

技术与方法

利用Sleeping beauty转座子系统构建响应IFN β 的荧光转基因小鼠

蔡少丽 许珊 焦长峰 丰志华 梁旺旺 邓湘凌 陈骥* 沈阳坤*

(福建师范大学南方生物医学研究中心, 福建省天然免疫生物学重点实验室, 福州 350117)

摘要 干扰素 β (interferon β , IFN β)在抗病毒感染、免疫调节及肿瘤治疗中发挥重要作用。近年来,越来越多的证据表明IFN β 能显著增强树突状细胞(dendritic cell, DC)的抗原呈递能力以及T细胞的活性。然而目前针对IFN β 在病毒入侵和肿瘤发生过程中如何诱发全身性免疫应答的机制尚不清楚,这极大地限制了大家对病毒感染和肿瘤免疫的理解。因此,在这一过程中检测释放IFN β 的细胞种类以及IFN β 在各组织中的表达水平显得尤为重要。目前将外源DNA序列插入到宿主基因组中仍然需要合成或克隆同源模板,这会花费大量的时间成本,且效率不高。在这里,该研究利用Sleeping beauty转座子/转座酶系统构建了由IFN β 启动子诱导表达红色荧光蛋白的转基因小鼠模型(C57BL/6^{IFN β -P-mCherry})。通过PCR及流式细胞术证实,小鼠中的外源基因经过数次传代仍然稳定表达。这些结果表明,该研究成功构建了由IFN β 启动子诱导稳定表达mCherry的转基因小鼠模型。这一模型为进一步研究干扰素通路在抗肿瘤和抗病毒中的功能提供有用的工具。

关键词 干扰素 β ; Sleeping beauty转座子系统; mCherry; 转基因小鼠

Effective Generation of the Fluorescent Mouse Model Responding to IFN β Signal using the Sleeping Beauty Transposon System

CAI Shaoli, XU Shan, JIAO Changfeng, FENG Zhihua, LIANG Wangwang, DENG Xiangling,
CHEN Qi*, SHEN Yangkun*(Fujian Key Laboratory of Innate Immune Biology, Biomedical Research Center of South China,
Fujian Normal University, Fuzhou 350117, China)

Abstract IFN β (interferon β) has an indispensable role in antiviral, immune regulation and oncological therapy. In recent years, numerous evidences have suggested that IFN β can improve the capacity of the antigen presentation of DC (dendritic cell), as well as significantly increase the activity of T cells. However, it is not clear how IFN β induces the systematic immune responses during viral infection and tumorigenesis. For this reason, it is vital to find out what types of cells release IFN β and detect the expression level of IFN β in various organs. Here, the “Sleeping beauty” transposon/transposase system is applied to construct a genetically modified mouse that is able to express mCherry driven by the IFN β promoter. The exogenous sequences remain unchanged and expressed following several generation in the mice as verified by PCR

收稿日期: 2022-07-19

接受日期: 2022-08-12

福建省自然科学基金(批准号: 2017J01621、2021J01202)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0591-22868830, E-mail: shenyk@fjnu.edu.cn

Received: July 19, 2022

Accepted: August 12, 2022

This work was supported by the Natural Science Foundation of Fujian Province (Grant No.2017J01621, 2021J01202)

*Corresponding authors. Tel: +86-591-22868830, E-mail: shenyk@fjnu.edu.cn

and flow cytometry. These data indicate that the mouse model enabling stable expression of mCherry controlled by the *IFN β* promoter is successfully constructed. This mouse model provides a useful tool for studying the regulation and function of *IFN β* signaling pathway related to its antiviral and antitumor activities.

Keywords *IFN β* ; Sleeping beauty transposon system; mCherry; transgenic mice

干扰素 β (interferon β , *IFN β*)是一类具有高活性的多功能糖蛋白,受多种先天免疫通路激活调控^[1]。近年来,研究发现天然免疫受体视黄酸诱导基因蛋白I(retinoic acid-inducible gene I, RIG-I)、黑色素瘤分化相关基因5(melanoma differentiation-associated gene 5, MDA5)、Toll样受体(Toll-like receptor, TLR)、环鸟苷酸腺苷酸合成酶(cyclic GMP-AMP synthase, cGAS)等分子可以有效激活*IFN β* 通路,并且在调控抗病毒及抗肿瘤免疫中具有重要作用^[2-3]。目前认为*IFN β* 的生理功能主要是通过激活 JAK-STAT通路,产生上百种干扰素刺激基因(interferon-stimulated gene, ISG)实现的^[4]。然而大多数 ISG在抗病毒、肿瘤调节中如何发挥作用尚不清楚,尤其是在病毒感染后,*IFN β* 和 ISG在全身各组织中的分布尚未见报道。因此,病毒感染后,监测全身的*IFN β* 应答对于理解天然免疫抗病毒机制有重要意义。

