

# 环指蛋白 31 基因敲除细胞系的构建及其对口蹄疫病毒复制的影响

周婷婷<sup>1,2</sup>, 张伟<sup>2</sup>, 刘华南<sup>2</sup>, 陈治彤<sup>2</sup>, 董星艳<sup>2</sup>, 王松豪<sup>3</sup>, 曹伟军<sup>2</sup>,  
郑海学<sup>1,2</sup>, 蒲秀瑛<sup>1\*</sup>, 杨帆<sup>2\*</sup>

1 兰州理工大学 生命科学与工程学院, 甘肃 兰州

2 中国农业科学院兰州兽医研究所/兰州大学 动物医学与生物安全学院, 动物疫病防控全国重点实验室, 甘肃 兰州

3 郟县农业农村局, 河南 平顶山

周婷婷, 张伟, 刘华南, 陈治彤, 董星艳, 王松豪, 曹伟军, 郑海学, 蒲秀瑛, 杨帆. 环指蛋白 31 基因敲除细胞系的构建及其对口蹄疫病毒复制的影响[J]. 微生物学报, 2026, 66(5): 2384-2392.

ZHOU Tingting, ZHANG Wei, LIU Huanan, CHEN Zhitong, DONG Xingyan, WANG Songhao, CAO Weijun, ZHENG Haixue, PU Xiuying, YANG Fan. Construction of cell lines with ring finger protein 31 gene knockout and evaluation of its impact on the replication of foot-and-mouth disease virus[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2026, 66(5): 2384-2392.

**摘要:** 【目的】探究环指蛋白 31 (ring finger protein 31, RNF31) 在口蹄疫病毒 (foot-and-mouth disease virus, FMDV) 复制过程中的具体功能, 旨在为宿主蛋白 RNF31 调控 FMDV 复制的分子机制提供理论支撑。【方法】运用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术, 在 RNF31 基因外显子区段设计 2 条 sgRNA 序列, 并与 pX459-puro 载体连接构建重组质粒。将 pX459-RNF31-sgRNA 转染至 PK-15 细胞, 经嘌呤霉素筛选, 获得 RNF31 基因敲除的细胞系。通过 Western blotting、RT-qPCR 及 TCID<sub>50</sub> 方法检测敲除 RNF31 基因对 FMDV 复制的影响。【结果】与野生型细胞相比, RNF31 基因敲除细胞系中 FMDV 的蛋白水平、mRNA 水平及病毒滴度均显著升高。【结论】本研究成功构建了 RNF31 基因敲除细胞系, 证实 RNF31 在 FMDV 复制过程中扮演关键角色, 研究结果为进一步探究 RNF31 抑制 FMDV 复制的机制提供了数据支持。

资助项目: 国家自然科学基金(32330107); 甘肃省联合科研基金(25JRRA1088, 25JRRA1087); 甘肃省研产融合科技攻关赋能计划(25FNNA002); 甘肃省科技重大专项计划(22ZD6NA001); 国家生猪产业技术体系项目(CARS-35); 国家生猪技术创新中心项目(NCTIP-XD/C03)

This work was supported by the National Natural Sciences Foundation of China (32330107), the Gansu Provincial Joint Research Fund (25JRRA1088, 25JRRA1087), the Gansu Province Research and Development-Industry Integration and Technology Empowerment Program (25FNNA002), the Gansu Provincial Major Science and Technology Special Program (22ZD6NA001), the Earmarked Fund for CARS-35, and the Project of National Center of Technology Innovation for Pigs (NCTIP-XD/C03).

\*Corresponding authors. E-mail: PU Xiuying, xiuypu@163.com; YANG Fan, yangfan02@caas.cn

Received: 2025-11-23; Accepted: 2026-01-19; Published online: 2026-01-29

关键词: CRISPR/Cas9; 环指蛋白 31; 敲除细胞系; 口蹄疫病毒

## Construction of cell lines with ring finger protein 31 gene knockout and evaluation of its impact on the replication of foot-and-mouth disease virus

ZHOU Tingting<sup>1,2</sup>, ZHANG Wei<sup>2</sup>, LIU Huanan<sup>2</sup>, CHEN Zhitong<sup>2</sup>, DONG Xingyan<sup>2</sup>, WANG Songhao<sup>3</sup>, CAO Weijun<sup>2</sup>, ZHENG Haixue<sup>1,2</sup>, PU Xiuying<sup>1\*</sup>, YANG Fan<sup>2\*</sup>

1 School of Life Science and Engineering, Lanzhou University of Technology, Lanzhou, Gansu, China

2 State Key Laboratory of Animal Disease Control and Prevention, College of Veterinary Medicine, Lanzhou

University, Lanzhou Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou, Gansu, China

3 Jiaxian Bureau of Agriculture and Rural Affairs, Pingdingshan, Henan, China

**Abstract:** [Objective] To investigate the function of ring finger protein 31 (RNF31) in the replication of foot-and-mouth disease virus (FMDV) and to provide a theoretical basis for the research on the molecular mechanism by which the host protein RNF31 regulates FMDV replication. [Methods] CRISPR/Cas9 gene editing was employed to design two sgRNA sequences in the exon segment of RNF31, and recombinant plasmids were constructed by ligation with the pX459-puro vector. The recombinant plasmids pX459-RNF31-sgRNA were transfected into PK-15 cells, followed by screening under the action of puromycin to obtain the cell lines with RNF31 gene knockout. The effect of RNF31 gene knockout on FMDV replication was detected by Western blotting, RT-qPCR, and TCID<sub>50</sub> methods. [Results] Compared with wild-type cells, the knockout of RNF31 significantly increased the protein level, mRNA level, and virus titer of FMDV. [Conclusion] We successfully construct the cell lines with RNF31 gene knockout and prove that RNF31 plays a key role in the replication of FMDV. This result provides data support for further research on the mechanism by which RNF31 inhibits FMDV replication.

