

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2023.06.008

稳定表达 Cas9 蛋白的 SW620 细胞株构建*

王 洁 刘瑞琦 雷 超 刘一睿 张竞方[△]

(北京中医药大学生命科学学院 北京 100029)

摘要 目的:建立稳定表达 Cas9 蛋白的 SW620 人结肠癌细胞系的单克隆细胞株,提高基因编辑效率,为利用基于 CRISPR/Cas9 技术的高通量筛选结肠癌相关致病基因提供细胞工具。**方法:**用 Cas9 慢病毒感染 SW620 细胞系,用致死剂量的 puromycin 筛选 5-7 天,通过有限稀释法获得单克隆细胞株。提取单克隆细胞基因组进行 Sanger 测序,筛选出含有 Cas9 基因序列的单克隆细胞株。利用基于 SSA 修复荧光素酶的报告系统检测单克隆细胞株中 Cas9 的编辑活性,并通过细胞增殖实验检测 Cas9 蛋白的表达是否影响细胞增殖。**结果:**获得了两个表达 Cas9 蛋白的 SW620 单克隆细胞株,并通过 Sanger 测序验证了 Cas9 序列;荧光素酶报告系统检测显示单克隆细胞株的 Cas9 蛋白有较高的编辑活性;细胞增殖实验显示 Cas9 蛋白的表达对 SW620 增殖活性影响不大。**结论:**本研究利用慢病毒感染的方式,构建了稳定表达 Cas9 蛋白的 SW620 单克隆细胞株,为后续大规模筛选与人结肠癌相关的基因突变提供了细胞工具。

关键词:CRISPR/Cas9;单克隆细胞株;慢病毒;SW620 细胞系

中图分类号:R-33;R735.3;Q78 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2023)06-1041-05

Construction of Monoclonal SW620 Stably Expressing Cas9*

WANG Jie, LIU Rui-qi, LEI Chao, LIU Yi-rui, ZHANG Jing-fang[△]

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

ABSTRACT Objective: Establish monoclonal SW620 cell lines stably expressing Cas9 to improve gene editing efficacy and provide cellular tools for CRISPR/Cas9-based high-throughput screening. **Methods:** We used Cas9 lentivirus to infect the SW620 cell line and used lethal doses of puromycin to screen the SW620 cell line for 5-7 days. The genomes of monoclonals were extracted for Sanger sequencing to detect the Cas9 fragment. We determined the editing activity of Cas9 in monoclonals by the single strand annealing (SSA) based luciferase reporter assay, and used the cell proliferation assay to determine whether Cas9 expression affected cell proliferation. **Results:** We obtained two monoclonals of SW620 expressing Cas9 and verified the Cas9 fragment by Sanger sequencing; the SSA based reporter assay showed high editing activity of Cas9; and the cell proliferation assay showed that Cas9 expression had little effect on the proliferation of SW620. **Conclusions:** In this study, we constructed a monoclonals of SW620 stably expressing Cas9 using lentiviral infection, thus providing a cellular tool for subsequent large-scale screening of genetic mutations associated with human colon cancer.

Key words: CRISPR/Cas9; Monoclonals; Lentivirus; SW620 cell lines

Chinese Library Classification (CLC): R-33; R735.3; Q78 **Document code:** A

Article ID:1673-6273(2023)06-1041-05

前言

成簇规律间隔的短回文重复序列 / 相关蛋白 9 (clustered regularly interspaced short palindromic repeat/CRISPR-associated protein9, CRISPR/Cas9) 系统是一项能对基因组特定位点进行精确编辑的技术^[1-4]。该系统由两部分组成,一部分是核酸内切酶 Cas9, 另一部分是长度 20 bp 左右的单链引导 RNA (guide RNA, gRNA)。通过设计识别基因组特定序列的 gRNA, 引导核酸内切酶 Cas9 对特定序列进行特异性切割, 即能实现定向的基因编辑^[5]。近年来, CRISPR/Cas9 技术迅速发展, 已被广泛运用于多个物种和包括高通量文库筛选在内的多个领域^[6]。与传

