مجله دانشگاه علوم پزشکی جیرفت

سال ۳ (۱)، خرداد ۱۳۹۶، صفحه ۳۸-۲۳

مقاله مروری

سیستم CRISPR-Cas و پیشرفت‌های اخیر در دقت عملکرد آن

هادی بیات [۱]، فاطمه نادری [۲]، امید محمدیان [۳]، اعظم رحیم‌پور [۴*]

[۱] کارشناس ارشد، گروه مهندسی بافت و طب بازساختی، دانشکده فناوری‌های نوین پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

[۲] دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه ژنتیک، دانشکده علوم نوین، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران پزشکی، تهران، ایران

[۳] دانشجوی کارشناسی ارشد، بیوشیمی بالینی، گروه بیوشیمی بالینی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

[۴] استادیار، گروه مهندسی بافت و طب بازساختی، دانشکده فناوری‌های نوین پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

چکیده

مقدمه: سیستم CRISPR-Cas به‌عنوان یک سیستم ایمنی اکتسابی در اکثر باکتری‌ها و آرکئی باکتری‌ها وجود دارد. طی سال‌های اخیر این سیستم به‌عنوان یک تکنولوژی مهندسی ژنوم با قابلیت تطبیق بسیار بالا در شرایط مختلف آزمایشگاهی در سطح سلول‌های یوکاریوتی معرفی شده است.

روش کار: مطالعه مروری حا ضر تلاش دارد پیشرفت‌های اخیر این سیستم و نکات کلیدی در جهت افزایش کارایی آن در کاربردهای تحقیقاتی و بالینی را مورد بررسی قرار دهد. در این راستا واژه های کلیدی CRISPR-Cas، بهبود کارایی و برش نابجا در پایگاه PubMed مورد بررسی قرار گرفته و ۷۲ عنوان انتخاب و در نگارش مقاله مورد استفاده قرار گرفتند.

یافته‌ها: آسان بودن طراحی سیستم CRISPR-Cas برای جایگاه‌های مختلف ژنوم، موجب شده است که این سیستم به‌طور گسترده برای مطالعه عملکرد جایگاه‌های مختلف ژنومیک، ایجاد ارگانیسم‌های مهندسی شده تحت عنوان مدل حیوانی و همچنین تحقیقات بالینی بیماری‌های ژنتیکی در سطح سلول‌های بنیادی مورد استفاده قرار می‌گیرد. در این راستا بهبود عملکرد و دقت این سیستم برای انجام دست‌ورزی‌های ژنومی ایمن و مؤثر ضروری است.

نتیجه‌گیری: در طی سال‌های اخیر راهکارهای متنوعی برای بهبود عملکرد سیستم CRISPR-Cas ارائه شده اند که از آن جمله می توان به بهبود طراحی، شناسایی هدف، اتصال و برش جایگاه اشاره نمود.

کلید واژه‌ها : CRISPR-Cas، ترمیم DNA، برش دو رشته‌ای DNA

اطلاعات مقاله

دریافت : ۱۳۹۵/۰۹/۲۸

پذیرش : ۱۳۹۵/۱۰/۰۹

***مولف مسئول**

اعظم رحیم‌پور

ایران، تهران، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، دانشکده فناوری‌های نوین پزشکی ، گروه مهندسی بافت و طب بازساختی.

تلفن: ۰۲۱۲۲۴۳۹۸۴۷

پست الکترونیک:

[Downloaded from journal.jmu.ac.ir on 2026-11-10]

Journal of Jiroft University of Medical Sciences

Vol. 3, No. 1, June 2017, P.23-38

The CRISPR-Cas system and Recent Advances in Its Precision Performance

Review Article

Hadi Bayat[1], Fatemeh Naderi[2], Omid Mohammadian[3], Azam Rahimpour[4*]

[1] M.sc, Department of Tissue Engineering and Regenerative Medicine, School of Advanced Technologies in Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran
[2] M.sc Student, Department of Genetics, School of Advanced Sciences, Islamic Azad University, Tehran Medical Branch, Tehran, Iran
[3] M.sc Student, Clinical Biochemistry, Departments of Clinical Biochemistry, School of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran
[4] Assistant Professor, Department of Tissue Engineering and Regenerative Medicine, School of Advanced Technologies in Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Abstract

Introduction: Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats-CRISPR associated (CRISPR-Cas) system is an adaptive immune system present in the most of bacteria and archaea. During the recent years, CRISPR-Cas has been introduced as a genome editing technology with high compatibility to different laboratory conditions in eukaryotic cell.
Methods: In the present review study, recent advances of this system and key points with regard to improving its efficiency in research and clinical application will be covered. In this regard, keywords including CRISPR-Cas, efficiency improvement, and off target have been analyzed in PubMed and 72 titles were selected and used in this paper.
Results: CRISPR-Cas system is widely used for studying the function of genomic loci, development of engineered organisms as animal models and also clinical research of genetic diseases in stem cells due to the simplicity of its design. In this regard, improving the performance and precision of this system is necessary for the accomplishment of the efficient and safe genetic manipulation.
Conclusion: Different approaches have been used for improving the function of CRISPR-Cas system including optimization of the design, target recognition, binding and cutting of the target sites.

Keywords: CRISPR-Cas, DNA repair, double-stranded DNA break

Article Info

Received: Dec. 18, 2016
Accepted: Dec. 29, 2016

***Corresponding Author:**

Azam Rahimpour

Department of Tissue Engineering and Regenerative Medicine, School of Advanced Technologies in Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Tel: +9821 2243 9847

Email: rahimpour@sbmu.ac.ir

Vancouver referencing:
Bayat H, Naderi F, Mohammadian O, Rahimpour A. The CRISPR-Cas system and Recent Advances in Its Precision Performance. *Journal of Jiroft University of Medical Sciences* 2017; 3(1): 23-38.

[Downloaded from journal.jmu.ac.ir on 2026-11-10]

مقدمه

در سال‌های اخیر معرفی نوکلئازهای برنامه‌ریزی شونده[1] کارایی ویرایش هدفمند ژنوم را تا حد زیادی افزایش داده است. نوکلئازهای برنامه‌ریزی شونده را می‌توان در چهار کلاس اصلی طبقه‌بندی کرد: مگانوکلئازها[2](MN)(۱)، نوکلئازهای انگشت روی[3](ZFN) (۲)، نوکلئازهای مؤثر شبیه فعال‌کننده رونویسی[4](TALEN) (۳) و CRISPR-Cas[5] (۴). عملکرد همه این ابزارها شامل شناسایی و اتصال اختصاصی به DNA هدف و سپس ایجاد برش دو رشته‌ای[6](DSB) در آن می‌باشد. در سه کلاس اول بخش شناسایی کننده DNA از جنس پروتئین است. در نتیجه به‌کارگیری این سیستم‌ها به دلیل نیاز به طراحی و مهندسی پروتئین در هر آزمایش بسیار سخت، زمان‌بر و پرهزینه می‌باشد. در حالی که در سیستم CRISPR-Cas بخش شناسایی کننده DNA هدف از جنس RNA است. در نتیجه این سیستم بسیار سریع، ساده و ارزان است. CRISPR-Cas در واقع یک سیستم ایمنی اکتسابی در باکتری‌ها می‌باشد که اولین بار در سال ۱۹۸۷ کشف شد (۵).

