

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2021.22.001

• 基础研究 •

靶向 AML 突变的 CRISPR/Cas9 基因敲除文库构建 *

娄琪¹ 张菊² 王洁¹ 张石生¹ 张竞方^{1Δ}

(1 北京中医药大学生命科学院 北京 100029; 2 中国科学院大学动物研究所 北京 100049)

摘要 目的:构建靶向约 200 个 AML 基因突变的 sgRNA 基因敲除文库,为进一步探索诱发 AML 的信号通路网络奠定基础。**方法:**TCGA 对 200 名 AML 病人进行了全基因组或全外显子组测序,鉴定出约 2000 个 AML 相关基因突变,从中选出了约 200 个突变两次或以上的基因作为靶向基因;接着,从 Bric 文库中挑选出相应基因的 sgRNA 序列,每个基因对应 4 条 sgRNA;利用 Gibson 组装酶连接到慢病毒载体内,得到 sgRNA 文库;之后,采用 pSSA 荧光素酶基因报告系统鉴定文库 sgRNA 的切割活性;对文库进行高通量测序鉴定;用慢病毒包装文库,并测定病毒滴度。**结果:**1、构建了一个靶向约 200 个 AML 突变的 sgRNA 基因敲除文库;2、pSSA 荧光素酶基因报告系统鉴定文库 sgRNA 具有切割活性;3、鉴定的 7 个单克隆质粒序列完全正确;4、高通量测序鉴定文库丰度和均一性符合要求;5、用慢病毒包装成病毒文库,测定病毒文库滴度为 4.4×10^7 符合后续实验要求。**结论:**成功构建了靶向约 200 个基因突变的 sgRNA 敲除文库,可用于大规模地筛选诱发 AML 的基因突变,为探索 AML 发生、发展的分子机制以及药物靶点奠定基础。

关键词:CRISPR/Cas9; sgRNA 基因敲除文库;高通量测序;慢病毒包装;AML

中图分类号:R-33;R733.71;Q78;Q813 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2021)22-4201-06

Construction of a sgRNA Library Targeting AML Mutations*

LOU Qi¹, ZHANG Ju², WANG Jie¹, ZHANG Shi-sheng¹, ZHANG Jing-fang^{1Δ}

(1 College of Life Sciences, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing, 100029, China;

2 Institute of Zoology, University of Chinese Academy of Sciences, Beijing, 100049, China)

ABSTRACT Objective: In this research, we attempt to generate a sgRNA knockout library targeting approximately 200 AML genetic alterations identified in human patients. This library will be a useful tool to decipher the functional signaling pathways that synergistically induce AML. **Methods:** The TCGA database contains the genome sequences of 200 AML patients, from which around 2000 genetic alterations were identified. We selected approximately 200 genetic alterations that occurred at least twice in this database for further study. The sgRNAs were selected from the Bric library, 4 for each gene. A lentiviral library was constructed as a pool using Gibson assembly. High-throughput sequencing was performed to evaluate the quality of the library. Then, the library was packaged into a pool of lentivirus particles, and viral titer was measured. **Results:** 1. A sgRNA knockout library targeting about 200 AML genetic alterations was generated. 2. The cleavage activity of representative sgRNAs in the library was confirmed using pSSA reporter assay. 3. Plasmids from 7 randomly picked bacterial monoclonal were prepared and verified by sequencing. 4. High-throughput sequencing demonstrated uniform distribution of sgRNA species in the library. 5. Lentiviral library was generated and viral titer (4.4×10^7) was high enough for further study. **Conclusion:** We generated a sgRNA knockout library targeting about 200 genetic mutations identified in AML patients, which can be used for pooled screening of AML driver mutations. This may help us to study molecular mechanisms of AML and to develop targeted therapies.

Key words: CRISPR/Cas9; sgRNA knockout library; High-throughput sequencing; Lentiviral packaging; AML

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R733.71; Q78; Q813 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2021)22-4201-06

前言

大规模、高通量的功能缺失性筛选是研究基因功能的有力工具^[1]。最新发展的 CRISPR/Cas9 技术能方便、高效地敲除靶

基因^[2-6],因此适用于建立大规模、功能缺失性筛选体系。目前,人类^[7-10]和小鼠^[8-11]的 sgRNA 全基因组敲除文库均已建立。其中,John G. Doench 等人设计的 sgRNA 敲除文库大大提高了靶靶效率且最大限度地降低脱靶效应^[11],同时多项利用

* 基金项目:国家自然科学基金青年基金项目(31701280)

作者简介:娄琪(1992-),女,硕士研究生,研究方向:AML 分子致病机制,E-mail: rrlouqi@126.com,电话:18800187883

Δ 通讯作者:张竞方,女,博士,副教授,研究方向:AML 致病机制及药物靶点发现,E-mail: zhangjingfang@bucm.edu.cn

(收稿日期:2021-03-31 接受日期:2021-04-27)

CRISPR/Cas9 全基因组敲除文库进行的体内、外筛选已经完成^[12-14]。然而,在充分了解研究背景的基础上,开发体量更小、针对性更强的个性化文库,更易得到高质量的筛选结果^[15]。

