

کاربرد روش‌های مولکولی نوین CRISPR/Cas در تشخیص اختصاصی سویه‌های COVID-19

● مریم احمد زاده

دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه ژنتیک، دانشکده علوم پایه،
موسسه آموزش عالی آل طه، تهران، ایران

mahmadzadeh@ut.ac.ir

● پروفیسور محمد حسین صنعتی

استاد تمام گروه بیوتکنولوژی پزشکی و مسئول فنی بخش
ژنتیک آزمایشگاه، پژوهشکده بیوتکنولوژی پزشکی، پژوهشگاه
ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران، ایران

mhsanati@yahoo.com

● دکتر فاطمه اکبریان

استادیار، گروه ژنتیک، دانشکده علوم پایه، موسسه آموزش عالی
آل طه، تهران، ایران

f.akbarian1@gmail.com

چکیده

سندرم تنفسی حاد جدید 2 (SARS-CoV-2) Coronavirus 2 یکی از عوامل عفونت تنفسی حاد است که منجر به مرگ بیش از دو میلیون نفر در سراسر جهان و بستری شدن هزاران نفر تا سال ۲۰۲۱ شده است. درصد قابل توجهی از بیماران در آزمایش RT-PCR برای SARS-CoV-2 مثبت هستند. ناقلین بدون علائم یا افرادی که قبل از بروز علائم هستند، با فعالیت‌های اجتماعی خود، انتشار ویروس در جامعه را تسهیل می‌کنند. از این رو، دسترسی به تست‌های تشخیصی تجاری برای تشخیص عفونت در مراحل اولیه، نظارت بر بیماری و پیگیری بیماران ضروری است. اخیراً، تشخیص‌های مبتنی بر CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) به دلیل زمان نتیجه دهی سریع‌تر و پتانسیل آن‌ها برای استفاده در آزمایش‌های مراقبت فردی، به عنوان جایگزین‌های جذابی برای RT-PCR ظاهر شده‌اند. توالی پالیندروم کوتاه خوشه‌ای با فواصل منظم تکراری به اختصار CRISPR نامیده می‌شود و به عنوان یک سیستم دفاع شخصی برای پروکاریوت‌ها عمل می‌کند. این سیستم اسیدنوکلئیک بیماری‌زای خاص را شناسایی و سپس در عملکرد ژنوم خارجی مهاجم تداخل می‌کند و از آن‌ها

در برابر مهاجمان خارجی محافظت می‌کند. در نهایت، محققین چالش‌ها و چشم‌اندازهای آینده سیستم‌های تشخیصی مبتنی بر سیستم CRISPR-Cas در زیست پزشکی را مورد بحث قرار می‌دهند، به این امید که بتوانند الهام بخش توسعه تشخیص‌های زیست پزشکی باشند.
واژگان کلیدی: سیستم ایمنی، CRISPR/Cas، COVID-19، RT-qPCR

مقدمه

۱- سیستم CRISPR/Cas

۱-۱: مکان ژنی سیستم CRISPR/Cas

مکان‌های CRISPR از توالی‌های تکراری با طول حدود ۲۰ تا ۴۰ جفت باز تشکیل شده‌اند که با دنباله‌های منحصر به فرد بین ۲۰ تا ۵۸ جفت بازی به نام فاصله دهنده از یکدیگر جدا شده‌اند. مجموعه‌ای از توالی‌ها در پایین دست مکان CRISPR قرار دارند که پروتئین‌های Cas را کد می‌کند. در زمان کشف آن‌ها نشان داده شد که برخی از این پروتئین‌ها همان‌هایی هستند که قبلاً تصور می‌شد در ترمیم DNA نقش دارند [۱].

مکان ژنی سیستم CRISPR/Cas شامل ۳ قسمت اصلی است: ژن‌های Leader، ژن‌های Cas و توالی

کریسپر (crispr array).

تداخل است.

مرحله ۱: این مرحله تزریق یا ورود ژنوم فاژ به ژنوم میزبان است. سازگاری یا adaptation به عنوان درج یا به دست آوردن نامیده می‌شود (insertion or acquisition) و فرآیندی است که در آن توالی DNA خارجی در توالی CRISPR ادغام می‌شود. ادغام یک spacer جدید توسط کمپلکس پروتئینی هتروگزامری (Cas1)2 – Cas2)) به درون توالی CRISPR انجام می‌شود. دو سیستم برای درج شدن توالی‌های protospacer در ژنوم باکتریایی وجود دارد. سیستم نوع I از integration host factor (IHF) استفاده می‌کند که به دنباله توالی leader متصل شده است و باعث خم شدن DNA می‌شود. این خم شدن کمپلکس پروتئینی هتروگزامری را قادر می‌سازد تا یک شکاف اولیه را برای قرار دادن فاصله دهنده ایجاد کند. در سیستم نوع II توالی leader anchoring sequence (LAS) با استفاده از پروتئین Cas1 تشخیص داده می‌شود و سپس، polar spacer وارد می‌شود (شکل ۱) [۳].