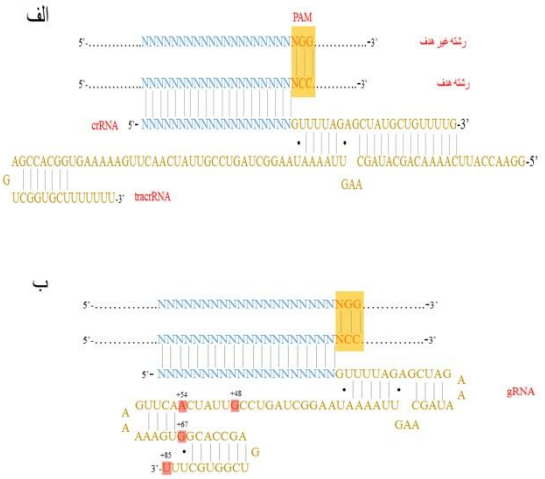
فعالیت این سیستم در زمان مواجهه سلول باکتریایی با باکتریوفاژ و یا اسید نوکلئیک مهاجم موجب حذف عنصر ژنتیکی خارجی می‌شود. تاکنون سه کلاس اصلی از این سیستم در سویه‌های مختلف باکتریایی شناسایی شده است. سیستم کلاس II باکتری استرپتوکوکوس پیوژنز، موسوم به CRISPR-Cas9 (SpCas9) که برای استفاده در سلول‌های یوکاریوت بهینه شده است، مهم‌ترین و پرکاربردترین این سیستم‌ها می‌باشد (۶). این سیستم شامل سه بخش است: crRNA[7]، tracrRNA[8] و پروتئین اندونوکلئاز Cas9 (شکل ۱). crRNA بخشی از توالی ژنوم مهاجم است که در آرایه‌های تکراری جایگاه ژنی CRISPR در باکتری‌ها ذخیره می‌شود. زمانی که باکتری مجدداً در معرض عنصر مهاجم قرار می‌گیرد این قطعه بیان شده و با اتصال به رشته مکملش در ژنوم مهاجم و در ادامه با هیبرید شدن tracrRNA با crRNA موجب فراخوانی Cas9 به جایگاه هدف می‌شود. در نهایت Cas9 با ایجاد برش دو رشته‌ای در ژنوم عنصر مهاجم، موجب غیرفعال شدن آن می‌شود. در تحقیقات مهندسی ژنوم، دو قطعه crRNA و tracrRNA به هم متصل شده‌اند و مولکول حاصل تحت عنوان RNA راهنما منفرد[9](sgRNA)یا به‌صورت خلاصه gRNA، جایگزین این دو قطعه شده است (۷) (شکل ۱). پروتئین Cas9 دارای دو دمین برش دهنده، HNH و RuvC، می‌باشد که به ترتیب رشته مکمل و غیر مکمل را برش می‌دهند (۸). لازم به ذکر است فعالیت نوکلئاز Cas9 علاوه بر عوامل ذکر شده به وجود توالی موسوم به PAM[10] بلافاصله بالادست جایگاه اتصال crRNA در رشته مکمل وابسته است. این توالی در سیستم کلاس II به‌صورت NGG می‌باشد. توالی PAM در آرایه‌های CRISPR وجود نداشته و تنها بر روی ژنوم مهاجم قرار دارد. بنابراین امکان برش ژنوم باکتری میزبان توسط Cas9 وجود ندارد (۱۰).

سلول‌های یوکاریوت برش دو رشته‌ای ایجاد شده می‌تواند توسط دو مسیر تعمیر متفاوت اصلاح شود: NHEJ[11] و HDR[12]. NHEJ روشی مستعد خطا بوده و در آن برش دو رشته‌ای از طریق ایجاد حذف و اضافه شدن‌های کوچک (Indel) تعمیر می‌شود؛ بنابراین در تحقیقات از این سیستم غالباً برای ایجاد موتاسیون و غیرفعال سازی ژن استفاده می‌شود. در مقابل HDR مسیری دقیق است که در آن مکانیسم تعمیر بر

1. programmable nucleases
2. meganuclease
3. Zinc finger nuclease
4. transcription activator-like effector nuclease
5. Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (CRISPR) / CRISPR Associated protein
6. Double stranded break
7. CRISPR RNA
8. Trans activating crisper RNA
9. Single guide RNA
1. Protospacer adjacent motif
1. Non-homologous end joining
2. Homology directed repair

[Downloaded from journal.jmu.ac.ir on 2026-11-10]

اساس استفاده از یک رشته الگو می‌باشد؛ بنابراین از این مسیر عمدتاً برای حذف یا اضافه دقیق بخش‌های هدف ژنوم و یا واردکردن دقیق ژن خارجی به یک محل شناخته شده در ژنوم استفاده می‌شود (۹).



شکل ۱: ساختار RNA راهنما به‌صورت وحشی و کایمر.
(الف) در ابتدا توالی crRNA از طریق جایگاه مکمل خود به رشته هدف متصل می‌شود و سپس توالی tracrRNA نیز به مکمل خود در crRNA متصل شده که این ساختار فضایی باعث فراخوانی پروتئین Cas9 به جایگاه هدف می‌شود. (ب) فرم کایمر RNA راهنما که از ادغام crRNA و tracrRNA طراحی شده است. چهار واریانت (+85, +67, +54, +48) مختلف معرفی شده که در این بین +85 بیشترین فعالیت را از خود نشان داده است (۷۲). NX20 توالی متصل شونده به رشته هدف که قابلیت طراحی شدن برای اتصال به جایگاه‌های مختلف ژنومی را دارد.

سیستم CRISPR-Cas به‌عنوان یک ابزار قدرتمند برای دست ورزی هدفمند ژنوم از پتانسیل بسیار بالایی در تحقیقات پایه و بالینی برخوردار است. از جمله مهم‌ترین زمینه‌های تحقیقاتی که می‌تواند از این ابزار بهره‌مند شوند می‌توان به مدل‌سازی بیماری‌ها در سلول (۴)، ایجاد میزبان‌های بیانی دست ورزی شده برای تولید مؤثر پروتئین‌های نوترکیب (۱۰, ۱۱) و طراحی راهکارهای درمانی برای بیماری‌های ژنتیکی دارای موتاسیون‌های شناخته شده اشاره نمود (۱۲, ۱۳). یکی از مهم‌ترین چالش‌های سیستم CRISPR-Cas9 در سطح تحقیقات و درمان، شناسایی و کاهش برش‌های نابجا[۳] در این سیستم است (۱۴). طبق گزارش‌های اخیر این سیستم می‌تواند تا پنج نوکلئوتید عدم مطابقت در هیبرید crRNA و ژنوم را تحمل کند (۱۵). هرچه این عدم تطابق به جایگاه ′۳ crRNA نزدیک‌تر باشد تحمل‌پذیری آن برای Cas9 کمتر خواهد بود. از این‌رو توالی crRNA را به دو بخش: seed و non-Seed تقسیم‌بندی می‌کنند. توالی seed عمدتاً حدود ۱۲ جفت باز سمت ۳ قطعه crRNA است (۱۶). تاکنون استراتژی‌های مختلفی در جهت کاهش برش‌های نابجا معرفی شده‌اند که از آن جمله می‌توان به پیش‌بینی و طراحی RNA راهنما مناسب، ایجاد انواع تغییریافته مختلف Cas9 و استفاده از روش‌های انتقال ژن کارآمد اشاره کرد. هر یک از این رویکردها و پیشرفت‌های اخیر صورت گرفته در آن‌ها در ادامه مورد بحث قرار می‌گیرند.

روش کار

طراحی مناسب gRNA برای سیستم CRISPR-Cas9

پیشرفت‌های اخیر CRISPR-Cas9 در محیط آزمایشگاهی[۴]، در محیط داخل سلولی[۵] و حتی در مدل‌های حیوانی از قبیل موش، گورخر ماهی[۶] و میمون، منجر به استفاده گسترده آن توسط محققین شده است. نکته قابل توجه آن است که در مورد سایر نوکلئازهای برنامه‌ریزی شونده شامل ZFN، TALEN و مگانوکلئازها، هدایت نوکلئاز غیراختصاصی به محل هدف بر روی ژنوم بر اساس برهمکنش پروتئین- DNA می‌باشد. حال آنکه در سیستم CRISPR-Cas9 این امر بر اساس اتصال RNA به DNA هدف صورت می‌پذیرد؛ بنابراین این سیستم می‌تواند حجم انبوهی از برش‌های نابجا را در ژنوم ایجاد کند (۱۴). علاوه بر وجود مقادیر فراوان از برش نابجا در

3. off target
4. In vitro
5. In vivo
1. Zebrafish

[Downloaded from journal.jmu.ac.ir on 2026-11-10]