**Keywords:** CRISPR/Cas9; ring finger protein 31; knockout cell lines; foot-and-mouth disease virus

口蹄疫(foot-and-mouth disease, FMD)是由口蹄疫病毒(foot-and-mouth disease virus, FMDV)感染引发的高度接触性动物疫病,严重影响猪、牛、羊等偶蹄类动物,在全球范围内给畜牧业造成了巨大经济损失<sup>[1]</sup>。FMDV属于小核糖核酸病毒科口蹄疫病毒属,目前FMDV的传播途径主要有2种,即接触传播和气溶胶传播<sup>[2]</sup>。FMDV为了在宿主细胞中高效复制,不断进化

出新的拮抗和逃避天然免疫的策略,因此深入研究病毒-宿主蛋白相互作用是开发新型抗病毒药物的关键。

E3泛素连接酶家族分为homologous to the E6-AP C-terminus (HECT)、really interesting new gene (RING)和ring between ring (RBR)3种类型,RBR家族包含多种蛋白,常见的有parkin RBR E3 ubiquitin protein ligase (PARKIN)、环指

蛋白 19B (ring finger protein 19B, RNF19B)、环指蛋白 144A (ring finger protein 144A, RNF144A)、环指蛋白 144B (ring finger protein 144B, RNF144B)、环指蛋白 216 (ring finger protein 216, RNF216)、环指蛋白 31 (ring finger protein 31, RNF31) 是 RBR 型 E3 泛素连接酶, 由 1 072 个氨基酸构成。RNF31 的结构组成包括 1 个假定的泛素结合结构域 (putative ubiquitin binding domain, PUB)、1 个含泛素相关结构域 (ubiquitin-associate domain, UBA)、3 个锌指结构域、1 个 RING 与 RING 间结构域 (RBR) 和 1 个线性泛素链决定域 (linear ubiquitin chain-determining domain, LDD)<sup>[3-5]</sup>。RNF31 是一种多功能蛋白, 定位于细胞质和细胞核, 已证实与多种炎症性疾病和癌症相关。RNF31 的各结构域可分别与不同蛋白质相互作用, 展现出多元化的生理功能。RNF31 N 端 PUB 结构域介导蛋白质间相互作用, 如 RNF31 与淋巴细胞 Yes 相关蛋白 (Yes-associated protein, YAP) 结合, 能够促进 YAP 蛋白的泛素化和降解<sup>[6]</sup>。UBA 结构域可识别并结合游离泛素或泛素化底物, 参与泛素信号的传递<sup>[7]</sup>。C 末端的 RBR 结构域和 LDD 结构域是泛素连接酶催化底物线性泛素化的重要结构域, 若该结构域缺失, 则会丧失泛素化功能<sup>[8-9]</sup>。例如, RNF31 缺失 RBR 结构域可减少雌激素受体  $\alpha$  (estrogen receptor  $\alpha$ , Era) 的表达量, 影响乳腺癌细胞的增殖<sup>[10]</sup>。目前, 关于 RNF31 在调控病毒复制方面的研究报道较少, 需进一步探索 RNF31 在病毒复制中的潜在作用。

本研究利用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术构建 RNF31 基因敲除的细胞系, 在该细胞系中进行 FMDV 感染试验, 通过 Western blotting、RT-qPCR 及 TCID<sub>50</sub> 方法研究 RNF31 对 FMDV 复制的影响, 探究 RNF31 在 FMDV 复制过程中的关键作用, 以期为进一步揭示 RNF31 与 FMDV 相互作用的分子机制提供理论依据, 也为抗病毒药物研究提供新的靶点。

## 1 材料与方法

### 1.1 载体、细胞及病毒

PK-15 细胞、BHK-21 细胞、pX459-puro 质粒、FMDV (O/BY/CHA/2010 株) 均保存于中国农业科学院兰州兽医研究所国家口蹄疫参考实验室。

### 1.2 主要试剂和仪器

大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态细胞、T4 DNA 连接酶, 宝生物工程(大连)有限公司; *Bbs* I, New England Biolabs 公司; RNA isolater Total RNA Extraction Reagent、M-MLV (H-) Reverse Transcriptase, 南京诺唯赞生物科技股份有限公司; Realtime PCR Super mix plus, 北京聚合美生物科技有限公司; Beta Actin Monoclonal antibody, 武汉三鹰生物技术有限公司; Anti-RNF31/HOIP antibody, Abcam Plc 公司; 兔抗 O 型 FMDV 多克隆抗体由本课题组 Zhang 等<sup>[11]</sup> 提供。

电泳仪、PCR 仪、实时荧光定量 PCR 仪, Bio-Rad 公司; 多功能酶标仪, Agilent Technologies 公司。

### 1.3 sgRNA 引物的设计与合成

在 NCBI 数据库查询猪源 RNF31 基因序列, 按照 CRISPR/Cas9 基因编辑设计原则, 对基因序列的 21 个外显子区段进行标注。选择含有特定靶基因位点的第 1、2 区段, 设计特异性 sgRNA, 相应引物序列见表 1, 设计的 2 对引物由北京擎科生物科技有限公司西安分公司合成。