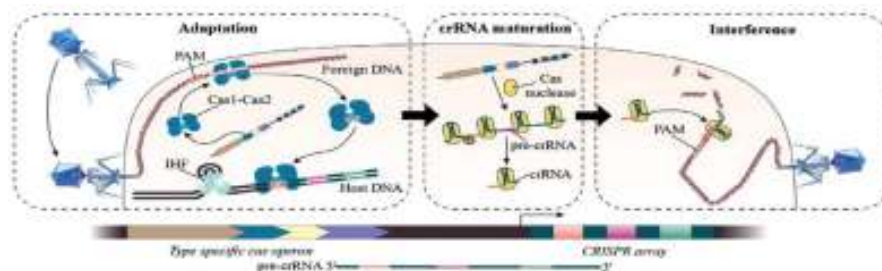
مرحله ۲: در مرحله دوم یا expression رونویسی توالی کریسپر به pre-crRNA و پروتئین‌های cas را خواهیم داشت. این pre-crRNA که دارای ساختارهای ساقه-حلقه مانند است با پردازش بیشتر کوتاه‌تر شده و به crRNA بالغ تبدیل می‌شود.

مرحله ۳: در مرحله سوم یا Interference بسته به این که کدام کلاس سیستم کریسپر باشد با استفاده از کمپلکس پروتئینی یا تک پروتئین cas تشخیص توالی‌های یکسان یا بسیار مشابه در ژنوم ویروس یا پلاسمید مهاجم صورت می‌گیرد. پس از شناسایی، ژنوم مهاجم، توسط این پروتئین‌ها شکسته شده و غیر فعال می‌شود [۴].

توالی کریسپر خود شامل توالی‌های تکراری (repeat sequence) و توالی‌های غیر تکراری یا (spacer sequence) است. این یعنی CRISPR شامل توالی‌های تکراری محافظت شده در ژنوم می‌باشد که توسط قطعاتی از جنس DNA تحت عنوان فاصله انداز (Spacer) که از DNA عامل بیگانه منشأ می‌گیرند از هم جدا شده‌اند. مکان ژنی کریسپر دارای ترکیبی از ژن‌های کد کننده مرتبط با کریسپر تحت عنوان ژن‌های Cas و یک سری ژن‌های غیر کد کننده هستند که باعث برش هدفمند اسید نوکلئیک‌ها می‌گردند. در واقع عملکرد کریسپر و پروتئین‌های Cas، باعث ایجاد ایمنی اکتسابی برای باکتری‌ها در مقابل حمله ویروس‌ها و پلاسمیدها است. توالی leader در مجاورت آرایه CRISPR قرار دارد و در مرحله سازگاری و رونویسی نقش دارد. مشاهده‌ها نشان داده است که مکان‌های CRISPR بدون توالی leader در مرحله سازگاری غیر فعال هستند اما هم چنان می‌توانند در crRNA-directed interference نقش داشته باشند [۲].

۲-۱- عملکرد سیستم CRISPR/Cas

در ابتدا عملکرد سیستم کریسپر نامشخص بود. حضور گسترده این سیستم در باکتری‌ها و آرکی باکتری‌ها تنها ما را در مورد ارتباط بین آن‌ها و مقاومت باکتری‌ها در برابر باکتریوفاژها آگاه کرد. دانشمندان پس از بررسی‌های متعدد دریافتند که پس از عفونت ویروسی، توالی‌های جدید spacer از باکتریوفاژ مهاجم (ویروس‌های ژنومی وارد شده) به ژنوم میزبان وارد می‌شود. هر گونه افزودن یا حذف این توالی‌ها، فنوتیپ مقاومت به فاژ را تغییر می‌دهد. مراحل مهم عملکرد CRISPR شامل سازگاری، بیان و



شکل ۱) مراحل عملکرد سیستم کریسپر (Wang and Cui, 2020).



