فناوری کریسپر و کاربرد آن در صنایع غذایی[1]

احسان یزدان‌پناه[2]، شاهین اقبال سعیدی ابواسحاقی و مرتضی خمیری[3]

چکیده

افزایش جمعیت جهان و تامین غذا یکی از چالش‌هایی پیش‌روی بشر است. یکی از موردهای بسیار مهم و تاثیر گذار برای افزایش میزان تولید مواد غذایی استفاده از مهندسی ژنتیک است؛ و کریسپرCas9[4] یکی از روش‌های نوین شناخته‌شده و دقیق ویرایش ژنوم است. مهمترین ویژگی‌های این فناوری که آن را از دیگر روش‌های مشابه متفاوت می‌کند سادگی استفاده، ارزان‌تر بودن، دقت و کارایی مناسب و زیاد آن است. کریسپرCas9 به‌نوعی با سیستم ایمنی مربوط به توالی کوتاهی از DNA مرتبط‌است. در واقع کریسپر سیستم ایمنی پروکاریوتی است که موجب مقاومت به تهدیدهای خارجی، مانند DNA فاژها، پلاسمیدها و ویروس‌ها می‌شود. این سیستم دارای سه بخش اصلی است. یک بخش آن CrRNA[5] است که دارای یک توالی تکراری است که با توالی موجود در Trac RNA مکمل می‌باشد. CrRNA از راه مکمل خود به جایگاه هدف متصل می‌شود و توالی Trac RNA نیز به مکمل خود که توالی‌های تکراری موجود در CrRNA است، می‌چسبد که این ساختار فضایی موجب فراخوانی پروتئین Cas9 به جایگاه هدف می‌شود. در صنعت غذا سیستم کریسپر می‌تواند به عنوان ابزاری قدرتمند در مدیریت فرآورده‌های تخمیری برای استفاده از آن در افزایش مقاومت فاژی، واکسینه‌شدن پلاسمیدی، ویرایش ژنوم و فعالیت‌های ضدباکتریایی مورد استفاده قرارگیرد که در مقاله حاضر مورد بررسی قرار می‌گیرند.

واژه‌های کلیدی: ژنوم، صنعت غذا، فناوری کریسپر، Cas9.

مقدمه

با افزایش پیوسته جمعیت جهان، زنجیره تأمین غذا بزرگترین چالش موجود است و با توجه به رشد جمعیت، مقدار غلات تولیدی تا سال ۲۰۵۰ باید دو برابر مقدار آن در سال ۲۰۰۵ باشد. برای رسیدن به این هدف راه‌های مختلفی مورد توجه پژوهشگران است. یکی از این راه‌های پیشنهادی افزایش سطح کشت محصول‌های کشاورزی است که با توجه به نیاز به زمین بیشتر و تخریب منابع طبیعی گزینه چندان مناسبی به نظر نمی‌رسد. از این رو، به جای افزایش سطح کشت باید گیاهانی با مقدار عملکرد بیشتر و همچنین مقاوم به بیماری‌ها و تنش‌های محیطی بوجود آورد (Brandt & Barrangou, 2019).

در چند دهه گذشته پیشرفت در علوم و فناوری مقدمه‌ای شد تا چندین فناوری جدید در صنایع غذایی و کشاورزی

۱- تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۳/۲۹ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۸/۱۱

۲- نویسنده مسئول، پست الکترونیک: ehsany81@yahoo.com

۳- به ترتیب، دانشجوی دکتری دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، استاد دانشگاه آزاد اسلامی واحد خوراسگان و استاد دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان.

4. Clustered regularly interspaced short palindromic repeats 5. Crispr RNA

استفاده شوند که این فناوری‌ها دانسته های ما را نسبت به طبیعت غذاها و فرآیندهای آن‌ها افزایش داده‌اند. امروزه مصرف‌کنندگان انتظار دارند که غذا افزون بر رفع گرسنگی دارای اثرهای مهمی بر سلامتی و جلوگیری از بیماری باشد (Eş, *et al*., 2019).

یکی از فناوری‌های نوینی که در بسیاری از شاخه‌های علم استفاده می‌شود ایجاد تغییرهای ژنتیکی می‌باشد که در مواد غذایی، کشاورزی، بوم‌شناسی، پزشکی، تولید دارو، دامپروری و مانند این ها کاربرد دارد و می‌تواند در بهبود شرایط انسان بسیار مؤثر باشد. امروزه از روش اصلاح ژنتیکی در موردهای مانند زیست‌ساخت ویتامین‌ها، آنزیم‌ها، ترکیب‌های دارویی، پادزیست‌ها (آنتی بیوتیک ها) و پپتیدهای زیست‌فعال استفاده می‌شود (Selle & Barrangou.,2015). معرفی فناوری DNA[1] نوترکیب در سال ۱۹۷۰ عصر جدیدی درزیست شناسی گشود که با ارائه این فن برای نخستین بار پژوهشگران توانستند مولکول‌های DNA را به منظور نوآوری در راهکارهای درمانی دستکاری کنند و امروزه روش‌های هدفمند تغییر ژنوم یاخته‌های زنده، ابزار قدرتمندی را برای درمان بیماری‌های ژنتیکی فراهم نموده است (ولیان بروجنی و محمدی فارسانی، ۱۳۹۶). توسعه روش‌های کارآمد و مطمئن برای ایجاد تغییرهای هدفمند و دقیق در ژنوم یاخته‌های زنده یکی از هدف‌های مهم پژوهشگران زیست‌فناوری است، بنابراین به ایجاد تغییر هدفمند و اختصاصی در ژنوم و اطلاعات زیستی موجود زنده، ویرایش ژنوم گفته می‌شود. در روش‌های مختلف ویرایش ژنوم تشخیص جایگاه هدف، دارای اهمیت ویژه‌ای است. در فناوری‌های جدید تغییر ژنتیکی به طور معمول ژن خارجی به موجود زنده وارد نمی‌شود. یکی از این روش‌های نوین و دقیق شناخته‌شده که برای ویرایش ژنوم وجود دارد، کریسپر Cas9 است. مهمترین ویژگی این فناوری که آن را از دیگر روش‌های مشابه متفاوت می‌سازد سادگی استفاده، ارزان بودن، دقت و کارایی مناسب و زیاد آن است (بیات و همکاران، ۱۳۹۶) (Gallo *et al*., 2018). این سیستم ایمنی مربوط به یک توالی کوتاه DNA است و پژوهشگران سال‌ها بر این بودند که این توالی هیچ‌گونه کارایی در یاخته ندارد، اما در سال‌های اخیر مشخص شد که این توالی نه تنها بی‌ارزش نیست، بلکه به همراه پروتئین Cas9 می‌تواند هر قسمت از DNA را برش دهد یا قسمتی از ژن را خاموش کند (پروین و سیدین، ۱۳۹۶).

