

官凯锋,袁晨阳,吕镭州,等.基于CRISPR/Cas9系统构建NCOA4敲除的MARC-145细胞系及其对HP-PRRSV复制的影响[J].华中农业大学学报,2025,44(5):134-141.DOI:10.13300/j.cnki.hnlkxb.2025.05.014

基于CRISPR/Cas9系统构建NCOA4敲除的MARC-145细胞系及其对HP-PRRSV复制的影响

官凯锋¹,袁晨阳²,吕镭州³,张改平^{1,2,3}

1. 北京大学现代农业学院, 北京 100871; 2. 西北农林科技大学动物医学院, 杨凌 712100;

3. 河南省农业科学院动物免疫学重点实验室, 郑州 450002

摘要 为探究NCOA4介导的铁自噬在PRRSV感染中的作用,利用CRISPR/Cas9技术在PRRSV易感的MARC-145细胞中敲除铁自噬的关键受体NCOA4基因,并结合Sanger测序和Western blot检测NCOA4的敲除效率。同时运用流式细胞术、qPCR、Western blot、TCID₅₀等对NCOA4缺失型和野生型MARC-145进行细胞周期、细胞活性检测,以及检测NCOA4缺失对PRRSV复制的影响。结果显示,本研究成功构建NCOA4基因敲除的MARC-145细胞系。此外,相比于野生型MARC-145细胞系,敲除NCOA4显著增加PRRSV ORF7 mRNA、N蛋白及病毒滴度水平,同时促进FTH 1蛋白表达。结果表明,铁自噬的关键受体基因NCOA4缺失能促进PRRSV复制。

关键词 CRISPR/Cas9; NCOA4; 铁自噬; 猪繁殖与呼吸综合征; 基因敲除; 细胞活性

中图分类号 S852.651 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2025)05-0134-08

猪繁殖与呼吸综合征(porcine reproductive and respiratory syndrome, PRRS),也称为蓝耳病,最初于20世纪80年代在美国被发现,随后迅速在欧洲蔓延^[1],对养猪业造成了巨大的经济损失^[2]。PRRS是由猪繁殖与呼吸综合征病毒(porcine reproductive and respiratory syndrome virus, PRRSV)引起的,主要引起母猪的生殖障碍和急性呼吸道疾病^[3]。PRRSV是一种单股正链RNA病毒,属于套式病毒目(Nidovirales)、动脉炎病毒属(Arterivirus),其基因组长度约为15 kb,含有9个开放阅读框(ORF),其中ORF1a和ORF1b编码病毒非结构蛋白(NSPs),ORF2-ORF7编码病毒结构蛋白^[4]。PRRSV主要感染巨噬细胞和单核细胞,能破坏猪的先天性和适应性免疫应答。PRRSV在体内的主要感染靶细胞是猪的肺泡巨噬细胞(PAM)^[5]。此外,只有非洲绿猴肾细胞系MA-104以及衍生的MARC-145,完全允许在体外进行PRRSV复制^[6]。作为原代细胞,PAM分离困难、寿命短并且对体外培养条件敏感。相比于PAM,MARC-145细胞系具有培养简单、容

易进行基因编辑的优势^[7],故该细胞系更易于构建基因敲除模型。PRRSV感染能引起细胞的一系列生理和结构变化,包括细胞内各种离子的变化等。

铁是宿主细胞生存所必需的元素。在生理条件下,铁参与细胞的各种生命活动,包括DNA复制、氧气运输、细胞能量代谢以及各种酶反应^[8]。微量元素铁在保障细胞正常生理机能过程中起着至关重要的作用。铁代谢失衡能影响许多疾病的发生和发展过程,比如炎症、癌症和病毒感染等^[9]。铁的过载或缺乏对细胞都可能造成危险。过载的铁能催化脂质过氧化,造成细胞死亡^[10]。然而,铁的缺乏会导致细胞自噬增加,增加铁离子释放,这一过程被称为铁自噬^[11]。已有研究表明,病毒感染会影响细胞内铁离子的浓度,如PRRSV^[12-13]等。因此,维持铁平衡对于细胞的正常生理功能和抗病毒研究非常重要。

核受体共激活因子4(NCOA4)作为铁自噬的关键受体,参与了多种病理过程,包括病毒感染。

收稿日期:2024-09-27

基金项目:国家自然科学基金项目(32302844);中国博士后科学基金面上项目(2024M750114)

官凯锋, E-mail: guankai Feng1121@pku.edu.cn

通信作者:张改平, E-mail: zhanggaiping@pku.edu.cn

*NCOA4*介导的铁自噬能监控细胞内铁离子浓度,铁自噬能增加细胞内亚铁离子浓度,继而亚铁离子通过芬顿反应变成三价铁离子,这个过程造成了大量活性氧生成,导致细胞铁死亡,这对病毒在细胞内复制至关重要^[14-15]。因此,*NCOA4*介导的铁自噬的通量变化,是维持细胞内铁平衡的关键,可能在抗病毒感染过程中起重要作用。已有研究表明,*NCOA4*能与人巨细胞病毒(HCMV)、人副流感病毒2(hPIV2)等病毒蛋白互作,促进铁自噬,从而抑制病毒复制^[16-17]。由于*NCOA4*在哺乳动物细胞中广泛表达,其功能可能对多种病毒复制过程产生影响。然而,*NCOA4*介导的铁自噬在PRRSV感染过程中的关系和作用尚未报道。