۳-۱- کاربردهای سیستم CRISPR/cas

به طور کلی می‌توان گفت سیستم CRISPR برای ویرایش ژنوم، غربالگری، فعال سازی رونویسی و سرکوب آن، ویرایش اپی ژنتیک، تصویر برداری زنده از DNA/mRNA، برنامه‌های درمانی و تشخیص کاربرد دارد. این تکنیک جهت حذف و اضافه کردن توالی‌های کوچک در ژنوم، تنظیمات مربوط به بیان ژن‌ها، فعال یا غیر فعال کردن بیان ژن‌ها، تعیین مکان و بررسی یا غربالگری موقعیت‌های ژنومی قابل به کارگیری می‌باشد. اگر چه تکنیک کریسپر در گستره وسیعی از کارهای تحقیقاتی به عنوان یک ابزار به کار گرفته می‌شود، می‌توان از آن برای هدف قرار دادن بیماری‌های ژنتیکی هم استفاده کرد. انواعی از بیماری‌های ژنتیکی که تکنیک کریسپر Cas9 در درمان و تحقیقات وسیع بر روی آن‌ها موفقیت آمیز بوده است می‌توان بتاتالاسمی، آب مروارید، دیستروفی عضلانی دوشن، کیستیک فیبروز، HIV_1 (human immunodeficiency viruses) و LDL_C (Low-density lipoprotein cholesterol) را نام برد. روش کریسپر یک روش مناسب جهت ژن درمانی نیز می‌باشد. همچنین در انواع سرطان‌ها برای درمان و ردیابی جهش ژن مربوطه قابل استفاده می‌باشد. مسئله‌ای که امروزه خیلی مورد توجه قرار گرفته این است که بسیاری از بیماری‌های غیر قابل درمان، منشأ ویروسی دارند. تحقیقات انجام شده نشان می‌دهد که می‌توان از کریسپر به عنوان یک ضد ویروس استفاده کرد و جهت جستجو و تخریب ویروس‌هایی که دارای ژنوم RNA هستند نیز قابل استفاده می‌باشد. حتی از کریسپر می‌توان جهش تشخیص عوامل عفونی نظیر پاتوژن‌های ویروسی و باکتریایی هم استفاده کرد [۵]. تکنیک کریسپر در تولید آنتی بیوتیک که پروسه‌ای طولانی اما کاربردی است نیز می‌تواند دخیل باشد. در این پروسه در باکتری‌ها جهش ایجاد می‌شود، بدون آن که نیاز به شکستن DNA باشد، این جهش باعث سستی و خمیدگی ژنوم آن‌ها شده و در نهایت بیان دوباره ژن و حذف برخی قسمت‌های کروموزوم باعث تولید آنتی بیوتیک‌های جدید می‌شود. از دیگر کاربردهای این روش که انقلابی در فناوری به خصوص بیوتکنولوژی محسوب می‌شود، ساخت عضو پیوندی است. علاوه بر این درمان بیماران قلبی با

کریسپر شایان ذکر است که تا کنون ویرایش ژنتیکی مربوط به بیماری قلبی در جنین انسان انجام شده است. در گذشته عفونت‌های ناشی از باکتری‌های گوناگون عامل مرگ افراد زیادی بود که کشف آنتی بیوتیک‌ها این مشکل را برطرف کرد. اما در حال حاضر مصرف خود سرانه آنتی بیوتیک‌ها و فاکتورهای دیگری سبب شده است که برخی باکتری‌ها به آنتی بیوتیک‌ها مقاوم شوند، که این مشکل با روش کریسپر و حذف باکتری مقاوم به آنتی بیوتیک می‌تواند برطرف شود.

در حوزه گیاهی می‌توان با روش کریسپر صفات تغذیه‌ای را بهبود بخشید، با توجه به این که بخشی از غذای انسان را گیاهان تأمین می‌کنند مسئله آینده ما، کم شدن گیاهان و پوشش گیاهی باشد که این بحران می‌تواند به دلیل خشک سالی، کم آبی، از دست رفتن مقاومت و یا مقاومت کم آن‌ها به این عنوان‌ها باشد. ضمناً بذرهایی با این روش می‌توان تولید کرد که قدرت بیشتری در رشد و نسبت به سایر عوامل محیطی تأثیر پذیری کمتر و مقاومت در برابر آفات را داشته باشد [۶].

یکی از کمک‌های بزرگی که این علم نوین به بشریت کرده، تولید حیوانات مدل می‌باشد. شرکت‌ها و کارخانه‌های داروسازی که بر روی داروها مطالعه می‌کنند برای بررسی روند اثر گذاری دارو، درمان و یا حتی تعویق بیماری نیاز به تست این داروها بر روی انسان دارند، مثلاً موش‌های مدل هموفیلی با روش کریسپر ساخته شده که علائم بیماری هموفیلی را در انسان دارد که مدل خوبی برای تست اثر گذاری دارو می‌باشد. در نهایت روش کریسپر یک فناوری بی نظیر است که قابلیت متحول سازی در حوزه بیوتکنولوژی و پزشکی را دارد اما باید این موضوع را در نظر گرفت که خطرات احتمالی آن هنوز به طور حتم و کامل مشخص نیست به خصوص این که حتی می‌تواند آثار سوء هم داشته باشد [۷].

