

# CRISPR/Cas9切割痘病毒DNA抑制病毒复制

王娇娇<sup>1</sup> 张新敏<sup>1</sup> 倪爱民<sup>2</sup> 章康健<sup>2</sup> 刘新垣<sup>1,2</sup> 刘锡君<sup>3\*</sup>

(<sup>1</sup>浙江理工大学生命科学院新元医学与生物技术研究所, 杭州 310018; <sup>2</sup>中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所, 上海 200031; <sup>3</sup>同济大学附属第十人民医院泛血管疾病研究所, 上海 200072)

**摘要** 当前, CRISPR/Cas9系统靶向痘病毒的相关研究鲜有报道。该文采用了CRISPR/Cas9基因组定点编辑技术, 以痘病毒为研究对象。在重组痘病毒WR-EGFP中针对EGFP基因序列设计不同靶点gRNAs, 转染Cas9/gRNA质粒, 同时感染WR-EGFP痘病毒, 随后观察EGFP荧光表达、提取病毒基因组, 通过PCR进行切口鉴定并运用错配酶切法验证CRISPR/Cas9对痘病毒靶点DNA切割的切口修复情况。与单独感染WR-EGFP组相比, 转染了Cas9/gRNA174和Cas9/gRNA175质粒的EGFP荧光强度明显降低, 表明CRISPR/Cas9抑制WR-EGFP病毒中EGFP基因的表达。相对定量PCR及错配酶切实验结果显示, CRISPR/Cas9切割靶点导致WR-EGFP病毒基因组产生了切口, 并且存在DNA错配修复现象。最后, 通过结晶紫染色法测定痘病毒的滴度, 结果显示, 经CRISPR/Cas9处理组的痘病毒滴度显著下降, 即CRISPR/Cas9能够使痘病毒的复制能力显著地降低。综上所述, CRISPR/Cas9切割痘病毒基因组DNA并且抑制痘病毒复制。

**关键词** CRISPR/Cas9; 痘病毒; 靶向切割; 病毒复制

## CRISPR/Cas9 Cleavage of Viral DNA Efficiently Suppresses Vaccinia Viruses

Wang Jiaojiao<sup>1</sup>, Zhang Xinmin<sup>1</sup>, Ni Aiming<sup>2</sup>, Zhang Kangjian<sup>2</sup>, Liu Xinyuan<sup>1,2</sup>, Liu Xijun<sup>3\*</sup>

(<sup>1</sup>Xin Yuan Institute of Medicine and Biotechnology, College of Life Sciences, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China;

<sup>2</sup>Institute of Biochemistry and Cell Biology, Shanghai Institutes for Biological Sciences, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China; <sup>3</sup>Institute of Pan-vascular Diseases, Shanghai Tenth People's Hospital, Tongji University, Shanghai 200072, China)

**Abstract** Previous study had shown that viral genomes could be edited effectively using CRISPR/Cas9-mediated genomic editing technique. However, the precise edit to viruses with large DNA genomes, such as vaccinia viruses by CRISPR/Cas9 system has not been reported. To explore the effects of genetic inactivation or mutation on vaccinia viral replication, the recombinant virus armed with a nonessential enhanced green fluorescent protein (EGFP) gene (WR-EGFP) was selected as the object of study here. Two guide RNAs were designed to target the coding region of EGFP gene. Fluorescence microscopy result showed that expression of EGFP significantly decreased in cells that both infected with WR-EGFP viruses and transfected with Cas9/gRNA plasmids, compared with control group that only infected with WR-EGFP. The Cas9/gRNA could induce site-specific cleavage of EGFP gene, thus caused mismatch repair of DNA viral genomes which were detected by SURVEYOR assay. Moreover, the mismatch repair of DNA sequence in virus resulted in losing the ability of virus replication. Taken together,

收稿日期: 2016-01-26 接受日期: 2016-03-10

国家自然科学基金(批准号: 31301064)和同济大学青年优秀人才培养行动计划(批准号: 2015KJ056)资助的课题

\*通讯作者。Tel: 18917688580, E-mail: liuxijun00@126.com

Received: January 26, 2016 Accepted: March 10, 2016

This work was supported by National Natural Science Foundation of China (Grant No.31301064) and Tongji University Outstanding Youth Program (Grant No.2015KJ056)

\*Corresponding author. Tel: +86-18917688580, E-mail: liuxijun00@126.com

网络出版时间: 2016-04-14 15:59:04

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20160414.1559.006.html>

the CRISPR/Cas9 system was a highly efficient strategy for editing the recombinant vaccinia viral genomes which could significantly inhibit the replication of virus.

