

· 基础研究 ·

利用 CRISPR/Cas9 技术构建 ACE2 基因修饰的猪胎儿成纤维细胞系

张成霖, 方 斌, 刘晓蕊, 李 琳, 王 盈, 杨海元*, 戴一凡*

南京医科大学江苏省异种移植重点实验室, 江苏 南京 211166

[摘 要] **目的:**利用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术构建血管紧张素转换酶 2(angiotensin converting enzyme 2, ACE2)基因编辑的长白猪胎儿成纤维细胞(porcine fetal fibroblast, PFF)细胞系,为构建新型冠状病毒即严重急性呼吸综合征冠状病毒 2 型(severe acute respiratory syndrome coronavirus type 2, SARS-CoV-2)不易感猪模型提供实验材料。**方法:**①利用生物信息学方法对大鼠和鸡的 ACE2 氨基酸序列进行比对,将大鼠 ACE2 与 SARS-CoV-2 S 蛋白相互作用的关键氨基酸残基替换为鸡 ACE2 的氨基酸残基,设计嵌合的 ACE2 基因并构建 ACE2 基因敲入供体。②设计并合成靶向猪 ACE2 基因的 sgRNA,克隆到 pX330 载体上构建 ACE2 基因打靶载体。③将 ACE2 打靶载体和 ACE2 基因敲入供体以及 Neomycin 抗性质粒共转染至长白猪 PFF 细胞,筛选 G418 抗性单细胞克隆并进行测序鉴定。**结果:**根据氨基酸序列比对结果,将大鼠 ACE2 蛋白的第 19、31、34、35、42、353、354 位氨基酸残基替换为鸡 ACE2 的氨基酸残基,设计合成了嵌合的 ACE2 基因。G418 抗性单细胞克隆基因型分析结果显示获得了阳性单细胞克隆。**结论:**利用 CRISPR/Cas9 技术成功获得了内源 ACE2 基因敲除、嵌合 ACE2 敲入的长白猪 PFF 细胞系,为构建 SARS-CoV-2 不易感猪模型奠定了基础。

[关键词] ACE2; CRISPR/Cas9; SARS-CoV-2; 猪胎儿成纤维细胞

[中图分类号] R394.33

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2022)11-1499-08

doi:10.7655/NYDXBNS20221101

Establishment of ACE2-modified porcine fetal fibroblasts via CRISPR/Cas9 system

ZHANG Chenglin, FANG Bin, LIU Xiaorui, LI Lin, WANG Ying, YANG Haiyuan*, DAI Yifan*

Jiangsu Key Laboratory of Xenotransplantation, Nanjing Medical University, Nanjing 211166, China

[Abstract] **Objective:** This study aims to establish angiotensin converting enzyme 2 (ACE2) gene-modified porcine fetal fibroblast (PFF) cell lines via CRISPR/Cas9 system-mediated gene modification, which could serve as donor cells for the subsequent construction of a severe acute respiratory syndrome coronavirus type 2 (SARS-CoV-2) insensitive pig model. **Methods:** ①The ACE2 amino acid sequences of rats and chickens were compared by bioinformatic analysis. The ACE2 amino acid residues, which play a crucial role in the interaction between ACE2 and SARS-CoV-2 S protein, were replaced by the amino acid residues of chicken's ACE2 at the corresponding sites. The chimeric ACE2 gene was synthesized and cloned into the knock-in vector. ②The sgRNA targeting the porcine ACE2 gene was designed, synthesized, and cloned into the pX330 vector to construct the ACE2 gene targeting vector. ③The ACE2 targeting vector, the ACE2 gene knock-in donor vector, and a neomycin-resistant plasmid were co-transfected into PFF. G418 was used to screen the resistant single-cell colonies, and sequencing was performed to identify the correct ones. **Results:** According to the amino acid sequence alignment, the rat ACE2 amino acid residues at positions 19th, 31st, 34th, 35th, 42nd, 353rd and 354th were replaced by the amino acid residues of chicken ACE2. The chimeric ACE2 gene was synthesized, and the ACE2 knock-in vector was successfully constructed. Genotype analysis of G418 resistant colonies showed that single-cell colonies with expected modification were successfully obtained. **Conclusion:** The PFF cells with endogenous ACE2 knock-out and chimeric ACE2 knock-in are successfully generated using CRISPR/Cas9-mediated gene modification, which will lay a foundation for the construction of SARS-CoV-2 insusceptible pig models.

[Key words] ACE2; CRISPR/Cas9; SARS-CoV-2; PFF

[基金项目] 国家自然科学基金(81874144, 81970164)

[J Nanjing Med Univ, 2022, 42(11): 1499-1506]

*通信作者(Corresponding author), E-mail: hyyang@njmu.edu.cn; daiyifan@njmu.edu.cn

自2019年12月以来,新型冠状病毒即严重急性呼吸综合征冠状病毒2型(severe acute respiratory syndrome coronavirus type 2, SARS-CoV-2)已经蔓延到多个国家和地区,引发了严重的全球公共卫生安全问题^[1-2]。SARS-CoV-2是一种新型 β 冠状病毒^[3],具有高度传染性、较高隐蔽性和广泛组织趋向性等特征。SARS-CoV-2为单股正链RNA病毒,基因组约为29.9 kb,主要由2个侧翼非翻译区和整段可编码蛋白的开放阅读框(open reading frame, ORF)组成^[4]。SARS-CoV-2编码的S蛋白是介导病毒入侵宿主细胞的关键蛋白,由S1和S2两个亚基组成。S1亚基上的受体结合域能与靶细胞上的受体特异性结合,从而决定病毒对细胞的趋向性和致病性^[5]。