急性髓系白血病(acute myeloid leukemia, AML)是一类由髓系造血干/祖细胞发生恶性克隆性增殖的疾病^[16,17]。其发病率随着年龄增长而上升,中位发病年龄为 67 岁^[18]。AML 病情发展迅速,预后不良,严重威胁人类的健康。目前,AML 的全基因组已被测通^[19,20]。其中,TCGA(The Cancer Genome Atlas)对 200 名原发性 AML 病人进行了全基因组或全外显子组测序,其中有 200 多个基因突变在两个或以上的病人中重复出现。本研究拟构建一个靶向这 200 多个 AML 候选突变的基因敲除文库,为筛选诱发 AML 的信号通路网络,研发个体化的治疗方案以及开发靶向药物提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验仪器 PCR 仪(thermofisher, ProFlex 3× 32);琼脂糖凝胶电泳仪(北京六一生物科技有限公司, DYCP-31F);电转仪(Bio-RAD, MicroPulser);酶标仪(PerkinElmer);分光光度计(NanoDrop, 55625500)。

1.1.2 实验试剂 *sbfi* 酶(NEB, R0642L);*Esp3I*(NEB, R0734L);RSAP(NEB, M0371S);BM2000+ Marker(BioMed, MD102-01);BM15000 DNA Marker(BioMed, MD106-01);NEB 10bets 电转感受态细胞(BioMed, BC401-01);PCR 纯化试剂盒(QiAquick, 28104);Phusion Hot Start Flex 2X Master Mix(NEB, M0536S);dNTP 混合液(NEB, N0447V);NAD(NEB, B9007S);Phusion DNA polymerase(NEB, M0530S);Taq DNA ligase(NEB, M0208V);T5 exonuclease(NEB, M0663S);引物合成及测序由北京擎科生物科技有限公司完成;oligo pools 由美国 Twist Bioscience 公司合成;人胚肾上皮细胞 HEK 293T 细胞(ATCC; Virginia, USA);PEI (Polysciences, 24885-2);lentiGuide-Puro(Ad

dgene, plasmid ID 52963);psPAX2(Addgene, plasmid ID 12260);Pmd2.G(Addgene, plasmid ID 12259);precut pUCA(Luc)质粒(UCATM CRISPR/Cas9 快速构建及活性检测试剂盒)。

Gibson assembly mix 的配制:首先配制 3 mL 5× isothermal Buffer:1 M Tris-HCl (pH=7.5), 2 M MgCl₂ 150 μL, 100 mM D₂TP 60 μL, 100 mM D₂ATP 60 μL, 100 mM D₂TTP 60 μL, 100 mM dCTP 60 μL, 1 M DTT 300 μL, PEG-8000 1.5 g, 100 mM NAD 300 μL, ddH₂O 补足至 6 mL。接下来配制 Gibson assembly Mix: 5× isothermal Buffer 320 μL, 10 U/μL T5 exonuclease 0.64 μL, 2 U/μL Phusion DNA Polymerase 20 μL, 40 U/μL Taq DNA Ligase 160 μL, 加 ddH₂O 至 1.2 mL。整个制备过程中要做到轻柔充分混匀,将配制好的 Gibson assembly mix 分装,存放至 -20℃ 冰箱中备用,避免反复冻存。

1.2 方法

1.2.1 扩增 oligo pool 首先,将合成的 oligo pool 干粉溶解至 1 ng/μL。接着,配制 50 μL PCR 反应体系:NEB Hot Smart PCR Master Mix(2×) 25 μL, oligo pool 1 μL, oligo-F 2.5 μL, oligo-R 2.5 μL, ddH₂O 19 μL。PCR 扩增的引物序列为 oligo-F: 5'-TAACCTGAAAGTATTTTCGATTTCTTGCTTTAT-ATATC-TT-3', oligo-R: 5'-GTTGATAACGGACTAGCCTTATTTAAAC-TTGCTATGCT-3'^[21]。PCR 反应条件为:98℃ 30 s, 设置不同的循环数 15、20 或 25(98℃ 30 s, 63℃ 30 s, 72℃ 30 s), 72℃ 5 min, 4℃ ∞。

1.2.2 Gibson 组装 首先,按照制造商的使用说明,使用 *Esp3I* 内切酶对慢病毒载体 LentiGuide-eGFP 进行酶切,37℃ 水浴中孵育 1 h 后,再加入 1 μL rSAP 酶继续孵育 30 min 去磷。接着,按照 PCR 纯化试剂盒的使用说明分别对 oligo 扩增产物和载体的酶切产物进行纯化,并通过琼脂糖凝胶电泳鉴定条带大小。最后,如表 1 所示,分别设置实验组和空白对照组进行连接。连接体系置于 50℃ 金属浴中反应 40 min 后,放置冰上备用。

表 1 Gibson 组装反应体系
Table 1 Gibson assembly reaction system

Component	Experimental group	Control group
sgRNA library insert	30 ng	0
Library plasmid backbone	100 ng	100 ng
Gibson assembly mix	15 μL	15 μL
ddH ₂ O	To 20 μL	To 20 μL

1.2.3 电转法获得 sgRNA 文库 取 1 μL 上述连接产物加入到 25 μL 电转感受态细胞 10bets 中,接着将 26 μL 混合液加入到预冷的电转杯中,设置电转化程序为 25 VF 200 欧 1800 V。电转后快速将电击杯置于冰中,并加入 SOC 培养基补足至 1 mL。进行多次电转并将电转产物混合在一起以减少实验误差。放入摇床中 37℃, 220 rpm 震荡 1 h。分别设置实验组、计数组和空白对照组。从混合液中取 1 μL 稀释 10000 倍,加 100 μL 到 10 cm 培养皿中作为计数组。剩余混合菌液全部涂布在多个培养皿中作为实验组。将所有的培养皿置于 32℃ 恒温箱中培养 14 h。收集实验组所有菌落至锥形瓶中,采用异丙醇沉淀法