统的 RNAi 文库筛选相比, CRISPR/Cas9 文库筛选基于更彻底的基因敲除而非敲低, 且脱靶效率更低^[7,8]。2014 年, Shalem 等设计了首个靶向人类全基因组 18080 个基因的 CRISPR/Cas9 基因敲除文库 -GeCKO 文库, 并且在 A375 黑色素瘤细胞系中筛选出 BRAF 抑制剂维莫菲尼 (Vemurafenib) 的耐药基因^[9]。此后, 多个研究团队利用 CRISPR/Cas9 文库进行了肿瘤相关基因的筛选^[9-11]。

结肠癌 (colorectal cancer, CRC) 是世界上发病率较高的癌症之一^[12]。CRC 的发展是一个多步骤、多基因突变的过程, 表现为腺瘤性息肉逐步发展为不受控增殖和转移的恶性肿瘤; 随着时间的推移, 出现多个原癌基因的激活和抑癌基因的缺失^[13]。

* 基金项目: 北京中医药大学重点攻关项目 (2020-JYB-ZDGG-058)

作者简介: 王洁 (1994-), 女, 硕士研究生, 研究方向: CRISPR/Cas9 技术介导肿瘤细胞靶向自杀疗法, E-mail: jiewang913@126.com

[△] 通讯作者: 张竞方, 女, 博士, 副教授, 研究方向: 利用 CRISPR/Cas9 技术研究癌症致病机制和药物靶点发现,

E-mail: zhangjingfang@bucm.edu.cn

(收稿日期: 2022-10-23 接受日期: 2022-11-18)

对病人样本测序发现多个基因突变,如 KRAS、TP53、SMAD4、BRAF 等基因影响了肿瘤的转移和预后,这些基因与 CRC 的发展和转移密切相关,可能成为 CRC 潜在的治疗靶点和与转移相关的生物标志物^[14,15]。目前,利用 CRISPR/Cas9 文库在人结肠癌细胞系的筛选已经展开^[16,17]。在不久的将来,运用 CRISPR/Cas9 介导的高通量筛选将成为探索 CRC 相关致病基因以及进而寻找新的治疗靶点的有力工具。

现阶段,常利用慢病毒载体将 CRISPR/Cas9 筛选文库呈递到细胞中。慢病毒是以 HIV-1 为基础发展的一种载体,具有很高的感染效率,并且可以在细胞基因组中整合目的基因,从而实现目的基因长期稳定的表达。然而,由于 Cas9 蛋白长达 4kb,因此对于同时表达 Cas9 和 gRNA 的慢病毒载体,其病毒包装效率和感染效率在一定程度会受到影响。而先构建稳定表达 Cas9 的细胞株,再利用 gRNA 病毒文库感染该细胞株,能在一定程度上提高文库的筛选效率。本研究将 Cas9 基因通过慢病毒感染进入结肠癌细胞系 SW620 中,构建稳定表达 Cas9 蛋白的 SW620 单克隆细胞株,并通过基于单链退火(single strand annealing, SSA)修复荧光素酶的报告系统证实该单克隆细胞株可以实现高效的基因编辑,为之后利用 gRNA 文库筛选与结肠癌发生、发展相关的基因突变或耐药基因奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞系和质粒 人胚胎肾细胞系 HEK293T、人结肠癌细胞系 SW620 由本实验室保存;PGK-Cas9-P2A-puroR 由本实验室保存;TP53-sgRNA1、TP53-sgRNA2 由本实验室改造构建;pMD2.G (Addgene, plasmid ID 12259);psPAX2 (Addgene, plasmid ID 12260);precut pUCA(Luc)质粒(UCATM CRISPR/Cas9 快速构建及活性检测试剂盒)。