因此,本研究采用CRISPR/Cas9技术建立*NCOA4*基因敲除的MARC-145细胞系,并探讨基因敲除对细胞周期的影响,验证敲除*NCOA4*后对PRRSV复制的影响,确定敲除模型的可行性,旨在为PRRSV和*NCOA4*介导的铁自噬提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 细胞、病毒和质粒

293T细胞、MARC-145细胞、pLentiCRISPRV2表达质粒、psPAX2辅助质粒、pMD2.G辅助质粒、HP-PRRSV来源于河南省农业科学院动物免疫学重点实验室。

1.2 试剂及抗体

E. coli DH5 α 感受态细胞、2 \times Phanta Max Master Mix,购自武汉谱奥生物科技有限公司;Universal Genomic DNA Kit购自康为世纪股份有限公司;Lipofectamine 2000购自Thermo公司;Anti-*NCOA4*抗体购自Abcam公司;PRRSV N蛋白抗体购自Gene-Tex公司;铁蛋白重链1(ferritin heavy chain 1, FTH1)抗体购自爱博泰克生物;GAPDH及HRP标记的二抗均购自武汉三鹰生物技术有限公司;反转录试剂盒、10 \times SYBR Green 实时荧光定量PCR预混液购自TaKaRa公司。

1.3 sgRNA引物设计

基于NCBI数据库中*NCOA4*基因的序列信息,按照CRISPR/Cas9系统的设计原则,在该基因的外显子区段设计特异性sgRNA。相应引物序列详见表1。

表 1 *NCOA4*-sgRNA 引物
Table 1 *NCOA4*-sgRNA primers

序号 No.	引物名称 Primer names	引物序列 (5'→3') Primer sequences (5'→3')
1	<i>NCOA4</i> -sgRNA1-F	CACCGTGACTCCTGTAC- CAACTGTC
2	<i>NCOA4</i> -sgRNA1-R	AAACGACAGTTGGTACAG- GAGTCAC
3	<i>NCOA4</i> -sgRNA2-F	CACCGAGGTCCATCT- CATCTTGATC
4	<i>NCOA4</i> -sgRNA2-R	AAACGATCAAGATGAGAT- GGACCTC
5	<i>NCOA4</i> -sgRNA3-F	CACCGTTTCACGACTGT- CACTCTC
6	<i>NCOA4</i> -sgRNA3-R	AAACGAGAGTGACAGTC- GTGAAAC

1.4 重组质粒 pLentiCRISPRV2-*NCOA4*-sgRNA 的构建

通过退火使合成的sgRNA上下游引物结合为双链小片段。随后将其连接到pLentiCRISPRV2载体上。转化试验中选用*E. coli* DH5 α 感受态细胞。利用PCR鉴定阳性克隆同时进行测序验证。

1.5 敲除细胞系构建

将293T细胞接种于培养皿,待其融合度达80%时,将pLentiCRISPRV2-*NCOA4*-sgRNA、pSPAX2、pMD2.G质粒按3:2:1的比例共转进293T细胞,72 h后收集细胞上清。慢病毒转染MARC-145细胞48 h后,进一步利用嘌呤霉素筛选。筛选期间取部分细胞,提取基因组DNA,对sgRNA靶点进行PCR扩增,并将扩增产物送测序,分析每个sgRNA的编辑效率。随后,将细胞按1个/孔接种于96孔细胞培养板。待孔中细胞长成单克隆细胞团后,取部分细胞提取基因组DNA,对sgRNA靶点进行PCR扩增,并将扩增产物进行测序鉴定。

1.6 Western blot

将*NCOA4*基因敲除细胞(*NCOA4*-KO-1和*NCOA4*-KO-2)以及野生型MARC-145细胞(WT)分别接种于6孔细胞培养板,感染PRRSV(MOI=1)24 h后收集细胞样品。蛋白变性后经SDS-PAGE分离后转移到PVDF膜上。5%脱脂牛奶封闭1~2 h。用PBST稀释的一抗4 $^{\circ}$ C孵育过夜。去除抗体后,将膜洗涤3次,每次10 min。用PBST稀释的二抗室温孵育1 h。洗涤3次后,用ECL增强型化学发光试剂显示信号。

1.7 qPCR检测

分别将 WT、NCOA4-KO-1 和 NCOA4-KO-2 细胞铺板,感染 PRRSV(MOI=1)24 h后,Trizol 裂解法提取细胞总 RNA,反转录后得到 cDNA 样品。以 cDNA 为模板进行定量 PCR 检测,检测 PRRSV ORF7 mRNA 水平。反应程序为:10×SYBR Green 实时荧光定量 PCR 预混液,5 μL;ddH₂O,3.2 μL;上游引物 ORF7 (N)-F,0.4 μL,序列为 AAAAC-CAGTCCAGAGGCAAG;下游引物 ORF7 (N)-R,0.4 μL,序列为 CGGATCAGACGCACAGTATG;cDNA,1 μL。