提取文库质粒,将纯化后的质粒放于 -80℃ 冰箱中,方便长期保存。

1.2.4 pSSA 法检测 sgRNA 的切割活性 利用基于单链退火(single strand annealing, SSA)修复荧光素酶的报告系统 pSSA(plasmid SSA)法检测 sgRNA 的切割活性。将待测基因的靶位点序列按照制造商的说明连入荧光素酶基因报告载体 precut pUCA(Luc)质粒中构建成报告质粒。同时,将每个基因对应的 4 条 sgRNA 分别连入慢病毒载体 LentiGuide-eGFP 中构成 sgRNA 表达载体。将 HEK 293T 细胞铺至 96 孔板中,按照制造商的使用说明每孔用 0.3 μL 的转染试剂 PEI 共转染 100 ng 质

粒。其中,报告质粒、sgRNA 表达质粒和 cas9 表达质粒转染比例为 1:2:2。转染 48 小时后,样品中加入荧光素酶底物孵育,然后根据操作手册说明使用酶标仪检测荧光素酶活性。

1.2.5 sgRNA 文库测序鉴定 从计数板上随机挑选几个单克隆进行一代测序。接着,经过两步 PCR 法扩增后进行高通量测序。为了减少由于 PCR 扩增而产生的文库 sgRNA 偏倚,尽可能减少循环数。第一步 PCR 反应体系为:NEB Hot Smart PCR Master Mix ($2\times$) 25 μL , 文库质粒 50 ng, Oligo-F 2.5 μL , Oligo-R 2.5 μL , 加 ddH₂O 至 50 μL 。我们分别设置了不同的循环数 (15、20、25), PCR 反应条件为:98 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 15、20 或 25 个循环 (98 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 63 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s), 72 $^{\circ}\text{C}$ 5 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ ∞ 。第二步 PCR 给文库加上 barcode 后, 上机测序。

1.2.6 文库慢病毒包装及其滴度测定 将状态良好的 HEK 293T 细胞接种到 10 cm 培养皿中,细胞密度达到 70 % 时,按照制造商的使用说明,每个培养皿用 45 μ L 的转染试剂 PEI 共转染 15 mg 质粒,其中文库质粒、包装质粒 psPAX2 和 Pmd2.G 的摩尔比为 8:6:3。为减少实验误差,同时包装多组。培养 48 h 后收集细胞上清液,将所有上清液混匀,用 0.45 μ m 滤膜过滤后分装,存放于 -80 $^{\circ}$ C 冰箱备用。

采用 puro 抗性筛选法测定病毒的滴度。将状态良好的 HEK 293T 细胞接种到 12 孔板中,每孔接种 3×10^6 个细胞(定义为“起始细胞数”)。分别加入 0 μL 、25 μL 、50 μL 、100 μL 、200 μL 、400 μL 慢病毒用离心法侵染细胞。33 $^{\circ}\text{C}$, 1000 $\times$ g 离心 2 h 后,置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 5 % CO_2 培养箱中培养 24 h。之后按照

4× 10⁴个细胞/孔接种到新的12孔板中,分别设置puro组和空白对照组,加入puro筛选3-4天。当puro组中未感染病毒的细胞彻底死亡,而空白对照组中未感染病毒的细胞密度达到80%-90%时,对各孔细胞进行计数。定义puro组的细胞数为"活细胞数",空白对照组的细胞数为"对照细胞数"。病毒滴度计算公式为:滴度(IFU/mL)=(活细胞数×起始细胞数)÷(对照细胞数×毫升病毒体积)。

1.3 统计学处理

采用 GraphPad Prism 8.0 对实验数据进行统计学分析,实验数据均采用平均值 $\pm$ 标准差(mean $\pm$ SD)的方式表示。两组间差异性比较,采用独立样本 t 检验进行分析。 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 sgRNA 的挑选及 oligo pool 的合成

为了提高文库的针对性,本研究从 TCGA 的 2000 个 AML 突变基因中筛选出发生两次或以上的突变基因,并根据 MGI (Mouse Genome Informatics, <http://www.informatics.jax.org/>) 数据库,将人类基因替换为同源的小鼠基因,最终确定了 231 个小鼠基因作为靶向基因。接着,从 John G. Doench 等人构建的 sgRNA 敲除文库 Brie 中挑选出相应的 sgRNA,其中每个基因包含 4 条 sgRNA,最终形成了含有 924 条 sgRNA 的文库。oligo pool 由美国 Twist Bioscience 公司合成,oligo 长度为 100bp (图1)。

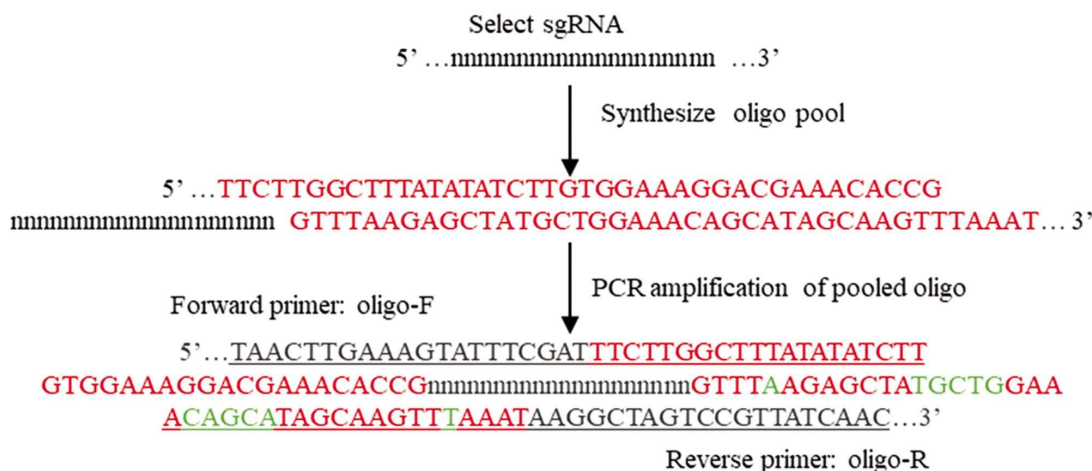


图 1 Oligo pool 扩增示意图

Fig.1 Oligo pool amplification

注:sgRNA scaffold 序列改造的部分用绿色表示。

Note: green-colored codons highlight the modified sgRNA scaffold.

