

# 应用 CRISPR/Cas 9 系统构建肺癌细胞系获得 AMPK $\alpha$ 1 基因敲除的稳定细胞株

黄小琴<sup>1, 2a, 2b</sup>, 涂名进<sup>3</sup>, 余华军<sup>2a, 2b</sup>, 贾玉芳<sup>1, 2a, 2b</sup>, 严秀文<sup>1, 2a, 2b</sup>, 汤喜莲<sup>1, 2a, 2b</sup>, 郑健<sup>1, 2a, 2b</sup>,  
何柳燕<sup>3</sup>, 伍俊<sup>2a, 3</sup>, 张海涛<sup>1, 2a, 2b</sup>

(1. 广东医科大学医学技术学院, 广东东莞 523000; 2. 广东医科大学 a. 多肽和蛋白质研究与应用重点实验室; b. 生物化学与分子生物学系, 广东湛江 524023; 3. 广东医科大学附属医院呼吸内科, 广东湛江 524023)

**摘要:** 目的 利用 CRISPR/Cas 9 系统在人肺癌细胞系 A549 和 H460 中获得敲除腺苷单磷酸活化蛋白激酶  $\alpha$  1 (adenosine monophosphate-activated protein kinase, AMPK  $\alpha$  1) 的稳定表达细胞系。方法 根据 CRISPR/Cas 9 靶点设计原则, 设计三条引导 RNA (sgRNA), 分别构建 AMPK  $\alpha$  1-CRISPR/Cas9 KO 及其 HDR 质粒。将质粒转染至 A549 和 H460 细胞后, 筛选稳定的单克隆细胞株。用 Western blot 鉴定筛选获得的肺癌细胞株是否表达 AMPK  $\alpha$  1。实验被分为原始对照组和敲除组, 采用 MTT 法检测 AMPK  $\alpha$  1 的肺癌细胞增殖情况。结果 经过 CRISPR/Cas 9 系统处理后, 筛选获得的 A549 和 H460 敲除 AMPK  $\alpha$  1 稳定细胞株与原始细胞株 A549 和 H460 相比, Western blot 检测不到 AMPK  $\alpha$  1 蛋白质的表达, 差异具有统计学意义 ( $t=137.7, 79.17$ , 均  $P < 0.000 1$ )。MTT 结果显示, 筛选获得的 A549 和 H460 敲除 AMPK  $\alpha$  1 的稳定细胞株与原始细胞株 A549 和 H460 相比, 敲除细胞株的增殖速度明显减弱, 差异具有统计学意义 ( $t=3.956 \sim 28.16$ , 均  $P < 0.05$ )。结论 CRISPR/Cas 9 系统成功建立敲除 AMPK  $\alpha$  1 表达的稳定肺癌细胞株, 为进一步研究 AMPK  $\alpha$  1 在肺癌发生发展中的作用提供细胞模型。

**关键词:** CRISPR/Cas 9; 肺癌; 腺苷单磷酸活化蛋白激酶  $\alpha$  1

**中图分类号:** R734.2; R730.43 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-7414 (2023) 01-107-05

**doi:** 10.3969/j.issn.1671-7414.2023.01.020

## Application of CRISPR/Cas 9 System to Construct Lung Cancer Cell Lines to Obtain Stable Cell Lines with AMPK $\alpha$ 1 Knockdown

HUANG Xiao-qin<sup>1, 2a, 2b</sup>, TU Ming-jin<sup>3</sup>, YU Hua-jun<sup>2a, 2b</sup>, JIA Yu-fang<sup>1, 2a, 2b</sup>, YAN Xiu-wen<sup>1, 2a, 2b</sup>,  
TANG Xi-lian<sup>1, 2a, 2b</sup>, ZHENG Jian<sup>1, 2a, 2b</sup>, HE Liu-yan<sup>3</sup>, WU Jun<sup>2a, 3</sup>, ZHANG Hai-tao<sup>1, 2a, 2b</sup>