1.8 病毒滴度测定

分别将 WT、NCOA4-KO-1 和 NCOA4-KO-2 细胞铺板,随后感染 PRRSV(MOI=1),48 h后分别收集病毒。将上述分别收集的病毒按 10 倍梯度稀释后依次感染 WT 型 MARC-145 细胞。培养 72 h 后观察细胞病变,并按照 Reed-Muench 法计算 TCID₅₀。

1.9 流式细胞术

分别将 WT 和 NCOA4-KO-1 细胞铺板,待细胞汇合度达 80% 时进行胰酶消化。将细胞转移至 1.5 mL 离心管,加入提前预冷的 70% 乙醇混悬,于 4 ℃

条件下固定过夜。弃去上清,用预冷的 PBS 充分悬浮细胞,再次离心。碘化丙啶(PI)染色液避光孵育 30 min,流式细胞仪检测。

1.10 细胞活性检测

将 WT 和 NCOA4-KO-1 细胞分别铺板,于 12、24、36 和 48 h 时加入 CCK-8 试剂,继续在 37 ℃ 条件下孵育 2 h。随后测定 450 nm 吸光度以评估细胞活性。

1.11 统计学分析

采用 GraphPad Prism 10.1.2 进行数据统计及可视化分析,所有试验结果以“平均值±标准差”表示。*表示 $P<0.05$; **表示 $P<0.01$ 。

2 结果与分析

2.1 pLentiCRISPRV2-NCOA4-sgRNA 重组载体的鉴定

根据 CRISPR/Cas9 设计原则,设计 3 条 sgRNA 序列(图 1),分别构建至载体 pLentiCRISPRV2 中,随后对菌液进行 PCR 鉴定并测序。测序结果显示重组质粒构建成功,命名为 pLentiCRISPRV2-NCOA4-sgRNA1、pLentiCRISPRV2-NCOA4-sgRNA2、pLentiCRISPRV2-NCOA4-sgRNA3。