已有研究表明血管紧张素转换酶2(angiotensin converting enzyme 2, ACE2)是SARS-CoV-2的主要功能受体^[6],ACE2的表达是SARS-CoV-2感染靶器官的关键。不同物种的ACE2与SARS-CoV-2的S蛋白亲和力表现出差异性,决定了相应物种对SARS-CoV-2病毒易感性的不同。如鸡、大鼠、兔等对SARS-CoV-2病毒不易感,而人、水貂、猫等对SARS-CoV-2病毒易感。猪作为重要的农业品种之一,与人类关系密切,存在着作为中间宿主间接向人类传播SARS-CoV-2的风险^[7]。因此,通过改造猪的ACE2来构建SARS-CoV-2不易感猪模型有重要现实意义。ACE2是由X染色体基因编码的锌-金属肽酶,属于I型跨膜糖蛋白,含有N端信号肽、C端结构域和胞外催化结构域^[8]。ACE2除了作为SARS-CoV-2主要的功能受体,本身还行使促进血管紧张素成熟、调控血管收缩和血压等重要生理功能^[9]。因此,构建SARS-CoV-2不易感的猪不能通过直接敲除猪的ACE2基因来实现,而应采取策略将猪内源ACE2替换为与S蛋白低亲和力的ACE2。

本研究通过对多个物种的ACE2蛋白序列进行生物信息学分析,构建了与SARS-CoV-2低亲和力的嵌合ACE2基因片段。然后,利用CRISPR/Cas9基因编辑技术将该ACE2整合到猪的ACE2基因位点,同时实现猪内源ACE2基因敲除和嵌合ACE2基因敲入,构建了ACE2基因修饰的猪胎儿成纤维细胞(porcine fetal fibroblast, PFF)系,为进一步利用体细胞核移植(somatic cell nuclear transfer, SCNT)技术构建SARS-CoV-2不易感的猪模型奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验细胞

培养27 d的长白猪PFF细胞为本实验室留存的细胞。

1.1.2 主要试剂与仪器

pX330质粒(Addgene公司,美国);DH5 α 感受态细胞、质粒抽提试剂盒(北京天根生化科技有限公司);Bbs I限制性内切酶、T4 DNA连接酶和T7E1酶(New England Biolabs公司,美国);Basic Nucleofector™ Kits转染试剂盒(Lonza公司,德国);DMEM培养液、G418药物、胎牛血清、0.25%胰蛋白酶、青链霉素双抗和DPBS缓冲液(赛默飞世尔科技公司,美国)。单孔细胞核转染仪(Lonza公司,德国);生物安全柜(赛默飞世尔科技公司,美国)。引物序列和磷酸化的寡核苷酸序列(南京金斯瑞公司)。

1.2 方法

1.2.1 ACE2嵌合基因的设计

利用DNASTar软件中的Protean模块分析猪和大鼠ACE2蛋白的二级结构,使用Chou Fasman算法预测猪和大鼠ACE2蛋白 α 螺旋、 β 折叠、 β 转角的比例。使用Swiss Model在线(<https://www.swissmodel.expasy.org/>)对猪和大鼠ACE2蛋白进行三维建模,然后利用Pymol软件比较两者三维结构的相似度,得出均方根偏差(root mean square deviation, RMSD)值。

在NCBI数据库中下载大鼠和鸡的ACE2氨基酸序列,在DNAMAN中进行氨基酸序列比对,根据氨基酸序列的比对结果在大鼠ACE2氨基酸序列的基础上,将与SARS-CoV-2结合的几个关键氨基酸残基替换为相应位点鸡ACE2的氨基酸残基,并通过密码子优化获得ACE2嵌合基因的基因序列,交由南京金斯瑞生物技术有限公司合成。

1.2.2 靶向猪ACE2的打靶载体构建

根据NCBI数据库中的ACE2基因序列,选取第10外显子设计1对扩增引物,上游引物ACE2_F:5'-CCAGTATGACATGGCTTATGCCAT-3',下游引物ACE2_R:5'-CCCCAACTGCCTCATGGAAAC-3',以长白猪PFF细胞的基因组为模板进行PCR扩增测序,确定是否与数据库中的ACE2基因序列一致。使用在线工具CRISPOR(<http://crispor.tefor.net/>)设计sgRNA,合成相应的2条Oligo片段:5'-GCATTAGCTCCATTTCTGAGC-3'和5'-GCTCAGAAATG-GAGCTAATGC-3'。利用Bbs I酶切pX330质粒,酶

切产物进行1%的琼脂糖凝胶电泳(100 V、60 min),切胶回收后纯化。用去离子水将sgRNA Oligo稀释至100 $\mu\text{mol/L}$ 。设置PCR仪退火程序:37 $^{\circ}\text{C}$ 30 min,95 $^{\circ}\text{C}$ 5 min,再以5 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 的速度降至25 $^{\circ}\text{C}$ 。将线性化的pX330载体与退火产物用T4 DNA连接酶进行连接,连接产物转化DH5 α 感受态细胞,涂板挑取单菌落测序鉴定正确的重组子,获得pX330-ACE2载体。