(1. School of Medical Technology, Guangdong Medical University, Guangdong Dongguan 523000, China; 2a. Peptide and Protein Research and Application Key Laboratory; 2b. Department of Biochemistry and Molecular Biology, Guangdong Medical University, Guangdong Zhanjiang 524023, China; 3. Department of Respiratory Medicine, Affiliated Hospital of Guangdong Medical University, Guangdong Zhanjiang 524023, China)

**Abstract: Objective** To construct stably lung cancer cell lines that did not express adenosine monophosphate-activated protein kinase  $\alpha$  1 (AMPK  $\alpha$  1) using CRISPR/Cas 9 system. **Methods** According to the CRISPR/Cas 9 target design principle, three small guide RNA (sgRNAs) were designed to construct AMPK  $\alpha$  1-CRISPR/Cas 9 KO and its HDR plasmid, respectively. After the plasmids were transfected into A549 and H460 cells, stable monoclonal cell lines were selected. The expression of AMPK  $\alpha$  1 was detected in stable monoclonal cell lines by Western blot. The experiments were divided into original control and knockout groups, MTT assay was used to detect the proliferation of AMPK  $\alpha$  1 knockout lung cancer cells. **Results** After treatment with the CRISPR/Cas 9 system, the knockdown AMPK  $\alpha$  1 stable cell lines obtained from the screening were undetectable by Western blot for AMPK  $\alpha$  1 protein expression compared with the original cell lines A549 and H460, and the differences were statistically significant ( $t=137.7, 79.17$ , all  $P < 0.000 1$ ). The MTT results showed that the proliferation rate of knockdown cell lines obtained from the screened stable cell lines of A549 and H460 knockdown AMPK  $\alpha$  1 was significantly weaker compared with the original cell lines A549 and H460, and the differences were statistically significant ( $t=3.956 \sim 28.16$ , all  $P < 0.05$ ).

**基金项目:** 广东医科大学学科建设项目 (4SG21012G): 麒麟菜多肽为有效成分研制防治 IPF 药物的前期研究。

**作者简介:** 黄小琴 (1996-), 女, 硕士, 检验技师, 主要从事生化检验, E-mail: huangxiaojin2333@163.com。

**通讯作者:** 伍俊 (1973-), 女, 博士, 主任医师, 主要从事呼吸疾病研究, E-mail: wujun0294@163.com。

张海涛 (1970-), 男, 博士, 教授, 主要从事肿瘤标志物研究, E-mail: taohaizhang@163.com。

**Conclusion** The stable lung cancer cell lines with no expression of AMPK  $\alpha$  1 were established by using CRISPR/Cas 9 system. It provides a cellular model for further studies on the role of AMPK  $\alpha$  1 in lung carcinogenesis and development.