2.2 sgRNA 文库骨架质粒的构建

以 lentiGuide-Puro(Addgene 52963)为骨架载体,首先根据 Baohui Chen 等的研究改造了 sgRNA scaffold 序列,使其具有更高的打靶效率以及较低的脱靶效应^[2](图 1)。然后在元件 puroR 后加入 P2A-cGFP,使其在表达 puroR 的同时表达 cGFP,方便后续利用流式细胞仪检测感染了 sgRNA 的细胞。接着,我们用新构建的慢病毒载体 hU6-gRNA-EF1a-puroR-cGFP(简称 LentiGuide-cGFP)侵染 HEK 293T

细胞,48 小时后于荧光显微镜下观察,发现绿色荧光能正常表达。

2.3 sgRNA 文库质粒的构建

由图 1 可见 PCR 扩增 oligo pool, 扩增后的长度为 140bp。经琼脂糖凝胶电泳鉴定, 选取 20 个循环的 PCR 产物进行文库构建(图 2A)。LentiGuide-eGFP 质粒经 *Esp3I* 酶切后(图 2B), 利用 Gibson 组装体系与 PCR 扩增的 oligo pool 连接。然后将连接产物进行电转。对实验组进行了 5 次电转, 混合后过夜培

养,最终收集的菌落数约为 2.5×10^5 个,平均每个 sgRNA 对应的质粒可放在 -80°C 长期保存。
大约 250 个克隆。最后,用异丙醇沉淀法提取文库质粒,纯化后

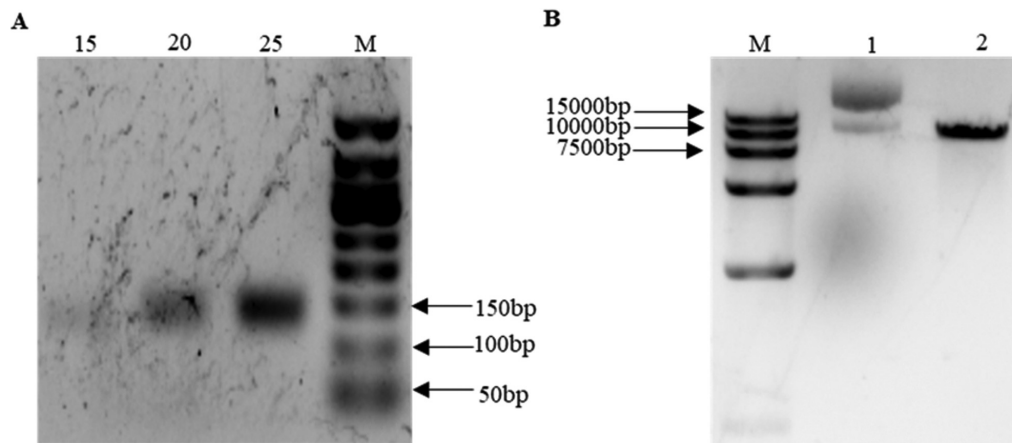


图 2 sgRNA 文库构建

Fig.2 Construction of the sgRNA library

注:(A)PCR 扩增 oligo pool。15、20、25 分别代表 PCR 扩增 15、20、25 个循环。(B)载体酶切。1:原质粒,2:酶切后线性化质粒。

Note : (A) PCR amplification of oligo pool. 15, 20 and 25 indicate the number of PCR cycles. (B) Restriction digest of plasmid backbone. 1: whole plasmid, 2: linearized plasmid after digestion.