1.1.2 实验试剂 PEI(proteintech, B600070);快速质粒小提试剂盒(离心柱型)(TIANGEN, DP105-03);Puromycin (InvivoGen, ant-pr-1);Polybrene (Biosharp, BL628A);PacI (NEB, R0547S);ClaI (NEB, R0197S);RSAP (NEB, M0371S);BM2000+ Marker (BioMed, MD102-01);cck8 试剂(bimake, B34304);PCR lysis buffer(10 mM Tris-HCl, 2 mM EDTA, 2.5 % Tween-20, 2.5 % Triton-X 100, 100 µg/mL Proteinase K, PH = 8);Tris (amresco, 77-86-1);EDTA (Macklin, E809068);Tween-20(Sigma, P1379);Triton-X 100(Solarbio, T8200);荧光素酶反应液(18 µL LBB + 1 µL Luciferase)由本实验室配制;DMEM 高糖培养基(Gibco, C11995500BT);胎牛血清(Gibco, 10099141);PBS(Solarbio, P1010);引物合成及一代测序由北京六合华大基因科技有限公司完成。

1.1.3 实验仪器 琼脂糖凝胶电泳仪(北京六一生物有限公司, DYCP-31F);酶标仪(PerkinElmer);分光光度计(NanoDrop, 55625500);倒置光学显微镜(卡尔蔡司公司);凝胶成像仪及图像分析系统(Molecular Imagery ChemiDoc™ XRST, Bio-Rad 公司);PCR 仪(Thermofisher, ProFlex 3 x 32)。

1.2 方法

1.2.1 Cas9 慢病毒的包装及其滴度测定 采用 PEI 转染试剂进行细胞转染,需转染的质粒和 PEI 转染试剂的体积比为 1:

3,目的质粒 PGK-Cas9-P2A-puroR 和包装质粒 psPAX2、pMD2.G 的摩尔比为 8:6:3,将目的质粒、包装质粒和 PEI 转染试剂共同转染至 HEK293T 细胞中,包装成慢病毒。6-8 h 后换液,48 h 后收集细胞上清液,离心:10000 rpm, 10 min。之后用 0.45 µM 的滤膜过滤细胞碎片并分装于 1.5 mL EP 管中,存放于 -80℃ 冰箱备用。

采用抗生素抗性筛选法测定病毒的滴度。将状态良好的 HEK293T 细胞接种到 6 孔板中,每个孔接种 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 的 Cas9 慢病毒,并加入 8 µg/mL 的 Polybrene。在 32℃, 1000×g 离心 90 min 后放入 37℃ 培养箱中培养。24 h 后按照 5×10^5 个细胞/孔接种于两个新的 6 孔板中,标记为加抗生素组和不加抗生素组。加入 0.3 µg/mL 浓度的 puro,筛选 5-7 天后,puro 组 0 µL 孔细胞全部死亡,不加抗生素组中未感染病毒的细胞密度达到 70 %-80 %时,消化各孔进行计数。定义加抗生素组的细胞为"活细胞",不加抗生素组的细胞为"对照细胞"。病毒滴度计算公式为:滴度(IFU/mL) = (起始细胞数 × 活细胞数) ÷ (对照细胞数 × 毫升病毒体积)。

1.2.2 Cas9 单克隆细胞株的建立 将生长状态良好的 SW620 细胞按照 2×10^6 个细胞/孔接种到 6 孔板中,每孔加入 8 µg/mL 的 Polybrene 和 1 mL Cas9 慢病毒,32℃, 1000×g 离心 90 min,放入 37℃ 培养箱中培养 24 h,随后转移至 10 cm 培养皿中继续培养 24 h。病毒侵染 48 h 后加入致死剂量的 puro 1 µg/mL,同时用未侵染病毒的 SW620 细胞作为对照,加入同样剂量的 puro,待对照细胞全部死亡后,初步筛出阳性细胞。对阳性细胞进行计数,按照有限稀释法将细胞铺于 96 孔板中,第二天在显微镜下标记单克隆细胞孔,培养过程中时刻观察细胞生长情况,标记生长状态良好的单克隆细胞株,5 天左右换液继续培养,两周后转移至 12 孔板中,待细胞密度达到 75 %-85 %时,一半细胞裂解提取细胞 DNA 进行 PCR 和测序,一半细胞转移到 6 孔板中继续培养。经测序鉴定后,将成功整合 Cas9 基因的单克隆细胞扩增培养,冻存后放液氮中保存。