1.2.3 T7E1酶切实验

将转染ACE2打靶载体后的细胞转移到6 cm培养皿中培养,待细胞长满后,消化提取基因组。PCR扩增并回收目的片段。T7E1酶切体系:纯化产物200 ng;10 $\times$ NEB Buffer 2 2 μL ;去离子水补至19 μL 。在PCR仪中进行退火:95 $^{\circ}\text{C}$ 5 min;-2 $^{\circ}\text{C}/\text{s}$ 降至85 $^{\circ}\text{C}$;-0.1 $^{\circ}\text{C}/\text{s}$ 降至25 $^{\circ}\text{C}$;4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。体系中加入1 μL T7E1酶,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育90 min。之后每管加入4 μL 的6 $\times$ Loading buffer,1%琼脂糖凝胶电泳,1 h后分析结果。根据公式 $\text{InDel}(\%)=100\times[1-(1-\text{裂解产物占比})^{1/2}]$,计算编辑效率。

1.2.4 ACE2嵌合基因敲入载体构建

在长白猪ACE2第10外显子上的敲除位点上下游各选取40 bp序列作为同源的左臂(LA)和右臂(RA),中间加入连接肽(GSG Linker)以及2A肽序列,在两同源臂外侧设计相同且反向的sf_sgRNA靶点序列(5'-GTGCTTCGATATCGATCGTTTGG-3'),合成得到pUC57_ARM-2A载体。利用引物In-Fusion_F:5'-GAGAACCCTGGACCTATGTCAAGCTCC-TGCTGGC-3',In-Fusion_R:5'-ATTAGCTCCATTT-CTCGCGCCGCACACAAA-3',通过In-fusion克隆将ACE2嵌合基因插入到经Esp3 I线性化pUC57_ARM-2A载体上,构建ACE2嵌合基因敲入的供体ACE2_KI。

合成2条Oligo片段(sf_sgRNA-F:5'-GTGCTTCGATATCGATCGTT-3'和sf_sgRNA-R:5'-AACGATCGATATCGAAGCAC-3'),退火后与线性化的pX330载体进行连接构建ACE2嵌合基因敲入载体pX330_sf。

1.2.5 细胞转染与单克隆细胞的筛选与鉴定

将生长27 d的原代长白公猪PFF细胞复苏在6 cm培养皿中,细胞量约为 2.6×10^6 个。使用含16% FBS的全培养基(42 mL DMEM培养液、8 mL FBS和500 μL 青链霉素双抗),在38.5 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 的条件下培养约24 h,至细胞融合度>90%。用0.05%胰酶消化约2 min,1 200 r/min离心收集细胞。将ACE2嵌合基因敲入载体ACE2_KI和两个打靶载体

pX330-ACE2、pX330_sf以及抗性质粒pHY54_SV40-neo按照Lonza核转染试剂盒说明书建议比例配置,并进行细胞转染,程序为U-023。转染结束后,将细胞分盘至10 cm培养皿中,细胞培养24 h后,用1 mg/mL的G418筛选9~12 d,挑单细胞克隆于24孔板中,待细胞长满后,消化至12孔板中培养。留部分细胞在24孔板中继续培养,长满后消化并用NP40裂解细胞,提取细胞基因组DNA^[10-11]。使用在线工具Cas-OFFinder(<http://www.rgenome.net/cas-offinder/>)寻找潜在的脱靶位点并设计引物。对基因组DNA进行PCR测序鉴定,将基因型鉴定正确且未发生脱靶效应的细胞克隆进行冻存。

2 结 果

2.1 猪/大鼠ACE2结构的比较

对猪和SARS-CoV-2不易感动物大鼠的ACE2结构进行比较^[12],利用DNASTAR软件中的Protean模块分析猪和大鼠ACE2的二级结构,并使用Chou-Fasman算法预测猪和大鼠ACE2的 α 螺旋、 β 折叠、 β 转角的比例。猪ACE2的 α 螺旋占41.2%, β 折叠占24.7%, β 转角占27.8%(图1A);大鼠ACE2的 α 螺旋占40.4%, β 折叠占27.5%, β 转角占28.8%(图1B),显示猪和大鼠ACE2蛋白具有高度相似的二级结构。使用Swiss Model在线工具对猪和大鼠ACE2进行三维建模,接着利用Pymol软件比较两者三维结构的相似度,得出RMSD值为0.052,表明两者在三维结构上亦具有极高的相似性(图1C),因此可以推测猪和大鼠ACE2在相应组织或器官内应具有相似的生理功能,使用大鼠ACE2替换猪ACE2具有可行性。

2.2 ACE2嵌合基因的合成及猪/嵌合ACE2结构的比较

随着病毒在人群和自然界中的不断复制,新的变异也随之出现,新变异株的产生可能会增加大鼠感染SARS-CoV-2的风险。因此,本研究在大鼠ACE2的基础上构建大鼠/鸡ACE2嵌合基因作为敲入基因。首先,根据大鼠和鸡的ACE2的氨基酸序列比对结果(图2A),将ACE2与S蛋白结合的关键氨基酸位点(第19、31、34、35、42、353、354位氨基酸残基)替换为鸡的氨基酸残基。

对嵌合ACE2进行三维建模,并与猪ACE2的三维结构进行比对(图2B),得出RMSD值为0.054,表明改造后的嵌合ACE2结构并未发生较大变化,与猪的ACE2仍具有极高的相似性,可以使用该嵌合的ACE2来替换猪的ACE2。