معرفی سیستم کریسپر

در واقع کریسپر نوعی سیستم ایمنی پروکاریوتی است که موجب مقاومت به عنصرهای خارجی، مانند: DNA فاژها، پلاسمیدها و ویروس‌ها می‌شود. میکروارگانیسم‌های دارای سیستم کریسپر پس از نخستین رویارویی با ژنوم خارجی پس از تخریب این ماده وراثتی (شامل DNA فاژها، پلاسمیدها و مانند این ها)، توالی‌های ۲۰ نوکلئوتیدی متعددی از ویروس هیدرولیز شده را وارد مکان ژنی کریسپر می‌کنند و این بخش مانند بایگانی از ژنوم‌های مهاجم برای یاخته به حساب می‌آید و در رویارویی با ژنوم‌های خارجی بعدی مانند الگو عمل می‌کند (جدیدی و عرب، ۱۳۹۵).

سیستم کریسپر دارای سه بخش اصلی می‌باشد. که شامل CrRNA[2]، Trac RNA[3] و پروتئین Cas9 می‌باشند. CrRNA در حقیقت بخشی از توالی ژنوم مهاجم است که در آن افزون بر نسخه برداری دقیق ژنوم مهاجم موجود در آرایه کریسپر، توالی‌های تکراری آن نیز در آن نسخه برداری می‌شود. زمانی که باکتری در برابر عنصر مهاجم قرار می‌گیرد این قطعه بیان می‌شود و با اتصال به رشته مکملش در ژنوم (که در حقیقت ژنوم خارجی ورودی است) موجب فراخوانی

1. Deoxyribonucleic acid 2. Crisper RNA 3. Trans-activating crispr RNA

پروتئین Cas9 به جایگاه موردنظر می‌شود (بیات و همکاران، ۱۳۹۶؛ Meiliana *et al*.,2017). همانگونه که بیان شد، CrRNA دارای یک بخش توالی تکراری می‌باشد که با توالی موجود در Trac RNA مکمل می‌باشد. CrRNA از راه مکمل خود به جایگاه هدف متصل می‌شود و توالی Trac RNA نیز به مکمل خود که توالی‌های تکراری موجود در CrRNA است، متصل می‌شود که این ساختار فضایی موجب فراخوانی پروتئین Cas9 به جایگاه هدف می‌شود (بیات و همکاران.، ۱۳۹۶؛ Yao *et al*., 2018).

تاریخچه کریسپر

در سال ۱۹۸۷ میلادی گروهی از پژوهشگران به سرپرستی یوشی زومی‌ایشی نو[1] در دانشگاه اوزاکا به بررسی باکتری *E. coli* پرداختند و با تکرار غیرعادی یک توالی در DNA این باکتری روبه‌رو شدند، اما تاریخچه کشف کریسپر به پژوهش روی آرکئی‌های[2] مقاوم به نمک در مرداب در سال ۱۹۸۹ در دانشگاه آلیکانته[3] اسپانیا برمی‌گردد (Lander., 2016). پژوهشگران دریافتند که غلظت نمک موجود در محیط کشت بر فعالیت برشی آنزیم‌های محدودکننده[4] (آنزیم‌های محدودکننده دسته‌ای از آنزیم‌ها هستند که DNA را بر اساس توالی خاصی از نوکلئوتیدها، به قطعه‌های مختلف تقسیم می‌کنند) در آرکئی ها اثر دارد. آن‌ها در ادامه به بررسی قطعه‌های تغییریافته پرداختند و در نخستین قطعه مورد بررسی، نسخه‌های کامل و متعددی از توالی‌های پالیندرومیک و نادر به طول ۳۰ جفت باز را کشف نمودند که در میان آن‌ها یک سری توالی فاصله‌انداز با طول ۳۶ جفت باز قرارداشت. پس از آن، توالی‌های همسان دیگری در باکتری *Haloferax volcanii* و دیگر آرکئی باکتری‌های نمک‌دوست توسط پژوهشگران کشف شد. در آن سال‌ها گمانه‌زنی‌های فراوانی در مورد نقش توالی کریسپر در تنظیم بیان ژن و تعمیر DNA مطرح شد که نادرست بودن همه ادعاها در زمان کوتاهی اثبات شد. پس از بررسی‌های تکمیلی، در پایان در سال ۲۰۰۷ میلادی کریسپر به عنوان سیستم ایمنی ذاتی باکتری‌ها و آرکئی‌ها معرفی شد (Lander, 2016).

انواع سیستم کریسپر

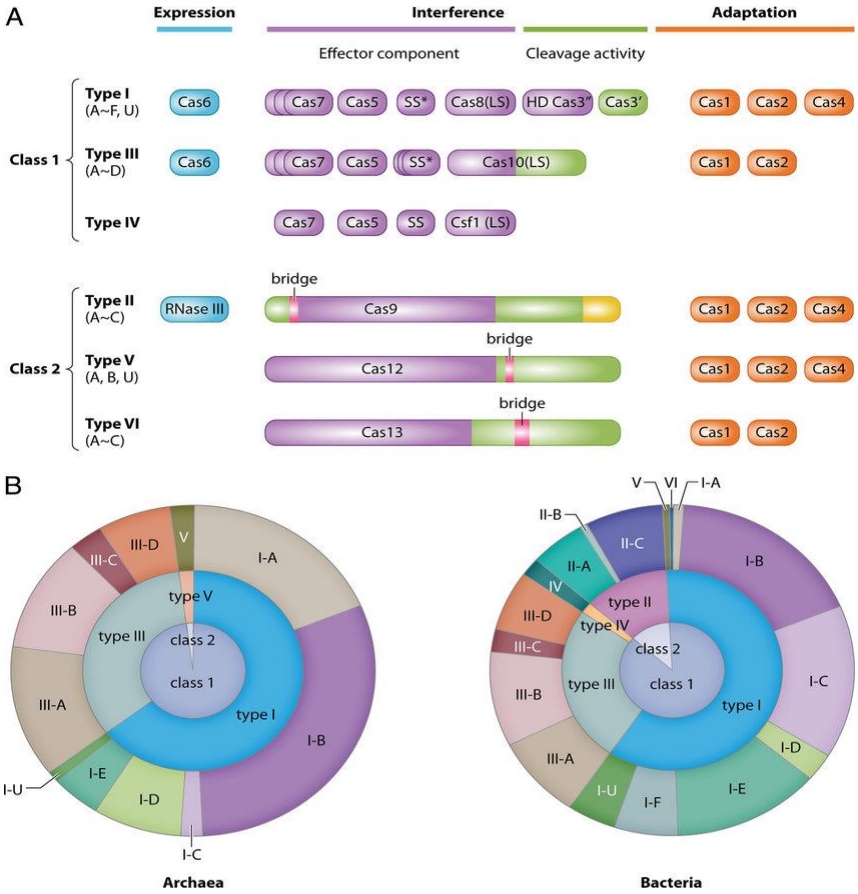
تقسیم‌بندی انواع مختلف سیستم کریسپر در میکروارگانیسم‌ها برپایه ژن رمزکننده و ساختار بخش مؤثر در مکان ژنی کریسپر است. سیستم کریسپر شامل سه نوع مهم I، II و III می‌باشد. انواع V، IV و VI نیز به ندرت مشاهده می‌شوند (شکل ۱) (Meiliana *et al*.,2017).