1.2.3 Cas9 单克隆细胞的鉴定 用细胞裂解液裂解 12 孔板中部分单克隆细胞,提取细胞基因组进行后续实验。裂解条件: $1.5-2 \times 10^5$ 个细胞/200 µL 细胞裂解液,在 37℃ 培养箱中放置 20 min,随后 50℃ 水浴 60 min, 95℃ 水浴 15 min。使用 APE 软件在 Cas9 基因序列上设计一对引物:引物长度设定在 20-25 bp 之间, Tm 值 = 55-65℃, GC 含量 = 50-60 %,避免重复碱基,且 3' 端最后 5 个碱基少于 2 个 G/C。根据以上条件分别选取了一条正向引物和一条反向引物:Cas9-F1/R1,能扩增至 258 bp 的条带,引物序列如表 1 所示。扩增条件:95℃ 变性 5 min; 95℃ 解链 30 s, 58℃ 复性 30 s, 72℃ 延伸 35 s, 以上步骤重复 35 个循环; 72℃ 10 min, 扩增体系见表 2。取 3-5 µL PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳检测。取裂解后的细胞液送 Sanger 测序,进一步验证是否含有 Cas9 基因序列。

1.2.4 Cas9 活性检测 利用基于 SSA 修复荧光素酶的 UCATM 报告系统法检测 Cas9 的切割活性。通过 CRISPR 靶点设计网站(<http://crispr.mit.edu/>)在 TP53 基因外显子区域选取了 2 条评分较高的 sgRNA 序列,构建 sgRNA 质粒和相应的 pLUC 报告质粒。TP53 sgRNA 序列如表 3 所示。

表 1 扩增 Cas9 片段的引物

Table 1 Primers for amplification of Cas9 fragment

Name	Sequence
Cas9-F1	5'-GGACATCGGCACCAACTCTG-3'
Cas9-R1	5'-GAACAGCTTGTCCACGTCGC-3'

表 2 Cas9 基因片段 PCR 扩增体系

Table 2 PCR amplification system of Cas9 fragment

Component	Quantity(μL)
Template	2.0
ddH ₂ O	31
High-fidelity KOD enzyme	1.0
Cas9-F(10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	1.5
Cas9-R(10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	1.5
dNTP	5.0
MgSO ₄	3.0
KOD Buffer (10 $\times$)	5
Total	50

将生长状态良好的 SW620-Cas9 单克隆细胞接种到 12 孔板中,每孔接种 1×10^5 个细胞。待细胞生长到 80 %左右时,将 sgRNA 质粒和相应的 pLUC 质粒按照 1000 μg /孔瞬时转染

SW620-Cas9 单克隆细胞株,6 h 后换液,48 h 后吸取 200 μL 上清液转移到底部透明的黑色 96 孔板中,每孔 30 μL 。加入荧光素酶反应液后迅速放入酶标仪中读取数值。

表 3 TP53 sgRNA 序列

Table 3 TP53 sgRNA sequences

Name	Sequence
TP53-sgRNA1	5'-TCGACGCTAGGATCTGACTG-3'
TP53-sgRNA2	5'-GGCAGCTACGGTTCCGTCT-3'

1.2.5 细胞增殖活性检测 将 SW620-Cas9 单克隆细胞和 SW620 细胞充分消化并计数,计数后将细胞接种到 96 孔板中, 1×10^4 个细胞/孔,每组设置 6 个复孔,培养 48 小时后,更换含 10 % cck8 试剂的培养基,100 μL /孔,37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱孵育 2-3 小时后测定 OD_{450nm} 值。