۲- بیماری COVID-19

۱-۲- اپیدمیولوژی عفونت COVID-19

این ویروس‌ها دارای ژنوم RNA با سنس مثبت و حاوی پوشش و تک رشته‌ای هستند که برای اولین بار در سال ۱۹۶۵ از انسان جدا شدند. در زمان‌های اخیر، سه

کرونا ویروس عمده منجر به شیوع بیماری‌ها شده است، که با سندرم تنفسی حاد (SARS-CoV) در سال ۲۰۰۲ شروع شد و پس از آن سندرم تنفسی خاورمیانه (MERS-CoV) در سال ۲۰۱۲ و در حال حاضر سندرم تنفسی حاد ویروس کرونا ۲ (SARS-CoV-2)، در دسامبر ۲۰۱۹، چین از شیوع ذات‌الریه به دلایل نامعلوم در ووهان خبر داد. با استفاده از فناوری NGS (Next-generation sequencing) یک ویروس کرونا ناشناخته از نمونه‌های دستگاه تنفسی تحتانی این بیماران کشف شد. از سلول‌های اپیتلیال مسیر تنفسی انسان برای جداسازی ویروسی که در سال ۲۰۱۹ کرونا ویروس جدید یا nCoV - 2019 نام گذاری شده بود، استفاده کردند. از نظر فیلوژنتیک، مشخص شد که ویروس کرونا بیشتر شبیه دو گونه کرونا ویروس مشتق از خفاش است (۸۸٪ شباهت) است نسبت به کرونا ویروس‌هایی که تا کنون انسان را آلوده کرده بودند، از جمله SARS (۷۹٪ شباهت) و MERS (۵۰٪ شباهت). در ۱۱ مارس ۲۰۲۰، WHO، پس از ارزیابی وضعیت بیماری در سراسر جهان، COVID-19 را به عنوان یک بیماری همه‌گیر اعلام کرد. طیف بیماری COVID-19 بدون علامت تا فاز بحرانی آن یعنی مرگ و میر متغیر است. در گزارشی از ۷۲۳۱۴ مورد از مرکز کنترل و پیشگیری از بیماری‌های چین، ۸۱٪ موارد به عنوان بیمار با علائم خفیف (بدون ذات‌الریه یا ذات‌الریه خفیف) و ۱۴٪ به عنوان بیمار با علائم شدید (تنگی نفس، فرکانس تنفسی ۳۰ بار در دقیقه و درصد اشباع اکسیژن خون کمتر از ۹۳٪) طبقه‌بندی شدند. از آنجا که SARS-CoV-2 یک ویروس جدید است، کل جمعیت جهان مستعد این ویروس هستند. تا زمانی که ایمنی جمعی از طریق واکسیناسیون یا عفونت ایجاد نشود، جمعیت همچنان در خطر خواهد بود [۸].

۲-۲- ضرورت تشخیص COVID-19

بیماری‌های واگیردار جزو خطرناک‌ترین تهدیدها برای سلامت انسان‌ها هستند، زیرا ۱۵٪ از کل مرگ و میر در سراسر جهان را موجب می‌شوند و بار عظیمی از ضررهای اقتصادی و نگرانی‌های عمومی را به همراه دارند [۹].

بیماری‌های عفونی اغلب توسط میکروارگانیسم‌های بیماری‌زای مختلف از جمله باکتری‌ها، ویروس‌ها، قارچ‌ها و انگل‌ها ایجاد می‌شوند. در قرن بیست و یکم، تعدادی بیماری عفونی جدید ظاهر شده است، مانند آنفلوآنزای مرغی، ویروس ابولا، ویروس‌های زیکا، SARS، MERS و همچنین اپیدمی ویروس SARS-CoV-2 که گفته شد هم اکنون سراسر جهان با این بیماری درگیر است [۱۰]. هر تصمیمی در مورد مدیریت همه‌گیری کووید-۱۹ به ارزیابی صحیح پزشکی و آزمایش‌های تشخیصی بستگی دارد. بر خلاف سایر بیماری‌ها، بیماری‌های عفونی به خصوص بیماری ویروسی کووید-۱۹ می‌تواند در مدت زمان نسبتاً کوتاهی به طور گسترده در بین جمعیت گسترش یابد. بنابراین، تعیین سریع عوامل بیماری‌زا و دستیابی به تشخیص اولیه افراد آلوده از اهمیت بسیار زیادی برخوردار است. لذا می‌بایست در پی راهی سریع، دقیق، حساس و قابل اعتماد برای تشخیص این بیماری‌ها بود.