نوع I - همه زیرگروه‌های موجود در نوع I کریسپر دارای ژن *Cas3* می‌باشند که این ژن یک پروتئین بزرگ که فعالیت هلیکازی دارد را فعال می‌کند و این پروتئین با تحریک فعالیت ATPAse موجب بازشدن ساختار DAN-DNA یا RNA-DNA می‌شود. گاهی دامنه هلیکازی با دامنه HD[5] ترکیب شده که این مجموعه دارای فعالیت اندونوکلئازی است و وظیفه جداسازی و برش DNA را برعهده دارد.

برای دامنه HD فعالیت اگزونوکلئازی ssDNAase و RNAase در *Methanocaldococcoccus Janashi* گزارش شده است. دامنه HD در قسمت N انتهایی پروتئین Cas3 وجود دارد و یا به صورت جداگانه‌ای به عنوان هلیکاز Cas3 نامگذاری می‌شود. در نوع F افزون بر ژن *Cas3*، ژن *Cas2* نیز وجود دارد و در زیرمجموعه‌های نوع I ژن‌های *Cas1* و *Cas2* دارای اپران‌های جداگانه‌ای هستند. در نوع I ژن‌های مؤثر در تولید آنزیم‌های Cas، دارای دو زیربخش کوچک و بزرگ هستند. در این میان

1. Yoshizumi Ishino 2. Archaea 3. University of Alicante 4. Restriction enzymes
5. Histidine (H) and/or aspartate (D) amino acid

ژن‌های *Cas5*، *Cas6* و *Cas7* به صورت مستقیم مسئول فرآیند نسخه‌برداری در Pre-CrRNA هستند و در نوع I اپران‌ها بیشتر اختصاصی هستند (Mokarova *et al*., 2011 ، Mokarova *et al*., 2015). Cas1 و Cas2 به شکل ترکیب‌های حد میانه برای فاصله سازها عمل می‌کنند. در این نوع، Cas6 یک اندونوکلئاز فعال است که وظیفه آماده‌سازی CrRNA را برعهده دارد و Cas5 و Cas7 پروتئین‌های غیرکاتابولیکی متصل به RNA هستند. در سیستم I-C کارهای مربوط به CrRNA به وسیله Cas5 انجام می‌شود. در این نوع، مجموعه CrRNA به همراه مجموعه پروتئینی Cas Code (Cas5، Cas8b، Cas7 و Cas6) در قسمت پایین دست آرایه کریسپر قرار دارند (Mokarova *et al*., 2015; Mokarova *et al*., 2015; Mokarova *et al*., 2011).



شکل ۱-طبقه‌بندی انواع سیستم‌های کریسپر (Ishino *et al*., 2018).

نوع II – سیستم کریسپر نوع II نسبت به دیگر نوع‌ها کمیاب ترند و در حدود ۵٪ از ژنوم باکتری‌ها دیده می‌شود، اما در آرکئی‌ها وجود ندارد. به‌تازگی به عنوان ابزار قدرتمندی برای ویرایش ژن در مهندسی ژنتیک و زیست‌فناوری مورد استفاده قرار می‌گیرد. این نوع کوتاه‌ترین ساختار ژنی در میان همه انواع کریسپر را دارند و تنها ۳ یا ۴ (به ندرت) ژن مؤثر برای انجام فعالیت دارد. هرچند، افزودن برخی از عامل‌ها مانند CrRNAهای فعال و یا پروتئین‌های مختلف بر عملکرد این نوع تأثیر می‌گذارد. مانند سیستم کریسپر نوع I و همچنین همه سیستم‌های کریسپر، در این نوع نیز توالی PAM[1] دارای اهمیت بسیار است و به وسیله پروتئین‌های مربوط در بخش پایین‌دستی Proto-Spacer روی رشته DNA غیرهدف شناسایی می‌شود. وجود توالی PAM برای شناسایی بخش هدف مورد نظر و شکست آن به وسیله پروتئین ضروری

1. Proto-spacer adjacent motif

می‌باشد. در این نوع، اتصال توالی خارجی به بخش کریسپر یاخته به وسیله مجموعه آنزیم‌های Cas1 و Cas2 صورت می‌گیرد. این مجموعه در بیشتر انواع شناخته‌شده کریسپر وجود دارد و برای پیوستن توالی خارجی به آرایه کریسپر ضروری است. فعالیت اندونوکلئازی Cas1 برای اتصال توالی خارجی مورد نیازاست؛ در حالی که Cas2 فعالیت آنزیمی نداشته و بیشتر نقش ساختاری دارد. برای نسخه‌برداری و ساخته‌شدن Pre-CrRNA در نوع II ساختاری وجود دارد که با انواع I و III متفاوت است. در انواع I و III از یک اندوریبونوکلئاز برای شکستن Pre-CrRNA و تبدیل آن به CrRNA بالغ استفاده می‌شود و این عمل با شناسایی بخش تکراری CrRNA اتفاق می‌افتد. در حالی‌که، در نوع II از RNAasII درون‌زاد استفاده می‌شود و یک RNA دوم که آن را Trace-RNA می‌گویند نیز وجود دارد که در بیشتر زیرگونه‌های نوع II مشاهده می‌شود و یک بخش جدانشدنی از نوع II است. در نوع II جفت بازهای موجود روی Trace-RNA که در حقیقت توالی‌های تکراری آرایه کریسپر هستند با مکمل آن‌ها روی Pre- CrRNA در حضور یک پروتئین نوکلئازی و یک هلیکاز به هم متصل می‌شوند. ویژگی اصلی کریسپر نوع II وجود پروتئین Cas9 است که در دیگر انواع دیده نمی‌شود. این پروتئین بزرگ دارای چندین دامنه است و مجموعه‌ای از کارها را در سیستم کریسپر انجام می‌دهد. وظیفه آن برش توالی هدف بعد از تشخیص آن به وسیله Cr-RAN و Trace-RAN است. عمل آن برای تشخیص DNA اصلی از مهاجم بسیار مهم است، زیرا این توالی تنها روی DNA مهاجم قرار دارد و سازوکار کریسپر با تشخیص توالی PAM، DNA مهاجم را حذف می‌کند و توالی موجود روی DNA اصلی که بدون توالی PAM است، سالم می‌ماند. پروتئین Cas9 که با نام csn1 هم شناخته می‌شود یک DNA نوکلئاز است که در نوع II کریسپر وجود داشته و می‌تواند هر دو رشته DNA را در فعالیت خود بشکند (Wei *et al*., 2015، Mokarova *et al*., 2011، Mokarova *et al*., 2015).