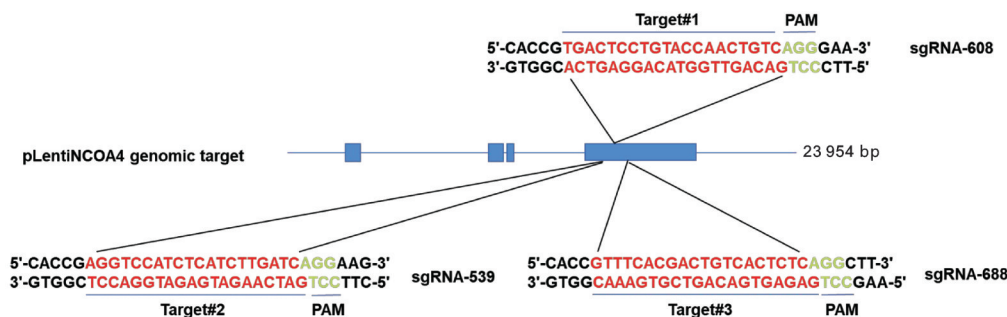


图1 NCOA4敲除重组质粒的构建

Fig.1 Construction of NCOA4 knockout recombinant plasmid

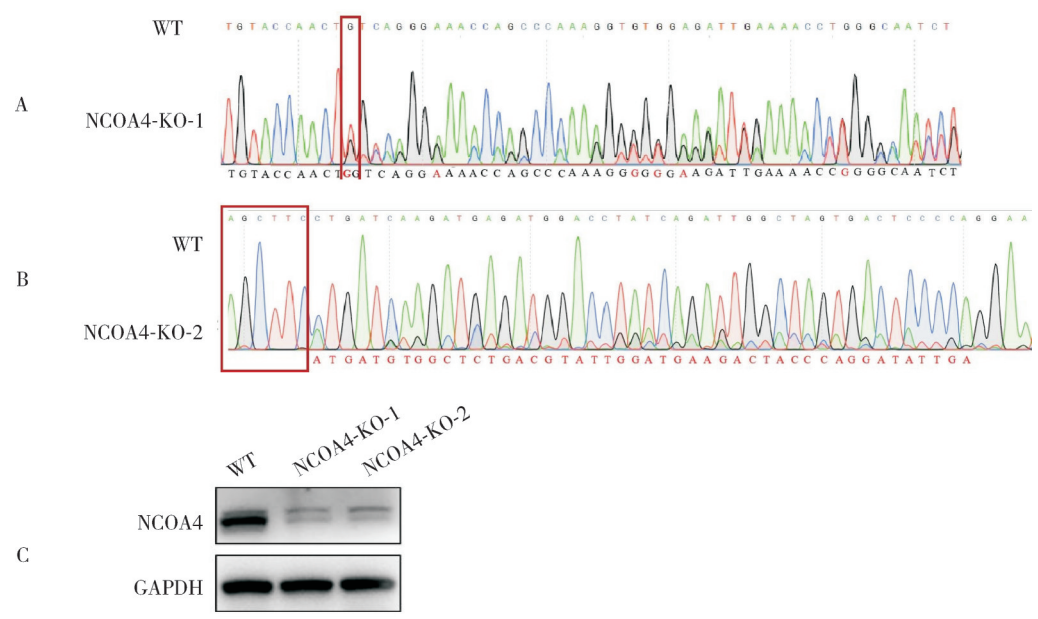
2.2 NCOA4基因敲除的 MARC-145 细胞系的筛选与鉴定

利用慢病毒感染 MARC-145 细胞后,经筛选获得单克隆细胞,并对其进行 Sanger 测序验证。结果显示:成功构建 NCOA4 基因的 MARC-145 敲除细胞系,并分选出 2 种类型的单克隆细胞系,即 NCOA4-KO-1(图 2A)和 NCOA4-KO-2(图 2B)。将这 2 种单克隆细胞系和野生型 MARC-145 细胞(WT)分别铺至 6 孔细胞培养板,Western blot 分析结果显示,在 NCOA4 敲除细胞系中,目标蛋白的表达水平下降了 80%(图 2C)。这些结果说明,

NCOA4 基因敲除的 MARC-145 细胞系成功构建。

2.3 敲除 NCOA4 基因对 PRRSV 复制的影响

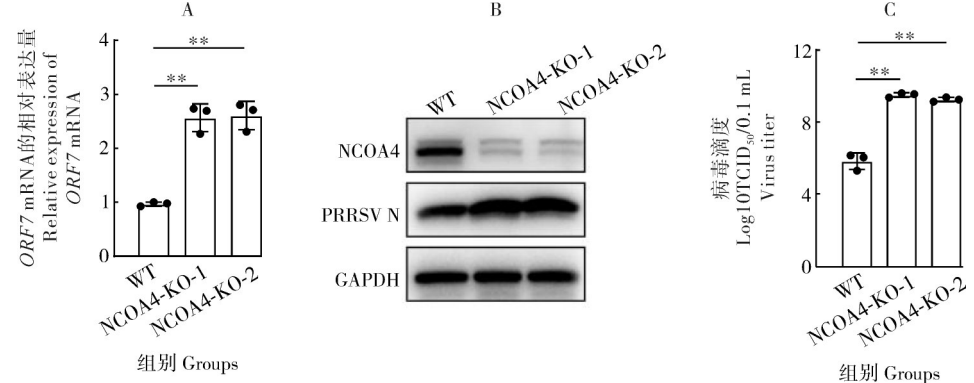
为探究 NCOA4 对 PRRSV 复制的影响,利用 PRRSV 分别感染 MARC-145 NCOA4-KO-1、NCOA4-KO-2 和 WT 细胞,提取总 RNA 和总蛋白,同时收集总病毒。进行 qPCR、Western blot 及 TCID₅₀ 分析,分别检测 PRRSV ORF7 mRNA 和 N 蛋白的表达水平以及病毒滴度。结果显示,相比于野生型,敲除 NCOA4 显著增加了 PRRSV ORF7 mRNA、N 蛋白表达水平及病毒滴度(图 3)。这些结果表明敲除 NCOA4 基因能促进 PRRSV 的复制。



A: *NCOA4*-KO-1 细胞系 (*NCOA4* 敲除的 MARC-145 细胞系 1) 基因缺失突变型分析图; B: *NCOA4*-KO-2 细胞系 (*NCOA4* 敲除的 MARC-145 细胞系 2) 基因缺失突变型分析图; C: 敲除细胞系中 *NCOA4* 基因的蛋白水平。A: Analysis of gene deletion mutant types in *NCOA4*-KO-1 cell line (*NCOA4* knockout MARC-145 cell line 1); B: Analysis of gene deletion mutant types in *NCOA4*-KO-2 cell line (*NCOA4* knockout MARC-145 cell line 2); C: Protein levels of the *NCOA4* gene in the knockdown cell lines.

图 2 MARC-145 细胞 *NCOA4* 敲除细胞系的构建与鉴定

Fig.2 Construction and identification of *NCOA4* knockout cell lines in MARC-145 cells



A: PRRSV 在 WT 和 *NCOA4*-KO 细胞中的 mRNA 水平; B: PRRSV N 蛋白在 WT 和 *NCOA4*-KO 细胞中的蛋白水平; C: 病毒滴度。 **表示 $P < 0.01$, 下同。 A: Relative quantification of PRRSV replication in WT and *NCOA4*-KOs cells; B: PRRSV N protein levels in WT and *NCOA4*-KO cells; C: Viral titer. ** represents $P < 0.01$, the same as below.