1.3 统计学分析

采用 GraphPad Prism 8.0.1 对实验数据进行统计学分析,统计结果均采用平均值 $\pm$ 标准差(mean $\pm$ SD)的方式表示。采用独立样本 t 检验对两组间差异性进行分析, $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 SW620-Cas9 单克隆细胞株的构建及鉴定

为了获得表达 Cas9 蛋白的 SW620 单克隆细胞株,我们用 PGK-Cas9-P2A-puroR 慢病毒侵染 SW620 细胞系。慢病毒的滴度用抗性筛选法测定,重复三次后取平均值,最终滴度为 1.6×10^7 TU/mL,说明病毒滴度较高,可以用于后续实验。Cas9 慢病毒侵染 SW620 细胞系后,用致死剂量的 puro 筛选 2 天,待对照组细胞全部死亡后,用同样剂量的 puro 继续筛选 2 天。将初

步筛出阳性细胞按照有限稀释法铺于 96 孔板中,使得每孔的细胞数量小于或等于 1 个。在显微镜下标记单克隆细胞株。培养两周后,选取生长状态较好的单克隆细胞株转移至 12 孔板中继续培养。待细胞密度达到 75 -85 %时,取一半细胞转移到 6 孔板中继续培养,另一半细胞则裂解并提取基因组 DNA,进行 PCR 和琼脂糖凝胶电泳。结果如图 1 所示,在随机挑选的 5 株单克隆中有 2 株出现了目的条带,说明这 2 株单克隆细胞株中整合了 Cas9 基因。为了进一步验证 Cas9 目的基因的整合,将这 2 个细胞株的基因组用引物 Cas9-F1 进行测序,测序结果显示 2 个细胞株确实整合了 Cas9 基因序列。将这 2 个稳定表达 Cas9 蛋白的细胞株分别命名为 SW620-Cas9-4 和 SW620-Cas9-5。

2.2 SW620-Cas9 单克隆细胞株的 Cas9 活性检测

为了验证我们构建的两个 SW620-Cas9 单克隆细胞株能表达有功能的 Cas9 蛋白,我们采用了基于 SSA 修复荧光素酶的报告系统 UCATM 检测 Cas9 的切割活性。除了使用已经验证过活性的 sgRNA 质粒和相应的 pLUC 报告质粒作为阳性对照,我们还构建了两个靶向基因组 TP53 的 sgRNA 质粒和相应的 pLUC 报告质粒。将三组质粒分别瞬转 SW620-Cas9-4 和 -5

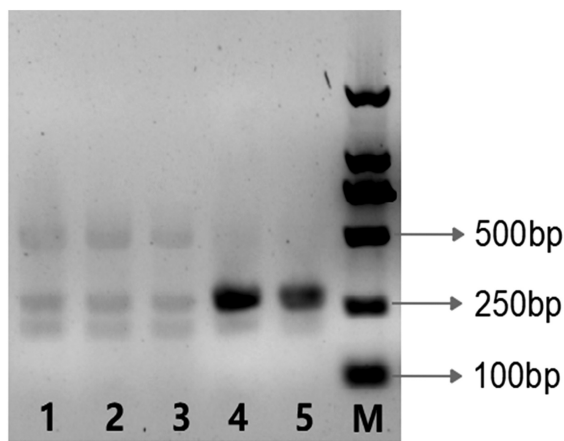


图 1 Cas9 基因片段

Fig. 1 Cas9 fragment

Note: 1-5: Cas9 fragments from monoclonal cell lines; M: Marker

两个细胞株以及 SW620, 使用无关 sgRNA 作为阴性对照, 48 h 后检测荧光素酶读值。结果如图 2 所示, SW620-Cas9-4 和 SW620-Cas9-5 两组的荧光素酶活性均高于阴性对照组, 而 SW620 细胞株则不显示荧光素酶活性, 这说明构建的两个 SW620-Cas9 细胞株均可正常表达具有切割活性的 Cas9 蛋白。且从靶向 TP53 基因的荧光素酶结果可以看出, TP53-sgRNA1 的荧光素酶活性较高, 说明在稳定表达 Cas9 的细胞系中, 可以检测出打靶相同基因的不同 sgRNA 的活性, 为筛选高活性的 sgRNA 提供了便利。