**Keywords** CRISPR/Cas9; vaccinia viruses; targeted cutting; virus replication

CRISPR(clustered regularly interspaced short palindromic repeats)系统是从原核生物中发现的,研究证实,CRISPR系统不仅参与原核细胞免疫适应性,而且在细菌和噬菌体之间相互关系的进化中也发挥着重要作用<sup>[1-3]</sup>。CRISPR属于特殊的DNA重复序列家族,通常由短的高度保守的重复序列组成,重复序列一般长约21~48 bp<sup>[4]</sup>。重复序列之间被间隔序列所隔开,其间隔序列长度受细菌种类和CRISPR位点影响。经过Shalem等<sup>[5]</sup>和Ran等<sup>[6]</sup>的进一步开发发现,CRISPR系统可以高效并准确地编辑DNA,目前有关此类的相关研究,如克服CRISPR/Cas脱靶现象、提高DNA编辑效率等方面,还在进一步发展中。

当前就研究基因功能而言,定点修饰已然成为重要的手段之一,因此这类技术也成为现代生物学的研究热点。CRISPR/Cas9是继第一代人工核酸内切酶——锌指核酸酶(zinc-finger nucleases, ZFN)和第二代人工核酸内切酶——转录激活因子样效应因子核酸酶(transcription activator-like effector nucleases, TALEN)后产生的第三代人工核酸内切酶,可用于各种复杂基因组的定点修饰,修饰类型包括基因的定点突变、基因定点插入、多个位点同时突变和小片段的缺失<sup>[7-8]</sup>。目前,CRISPR/Cas9已成功应用于小鼠、斑马鱼和人类细胞甚至细菌的基因组精确编辑<sup>[9]</sup>。由于CRISPR/Cas9技术具有突变效率高、制作简单而且成本低廉等优势,已被公认为是一种具有广阔应用前景的基因组定点改造分子工具。CRISPR/Cas9对病毒基因组的编辑相继也有报道,而痘病毒具有较大的基因组,作为基因载体和一种溶瘤病毒已被用于溶瘤病毒靶向基因病毒研究中。因此,本论文以痘病毒为研究对象探究CRISPR/Cas9是否可以应用于痘病毒,以期为研发重组痘病毒提供方法学基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

痘病毒WR(Western Reserve)株由浙江省医学科学院阎辉教授提供。痘病毒WR-EGFP病毒由本实验室构建。人胚肾细胞株HEK293细胞购于中

国科学院上海细胞库。Cas9/gRNA构建试剂盒购于北京唯尚立德公司。T7E1核酸内切酶购于NEB公司。DMEM培养液、胎牛血清FBS购于Gibco公司。血液基因组DNA抽提试剂盒购于上海捷瑞生物工程有限公司。质粒DNA小量抽提试剂盒、细胞裂解液IP lysis、2×Taq PCR Master MIX、AceQ qPCR SYBR® Green Master Mix购于北京天根生化科技公司。胰蛋白酶细胞消化液购于碧云天生物技术有限公司。Proteinase K、RNase A购于上海生工生物工程有限公司。KOD高保真酶购于Axygen公司。Lipofectamine™ 2000转染试剂购于美国Thermo Fisher Scientific公司。ReverTra Ace qPCR RT Kit购于Toyobo公司。

### 1.2 细胞培养

人胚肾细胞株HEK293细胞属于贴壁培养的细胞,当细胞长满至80%~90%,用胰蛋白酶细胞消化液消化2~3 min,在显微镜下观察细胞呈现单个分散状态,用带血清的DMEM终止消化,传代于10 cm培养皿中,加入含10%胎牛血清的DMEM培养液,置于37 °C、5% CO<sub>2</sub>恒温培养箱中培养。

### 1.3 仪器

所用实验仪器设备有:倒置荧光显微镜(IX-71)(购于日本Olympus公司)、定量PCR仪(7300)(购于美国ABI公司)、PCR仪(2720)(购于基因有限公司)、倒置显微镜(IX50)(购于日本Olympus公司)、水平电泳槽(HE-120)(购于上海天能科技有限公司)、生物安全柜(Nuaire 425-400)(购于上海莱睿科技仪器有限公司)、细胞计数仪(mini-004-0155)(购于美国Nexcelom公司)、二氧化碳培养箱(BBG16UV151L)(购于德国Heraeus公司)、液氮罐(Director 4000)(购于英国ICI公司)、凝胶成像仪(G/S2500)(购于上海天能科技有限公司)。

### 1.4 质粒的构建

首先设计gRNA的靶点,EGFP基因(1~1 058 bp)的174位gRNA靶点引物为174-Sense: 5'-AAA CAC CGG CAC CGG AGC GCA CCA TCT TCT TCA-3'和174-Antisense: 5'-CTC TAA AAC AAA CTG AAG AAG ATG GTG CGC TCC-3'。EGFP的175位gRNA