### 1.4 构建重组质粒 pX459-sgRNA

#### 1.4.1 单酶切 pX459-puro 质粒

使用限制性核酸内切酶 *Bbs* I 对载体进行单酶切, 使其形成线性 DNA 分子。相应酶切体系和程序参照 *Bbs* I 说明书, 酶切产物加入 Gel Loading Dye (6 $\times$ ) 0.006 mL, 混合均匀后进行琼脂糖凝胶电泳, 随后进行胶回收。

表1 本研究所用引物

Table 1 Primers used in this study

Primer names	Primer sequences (5'→3')
RNF31-sgRNA1-F	CACCGTGGTCCGCTGCAACGCTCAT
RNF31-sgRNA1-R	AAACATGAGCGTTGCAGCGGACCAC
RNF31-sgRNA2-F	CACCGACTTGACCCCGCGCCAGTAC
RNF31-sgRNA2-R	AAACGTACTGGCGCGGGGTCAAGTC
RNF31-F	TCTTCCCTAGTACTTCCTGTT
RNF31-R	TCCTCTGTGTAGCCATATAATC
FMDV-F	CACTGGTGACAGGCTAAGG
FMDV-R	CCCTTCTCAGATTCCGAGT
GAPDH-F	ACATGGCCTCCAAGGAGTAAGA
GAPDH-R	GATCGAGTTGGGGCTGTGACT

#### 1.4.2 重组质粒 pX459-sgRNA 构建

将 2 对 sgRNA 的上、下游引物均稀释至 10 μmol/L, 相应扩增体系和程序参照 LA 10× PCR buffer 说明书, 形成 2 个双链 DNA 片段。将这 2 个 DNA 片段分别与单酶切后的 pX459-puro 载体通过 T4 DNA 连接酶进行连接, 相应连接体系和程序参照 T4 DNA 连接酶说明书。将 2 个连接产物分别转化至大肠杆菌 DH5α 感受态细胞, 涂布于含有氨苄抗性的 LB 培养板, 37 °C 培养 12 h。培养板中形成可见菌落后, 选取单克隆菌落置于含有氨苄抗性的 LB 培养液中, 37 °C、220 r/min 培养 14 h。通过菌液 PCR 鉴定筛选阳性克隆, 并提取质粒进行测序, 将构建成功的 2 个质粒分别命名为 pX459-RNF31-sgRNA-1 和 pX459-RNF31-sgRNA-2。

### 1.5 细胞转染与筛选

#### 1.5.1 细胞转染

复苏 PK-15 细胞, 进行 1-2 次传代, 将生长旺盛的细胞接种于 6 孔板中。待细胞密度达到 70%-80% 时, 进行转染。在 1.5 mL 离心管中加入 jetPRIME® buffer 0.1 mL, 其中一支离心管中加入质粒 pX459-RNF31-sgRNA-1 2 μg, 另一支离心管中加入质粒 pX459-RNF31-sgRNA-2 2 μg, 涡旋振荡混匀。提前将 jetPRIME® reagent 涡旋振荡混匀, 取 0.004 mL 加入至质粒混合液

中, 涡旋振荡混匀, 静置孵育 10 min 形成复合物。更换 6 孔板中的细胞培养基, 将复合物贴近液面缓慢均匀加入, 置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 24 h。

#### 1.5.2 细胞筛选

取出已完成质粒转染的 6 孔板, 弃去细胞上清液, 用 1 mL PBS 清洗细胞 1 遍, 加入 0.5 mL 胰酶, 室温静置 30 s 后弃去, 置于 37 °C 温箱中消化至细胞变圆。加入 1 mL 培养基将细胞均匀分散, 再补加 2 mL 培养基使细胞混合均匀, 接种至 6 孔板中, 分别加入终浓度为 1.5、2、3 μg/mL 的嘌呤霉素, 继续培养 3 d, 弃去上清液, 更换 2 mL 新的培养基促进细胞生长。1 d 后用胰酶消化细胞并计数, 按 10 个/mL 的密度接种于 96 孔板中, 7 d 后观察细胞状态。通过有限稀释法挑选正常形态的单克隆细胞, 逐级扩大培养。

### 1.6 细胞鉴定

#### 1.6.1 PCR 扩增鉴定

将待测细胞于 4 °C、12 000 r/min 离心 3 min, 弃去上清液, 提取基因组 DNA。鉴定 RNF31 基因的引物见表 1, 相应 PCR 扩增体系和程序参照 2×Phanta Max Master Mix (Dye Plus) 说明书, 扩增产物经琼脂糖凝胶电泳后, 送北京擎科生物科技有限公司西安分公司进行测序分析。将 RNF31 基因出现缺失、插入导致移码的细胞株命名为 PK-RNF31-KO, 将 RNF31 基因碱基序列未发生改变的细胞株命名为 PK-RNF31-WT。

#### 1.6.2 Western blotting 鉴定

将 PK-RNF31-WT 和 PK-RNF31-KO 细胞接种至 12 孔板, 待细胞密度生长至 80% 时, 每孔加入 2×SDS-PAGE loading buffer 0.2 mL, 裂解并收集细胞样品。于 100 °C 加热 10 min, 涡旋振荡混匀, 室温 12 000 r/min 离心 1 min, 取上清进行 SDS-PAGE, 转印至 NC 膜上。以 Anti-RNF31/HOIP antibody、Beta Actin Monoclonal antibody 为一抗, Goat Anti-Rabbit IgG H&L (HRP)、Goat Anti-Mouse IgG H&L (HRP) 为二