2.3 SW620-Cas9 单克隆细胞株的增殖活性检测

为了检测 Cas9 蛋白的表达是否影响 SW620 的增殖活性, 我们将相同数量的 SW620-Cas9-4, SW620-Cas9-5 和 SW620 细胞培养 48 小时后, 采用 cck8 试剂检测细胞增殖活性。结果如图 3 显示, 在相同培养条件下, SW620-Cas9-4 和 SW620-Cas9-5 的细胞数量与 SW620 相差无几, 说明 Cas9 蛋白在细胞中的稳定表达不影响 SW620 细胞正常的增殖活性。

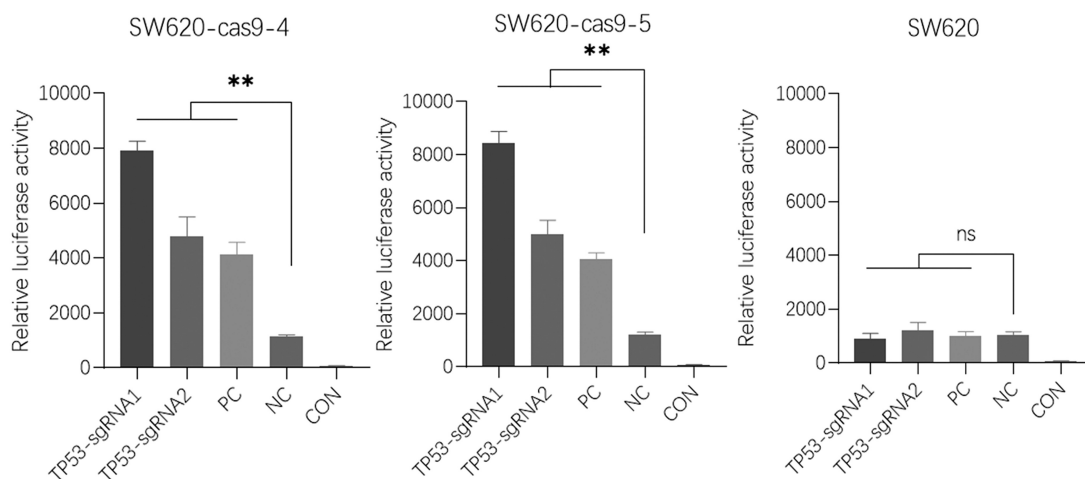


图 2 基于 SSA 修复荧光素酶报告系统检测 Cas9 的切割活性

Fig. 2 Detection of the cleavage activity of Cas9 based on SSA based luciferase reporter assay

Note: PC: positive control, NC: negative control,

CON: blank control, n = 6.

** $P < 0.01$.

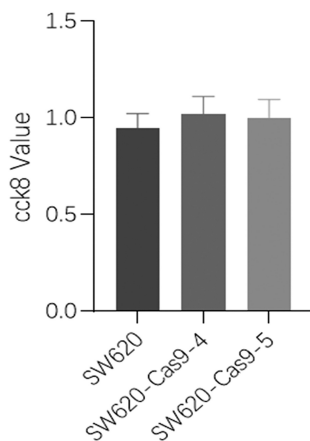


图 3 Cas9 蛋白的表达对细胞增殖活性的影响

Fig. 3 Effect of Cas9 expression on cell proliferation

Note: SW620: SW620 blank cell line, SW620-Cas9-4, -5: SW620-Cas9 monoclonal cell lines, n=6