**Keywords:** CRISPR/Cas 9; lung cancer; adenosine monophosphate -activated protein kinase  $\alpha$  1

肺癌占有新诊断癌症的13%以上,其中非小细胞肺癌占有肺癌的近85%。由于非小细胞肺癌现有治疗方法效果有限,其预后远不能令人满意<sup>[1-2]</sup>。因此迫切需要找到治疗肺癌的一个新突破口。腺苷单磷酸活化蛋白激酶 $\alpha$ 1(adenosine monophosphate -activated protein kinase  $\alpha$  1, AMPK  $\alpha$  1)是一种蛋白激酶,在能量代谢、癌症转移中发挥重要作用。BioPortal数据库显示,编码LKB1的STK11基因突变或删除的同一癌症基因组研究中,编码AMPK  $\alpha$  1的PRKAA1基因往往被扩增,最高的频率(10%~15%)发生在肺腺癌中<sup>[3]</sup>。研究表明AMPK  $\alpha$  1在非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)肿瘤组织中的表达水平明显高于癌旁非肿瘤肺组织,且与不良预后相关<sup>[4]</sup>。KIM等<sup>[5]</sup>人发现AMPK  $\alpha$  1可以通过调节自噬诱导来调节肺腺癌细胞的迁移和侵袭。但AMPK  $\alpha$  1在肺癌中的功能尚不完全清晰。建立稳定缺失AMPK  $\alpha$  1表达的肺癌细胞株是研究AMPK  $\alpha$  1在肺癌中功能的前提。Clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR)及其相关蛋白(CRISPR-associated protein 9, Cas 9)是一种高效、准确的基因组编辑工具。Cas 9通过引导RNA (sgRNA)与靶基因结合,在预先指定的基因组位点产生DNA双链断裂(DSB),瞬时激活内源性DNA修复机制<sup>[6]</sup>。相比于早期使用RNAi的修饰效率低下、脱靶严重以及仅限于转录而言, Cas9和sgRNA联合介导的筛选可提供更高的筛选敏感性和专一性,并可设计为靶向几乎任何DNA序列<sup>[7]</sup>。因此本文拟采用CRISPR/Cas 9技术,对A549和H460两株细胞进行基因编辑获得AMPK  $\alpha$  1基因敲除的稳定细胞株,为后续深入研究肺癌中AMPK  $\alpha$  1的生物学作用和功能提供研究细胞。

## 1 材料和方法

1.1 细胞株来源 人肺癌A549细胞和H460细胞均来源于美国标准培养收集所(ATCC, 美国)。

1.2 仪器与试剂 AMPK  $\alpha$  1-CRISPR/Cas 9 KO以及HDR质粒(Santa Cruz, sc-400104/sc-400104-HDR); 1640培养液和胎牛血清(proccll); 蛋白裂解液(碧云天)和BCA蛋白定量试剂盒(鼎国昌盛); GAPDH, HRP标记二抗和兔抗人AMPK  $\alpha$  1一抗(abcam ab32047); Lipofectamine 3000转染试剂盒(Invitrogen); 转膜仪及垂直电泳系统(Bio-Rad)。

## 1.3 方法

1.3.1 细胞培养: A549和H460用含10g/dl FBS,  $1 \times 10^5$  U/L青霉素和100 U/ml链霉素的1640培养液培养,接种于10 cm培养皿,置于37℃ 5ml/dl CO<sub>2</sub>饱和湿度条件下培养,取对数生长期细胞用于相关实验。

1.3.2 gRNA靶点及寡核苷酸序列: CRISPR/Cas9质粒的AMPK  $\alpha$  1-sgRNA位点分别为40777528, 40767471和40767685。寡核苷酸序列分别为5'-TACTCAATCGACAGAAGATT-3', 5'-GGGCCAC AATCAAAGATATC-3'和5'-TCCTGTTACAGATTG TATGC-3'。

1.3.3 CRISPR/Cas9质粒转染: 取对数生长期的A549和H460细胞接种于12孔板,待细胞密度为70%~80%时更换无血清培养液。根据Lipofectamine 3 000说明书将 $1 \times 10^{-6}$ g混合质粒分别转至A549和H460细胞。转染24 h后荧光显微镜下观察转染情况。

1.3.4 单克隆细胞株单克隆筛选:

1.3.4.1 确定嘌呤霉素筛选浓度: 取对数生长期的A549和H460细胞以 $6.5 \times 10^4$ 接种于24孔板,向孔中加入含0.8, 1.0, 1.2, 1.4, 1.6, 1.8和2.0 mg/L嘌呤霉素的10g/dl FBS 1640细胞培养液,培养72 h,显微镜下观察最小致死的嘌呤霉素浓度。

1.3.4.2 稳定细胞株的单克隆筛选: 选取上述转染后各组细胞状态良好时,加入相应的含最低浓度的嘌呤霉素选择性培养基,培养4~5天后可杀死100%未转染细胞。撤去含嘌呤霉素的培养基,待A549和H460细胞长到一定密度,利用有限稀释法进行96孔板单细胞筛选。