抗, 进行 Western blotting 分析, 检测 RNF31 蛋白的表达情况。

### 1.7 CCK-8 检测细胞活力

将 PK-RNF31-WT、PK-RNF31-KO-1 和 PK-RNF31-KO-2 细胞以  $4 \times 10^4$  个/mL 的密度接种至 96 孔板, 每孔 0.1 mL。置于培养箱中培养 8 h, 观察细胞生长状态, 弃去细胞上清液, 加入含有 CCK-8 溶液的培养基(每孔 0.01 mL)。置于培养箱中培养 4 h, 用酶标仪测量 450 nm 处的吸光度。计算 2 组细胞存活率, 分析敲除 RNF31 基因对 PK-15 细胞生长活力的影响。

### 1.8 Western blotting 检测病毒蛋白

将 PK-RNF31-WT、PK-RNF31-KO-1 和 PK-RNF31-KO-2 细胞接种至 12 孔板, 待细胞密度生长至 80% 时, 感染等量 FMDV。在 0、6、12 h 后弃去细胞上清液, 每孔加入  $2 \times$  SDS-PAGE loading buffer 0.2 mL, 裂解并收集细胞样品。于 100 °C 加热 10 min, 涡旋振荡混匀, 室温 12 000 r/min 离心 1 min, 取上清进行 SDS-PAGE, 转印至 NC 膜上。以 Anti-RNF31/HOIP antibody、兔抗 O 型 FMDV 多克隆抗体、Beta Actin Monoclonal antibody 为一抗, Goat Anti-Rabbit IgG H&L (HRP)、Goat Anti-Mouse IgG H&L (HRP) 为二抗, 进行 Western blotting 分析, 检测 RNF31 蛋白和病毒蛋白的表达情况。

### 1.9 RT-qPCR 检测病毒 mRNA

将 PK-RNF31-WT、PK-RNF31-KO-1 和 PK-RNF31-KO-2 细胞接种至 12 孔板, 待细胞密度生长至 80% 时, 感染等量 FMDV。在 0、6、12 h 后弃去细胞上清液, 每孔加入 RNA isolater Total RNA Extraction Reagent 1 mL, 室温裂解 5–10 min, 收集细胞样品提取 RNA。相应 RNA 反转录体系和程序参照 M-MLV (H-) Reverse Transcriptase 说明书, 获得 cDNA。相应实时荧光定量 PCR 体系参照 Realtime PCR Super mix plus 说明书, GAPDH、FMDV 上、下游引物见表 1。检测 FMDV 的相对 mRNA 水平, 每组设

置 3 个重复, 以  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  法分析试验数据。

### 1.10 TCID<sub>50</sub> 检测病毒滴度

将 PK-RNF31-WT、PK-RNF31-KO-1 和 PK-RNF31-KO-2 细胞接种至 12 孔板, 待细胞密度生长至 80% 时, 感染等量 FMDV。在 0、6、12 h 后收集细胞上清液, 将上清液反复冻融 3 次, 4 °C、12 000 r/min 离心 3 min, 取上清测定病毒滴度。将 BHK-21 细胞接种至 96 孔板, 每孔 0.1 mL。用 DMEM 培养基将离心后的病毒液按 10 倍倍比稀释, 加入到 BHK-21 细胞中, 每孔 0.1 mL, 每个稀释度设置 8 个重复。在 48–72 h 期间观察细胞病变情况, 根据 Reed-Muench 法计算 TCID<sub>50</sub>。

### 1.11 统计学分析

使用 GraphPad Prism 10.3.1 软件进行统计学分析, 并绘制相关图表。ns 表示  $P > 0.05$ , \* 表示  $P < 0.05$ , \*\* 表示  $P < 0.01$ , \*\*\* 表示  $P < 0.001$ , \*\*\*\* 表示  $P < 0.0001$ 。

## 2 结果与分析

### 2.1 重组质粒 pX459-RNF31-sgRNA 的鉴定

利用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术在猪 RNF31 基因序列的第 1 个外显子区段的 5 529 bp 位置、第 2 个外显子区段的 5 956 bp 位置设计 sgRNA 序列(图 1)。通过序列测定, 确认 sgRNA 成功构建至 pX459-puro 载体中, 将重组质粒分别命名为 pX459-RNF31-sgRNA-1、pX459-RNF31-sgRNA-2。

### 2.2 敲除 RNF31 基因的 PK-15 细胞系的构建与鉴定

DNA 测序结果如图 2A、2B 所示, 第一条 sgRNA 打靶成功, PK-RNF31-KO-1 在第 1 个外显子区段插入 1 个碱基对, PK-RNF31-KO-2 在第 1 个外显子区段敲除 1 个碱基对。同时, Western blotting 检测发现, 2 株对应细胞中均未能检测到 RNF31 蛋白表达(图 2C), 表明成功构