2.4 验证文库 sgRNA 具有切割活性

从文库中随机挑选了三个基因 Trp53、Tet2、Dnmt3a,利用 pSSA 法检测它们对应的 4 条 sgRNA 的切割活性^[23]。结果发现,

三个基因对应的 4 条 sgRNA 的切割活性与阴性对照相比,均提高了 2 倍或以上,其中,有几条 sgRNA 的切割活性甚至高于阳性对照(图 3)。

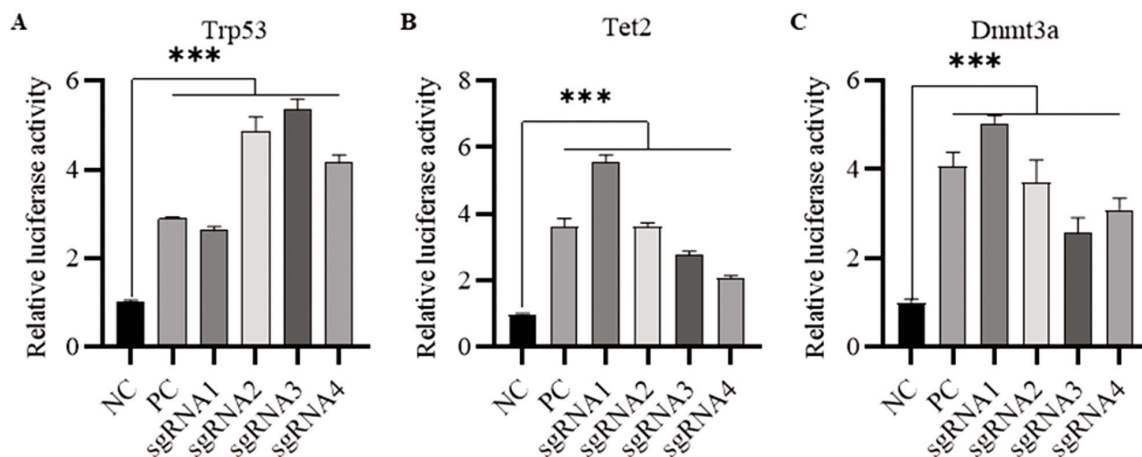


图 3 文库 sgRNA 的切割活性检测

Fig.3 Detection of sgRNA cleavage activity

注:利用 pSSA 荧光素酶报告系统检测基因(A)TrpP53(B)Tet2(C)Dnmt3a 分别对应的 4 条 sgRNA 的切割活性。NC 为阴性对照,PC 为阳性对照。n=3。*** $P<0.001$ 。

Note: The pSSA assay was used to detect the cleavage activity of 4 sgRNAs targeting (A) Trp53 or (B) Tet2 or (C) Dnmt3a. NC: negative control, PC: positive control. Data were expressed as mean $\pm$ SD, n = 3. *** $P<0.001$.

2.5 测序验证 sgRNA 文库

为了初步评估所构文库的质量,在稀释 10000 倍的计数板上随机挑选了 7 个单克隆,进行一代测序。结果显示 7 个样本序列均正确,且分别对应 7 条不同的 sgRNA。对 924 条 sgRNA 进行编号,7 个单克隆分别属于第 21、170、185、269、586、659、921 号 sgRNA(图 4A)。

为进一步检测文库的丰度,本研究对所构的文库用两步

PCR 法克隆并进行深度测序。进行第一步 PCR 时,仍尽可能减少循环数,以减少由于 PCR 扩增而产生结果的偏差。Illumina 测序结果显示建库后的目的片段长度为 140 bp 左右,文库覆盖率 $>99.5\%$ 。其中,sgRNA 的 reads 呈现正态分布(图 4B),90% 的 sgRNA 的 reads 小于或等于 2164,10% 的 sgRNA 的 reads 小于或等于 710,相差 3.05 倍(图 4C),说明所构文库的 sgRNA 分布比较均一。

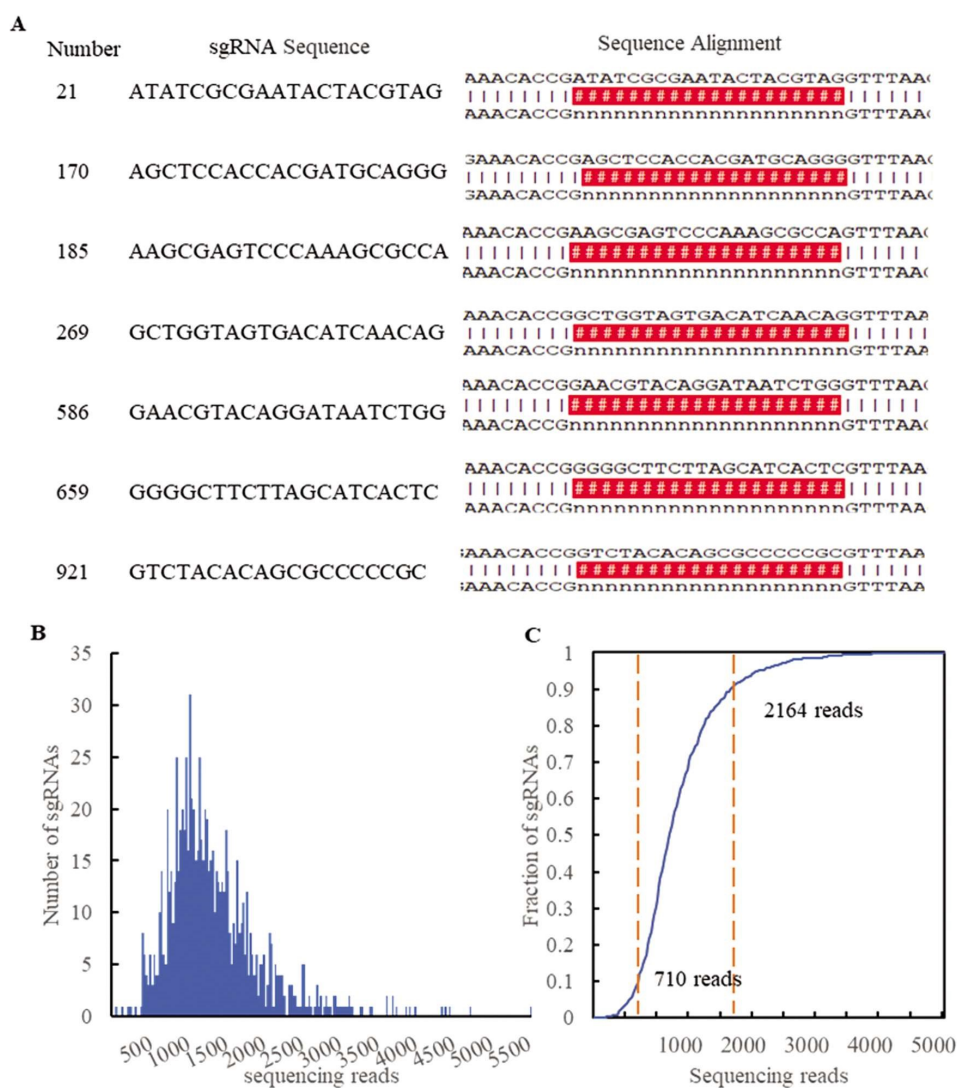


Fig. 4 Sequencing of the sgRNA library

注: (A) 随机挑选的 7 个单克隆质粒测序结果。 (B) sgRNA 的 reads 呈柱状分布。 (C) sgRNA 的 reads 累积分布图。 10% 和 90% 的 sgRNA reads 由橙色虚线表示。

Note: (A) Sequencing results of 7 randomly selected single colonies. (B) Histogram of sgRNA representation. (C) Cumulative distribution of sequencing reads. The number of sequencing reads for the 10th and 90th sgRNA percentile is indicated by the dashed orange lines and text labels.