محل‌هایی که بالادست PAM با توالی NGG– قرار گرفته‌اند، امکان ایجاد برش نابجا در محل‌های شامل توالی ثانویه PAM، NAG-، نیز برای SpCas9 مشاهده شده است (۱۷). بر همین اساس مطالعات جامعی برای طراحی پایگاه‌های آنلاین در جهت شناسایی جایگاه‌های بالقوه برش نابجا بر اساس مشابهت توالی با جایگاه هدف و همچنین جایگاه عدم تطبیق در طول crRNA انجام شده است (۱۸) (جدول- ۱ و ۲). طراحی gRNA مناسب برای تکنیک CRISPR-Cas یکی از کلیدی‌ترین مراحل در جهت جلوگیری و از برش نابجا می‌باشد. عواملی همچون جایگاه خاص نوکلئوتیدها در طول gRNA، توالی اطراف محل نشست gRNA، درصد نوکلئوتیدهای گوانین و سیتوزین (GC)در طول gRNA و ساختار ثانویه مناسب برای gRNA می‌بایست در طراحی مدنظر قرار گیرند تا برش در محل مناسب حاصل شود (۱۹). در یک مطالعه انجام شده در این زمینه، ۱۸۴۱ gRNA هدف‌گیری کننده مارکرهای سطح سلولی با هدف غیر فعال‌سازی این مارکرها مورد استفاده قرار گرفت. حذف مارکر سطح سلولی با تکنیک FACS بررسی شد. در این مطالعه مشخص شد قرار داشتن توالی gRNA در نواحی کد کننده نتایج بهتری را در بردارد. با این وجود لازم است به برخی محدودیت‌های این مطالعه اشاره شود: ۱- فعالیت gRNA هایی که چارچوب خواندن را به هم نمی‌ریزند را نمی‌توان با این مدل بررسی کرد. ۲- اگر تغییر چارچوب در پایین‌دست اپی‌توپ مورد شناسایی توسط آنتی‌بادی مورد استفاده در FACS باشد امکان شناسایی آن با استفاده از این تکنیک وجود نخواهد داشت. در مطالعه دیگری با بررسی ۲۱۸ gRNA مختلف در جایگاه‌های مختلف ژنوم و بررسی فعالیت آن‌ها، مشخص شد که در میان ۲۰ نوکلئوتید gRNA جایگاه ′۳ و همچنین جایگاه ۲۰ (نوکلئوتید مجاور جایگاه PAM) همراهی آشکاری با برش مناسب دارند (۱۹–۲۱). علاوه بر این در مطالعات ساختاری مشاهده شده است که نوکلئوتید ۲۰ در تشکیل اولیه لوپ R، ساختار سه رشته‌ای شامل هیبرید gRNA با رشته DNA هدف در زمانی‌که دو رشته DNA از هم باز شده‌اند، نیز نقش مهمی اجرا می‌کند (۲۲). همچنین گزارش شده است قرارگیری آدنین در این جایگاه میزان برش را تا حدود ۵۰ درصد کاهش می‌دهد. به‌صورت کلی نوکلئوتیدهای موجود در ناحیه Seed نقش مهمی در کارآمدی برش مناسب اجرا می‌کنند (۲۳). در ابتدا تصور بر این بود که توالی non-seed نقش تعیین‌کننده‌ای در ایجاد برش مناسب دارا نمی‌باشد اما در مطالعات اخیر مشاهده شده است که قرارگیری نوکلئوتیدهای تیمیدین و گوانین در جایگاه ۲ و ۳ تأثیر منفی بر ایجاد برش مناسب خواهد داشت. همچنین مشخص شده است قرارگیری آدنین در جایگاه ۶ این توالی نقش مهمی در بازده برش مناسب دارد. به‌صورت کلی، نوکلئوتیدهای ناحیه ۲ و ۴-۶ نقش مهمی در اتصال gRNA به جایگاه هدف داشته و در نتیجه موجب فراخوانی بهتر پروتئین Cas9 به هترودوپلکس RNA:DNA می‌شوند. همچنین در مطالعه آماری ۲۱۸ gRNA که قبلاً نیز به آن اشاره شد، مشاهده شد پائین بودن یا بالا بودن درصد گوانین و سیتوزین اثرات منفی در برش مناسب داشته و میزان نوکلئوتیدهای GC حدود ۴۰ تا ۶۰ درصد برای برش مناسب مورد نیاز است (۲۴).

جایگاه ژنومی اتصال gRNA به DNA نیز نقش مهمی در برش ایجاد می‌کند و مشاهده شده است که اتصال gRNA به ناحیه نزدیک پروموتر و شروع رونویسی بسیار کارآمدتر از نواحی بین ژنی است چراکه در این مناطق کروماتین در دسترس‌تر است (۲۵). تشکیل ساختار ثانویه توسط gRNA مخصوصاً در ناحیه توالی Seed در فراخوانی Cas9 به محل هدف و نیز القاء ساختار فعال اندونوکلئازی این آنزیم مهم است(۲۶) (شکل ۲-الف).

یکی از رویکردهای معرفی شده برای کاهش برش نابجا استفاده از gRNA کوتاه شده یا tru-gRNA[1] که حدود ۱۷–۱۸ باز دارد، می‌باشد. tru-gRNA در مقایسه با gRNA معمول

1. truncated gRNA

[Downloaded from journal.jmu.ac.ir on 2026-11-10]

با ۲۰ باز، برش نابجای کمتری (حدوداً ۵۰۰ برابر) ایجاد می‌کند (۲۷). این کوتاه‌تر شدن باید در انتهای ′۵gRNA ایجاد شود چرا که کوتاه‌تر شدن در انتهای ′۳ موجب کمتر شدن و حتی از بین رفتن فعالیت gRNA می‌شود (۱۵). همچنین کاهش دادن بیش از ۳-۱ نوکلئوتید کاهش شدید یا حذف فعالیت gRNA را به دنبال خواهد داشت. به نظر می‌رسد gRNA معمول با ۲۰ نوکلئوتید میزان بیشتری از انرژی را برای Cas9 ایجاد می‌کند در حالی که در مورد tru-gRNA حداقل میزان انرژی برای Cas9 ایجاد شده و در نتیجه از برش نابجا جلوگیری می‌شود (شکل ۲-ب).

gRNA با داشتن گوانین اضافی در انتهای ′۵ (-5’ GGGX19 یا 5’-GGX20) می‌تواند تخصصی‌تر عمل کند. اگرچه هنوز مکانیسم دقیقی برای این مسئله ارائه نشده است اما تغییر پایداری gRNA، میزان بیان و یا ساختار ثانویه آن می‌تواند مورد توجه قرار گیرد (۲۸) (شکل ۲-ج).

از جمله عوامل دیگری که می‌توانند در افزایش احتمال اتصال اختصاصی مؤثر باشند می‌توان به اضافه شدن جفت باز A-U به داربست gRNA (توالی tracrRNA) که موجب پایدار شدن داربست می‌شود و نیز اضافه شدن جفت باز به ساختار سنجاق‌سر در ساختار فضایی داربست که موجب افزایش ضریب اتصال gRNA به جایگاه هدف و در نهایت افزایش برش اختصاصی می‌شود، اشاره کرد (۲۹).

الف- فرم وحشی سیستم CRISPR، ب- فرم وحشی سیستم CRISPR با tru-gRNA، ج- فرم وحشی سیستم CRISPR با gRNA افزایش یافته، د- سیستم Cas9n که به دو جفت gRNA احتیاج دارد، ذ- سیستم RFN که از ادغام dCas9 و FokI ایجاد شده و همانند سیستم Cas9n نیاز به دو جفت gRNA دارد و در صورت دایمر شدن FokI برش ایجاد می‌شود، ر- سیستم وحشی CRISPR با سه جهش در جایگاه غیراختصاصی رشته non-target (eSpCas9 1.1)، ز- سیستم وحشی CRISPR با چهار جهش در جایگاه غیراختصاصی رشته target (SpCas9-HF1) : محل برش رشته‌های DNA: جهش در جایگاه غیراختصاصی اتصال Cas9 به رشته‌های DNA و gRNA

انواع کارآمدتر و دقیق‌تر سیستم CRISPR

مطالعات اخیر نشان داده است که اگرچه هر ۲۰ نوکلئوتید در توالی gRNA برای عملکرد اختصاصی و اتصال به هدف ضروری هستند اما وجود چند عدم تطبیق در این محل‌ها قابل تحمل است که این خود موجب ایجاد برش نابجا در ژنوم می‌شود (۳۰, ۳۱). برای جلوگیری از ایجاد برش دو رشته‌ای در جایگاه غیراختصاصی، نوع Cas9 نیکاز ($Cas9_n$) معرفی شده است. همان‌طور که اشاره شد پروتئین Cas9 دو دمین برش دهنده دارد که هر یک در یکی از رشته‌های DNA ایجاد برش می‌کنند؛ بنابراین با غیرفعال نمودن هر یک از این دومن‌ها می‌توان به یک آنزیم با قابلیت ایجاد برش تک‌رشته‌ای[18] دست یافت. این نوع موتان از Cas9، نیکاز نامیده شده است. در این حالت برای القا برش دو رشته‌ای نیاز به دو gRNA می‌باشد که هریک به یکی از رشته‌ها متصل می‌شود به صورتی که ناحیه ′۵ این gRNA ها به سمت هم بوده و فاصله بین این دو ′۵ (Offset) می‌تواند بین ۲۰-۰ جفت باز باشد. در این حالت برش با انتهای اضافه ′۵ در DNA هدف ایجاد می شود (شکل ۲-د). این سیستم تحت عنوان double nicking شناخته شده است. در این سیستم به‌صورت معمول از آنزیم نیکاز دارای جهش D10A در دمین RuvC استفاده می شود (۳۲). اهمیت استفاده از فرم نیکاز آن است که در صورتی که هر یک از

1. nick

[Downloaded from journal.jmu.ac.ir on 2026-11-10]

gRNA ها به‌صورت غیراختصاصی به محلی متصل شده و در آن محل برش تک رشته‌ای ایجاد شود، سیستم تعمیری BER[19] آن را رفع می‌نماید و تنها برش دو رشته‌ای ایجاد شده در نتیجه اتصال دو gRNA در فاصله نزدیم به هم منجر به فعال شدن مسیرهای NHEJ و یا HDR می‌شود. لازم به ذکر است تاکنون روش مؤثری برای بررسی دقیق اثرات برش تک رشته‌ای معرفی نشده است. این سیستم به میزان قابل توجه ای موجب کاهش برش نابجا می‌شود اگرچه کارایی Cas9n در مقایسه با فرم وحشی پروتئین Cas9 نیز به میزان کمی کاهش می‌یابد (۳۳) (شکل ۲-د).