۳- کریسپر به عنوان ابزاری برای تشخیص

ویژگی‌هایی از جمله سریع، حساس، اختصاصی، دقیق، ارزان و قابل اعتماد بودن ابزارهای تشخیصی مبتنی بر CRISPR پتانسیل عظیمی برای کاربردهایی در طیف وسیعی از زمینه‌ها را فراهم می‌کند. آن‌ها نه تنها برای تشخیص عوامل بیماری‌زا در طول همه‌گیری، بلکه در تشخیص سرطان، شناسایی پلی مورفیسم تک نوکلئوتیدی (SNPs) و تشخیص بیماری‌های ژنتیکی نیز توانمندی دارند. نمونه‌هایی از توالی‌های هدف این سیستم شامل توالی جهش‌های انکوژنیک یا توالی‌های ویروسی و باکتریایی مشتق شده از عامل عفونی است. هدف سیستم‌های CRISPR شناسایی عوامل بیماری‌زای خاص و همچنین ترمیم آلل‌های ایجاد کننده بیماری از طریق ویرایش توالی DNA خاص در مکان‌های دقیق کروموزوم است. به دلیل نیاز به تشخیص دقیق در بسیاری از بیماری‌ها، کاربرد مهم دیگری از سیستم CRISPR-Cas پدیدار شده است: تشخیص بیماری‌ها و میکروب‌ها. اگر چه پلتفرم‌های قدرتمند و کارآمدی بر اساس CRISPR-Cas9 توسعه یافته‌اند، اما کشف Cas13a (C2c2 سابق) و Cas12a (Cpf1 سابق) در مکان‌های دقیق کروموزوم است. به دلیل نیاز به تشخیص



به Nidovirales هستند. خانواده Coronaviridae به دو گروه Coronavirinae و Torovirinae طبقه‌بندی می‌شوند. زیرخانواده Coronavirinae از گروه‌های آلفا، بتا، گاما و دلتا تشکیل شده است که انسان‌ها را توسط گروه‌های آلفا (E229، NL63) و بتا (OC43، HKU1) آلوده می‌کنند. سندرم تنفسی خاورمیانه (MERS) و سندرم تنفسی حاد (SARS) کرونا و ویروس‌های دیگری از ویروس‌های گروه بتا هستند که انسان‌ها را درگیر می‌کنند. کرونا ویروس در انسان می‌تواند باعث عفونت در دستگاه تنفسی، گوارشی و کبد شود که منجر به هر دو علائم خفیف مانند سرماخوردگی می‌شود و یا حتی می‌تواند مرگ و میر به همراه داشته باشد. علاوه بر این، علائم ایجاد شده توسط این ویروس‌ها در سایر گونه‌های جانوری متفاوت است. به عنوان مثال، آن‌ها باعث عفونت در دستگاه تنفسی فوقانی جوجه‌ها می‌شوند، در حالی که باعث ایجاد اسهال در گاوها و خوک‌ها می‌شوند [۱۴].

تشخیص زود هنگام عفونت ویروسی ممکن است امکان مداخله سریع را فراهم آورد، که این امر می‌تواند به طور موثری خطر انتقال بیماری به دیگران را به حداقل برساند. یکی از رایج‌ترین تکنیک‌ها برای تشخیص اسید نوکلئیک‌های ویروسی است و به دلیل حساسیت و دقت بالای آن، به عنوان تکنیکی استاندارد برای تشخیص عفونت‌های ویروسی استفاده می‌شود. از تست کمی PCR (qPCR) می‌توان برای تشخیص COVID-19 استفاده کرد، اما دسترسی محدود به تجهیزات و مواد qPCR ممکن است روند تشخیص را کند کند. روش‌های Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) و recombinase polymerase amplification (RPA) رویکردهایی هستند که به دلیل ارزان بودن، سرعت بالا و تطبیق پذیری (versatility) جایگزین‌های مناسبی برای PCR هستند. ویژگی تکثیر ایزوترمال که در دمای ثابت انجام می‌شود و نیازی به چرخه تغییر دما ندارد، یکی از جنبه‌های کلیدی RPA و LAMP است و همچنین می‌تواند با حداقل ابزار و تجهیزات انجام شود [۱۵]. همان‌طور که در قبل نیز گفته شده سیستم کریسپر، که در حال حاضر به یک سیستم ویرایش ژنوم قدرتمند تبدیل شده است، متکی بر

که هر دو دارای فعالیت برش متوالی یا همزمان (collateral cleavage activity) هستند، زمینه تشخیص اسیدنوکلئیک را متحول کرده است. با استفاده از این اصل که اسیدهای نوکلئیک نشانگرهای زیستی اصلی برای بیماری‌ها هستند، روش‌های تشخیصی مبتنی بر CRISPR در درجه اول بر شناسایی توالی خاصی که مربوط به بیماری می‌باشد و سپس برش آن به منظور تولید یک سیگنال قابل خوانش متکی است [۱۱].