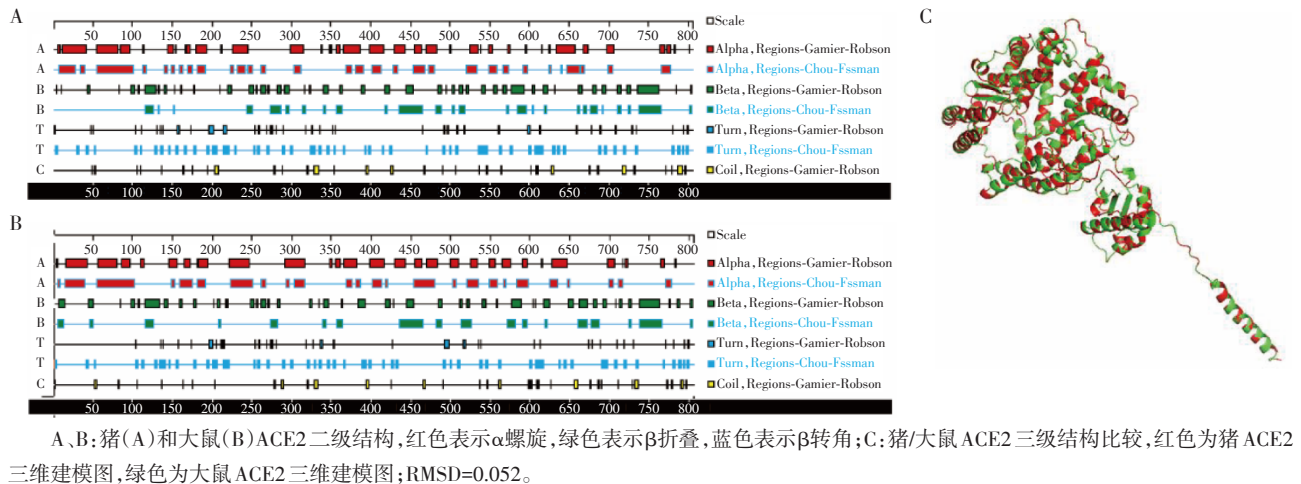


图1 猪/大鼠ACE2蛋白质二级结构和三级结构分析

Figure 1 Analysis of secondary and three-dimensional structures of ACE2 protein between pigs and rats

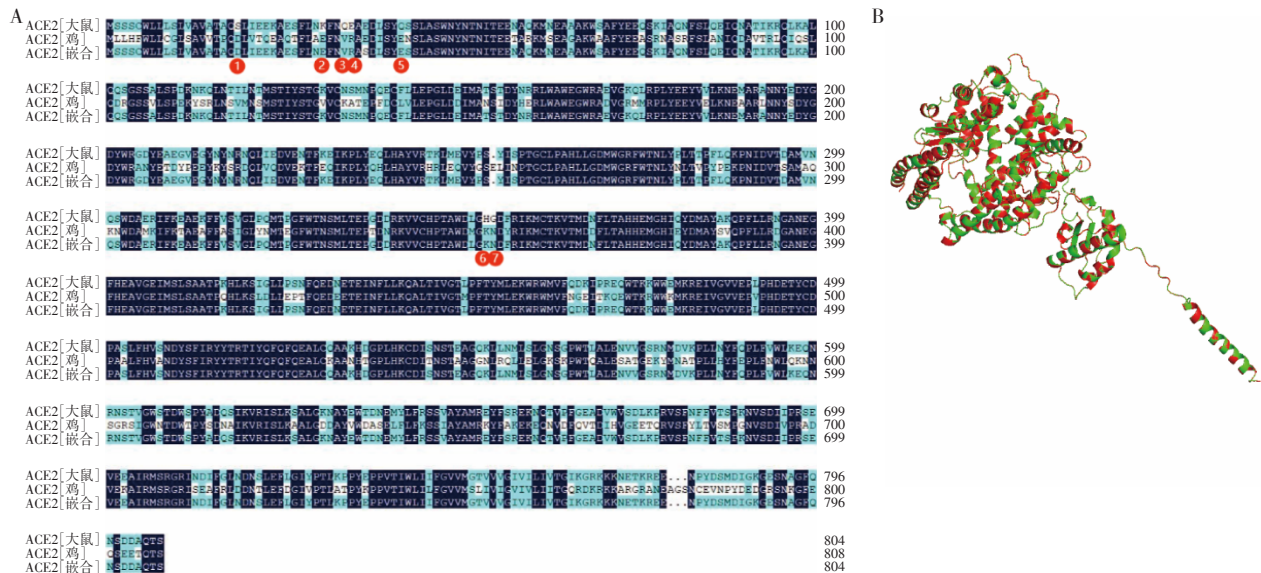


图2 嵌合ACE2氨基酸序列的比对(A)和三级结构的分析(B)

Figure 2 Comparison of chimeric ACE2 amino acid sequences(A) and analysis of tertiary structures(B)