در راستای بهبود سیستم نیکاز، محققین نوع دقیق‌تری از Cas9 را معرفی کردند که در آن هر دو دمین برش دهنده غیرفعال شدند. این نوع اصطلاحاً dCas9[20] نامیده شده است. در ادامه، اتصال دمین برش دهنده غیراختصاصی Fok1 به انتهای آمینوی dCas9 سیستم موسوم به RFN[21] را ایجاد کرد. در این سیستم dCas9 به‌عنوان حامل و هدایت‌کننده Fok1 به جایگاه برش عمل می‌کند. اساس این سیستم مشابه double nicking است با این تفاوت که فعالیت نوکلئازی Fok1 مستلزم دایمر شدن آن با همتای خود در رشته مقابل می‌باشد؛ بنابراین برخلاف سیستم نیکاز در RFN اتصال یک gRNA به تنهایی منجر به ایجاد برش تک رشته‌ای نخواهد شد. این سیستم نیز همانند double nicking نیاز به طراحی دو gRNA که هر یک به یکی از رشته‌های DNA متصل می‌شوند، دارد. در این مورد نیز ۵′ این gRNA ها باید به سمت یکدیگر بوده و فاصله کارآمد بین ۵′ gRNA ها، ۱۴-۱۷ جفت باز می‌باشد (۳۴) (شکل ۲-ذ).

بعلاوه به‌منظور بهینه سازی هر چه بیشتر RFN، از یک سیستم جدید برای بیان هم‌زمان دو یا چند gRNA استفاده شده است. در این سیستم آنزیم اندوریبونوکلئاز Cys-4 نیز به همراه مجموعه dCas9-FokI در سلول بیان می‌شود. همچنین محل برش این آنزیم در بالادست توالی کد کننده gRNA مورد نظر قرار داده می‌شود. به این ترتیب gRNA ها تحت یک پروموتر واحد به‌صورت یک رونوشت بیان شده و سپس آنزیم Cys-4 با ایجاد برش در محل اختصاصی خود آن‌ها را از هم جدا می‌کند.

در سیستم‌های معمول بیان gRNA لازم است طراحی به صورتی انجام شود که در ابتدای ۵′ gRNA گوانین قرار گیرد چرا که این نحوه طراحی جهت بیان مؤثر RNA از پروموتر U6 ضروری است. حال آنکه در مدل بیانی بر پایه Cys-4 قسمت ۵′ رونوشت شامل اولین توالی شناسایی Cys-4 می‌باشد بنابراین اجباری به وجود گوانین در جایگاه ۵′ gRNA نمی‌باشد. این مسئله در طراحی gRNA بسیار مهم و تأثیرگذار است زیرا دامنه gRNA های مناسب برای هدف مورد نظر را گسترده‌تر می‌نماید (۳۵, ۳۶). استفاده هم‌زمان tru-gRNA و سیستم RFN در رده‌های سلولی سرطانی و سلول‌های بنیادی برش مناسب با میزان بالا را فراهم کرده است (۳۷). یکی از مهم‌ترین محدودیت‌های این سیستم اندازه بزرگ آن است که مانع از انتقال آن با استفاده از وکتورهای ویروسی می‌شود (۳۸).

1. RNA-guided FokI Nuclease
2. Base excision repair
3. Dead Cas9

[Downloaded from journal.jmu.ac.ir on 2026-11-10]

یکی از موارد مهم در ایجاد برش نابجا در ژنوم بیان طولانی مدت اجزا سیستم CRISPR مخصوصاً Cas9 در سلول است چرا که این مسئله امکان ایجاد برش نابجا را افزایش می‌دهد.

جدول ۱: پایگاه‌های طراحی gRNA

نرم‌افزار	آدرس	ژنوم	ساختار gRNA پیش‌فرض	مزیت	محدودیت	منبع
Cas9 Design	http://cas9.cbi.pku.edu.cn	۱۰ ژنوم رایج	اندازه هدف، داربست RNA مخصوص استفاده‌کننده برای پیش‌بینی ساختار	می‌تواند برای شناسایی ساختار سنجاق‌سر مشکل‌زا در sgRNA بکار رود.	پیش‌بینی نکردن برش نابجا و کارآمدی برش اختصاصی	(۶۱)
CRISPR MultiTargeter	http://www.multicrispr.net/	۱۲ ژنوم رایج	G یا GG در انتهای ’5، طول هدف، PAM مخصوص استفاده‌کننده، sgRNA جفت	راحتی کار، گزینه‌های تغییر فراوان، حالات مختلف جداگانه که می‌تواند سودمند باشد	نبود پیش‌بینی برش نابجا، چندحالته بودن می‌تواند گیج‌کننده باشد.	(۶۲)
Cas OFFinder	http://www.rgenome.net/casoffinder/	تقریباً ۲۰ ژنوم رایج	PAM های مختلف، تحمل عدم تطبیق	راحتی کار، آنالیز چندین sgRNA، برش نابجا با نهایت ۹ عدم تطبیق.	مشخص نبودن جایگاه عدم تطبیق، تعداد عدم تطبیق در هر جایگاه را نشان نمی‌دهد.	(۶۳)
SSFinder	https://code.google.com/p/ssfinder/	N/A	ندارد	ورودی و خروجی ساده، کار سریع بر روی تعداد کم توالی	نبود گزینه تغییر، نبود اطلاعات برش اختصاصی و یا غیراختصاصی	(۶۴)

محققین با بررسی ساختار کریستالی این پروتئین جایگاهی را برای تقسیم پروتئین به دو بخش بدون تحت تأثیر قرار گرفتن دومن‌های برشی کشف کرده‌اند. این فرم جدید که Cas9 مجزا[۲۲] نامیده شد توانایی سر هم شدن مجدد پس از قرار گرفتن در معرض gRNA را دارا می‌باشد. اگرچه مشخص شده است فعالیت این نوع آنزیم با سیستم tru-gRNA سازگار نیست (۳۹). در ادامه به‌منظور رفع وابستگی فعالیت سیستم Cas9 مجزا به gRNA، از دومین‌های دایمر شونده تحریک

2. Split Cas9

[Downloaded from journal.jmu.ac.ir on 2026-11-10]

شونده با نور یا مولکول‌های کوچک برای القاء دیمر شدن این نوع Cas9 استفاده شد. در مطالعه انجام شده توسط زیتچ و همکاران، دمین دایمر کننده راپامایسین مورد استفاده قرار گرفت. این دومین امکان سرهم‌بندی Cas9 را در حضور راپامایسین موجب می‌شود (۴۰). در مطالعه دیگر دیویس و همکاران یک اینتئین[۲۳] القا شونده با ترکیب 4-HT[۲۴] را در محل مناسب در ساختار Cas9 وارد نمودند. این اینتئین تنها در حضور 4-HT از آنزیم خارج می‌شود. در نتیجه آنزیم Cas9 در حضور ترکیب القایی فعال و در عدم حضور آن غیرفعال است. این سیستم اختصاصی را تا ۲۵ درصد در سلول‌های انسانی افزایش می‌دهد (۴۱). بعلاوه اخیراً یک نوع Cas9 فعال شونده با نور نیز گزارش شده است. این نوع بر اساس اتصال یک دومین دایمر کننده القا شونده توسط نور به زیر واحدهای Cas9 مجزا ایجاد شده است. ویژگی بارز این سیستم قابل‌برگشت بودن آن است که در سیستم‌های القا شونده توسط راپامایسین و یا اینتئین قابل دسترسی نمی‌باشد (۴۲).