1.3.5 Western blot: 将单克隆筛选后的A549和H460敲除AMPK  $\alpha$  1稳定细胞株和正常A549和H460细胞用RIPA裂解蛋白,BCA法测定蛋白浓度。蛋白变性后进行十二烷基硫酸钠(sodiumdodecyl-sulfate, SDS)-聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE),并110V电转湿转到聚偏氟乙烯膜。用封闭缓冲液封闭膜1~2 h,在4℃下与AMPK  $\alpha$  1(abcam, 英国, 1:500), GAPDH(细胞信号技术公司, 美国, 1:1 000)等特异性抗体孵育过夜,与相应的抗兔HRP-标记IgG室温下孵育1h。显影检测蛋白表达。

1.3.6 细胞增殖试验: 2.7.3-(4, 5-二甲基噻唑-2-基)-2, 5-二苯基溴化四唑(MTT)用于测量细胞增殖。以1 000个细胞/孔的初始密度接种于96孔板。在不同的时间点(0, 24, 48或72 h)使用0.000 5 mg/L MTT溶液(sigma, MO, U S A)评估细胞活

力。取4 h后,用150  $\mu$ l 二甲基亚砜(DMSO, Sigma, 美国)替换,涡旋10 min。用酶标仪测定在490nm处的吸光度( $A$ )。

1.4 统计学分析 数据统计、分析和绘图采用Graphpad prism 8。两组间比较采用独立样本 $t$ 检验。每个实验组重复3次。以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

## 2 结果

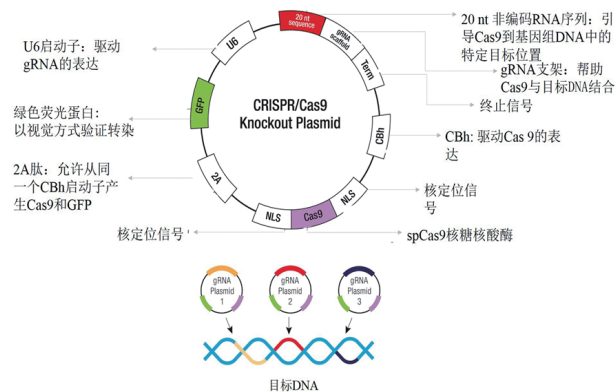


图1 AMPK  $\alpha$  1-CRISPR/Cas9 KO 及其 HDR 质粒图谱

2.2 AMPK  $\alpha$  1-CRISPR/Cas9 KO 及其 HDR 质粒荧光效率 见图2。A549 转染 AMPK  $\alpha$  1-CRISPR/Cas9 KO 及其 HDR 质粒和 H460 转染 AMPK  $\alpha$  1-CRISPR/Cas9 KO 及其 HDR 质粒后荧光效率分别可

2.1 AMPK  $\alpha$  1-CRISPR/Cas9 KO 及其 HDR 的质粒图谱 见图1。AMPK  $\alpha$  1-CRISPR/Cas9 KO 是由带有绿色荧光的20nt非编码RNA序列组成。设计的3个gRNA引导敲除质粒结合于目标DNA。HDR质粒是带有2个loxP(34 bp)重组位点和嘌呤霉素抗性基因的修复质粒。HDR质粒可在敲除质粒移除目标基因后插入由两个LoxP位点组成的嘌呤霉素选择标记。