靶点引物为175-Sense: 5'-AAA CAC CGG CAC CGC TGA AGC ACT GCA CGC CGT-3'和175-Antisense: 5'-CTC TAA AAC AAA CAC GGC GTG CAG TGC TTC AGC-3'。构建Cas9/gRNA质粒, 第一步合成oligos二聚体, 引物浓度稀释至10  $\mu\text{mol/L}$ , 反应体系为: Target-Sense 1  $\mu\text{L}$ 、Target-Antisense 1  $\mu\text{L}$ 、Solution I 5  $\mu\text{L}$ 、加 $\text{H}_2\text{O}$ 至10  $\mu\text{L}$ 。反应条件为: 95  $^\circ\text{C}$  3 min; 95  $^\circ\text{C}$ 到25  $^\circ\text{C}$ 缓慢冷却; 16  $^\circ\text{C}$  5 min。第二步将oligos二聚体插入到载体中, 反应体系为: Cas9/gRNA 1  $\mu\text{L}$ 、oligos二聚体2  $\mu\text{L}$ 、加 $\text{H}_2\text{O}$ 至10  $\mu\text{L}$ , 充分混匀后, 室温(25  $^\circ\text{C}$ )静置5 min。第三步将2  $\mu\text{L}$ 反应产物转化到100  $\mu\text{L}$  DH5 $\alpha$ 感受态细胞中挑取单克隆。第四步阳性克隆的鉴定, 挑4~6个单克隆菌落, 取一部分菌种保存, 其余提取质粒DNA进行测序鉴定(由桑尼公司负责测序)。测序引物: 5'-TGA GCG TCG ATT TTT GTG ATG CTC GTC AG-3'。将测序结果进行比对, 阳性克隆质粒进行大量抽提。

### 1.5 病毒感染细胞和荧光检测

取对数生长期的HEK293细胞, 经过胰酶消化后, 以 $5 \times 10^5$ /孔的密度接种于6孔板, 置于培养箱中培养过夜。次日加入病毒WR-EGFP感染复数(multiplicity of infection, MOI)=1的病毒剂量感染2 h, 吸掉培养液, 用PBS洗2遍后分别转染Cas9/gRNA174和Cas9/gRNA175质粒, 每组实验均设有阴性对照Mock组(不加病毒和质粒)和阳性对照组(只加病毒)。从感染WR-EGFP开始, 24 h后置细胞培养板于倒置荧光显微镜下拍照(488 nm波长激发光)。

用Lipofectamine<sup>TM</sup> 2000 DNA转染试剂转染Cas9/gRNA174和Cas9/gRNA175质粒步骤如下: 分别取4  $\mu\text{g}$ 质粒Cas9/gRNA174和Cas9/gRNA175 DNA质粒于EP管中, 以无血清DMEM稀释至150  $\mu\text{L}$ , 轻轻混匀; 取两个EP管, 分别加10  $\mu\text{L}$  Lipofectamine<sup>TM</sup> 2000, 并用无血清的DMEM稀释至150  $\mu\text{L}$ , 震荡混匀, 室温孵育5 min; 将DNA悬液和Lipofectamine<sup>TM</sup> 2000混合液加在一起总体积为300  $\mu\text{L}$ , 轻轻混匀, 室温孵育20 min; 将300  $\mu\text{L}$ 混合液加到6孔板中, 前后左右晃动6孔板, 充分混匀, 置于37  $^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$ 恒温培养箱中培养, 6 h后换液, 24 h后在荧光显微镜下观察荧光, 拍照记录。

### 1.6 病毒滴度测定

将HEK293细胞铺在6孔板中, 次日密度可达100%, 将待测病毒做 $10^{-7}$ ~ $10^{-1}$ 的梯度稀释。将分装

好的100  $\mu\text{L}$ 痘苗病毒与等体积的0.25 mg/mL胰蛋白酶混合, 37  $^\circ\text{C}$ 水浴锅中充分混匀30 min, 每10 min需要进行震荡以使病毒尽量分散, 之后取100  $\mu\text{L}$ 进行梯度稀释。为防止产生大量气泡, 一般使用无血清的液体培养基将病毒进行稀释。将6孔板中原本的液体培养基吸去, 加入稀释的病毒1 mL,  $10^{-7}$ ~ $10^{-5}$ 每个稀释梯度做复孔, 每孔加液体培养基至总体积为2 mL。感染48 h后吸去液体培养基, 每孔加500  $\mu\text{L}$  2%结晶紫; 反应30 min后吸去结晶紫染色液, 用水漂洗。将洗好的6孔板倒扣于吸水纸上, 自然风干之后标记空斑并计数。病毒滴度的计算公式为: 病毒滴度=病毒噬斑数 $\times$ 稀释数 $\times 2$ 。

### 1.7 PCR检测病毒基因组的切口

收集细胞提取病毒DNA。以等量的病毒基因组为模板, 用表1中的引物进行PCR扩增。PCR反应条件为: 94  $^\circ\text{C}$ 预变性3 min; 94  $^\circ\text{C}$ 变性30 s, 54  $^\circ\text{C}$ 退火30 s, 72  $^\circ\text{C}$ 延伸1 min, 35个循环; 72  $^\circ\text{C}$ 延伸10 min; 4  $^\circ\text{C}$ 保存。配制1.2%的琼脂糖凝胶, 160 V下电泳20 min。用凝胶成像仪进行拍照分析。

