA 病毒的报道, 针对 TuMV 设计 crRNA 证明了 Cas13a 拥有可以干扰 TuMV 的能力^[10, 12, 18]。然而目前仍鲜见文章报道 Cas13b 在动物 RNA 病毒上的编辑。

3.2 影响 CRISPR/Cas13b 切割效率的原因

本研究中我们以 CRISPR/Cas13b 系统对 Vero 细胞进行瞬时转染, 验证其对 PEDV 病毒感染的敲低能力。但结果显示只有部分靶向 crRNA 能够有效抑制 PEDV 的增殖。例如 U6-crRNA3 和 U6-crRNA4 在 PEDV 增殖过程中起到了抑制作用, 但 U6-crRNA1 和 U6-crRNA2 没有达到预期中的效果。研究认为 CRISPR-Cas13b 中 crRNA-cas(crRNP) 效应因子复合体工作时受到靶向 RNA 的邻间隔序列基序 (Protospacer flanking sequence, PFS) 序列调节^[9, 19], 但现在优化后的 LwaCas13a、PspCas13b 并不需要 PFS 调节, 从结构上看 Cas13b 和 Cas13a 都有 2 个 HEPN 区用以切割靶向 RNA, 当 Cas13a 没有和靶标 RNA 结合时是失活状态, 而在向导 RNA 和靶标 RNA 相互配对后, 向导 RNA 和 Cas13a 蛋白构象发生变化引起 Cas13a 切割效应激活, 所以我们猜测不同的 crRNA 在与 Cas13b 形成复合体时会影响 Cas13b 的活性, 现行研究者们根据打靶位点会设置多个打靶 crRNA 以筛选有效的 crRNA; 又因为 Cas13a 在切割靶标 RNA 的同时也会切割非靶标的 RNA^[11, 20], 基于 Cas13b 和 Cas13a 同源性和结构相似性, 我们推测可能发生了一些非特异的切割导致不同 crRNA 的切割效率差异; 另外, PEDV 感染后的增殖速度极快, 这也限制了 CRISPR/Cas13b 系统对 PEDV 基因组的高效切割进而抑制 PEDV 的增殖。因此 CRISPR/Cas13b 系统对 RNA 病毒的切割作用仍然需要进一步的优化以提升其靶向 RNA 的干扰效率。

3.3 CRISPR/Cas13b 系统的应用

不同于 CRISPR/Cas9 系统在打靶植物番茄黄叶病毒和人乳头瘤病毒等 DNA 病毒的应用^[21-22], CRISPR/Cas13b 系统提出一种新的抗 RNA 病毒的策略。本研究对 Cas13b 系统抑制动物 RNA 病毒进行了报道, 其对 PEDV 的有效抵抗可以为开发新的 PEDV 治疗手段、制备 PEDV 抗性动物提供了新途径。同时本研究采用的 RNA 抑制策略可推广到其他多种 RNA 病毒的防控上, 为 Cas13b 系统的实际应用提供了广阔的前景, 具有广泛的适应性。

参考文献:

- [1] PENSART M B, DE BOUCKP. A new coronavirus-like particle associated with diarrhea in swine[J]. *Arch Virol*, 1978, 58(3): 243-247.
- [2] WANG D L, FANG L R, XIAO S B. Porcine epidemic diarrhea in China[J]. *Virus Res*, 2016(226): 7-13.
- [3] HUANG Y W, DICKERMAN A W, PINEYRO P, et al. Origin, evolution, and genotyping of emergent porcine epidemic diarrhea virus strains in the United States[J]. *MBio*, 2013, 4(5): e713-e737.
- [4] HSU T, LIU H, CHIN C, et al. Detection, sequence analysis, and antibody prevalence of porcine deltacoronavirus in Taiwan[J]. *Arch Virol*, 2018, 163(11): 3113-3117.
- [5] SONG D, MOON H, KANG B, et al. Porcine epidemic diarrhea: A review of current epidemiology and available vaccines[J]. *Clin Exp Vaccine Res*, 2015, 4(2): 166-176.
- [6] 陈申秒, 牛成明, 何福庆, 等. 猪流行性腹泻病毒研究进展及疫苗应用前景[J]. *中国畜牧兽医*, 2014(3): 223-229.
- [7] ABUDAYYEH O O, GOOTENBERG J S, KONERMANN S, et al. C2c2 is a single-component programmable RNA-guided RNA-targeting CRISPR effector[J]. *Science*, 2016, 353(6299): aaf5573.
- [8] MAKAROVA K S, WOLF Y I, ALKHNABASHI O S, et al. An updated evolutionary classification of CRISPR-Cas systems[J]. *Nat Rev Microbiol*, 2015, 13(11): 722-736.
- [9] YAN W X, CHONG S, ZHANG H, et al. Cas13d is a compact RNA-targeting Type VI CRISPR effector positively modulated by a WYL-domain-containing accessory protein[J]. *Mol Cell*, 2018, 70(2): 327-339.
- [10] COX D B T, GOOTENBERG J S, ABUDAYYEH O O, et al. RNA editing with CRISPR-Cas13[J]. *Science*, 2017, 358(6366): 1019-1027.
- [11] ABUDAYYEH O O, GOOTENBERG J S, ESSLET-ZBICHLER P, et al. RNA targeting with CRISPR-Cas13[J]. *Nature*, 2017, 550(7675): 280-284.
- [12] AMAN R, ALI Z, BUTT H, et al. RNA virus interference via CRISPR/Cas13a system in plants[J]. *Genome Biol*, 2018, 19(1): 1-9.
- [13] MILLER L C, CRAWFORD K K, LAGER K M, et al. Evaluation of two real-time polymerase chain reaction assays for porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) to assess PEDV transmission in growing pigs[J]. *J Vet Diagn Invest*, 2016, 28(1): 20-29.
- [14] TIJSTERMAN M, PLASTERK R H. Dicers at RISC: The mechanism of RNAi[J]. *Cell*, 2004, 117(1): 1-3.
- [15] 肖婧, 张宗德. CRISPR 技术: 一个新型基因编辑工具所引发的革命[J]. *华西医学*, 2018, 33(8): 943-949.
- [16] WOLTER F, PUCHTA H. The CRISPR/Cas revolution reaches the RNA world: Cas13, a new Swiss army knife for plant biologists[J]. *Plant J*, 2018, 94(5): 767-775.
- [17] MCBRIDE K M. Nuclear export signal located within the DNA-binding domain of the STAT1 transcription factor[J]. *EMBO J*, 2000, 19(22): 6196-6206.
- [18] GOOTENBERG J S, ABUDAYYEH O O, LEE J W, et al. Nucleic acid detection with CRISPR-Cas13a/C2c2[J]. *Science*, 2017, 356(6336): 438-442.
- [19] TERNS M P. CRISPR-based technologies: Impact of RNA-targeting systems[J]. *Mol Cell*, 2018, 72(3): 404-412.
- [20] LIU L, LI X, MA J, et al. The molecular architecture for RNA-guided RNA cleavage by Cas13a[J]. *Cell*, 2017, 170(4): 714-726.
- [21] ALI Z, ABULFARAJ A, IDRIS A, et al. CRISPR/Cas9-mediated viral interference in plants[J]. *Genome Biol*, 2015, 16(1): 238-249.
- [22] SCHINDELE P, WOLTER F, PUCHTA H. Transforming plant biology and breeding with CRISPR/Cas9, Cas12 and Cas13[J]. *FEBS Lett*, 2018, 592(12): 1954-1967.

【责任编辑 庄延】