目前最常用的*IFN β* 检测方法是qRT-PCR法和荧光素酶报告基因法(Luciferase)^[5-7]。然而这些检测方法并不能分析机体内干扰素的来源,尤其是免疫细胞亚群种类繁多,干扰素的追踪目前并没有很好的方法。与此同时,荧光介导的追踪技术得到了快速的发展,且能用于荧光显微镜、小动物成像仪和流式细胞仪等更多的检测设备。因此,制备干扰素启动子启动的荧光报告系统在免疫系统追踪方面有着无可替代的作用。与此同时,转座子系统已经成为制备转基因模型的常规分子改造工具。与病毒类载体不同,转座子不仅具有更小的分子量,且不具有潜在的传染性,安全性更高^[8-9]。鱼类睡美人(Sleeping beauty)转座子系统结构简单、活性高,已被广泛应用于生物学研究的各个领域^[10]。

因此,本研究利用 Sleeping beauty 转座子系统构建了由 *IFN β* 启动子调控 mCherry 表达的转基因模型小鼠 C57BL/6^{IFN β -P-mCherry}。通过小鼠子代的交配,本研究证实 C57BL/6^{IFN β -P-mCherry} 小鼠能够稳定表达 mCherry 标签。此外,小鼠原代肺成纤维细胞(lung fibroblasts, LFs)的刺激实验显示,该转基因小鼠的原代细胞能够诱导 mCherry 红色荧光蛋白的表达,且能够实时指示

内源性*IFN β* 的表达。因此, C57BL/6^{IFN β -P-mCherry} 小鼠模型的应用对于 *IFN β* 的机制研究及抗肿瘤、抗病毒等相关药物的开发都将有重要价值。

1 材料与方法

1.1 材料

pT2/SVneo质粒为本实验室长期保存的菌种;质粒 pUC57-*IFN β* -P-(mCherry/EGFP)由武汉金开瑞生物工程有限公司合成; *Escherichia coli* Trans5 α 购自北京全式金生物科技股份有限公司; L929细胞购自 ATCC(American type culture collection); SPF级小鼠购自上海斯莱克实验动物有限责任公司。

主要试剂包括: 2 $\times$ DNA聚合酶Mix(Vazyme, 货号 P515-01)、HiScript III 1st Strand cDNA Synthesis Kit(+gDNA wiper)(Vazyme, 货号 R312-01)、ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix(Vazyme, 货号 Q711-02)、Lipo2000(Invitrogen, 货号 11668030)、FastDigest *Bst*BI(Thermo Fisher, 货号 FD0124)、Fast-Digest *Eco*RI(Thermo Fisher, 货号 FD0274)、胎牛血清(Pansera-ES, 货号 ST30-2602)、DMEM培养液(Cytiva, 货号 SH30243.01)。

所用主要仪器包括: Bio-Rad凝胶成像系统(上海培清科技有限公司, JS-6800)、流式细胞仪(美国 BD公司, FACS Aria III)、实时荧光定量PCR仪(美国 ABI公司, StepOne Plus)、超微量紫外分光光度计(美国 Thermo Fisher公司, ND-2000C)、PCR仪(美国 ABI公司, 2720型)、台式高速冷冻离心机(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司, TGL-16)、显微注射系统(德国 Carl Zeiss公司, TransferMan NK2)。

1.2 引物设计与合成

利用 Primer Premier 5.0软件设计用于扩增小鼠外源基因 *IFN β* -mCherry的引物,引物序列见表1,引物由福州尚亚生物技术有限公司合成。

1.3 不同长度*IFN β* 启动子的扩增

首先查找 *IFN β* 基因启动子序列,并通过PCR将不同长度的 *IFN β* 启动子序列扩增备用,随后将各启动子片段连接至克隆载体。

表1 用于构建IFNβ-mCherry-pT2-SVneo的引物
Table 1 The primers used to construct IFNβ-mCherry-pT2-SVneo

引物名称	引物序列(5'→3')
Primer name	Primer sequence (5'→3')
IFNβ-P-mCherry-F	ATG TCA TGG CTT TAG AAG CTT GAA TTC ATG
IFNβ-P-mCherry-R	CGA GTA GCC TTC CAC AAG CTT TAA GAT ACA