جایگزینی اسید آمینه در توالی Cas9 وحشی می‌تواند قدرت اتصال این پروتئین را بیشتر نموده و در نتیجه موجب عدم تحمل‌پذیری عدم تطابق در توالی gRNA شود. eSpCas9 1.1 نوعی از SpCas9 است که در آن سه اسید آمینه آلانین جایگزین شده است (A/K1003A/R1060A۸۴۸K). این دنباله‌ها به رشته غیر هدف متصل می‌شوند. این جایگزینی موجب از بین رفتن برش‌های نابجا در ژنوم و نیز افزایش برش در محل اختصاصی نسبت به فرم وحشی شد (۴۳). در مطالعه دیگر جایگزینی چهار اسید آمینه در جایگاه اتصال غیراختصاصی رشته DNA هدف با gRNA (N497A, R661A, Q695A,Q926A) افزایش انرژی اتصال را به دنبال داشت و در نتیجه کاهش چشم‌گیری در برش نابجا در ژنوم مشاهده شد (۴۴) (شکل ۲-ر)، (شکل ۲-ز). به‌کارگیری این دو نوع آنزیم با gRNA یکسان و در رده سلولی یکسان در مقایسه عملکرد آن‌ها بسیار قابل توجه خواهد بود. معرفی این دو نوع جدید برای انجام مهندسی ژنوم دقیق‌تر برای سطح درمان بیماری‌های ژنتیکی بسیار کمک‌کننده خواهد بود (جدول-۳).

کشف و معرفی انواع دیگر پروتئین‌های دارای فعالیت اندونوکلئازی که برای مهندسی ژنوم نیز کاربرد دارند می‌تواند دیدگاه‌های جامع‌تری را برای استفاده مؤثر از این ابزار فراهم کند. از این جمله می‌توان به پروتئین Cpf1 اشاره نمود که عملکرد آن در مهندسی ژنوم سلول‌های انسانی به‌تازگی بررسی شده است (۴۵). Cpf1 واریانت معروف دیگر از کلاس II سیستم CRISPR است که بنام Type V نام‌گذاری شده است. این اندونوکلئاز از نظر ساختاری و عملکردی تفاوت هایی با Cas9 دارد: ۱- فعالیت آن تنها به وجود یک crRNA وابسته است و نیازی به tracrRNA ندارد، ۲- ایجاد برش با انتهای اضافه می‌کند که این خود موجب افزایش ضریب واردکردن یک کاست ژنی به ژنوم می‌شود، ۳- جایگاه PAM با فرمت ′۳-TTTN-′۵ دارد که غنی از تیمیدین است، ۴- Cpf1 تنها حاوی یک دمین برش دهنده مشابه RuvC است (۴۶). اخیراً مشاهده شده که این پروتئین علاوه بر خاصیت DNase خاصیت RNase هم دارد که موجب می‌شود RNA پیش ساز که برای هدایت این

1. intein

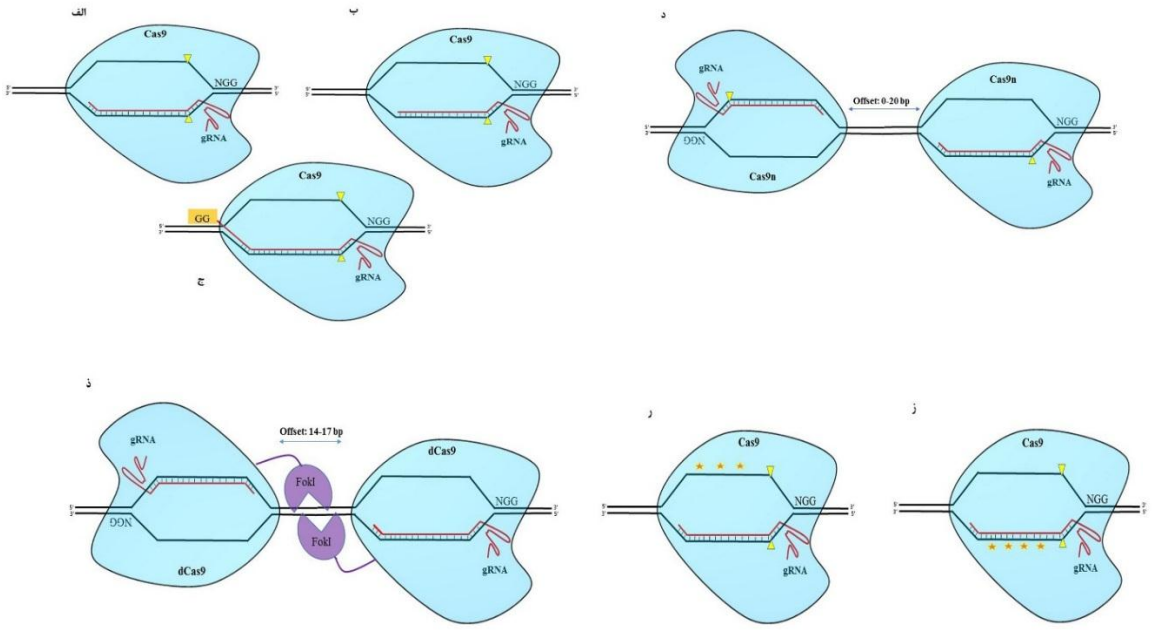
2. 4- hydroxytamoxifen

[Downloaded from journal.jmu.ac.ir on 2026-11-10]

پروتئین به جایگاه هدف می‌شود را ویرایش کند (۴۷). ساختار کریستالی این پروتئین و همچنین ساختار کریستالی این پروتئین در اتصال به جایگاه هدف هم به خوبی مطالعه شده است که می‌تواند دیدگاه جامعی از چگونگی عملکرد آن را ارائه دهد (۴۵, ۴۸).

جدول ۲. پایگاه‌های طراحی gRNA و بررسی جایگاه‌های برش نابجا هم‌زمان

نرم‌افزار	آدرس	ویژگی	منبع
CCTop	/http://crispr.cos.uni-heidelberg.de	مناسب برای تولید تعداد زیاد کاندید با اطلاعات جامع در مورد جایگاه اختصاصی و غیراختصاصی	(۶۵)
CHPCHOP	https://chopchop.rc.fas.harvard.edu	مناسب برای طراحی تعداد زیاد gRNA برای یک جایگاه	(۶۶)
Crispr.mit	/http://crispr.mit.edu	مناسب برای تولید تعداد زیاد کاندید با اطلاعات جامع در مورد جایگاه اختصاصی و غیراختصاصی	(۱۷)
ZiFiT	/http://zifit.partners.org/ZiFiT	پیدا کردن جایگاه هدف و برش‌های نابجا برای یک توالی	(۶۷)
GT-Scan	/http://gt-scan.braembl.org.au/gt-scan	پیدا کردن جایگاه هدف و برش‌های نابجا برای یک توالی	(۶۸)
COD	http://cas9.wicp.net	پیدا کردن جایگاه هدف برای یک توالی و پیش‌بینی و امتیازدهی به برش‌های نابجا	(۶۹)
CRISPRseek	http://www.bioconductor.org/packages/release/bioc/html/CRISPRseek.htm	پیدا کردن توالی هدف و برش نابجا برای چند توالی هم‌زمان، بررسی نیکاز و RFN	(۷۰)
E-CRISP	/http://www.e-crisp.org/E-CRISP	پیدا کردن توالی هدف و برش نابجا برای یک توالی هم‌زمان، بررسی نیکاز و RFN، بررسی کیفیت gRNA	(۷۱)



شکل ۲: انواع مختلف واریانت های پروتئین Cas9

[Downloaded from journal.jmu.ac.ir on 2026-11-10]

جدول ۳: بررسی اجمالی استراتژی‌های کاهش برش نابجا

استراتژی	ویژگی	مکانیسم عمل	ویژگی عملکردی
Tru-gRNA	۱-۳ نوکلئوتید در انتهای ’۵ حذف‌شده	ممکن است موجب کاهش انرژی اتصال RNA-DNA شود	برش نابجا کاهش‌یافته، بیشتر برش‌های نابجا ۲ یا کمتر عدم تطابق دارند
gRNA افزایش یافته	گوانیدین به انتهای ’۵ gRNA اضافه‌شده	مکانیسم افزایش اختصاصی نامعلوم اما ممکن است بی‌ثباتی تراکنش پروتئین و بخش ’5 انتهایی درگیر باشد	برش نابجا با بعضی از gRNA ها مشاهده شده و در بعضی موارد برش اختصاصی هم کاهش پیدا کرده
$Cas9_n$	دو Cas9 که یکی از دمین های برش دهنده غیرفعال شده با هم عمل می‌کنند	نیازمند دو تا gRNA مجزا در رشته‌های مکمل که با فاصله کم از هم قرار دارند تا DSB را القا کند	تعداد برش نابجا کم شده ولی هنوز هر مونومر خاصیت ایجاد nick دارد که در بعضی جایگاه‌ها خاصیت جهش‌زایی بالا نشان داده
RFN	ادغام dCas9 به دمین نیازمند دایمر بنام Fok1	مشابه سیستم $Cas9_n$ با این تفاوت که هر مونومر به تنهایی برش نمی‌دهد و حتماً باید دایمر باشد	برش نابجا بسیار کاهش پیدا کرده اما هنوز به‌وسیله روش‌های گسترده ژنومی بررسی دقیق نشده
Cas9 مهندسی شده	جایگزینی آلانین در ۳-۴ جایگاه از پروتئین spCas9	کاهش پیوند غیراختصاصی Cas9 با رشته هدف (SpCas9-HF1) یا رشته غیر هدف (eSpCas9 1.1)	برش نابجا بسیار کم شده یا اصلاً وجود ندارد، در بعضی جایگاه‌های غیراختصاصی هنوز جهش‌زایی ممکن است