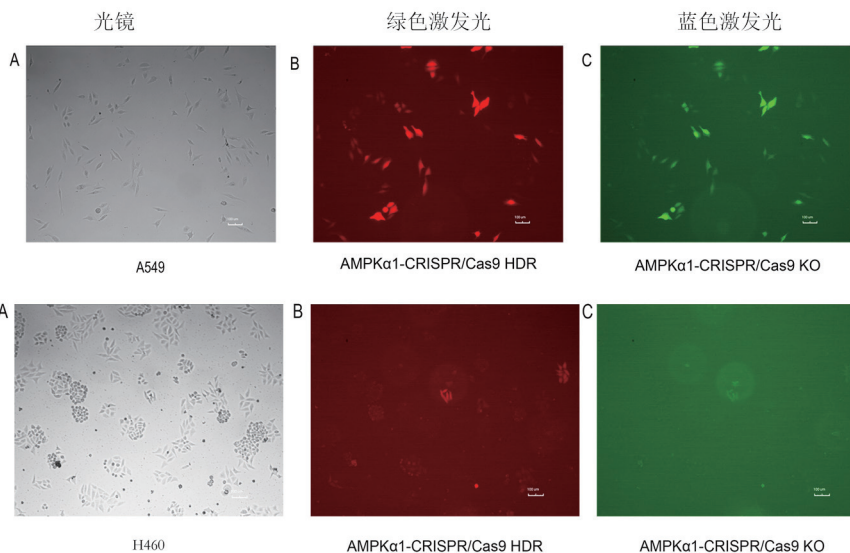
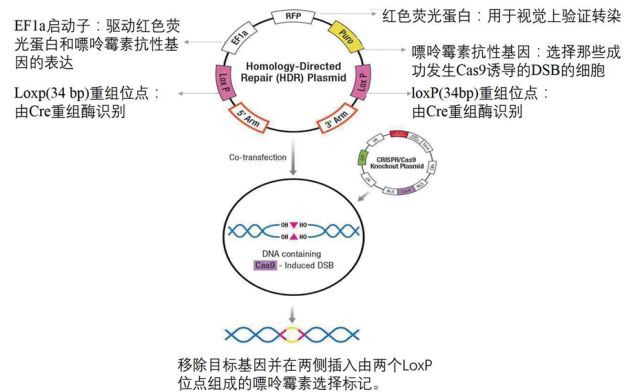


图2 AMPK  $\alpha$  1-CRISPR/Cas9 KO 及其 HDR 质粒荧光图

2.3 免疫印迹法检测细胞株内 AMPK  $\alpha$  1 蛋白表达 Western blotting 检测细胞株 AMPK  $\alpha$  1 蛋白表达水平。A549 敲除 AMPK  $\alpha$  1 细胞与对照组 A549 细胞相比,检测不到 AMPK  $\alpha$  1 水平,差异具有统计学意义( $t=137.7, P < 0.0001$ ) (见图3A, 3C)。H460 敲除 AMPK  $\alpha$  1 细胞与对照组 H460 细胞相比,检测不到 AMPK  $\alpha$  1 水平,差异具有统计学意义( $t=79.17, P < 0.0001$ ) (见图3B, 3C)。

2.4 细胞增殖试验 见图4。MTT 结果显示,敲除 AMPK  $\alpha$  1 的 A549 和 H460 细胞株的增殖速度慢于原始对照株,差异具有统计学意义( $t=3.956 \sim 28.16$ , 均 $P < 0.05$ )。

## 3 讨论

AMPK  $\alpha$  1 参与各种代谢途径,与肺癌的发生发展有密切关系。AMPK  $\alpha$  1 可与 TBC1D1 结合参与调控葡萄糖转运蛋白4型(glucose trans-



porter-4, GLUT4) 易位, 这与葡萄糖摄入密切相关<sup>[8]</sup>。AMPK  $\alpha$  1 是糖酵解主要调节因子之一<sup>[9]</sup>, AMPK  $\alpha$  1 也参与蛋白质代谢和自噬<sup>[10]</sup>, AMPK  $\alpha$  1 还在衰老表型甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 的核转移

中起关键作用<sup>[11]</sup>。GAPDH 是一种关键的糖酵解酶, 与年龄相关疾病密切相关, 如阿尔茨海默病和帕金森病<sup>[12-13]</sup>。AMPK  $\alpha$  1 还与褐色脂肪细胞形成呈正相关, 参与脂质代谢<sup>[14]</sup>。