1.4 IFNβ启动子诱导mCherry荧光蛋白表达载体的构建

IFNβ-P-mCherry序列合成后, 用LIC(ligation-independent cloning)的方法将IFNβ-P-mCherry序列连接至pT2/SVneo序列上。LIC连接(10 μL反应体系): 100 ng pT2/SVneo线性载体、100 ng IFNβ-P-mCherry纯化片段、1 μL 10× Exonuclease III缓冲液, 加入双蒸水补充至9 μL, 冰浴5 min; 加入1 μL Exonuclease III(20 U/μL), 冰浴60 min; 加入1 μL EDTA(0.5 μmol/L), 65 °C处理15 min终止反应。

1.5 IFNβ诱导表达mCherry的质粒在细胞水平的验证

在6孔板中按5×10⁵个/孔加入L929细胞, 在培养12 h后将培养液换为低血清OPTI-MEM培养液, 并将2 mg pT2-IFNβ-P-mCherry重组质粒转染至细胞中。8 h后将细胞培养液换为正常的DMEM培养液。转染pT2-IFNβ-P-mCherry重组质粒24 h后, 用2.5 mg Poly(I:C)或者HT-DNA刺激细胞, 24 h后利用荧光显微镜观察细胞红色荧光表达情况或者利用流式细胞仪分析荧光强度, 以检测IFNβ启动子的诱导能力。

1.6 C57BL/6^{IFNβ-P-mCherry}转基因小鼠模型的构建

将含有转座酶的质粒pX100与质粒pT2-IFNβ-P-mCherry按1:1比例配成终浓度为10 ng/μL的混合液, 并利用注射针虹吸。虹吸结束后, 将注射针安装至显微操作注射仪上进行注射。当受精卵细胞质有明显膨胀时停止注射。本文章中所涉及的小鼠相关实验均已通过福建师范大学实验动物伦理委员会审核批准[伦理审批号: IACUC-20200006, 实验动物使用许可证号: SYXK(闽)2020-0007]。

1.7 小鼠肺成纤维细胞的分离与刺激

C57BL/6^{IFNβ-P-mCherry}转基因小鼠安乐死后, 将小鼠浸泡于酒精中2 min, 之后分离并取出小鼠肺成纤维细胞。将分离的肺成纤维细胞按照5×10⁵个/孔铺到6孔板中, 待细胞贴壁后换成无血清的DMEM培养基。12 h后分别利用Poly(I:C)和HT-DNA进行刺激,

24 h后通过荧光显微镜观察mCherry的表达情况。并利用qRT-PCR检测Poly(I:C)或HT-DNA刺激后细胞中mCherry或IFNβ的表达情况。

1.8 流式细胞分析

消化细胞后将其转移至流式分析管(含10%胎牛血清)中, 以正常细胞作为对照。通过流式细胞仪分析荧光强度。流式细胞分析绿色荧光蛋白用波长为488 nm的激光激发, 分析mCherry用波长为561 nm的激光激发。以阴性细胞作对照画流式门, 分析荧光强度。