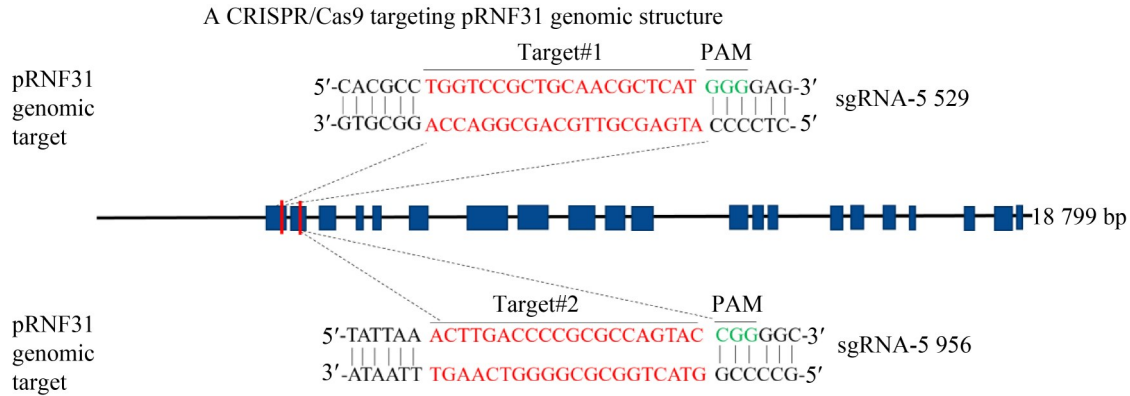


图1 猪RNF31基因sgRNA设计示意图

Figure 1 Schematic diagram of pX459-sgRNA for porcine RNF31 gene.

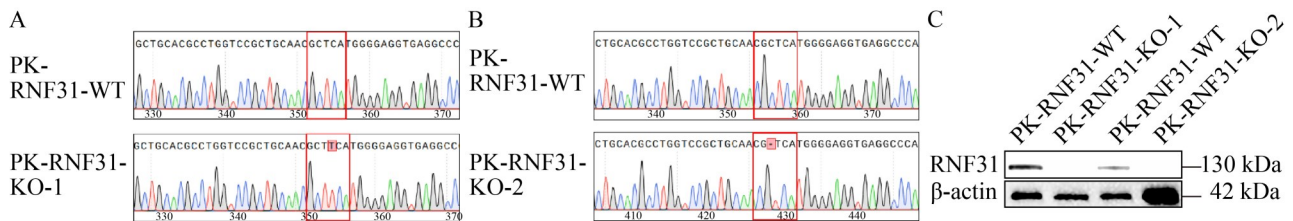


图2 构建RNF31基因敲除细胞系及其鉴定

Figure 2 Construction and identification of RNF31 gene knockout cell lines. A: Analysis diagram of Sanger sequencing for gene deletion in PK-RNF31-KO-1 cells; B: Analysis diagram of Sanger sequencing for gene deletion in PK-RNF31-KO-2 cells; C: Western blotting identification of RNF31 gene knockout cells.

建了敲除 RNF31 基因的猪 PK-15 细胞系。

### 2.3 敲除 RNF31 基因对细胞活力的影响

如图 3 所示, PK-RNF31-KO-1 和 PK-RNF31-KO-2 细胞活力与野生型对照细胞活力相比无明显差异, 这为后续研究 RNF31 在 FMDV 复制中的功能提供了良好的工具细胞。

### 2.4 敲除 RNF31 基因对 FMDV 蛋白水平的影响

如图 4 所示, 随着感染时间的延长, PK-RNF31-KO-1 和 PK-RNF31-KO-2 细胞中 FMDV 的蛋白丰度显著高于野生型对照细胞, 表明敲除 RNF31 基因促进 FMDV 的蛋白水平。

### 2.5 敲除 RNF31 基因对 FMDV mRNA 水平的影响

如图 5 所示, 随着感染时间的延长, 6 h 和

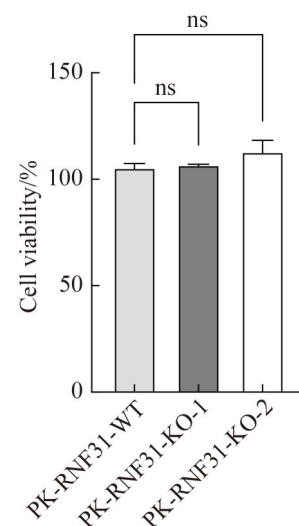


图3 检测RNF31基因敲除细胞系的细胞活力

Figure 3 Detection of cell viability in the RNF31 gene knockout cell lines. ns indicates no statistical significance. ns:  $P>0.05$ .

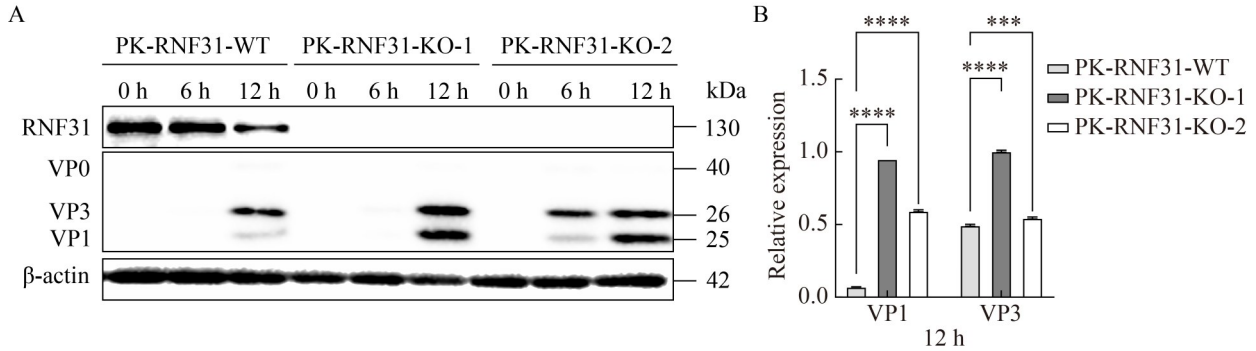


图4 RNF31基因敲除细胞系对FMDV蛋白水平的影响

Figure 4 Effect of RNF31 gene knockout cell lines on FMDV protein levels. A: Western blotting detection; B: Intensity analysis of Figure A. \*\*\*:  $P < 0.001$ ; \*\*\*\*:  $P < 0.0001$ .