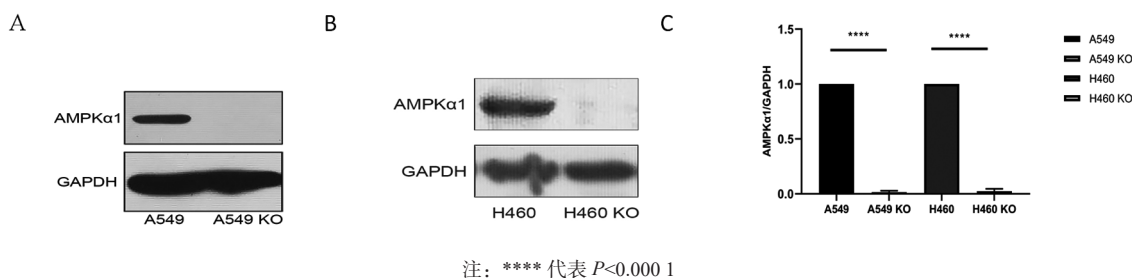


图3 western blot 检测 AMPK  $\alpha$  1 蛋白

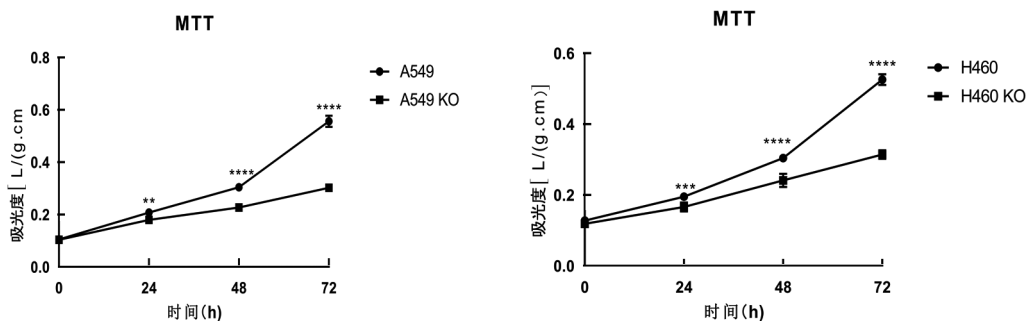


图4 MTT 细胞增殖

EICHNER 等<sup>[15]</sup>的研究指出 AMPK 通过诱导溶酶体支持 (KrasG12D) 依赖性肺癌的生长, 特别是在肿瘤发生的早期阶段。GONG 等<sup>[16]</sup>人的研究表明 AMPK  $\alpha$  1 过表达促进肺癌细胞增殖, 调节硫氧化蛋白 (thioredoxin, Trx) 表达, 下调活性氧水平, 抑制细胞凋亡。Trx 是一种抗氧化蛋白, 在 NSCLC 中高表达。MTT 实验结果显示 AMPK  $\alpha$  1 促进肺癌细胞生长。这与历史研究结果一致。AMPK  $\alpha$  1 可以作为肺癌的一个潜在靶点, 为肺癌的治疗提供思路。

CRISPR/Cas9 技术是一种相对简单、准确、高效的研究细菌的工具。CRISPR/Cas 9 基因组编辑系统彻底改变了操纵、检测和记录几种物种细胞中特定 DNA 和 RNA 序列的能力<sup>[17]</sup>。几种类型的 CRISPR 相关 (Cas) 蛋白已经确定, 每一种都有不同的功能; CRISPR/Cas 系统可以分为六种类型。第二类系统在 Cas9 蛋白的帮助下精确地编辑遗传 DNA。II 型 CRISPR/Cas9 系统是目前主要的蛋白质在基因组编辑中使用。这项技术在全球各地被广泛使用<sup>[18]</sup>。指导 RNA (gRNA) 和 Cas9 蛋白是 CRISPR/Cas 9 系统的两个重要组成部分。设计的 sgRNA 通过识别互补碱基对达到靶向切割目标序列的目的<sup>[19]</sup>。本实验设计的三条 sgRNA 位于外显子