ماهیت حساس بودن تست‌های تشخیصی CRISPR از این واقعیت ناشی می‌شود که اکثر آن‌ها قادر به استفاده از پروب‌های فلورسنت هستند که بسیار حساس می‌باشند. این ویژگی از اتصال به هدف از طریق قانون جفت شدن بازهای واتسون-کریک بین DNA-RNA یا RNA-RNA ناشی می‌شود. همچنین این آزمایش‌ها می‌توانند به سرعت انجام شوند زیرا نیازی به ایزوله کردن کشت یا استخراج DNA ژنومی نیست.

برای تشخیص ویروس‌ها از آن‌جا که این آزمایش بر اساس تشخیص ژنوم ویروسی است، می‌توان از آن در هر مرحله از عفونت، به ویژه در مراحل اولیه دوره کمون، بدون نیاز به آزمایش‌های تأییدی اضافی استفاده کرد [۱۲].

۳-۱- استفاده از سیستم CRISPR/Cas برای تشخیص COVID-19

ظهور سندرم تنفسی حاد ویروس کرونا ۲ (SARS-CoV-2)، که به کرونا ویروس جدید ۲۰۱۹ (COVID-19) نیز معروف است، برای اولین بار در دسامبر ۲۰۱۹ در ووهان چین مشاهده شد. این بیماری ویرانگر باعث ایجاد تعداد زیادی مرگ و میر در سراسر جهان شده است و تعداد کشته‌ها روز به روز در حال افزایش است. کرونا ویروس‌ها، یک عامل بیماری‌زای بزرگ در انسان‌ها و حیوانات هستند. گروهی از ویروس‌های دارای پوشش و دارای ژنوم RNA هستند. به دلیل ساختار تاج مانند در سطح آن‌ها، این ویروس‌ها کرونا ویروس نامیده می‌شوند (در لاتین، "corona" به معنی "تاج" است) [۱۳]. این ویروس‌ها بزرگ‌ترین گروه را از نظر Nidovirales تشکیل می‌دهند. Coronaviridae، Arteriviridae، Mesoniviridae و Roniviridae خانواده

فعالیت پروتئین‌های Cas با حضور RNA راهنما می‌باشد. انواع مختلفی از سیستم‌های CRISPR برای طراحی و توسعه روش‌های تشخیصی مولکولی ساده، قابل حمل، دقیق، کارآمد، سریع و ارزان استفاده شده است. تشخیص موفقیت آمیز اسیدهای نوکلئیک توسط سیستم *crispr/dcas9* (*dCas9*) نوعی جهش یافته از *Cas9* است که فعالیت اندونوکلازی آن از طریق جهش‌های نقطه‌ای در دومین‌های اندونوکلازی آن حذف می‌شود (چندین بار گزارش شده است. رویکردهای تقویت همدم RPA و LAMP معمولاً در کارهای تشخیصی مبتنی بر CRISPR برای تکثیر توالی ژنومی هدف استفاده می‌شود. سیستم CRISPR یک سیستم ساده، کارآمد و قابل اعتماد است که محققان را قادر می‌سازد تا تغییرات دلخواه را در توالی ژنومی ایجاد کنند که ممکن است عملکرد ژن را تغییر دهد. کلاس II سیستم کریسپر به طور گسترده‌ای برای دستکاری ژنومی و تشخیص بیماری‌های عفونی استفاده می‌شود [۱۶]. به تازگی، سیستم‌های تشخیصی مبتنی بر CRISPR توسعه یافته‌اند که شامل استفاده از آنزیم‌های *Cas12* و *Cas13* است. مانند *Cas9*، اندونوکلاز *Cas12* از طریق *gRNA* به ناحیه ژنومی مورد نظر متصل می‌شود و باعث شکست ژنوم هدف می‌شود. با این حال، در عمل تفاوت بین *Cas9* و *Cas12* در این است که وقتی *Cas12* شروع به برش DNA هدف می‌کند، همچنین شروع به شکستن DNA تک رشته‌ای مجاور نیز می‌کند، به طوری که یک مولکول گزارشگر فلورسنت شکسته شده در اطراف ژنوم هدف سیگنال قابل تشخیصی ارائه می‌دهد. اندونوکلاز *Cas13* عملکردی مشابه *Cas12* دارد، اما بر خلاف *Cas12* روی توالی RNA عمل می‌کند. یک سیستم مبتنی بر *CRISPR/Cas13* می‌تواند طوری برنامه ریزی شود که توالی *SARS-CoV-2* را هدف قرار دهد که در آن اندونوکلاز *Cas13* می‌تواند از طریق *gRNA* حمله کرده و ناحیه مورد نظر را از بین ببرد تا در نهایت ویروس‌ها را از بین ببرد [۱۷].