相对定量切口比例, 以对应量总病毒DNA产物为模板进行荧光定量PCR, 以HEK293细胞中的Primer 0为内参, 以Primer 1和Primer 2为引物, 检测病毒基因组中由于Cas9切割导致切口的相对数量比。qPCR反应条件: 95  $^\circ\text{C}$ 预变性15 min; 95  $^\circ\text{C}$ 变性10 s, 55  $^\circ\text{C}$ 退火30 s, 72  $^\circ\text{C}$ 延伸32 s, 40个循环反应。

### 1.8 错配酶切法

C-端带有硫酯键的截短型无活性的T7核酸内切酶I(T7E1)与麦芽糖结合蛋白融合表达。将合成的多肽(由截短型的T7核酸内切酶I缺失的氨基酸序列构成)与上述携带硫酯键的T7E1在体外进行连接反应, 得到全长且有活性的T7核酸内切酶I。它可

表1 引物信息

Table 1 Information of primers

| 引物名称        | 序列(5'→3')                     |
|-------------|-------------------------------|
| Primer name | Primer sequences (5'→3')      |
| Primer 0F   | CGG CCC CAT GTT TTC AGG TA    |
| Primer 0R   | ATG CGT CCA TAG TCC CGT TC    |
| Primer 1F   | GGC GGA CTT GAA GAA GTC G     |
| Primer 1R   | GGA TCC ACC GGC CGG TCG       |
| Primer 2F   | GTG AAC CGC ATC GAG CTG AA    |
| Primer 2R   | TTA CTT GTA CAG CTC GTC CAT G |
| Primer 3F   | GGA TCC ACC GGC CGG TCG       |
| Primer 3R   | ACG GGG CCG TCG CCG ATG G     |

以识别并切割不完全配对DNA、十字型结构DNA、Holliday结构或交叉DNA、异源双链DNA或者以更慢的速度切割或切刻双链DNA。该酶切割错配碱基5'端的第一、第二或第三个磷酸二酯键<sup>[10]</sup>。在检测DNA突变时,可应用于CRISPR/Cas9切割形成的突变体,识别错配的DNA。

提取病毒DNA,备用于PCR错配酶切鉴定反应。以Primer 3为引物,PCR扩增出带有突变位点DNA片段,扩增长度约700 bp,突变位点最好不位于PCR片段中央,这样将切割出两条大小不同的带。突变体DNA与野生型DNA的PCR产物进行混合,进行加热变性、退火复性处理。退火反应条件:95 °C 5 min; 94 °C 2 s,每个循环梯度降温0.1 °C,200次循环; 75 °C 1 s,每个循环梯度降温0.1 °C,600次循环; 16 °C 2 min。退火后分别向每个管中加入0.5 mL T7E1,37 °C反应30 min。待反应结束后,经2%琼脂糖凝胶电泳检测分析酶切结果。

### 1.9 数据统计

本研究中所有实验独立重复3次,实验数据均以mean±S.D.形式表示,数据之间用GraphPad Prism 5软件进行统计学分析。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计