مکانیسم‌های مختلف برای انتقال سیستم CRISPR به درون سلول

یکی از مهم‌ترین مراحل در طی مهندسی ژنوم مخصوصاً در مورد کاربردهای درمانی، انتقال کارآمد این سیستم به درون سلول هدف می‌باشد. طبقه گفته دکتر ایندر ورما تنها سه مشکل در ژن‌درمانی وجود دارد: انتقال، انتقال و انتقال به درون سلول (۴۹). سیستم‌های انتقال ژن ویروسی و غیر ویروسی به‌صورت گسترده برای انتقال ژن‌های کد کننده Cas9 و نیز gRNA به درون سلول استفاده شده است. همچنین امکان انتقال رونوشت یا پروتئین این اجزاء به سلول نیز وجود دارد. یکی از مهم‌ترین محدودیت‌های انتقال ژن کد کننده سیستم CRISPR آن است که بیان مقادیر زیاد این محصولات خود موجب بیشتر شدن برش نابجا می‌شود (۵۰). اگرچه انتقال ریبونوکلئوپروتئین کنترل بیشتری بر روی غلظت داخل سلولی و همچنین مدت زمان در معرض بودن این سیستم ایجاد می‌کند اما ساختار چهارم شکننده، اندازه بزرگ پروتئین و بار منفی RNA انتقال این سیستم از غشا سلولی را محدود نموده است. علاوه بر این حساسیت RNA به اندونوکلئازها تجزیه آن‌ها را به دنبال خواهد داشت. در این راستا استراتژی‌های شیمیایی مختلفی برای غلبه بر این محدودیت ها معرفی‌شده‌اند (۵۱). تاکنون چندین روش فیزیکی و شیمیایی از قبیل نوکلئوفکشن، الکتروپرویشن، لیپوفکشن (۵۲) و نیز استفاده از پپتیدهای نفوذکننده به سلول ۲۵(CPP)(۵۳) برای انتقال ساختار CRISPR به درون سلول‌های کشت داده شده به‌کار برده شده است (۵۴). ویژگی‌های بخصوص از قبیل بازده بالا، آسانی و

1. Cell penetrating peptide

[Downloaded from journal.jmu.ac.ir on 2026-11-10]

افزایش بیان ژن، این روش‌ها را حامل‌های قابل اطمینانی برای بررسی‌های آزمایشگاهی تبدیل کرده است.

وکتورهای ویروسی کارایی بالایی را در انتقال ژن خارجی به طیف وسیعی از سلول‌ها نشان داده‌اند (۵۵). چهار کلاس وکتور ویروسی (لنتی ویروس، رتروویروس، آدنوویروس و ویروس‌های همراهی‌کننده ادنوویروس) به‌طور گسترده به‌عنوان ناقل برای انتقال سیستم CRISPR مورد استفاده قرار گرفته است (۵۲). اگرچه اندازه بزرگ Cas9 بسته‌بندی ویروس را با مشکل مواجه کرده و تیتر آن را کاهش می‌دهد. بعلاوه با وجود این توالی بزرگ، فضای زیادی برای کلون کردن دیگر عوامل باقی نمی‌ماند. به‌منظور رفع این مشکل، نوع کوتاه‌تر Cas9 با طول ۳,۳ کیلو باز از باکتری استافیلوکوکوس ارئوس معرفی شده است (۵۶). با این وجود استفاده از وکتورهای ویروسی با محدودیت‌هایی همچون سرطان‌زایی، تحریک سیستم ایمنی و واردشدگی‌های نابجا همراه است (۵۴).

یکی از محدودیت های سیستم انتقال ژن غیر ویروسی کارآمدی نسبتاً کم آن‌ها می‌باشد. در این راستا، حاملین نانو با ویژگی‌های فیزیوشیمیایی و تغییرات سطحی به‌خوبی توانسته‌اند مولکول‌های کوچک را به هدف مشخص منتقل کنند (۵۷). اخیراً یک ذره نانو بنام نانوگوی DNA (DNA NC)[۲۶] که در واقع نانو ذرات رشته‌ای شکل از جنس DNA می‌باشند، تهیه شده است که دارای یک تشابه اتصالی به gRNA می‌باشد. با بارگذاری کمپلکس Cas9-sgRNA بر روی این نانوذره امکان انتقال مؤثر این مجموعه به سلول فراهم شد. همچنین با پوشاندن این ذره با پلیمر پلی‌اتیلن ایمین (PEI)[۲۷] امکان فرار آن از اندوزوم پس از ورود به سلول ایجاد شد (۵۸, ۵۹).

روش های مکانیکی که موجب به هم ریختگی موقتی دیواره سلولی می‌شوند نیز می‌توانند در انتقال ماکرومولکول‌ها به درون سلول مؤثر باشد. از جمله ویژگی‌های این روش می‌توان به قابلیت استفاده برای طیف وسیعی از سلول‌ها اشاره نمود. اخیراً استفاده از غشاهای میکروفلویدی تغییردهنده که با ایجاد تغییرات سریع مکانیکی در سلول منجر به ایجاد حفرات موقتی در غشاء سلول می‌شوند، کارایی مناسبی در انتقال سیستم CRISPR به سلول‌های مختلف نشان داده است. از ویژگی‌های مهم این سیستم امکان کنترل دقیق شرایط آزمایش در زمان انتقال می‌باشد. استفاده از این روش نوین برای انتقال سیستم CRISPR چشم اندازهای جدیدی را پیش روی محققین قرار داده است (۶۰).

نتیجه گیری

رشد روزافزون هر تکنولوژی جدید مانند سیستم CRISPR نیازمند توجهات دقیق‌تر است. در طی دو سال اخیر تحقیقات بر روی سیستم CRISPR گام‌های مهمی در تکامل مهند سی ژنوم ایجاد کرده است. بهینه کردن اجزا مختلف سیستم CRISPR، امکان کاهش برش‌های نابجا بدون ایجاد تغییر در فعالیت برش اختصاصی را فراهم نموده است. بعلاوه به‌کارگیری روش‌های مؤثر برای به حداقل رساندن برش نابجا (از قبیل استفاده از انواع تغییر یافته Cas9) نقش کلیدی در افزایش دقت این سیستم داشته‌اند و استفاده از آن را در کاربردهای بالینی محتمل‌تر نموده‌اند. به کارگیری روش های جدید تشخیص جهش های نابجا به‌طور ویژه توسط Digenome-seq امکان تشخیص برش‌های نابجا با فراوانی کم را قبل از انجام ژن‌درمانی و سلول درمانی فراهم می‌نماید.

1. DNA nano clew

2. Polyethylenimine

[Downloaded from journal.jmu.ac.ir on 2026-11-10]

هم اکنون ضریب خطای سیستم‌های جدید توالی یابی مانع شناسایی برش نابجا با فرکانس کمتر از ۰,۱ درصد می‌شود (۲۸)؛ بنابراین بهینه سازی سیستم‌های تشخیصی جهت کاربرد درمانی این سیستم در اولویت هستند. دیدگاه‌های جامع‌تر در مورد حالات کروماتین و سطح بیان ژن در جایگاه‌های هدف سیستم CRISPR نیز برای استفاده بهینه از این سیستم مورد نیاز می‌باشد. در طولانی مدت مجموعه داده‌های زیادی که توسط تعداد بیشتر gRNA و برش‌های نابجای آن‌ها ترسیم خواهد شد، توانایی ایجاد الگوریتم‌های بیوانفورماتیکی برای طراحی دقیق‌تر gRNA با حداقل جایگاه برش نابجا را ایجاد می‌کند. همچنین مقایسه سیستم های موجود برای انجام مهندسی ژنوم با gRNA یکسان و در محیط سلولی یکسان، ما را قادر خواهد ساخت تا نقاط قوت و ضعف هر یک را شناسایی نموده و امکان انتخاب بهترین ترکیب را در شرایط مختلف داشته باشیم. در نهایت پیشرفت‌های ایجاد شده در طراحی ناقلین ویروسی و غیر ویروسی که بهترین عملکرد برای انتقال CRISPR در مدل های حیوانی و انسانی را دارند می‌توانند ما را به انجام ژن‌درمانی در موجود زنده بیش از پیش امیدوار کنند.