□ بحث و نتیجه گیری

گفته شد ویژگی اصلی سیستم‌های *CRISPR/Cas* استفاده از اندونوکلازهای Cas با نقش هدایت‌گری

توسط RNA (حضور توالی *gRNA*) است که از این RNA کوتاه برای مکان‌یابی و برش نوکلئیک اسیدهای مکمل استفاده می‌کنند. مطالعات اخیر ویژگی‌هایی را نشان می‌دهد که دانشمندان پیچیدگی‌های قابل توجهی به این مکانیسم می‌افزایند. پس از تشخیص اسیدهای نوکلئیک مکمل توسط *crRNA*، بسیاری از سیستم‌های *CRISPR-Cas* همچنین RNA یا *ssDNA* غیر هدف را تخریب می‌کنند. بسیاری از بازدارنده‌های اندونوکلازهای Cas در ژنوم‌های فاژ یافت شده‌اند، که نشان از نیاز به ایجاد عفونت در میزبان به طور مشترک در این ویروس‌ها برای سرکوب تدریجی پاسخ ایمنی *CRISPR-Cas* دارد. استراتژی‌های مبتنی بر *CRISPR* یک رویکرد جدید برای بسیاری از بیماری‌های عفونی چالش برانگیز است. می‌توان از فناوری‌های *CRISPR* برای ایجاد سیستم‌های تشخیص سریع و کم هزینه و همچنین شناسایی ژن‌های مقاوم در برابر دارو استفاده کرد. درمان‌های مبتنی بر *CRISPR* برای ویروس‌های در حال ظهور، مانند *SARS-CoV-2*، نیز پیشنهاد شده است.

افزایش فزاینده تعداد مرگ و میر ناشی از شیوع *COVID-19* باعث نگرانی عمده در سراسر جهان شده است. یکی از جنبه‌های گیج‌کننده *COVID-19* این است که طیف گسترده‌ای از علائم را در بیماران نشان می‌دهد. بنابراین، رویکردهای بسیار حساس، خاص و دقیق باید برای تشخیص زود هنگام و در نتیجه مدیریت بهتر *COVID-19* ایجاد شود. یکی از ویژگی‌های جذاب *CRISPR* این است که می‌توان آن را طوری برنامه‌ریزی کرد که تقریباً هر ناحیه‌ای را در ژنوم مد نظر هدف قرار دهد. به دنبال شیوع بیماری *COVID-19*، گروه‌های مختلف سیستم‌های تشخیصی متفاوتی را برای تشخیص اسید نوکلئیک *SARS-CoV-2* با استفاده از فعالیت برش غیر انتخابی اندونوکلازهای *Cas12* و *Cas13* ایجاد کرده‌اند. به عنوان مثال، سیستم‌های *CRISPR/Cas12a*، *CRISPR/Cas13a* و *CRISPR/Cas13b* در سال‌های اخیر برای توسعه روش‌های تشخیص سریع و حساس برای تشخیص پاتوژن‌های انسانی (باکتری‌ها و ویروس‌ها) استفاده شده است. سیستمی تحت عنوان *SHERLOCK* توسعه یافته و می‌تواند



مزایای بزرگ سیستم‌های تشخیص مبتنی بر CRISPR است. البته چالش‌هایی نیز بر سر راه تشخیص به واسطه سیستم‌های کریسپر وجود دارد اما به صورت کلی می‌توان گفت این روش یک روش بسیار مؤثر و پربازده به عنوان آزمایش‌های تشخیصی است و تحقیقات بیشتر در جهت توسعه و تجاری سازی پلتفرم‌های شکل گرفته به واسطه کریسپر احتمالاً تأثیر مؤثر و پایداری بر همه گیری فعلی خواهد گذاشت.