学意义。

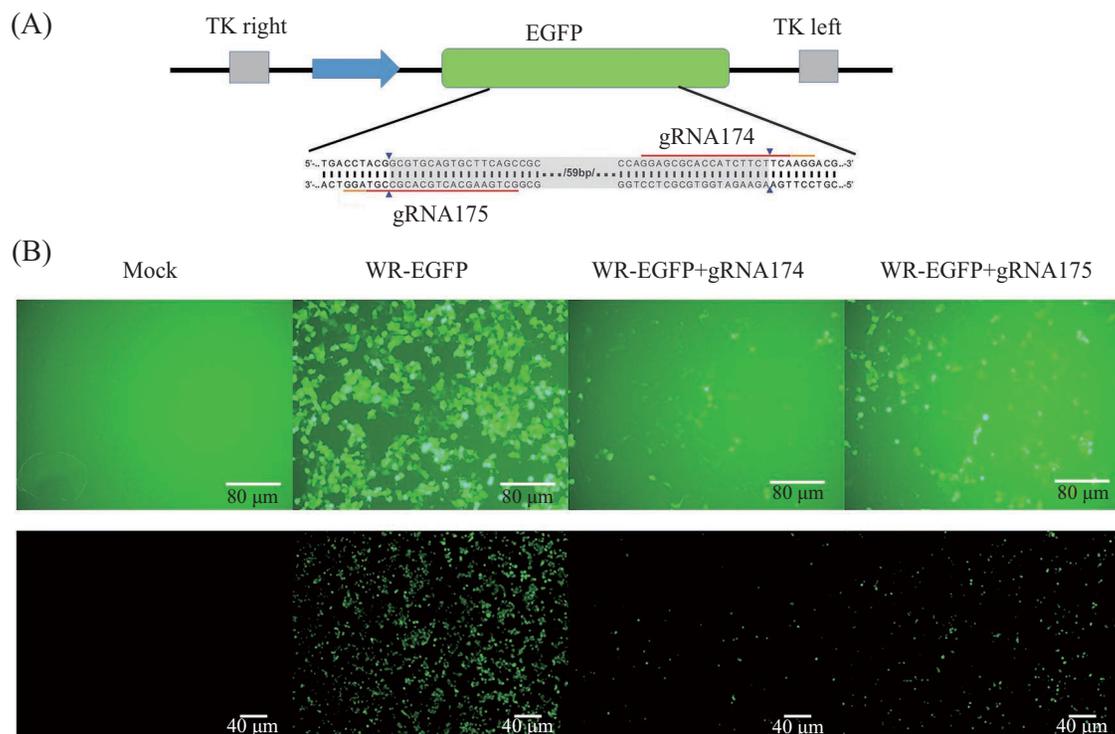
## 2 结果

### 2.1 CRISPR/Cas9抑制WR-EGFP痘病毒EGFP的表达

野生型痘苗病毒WR经过改造,在痘病毒基因胸腺嘧啶脱氧核苷激酶(thymidine kinase, TK)区插入痘病毒启动子P7.5控制EGFP基因表达框(图1A)。HEK293细胞先感染WR-EGFP病毒,再转染表达Cas9/gRNA174(gRNA174)和Cas9/gRNA175(gRNA175)质粒,以不感染病毒的细胞作为阴性对照组(Mock),只感染WR-EGFP病毒的作为阳性对照组。感染WR-EGFP 24 h后观察荧光,可以明显看到转染CRISPR/Cas9质粒的实验组荧光强度明显下降(图1B)。

### 2.2 CRISPR/Cas9能够高效切割痘病毒基因组DNA的靶位点

以等量的病毒基因组为模板,设计针对EGFP的检测引物Primer 3进行PCR扩增。条带1、2、3、4和5分别指上样量为0、5、25、50和100 ng总病毒基因组(图2A)。针对WR-EGFP病毒基因组分别设

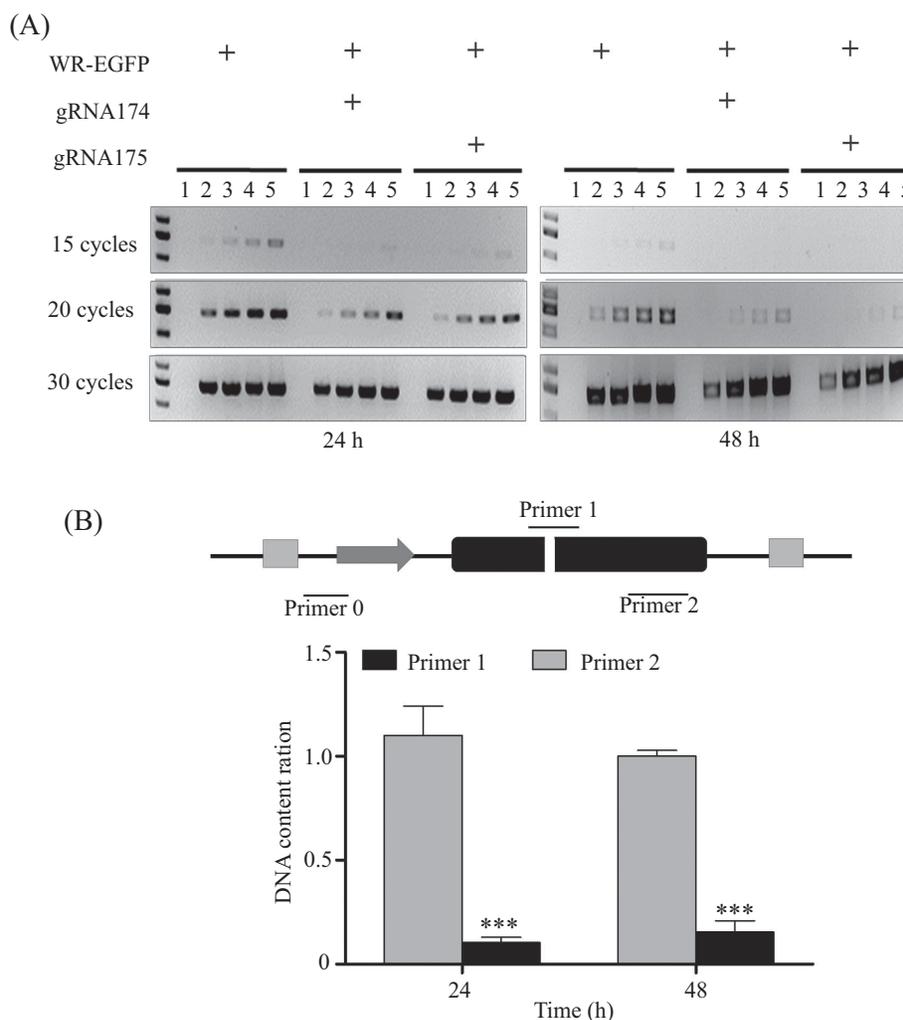


A: 重组痘病毒的结构及gRNA靶位点示意图; B: WR-EGFP病毒和CRISPR/Cas9感染细胞后荧光蛋白的表达。

A: the constructure of WR-EGFP and target sites of gRNAs; B: fluorescence protein expression after infection of WR-EGFP and/or gRNAs.