2.3 载体的构建及靶位点编辑效率检测

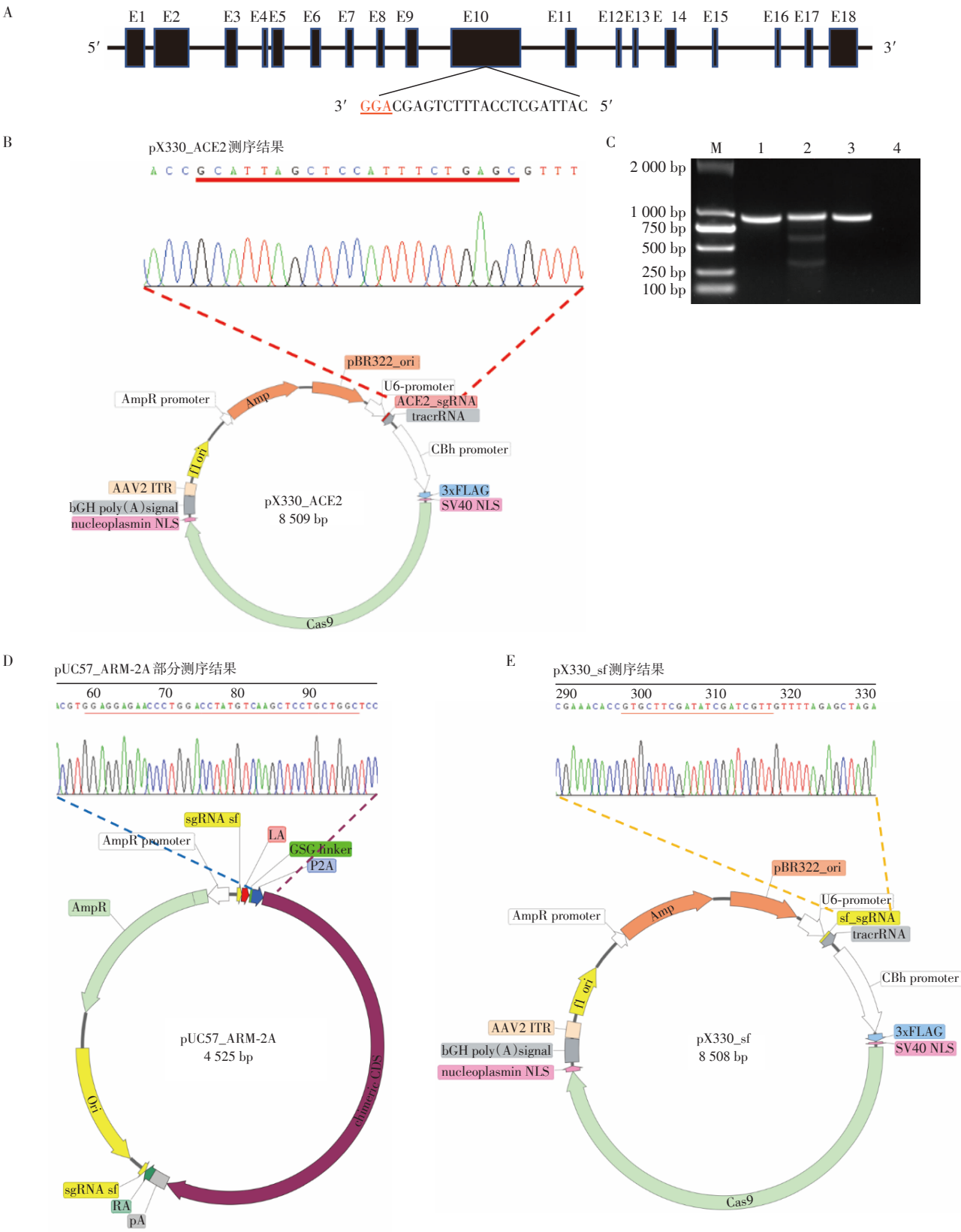
依据测序确认的长白猪ACE2第10外显子序列,利用在线工具设计sgRNA(图3A)。利用Bbs I酶将pX330载体线性化(图3B),并与sgRNA退火形成的双链连接,最后将连接产物进行转化,挑取单菌落并送测序,测序结果表明pX330载体上成功插入了猪ACE基因靶点的sgRNA序列。以转染打靶载体pX330_ACE2后的细胞基因组为模板进行PCR扩增,将PCR产物退火,再经过T7E1酶切,琼脂糖凝胶电泳结果显示目的片段被切成两段(图3C)。公式计算得出编辑效率为12.02%。

利用Esp3 I酶线性化pUC57_ARM-2A载体,同时根据设计的In-Fusion引物扩增ACE2嵌合基因,通过无缝克隆技术将ACE2嵌合基因插入敲入载体

中,构建ACE2嵌合基因敲入载体(图3D),使用In-Fusion引物对敲入载体进行测序验证,测序结果显示ACE2嵌合基因敲入载体ACE2_KI构建成功。此外将两臂外侧的sgRNA与线性化的pX330载体连接,将连接产物进行测序验证,测序结果表明打靶载体pX330_sf构建成功(图3E)。

2.4 长白猪PFF细胞系ACE2基因靶向编辑过程

将ACE2嵌合基因敲入载体ACE2 KI_pUC57和两个打靶载体pX330_ACE2、pX330_sf以及抗性质粒pHY54 SV40-neo转染长白猪PFF细胞后,Cas9蛋白会在sf_sgRNA和ACE2_sgRNA的引导下分别对ACE2嵌合基因敲入载体ACE2 KI_pUC57(图4)和猪的ACE2基因第10外显子进行剪切,通过同源定向修复机制将含有同源臂的线性ACE2嵌合基因整



A: 长白猪 ACE2 基因靶点示意图; B: 打靶载体 pX330-ACE2 图谱和测序结果; C: T7E1 酶切验证突变效率: 1 是加入 T7E1 酶的野生型基因组, 2 是加入 T7E1 酶的 ACE2 编辑基因组, 3 是没有加入 T7E1 酶的 ACE2 编辑基因组, 4 是加入 T7E1 酶的空白对照组; D: ACE2 嵌合基因敲入载体图谱和部分测序结果; E: 打靶载体 pX330-sf 图谱和测序结果。