2.6 文库的慢病毒包装及滴度测定

最后,我们将文库用慢病毒包装,并采用 puro 抗性筛选法测定病毒的滴度。重复测定三次,最终确定文库病毒滴度为 4.4×10^7 。

3 讨论

AML 是血液系统常见的恶性肿瘤之一。目前,关于 AML 致病机制的研究进展迅速,新的靶向治疗不断涌现^[24-28],但是,大多数 AML 的治疗仍依赖于非选择性的化疗。而 AML 患者中大多数都是老年人,很多不符合化疗治疗的条件^[29],因此进一步揭示不同突变如何协同作用诱发 AML,对了解 AML 的发病机制以及个体化治疗都有重要意义。

随着基因编辑技术的发展, 锌指核酸酶(Zincfinger nucleases, ZFNs)^[30]、转录激活因子样效应核酸酶(Transcription activator-like effector nucleases, TALENs)^[31,32]和 CRISPR/Cas9^[33,34]等

人工核酸内切酶相继而生。其中,最新发展的 CRISPR/Cas9 技术由于 sgRNA 文库构建快捷、操作简便、成本较低、基因调控方式多样(敲除、插入、激活等)以及可以实现多个位点同时编辑等优点,逐渐成为在哺乳动物中进行大规模基因分析的有力工具。基于 CRISPR/Cas9 的全基因组文库已在多种细胞系中被广泛应用于多种疾病的研究。但是,全基因组文库通常包含数万条 sgRNA,所需的细胞数量较多,且筛选过程及后续的数据分析都需要投入大量的人力、物力。而针对特定疾病、特定组织发育或其它生物学特点所设计的个性化文库能大大降低 sgRNA 数量,具有更强的针对性,更容易得到高质量的筛选结果。如: Leanne Li 等人利用一个靶向约 5000 个可成药蛋白的 sgRNA 文库,筛选发现抑制二氢乳清酸脱氢酶(dihydroorotate dehydrogenase, DHODH)能有效抑制小细胞肺癌的体内、外生长^[5]。

本研究基于 CRISPR/Cas9 技术构建了一个靶向约 200 个 AML 相关突变的 sgRNA 基因敲除文库。本研究使用 lentiGu-

ide-Puro 质粒为基本骨架,该质粒不含元件 Cas9,使用 Hu6 启动子启动 sgRNA 的表达;本研究还对骨架质粒进行了改造,在元件 puroR 后加入 P2A-eGFP,方便后续追踪感染了 sgRNA 的细胞;Gibson 组装技术是一种简单、快速、高效的 DNA 定向无缝克隆技术,在文库构建过程中可以大大的提高连接效率^[21,36];为减少 sgRNA 文库发生偏倚,应尽可能减少 oligo pool 扩增时 PCR 循环数,并尽量减少电转后培养菌落的时间,以及降低培养温度。文库质粒构建完成后,我们随机挑选了几个基因,利用 SSA 荧光素酶基因报告系统验证了其对应 sgRNA 的切割活性;接着,我们采用深度测序来检测文库的丰度。最后,我们将文库质粒用慢病毒包装,并进行了滴度测定。

本研究成功构建了一个靶向 200 多个 AML 突变的 sgRNA 敲除文库,初步验证了文库 sgRNA 的切割活性,并进行了慢病毒包装,为筛选诱发 AML 的信号通路网络以及阐明 AML 的分子致病机制提供了强有力的工具。另外,本研究也为其他个性化文库的构建提供了经验和参考方案。

参考文献(References)

