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

● مریم احمد زاده

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

mahmadzadeh@ut.ac.ir

● دکتر فاطمه اکبریان

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

f.akbarian1@gmail.com

● پروفسور محمد حسین صنعتی

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

mhsanati@yahoo.com

❑ چکیده

سندرم تنفسی حاد جدید 2 Coronavirus (SARS-CoV-2) یکی از عوامل عفونت تنفســـی حاد است که منجر به مرگ بیش از دو میلیون نفر در سراســـر جهان و بســـتری شدن هزاران نفر تا ســـال ۲۰۲۱ شده است. درصد قابل توجهی از بیمـــاران در آزمایـــش RT-PCR بـــرای SARS-CoV-2 مثبت هســـتند. ناقلیـــن بدون علائم یا افرادی که قبل از بروز علائم هستند، با فعالیت‌های اجتماعی خود، انتشار ویروس در جامعه را تسهیل می‌کنند. از این رو، دسترســـی به تست‌های تشـــخیصی تجاری برای تشخیص عفونت در مراحل اولیه، نظارت بر بیماری و پیگیری بیماران ضـــروری اســـت. اخیـــراً، تشـــخیص‌های مبتنـــی بـــر CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats)

بـــه دلیل زمان نتیجه دهی ســـریع‌تر و پتانســـیل آن‌ها بـــرای اســـتفاده در آزمایش‌های مراقبت فـــردی، به عنوان جایگزین‌های جذابی برای RT-PCR ظاهر شده‌اند. توالی پالیندروم کوتاه خوشه‌ای با فواصل منظم تکراری به اختصار CRISPR نامیده می‌شـــود و به عنوان یک سیستم دفاع شـــخصی برای پروکاریوت ها عمل می‌کند. این سیســـتم اســـیدنوکلئیک بیماری زای خاصی را شناســـایی و سپس در عملکرد ژنوم خارجـــی مهاجم تداخل می‌کند و از آن‌ها در برابر مهاجمـــان خارجی محافظت می‌کنـــد. در نهایت، محققیـــن چالش‌ها و چشـــم‌اندازهای آینده سیســـتم‌های تشـــخیصی 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 کلیـــدی: سیســـتم ایمنـــی 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 فـــرد بین ۲۰ تا ۵۸ جفت بازی به نـــام فاصله دهنده از یکدیگر جدا شده‌اند. مجموعه‌ای از توالی‌ها در پایین دست مکان CRISPR قرار دارنـــد که پروتئین‌های Cas را کد می‌کند. در زمان کشـــف آن‌ها نشـــان داده شد که برخی از این پروتئین‌ها همان‌هایی هســـتند که قبلاً تصور می‌شد در ترمیم DNA نقش دارند [۱].

مکان ژنی سیســـتم CRISPR/Cas شـــامل ۳ قسمت اصلی اســـت: ژن‌هـــای Leader، ژن‌هـــای Cas و توالی

[Downloaded from labdiagnosis.ir on 2026-06-03]

کریسپر (crispr array).

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 نوکلئیک ها 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].

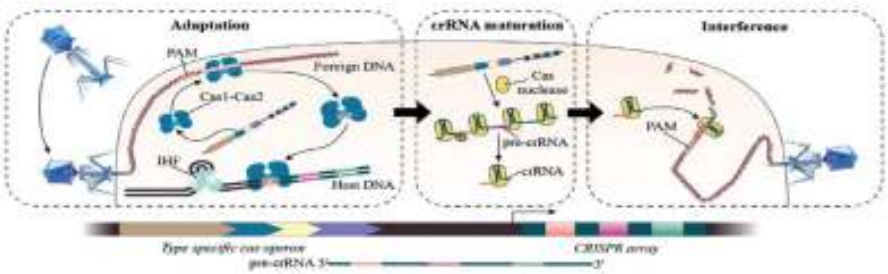
۲-۱- عملکرد سیستم CRISPR/Cas

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 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 هتروهگزامری(2 (2Cas – 2(Cas1)) 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 هگزامری 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].



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

[Downloaded from labdiagnosis.ir on 2026-06-03]

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) LDL_C (Low-density lipoprotein cholesterol) و ... 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 پاتوژن های 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 بیوتیک های 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 بیوتیک ها این مشکل را برطرف کرد. اما در حال حاضر مصرف خود سرانه آنتی بیوتیک ها و فاکتورهای دیگری سبب شده است که برخی باکتری‌ها به آنتی بیوتیک ها 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

۲-۱- 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

[Downloaded from labdiagnosis.ir on 2026-06-03]