1.9 统计分析

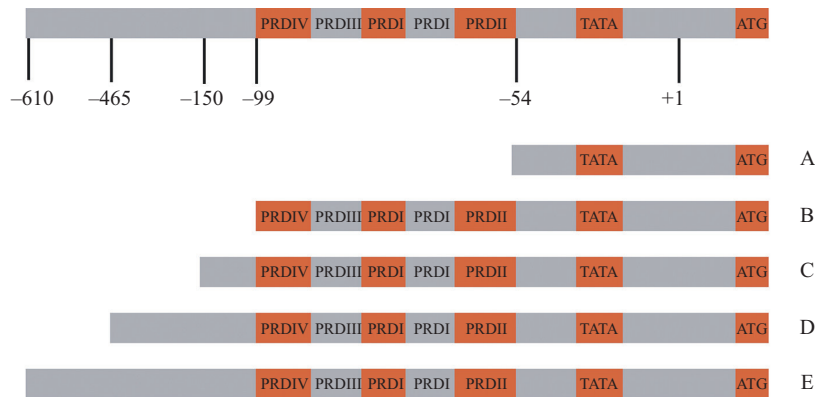
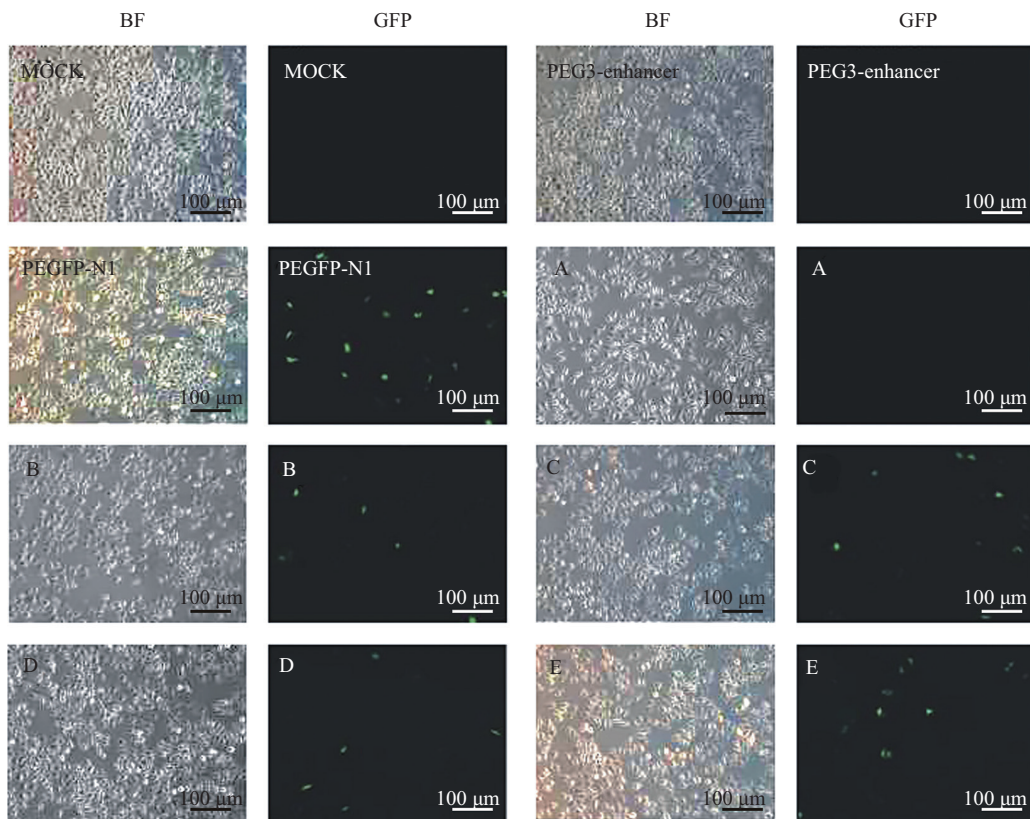
用SPSS 20.0软件采用One-Way ANOVA法进行方差分析和显著性检验。每组实验至少重复3次, 数据用平均值±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。

2 结果

2.1 最佳鼠源IFNβ基因启动子序列的优化

研究表明, 小鼠IFNβ基因启动子全长超过了1 000 bp, 为了在体外得到具有更高活性的启动子片段, 本研究选取IFNβ基因启动子的不同片段进行分析。如图1所示, 本研究分别选取小鼠IFNβ基因核心启动子的A(-54—+60)、B(-99—+60)、C(-150—+60)、D(-465—+60)、E(-610—+60)区域片段, 在细胞水平进行验证。

为了确定不同长度小鼠IFNβ启动子诱导荧光蛋白的表达能力, 本研究选取荧光强度较高的EGFP荧光蛋白为标签。首先将各截短的小鼠IFNβ启动子连接在携带EGFP绿色荧光蛋白基因的质粒上制备PEG3-enhancer-IFNβ-P-EGFP重组载体。接着, 本研究将重组载体分别转染到小鼠成纤维细胞L929中, 24 h后转染外源DNA(HT-DNA)进行刺激, 刺激12 h后观察各组EGFP表达强度。如图2所示, 阴性对照组、空载组与鼠源IFNβ启动子A片段(-54—+60)重组载体组未见绿色荧光, 其他组有少量的绿色荧光, 表明mIFNβ(-99—+60)、mIFNβ(-150—+60)、mIFNβ(-465—+60)和mIFNβ(-610—+60)段启动子能

图1 小鼠 $IFN\beta$ 启动子截短示意图Fig.1 Schematic diagram of the truncated murine $IFN\beta$ promoter

MOCK: 阴性对照组; PEG3-enhancer: 空载体组; PEGFP-N1: 阳性对照组; A: 鼠源 $IFN\beta$ 启动子A片段(-54—+60)重组载体组; B: 鼠源 $IFN\beta$ 启动子B片段(-99—+60)重组载体组; C: 鼠源 $IFN\beta$ 启动子C片段(-150—+60)重组载体组; D: 鼠源 $IFN\beta$ 启动子D片段(-465—+60)重组载体组; E: 鼠源 $IFN\beta$ 启动子E片段(-610—+60)重组载体组。

MOCK: negative control group; PEG3-enhancer: empty group; PEGFP-N1: positive control group; A: recombinant vector group of murine $IFN\beta$ promoter A (-54—+60); B: recombinant vector group of murine $IFN\beta$ promoter B (-99—+60); C: recombinant vector group of murine $IFN\beta$ promoter C (-150—+60); D: recombinant vector group of murine $IFN\beta$ promoter D (-465—+60); E: recombinant vector group of murine $IFN\beta$ promoter E (-610—+60).