区域, GC 含量大于 40%, 且无 4 个以上的 T 结尾, 符合 sgRNA 设计标准。

CRISPR/Cas9 技术在肺癌的应用相当普遍。GAO 等<sup>[20]</sup>人利用 CRISPR/Cas9 技术证明, 选择性靶向 KRAS 致癌突变等位基因可有效抑制 HEK293T, S549 和 H228 癌细胞系的肿瘤细胞发育。WANG 等<sup>[21]</sup>人使用 CRISPR/Cas9 基因组编辑技术在人肺腺癌细胞系 A549 和 H1299 中敲除纤维蛋白原  $\alpha$  (fibrinogen alpha, FGA) 并且敲除 FGA 促进肺腺癌细胞生长。因此本实验采用 CRISPR/Cas9 技术去选择性敲除肺癌细胞的 AMPK  $\alpha$  1, 构建敲除 AMPK  $\alpha$  1 的肺癌细胞模型。CRISPR/Cas9 技术应用的普遍性也体现在当今最热门的新型冠状病毒肺炎的快速诊断<sup>[22]</sup>。

诚然本实验也有一定的局限性: 首先 CRISPR/Cas9 敲除具有一定的随机性, 不同肺癌细胞系转染敲除质粒的效率并不一致。这可能与转染肺癌细胞的状态密切相关。其次 Cas9 敲除 AMPK  $\alpha$  1 的肺癌细胞株存在传代数减少, 生长缓慢的特点。AMPK  $\alpha$  1 可能和细胞衰老和凋亡有关。但具体机制还需要进一步研究。但本次实验成功构建的敲除 AMPK  $\alpha$  1 的 A549 和 H460 细胞株, 为后续研究 AMPK  $\alpha$  1 在肺癌的促癌机制提供了基础。后续实

验将建立敲除 AMPK  $\alpha 1$  的肺癌动物模型,这将进一步验证 AMPK  $\alpha 1$  促进肺癌生长。其次也需要找出敲除 AMPK  $\alpha 1$  蛋白将影响的相关糖脂代谢酶,确定 AMPK  $\alpha 1$  促进肺癌细胞生长的具体机制。这些都需要进一步研究。