امروزه سه نوع پروتئین Cas1 از برخی میکروارگانیسم‌ها مانند اشرشیا[1]سودوموناس[2] و مانند این‌ها استخراج شده است. این پروتئین به شکل یک همودایمر[3] است و یک نوکلئاز حاوی عنصر فلزی می‌باشد که می‌تواند SDNA و dsDNA را برش بزند. این پروتئین دارای دو دامنه است. قسمت C انتهایی که دارای فعالیت هلیکازی است و قسمت N انتهایی که وظیفه دوتایی‌شدن و اتصال به سایر پروتئین‌ها را برعهده دارد. پژوهش‌های تازه‌تر نشان داده است که ژن Cas1 در فرآیند خودساختی[4] نیز شرکت می‌کند.

نوع III – در طبیعت به فراوانی دیده می‌شود و هرچند به عنوان یک ابزار ژنتیکی کاربرد زیادی ندارد، اما وظیفه محافظت از یاخته در برابر ژنوم‌های خارجی را برعهده دارد. در این حالت، چندین نوع پروتئین Cas به همراه CrRNA وجود دارند که سیستم کریسپر را هدایت می‌کنند. کارایی آن نسبت به نوع II کمتر است. در این نوع، افزون بر RNAase، RNA راهنما و DNAase، آنزیم (سیکلیک اولیگوآدینلات سنتاز[5]) وجود دارد و پژوهش‌ها نشان داده است که در این نوع، سه حالت فعالیت آنزیمی دیده می‌شود. **۱**– فعالیت اندوریبونوکئازی، **۲**– فعالیت‌های DNAase که به وسیله دامنه‌های Cas10 انجام می‌شود. **۳**– فعالیت‌های سیکلیک اولیگو آدنیلات سنتتاز که به وسیله دامنه Palm و Cas10 انجام می‌شود (Niewoehner *et al*., 2017).

اجزای مختلف سیستم کریسپر

۱– **ژنگاه[6] کریسپر**– ساختاری با توالی‌های مورد نیاز برای شناسایی ژن‌های خارجی ورودی به یاخته در ژنوم

1. Escherichia 2. Pseudomonas 3. Homodimer 4. Autogenous process
5. Cyclic oligoadenylate synthase 6. Locus

پروکاریوت‌ها می‌باشد که به عنوان ژنگاه کریسپر شناخته می‌شود.

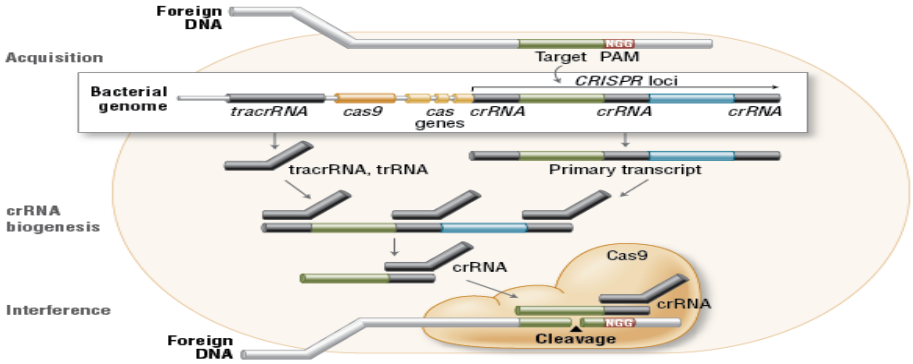
۲- پروتئین Cas- بخش‌های مختلف ژن‌های موجود در ژنگاه کریسپر، ساخت پروتئین‌ها را هدایت می‌کنند که به این پروتئین‌ها، پروتئین Cas گفته می‌شود که همه این مجموعه پروتئین‌ها مانند Cas1 تا Cas6 به وسیله توالی‌های موجود در بخش کریسپر ساخته می‌شوند. البته، بسته به نوع سیستم کریسپر مقداری از پروتئین‌ها ممکن است کم یا زیاد شوند.

۳- CrRNA- باکتری‌ها و آرکئی‌ها در سیستم کریسپر خود که نقش دفاعی دارند دارای یک RNA هستند که نسخه‌برداری دقیقی از ژنوم خارجی ورودی به یاخته است.

۴- Trace–RNA - یکی از RNAهای مورد نیاز در سیستم دفاعی کریسپر است که وظیفه آن به صورت ساختاری، اتصال به CrRNA و نگهداری آن است تا پروتئین Cas بتواند کار خود را درست انجام‌دهد.

۵- sgRNA[1]- در نوع II کریسپر دیده می‌شود و مجموعه‌ای از CrRNA و Trace–RNA است و برای فعالیت سیستم ایمنی کریسپر در یاخته ضروری است.

۶- PAM – یک توالی ویژه و کوتاه از DNA است که به طور معمول بین ۲ تا ۶ جفت باز طول دارد که در ادامه ناحیه هدفی که قرار است توسط آنزیم شکسته شود، وجود دارد. این توالی برای نوکلئازهای کریسپر ضروری است، زیرا وجود این توالی موجب شناخته‌شدن توالی هدف و شکسته‌شدن آن توسط آنزیم می‌شود و این توالی بیشتر در قسمت پایین‌دست محل برش قرار دارد. توالی PAM به صورت مستقیم توسط اندونوکلئاز تشخیص داده می‌شود که برای این کار وجود gRNA ضروری است و بخشی از ژنوم که باید به وسیله فناوری کریسپر ویرایش شود به وسیله توالی PAM محدود می‌گردد. بیشترین نوع پروتئین Cas9 که استفاده می‌شود از میکروارگانیسم *Streptococcus pyogenes* به دست می‌آید که در این میکروارگانیسم یک توالی '5-NGG-3' تشخیص داده شده است (N می‌تواند هرباز نوکلئوتیدی باشد) (شکل ۲)



شکل ۲- اجزاء مختلف سیستم کریسپر.