图2 不同长度鼠源 $IFN\beta$ 启动子诱导EGFP表达的效率Fig.2 Efficiency of EGFP expression induced by murine $IFN\beta$ promoters of different lengths

够启动EGFP表达。

为了能更直观和准确地判断各启动子的能力, 本研究将不同长度的鼠源 $IFN\beta$ 启动子质粒分别转染至L929细胞中, 并用HT-DNA刺激L929细胞12 h后,

通过流式细胞术分析各细胞转染效率。如图3所示, 小鼠 $IFN\beta$ 启动子-99—+60区域诱导EGFP荧光表达的能力最强。这些结果表明, 本研究成功鉴定出能够较强诱导EGFP表达的 $mIFN\beta$ (-99—+69)区域。

2.2 用于转基因的pT2-IFNβ-P-mCherry转座子载体的制备

红色荧光蛋白的波长比绿色荧光蛋白的长(GFP

激发波长是488 nm, 发射波长是507 nm; mCherry激发波长是552 nm, 发射波长是600~650 nm), mCherry能显著降低荧光蛋白在体内的背景信号。为了降低

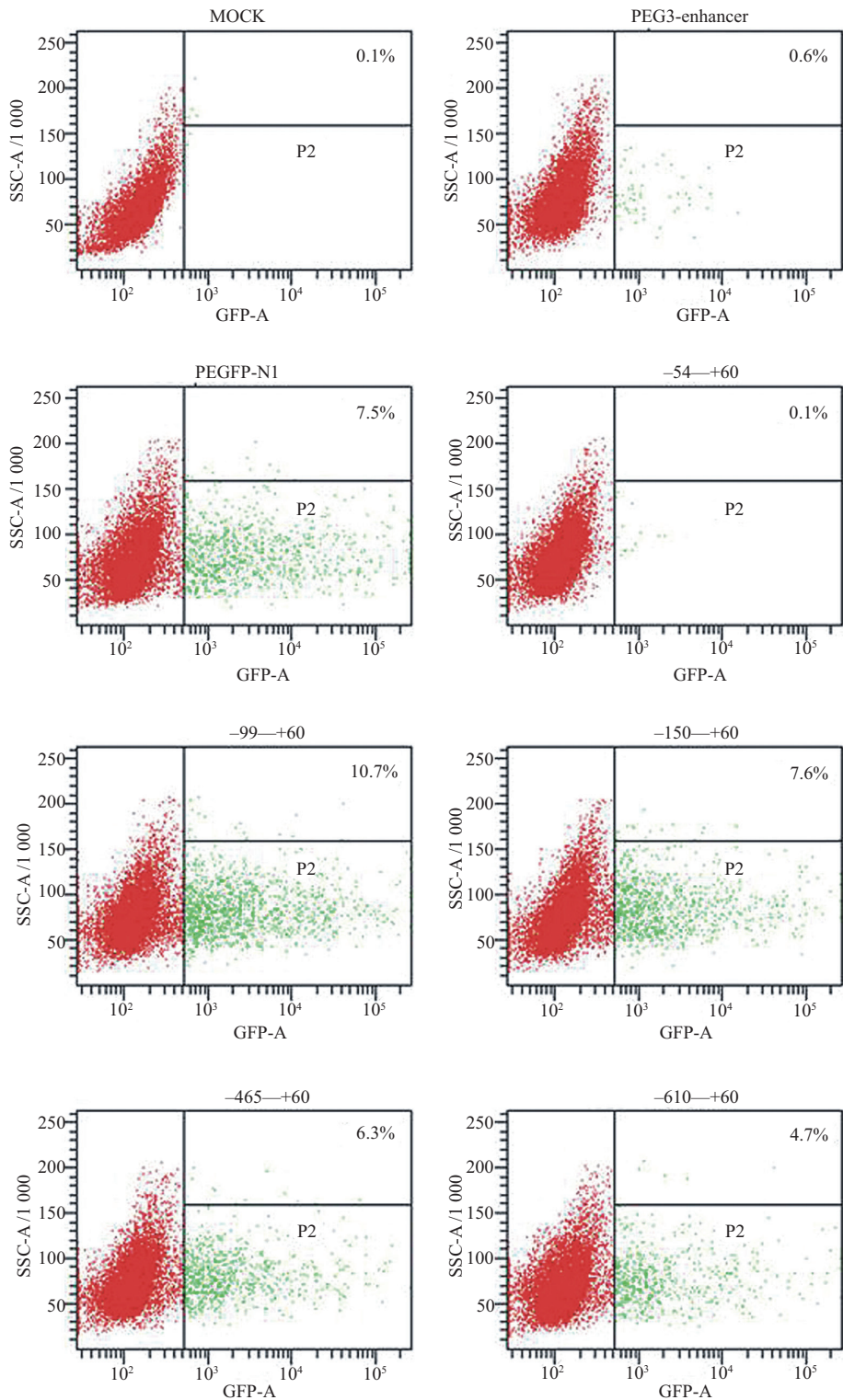
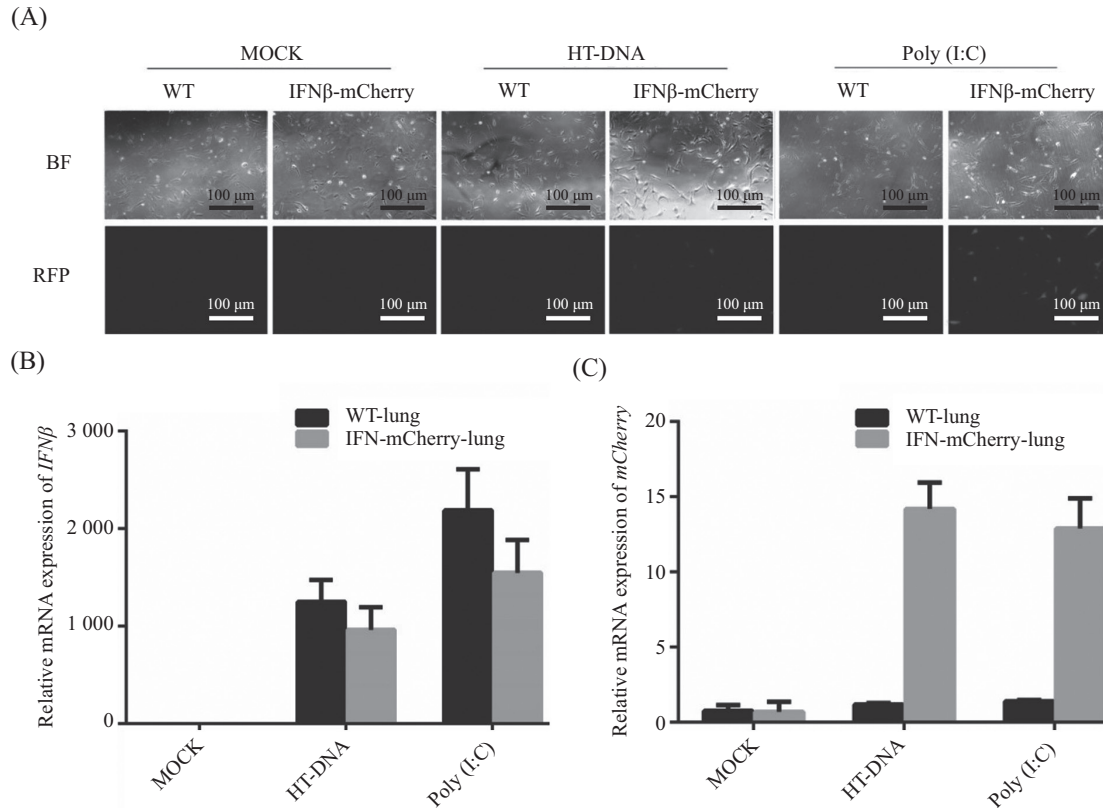


图3 不同长度IFNβ启动子诱导EGFP表达的能力

Fig.3 The ability of IFNβ promoters of different lengths to induce EGFP expression



A: Poly(I:C)与HT-DNA刺激转基因小鼠mCherry的表达。用Poly(I:C)与HT-DNA刺激细胞,通过荧光显微镜检测mCherry荧光强度,WT为野生型小鼠肺成纤维细胞,IFN-mCherry为C57BL/6^{IFNβ-P-mCherry}小鼠肺成纤维细胞。B: 在Poly(I:C)和HT-DNA刺激下,通过qRT-PCR检测小鼠肺成纤维细胞中 $IFN\beta$ 的表达; C: 在Poly(I:C)与HT-DNA刺激下,通过qRT-PCR检测小鼠肺成纤维细胞中mCherry的表达。