图1 CRISPR/Cas9对痘病毒WR-EGFP荧光蛋白表达的影响

Fig.1 Effects of CRISPR/Cas9 on the expression of WR-EGFP vaccinia virus



A: WR-EGFP和/或gRNAs处理EGFP不同时间的PCR鉴定结果; 1: 模板量0 ng; 2: 模板量5 ng; 3: 模板量25 ng; 4: 模板量50 ng; 5: 模板量100 ng; B: 相对定量PCR引物的位置结构图及定量结果。\*\*\* $P < 0.001$ , 与Primer 2组比较。

A: EGFP PCR results after treatment with WR-EGFP and/or gRNAs for different times; 1: 0 ng amount template; 2: 5 ng amount template; 3: 25 ng amount template; 4: 50 ng amount template; 5: 100 ng amount template; B: the structure of primers and relative quantification result. \*\*\* $P < 0.001$  vs Primer 2 group.

图2 CRISPR/Cas9能够高效切割痘病毒基因组靶位点

Fig.2 CRISPR/Cas9 could cleave the target site of vaccinia genome effectively

计三对不同的引物: 病毒载体上的引物Primer 0, 检测Cas9切口的引物Primer 1和Primer 2。以Primer 0作为内参引物, 用相对定量PCR法测定Primer 1和Primer 2引物识别的基因区域相对比值。病毒基因组中由于Cas9切割产生切口导致Primer 1引物的PCR产物明显降低(图2B)。

### 2.3 CRISPR/Cas9切割痘病毒DNA产生切口错配修复

错配酶切法测定由于CRISPR/Cas9切割导致痘病毒基因组的修复, 利用引物Primer 3进行PCR, 得到700 bp的DNA条带产物回收后再用T7E1酶切割, 箭头位置表示酶切之后的条带。根据gRNA174和

gRNA175靶向的位置不同产生切口修复后酶切条带大小也不同(图3)。

### 2.4 CRISPR/Cas9抑制痘病毒复制

在病毒感染2 h后, HEK293细胞中转染Cas9/gRNAs, 转染24 h后收集细胞测定细胞裂解液中病毒滴度。CRISPR/Cas9对痘病毒DNA基因组的切割导致病毒的生长曲线也呈现下降趋势。结果显示, gRNA指导Cas9切割痘病毒DNA导致病毒的滴度显著性地降低(图4)。

## 3 讨论

CRISPR/Cas9起初是在细菌获得性免疫系统中

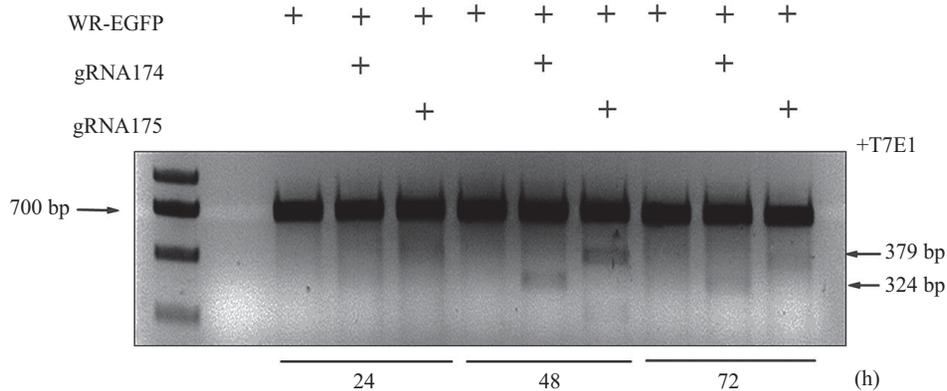
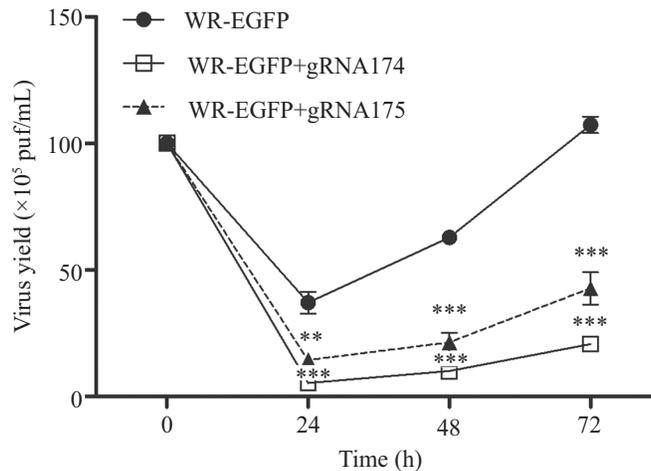


图3 CRISPR/Cas9切割痘病毒DNA产生切口错配修复

Fig.3 CRISPR/Cas9 incision to DNA of vaccinia virus caused mismatch repair



\*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ , 与WR-EGFP组比较。

\*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  vs WR-EGFP group.