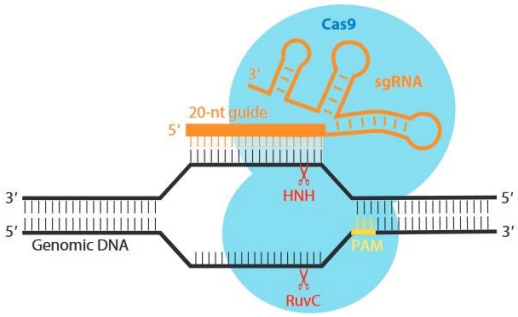
شیوه عمل سیستم ایمنی بر پایه کریسپر به وسیله پیوستن توالی کوچک ویروسی به ژنگاه کریسپر در یاخته شروع می‌شود و این امکان را به یاخته می‌دهد که با انجام یک سری فعالیت‌های آنزیمی از این قسمت به عنوان بایگانی ژنوم‌های خارجی برای تشخیص و نابودی آن‌ها بهره ببرد. نوکلئاز Cas، ژنوم ویروس را شکسته و سپس بخشی از آن را در ژنگاه کریسپر ذخیره می‌کند. توالی PAM جزئی از ژنوم ویروس مهاجم یا پلاسمید است و در ژنوم باکتری وجود

1. Single guide RNA

ندارد که در صورت وجود نداشتن توالی PAM یاخته نمی‌تواند ژنوم خارجی را برش بزند. توالی PAM برای انواع مختلف کریسپر متفاوت است که یکی از تفاوت‌های مهم، در جایگاه آن‌ها است. برای نمونه ، در نوع I و IV توالی PAM در قسمت '5 Proto-Spacer قرار دارد، در حالی‌که در نوع II در قسمت '۳ قرار دارد.

در مورد نوع III و IV اطلاعات محدودتر است و به نظر می‌رسد که روی RNA هدف قرار دارند. با همه این دشواری‌ها، هم محل قرارگیری توالی PAM و هم خود توالی می‌تواند در میکروارگانیسم‌های مختلف، متفاوت باشد (شکل ۳) (Zhang *et al*.,2015; Jiang *et al*.,2017; Anders *et al*., 2014).

۷- پروتئین آنتی‌کریسپر- ترکیب‌هایی که به وسیله برخی از فاژها و یا عامل‌های خارجی تولید شده و بر ترکیب‌های سیستم کریسپر اثر گذاشته و آن‌ها را غیرفعال می‌کند. افزون بر این مورد، برخی سیستم‌های دیگر نیز برای غیرفعال کردن سیستم کریسپر گزارش شده‌است. پروتئین‌ها در برخی از موردها در فناوری کریسپر برای غیرفعال سازی آنزیم Cas9 استفاده می‌شود. نکته‌ای که در مورد پروتئین Cas9 وجود دارد این است که این پروتئین دارای ۲ دامنه است. یک دامنه نوکلئازی با عنوان HNH که رشته DNA مکمل توالی RNA راهنما را می‌شکند و همچنین دارای یک دامنه RuV-C می‌باشد که مسئول شکستن رشته DNA مقابل رشته مکمل است (Zhang *et al*., 2015).



شکل ۳- محل قرار گرفتن توالی PAM روی ژنوم (Jiang *et al*.,2017).

عملکرد سیستم کریسپر

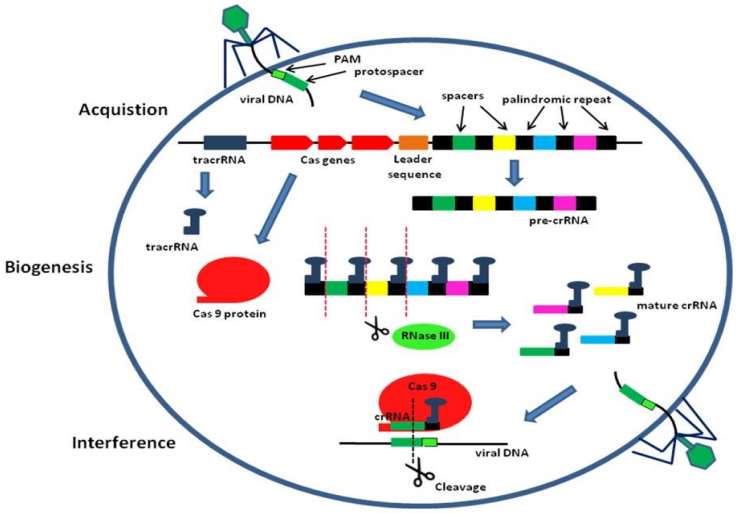
شروع عملکرد سیستم کریسپر شامل ۳ مرحله است: **۱**- هماهنگ‌شدن و یکپارچه‌شدن ژنوم خارجی در آرایه کریسپر. **۲**- انجام فرآیند رونویسی از بخش کریسپر و ایجاد Pre-Cr RNA و سپس بلوغ RNA. **۳**- ممانعت و حذف ژنوم خارجی با شناسایی آن (شکل ۴).

دو پروتئین مهم به نام‌های Cas1 و Cas2 در شمار زیادی از سیستم‌های کریسپر شناخته‌شده وجود دارند که از اهمیت خیلی زیادی در این فرآیند برخوردارند. این دو پروتئین به همراه هم، مجموعه‌ای را تشکیل می‌دهند که بخشی از فرآیندهای سیستم کریسپر را انجام می‌دهند. وظیفه Cas1 ایجاد اتصال بین قطعه‌های خارجی می‌باشد و Cas2 نیز دارای نقش‌های ساختاری بوده و فعالیتی غیرآنزیمی دارد (Mokarova *et al*., 2015; Brandt & Barrangou, 2019; Barrangou., 2015). کریسپر Cas9 را می‌توان با بهینه کردن کدهای Cas9 براساس کدهای ژنتیکی پستانداران و نیز فراهم آوردن اجزاء RNA آن در پستانداران استفاده کرد و با تغییر توالی ۲۰ نوکلئوتیدی نیز می‌توان هر نوع ژنی را در یاخته هدف قرار داد.