3 讨论

人类全基因组的成功测序为研究基因功能提供了有力图谱, 而进一步破解基因的功能, 可以通过影响基因的正常表达并分析相关表型来实现^[18]。基因编辑技术是一项能对基因组特定位点进行精确修饰的技术, 通过调控基因组的表达, 可以更好地理解和探索特定基因的功能。随着基因编辑技术的发展, CRISPR/Cas9 技术以其高效率和高精度的特点, 广泛应用于基因治疗、遗传修饰等方面。CRISPR/Cas9 属于 II 型 CRISPR/Cas 系统, 只需要 gRNA 引导 Cas9 蛋白即可实现特定基因的识别和切割^[9]。其中, 基于 CRISPR/Cas9 系统的 gRNA 文库筛选可以同时靶向多个基因组的多个位点, 产生双等位基因或多基因的突变^[20, 21], 使得大规模筛选功能基因变得高效、快捷。gRNA 文库筛选的效率在一定程度上受 Cas9 蛋白表达的影响, Cas9 蛋白在细胞系中稳定表达能够提高基因的敲除效率, 并且

Cas9 的过表达不会对敲除效率产生反作用^[22],这一结论为本研究构建稳定表达 Cas9 的细胞系提供了思路。

多项研究证明运用 CRISPR/Cas9 技术介导的高通量文库筛选,是探索结肠癌发生、发展相关基因,以及进一步开发基因治疗靶点的重要方式^[23,24]。目前,利用 CRISPR/Cas9 文库在人结肠癌细胞系 HT29、HCT116 中已经筛选出与癌细胞增殖相关的基因^[16,17,25]。但在 SW620 细胞系中的研究相对较少,本研究为 CRISPR/Cas9 文库在 SW620 细胞系中的高效筛选提供了工具。

慢病毒能够将外源基因高效地整合到细胞基因组中,在细胞基因组中实现稳定表达。通过慢病毒构建稳定表达 Cas9 蛋白的结肠癌细胞株,可以更好地提高文库筛选效率。本研究正是利用这一特点,将 Cas9 载体包装成慢病毒后,感染人结肠癌细胞系 SW620,通过 puro 筛选和有限稀释法得到单克隆细胞株,运用 PCR 和一代测序的方式筛选出稳定表达 Cas9 的单克隆细胞株 SW620-Cas9-4 和 SW620-Cas9-5;随后采用基于 SSA 修复荧光素酶的报告系统对 Cas9 蛋白的切割活性进行了验证;最后验证了细胞株的增殖活性不受 Cas9 蛋白的影响。

综上所述,本研究成功构建了稳定表达 Cas9 蛋白的 SW620 细胞株,初步验证了该细胞株具有基因编辑功能且增殖能力和正常的 SW620 细胞株无差别。该细胞株理论上可用于筛选与结直肠癌发生发展相关的基因,为筛选诱发结肠癌的基因和分子致病机制提供研究基础。

参考文献(References)