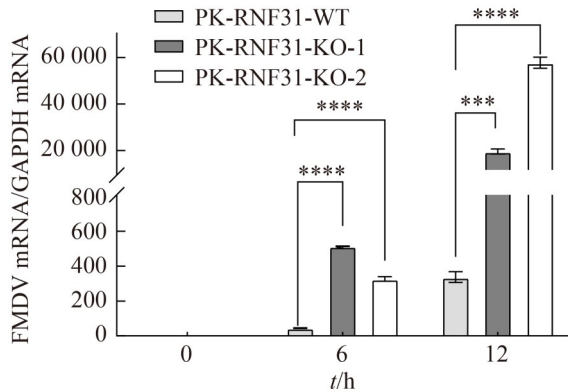


图5 实时相对定量检测RNF31基因敲除细胞系对FMDV mRNA水平的影响

Figure 5 Real-time relative quantitative detection of the effect of RNF31 gene knockout cell lines on FMDV mRNA levels. \*\*\*:  $P < 0.001$ ; \*\*\*\*:  $P < 0.0001$ .

12 h 时 PK-RNF31-KO-1 和 PK-RNF31-KO-2 细胞中 FMDV 的相对 mRNA 水平显著高于野生型对照细胞, 表明敲除 RNF31 基因可促进 FMDV 的 mRNA 水平。

## 2.6 敲除 RNF31 基因对 FMDV 病毒滴度的影响

如图 6 所示, 随着感染时间的延长, 6 h 和 12 h 时 PK-RNF31-KO-1 和 PK-RNF31-KO-2 细胞中 FMDV 的病毒滴度显著高于野生型对照细胞, 表明敲除 RNF31 基因可促进 FMDV 的病毒滴度。

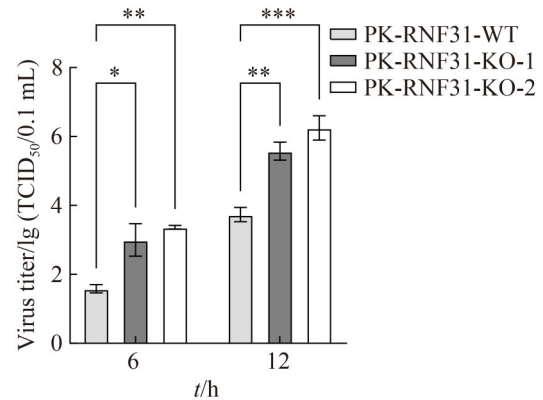


图6 TCID<sub>50</sub>测定RNF31基因敲除细胞系对FMDV的影响

Figure 6 Determination of the effect of RNF31 gene knockout cell lines on FMDV TCID<sub>50</sub>. \*:  $P < 0.05$ ; \*\*:  $P < 0.01$ ; \*\*\*:  $P < 0.001$ .

## 3 讨论与结论

CRISPR/Cas 作为近年来基因编辑领域的核心技术之一, 与锌指核酸酶技术(zinc finger nuclease, ZFN)、转录激活因子样效应核酸酶技术(transcription activator-like effector nuclease, TALEN)相比, 可对目的基因进行插入、删除和替换操作, 从而改变生物体的基因组序列和遗传信息; 该技术具有成本低、简单高效的优势特性, 广泛应用于癌症、病毒、遗传疾病和农作物改良育种等研究领域<sup>[12]</sup>。在病毒学领域应

用较多, 如研究病毒-宿主的相互作用、不同病毒基因的功能、重组疫苗的研发以及构建敲除细胞系等, 为实验提供了重要的工具和方法<sup>[13]</sup>。CRISPR 全基因组筛选可快速找到与病毒相关的基因, 如参与病毒进入、复制、释放等过程的宿主蛋白。Li 等<sup>[14]</sup>通过 CRISPR/Cas 全基因组筛选与甲型流感病毒(influenza A virus, IAV)感染相关的宿主蛋白, 在 121 个蛋白中鉴定出宿主蛋白 WD repeat-containing protein 7 (WDR7)、卷曲螺旋结构域蛋白 115 (coiled-coil domain-containing protein 115, CCDC115) 和跨膜蛋白 199 (transmembrane protein 199, TMEM199) 与病毒感染有关。Peng 等<sup>[15]</sup>根据猪全基因组设计 CRISPR/Cas9 敲除库, 通过筛选并鉴定 ERBB2 转录因子 1 (transducer of ErbB2.1, TOB1) 敲除可抑制 FMDV 感染。Khasa 等<sup>[16]</sup>利用人胶质母细胞瘤细胞系 SNB-19 进行 CRISPR/Cas9 全基因组筛选, 确定受体酪氨酸激酶 AXL (receptor tyrosine kinase AXL, AXL) 是寨卡病毒 (Zika virus, ZIKV) 感染的关键宿主因子, 敲除 AXL 可抑制 ZIKV 的感染。