مرحله‌های انجام فن کریسپر بدین گونه است که: **۱**- sgRNA مورد نیاز برای هدف‌گیری ژن مورد نظر و نیز آغازگر مورد نیاز توسط ابزارهای Insilco طراحی شوند. **۲**- sgRNA راهنما در یک پلاسمید بیانی که حاوی Trace RNA و توالی کدکننده پروتئین Cas9 است، همانندسازی می‌شود. سپس این پلاسمید که دارای تمام اجزای مورد نیاز برای

هدف‌گیری ژن مورد نظر است به یاخته هدف انتقال داده می‌شود و در مرحله بعد یاخته‌هایی که پلاسمید را دریافت کرده‌اند، تکثیر می‌شوند (ولیان بروجنی و محمدی فارسانی، ۱۳۹۶). **۳**- توالی هدفی که از یک ژنوم موجود زنده برای انجام ویرایش در نظر داریم باید دارای دو ویژگی باشد. یکی توالی هدف در میان همه توالی‌های ژنوم موجود زنده تا حد امکان یگانه باشد و دیگری توالی PAM بی‌درنگ پایین‌دست ژن هدف وجود داشته باشد.

همان‌طور که بیان شد حضور توالی PAM در پایین‌دست ژن هدف برای فعالیت نوکلئازی Cas9 ضروری است که می‌تواند با توجه به نوع Cas9 متفاوت باشد. پژوهشگران هنگام گزینش پلاسمید و طراحی سیستم کریسپر، باید وجود توالی PAM در پایین‌دست ژن هدف که متناسب با گونه Cas9 مورد استفاده است را توجه کنند.



شکل ۴- عملکرد سیستم کریسپر در میکروارگانیسم‌ها (Hryhorowicz (Boksa) *et al.* 2016).

مجموعه Cas9-gRNA به هر توالی از ژنوم که PAM داشته باشد متصل شده، اما Cas9 تنها در حالتی برش را انجام می‌دهد که توالی حدفاصل gRNA با توالی هدف به مقدار کافی دارای همسانی باشند. در این حالت مدت زمان اتصال بیشتر خواهد بود و دامنه های نوکلئازی می‌توانند وظیفه خود را به خوبی انجام دهند.

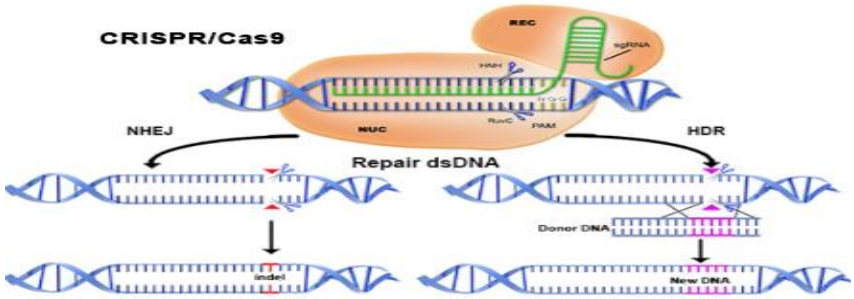
همان‌گونه که پیش‌تر گفته شده در پروتئین Cas9 دو دُومین نوکلئازی به نام‌های RUVC و HNH وجود دارد که هر کدام با برش یک رشته از DNA سبب ایجاد شکست‌های دو رشته‌ای با انتهای صاف در DNA می‌شوند. با ایجاد جهش در یکی از این دو دُومین می‌توان آنزیم‌هایی با توانایی شکست تک رشته ایجاد کرد. با استفاده از دو مولکول Cas9 جهش‌یافته می‌توان سیستمی طراحی کرد که شکاف در دو رشته با دو شکست یکسان در ژنوم ایجاد شود (ولیان بروجنی و محمدی فارسانی، ۱۳۹۶). پس از برش DNA توسط آنزیم، دو سیستم ترمیمی در یاخته وجود دارد (شکل ۵).

۱- مسیر ترمیمی اتصال در انتهای ناهمتا (NHES). این روش مرسوم‌ترین روش ترمیمی برای ترمیم DSB[1] می‌باشد، اما در این ترمیم مقدار زیادی جهش‌های حذف و اضافه در محل برش اتفاق می‌افتد و این تغییرها در توالی هدف موجب می‌شود که پس از ترمیم، DNA دستورزی شده دچار جهش‌های مختلفی از جمله جهش نقطه‌ای، اضافه یا تغییر چارچوب گردد. در بهترین حالت ممکن نتیجه این برش و ترمیم موجب از دست رفتن چند عملکرد در ژن هدف می‌شود.

1. DNA double-strand breaks

۲- مسیر ترمیم (ترمیم مستقیم همتا) HDR[1] از این روش برای تغییر در یک نوکلئوتید تا اضافه کردن چند نوکلئوتید به توالی هدف می‌توان استفاده نمود. آن چیزی که به عنوان تغییر ژنتیکی کنترل‌شده و برنامه‌ریزی شده شناخته می‌شود در حقیقت توسط مسیر HDR انجام می‌شود. درحالی‌که ترمیم برش دو رشته‌ای از راه NHES[2] که به صورت معمول رخ می‌دهد موجب تغییرهای ناقص و غیرقابل برنامه‌ریزی می‌شود (شکل۵).

به منظور استفاده از روش ترمیمی HDR برای دستورزی ژنتیکی یک قطعه DNA به عنوان الگوی ترمیمی با توالی از پیش‌تعیین‌شده باید به همراه Cas9 و gRNA به یاخته وارد شود که این الگو باید شامل توالی همسان بالادست و پایین‌دست در توالی هدف باشد. البته بازوی همسان چپ و راست و اندازه این دو بازو به توالی مورد نظر دستورزی وابسته است. افزون بر این، باید توجه نمود که توالی الگویی ترمیمی نباید توالی PAM داشته باشد؛ زیرا اگر این توالی را داشته باشد توسط Cas9 به عنوان رشته مهاجم شناخته شده و برش داده‌می‌شود. با وجود دقت زیاد HDR باید به این مسئله توجه داشت که بازده این روش به طور معمول کمتر از ۱۰٪ است که پژوهشگران امروزه برای بهبود روش HDR از روش‌های مختلفی از جمله استفاده از یاخته در مرحله‌هایی که HDR آن فعالیت بالاتری دارد، استفاده می‌نمایند (جدیدی و عرب، ۱۳۹۵). در دستورزی ژنتیکی از روش NHES برای غیرفعال‌سازی و ایجاد جهش استفاده می‌شود، اما از HDR برای دستورزی برنامه‌ریزی شده براساس الگو که شامل حذف و یا اضافه کردن بخش‌های هدف ژنوم و یا وارد کردن دقیق ژن خارجی به یک محل شناخته‌شده در ژنوم است، استفاده می‌شود (بیات و همکاران، ۱۳۹۶).