图 3 载体的构建和剪切效率验证

Figure 3 Construction of the vector and verification of shearing efficiency

合到猪 ACE2 基因内部,从而导致猪的 ACE2 基因被破坏,而嵌合 ACE2 基因在 P2A 短肽自我剪切作用下,可以获得完整的嵌合 ACE2 蛋白。

2.5 ACE2 编辑的细胞克隆鉴定

经 G418 筛选后共获得 19 个单细胞克隆,测序结果显示有 4 个单细胞克隆的 ACE2 基因成功被 ACE2 嵌合基因所替换(表 1,图 5A),敲入效率达 21%。对在线工具 Cas-OFFinder 寻找到的 10 个潜在脱靶位点进行测序验证,测序结果显示所有潜在位点并未发生脱靶效应(图 5B)。

3 讨论

CRISPR/Cas9 基因编辑技术在猪遗传修饰研究中的应用,极大推动了抗病猪品种的培育^[13-14]。如猪繁殖与呼吸综合征(porcine reproductive and respiratory syndrome, PRRS)又称“蓝耳病”,是造成全世界养猪产业经济损失最严重的猪传染病之一,该病的病原是猪繁殖与呼吸综合征病毒(porcine reproductive and respiratory syndrome virus, PRRSV)。经研究发现 CD163 蛋白是 PRRSV 感染宿主的必需受体^[15],