图4 CRISPR/Cas9抑制痘病毒复制

Fig.4 CRISPR/Cas9 could inhibit the replication of vaccinia virus

被发现的,它能够切割外源DNA从而保护自身机体免受损伤。科研人员利用它能够对具有一定特性的DNA序列进行切割,对CRISPR/Cas9基因序列和gRNA靶点进行了优化,从而使CRISPR/Cas9在对基因组进行改造方面迅速获得广泛的应用,包括细菌、真菌酵母、植物和动物等生物有机体<sup>[9,11-13]</sup>。最近有研究表明,CRISPR/Cas9基因编辑技术不但适用于具有细胞结构的生物体,而且适用于一些非细胞生物体物种,比如非整合的DNA病毒<sup>[14-17]</sup>。Bi等<sup>[14]</sup>发现,CRISPR/Cas9可以高效编辑大基因组DNA病毒如腺病毒和疱疹病毒。Kennedy等<sup>[15]</sup>、Lin等<sup>[16]</sup>和Wang等<sup>[17]</sup>同样利用该技术对乙肝病毒(hepatitis B virus, HBV)的共价闭合环状DNA(covalently closed circular DNA, cccDNA)进行靶向编辑。但是它在

痘病毒基因组改造中的应用情况如何,目前尚无任何报道。因此我们选用了重组痘病毒作为研究对象,利用CRISPR/Cas9基因编辑技术,旨在探究该技术在痘病毒改造中的作用,为后续痘病毒载体的改造工作提供参考。CRISPR/Cas9目前还存在一个很大的缺陷就是脱靶效应,为了真正实现精确定位的CRISPR/Cas9切割,该技术的改进工作也还在继续深入中。在此,我们以WR-EGFP重组痘病毒作为研究对象,因为EGFP基因在人体和病毒基因组中有极少的内源性同源序列,能够最大限度地降低脱靶效应,并且通过EGFP的荧光可以直观明显地观察到切割后对病毒的影响,因此靶向EGFP基因序列是比较合适的选择。采用针对EGFP序列已经验证过切割效率的gRNA174和gRNA175指导Cas9靶向切割,通

过荧光显微镜观察到WR-EGFP表达的荧光强度显著性地降低,而无病毒感染对照组没有荧光,只感染病毒无转染Cas9/gRNA174质粒对照组呈现非常强的荧光。此结果表明,CRISPR/Cas9对病毒的切割后可以显著性地下调病毒基因组上EGFP的表达。在此实验基础之上,CRISPR/Cas9对痘病毒切割产生的切口用传统的PCR方法来验证痘病毒是否产生切口而导致针对该缺口的PCR反应无法扩增,结果呈现切口处的PCR产物的量明显要低于只有WR-EGFP痘病毒组。既然CRISPR/Cas9的切割使痘病毒产生了明显的切口,病毒的基因组是否可以在宿主细胞中进行切口修复,接下来通过错配酶切法验证。结果显示,痘病毒在感染24 h没有明显的切口修复,但是48 h可以产生明显的切口修复,72 h又出现微弱的修复条带。其解释可能为,48 h时可以看到gRNA靶向病毒基因组进行剪切并发生切口修复,但这些突变病毒的复制能力受到抑制,而未被切割的野生病毒因未受影响所以能够快速扩增,获得生长优势,故而在72 h检测时,因突变病毒所占比例减少,而使得SURVEYOR实验中看到酶切条带变弱。目前研究表明,痘病毒的基因组大部分都是在细胞胞质中进行复制和基因表达,可是使用的Cas9表达都携带有核定位序列和U6启动子控制的gRNA表达。由此可以推断,携带核定位的Cas9依然可以切割细胞胞质中痘病毒基因组,去掉核定位序列的Cas9是否具备更加强的病毒切割活性,还需要一系列的实验进行验证。

痘病毒基因组DNA被CRISPR/Cas9切割后依然可以进行修复,虽然现在还无法确定细胞内同源重组酶是否可以在细胞胞质中起到修复断裂DNA的作用,但通过错配酶切法验证结果发现,被切割的痘病毒基因组可以进行错配修复即细胞内非同源末端连接(non-homologous end joining, NHEJ),可能的解释是细胞胞质中存在内源性的DNA连接酶进行DNA切口链接。如果只是简单地对切口DNA进行末端连接产生新的基因型突变的痘病毒,也许可以应用到痘病毒的突变筛选过程,但是往往我们进行病毒改造是需要定向的改造,因此非同源末端连接产生新基因型突变的痘病毒的作用还有待进一步探讨。至于痘病毒基因组的切口是否可以通过重组修复(homology directed repair, HDR)这种方式进行,这就要验证同源重组系统是否会在细胞质中进行。如