图 3 *NCOA4*-KO 对 PRRSV 复制的影响

Fig.3 The effect of *NCOA4*-KO on PRRSV replication

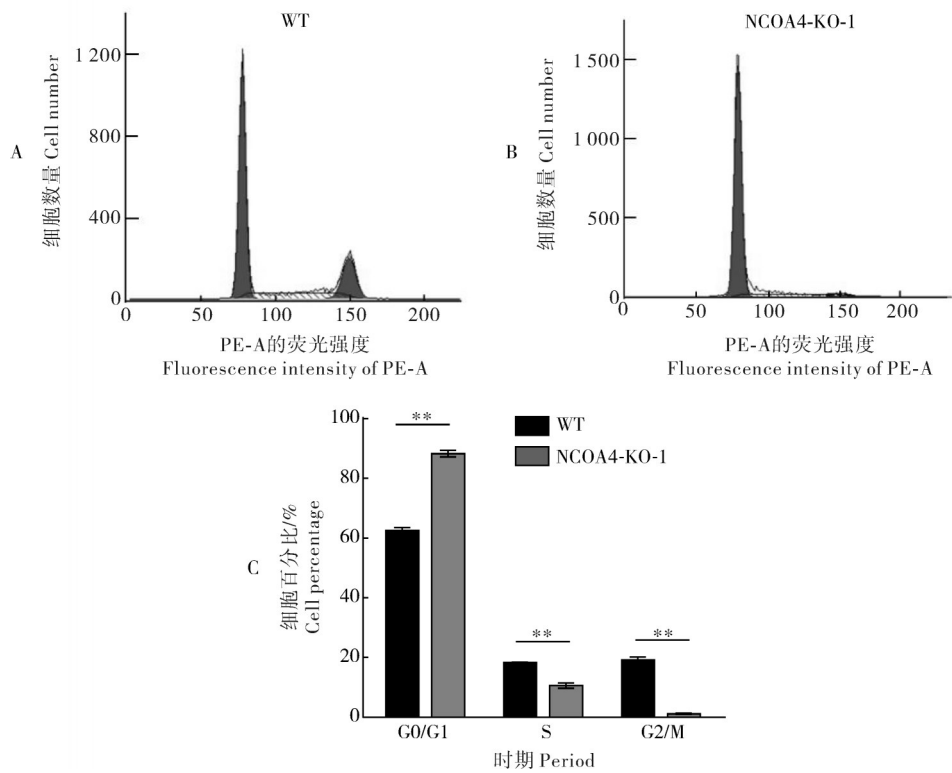
2.4 *NCOA4* 基因敲除对细胞周期、细胞活性及铁自噬过程的影响

流式细胞术分析结果显示,相比于野生型, *NCOA4* 基因敲除细胞 G0/G1 期细胞比例显著增加 ($P < 0.01$), 而 S 期和 G2/M 期比例均极显著降低 ($P < 0.01$) (图 4)。

CCK8 试验结果表明,与野生型相比, *NCOA4* 基因敲除细胞在 24、36 h 的增殖能力明显减弱, 48 h 差

异更加显著 (图 5)。这表明 *NCOA4* 缺失可抑制细胞增殖。

为检测 *NCOA4* 基因敲除对铁自噬的影响, 利用 Western blot 检测铁蛋白重链 1 (ferritin heavy chain 1, FTH1, 铁自噬标志蛋白) 的蛋白表达水平。结果显示, 相比于 WT 型, *NCOA4* 基因敲除细胞系中 FTH1 蛋白表达水平增加 (图 6)。这表明敲除细胞系中 FTH1 的利用减少, 且铁自噬被抑制。



A、B:野生型及NCOA4基因敲除细胞周期的流式细胞术分析结果;C:G0/G1、S、G2/M各时期细胞比例直方图($n=3$)。A and B: Cell cycle analysis of wild type cells and NCOA4 gene knockout by flow cytometry; C:Histogram of cell proportion in G0/G1, S, G2/M phases of the cell cycle ($n=3$).

图4 NCOA4基因敲除细胞周期检测

Fig.4 Cell cycle detection after NCOA4 gene knockout

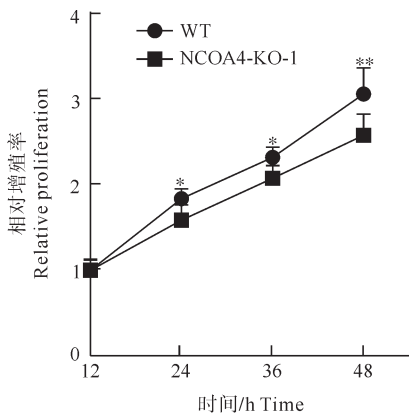


图5 NCOA4基因敲除后的细胞活性($n=10$)

Fig.5 Cell viability detection after NCOA4 gene knockout($n=10$)

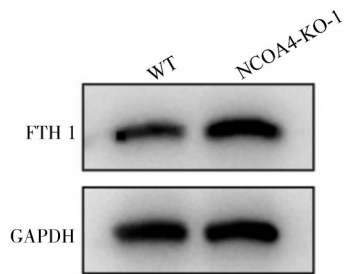


图6 FTH1在WT和NCOA4-KO细胞中的蛋白水平

Fig.6 FTH1 protein levels in WT and NCOA4-KO cells

3 讨论

近年来,3种主要的核酸酶介导的基因编辑工具,包括转录激活因子样核酸酶(TALENs),锌指核酸酶(ZFNs)和成簇规则间隔短回文重复序列(CRISPR)/CRISPR相关核酸酶9(Cas9)已广泛用于抗病毒研究^[18-19]。由于TALENs和ZFNs的构建