研究发现 E3 泛素连接酶在抗病毒方面发挥重要作用, 多种 E3 泛素连接酶被鉴定为机体本身的抗病毒效应物, 可通过泛素-蛋白酶体系统 (ubiquitin-proteasome system, UPS) 调控病毒蛋白, 从而影响病毒复制。RNF31 作为线性泛素链组装复合体 (linear ubiquitin chain assembly complex, LUBAC) 不可或缺的重要组成部分, 也是目前发现并证实能够通过特定分子机制影响底物蛋白线性泛素化修饰过程的 E3 泛素连接酶<sup>[17]</sup>。例如, 丙型肝炎病毒 (hepatitis C virus, HCV) 感染后, 非结构蛋白 3 (non-structural protein 3, NS3) 与 LUBAC 相互作用, 使核因子  $\kappa$ B (nuclear factor-kappaB, NF- $\kappa$ B) 必需调节蛋白 (NF- $\kappa$ B essential modulator, NEMO) 无法进行线性泛素化, 抑制 NF- $\kappa$ B 的激活, 从而使 HCV 逃避天然免疫<sup>[18]</sup>。人冠状病毒 (human coronavirus, HCoV) 的非结构蛋白 14 (non-structural protein

14, NSP14) 与 RNF31 结合, 利用线性泛素化途径激活 NF- $\kappa$ B, 泛素化的 NSP14 招募 NEMO 从而引发促炎反应<sup>[19]</sup>。这些结果初步揭示了 RNF31 在病毒感染后的炎症反应中发挥作用, 但 RNF31 参与病毒复制的功能和分子机制仍不清楚。

为了探究 RNF31 在病毒复制中的功能, 本研究利用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术构建了 RNF31 基因敲除的 PK-15 细胞系模型, 以探究 RNF31 对 FMDV 复制的影响。对 PK-RNF31-KO 细胞与野生型细胞感染 FMDV 的样本进行分析后发现, PK-RNF31-KO 细胞感染 FMDV 后 FMDV 的蛋白水平、mRNA 水平和病毒滴度均显著升高, 这证实了 RNF31 具有抑制 FMDV 复制的功能。推测 RNF31 可能调控 FMDV 生命环节中的关键步骤, 如吸附、内化、病毒颗粒脱壳和基因组释放等; 它可能利用 E3 泛素连接酶靶向 FMDV 结构蛋白或非结构蛋白泛素化降解, 从而阻断病毒粒子的组装和释放等; 还可能催化线性泛素链修饰 NEMO 等信号分子, 激活 NF- $\kappa$ B 与 I 型干扰素 (type I interferon, IFN-I) 信号通路, 诱导 IFN-I 与促炎因子的产生, 进而促进抗病毒天然免疫等。目前关于 RNF31 调控 FMDV 的分子机制尚不清楚, 可利用该细胞系模型揭示 RNF31 抑制 FMDV 复制的作用机制。

综上所述, 本研究利用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术在 FMDV 易感细胞 PK-15 中构建了敲除 RNF31 基因的细胞系, 发现敲除 RNF31 可显著促进 FMDV 的蛋白水平、mRNA 水平和病毒滴度升高。本研究为深入阐明 RNF31 调控 FMDV 复制的机制提供了依据和细胞模型, 也为 FMD 的防控提供新的理论基础和潜在干预策略。

## 作者贡献声明

周婷婷: 实验设计, 数据分析, 撰写文章; 张伟: 实验指导, 提供撰写思路; 刘华南: 协助实验设计; 陈治彤: 协助实验操作, 数据分析; 董星艳: 协助实验操作, 样本处理; 王松豪: 提供稿件修改建