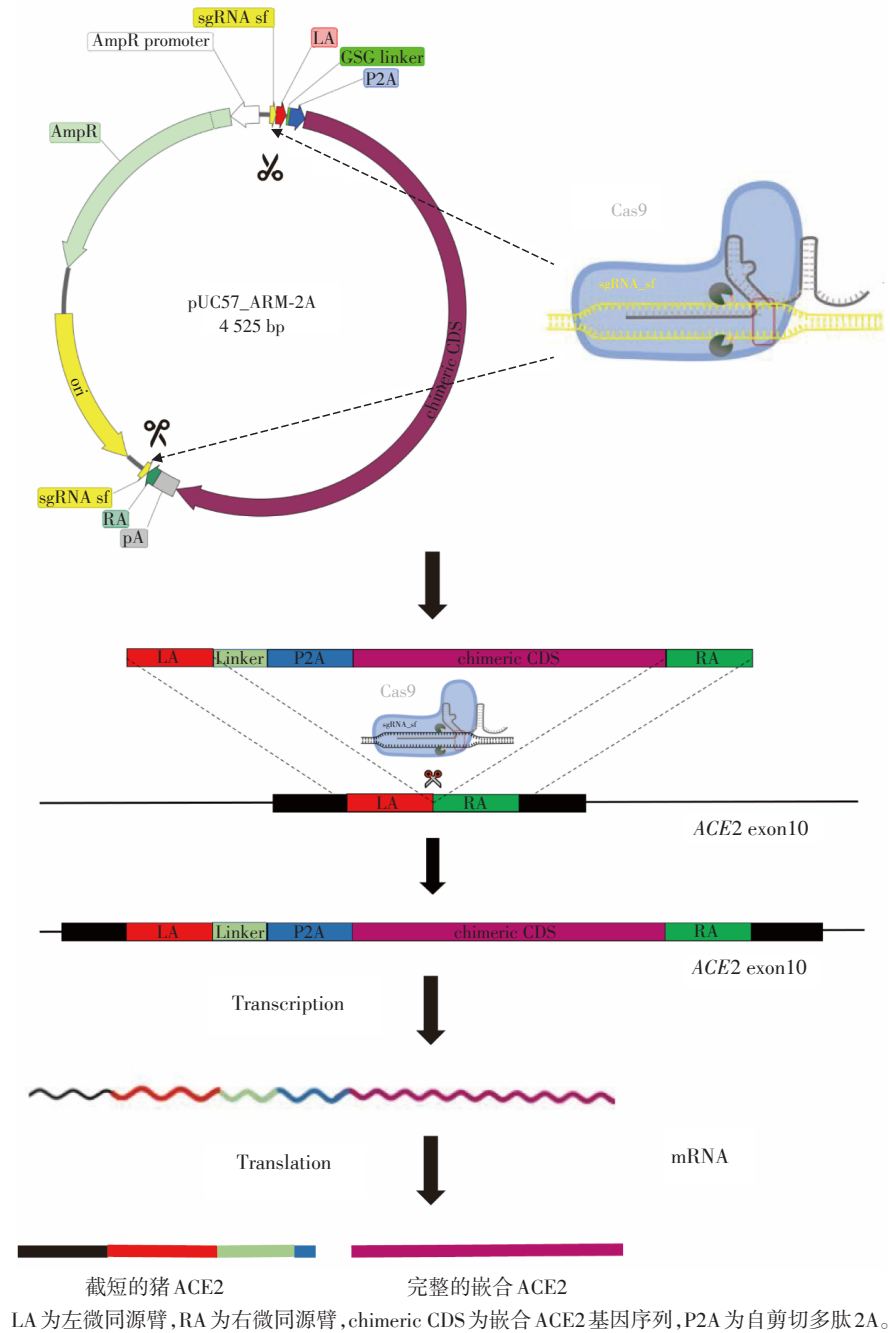


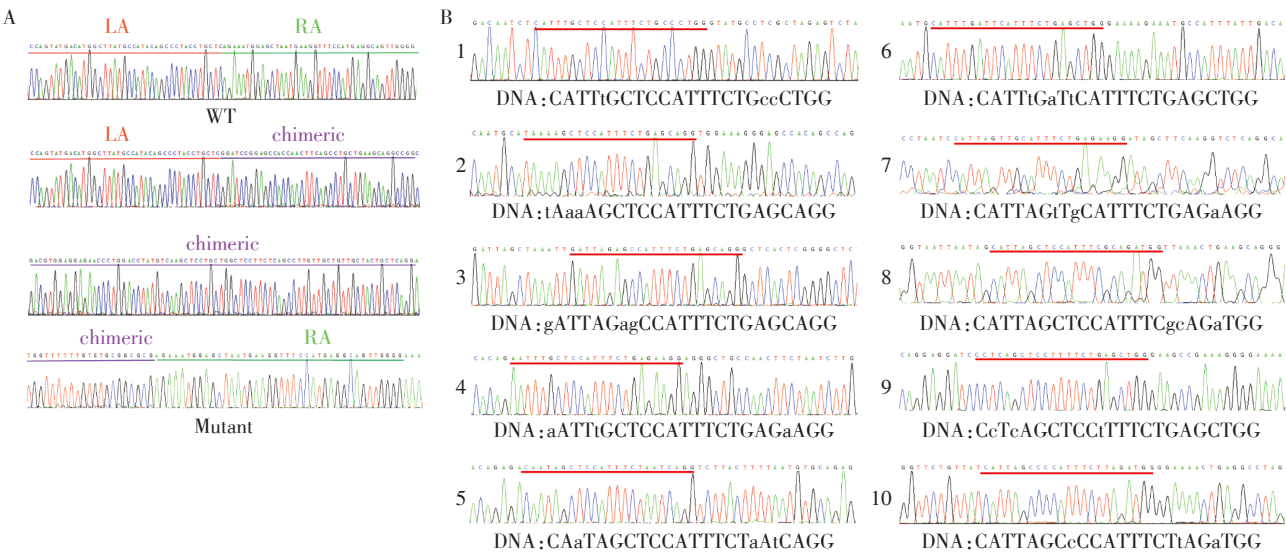
图4 嵌合 ACE2 基因的敲入编辑策略

Figure 4 Schematic of chimeric ACE2 knock-in strategy

表 1 嵌合ACE2敲入的长白猪PFF的基因型
Table 1 Gene type of chimeric ACE2 knock-in cell colonies of PFF

序号	测序区域(5'→3')	类型
WT	CCAGTATGACATGGCTTATGCCATACAGCCCTA CCTGCTCAGAAATGGAGCTAATGAAGGTTTCC ATGAGGCAGTTGGGG	WT
1	CCAGTATGACATGGCTTATGCCATACAGCCCTA CCTGCTCGGATCCGGAGCCACCAACTT//GGTT TTTTGTGTGCGGCGCGAGAAATGGAGCTAATG AAGGTTTCCATGAGGCAGTTGGGG	+2 564 bp
2	CCAGTATGACATGGCTTATGCCATACAGCCCTA CCTGCTCGGATCCGGAGCCACCAACTT//GGTT TTTTGTGTGCGGCGCGAGAAATGGAGCTAATG AAGGTTTCCATGAGGCAGTTGGGG	+2 564 bp
3	CCAGTATGACATGGCTTATGCCATACAGCCCTA CCTGCTCGGATCCGGAGCCACCAACTT//GGTT TTTTGTGTGCGGCGCGAGAAATGGAGCTAATG AAGGTTTCCATGAGGCAGTTGGGG	+2 564 bp
4	CCAGTATGACATGGCTTATGCCATACAGCC CTACCTGCTCGGATCCGGAGCCACCAACTT//G GTTTTTGTGTGCGGCGCGAGAAATGGAGCTA ATGAAGGTTTCCATGAGGCAGTTGGGG	+2 564 bp

注:WT为野生型;1~4为嵌合ACE2敲入成功的细胞克隆;+为碱基插入;标红字母为插入的碱基序列。



A:野生型和ACE2敲入的细胞测序结果(部分);B:脱靶效应检测的测序结果。

图5 嵌合ACE2敲入的细胞克隆测序分析
Figure 5 Sequencing of chimeric ACE2 knock-in cell colonies

2014年,Whitworth等^[16]成功制备了CD163双等位基因敲除猪,该基因编辑猪在进行攻毒试验后未表现出蓝耳病的临床症状。该研究表明病毒受体基因编辑后能显著提高猪的抗病能力。因此,对猪进行基因编辑以降低其对SARS-CoV-2的易感性是一种可行策略。

ACE2是SARS-CoV-2的主要功能受体,ACE2还参与调节血压、体液平衡和细胞增殖等过程,具有重要的生理功能。ACE2基因缺失会引起动物的

生理功能异常甚至死亡^[17]。目前尚未出现SARS-CoV-2感染大鼠的报道,但随着病毒在人群和自然界中的不断复制,产生的新变异毒株存在感染大鼠的风险。但SARS-CoV-2作为一种β属冠状病毒能够感染包括人类、家畜在内的哺乳动物,却无法感染鸟类。因此,本研究采取了一种新的策略来进行猪ACE2基因的改造。在SARS-CoV-2不易感的大鼠ACE2基因的基础上,将与S蛋白RBD区域直接接触的关键氨基酸序列进一步替换为β冠状病毒不

易感的鸡 ACE2 序列^[18], 构建大鼠/鸡嵌合 ACE2 基因, 利用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术将嵌合 ACE2 基因整合到猪 ACE2 基因的第 10 号外显子上。利用猪内源的 ACE2 基因启动子和 2A 肽序列来表达嵌合的 ACE2 基因, 同时实现了猪内源 ACE2 基因的敲除和嵌合 ACE2 基因的敲入。