شکل ۵- مسیرهای ترمیمی در ژنوم سلول.

برای برش‌دادن DNA از نوکلئازهای قابل برنامه‌ریزی می‌توان استفاده کرد که خود در ۴ دسته طبقه‌بندی می‌شوند. **۱**- مگانوکلئازها (MN) **۲**- نوکلئازهای انگشت رویی (ZFN[3]). **۳**- نوکلئازهای (TALEN[4]). **۴**- کریسپرCas9. عملکرد همه این نوکلئازها شامل شناسایی و اتصال اختصاصی به DNA هدف و سپس ایجاد برش دو رشته‌ای (DSB) در آن‌ها می‌باشد. در سه دسته اول، بخش شناسایی‌کننده DNA از جنس پروتئین بوده در نتیجه به کارگیری این سیستم به دلیل نیاز به طراحی و مهندسی پروتئین در هر آزمایش بسیار سخت، زمان‌بر و پرهزینه می‌باشد. درحالی‌که در سیستم کریسپرCas9 بخش شناسایی‌کننده DNA هدف، از جنس RNA می‌باشد. بنابراین، استفاده از این سیستم بسیار ساده، سریع‌تر و ارزان‌تر است (بیات و همکاران، ۱۳۹۶؛ Lander., 2016).

عملکرد سیستم کریسپر بعد از برش داده شدن

بعد از ایجاد برش، سیستم ترمیمی DNA فعال شده و محل باز شده را با سر به هم متصل می‌کند و در این بین تا

1. Homology-directed repair 2. Non-homologous end joining 3. Zinc finger nuclease
4. Transcription activator-like effector nucleases

این کار بخواهد اتفاق بیفتد یک سری آنزیم‌های اگزونوکلئازی وجود دارند که از بیرون مشغول هضم DNA می‌باشند و به همین دلیل بخشی از DNA آسیب دیده و از دست می‌رود. بنابراین، پیش از ترمیم، بخش‌هایی که هدف ویرایش نبوده حذف شده و بعد از متصل‌شدن دو سر برش‌خورده، این DNA به وجود آمده با DNA اصلی مقداری متفاوت است و از این رو، محل تغییر می‌نماید و کارکرد ژن دچار اختلال می‌شود. به بخش‌هایی که در این روش به DNA اضافه یا کم می‌شود، Indels گفته می‌شود که ترکیبی از دو واژه Insertion-Deletion است. پس از برش‌زدن چهار حالت ممکن است اتفاق افتد:

۱- پس، هدف از Indels، از دور خارج نمودن ژن است.

۲- اگر قرار باشد یک تکه بزرگ از ژن به طور دقیق حذف شود، در این هنگام برعکس شرایط بالا از دو gRNA استفاده می‌شود که این دو RNA هر کدام به همراه یک Cas9 به دو محل از DNA مورد نظر متصل شده و در دو محل ژن مورد نظر را برش می‌دهند. بنابراین، بخش میانی که برش داده شده از ژنوم خارج می‌شود و حذف می‌شود و پس از آن DNA به هم جوش می‌خورد که این روش را حذف قطعه‌ای می‌نامند و روش استاندارد حذف ژن است. افزون بر حذف، اگر لازم باشد تکه‌ای از DNA مدنظر به DNA هدف اضافه شود باید بوسیله دو gRNA که در قسمت پیش بیان‌شد، بخش مورد نظر را حذف کرد و یک DNA که از دو طرف مکمل بخش برش‌خورده باشد برای اتصال به داخل یاخته ارسال شود تا به جای ناحیه حذفی قرارگیرد که به آن DNA دهنده می‌گویند.

۳- DNA فرستاده شده پیش از اتصال باز می‌شود و هر رشته آن به یک رشته DNA هدف متصل می‌شود که این کار به وسیله سیستم ترمیم DNA انجام می‌شود. سپس هر کدام از این رشته‌ها به عنوان رشته الگو جهت انتقال ژن مورد نظر عمل می‌کند.

۴- ایجاد تعدیل تک نوکلئوتیدی: هدف از این روش تنها جابه‌جایی یک نوکلئوتید است. برای نمونه $A \leftarrow C$ که با دو روش انجام می‌شود: **الف**- در روش استاندارد با دو gRNA که گفته شده دو طرف ژن مورد نظر برش داده شده و ژن حذف شده. سپس یک DNA که کامل شبیه DNA اصلی بوده و تنها در همان نوکلئوتید مورد نظر تفاوت دارد را به محل اضافه می‌شود که این DNA به عنوان دهنده عمل می‌کند. در قسمت انتهایی، DNA دهنده نیز با DNA اصلی مکمل است. **ب**- در روش دیگری با تغییرهایی که روی پروتئین Cas9 انجام داده شده این پروتئین می‌تواند عمل تبدیل را انجام دهد، یعنی یک نوکلئوتید را به نوکلئوتید دیگر تبدیل می‌کند.

این سیستم به طور طبیعی در بیشتر باکتری‌ها وجود دارد و گفته می‌شود شاید در سایر موجودها نیز به شکل دیگری وجود داشته باشد. می‌توان توالی‌هایی که در داخل ویروس‌ها زیاد تکرار شده است را به داخل پلاسمید که دارای پروتئین Cas9 می‌باشد انتقال کرد و سپس این پلاسمید داخل یاخته فعالیت می‌کند و به مجرد ورود ویروس مورد نظر ساختار آن را به طور کامل منهدم و یا جزئی از آن را غیرفعال می‌کند؛ بدین صورت که به تکه‌ای از ژن اصلی ویروس متصل شده و آن را از دور خارج می‌کند و از این رو ویروس غیرفعال می‌شود. انتقال اطلاعات مرتبط با فاژها و مقاومت به فاژها را می‌توان با طراحی پلاسمیدی که دارای توالی مورد نظر است به وجود آورد (Joberty *et al.*, 2020; Bennett, *et al.*, 2020; Pineault, *et al.*, 2019).