议；曹伟军：提供资源；郑海学：监督管理；蒲秀瑛：论文讨论；杨帆：稿件指导和修改，获取基金。

## 作者利益冲突公开声明

作者声明不存在任何可能会影响本文所报告工作的已知经济利益或个人关系。

## 参考文献

- [1] 郑海学, 刘湘涛. 口蹄疫病毒遗传进化研究进展[J]. 生命科学, 2016, 28(3): 311-324.  
Zheng HX, Liu XT. Advances on evolution of foot-and-mouth disease virus[J]. Chinese Bulletin of Life Sciences, 2016, 28(3): 311-324 (in Chinese).
- [2] Brown E, Nelson N, Gubbins S, Colenutt C. Airborne transmission of foot-and-mouth disease virus: a review of past and present perspectives[J]. Viruses, 2022, 14(5): 1009.
- [3] Draber P, Kupka S, Reichert M, Draberova H, Lafont E, de Miguel D, Spilgies L, Surinova S, Taraborrelli L, Hartwig T, Rieser E, Martino L, Rittinger K, Walczak H. LUBAC-recruited CYLD and A20 regulate gene activation and cell death by exerting opposing effects on linear ubiquitin in signaling complexes[J]. Cell Reports, 2015, 13(10): 2258-2272.
- [4] Cai CM, Tang YD, Zhai JB, Zheng CF. The RING finger protein family in health and disease[J]. Signal Transduction and Targeted Therapy, 2022, 7(1): 300.
- [5] Jimbo K, Hattori A, Koide S, Ito T, Sasaki K, Iwai K, Nannya Y, Iwama A, Tojo A, Konuma T. Genetic deletion and pharmacologic inhibition of E3 ubiquitin ligase HOIP impairs the propagation of myeloid leukemia[J]. Leukemia, 2023, 37(1): 122-133.
- [6] Yang HJ, Xue M, Su P, Zhou Y, Li X, Li ZB, Xia Y, Zhang CM, Fu MX, Zheng XX, Luo GS, Wei T, Wang XX, Ding YL, Zhu J, Zhuang T. RNF31 represses cell progression and immune evasion *via* YAP/PD-L1 suppression in triple negative breast cancer[J]. Journal of Experimental & Clinical Cancer Research, 2022, 41(1): 364.
- [7] Liu JP, Wang YL, Gong YK, Fu T, Hu SC, Zhou ZX, Pan LF. Structural insights into SHARPIN-mediated activation of HOIP for the linear ubiquitin chain assembly[J]. Cell reports, 2017, 21(1): 27-36.
- [8] Smit JJ, Monteferrario D, Noordermeer SM, van Dijk WJ, van der Reijden BA, Sixma TK. The E3 ligase HOIP specifies linear ubiquitin chain assembly through its RING-IBR-RING domain and the unique LDD extension[J]. The EMBO Journal, 2012, 31(19): 3833-3844.
- [9] Ikeda F, Deribe YL, Skånland SS, Stieglitz B, Grabbe C, Franz-Wachtel M, van Wijk SJL, Goswami P, Nagy V, Terzic J, Tokunaga F, Androulidaki A, Nakagawa T, Pasparakis M, Iwai K, Sundberg JP, Schaefer L, Rittinger K, Macek B, Dikic I. SHARPIN forms a linear ubiquitin ligase complex regulating NF- $\kappa$ B activity and apoptosis[J]. Nature, 2011, 471(7340): 637-641.
- [10] Zhu J, Zhao C, Razavirad A, Zhuang T, Jonsson P, Liang N, Williams C, Lin Cy, Qiao Y, Zendeherdel K, Strömlund S, Treuter E, Dahlman-Wright K. The atypical ubiquitin ligase RNF31 stabilizes estrogen receptor  $\alpha$  and modulates estrogen-stimulated breast cancer cell proliferation[J]. Oncogene, 2014, 33(34): 4340-4351.
- [11] Zhang W, Li WW, Yang Y, Cao WJ, Shao WH, Huang MY, Wang JL, Chen ZT, Cai JT, Liu HN, Zhao XY, Dong XY, Zhou TT, Tian H, Zhu ZX, Yang F, Zheng HX. RING finger protein 5 is a key anti-FMDV host factor through inhibition of virion assembly[J]. PLoS Pathog, 2025, 21(1): e1012848
- [12] Liu WL, Yang CS, Liu YQ, Jiang G. CRISPR/Cas9 system and its research progress in gene therapy[J]. Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry, 2019, 19(16): 1912-1919.
- [13] 许立慧, 刘莹玉, 崔珍珍, 范新莹, 胡婷婷, 王晓琳, 梁健, 宫庆龙, 李健明, 时坤, 冷雪, 杜锐. CRISPR/Cas9技术在动物病毒和疫苗研究中的应用[J]. 中国兽医科学, 2023, 53(12): 1570-1578.  
Xu LH, Liu YY, Cui ZZ, Fan XY, Hu TT, Wang XL, Liang J, Gong QL, Li JM, Shi K, Leng X, Du R. Applications of CRISPR/Cas9 technology in animal viruses and vaccines[J]. Chinese Veterinary Science, 2023, 53(12): 1570-1578 (in Chinese).
- [14] Li B, Clohisey SM, Chia BS, Wang B, Cui A, Eisenhaure T, Schweitzer LD, Hoover P, Parkinson NJ, Nachshon A, Smith N, Regan T, Farr D, Gutmann MU, Bukhari SI, Law A, Sangesland M, Gat-Viks I, Digard P, Vasudevan S, et al. Genome-wide CRISPR screen identifies host dependency factors for influenza A virus infection[J]. Nature Communications, 2020, 11(1): 164.
- [15] Peng GC, Liu TR, Qi XL, Wang YZ, Ren JJ, Peng JL, Du XG, Hu SY, Wu S, Zhao YF, Li D, Zheng HX. A genome-wide CRISPR screening uncovers that TOB1 acts as a key host factor for FMDV infection *via* both IFN and EGFR mediated pathways[J]. PLoS Pathogens, 2024, 20(3): e1012104.
- [16] Khasa R, Ogden SC, Wang YQ, Mou Z, Metzler AD, Xie XP, Dai XH, Tang HL. A single mutation in the PrM gene of Zika virus determines AXL dependency for infection of human neural cells[J]. Journal of Virology, 2025, 99(4): e01873-24.
- [17] 张杰. RNF31在调控造血系统发育、炎症和肿瘤发生中的功能研究[D]. 北京: 清华大学, 2023.  
Zhang J. The biological function of RNF31 in the regulation of hematopoiesis, inflammation and tumorigenesis[D]. Beijing: Tsinghua University, 2023 (in Chinese).
- [18] Chen YZ, He L, Peng YN, Shi XD, Chen JZ, Zhong J, Chen XW, Cheng GH, Deng HY. The hepatitis C virus protein NS3 suppresses TNF- $\alpha$ -stimulated activation of NF- $\kappa$ B by targeting LUBAC[J]. Science Signaling, 2015, 8(403): ra118.
- [19] Hua F, Hao WZ, Wang LY, Song K, Hasan A, Wu YK, Li K, Lin Z, Sun YW, Li ST. Linear ubiquitination mediates coronavirus NSP14-induced NF- $\kappa$ B activation[J]. Cell Communication and Signaling, 2024, 22(1): 573.