本研究利用短同源臂 (40 bp) 来构建 ACE2 基因敲入供体, 转染后获得 19 个抗性的猪 PFF 细胞克隆, 其中 4 个为阳性单细胞克隆 (即嵌合的 ACE2 基因整合到猪内源的 ACE2 位点), 基因敲入效率高达 21%。以上结果显示, 短同源臂的供体简化了载体构建过程, 而且不会降低基因敲入效率。

由于 ACE2 基因在猪的 PFF 细胞中不表达, 本研究没有对 ACE2 编辑的 PFF 细胞克隆进行 ACE2 的表达检测和功能验证。本研究设计的嵌合 ACE2 是否能在猪体内发挥正常的生理功能和降低猪对 SARS-CoV-2 的易感性, 还需要通过体细胞核移植获得 ACE2 编辑的克隆猪后, 开展实验来进行研究探讨。

综上, 本研究首次在猪 PFF 细胞中利用 CRISPR/Cas9 技术实现了外源 ACE2 基因的定点整合, 成功建立了 ACE2 基因编辑的长白猪 PFF 细胞系, 为 SARS-CoV-2 不易感猪模型的构建提供了重要的实验材料。

[参考文献]

- [1] LI W, MOORE M J, VASILIEVA N, et al. Angiotensin-converting enzyme 2 is a functional receptor for the SARS coronavirus[J]. *Nature*, 2003, 426(6965): 450-454
- [2] CAO Y, SU B, GUO X, et al. Potent neutralizing antibodies against SARS-CoV-2 identified by high-throughput single-cell sequencing of convalescent patients' B cells[J]. *Cell*, 2020, 182(1): 73-84
- [3] 蒋潘虹, 阮嘉雯, 俞慕华, 等. 新型冠状病毒 (SARS-CoV-2) 变异的研究进展[J]. *中国人兽共患病学报*, 2022, 38(2): 157-164
- [4] ADIL M T, RAHMAN R, WHITELAW D, et al. SARS-CoV-2 and the pandemic of COVID-19[J]. *Postgrad Med J*, 2021, 97(1144): 110-116
- [5] 刘玲, 陈晓聪, 宣焱, 等. 新冠病毒受体蛋白 ACE2 结构与功能的生信分析及原核表达[J/OL]. *中国免疫学杂志*, 2021 [2022-01-01]. <https://kns.cnki.net/kcms/detail/22.1126.R.20211129.1310.006.html>
- [6] SCIALO F, DANIELE A, AMATO F, et al. ACE2: The major cell entry receptor for SARS-CoV-2[J]. *Lung*, 2020, 198(6): 867-877
- [7] PICKERING B S, SMITH G, PINETTE M M, et al. Susceptibility of domestic swine to experimental infection with severe acute respiratory syndrome coronavirus 2[J]. *Emerg Infect Dis*, 2021, 27(1): 104-112
- [8] 汪娅媛, 田仰清, 严涵, 等. 新型冠状病毒及其受体 ACE2 在犬猫上的研究[J]. *上海畜牧兽医通讯*, 2021(3): 6-9
- [9] YAN R, ZHANG Y, LI Y, et al. Structural basis for the recognition of SARS-CoV-2 by full-length human ACE2[J]. *Science*, 2020, 367(6485): 1444-1448
- [10] LI Z, YANG H Y, WANG Y, et al. Generation of tryptophan hydroxylase 2 gene knockout pigs by CRISPR/Cas9-mediated gene targeting[J]. *J Biomed Res*, 2017, 31(5): 445-452
- [11] 曾华沙, 姚俊, 王红顺, 等. 人/猪 OSBPL2 同源性比较及猪 PFFs 靶基因敲除细胞系的建立[J]. *南京医科大学学报 (自然科学版)*, 2018, 38(2): 149-154
- [12] PRAHARAJ M R, GARG P, KESARWANI V, et al. SARS-CoV-2 spike glycoprotein and ACE2 interaction reveals modulation of viral entry in wild and domestic animals[J]. *Front Med (Lausanne)*, 2021, 8: 775572
- [13] WANG R G, RUAN M M, ZHANG R J, et al. Antigenicity of tissue and organs from GGTA1/CMAH/ β 4GalNT2 triple gene knock pigs[J]. *J Biomed Res*, 2019, 33(4): 235-243
- [14] 刘思远, 卢丹, 唐中林. CRISPR/Cas9 技术及其在猪基因编辑中的应用[J]. *畜牧兽医学报*, 2020, 51(3): 409-416
- [15] PRATHER R S, WHITWORTH K M, SCHOMMER S K, et al. Genetic engineering alveolar macrophages for host resistance to PRRSV[J]. *Vet Microbiol*, 2017, 209: 124-129
- [16] WHITWORTH K M, LEE K, BENNE J A, et al. Use of the CRISPR/Cas9 system to produce genetically engineered pigs from *in vitro*-derived oocytes and embryos[J]. *Biol Reprod*, 2014, 91(3): 78
- [17] ZHU P, ZHANG W, FENG F, et al. Role of angiotensin-converting enzyme 2 in fine particulate matter-induced acute lung injury[J]. *Sci Total Environ*, 2022, 825: 153964
- [18] MEEKINS D A, GAUDREAULT N N, RICHT J A. Natural and experimental SARS-CoV-2 infection in domestic and wild animals[J]. *Viruses*, 2021, 13(10): 1993

[收稿日期] 2022-05-24

(本文编辑: 陈汐敏)