昂贵且耗时^[20],基因编辑技术CRISPR/Cas9因其简单、高效、脱靶效应有限的特点,使其具有更高效的靶位点设计、更少的载体构建、有限的脱靶效应,快速应用于每个研究领域^[21-22]。特别在抗病毒研究领域,CRISPR/Cas9被认为是一种潜在的抗病毒工具。CRISPR/Cas9技术涉及Cas9解旋酶,它可以与宿主DNA的回文重复序列转录的RNA结合,并切割与RNA间隔子配对的DNA,RNA间隔子是从其他染色体元件获得的宿主DNA的短片段转录本。在这个系统中,DNA回文重复序列的转录物命名为反式激活的CRISPR RNA(tracr RNA),而间隔子的转录

物称为CRISPR RNA (crRNA)。tracrRNA和crRNA可以连接在一起形成单个向导RNA (sgRNA), 可以使Cas9诱导Protospacer相邻基序(PAMs)区域的DNA切割^[23-24]。已有研究表明, 通过CRISPR/Cas9技术敲除HIV的受体CXCR4和CCR5, 能显著抑制HIV的复制^[25-26]; 相比于野生型BHK21细胞, 利用CRISPR/Cas9技术构建的TRIM3基因敲除的BHK21细胞系能够显著抑制FMDV的复制^[27]; 在HEK-293T细胞系中敲除USP30基因可显著抑制SVA的复制^[28]。同样该技术也被广泛应用于研究PRRSV。在PK15-CD163-Cas9细胞中敲除IL20RB、ATP6V0A1和STX10基因可显著降低PRRSV ORF7 mRNA表达水平^[29]; 此外, 利用该技术培育的CD163敲除猪, 能免受PRRSV感染^[30]。本研究通过sgRNA转染和单克隆筛选构建出NCOA4基因敲除的MARC-145细胞系, 并通过Western blot验证了NCOA4基因的敲除效率。由于MARC-145对PRRSV易感, 且是PRRSV致病机制研究的模式细胞。因此, 敲除细胞系的出现能有效研究NCOA4在PRRSV复制过程中的关键作用。

NCOA4作为铁自噬的关键受体, 能识别铁蛋白并和FTH1结合, 形成铁蛋白-NCOA4复合物, 这种复合物能被自噬接头蛋白(TAX1BP1)识别, 继而发生自噬反应, 从而释放铁离子^[31]。NCOA4的表达量决定了铁蛋白的自噬降解程度, 是细胞内铁离子浓度的关键。铁过载会促进NCOA4与HERC2互作, 这种互作使NCOA4在蛋白酶体的作用下被降解, 从而导致铁蛋白积累^[32]。铁与NCOA4的结合也能通过改变NCOA4蛋白形态, 从而抑制铁自噬。因此, NCOA4的表达量调控机制为研究铁自噬的重点, 不仅能受蛋白酶体这种翻译后修饰的影响, 也能受转录调控和转录后调控的影响。比如, 转录因子HIF2能与NCOA4启动子上的顺式作用元件结合从而在转录水平激活NCOA4的表达^[33-34]。miRNA-124-3p能与NCOA4的3'UTR结合, 并在转录后水平抑制NCOA4蛋白表达量。NCOA4介导的铁自噬对疾病的发生具有重要影响, 特别在病毒感染方面, NCOA4介导的铁自噬能显著抑制病毒复制^[17]。本研究中, 利用QPCR和Western blot检测发现敲除NCOA4后, PRRSV复制显著增强。因此, 铁自噬的抑制剂可能是治疗疾病的有效手段, 而将铁自噬与铁死亡相结合的药物也可能是有效应对疾病耐药性

的方法。

为研究铁自噬和PRRSV复制的关系, 本研究以铁自噬为切入点, 以铁自噬的关键受体NCOA4为关键, 通过CRISPR/Cas9基因编辑技术在对PRRSV易感的MARC-145细胞中敲除了NCOA4的表达。同时利用流式细胞术检测了敲除NCOA4与否的细胞周期的变化, 并在转录、翻译以及病毒感染水平验证了NCOA4对PRRSV复制的影响。这些结果初步揭示了NCOA4介导的铁自噬对PRRSV复制的抑制作用, 但在其机制上仍需进一步探索。未来研究可结合多组学分析、基因治疗和铁代谢调控, 为PRRS及其他病毒性疾病的防控提供新策略。