کرونا ویروس عمده منجر به شـیوع بیماری‌ها شـده است، که با سـندرم تنفسـی حـاد (SARS-CoV) در سـال ۲۰۰۲ شـروع شد و پس از آن سـندرم تنفسی خاورمیانه (MERS-CoV) در سـال ۲۰۱۲ و در حـال حاضـر سـندرم تنفسـی حـاد ویـروس کرونـا ۲ (SARS-CoV-2). در دسـامبر ۲۰۱۹، چین از شیوع ذات‌الریه به دلایل نامعلوم در ووهان خبر داد. با استفاده از فناوری NGS (Next-generation sequencing) یـک ویـروس کرونا ناشـناخته از نمونه‌های دسـتگاه تنفسـی تحتانی این بیماران کشـف شـد. از سـلول‌های اپیتلیال مسـیر تنفسی انسان برای جداسـازی ویروسی که در سال ۲۰۱۹ کرونا ویروس جدید یا nCoV - 2019 نام گذاری شـده بود، اسـتفاده کردند. از نظر فیلوژنتیک، مشـخص شـد که ویروس کرونا بیشتر شـبیه دو گونه کرونا ویروس مشـتق از خفاش است (۸۸٪ شباهت) است نسبت به کرونا ویروس‌هایی که تا کنون انسان را آلوده کرده بودند، از جمله SARS (۷۹٪ شـباهت) و MERS (۵۰٪ شـباهت). در ۱۱ مارس ۲۰۲۰، WHO، پس از ارزیابی وضعیت بیماری در سراسـر جهان، COVID-19 را به عنوان یک بیماری همه‌گیر اعـلام کرد. طیف بیمـاری COVID-19 بدون علامـت تا فاز بحرانـی آن یعنی مرگ و میر متغیر اسـت. در گزارشـی از ۷۲۳۱۴ مورد از مرکز کنترل و پیشـگیری از بیماری‌هـای چین، ۸۱٪ موارد به عنـوان بیمار با علائم خفیـف (بـدون ذات الریه یا ذات الریه خفیـف) و ۱۴٪ به عنوان بیمار با علائم شـدید (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 جـزو خطرناک‌ترین تهدیدها برای سـلامت انسان‌ها هسـتند، زیرا ۱۵٪ از کل مرگ ومیر در سراسـر جهان را موجب می‌شوند و بار عظیمی از ضررهای اقتصـادی و نگرانی‌هـای عمومی را به همـراه دارند [۹].

بیماری‌هـای عفونـی اغلب توسـط میکروارگانیسـم‌های بیمـاری زای مختلف از جمله باکتری‌ها، ویروس‌ها، قارچ‌ها و انگل‌ها ایجاد می‌شـوند. در قرن بیسـت و یکم، تعدادی بیماری عفونی جدید ظاهر شـده اسـت، مانند آنفولانزای مرغی، ویروس ابولا، ویروس‌های زیکا، SARS ،MERS و همچنین اپیدمی ویروس SARS-CoV-2 که گفته شد هم اکنون سراسـر جهان با این بیماری درگیر است [۱۰]. هـر تصمیمی در مورد مدیریت همـه گیری کووید-۱۹ به ارزیابی صحیح پزشـکی و آزمایش‌های تشخیصی بستگی دارد. بـر خلاف سـایر بیماری‌ها، بیماری‌هـای عفونی به خصوص بیماری ویروسی کووید-۱۹ می‌تواند در مدت زمان نسـبتاً کوتاهی به طور گسـترده در بین جمعیت گسترش یابد. بنابراین، تعیین سـریع عوامل بیماری زا و دستیابی به تشخیص اولیه افراد آلوده از اهمیت بسیار زیادی برخوردار اسـت. لذا می‌بایسـت در پی راهی سریع، دقیق، حساس و قابل اعتماد برای تشخیص این بیماری‌ها بود.

۳- کریسپر به عنوان ابزاری برای تشخیص

ویژگی‌هایی از جمله سـریع، حساس، اختصاصی، دقیق، ارزان و قابـل اعتماد بودن ابزارهای تشـخیصی مبتنی بر CRISPR پتانسـیل عظیمی برای کاربردهایی در طیف وسـیعی از زمینه‌هـا را فراهم می‌کند. آن‌هـا نه تنها برای تشـخیص عوامل بیماری زا در طول همـه گیری، بلکه در تشخیص سرطان، شناسایی پلی مورفیسم تک نوکلئوتیدی (SNPs) و تشـخیص بیماری‌های ژنتیکـی نیز توانمندی دارند. نمونه‌هایی از توالی‌های هدف این سیستم شامل توالی جهش‌های انکوژنیک یا توالی‌های ویروسی و باکتریایی مشتق شـده از عامل عفونی است. هدف سیستم‌های CRISPR شناسایی عوامل بیماری‌زای خاص و همچنین ترمیم آلل‌های ایجـاد 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 اسـت: تشخیص بیماری‌ها و میکروب‌هـا. اگر چـه پلتفرم‌های قدرتمنـد و کارآمدی بر اسـاس CRISPR-Cas9 توسـعه یافته‌اند، اما کشف Cas13a (C2c2 سـابق) و Cas12a (Cpf1 سـابق)

[Downloaded from labdiagnosis.ir on 2026-06-03]

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 پروب های 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 آن جا 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].

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

ظهور سندرم تنفسی حاد ویروس کرونا۲ (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 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 (HKU1، OC43) آلوده می‌کنند. سندرم تنفسی خاورمیانه (MERS) و سندرم تنفسی حاد (SARS) کرونا 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. PCR یکی از رایج‌ترین تکنیک‌ها برای تشخیص اسید نوکلئیک های 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]. همان طور که در قبل نیز گفته شده سیستم کریسپر، که در حال حاضر به یک سیستم ویرایش ژنوم قدرتمند تبدیل شده است، متکی بر

[Downloaded from labdiagnosis.ir on 2026-06-03]

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 اندونوکلئازی آن از طریق جهش‌های نقطه‌ای در دومین‌های اندونوکلئازی آن حذف می‌شود) چندین بار گزارش شده است. رویکردهای تقویت همدما 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، اندونوکلئاز Cas12 از طریق gRNA به ناحیه ژنومی مورد نظر متصل می‌شود و باعث شکست ژنوم هدف می‌شود. با این حال، در عمل تفاوت بین Cas12 و Cas9 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. اندونوکلئاز 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 اندونوکلئاز 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 اندونوکلئازهای Cas با نقش هدایت گری توسط RNA (حضور توالی gRNA) است که از این RNA کوتاه برای مکان یابی 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 باز دارنده‌های اندونوکلئازهای Cas در ژنوم های 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 گیج کننده 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 اندونوکلئازهای 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

[Downloaded from labdiagnosis.ir on 2026-06-03]

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 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.

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, CuiW. 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.; Belliato, 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.-l. 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.; Kemball 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.

[Downloaded from labdiagnosis.ir on 2026-06-03]