تقدیر و تشکر

این تحقیق با حمایت دانشکده فناوری‌های نوین دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی انجام شده است. وجهت اخذ کد اخلاق این مقاله در کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی جیرفت مطرح و با کد اخلاق IR.JMU.REC.1396.13 به ثبت رسیده است.

تعارض منافع

هیچ‌گونه تعارض منافع توسط نویسندگان بیان نشده است.

References

1. Xu H, Liu B, Pardinas J. Biological and Technological Implications of Meganucleases. Gene and Gene Editing. 2015; 1(1): 41-6.
2. Jo YI, Kim H, Ramakrishna S. Recent developments and clinical studies utilizing engineered zinc finger nuclease technology .Cellular and Molecular Life Sciences. 2015; 72(20): 3819-30.
3. Scharenberg AM, Duchateau P, Smith J. Genome engineering with TAL-effector nucleases and alternative modular nuclease technologies. Current Gene Therapy. 2013; 13(4): 291-303.
4. Go DE, Stottmann RW. The Impact of CRISPR/Cas9-Based Genomic Engineering on Biomedical Research and Medicine. Current Molecular Medicine. 2016; 16(4): 343-52.
5. Lander ES. The Heroes of CRISPR. Cell. 2016; 164(1-2): 18-28.
6. Makarova KS, Koonin EV. Annotation and Classification of CRISPR-Cas Systems. Methods in Molecular Biology. 2015; 1311: 47-75.
7. Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. Science. 2012; 337(6096): 816-21.
8. Jiang F, Taylor DW, Chen JS, Kornfeld JE, Zhou K, Thompson AJ, et al. Structures of a CRISPR-Cas9 R-loop complex primed for DNA cleavage. Science. 2016; 351(6275): 867-71.
9. Maruyama T, Dougan SK, Truttmann MC, Bilate AM, Ingram JR, Ploegh HL. Increasing the efficiency of precise genome editing with CRISPR-Cas9 by inhibition of nonhomologous end joining. Nature Biotechnology. 2015; 33(5): 538-42.
10. Rahimpour A, Ahani R, Najaei A, Adeli A, Barkhordari F, Mahboudi F. Development of Genetically Modified Chinese Hamster Ovary Host Cells for the Enhancement of Recombinant Tissue Plasminogen Activator Expression. The Malaysian Journal of Medical Sciences. 2016; 23(2): 6-13.

[Downloaded from journal.jmu.ac.ir on 2026-11-10]

11. Rahimpour A, Vaziri B, Moazzami R, Nematollahi L, Barkhordari F, Kokabee L, et al. Engineering the cellular protein secretory pathway for enhancement of recombinant tissue plasminogen activator expression in Chinese hamster ovary cells: effects of CERT and XBP1s genes. Journal of Microbiology and Biotechnology. 2013; 23(8): 1116-22.
12. Banan M, Bayat H, Namdar-Aligoodarzi P, Azarkeivan A, Kamali K, Daneshmand P, et al. Utility of the multivariate approach in predicting beta-thalassemia intermedia or beta-thalassemia major types In Iranian patients. Hemoglobin. 2013; 37(5): 413-22.
13. Banan M, Bayat H, Azarkeivan A, Mohammadparast S, Kamali K, Farashi S ,et al. The XmnI and BCL11A single nucleotide polymorphisms may help predict hydroxyurea response in Iranian beta-thalassemia patients. Hemoglobin. 2012; 36(4): 371-80.
14. Zhang XH, Tee LY, Wang XG, Huang QS, Yang SH. Off-target Effects in CRISPR/Cas9-mediated Genome Engineering. Molecular Therapy-Nucleic Acids. 2015; 4: e264.
15. Fu Y, Foden JA, Khayter C, Maeder ML, Reyon D, Joung JK, et al. High-frequency off-target mutagenesis induced by CRISPR-Cas nucleases in human cells. Nature Biotechnology. 2013; 31(9): 822-6.
16. Jiang F, Zhou K, Ma L, Gressel S, Doudna JA. A Cas9-guide RNA complex preorganized for target DNA recognition. Science. 2015; 348(6242): 1477-81.
17. Hsu PD, Scott DA, Weinstein JA, Ran FA, Konermann S, Agarwala V, et al. DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases. Nature Biotechnology. 2013; 31(9): 827-32.
18. Graham DB, Root DE. Resources for the design of CRISPR gene editing experiments. Genome Biology. 2015; 16: 260.
19. Doench JG, Fusi N, Sullender M, Hegde M, Vaimberg EW, Donovan KF, et al. Optimized sgRNA design to maximize activity and minimize off-target effects of CRISPR-Cas9. Nature Biotechnology. 2016; 34: 184-91.
20. Wang T, Wei JJ, Sabatini DM, Lander ES. Genetic Screens in Human Cells Using the CRISPR-Cas9 System. Science. 2014; 343(6166):80-4.
21. Doench JG, Hartenian E, Graham DB, Tothova Z, Hegde M, Smith I, et al. Rational design of highly active sgRNAs for CRISPR-Cas9-mediated gene inactivation. Nature Biotechnology. 2014; 32(12): 1262-7.
22. Anders C, Niewoehner O, Duerst A, Jinek M. Structural basis of PAM-dependent target DNA recognition by the Cas9 endonuclease. Nature. 2014; 513(7519): 569-73.
23. Gagnon JA, Valen E, Thyme SB, Huang P, Akhmetova L, Pauli A, et al. Efficient mutagenesis by Cas9 protein-mediated oligonucleotide insertion and large-scale assessment of single-guide RNAs. PLoS One. 2014; 9(5): e98186.
24. Liu X, Homma A, Sayadi J, Yang S, Ohashi J, Takumi T. Sequence features associated with the cleavage efficiency of CRISPR/Cas9 system. Scientific Reports. 2016; 6(19675): 19675.
25. Singh R, Kuscu C, Quinlan A, Qi Y, Adli M. Cas9-chromatin binding information enables more accurate CRISPR off-target prediction. Nucleic Acids Research 2015; 43(18): e118.
26. Jinek M, Jiang F, Taylor DW, Sternberg SH, Kaya E, Ma E, et al. Structures of Cas9 endonucleases reveal RNA-mediated conformational activation. Science. 2014; 343(6176): 1247997.
27. Fu Y, Sander JD, Reyon D, Cascio VM, Joung JK. Improving CRISPR-Cas nuclease specificity using truncated guide RNAs. Nature Biotechnology. 2014; 32(3): 279–84.
28. Kim D, Bae S, Park J, Kim E, Kim S, Yu HR, et al. Digenome-seq: genome-wide profiling of CRISPR-Cas9 off-target effects in human cells. Nature Methods. 2015; 12(3): 237-43.
29. Chen B, Gilbert LA, Cimini BA, Schnitzbauer J, Zhang W, Li GW, et al. Dynamic imaging of genomic loci in living human cells by an optimized CRISPR/Cas system. Cell. 2013; 155(7): 1479-91.
30. Cong L, Ran FA, Cox D, Lin S, Barretto R, Habib N, et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. Science. 2013; 339(6121):819-23.
31. Jiang W, Bikard D, Cox D, Zhang F, Marraffini LA. RNA-guided editing of bacterial genomes using CRISPR-Cas systems. Nature Biotechnology. 2013; 31(3): 233-9.

[Downloaded from journal.jmu.ac.ir on 2026-11-10]

32. Ran FA, Hsu PD, Lin CY, Gootenberg JS, Konermann S, Trevino AE, et al. Double nicking by RNA-guided CRISPR Cas9 for enhanced genome editing specificity. Cell. 2013; 154(6): 1380-9.

33. Mali P, Aach J, Stranges PB, Esvelt KM, Moosburner M, Kosuri S, et al. CAS9 transcriptional activators for target specificity screening and paired nickases for cooperative genome engineering. Nature Biotechnology. 2013; 31(9): 833-8.

34. Tsai SQ, Wyvekens N, Khayter C, Foden JA, Thapar V, Reyon D, et al. Dimeric CRISPR RNA-guided FokI nucleases for highly specific genome editing. Nature Biotechnology. 2014; 32(6):569-76.