参考文献 References

- [1] BARON T, ALBINA E, LEFORBAN Y, et al. Report on the first outbreaks of the porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) in France: diagnosis and viral isolation [J]. *Annals of veterinary research*, 1992, 23(2): 161-166.
- [2] ZHANG Z D, LI Z, LI H, et al. The economic impact of porcine reproductive and respiratory syndrome outbreak in four Chinese farms: based on cost and revenue analysis [J/OL]. *Frontiers in veterinary science*, 2022, 9: 1024720 [2024-09-27]. <https://doi.org/10.3389/fvets.2022.1024720>.
- [3] MONTANER-TARBES S, DEL PORTILLO H A, MONTOYA M, et al. Key gaps in the knowledge of the porcine reproductive syndrome virus (PRRSV) [J/OL]. *Frontiers in veterinary science*, 2019, 6: 38 [2024-09-27]. <https://doi.org/10.3389/fvets.2019.00038>.
- [4] MENG X J. Heterogeneity of porcine reproductive and respiratory syndrome virus: implications for current vaccine efficacy and future vaccine development [J]. *Veterinary microbiology*, 2000, 74(4): 309-329.
- [5] DUAN X, NAUWYNCK H J, PENSART M B. Effects of origin and state of differentiation and activation of monocytes/macrophages on their susceptibility to porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) [J]. *Archives of virology*, 1997, 142(12): 2483-2497.
- [6] KIM H S, KWANG J, YOON I J, et al. Enhanced replication of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus in a homogeneous subpopulation of MA-104 cell line [J]. *Archives of virology*, 1993, 133(3): 477-483.
- [7] YIM-IM W, HUANG H Y, PARK J, et al. Comparison of ZMAC and MARC-145 cell lines for improving porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolation from clinical samples [J/OL]. *Journal of clinical microbiology*, 2021, 59(3): e01757-20 [2024-09-27]. <https://doi.org/10.1128/JCM.01757-20>.

- [8] GALY B, CONRAD M, MUCKENTHALER M. Mechanisms controlling cellular and systemic iron homeostasis [J]. *Nature reviews molecular cell biology*, 2023, 25(2):133-155.
- [9] WANG W, KNOVICH M A, COFFMAN L G, et al. Serum ferritin: past, present and future [J]. *Biochimica et biophysica acta (BBA): general subjects*, 2010, 1800(8):760-769.
- [10] ANDERSON G J, FRAZER D M. Current understanding of iron homeostasis [J]. *The American journal of clinical nutrition*, 2017, 106(Suppl 6):1559S-1566S.
- [11] KAUR J, DEBNATH J. Autophagy at the crossroads of catabolism and anabolism [J]. *Nature reviews molecular cell biology*, 2015, 16(8):461-472.
- [12] GREBENNIKOVA T V, MATVEEVA I S, MUSIENKO M I, et al. Changes of trace element content in MARC-145 cells before and after infection with virulent and attenuated strains of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) [J]. *Molekuliarnaia genetika, mikrobiologiya i virusologiya*, 2006(1):24-28.
- [13] SCHMIDT S M. The role of iron in viral infections [J]. *Frontiers in bioscience*, 2020, 25(5):893-911.
- [14] HE J H, LI Z W, XIA P P, et al. Ferroptosis and ferritinophagy in diabetes complications [J/OL]. *Molecular metabolism*, 2022, 60: 101470 [2024-09-27]. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2022.101470>.
- [15] MANCIAS J D, WANG X X, GYGI S P, et al. Quantitative proteomics identifies NCOA4 as the cargo receptor mediating ferritinophagy [J]. *Nature*, 2014, 509(7498):105-109.
- [16] SUN Y M, BAO Q C, XUAN B Q, et al. Human cytomegalovirus protein pUL38 prevents premature cell death by binding to ubiquitin-specific protease 24 and regulating iron metabolism [J/OL]. *Journal of virology*, 2018, 92(13):e00191-18 [2024-09-27]. <https://doi.org/10.1128/jvi.00191-18>.
- [17] OHTA K, SAKA N, NISHIO M. Human parainfluenza virus type 2 V protein modulates iron homeostasis [J/OL]. *Journal of virology*, 2021, 95(6):e01861-20 [2024-09-27]. <https://doi.org/10.1128/jvi.01861-20>.
- [18] WOOD A J, LO T W, ZEITLER B, et al. Targeted genome editing across species using ZFNs and TALENs [J/OL]. *Science*, 2011, 333(6040):307 [2024-09-27]. <https://doi.org/10.1126/science.1207773>.
- [19] BARRANGOU R, FREMAUX C, DEVEAU H, et al. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes [J]. *Science*, 2007, 315(5819):1709-1712.
- [20] KHALILI K, KAMINSKI R, GORDON J, et al. Genome editing strategies: potential tools for eradicating HIV-1/AIDS [J]. *Journal of neurovirology*, 2015, 21(3):310-321.
- [21] CONG L, RAN F A, COX D, et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems [J]. *Science*, 2013, 339(6121):819-823.
- [22] HSU P D, LANDER E S, ZHANG F. Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering [J]. *Cell*, 2014, 157(6):1262-1278.
- [23] ANDERS C, NIEWOEHNER O, DUERST A, et al. Structural basis of PAM-dependent target DNA recognition by the Cas9 endonuclease [J]. *Nature*, 2014, 513(7519):569-573.
- [24] NISHIMASU H, RAN F A, HSU P D, et al. Crystal structure of Cas9 in complex with guide RNA and target DNA [J]. *Cell*, 2014, 156(5):935-949.
- [25] XU L, YANG H, GAO Y, et al. CRISPR/Cas9-mediated CCR5 ablation in human hematopoietic stem/progenitor cells confers HIV-1 resistance *in vivo* [J]. *Molecular therapy*, 2017, 25(8):1782-1789.
- [26] HOU P P, CHEN S L, WANG S L, et al. Genome editing of CXCR4 by CRISPR/cas9 confers cells resistant to HIV-1 infection [J/OL]. *Scientific reports*, 2015, 5: 15577 [2024-09-27]. <https://doi.org/10.1038/srep15577>.
- [27] WHITWORTH K M, ROWLAND R R R, EWEN C L, et al. Gene-edited pigs are protected from porcine reproductive and respiratory syndrome virus [J]. *Nature biotechnology*, 2016, 34(1):20-22.
- [28] OHSHIMA T, YAMAMOTO H, SAKAMAKI Y, et al. NCOA4 drives ferritin phase separation to facilitate macroferritinophagy and microferritinophagy [J/OL]. *Journal of cell biology*, 2022, 221(10):e202203102 [2024-09-27]. <https://doi.org/10.1083/jcb.202203102>.
- [29] KUNO S, FUJITA H, TANAKA Y K, et al. Iron-induced NCOA4 condensation regulates ferritin fate and iron homeostasis [J/OL]. *EMBO reports*, 2022, 23(5):e54278 [2024-09-27]. <https://doi.org/10.15252/embr.202154278>.
- [30] DAS N K, JAIN C, SANKAR A, et al. Modulation of the HIF2 α -NCOA4 axis in enterocytes attenuates iron loading in a mouse model of hemochromatosis [J]. *Blood*, 2022, 139(16):2547-2552.
- [31] LI X Q, LOZOVATSKY L, SUKUMARAN A, et al. NCOA4 is regulated by HIF and mediates mobilization of murine hepatic iron stores after blood loss [J]. *Blood*, 2020, 136(23):2691-2702.
- [32] XIE K, MO Y, YUE E L, et al. Exosomes derived from M2-type microglia ameliorate oxygen-glucose deprivation/reoxygenation-induced HT22 cell injury by regulating miR-124-3p/NCOA4-mediated ferroptosis [J/OL]. *Heliyon*, 2023, 9(7):e17592 [2024-09-27]. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e17592>.
- [33] FANG Y Y, CHEN X C, TAN Q Y, et al. Inhibiting ferroptosis through disrupting the NCOA4-FTH1 interaction: a new mechanism of action [J]. *ACS central science*, 2021, 7(6):980-989.
- [34] LI Y N, LI M H, LIU L, et al. Cell-specific metabolic reprogramming of tumors for bioactivatable ferroptosis therapy [J]. *ACS nano*, 2022, 16(3):3965-3984.