A: Poly (I:C) and HT-DNA stimulated the expression of mCherry in transgenic mice. Cells were stimulated with Poly (I:C) and HT-DNA, and mCherry fluorescence intensity was detected by fluorescence microscopy. WT was wild-type mouse lung fibroblasts, IFN-mCherry was C57BL/6^{IFNβ-P-mCherry} mouse lung fibroblasts; B: the expression of $IFN\beta$ in mouse lung fibroblasts was detected by qRT-PCR under the stimulation of Poly (I:C) and HT-DNA; C: the expression of mCherry in mouse lung fibroblasts was detected by qRT-PCR under the stimulation of Poly (I:C) and HT-DNA.

图6 转基因小鼠肺成纤维细胞对外源核酸刺激的响应

Fig.6 The response of transgenic mouse lung fibroblasts to exogenous nucleic acid stimulation

该转座子系统可有效构建转基因小鼠模型,能够进行生殖系传递,但由于无法判断小鼠的杂合或者纯合情况,因此,新生小鼠需要进行分子鉴定。

2.4 C57BL/6^{IFNβ-P-mCherry}转基因小鼠原代肺成纤维细胞mCherry的诱导表达

为了进一步探究C57BL/6^{IFNβ-P-mCherry}中红色荧光蛋白的表达能否准确反映小鼠应对外界刺激时内源性 $IFN\beta$ 的表达,本研究利用外源核酸Poly(I:C)和HT-DNA分别刺激野生型和C57BL/6^{IFNβ-P-mCherry}小鼠的原代肺成纤维细胞。结果显示,Poly(I:C)和HT-DNA都能刺激C57BL/6^{IFNβ-P-mCherry}小鼠的肺成纤维细胞表达mCherry红色荧光,而野生型小鼠中未见荧光表达(图6A)。接着,本研究通过Poly(I:C)与HT-DNA刺激验证小鼠体内mCherry与 $IFN\beta$ 表达的同步性。Poly(I:C)与HT-DNA刺激小鼠肺成纤维细胞8 h后,

通过qRT-PCR检测发现内源性 $IFN\beta$ 表达明显升高(图6B)。接着本研究检测了小鼠肺成纤维细胞 $IFN\beta$ 启动子启动mCherry表达的情况,结果显示mCherry也有和内源性 $IFN\beta$ 同样的表达模式(图6C)。这些结果表明,C57BL/6^{IFNβ-P-mCherry}转基因小鼠能够精准地表征内源性 $IFN\beta$ 表达。

3 讨论

哺乳动物的核酸类物质不仅包含遗传信息,在多种情况下也会诱发剧烈的免疫反应^[11-12]。当致病病原如病菌、病毒等感染宿主后,会将遗传物质释放至胞质内,随后这些遗传物质被RIG-I、MDA5、cGAS等核酸感受器所识别,从而激活干扰素通路,发挥抵抗病原的作用^[13]。此外,在特定病理情况下,细胞核或者线粒体中的部分DNA也会泄露到细胞

质中, 而定位在胞质的Trex1等核酸酶会对过度累积的DNA进行清理, 防止持续性IFN β 产生对机体造成损伤。研究发现, 患有自身免疫疾病的部分患者Trex1基因发生突变, 导致自身DNA在胞质中累积, 最终诱发持续性的炎症或自身免疫性疾病^[14]。因此, 在病理情况下, I型干扰素IFN β 的持续激活将会加速自身免疫疾病的发生发展。

目前, 干扰素信号通路的研究大多都还停留在细胞水平, 全面分析干扰素IFN β 应答反应在动物水平的作用机制(如机体的抗病毒反应在各个组织响应水平的研究以及自身免疫过程中IFN β 的积累的研究), 对干扰素调节通路的研究具有重大意义^[15]。因此, 本研究针对天然免疫信号通路中主要的靶标分子IFN β , 构建了IFN β 诱导表达荧光报告基因的小鼠模型。为了得到更强的荧光表达, 本研究首先筛选了小鼠IFN β 启动子片段, 利用各截短的IFN β 启动子启动EGFP的表达, 最终找到了启动能力较强的-610—+60片段。接着, 为了在制备转基因小鼠的过程中避免绿色荧光信号的干扰, 本研究将活性较强的IFN β -610—+60启动子序列与mCherry基因序列均连接至Sleeping beauty转座子载体, 成功构建了pT2-IFN β -P-mCherry重组质粒。此外, 将IFN β 启动子报告基因质粒转染到L929细胞中, 当用双链HT-DNA和RNA类似物Poly(I:C)刺激细胞时, 细胞内mCherry红色荧光表达增强。这些结果表明, 本研究筛选的IFN β 启动子能够诱导mCherry的表达, 且能够实时指示内源性IFN β 的表达情况。