35. Guilinger JP, Thompson DB, Liu DR. Fusion of catalytically inactive Cas9 to FokI nuclease improves the specificity of genome modification. Nature Biotechnology. 2014; 32(6): 577-82.

36. Cheng AW, Wang H, Yang H, Shi L, Katz Y, Theunissen TW, et al. Multiplexed activation of endogenous genes by CRISPR-on, an RNA-guided transcriptional activator system. Cell Research. 2013; 23(10): 1163-71.

37. Wyvekens N, Topkar VV, Khayter C, Joung JK, Tsai SQ. Dimeric CRISPR RNA-Guided FokI-dCas9 Nucleases Directed by Truncated gRNAs for Highly Specific Genome Editing. Human Gene Therapy. 2015; 26(7): 425-31.

38. Tsai SQ, Joung JK. Defining and improving the genome-wide specificities of CRISPR-Cas9 nucleases. Nature Reviews Genetics. 2016; 17(5): 300-12.

39. Wright AV, Sternberg SH, Taylor DW, Staahl BT, Bardales JA, Kornfeld JE, et al. Rational design of a split-Cas9 enzyme complex. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2015; 112(10): 2984-9.

40. Zetsche B, Volz SE, Zhang F. A split-Cas9 architecture for inducible genome editing and transcription modulation. Nature Biotechnology. 2015; 33(2): 139-42.

41. Davis KM, Pattanayak V, Thompson DB, Zuris JA, Liu DR. Small molecule-triggered Cas9 protein with improved genome-editing specificity. Nature Chemical Biology. 2015; 11(5): 316-8.

42. Nihongaki Y, Kawano F, Nakajima T ,Sato M. Photoactivatable CRISPR-Cas9 for optogenetic genome editing. Nature Biotechnology. 2015; 33(7): 755-60.

43. Slaymaker IM, Gao L, Zetsche B, Scott DA, Yan WX, Zhang F. Rationally engineered Cas9 nucleases with improved specificity. Science. 2016; 351(6268): 84–8.

44. Kleinstiver BP, Prew MS, Tsai SQ, Topkar VV, Nguyen NT, Zheng Z, et al. Engineered CRISPR-Cas9 nucleases with altered PAM specificities. Nature. 2015; 523(7561): 481-5.

45. Kim D, Kim J, Hur JK, Been KW, Yoon SH, Kim JS. Genome-wide analysis reveals specificities of Cpf1 endonucleases in human cells. Nature Biotechnology. 2016: 34: 863-8.

46. Zetsche B, Gootenberg JS, Abudayyeh OO, Slaymaker IM, Makarova KS, Essletzbichler P, et al. Cpf1 Is a Single RNA-Guided Endonuclease of a Class 2 CRISPR-Cas System. Cell. 2015; 163(3): 759-71.

47. Fonfara I, Richter H, Bratovic M, Le Rhun A, Charpentier E. The CRISPR-associated DNA-cleaving enzyme Cpf1 also processes precursor CRISPR RNA. Nature. 2016; 532(7600): 517-21.

48. Yamano T, Nishimasu H, Zetsche B, Hirano H, Slaymaker IM, Li Y, et al. Crystal Structure of Cpf1 in Complex with Guide RNA and Target DNA. Cell. 2016; 165(4): 949-62.

49. Choi KY, Silvestre OF, Huang X, Hida N, Liu G, Ho DN, et al. A nanoparticle formula for delivering siRNA or miRNAs to tumor cells in cell culture and in vivo. Nature protocols. 2014; 9(8): 1900-15.

50. Pattanayak V, Lin S, Guilinger JP, Ma E, Doudna JA, Liu DR. High-throughput profiling of off-target DNA cleavage reveals RNA-programmed Cas9 nuclease specificity. Nature Biotechnology. 2013; 31(9):839-43.

51. Yin H, Kanasty RL, Eltoukhy AA, Vegas AJ, Dorkin JR, Anderson DG. Non-viral vectors for gene-based therapy. Nature Reviews Genetics. 2014; 15(8): 541-55.

52. Sheridan C. Gene therapy finds its niche. Nature Biotechnology. 2011; 29(2): 121-8.

53. Ramakrishna S, Dad A-BK, Beloor J, Gopalappa R, Lee S-K, Kim H. Gene disruption by cell-penetrating peptide-mediated delivery of Cas9 protein and guide RNA. Genome Research. 2014; 24: 1020–7.

54. Kotterman MA, Schaffer DV. Engineering adeno-associated viruses for clinical gene therapy. Nature Reviews Genetics. 2014; 15(7): 445-51.

[Downloaded from journal.jmu.ac.ir on 2026-11-10]

55. Rajabibazl M, Rasaee MJ, Forouzandeh M, Rahimpour A. Retroviral transduction of fluonanobody and the variable domain of camelid heavy-chain antibodies to chicken embryonic cells. Iranian Journal of Immunology. 2013; 10(4): 247-58.
56. Ran FA, Cong L, Yan WX, Scott DA, Gootenberg JS, Kriz AJ, et al. In vivo genome editing using Staphylococcus aureus Cas9. Nature. 2015; 520(7546): 186-91.
57. Li L, He ZY, Wei XW, Gao GP, Wei YQ. Challenges in CRISPR/CAS9 Delivery: Potential Roles of Nonviral Vectors. Human Gene Therapy. 2015; 26(7): 452-62.
58. Gasiunas G, Barrangou R, Horvath P, Siksnys V. Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2012; 109(39): E2579-86.
59. Sun W, Ji W, Hall JM, Hu Q, Wang C, Beisel CL, et al. Self-assembled DNA nanoclews for the efficient delivery of CRISPR-Cas9 for genome editing. Angewandte Chemie *International* Edition. 2015; 54(41): 12029-33.
60. Han X, Liu Z, Jo MC, Zhang K, Li Y, Zeng Z ,et al. CRISPR-Cas9 delivery to hard-to-transfect cells via membrane deformation. Science Advances. 2015; 1(7): e1500454.
61. Ma M, Ye AY, Zheng W, Kong L. A guide RNA sequence design platform for the CRISPR/Cas9 system for model organism genomes. BioMed Research International. 2015; 31(7): 1120–1123.
62. Prykhozhij SV, Rajan V, Gaston D, Berman JN. CRISPR multitargeter: a web tool to find common and unique CRISPR single guide RNA targets in a set of similar sequences. PLoS One. 2015; 10(3): e0119372.
63. Bae S, Park J, Kim JS. Cas-OFFinder: a fast and versatile algorithm that searches for potential off-target sites of Cas9 RNA-guided endonucleases. Bioinformatics. 2014; 30(10): 1473-5.
64. Upadhyay SK, Sharma S. SSFinder: high throughput CRISPR-Cas target sites prediction tool. BioMed Research International. 2014; 2014: 1-4.
65. Stemmer M, Thumberger T, Del Sol Keyer M, Wittbrodt J, Mateo JL. CCTop: An Intuitive, Flexible and Reliable CRISPR/Cas9 Target Prediction Tool. PLoS One. 2015; 10(4): e0124633.
66. Montague TG, Cruz JM, Gagnon JA, Church GM ,Valen E. CHOPCHOP: a CRISPR/Cas9 and TALEN web tool for genome editing. Nucleic Acids Research. 2014; 42: W401-7.
67. Sander JD, Maeder ML, Reyon D, Voytas DF, Joung JK, Dobbs D. ZiFiT (Zinc Finger Targeter): an updated zinc finger engineering tool. Nucleic Acids Research. 2010; 38: W462-8.
68. O'Brien A, Bailey TL. GT-Scan: identifying unique genomic targets. Bioinformatics. 2014; 30(18): 2673-5.
69. Guo D, Li X, Zhu P, Feng Y, Yang J, Zheng Z, et al. Online High-throughput Mutagenesis Designer Using Scoring Matrix of Sequence-specific Endonucleases. Journal of Integrative Bioinformatics. 2015; 12(1):35-48.
70. Zhu LJ, Holmes BR, Aronin N, Brodsky MH. CRISPRseek: a bioconductor package to identify target-specific guide RNAs for CRISPR-Cas9 genome-editing systems. PLoS One. 2014; 9(9): e108424.
71. Heigwer F, Kerr G, Boutros M. E-CRISP: fast CRISPR target site identification. Nature methods. 2014; 11(2): 122-3.
72. Mekler V, Minakhin L, Semenova E, Kuznedelov K, Severinov K. Kinetics of the CRISPR-Cas9 effector complex assembly and the role of 3'-terminal segment of guide RNA. Nucleic Acids Research. 2016; 44(6): 2837-45.

[Downloaded from journal.jmu.ac.ir on 2026-11-10]