果细胞核中的同源重组系统对细胞胞质中的痘病毒基因组DNA也是有修复作用的话,可以利用这一个系统快速产生重组痘病毒。因为通过CRISPR/Cas9技术抑制野生型痘病毒的复制从而提高重组病毒颗粒的比例,加快痘病毒重组子的筛选。这部分工作我们将继续探究,为CRISPR/Cas9技术应用于治疗痘病毒的感染和病毒载体改造奠定基础。

痘病毒载体具有对外源基因容纳大、免疫原性低等特点,对于转移癌的治疗具有很好的应用前景。本研究证实,CRISPR/Cas9技术可以应用于痘病毒的改造,该方法更加方便、快捷、高效,能够大大改善痘病毒改造过程中因为重组率低引起的筛选工作困难、周期长等问题,为痘病毒在基因病毒靶向治疗中的应用提供了新的支持。

### 参考文献 (References)

- 1 Barrangou R, van Pijkeren JP. Exploiting Crispr-Cas immune systems for genome editing in bacteria. *Curr Opin Biotechnol* 2015; 37: 61-8.
- 2 Kiro R, Goren MG, Yosef I, Qimron U. Crispr adaptation in *Escherichia coli* subtype E system. *Biochem Soc Trans* 2013; 41(6): 1412-5.
- 3 Stern A. CRISPR and RNA interference: Similarities across immune systems: Comment on "Diversity, evolution, and therapeutic applications of small RNAs in prokaryotic and eukaryotic immune systems" by Edwin L. Cooper and Nicola Overstreet. *Phys Life Rev* 2014; 11(1): 135-6; discussion 49-51.
- 4 Li J, Zhang Y, Chen KL, Shan QW, Wang YP, Liang Z, et al. Crispr/Cas: A novel way of RNA-guided genome editing. *Yi Chuan* 2013; 35(11): 1265-73.
- 5 Shalem O, Sanjana NE, Hartenstein E, Shi X, Scott DA, Mikkelsen TS, et al. Genome-scale CRISPR-Cas9 knockout screening in human cells. *Science* 2014; 343(6166): 84-7.
- 6 Ran FA, Hsu PD, Wright J, Agarwala V, Scott DA, Zhang F. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nat Protoc* 2013; 8(11): 2281-308.
- 7 Tremblay JP. The CRISPR system can correct or modify the expression of genes responsible for hereditary diseases. *Med Sci (Paris)* 2015; 31(11): 1014-22.
- 8 Spencer NY, Yan Z, Cong L, Zhang Y, Engelhardt JF, Stanton RC. Definitive localization of intracellular proteins: Novel approach using CRISPR-Cas9 genome editing, with glucose 6-phosphate dehydrogenase as a model. *Anal Biochem* 2016; 494: 55-67.
- 9 Li JF, Zhang D, Sheen J. Targeted plant genome editing via the CRISPR/Cas9 technology. *Methods Mol Biol* 2015; 1284: 239-55.
- 10 Vouillot L, Thelie A, Pollet N. Comparison of T7e1 and surveyor mismatch cleavage assays to detect mutations triggered by engineered nucleases. *G3 (Bethesda)* 2015; 5(3): 407-15.
- 11 Liao HK, Li M, Martinez Martinez L, Izpisua Belmonte JC. Stem cell, CRISPR and HIV. *Cell Cycle* 2015; 14: 1991-2.

- 12 Liao HK, Gu Y, Diaz A, Marlett J, Takahashi Y, Li M, *et al.* Use of the CRISPR/Cas9 system as an intracellular defense against Hiv-1 infection in human cells. *Nat Commun* 2015; 6: 6413.
- 13 Kou Z, Wu Q, Kou X, Yin C, Wang H, Zuo Z, *et al.* CRISPR/Cas9-mediated genome engineering of the ferret. *Cell Res* 2015; 25(12): 1372-5.
- 14 Bi Y, Sun L, Gao D, Ding C, Li Z, Li Y, *et al.* High-efficiency targeted editing of large viral genomes by RNA-guided nucleases. *PLoS Pathog* 2014; 10(5): e1004090.
- 15 Kennedy EM, Kornepati AV, Cullen BR. Targeting hepatitis B virus cccDNA using CRISPR/Cas9. *Antiviral Res* 2015;123: 188-92.
- 16 Lin G, Zhang K, Li J. Application of CRISPR/Cas9 technology to Hbv. *Int J Mol Sci* 2015; 16(11): 26077-86.
- 17 Wang J, Xu ZW, Liu S, Zhang RY, Ding SL, Xie XM, *et al.* Dual gRNAs guided CRISPR/Cas9 system inhibits hepatitis B virus replication. *World J Gastroenterol* 2015; 21(32): 9554-65.