#### 参考文献:

- [1] SIEGEL R L, MILLER K D, JEMAL A. Cancer statistics, 2020[J]. CA-A Cancer Journal for Clinicians, 2020, 70(1): 7-30.
- [2] SIEGEL R L, MILLER K D, JEMAL A. Cancer statistics, 2019[J]. CA-A Cancer Journal for Clinicians, 2019, 69(1): 7-34.
- [3] ROSS F A, MACKINTOSH C, HARDIE D G. AMP-activated protein kinase: a cellular energy sensor that comes in 12 flavours[J]. The FEBS Journal, 2016, 283(16): 2987-3001.
- [4] HUI Gongdao, XIU Wangyu, YONG Chen, et al. AMP-activated protein kinase  $\alpha 1$  serves a carcinogenic role via regulation of vascular endothelial growth factor expression in patients with non-small cell lung cancer[J]. Oncology Letters, 2019, 17(5): 4329-4334.
- [5] KIM M J, MIN Y, SON J, et al. AMPK  $\alpha 1$  regulates lung and breast cancer progression by regulating TLR4-mediated TRAF6-BECN1 signaling axis[J]. Cancers, 2020, 12(11): 3289.
- [6] MA Ning, SHAN Yongli, LIAO Baojian, et al. Factor-induced reprogramming and Zinc finger nuclease-aided gene targeting cause different genome instability in beta-thalassemia induced pluripotent cells (iPSCs)[J]. Journal of Biological Chemistry, 2015, 290(19): 12079-12089.
- [7] SHALEM O, SANJANA N E, HARTENIAN E, et al. Genome-scale CRISPR-Cas9 knockout screening in human cells[J]. Science, 2014, 343(6166): 84-87.
- [8] HOOK S C, CHADT A, HEESOM K J, et al. TBC1D1 interacting proteins, VPS13A and VPS13C, regulate GLUT4 homeostasis in C2C12 myotubes[J]. Scientific Reports, 2020, 10(1): 17953.
- [9] YANG Qiuhua, XU Jie'an, MA Qian, et al. PRKAA1/AMPK  $\alpha 1$ -driven glycolysis in endothelial cells exposed to disturbed flow protects against atherosclerosis[J]. Nature Communications, 2018, 9(1): 4667.
- [10] JANG Minsu, PARK R, KIM H, et al. AMPK contributes to autophagosome maturation and lysosomal fusion[J]. Scientific Reports, 2018, 8(1): 12637.
- [11] SOHN J Y, KWAK H J, RHIM J H, et al. AMP-activated protein kinase-dependent nuclear localization of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase in senescent human diploid fibroblasts[J]. Aging, 2022, 14(1): 4-27.
- [12] GERSZON J, RODACKA A. Oxidatively modified glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in neurodegenerative processes and the role of low molecular weight compounds in counteracting its aggregation and nuclear translocation [J]. Ageing Research Reviews, 2018, 48: 21-31.
- [13] BUTERA G, MULLAPPILLY N, MASETTO F, et al. Regulation of autophagy by nuclear GAPDH and its aggregates in cancer and neurodegenerative disorders [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2019, 20(9): 2062.
- [14] GAO Xuyang, DENG Buhao, LI Xinrui, et al. Melatonin regulates differentiation of sheep brown adipocyte precursor cells via AMP-activated protein kinase[J]. Frontiers in Veterinary Science, 2021, 8: 661773.
- [15] EICHNER L J, BRUN S N, HERZIG S, et al. Genetic analysis reveals AMPK is required to support tumor growth in murine Kras-dependent lung cancer models[J]. Cell Metabolism, 2019, 29(2): 285-302, e7.
- [16] GONG Daohui, LI Ying, WANG Yuxiu, et al. AMPK  $\alpha 1$  downregulates ROS levels through regulating Trx leading to dysfunction of apoptosis in non-small cell lung cancer[J]. OncoTargets and Therapy, 2020, 13: 5967-5977.
- [17] DE OLIVEIRA V C, GOMES M C, BELIZÁRIO J E, et al. Characterization of post-edited cells modified in the TFAM gene by CRISPR/Cas9 technology in the bovine model[J]. PLoS One, 2020, 15(7): e0235856.
- [18] ZHANG Baohong. CRISPR/Cas gene therapy[J]. Journal of Cellular Physiology, 2021, 236(4): 2459-2481.
- [19] ASMAMAW M, ZAWDIE B. Mechanism and applications of CRISPR/Cas-9-mediated genome editing [J]. Biologics, 2021, 15: 353-361.
- [20] GAO Zongliang, FAN Minghui, DAS A T, et al. Extinction of all infectious HIV in cell culture by the CRISPR-Cas 12a system with only a single crRNA[J]. Nucleic Acids Research, 2020, 48(10): 5527-5539.
- [21] WANG Meng, ZHANG Guangxin, ZHANG Yue, et al. Fibrinogen alpha chain knockout promotes tumor growth and metastasis through integrin-AKT signaling pathway in lung cancer[J]. Molecular Cancer Research, 2020, 18(7): 943-954.
- [22] 吴永彬, 李凌. CRISPR/Cas 系统在新型冠状病毒肺炎快速诊断中的应用 [J]. 现代检验医学杂志, 2022, 37(3): 1-5.
- WU Yongbin, LI Ling. Application of CRISPR/Cas systems in the rapid diagnosis of coronavirus disease 2019[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2022, 37(3): 1-5.

收稿日期: 2022-07-13

修回日期: 2022-09-28