然后, 本研究通过显微注射技术成功构建了C57BL/6^{IFN β -P-mCherry}转基因小鼠。C57BL/6^{IFN β -P-mCherry}转基因小鼠肺成纤维细胞的刺激结果显示, 这些原代细胞能够响应Poly(I:C)和HT-DNA的刺激产生mCherry。此外, 本研究利用qRT-PCR检测了转基因小鼠肺成纤维细胞中IFN β 和mCherry的表达水平, 结果显示mCherry与胞内IFN β 的表达趋势一致。这表明, C57BL/6^{IFN β -P-mCherry}转基因小鼠模型构建成功。然而, 利用小动物成像系统, 本研究没有监测到在I型单纯疱疹病毒(herpes simplex virus 1, HSV-1)刺激下转基因小鼠(C57BL/6^{IFN β -P-mCherry})体内mCherry的表达。这可能是由于外源刺激下小鼠体内产生荧光强度较弱或者小鼠体内背景信号干扰较强, 导致无法

在转基因小鼠体内观察到荧光信号。最终我们建立了遗传性状稳定的转基因小鼠, 且该转基因小鼠的原代细胞可以有效响应外源核酸的刺激。因此, 利用C57BL/6^{IFN β -P-mCherry}小鼠不同组织器官的原代细胞, 可以模拟各组织器官对外源刺激的响应, 进而有利于自身免疫性疾病、病原微生物感染等方面的研究及相关药物的开发。

参考文献 (References)

- [1] SCHOGGINS J W. Interferon-stimulated genes: what do they all do [J]? *Annu Rev Virol*, 2019, 6(1): 567-84.
- [2] CHEN Q, SUN L, CHEN Z J. Regulation and function of the cGAS-STING pathway of cytosolic DNA sensing [J]. *Nat Immunol*, 2016, 17(10): 1142-9.
- [3] GAO D, WU J, WU Y T, et al. Cyclic GMP-AMP synthase is an innate immune sensor of HIV and other retroviruses [J]. *Science*, 2013, 341(6148): 903-6.
- [4] TRINCHIERI G. Type I interferon: friend or foe [J]? *J Exp Med*, 2010, 207(10): 2053-63.
- [5] LUTHRA P, SUN D, SILVERMAN R H, et al. Activation of IFN- β expression by a viral mRNA through RNase L and MDA5 [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108(5): 2118-23.
- [6] WANG D, FANG L, WEI D, et al. Hepatitis A virus 3C protease cleaves NEMO to impair induction of beta interferon [J]. *J Virol*, 2014, 88(17): 10252-8.
- [7] SCHROEDER S, POTT F, NIEMEYER D, et al. Interferon antagonism by SARS-CoV-2: a functional study using reverse genetics [J]. *Lancet Microbe*, 2021, 2(5): e210-e218.
- [8] MANOIL C, BECKWITH J. TnpA: a transposon probe for protein export signals [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1985, 82(23): 8129-33.
- [9] CAIN A K, BARQUIST L, GOODMAN A L, et al. A decade of advances in transposon-insertion sequencing [J]. *Nat Rev Genet*, 2020, 21(9): 526-40.
- [10] DUPUY A J, AKAGI K, LARGAESPADA D A, et al. Mammalian mutagenesis using a highly mobile somatic Sleeping Beauty transposon system [J]. *Nature*, 2005, 436(7048): 221-6.
- [11] AKIRA S, TAKEDA K. Toll-like receptor signalling [J]. *Nat Rev Immunol*, 2004, 4(7): 499-511.
- [12] JR J C, MEDZHITOV R. Innate immune recognition [J]. *Annual Rev Immunol*, 2002, 20(1): 197-216.
- [13] HUR S. Double-stranded RNA sensors and modulators in innate immunity [J]. *Annu Rev Immunol*, 2019, 37: 349-75.
- [14] XIAO N Y, WEI J J, XU S, et al. cGAS is responsible for spontaneous lupus-like autoimmune disorder induced by TREX1 mutation [J]. *J Autoimmunity*, 2019, 100: 84-94.
- [15] WU J, CHEN Z J. Innate immune sensing and signaling of cytosolic nucleic acids [J]. *Annu Rev Immunol*, 2014, 32: 461-88.