Constructing MARC-145 cell lines with *NCOA4* gene knockout based on CRISPR/Cas9 system and its effect on replication of HP-PRRSV

GUAN Kaifeng¹, YUAN Chenyang², LÜ Rongzhou³, ZHANG Gaiping^{1,2,3}

1.School of Advanced Agricultural Sciences, Peking University, Beijing 100871, China;

2.College of Veterinary Medicine, Northwest A&F University, Yangling 712100, China;

3.Key Laboratory of Animal Immunology, Henan Academy of Agricultural Sciences, Zhengzhou 450002, China

Abstract Ferritinophagy is a crucial cellular pathway that selectively degrades ferritin to release free iron and plays a key role in maintaining intracellular iron homeostasis. Recent studies have shown a close relationship between viral infections and host iron metabolism. As a significant pathogen severely affecting the global swine industry, the relationship between PRRSV replication and host ferritinophagy remains unclear. CRISPR/Cas9 technology was used to knockout the *NCOA4* gene encoding a key receptor for ferritinophagy in PRRSV-susceptible MARC-145 cells to study the role of *NCOA4*-mediated ferritinophagy in the infection of PRRSV. The efficiency of knocking out the *NCOA4* gene was detected with Sanger sequencing and Western blot. Methods including flow cytometry, QPCR, Western blot and TCID₅₀ assays were used to detect the cell cycle and cell viability of the *NCOA4* deficient mutant and wild-type MARC-145, and study the effect of *NCOA4* deficiency on the replication of PRRSV. The results showed that MARC-145 cell lines with *NCOA4* gene knockout were successfully constructed. The level of ORF7 mRNA, N protein, and viral titers of PRRSV in MARC-145 cell lines with *NCOA4* gene knockout was significantly increased and the expression of FTH1 protein was promoted compared with that in wild-type MARC-145 cells. It is indicated that the deletion of *NCOA4*, a key receptor gene for ferritinophagy, can promote the replication of PRRSV. It will provide a theoretical basis for the prevention and control of PRRSV.

Keywords CRISPR/Cas9; *NCOA4*; ferritinophagy; PRRS; gene knockout; cell activity

(责任编辑:赵琳琳)