- [1] Charpentier E, Doudna J A. Biotechnology: Rewriting a genome[J]. Nature, 2013, 495(7439): 50-1
- [2] Mali P, Yang L, Esvelt K M, et al. RNA-guided human genome engineering via Cas9[J]. Science, 2013, 339(6121): 823-6
- [3] Ran F A, Hsu P D, Wright J, et al. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system[J]. Nat Protoc, 2013, 8(11): 2281-308
- [4] Ran F A, Hsu P D, Lin C Y, et al. Double nicking by RNA-guided CRISPR Cas9 for enhanced genome editing specificity[J]. Cell, 2013, 154(6): 1380-9
- [5] Fu Y, Sander J D, Reyon D, et al. Improving CRISPR-Cas nuclease specificity using truncated guide RNAs [J]. Nat Biotechnol, 2014, 32(3): 279-84
- [6] Knott G J, Doudna J A. CRISPR-Cas guides the future of genetic engineering[J]. Science (New York, NY), 2018, 361(6405): 866-9
- [7] Zhou Y, Zhu S, Cai C, et al. High-throughput screening of a CRISPR/Cas9 library for functional genomics in human cells [J]. Nature, 2014, 509(7501): 487-91
- [8] Shalem O, Sanjana N E, Hartenian E, et al. Genome-scale CRISPR-Cas9 knockout screening in human cells [J]. Science (New York, NY), 2014, 343(6166): 84-7
- [9] Yuan Y, Liu Y, Wu Y, et al. Clinical characteristics and prognostic value of the KRAS mutation in Chinese colorectal cancer patients[J]. Int J Biol Markers, 2021, 36(2): 33-9
- [10] Shen J P, Zhao D, Sasik R, et al. Combinatorial CRISPR-Cas9 screens for de novo mapping of genetic interactions[J]. Nature methods, 2017, 14(6): 573-6
- [11] Steinhart Z, Pavlovic Z, Chandrashekhar M, et al. Genome-wide CRISPR screens reveal a Wnt-FZD5 signaling circuit as a druggable vulnerability of RNF43-mutant pancreatic tumors [J]. Nature medicine, 2017, 23(1): 60-8
- [12] He C, Han S, Chang Y, et al. CRISPR screen in cancer: status quo and future perspectives[J]. Am J Cancer Res, 2021, 11(4): 1031-1050
- [13] Tiwari A, Saraf S, Verma A, et al. Novel targeting approaches and signaling pathways of colorectal cancer: An insight [J]. World J Gastroenterol, 2018, 24(39): 4428-35
- [14] Ye Z L, Qiu M Z, Tang T, et al. Gene mutation profiling in Chinese colorectal cancer patients and its association with clinicopathological characteristics and prognosis[J]. Cancer Med, 2020, 9(2): 745-56
- [15] Huang D, Sun W, Zhou Y, et al. Mutations of key driver genes in colorectal cancer progression and metastasis [J]. Cancer Metastasis Rev, 2018, 37(1): 173-87
- [16] 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
- [17] Hart T, Chandrashekhar M, Aregger M, et al. High-Resolution CRISPR Screens Reveal Fitness Genes and Genotype-Specific Cancer Liabilities[J]. Cell, 2015, 163(6): 1515-26
- [18] Boettcher M, McManus MT. Choosing the Right Tool for the Job: RNAi, TALEN, or CRISPR[J]. Mol Cell, 2015, 58(4): 575-85
- [19] Sachse C, Krausz E, KRönKE A, et al. High-throughput RNA interference strategies for target discovery and validation by using synthetic short interfering RNAs: functional genomics investigations of biological pathways [J]. Methods in enzymology, 2005, 392: 242-277
- [20] Cong L, Ran FA, Cox D, et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems[J]. Science, 2013, 339(6121): 819-23
- [21] Wang H, Yang H, Shivalila CS, et al. One-step generation of mice carrying mutations in multiple genes by CRISPR/Cas-mediated genome engineering[J]. Cell, 2013, 153(4): 910-918
- [22] 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]. Nat Biotechnol, 2014, 32(3): 267-73
- [23] Michels BE, Mosa MH, Streibl BI, et al. Pooled In Vitro and In Vivo CRISPR-Cas9 Screening Identifies Tumor Suppressors in Human Colon Organoids[J]. Cell Stem Cell, 2020, 26(5): 782-792
- [24] Xie C, Li K, Li Y, et al. CRISPR-based knockout screening identifies the loss of MIEF2 to enhance oxaliplatin resistance in colorectal cancer through inhibiting the mitochondrial apoptosis pathway [J]. Front Oncol, 2022, 12: 881487
- [25] Yau EH, Kummetha IR, Lichinchi G, et al. Genome-Wide CRISPR Screen for Essential Cell Growth Mediators in Mutant KRAS Colorectal Cancers[J]. Cancer Res, 2017, 77(22): 6330-6339