توالی اسیدنوکلئیک نمونه بالینی را با حساسیت بالا تشخیص دهد. یکی دیگر از سیستم‌های تشخیص مبتنی بر CRISPR (CRISPR/Cas12) سیستم DETECTR است که عفونت‌های ویروسی را با سرعت (۳۰ دقیقه)، ارزان‌تر و دقیق‌تر از سایر روش‌ها تشخیص می‌دهد. در حال حاضر کیت‌های تشخیص DETECTR و SHERLOCK برای تشخیص SARS-CoV-2 تأیید شده‌اند و به صورت تجاری در دسترس هستند. دستیابی سریع به نتایج یکی از

References:

- 1- Barrangou R et al. (2007) CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science* 315 (5819), 1709–1712.
- 2- Carte J et al. (2008) Cas6 is an endoribonuclease that generates guide RNAs for invader defense in prokaryotes. *Genes Dev* 22 (24), 3489–3496.
- 3- Wang Z, Cui W. CRISPR-Cas system for biomedical diagnostic platforms. *VIEW*. 2020;1:20200008.
- 4- McGinn, J.; Marraffini, L.A. Molecular mechanisms of CRISPR-cas spacer acquisition. *Nat. Rev. Microbiol.* 2019, 17, 7–12.
- 5- Inek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*. (2012) 337:816–21.
- 6- Chen, K., Wang, Y., Zhang, R., Zhang, H. & Gao, C. CRISPR/Cas genome editing and precision plant breeding in agriculture. *Annu. Rev. Plant Biol.* 70, 667–697 (2019).
- 7- Ali, Z. et al. Efficient virus-mediated genome editing in plants using the CRISPR/Cas9 system. *Mol. Plant* 8, 1288–1291 (2015).
- 8- Rello, J.; Storti, E.; Belliati, M.; Serrano, R. Clinical Phenotypes of SARS-CoV-2: Implications for Clinicians and Researchers. *Eur. Respir. J.* 2020, 55, 55.
- 9- Radmard S.; Reid S.; Ciryam P.; Boubour A.; Ho N.; Zucker J.; Sayre D.; Greendyke W. G.; Miko B. A.; Pereira M. R.; Whittier S.; Green D. A.; Thakur K. T. Clinical utilization of the FilmArray meningitis/encephalitis (ME) multiplex polymerase chain reaction (PCR) assay. *Frontiers in neurology* 2019, 10, 281.10.3389/fneur.2019.00281.
- 10- Carossino M.; Ip H. S.; Richt J. A.; Shultz K.; Harper K.; Loynachan A. T.; Del Piero F.; Balasuriya U. B. Detection of SARS-CoV-2 by RNAscope® in situ hybridization and immunohistochemistry techniques. *Arch. Virol.* 2020, 165 (10), 2373–2377.
- 11- Brandsma E.; Verhagen H. J.; van de Laar T. J.; Claas E. C.; Cornelissen M.; van den Akker E.. Rapid, sensitive and specific SARS coronavirus-2 detection: a multi-center comparison between standard qRT-PCR and CRISPR based DETECTR. *medRxiv* 2020.
- 12- Huang W.; Yu L.; Wen D.; Wei D.; Sun Y.; Zhao H.; Ye Y.; Chen W.; Zhu Y.; Wang L.. A CRISPR-Cas12a-based specific enhancer for more sensitive detection of SARS-CoV-2 infection. *medRxiv* 2020.
- 13- Li S.-Y.; Cheng Q.-X.; Liu J.-K.; Nie X.-Q.; Zhao G.-P.; Wang J. CRISPR-Cas12a has both cis-and trans-cleavage activities on single-stranded DNA. *Cell Res.* 2018, 28 (4), 491–493.
- 14- Xiao A. T.; Tong Y. X.; Zhang S. False-negative of RT-PCR and prolonged nucleic acid conversion in COVID-19: rather than recurrence. *J. Med. Virol.* 2020, 92, 1755.10.1002/jmv.25855.
- 15- Joung J.; Ladha A.; Saito M.; Segel M.; Bruneau R.; Huang M.-I. W.; Kim N.-G.; Yu X.; Li J.; Walker B. D.. Point-of-care testing for COVID-19 using SHERLOCK diagnostics. *medRxiv* 2020.
- 16- Arizti-Sanz J.; Freije C. A.; Stanton A. C.; Boehm C. K.; Petros B. A.; Siddiqui S.; Shaw B. M.; Adams G.; Kosoko-Thoroddsen T.-S. F.; Kembell M. E.. Integrated sample inactivation, amplification, and Cas13-based detection of SARS-CoV-2. *bioRxiv* 2020.
- 17- Rauch J. N.; Valois E.; Solley S. C.; Braig F.; Lach R. S.; Baxter N. J.; Kosik K. S.; Arias C.; Acosta-Alvear D.; Wilson M. Z.. A Scalable, easy-to-deploy, protocol for Cas13-based detection of SARS-CoV-2 genetic material. *bioRxiv* 2020.