- [1] Shalem O, Sanjana NE, Zhang F. High-throughput functional genomics using CRISPR-Cas9[J]. *Nat Rev Genet*, 2015, 16(5): 299-311
- [2] Zetsche B, Gootenberg JS, Abudayyeh OO, et al. Cpf1 is a single RNA-guided endonuclease of a class 2 CRISPR-Cas system [J]. *Cell*, 2015, 163(3): 759-771
- [3] Lau CH, Tin C, Suh Y. CRISPR-based strategies for targeted transgene knock-in and gene correction[J]. *Fac Rev*, 2020, 9: 20
- [4] Rouet P, Smih F, Jasin M. Introduction of double-strand breaks into the genome of mouse cells by expression of a rare-cutting endonuclease[J]. *Mol Cell Biol*, 1994, 14(12): 8096-8106
- [5] Wiles MV, Qin W, Cheng AW, et al. CRISPR-Cas9-mediated genome editing and guide RNA design [J]. *Mamm Genome*, 2015, 26(9-10): 501-510
- [6] Devkota S. The road less traveled: strategies to enhance the frequency of homology-directed repair (HDR) for increased efficiency of CRISPR/Cas-mediated transgenesis [J]. *BMB Reports*, 2018, 51(9): 437-443
- [7] Lander ES. Initial impact of the sequencing of the human genome[J]. *Nature*, 2011, 470(7333): 187-197
- [8] Doench JG, Hartenian E, Graham DB, et al. Rational design of highly active sgRNAs for CRISPR-Cas9-mediated gene inactivation [J]. *Nat Biotechnol*, 2014, 32(12): 1262-1267
- [9] Sanjana NE, Shalem O, Zhang F. Improved vectors and genome-wide libraries for CRISPR screening [J]. *Nat Methods*, 2014, 11 (8): 783-784
- [10] Koike-Yusa H, Li Y, Tan EP, et al. Genome-wide recessive genetic screening in mammalian cells with a lentiviral CRISPR-guide RNA library[J]. *Nature Biotechnology*, 2013, 32(3): 267-273
- [11] Doench JG, Fusi N, Sullender M, et al. Optimized sgRNA design to maximize activity and minimize off-target effects of CRISPR-Cas9 [J]. *Nat Biotechnol*, 2016, 34(2): 184-191
- [12] Ringel T, Frey N, Ringnald F, et al. Genome-Scale CRISPR Screening in Human Intestinal Organoids Identifies Drivers of TGF-beta Resistance[J]. *Cell Stem Cell*, 2020, 26(3): 431-440 e438
- [13] Song CQ, Li Y, Mou H, et al. Genome-Wide CRISPR Screen Identifies Regulators of Mitogen-Activated Protein Kinase as Suppressors of Liver Tumors in Mice [J]. *Gastroenterology*, 2017, 152 (5): 1161-1173 e1161
- [14] Liu T, Shen JK, Li Z, et al. Development and potential applications of CRISPR-Cas9 genome editing technology in sarcoma[J]. *Cancer Lett*, 2016, 373(1): 109-118
- [15] Peng J, Zhou Y, Zhu S, et al. High-throughput screens in mammalian cells using the CRISPR-Cas9 system [J]. *FEBS J*, 2015, 282 (11): 2089-2096
- [16] EA M. Stem cells in normal and leukemic hemopoiesis (Henry Stratton Lecture, 1982)[J]. *Blood*, 1983, 62(1): 1-13
- [17] Medinger M, Passweg JR. Acute myeloid leukaemia genomics[J]. *Br J Haematol*, 2017, 179(4): 530-542
- [18] Zeidan AM, Podoltsev NA, Wang X, et al. Temporal patterns and predictors of receiving no active treatment among older patients with acute myeloid leukemia in the United States: A population-level analysis[J]. *Cancer*, 2019, 125(23): 4241-4251
- [19] Cancer Genome Atlas Research N, Ley TJ, Miller C, et al. Genomic and epigenomic landscapes of adult de novo acute myeloid leukemia [J]. *N Engl J Med*, 2013, 368(22): 2059-2074
- [20] Tyner JW, Tognon CE, Bottomly D, et al. Functional genomic landscape of acute myeloid leukaemia [J]. *Nature*, 2018, 562 (7728): 526-531
- [21] Canver MC, Hacussler M, Bauer DE, et al. Integrated design, execution, and analysis of arrayed and pooled CRISPR genome-editing experiments[J]. *Nat Protoc*, 2018, 13(5): 946-986
- [22] Chen B, Gilbert LA, Cimini BA, et al. Dynamic imaging of genomic loci in living human cells by an optimized CRISPR/Cas system [J]. *Cell*, 2013, 155(7): 1479-1491
- [23] Ren C, Xu K, Liu Z, et al. Dual-reporter surrogate systems for efficient enrichment of genetically modified cells [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2015, 72(14): 2763-2772
- [24] Wei AH, Dohner H, Pocock C, et al. Oral Azacitidine Maintenance Therapy for Acute Myeloid Leukemia in First Remission[J]. *N Engl J Med*, 2020, 383(26): 2526-2537
- [25] Norsworthy KJ, By K, Subramaniam S, et al. FDA Approval Summary: Glasdegib for Newly Diagnosed Acute Myeloid Leukemia [J]. *Clin Cancer Res*, 2019, 25(20): 6021-6025
- [26] Lancet JE, Uy GL, Corte JE, et al. CPX-351 (cytarabine and daunorubicin) liposome for injection versus conventional cytarabine plus daunorubicin in older patients with newly diagnosed secondary acute myeloid leukemia[J]. *J Clin Oncol*, 2018, 36(26): 2684-2692
- [27] Garcia-Manero G, Griffiths EA, Steensma DP, et al. Oral cedazuridine-decitabine for MDS and CMML a phase 2 pharmacokinetic-pharmacodynamic randomized crossover study [J]. *Blood*, 2020, 136 (6): 674-683
- [28] Zhao J, Song Y, Liu D. Gilteritinib: a novel FLT3 inhibitor for acute myeloid leukemia[J]. *Biomark Res*, 2019, 7: 19
- [29] Kantarjian H, Kadia T, DiNardo C, et al. Acute myeloid leukemia: current progress and future directions[J]. *Blood Cancer J*, 2021, 11(2): 41
- [30] Ashmore-Harris C, Fruhwirth GO. The clinical potential of gene editing as a tool to engineer cell-based therapeutics [J]. *Clin Transl Med*, 2020, 9(1): 15

- rat full-thickness wound model[J]. Burns, 2020, 46: 377-385
- [2] Oryan A, Alemzadeh E, Mohammadi AA. Application of honey as a protective material in maintaining the viability of adipose stem cells in burn wound healing: A histological, molecular and biochemical study[J]. Tissue Cell, 2019, 61: 89-97
- [3] Liu G, Lu P, Chen L, et al. B-cell leukemia/lymphoma 10 promotes angiogenesis in an experimental corneal neovascularization model[J]. Eye, 2018, 32: 1220-1231
- [4] Yang L, Zhang D, Wu H, et al. Basic Fibroblast Growth Factor Influences Epidermal Homeostasis of Living Skin Equivalents through Affecting Fibroblast Phenotypes and Functions [J]. Skin Pharmacol Physiol, 2018, 31: 229-237
- [5] Chen P, Zhang H, Zhang Q, et al. Basic Fibroblast Growth Factor Reduces Permeability and Apoptosis of Human Brain Microvascular Endothelial Cells in Response to Oxygen and Glucose Deprivation Followed by Reoxygenation via the Fibroblast Growth Factor Receptor 1 (FGFR1)/ERK Pathway[J]. Med Sci Monit, 2019, 25: 7191-7201
- [6] Kilic Bektas C, Kimiz I, Sendemir A, et al. A bilayer scaffold prepared from collagen and carboxymethyl cellulose for skin tissue engineering applications[J]. J Biomater Sci Polym Ed, 2018, 29: 1764-1784
- [7] Francisco J, Zhang Y, Jeong JI, et al. Blockade of Fibroblast YAP Attenuates Cardiac Fibrosis and Dysfunction Through MRTF-A Inhibition[J]. JACC Basic Transl Sci, 2020, 5: 931-945
- [8] Peng J, Liu R, Peng L, et al. Calcium gluconate alleviates the toxic effect of hydrofluoric acid on human dermal fibroblasts through the Wnt/ β -catenin pathway[J]. Oncol Lett, 2018, 16: 2921-2928
- [9] Kawanaka Y, Kawakami H, Shimizu S, et al. A Case of Pulmonary Tumor Thrombotic Microangiopathy Suggested by the Presence of Tumor Cells in Peripheral Blood [J]. Case Rep Oncol, 2020, 13: 843-848
- [10] Ouyang QQ, Hu Z, Lin ZP, et al. Chitosan hydrogel in combination with marine peptides from tilapia for burns healing [J]. Int J Biol Macromol, 2018, 112: 1191-1198
- [11] Cai J, Zhou Q, Wang Z, et al. Comparative Analysis of KGF-2 and bFGF in Prevention of Excessive Wound Healing and Scar Formation in a Corneal Alkali Burn Model[J]. Cornea, 2019, 38: 1430-1437
- [12] Oryan A, Alemzadeh E. Comparison of botulinum toxin type A and aprotinin monotherapy with combination therapy in healing of burn wounds in an animal model[J]. Mol Biol Rep, 2020, 47: 2693-2702
- [13] Sharifi E, Chehelgerdi M, Fatahian-Kelishadrokhi A, et al. Comparison of therapeutic effects of encapsulated Mesenchymal stem cells in Aloe vera gel and Chitosan-based gel in healing of grade-II burn injuries[J]. Regen Ther, 2021, 18: 30-37
- [14] Zhao Y, Wang Q, Jin Y, et al. Discovery and Characterization of a High-Affinity Small Peptide Ligand, H1, Targeting FGFR2IIIc for Skin Wound Healing[J]. Cell Physiol Biochem, 2018, 49: 1033-1048
- [15] Alemzadeh E, Oryan A. Effectiveness of a Crocus sativus Extract on Burn Wounds in Rats[J]. Planta Med, 2018, 84: 1191-1200
- [16] Yuan B, Broadbent JA, Huan J, et al. The Effects of Adipose Stem Cell-Conditioned Media on Fibrogenesis of Dermal Fibroblasts Stimulated by Transforming Growth Factor- β 1 [J]. J Burn Care Res, 2018, 39: 129-140
- [17] Lu GM, Rong YX, Liang ZJ, et al. FGF2-induced PI3K/Akt signaling evokes greater proliferation and adipogenic differentiation of human adipose stem cells from breast than from abdomen or thigh[J]. Aging, 2020, 12: 14830-14848
- [18] Mahmood R, Mehmood A, Choudhery MS, et al. Human neonatal stem cell-derived skin substitute improves healing of severe burn wounds in a rat model[J]. Cell Biol Int, 2019, 43: 147-157
- [19] Alemzadeh E, Oryan A, Mohammadi AA. Hyaluronic acid hydrogel loaded by adipose stem cells enhances wound healing by modulating IL-1 β , TGF- β 1, and bFGF in burn wound model in rat [J]. J Biomed Mater Res B Appl Biomater, 2020, 108: 555-567
- [20] Matsumine H, Fujimaki H, Takagi M, et al. Full-thickness skin reconstruction with basic fibroblast growth factor-impregnated collagen-gelatin sponge[J]. Regen Ther, 2019, 11: 81-87

(上接第 4206 页)

- [31] Sun N, Zhao H. Transcription activator-like effector nucleases (TALENs): a highly efficient and versatile tool for genome editing [J]. Biotechnol Bioeng, 2013, 110(7): 1811-1821
- [32] Gautron AS, Juillerat A, Guyot V, et al. Fine and Predictable Tuning of TALEN Gene Editing Targeting for Improved T Cell Adoptive Immunotherapy[J]. Mol Ther Nucleic Acids, 2017, 9: 312-321
- [33] Janik E, Niemcewicz M, Ceremuga M, et al. Various Aspects of a Gene Editing System-CRISPR-Cas9 [J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(24): 9604
- [34] Saifaldeen M, Al-Ansari DE, Ramotar D, et al. CRISPR FokI Dead Cas9 System: Principles and Applications in Genome Engineering[J]. Cells, 2020, 9(11): 2518
- [35] Li L, Ng SR, Colón CI, et al. Identification of DHODH as a therapeutic target in small cell lung cancer[J]. Sci Transl Med, 2019, 11(517): eaaw7852
- [36] Gibson DG, Young L, Chuang RY, et al. Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases [J]. Nat Methods, 2009, 6(5): 343-345