بهبود و کارامدترسازی Cas9 در سیستم کریسپر

بررسی‌های تازه نشان داده‌است که اگرچه هر ۲۰ نوکلئوتید در توالی gRNA برای عملکرد اختصاصی و اتصال به هدف ضروری است، اما وجود چند ناهمخوانی در این محل‌ها قابل تحمل بوده که البته این مورد موجب ایجاد برش‌های نابجا در

ژنوم می‌شود. برهمین اساس برای جلوگیری از ایجاد برش دو رشته‌ای در جایگاه غیراختصاصی نوعی از Cas9 به نام نیکاز[1] طراحی شده است. همانطور که گفته شد، Cas9 دارای دو دامنه برش‌دهنده است که هر کدام در یکی از رشته‌های DNA برش ایجاد می‌کنند. بنابراین، با غیرفعال کردن هر یک از این دامنه‌ها می‌توان یک آنزیم با قابلیت برش تک رشته‌ای ایجاد کرد که به این حالت از Cas9 که با جهش ایجاد می‌شود، نیکاز گویند. از این رو، در این حالت برای ایجاد برش دو رشته نیاز به دو gRNA و دو آنزیم Cas9 می‌باشد. نوعی دیگر از این سیستم، Double Nicking است که جهش D10A در RUV-C اتفاق می‌افتد و از زیرمجموعه‌های فرم نیکاز به حساب می‌آید. در فرم نیکاز اگر هر یک از gRNAها به صورت غیراختصاصی به محلی متصل شوند و در آن‌جا برش تک رشته‌ای ایجاد کنند سیستم تعمیری Base Excision Repair آن را بازسازی می‌کند و تنها برش‌های ایجادشده در نتیجه اتصال دو gRNA در فاصله نزدیک به هم به فعال‌شدن مسیرهای NHES و HDR می‌انجامد. در راستای بهبود نیکاز پژوهشگران نوعی دیگر از Cas9 را معرفی کرده‌اند که در آن هر دو دومین برش‌دهنده غیرفعال است که در اصطلاح به آن Cas9 مرده[2] گفته می‌شود. با اتصال دومین برش‌دهنده غیراختصاصی FOKI به انتهای آمینی Cas9 سیستمی‌موسوم به RFN[3] ایجاد می‌شود. اساس این سیستم مشابه Double Nicking است؛ با این تفاوت که فعالیت نوکلئازی FOKI مستلزم دوتایی‌شدن با همتای خود در رشته مقابل است. برای بهینه‌سازی RFN از یک سیستم جدید برای بیان همزمان دو یا چند gRNA استفاده شده‌است که در این سیستم از آنزیم اندوریبونوکلئاز cys-4 به همراه Cas9–FOKI استفاده می‌شود. محل برش این آنزیم در بالادست توالی کدکننده gRNA قرار دارد. در سیستم‌های معمول طراحی gRNA باید در ابتدای '۵ gRNA اسید امینه گوانین قرار داشته باشد، زیرا بیان‌شدن به وسیله آغازگر[4] U_6 ضروری است. حال آن‌که در مدل بر پایه cys-4 قسمت '۵ رونوشت شامل اولین توالی شناسایی cys4 است. بنابراین، اجباری به وجود گوانین در جایگاه '۵ وجود ندارد (بیات و همکاران، ۱۳۹۶؛ Javaid & Choi, 2021).

استفاده همزمان Trace-gRNA و سیستم RFN در یاخته‌های سرطانی و بنیادی، برش مناسب با مقدار بالا را ایجاد کرده است، اما مهمترین محدودیت این سیستم اندازه بزرگ آن است که مانع از انتقال آن با استفاده از ناقل‌های ویروسی می‌شود. پروتئین‌های دیگری نیز وجود دارند که دارای فعالیت اندونوکلئازی خوبی هستند، مانند CPF_1 که در دسته II کریسپر قرار دارد و از نظر ساختاری و عملکردی تفاوت‌هایی با Cas۹ دارد. این پروتئین‌ها به صورت زیرهستند: **الف**– فعالیت آن‌ها تنها به وجود یک CrRNA وابسته است و نیازی به Trace-RNA ندارد. **ب**– ایجاد روش‌هایی با انتهای اضافه که خود موجب افزایش ضریب ورود یک بخش ژنی به ژنوم می‌شود. **پ**– جایگاه PAM آن دارای فرمت '۵ -TTTN- '3 است که غنی از تیمین است. **ت**– تنها دارای یک دامنه برش‌دهنده مانند Ruv-C است. از دیگر ویژگی‌های CPF1-Cas9 توانایی آن در ایجاد شکست دو رشته‌ای و شکل‌گیری انتهای چسبنده است که به افزایش کارایی سیستم ترمیمی HDR کمک می‌کند و از دیگر سودمندی‌های CPF1-Cas9 کوچک‌تر بودن آن نسبت به Cas9 است. (شکل ۶)

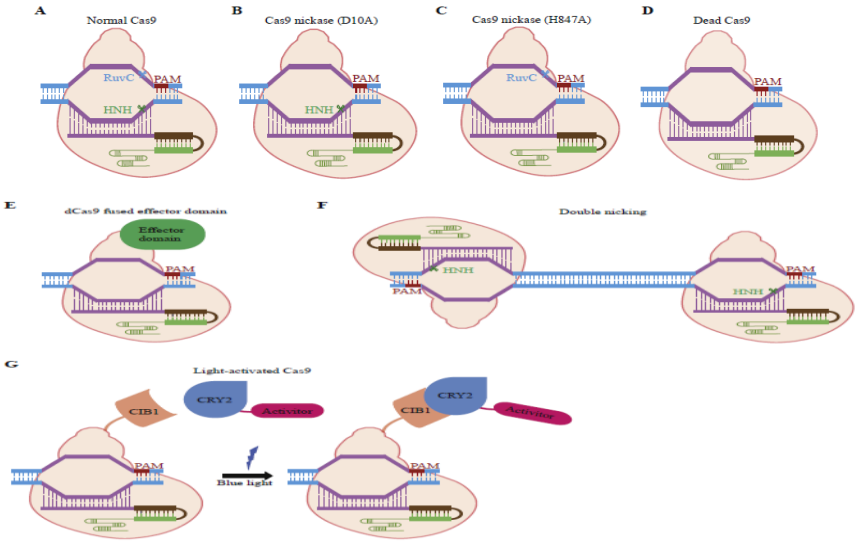
انتظار می‌رود در آینده‌ای نه چندان دور کیت‌های Crisper-Cas9 به عنوان ابزار مولکولی متشکل از شکل‌های متفاوت پروتئین Cas9 و ساختارهای متنوع gRNA و انواع مولکول‌ها برای اهداف ویژه گسترش یابند (بیات و همکاران، ۱۳۹۶؛ Mei *et al*.,2016).

کاربردهای فناوری کریسپر در صنعت غذا

غذاهای تخمیری در بین خوراکی‌های موجود بخش اساسی را تشکیل می‌دهند و در شیر، گوشت و خیار، دانه‌ها و

1. Nickase 2. Dead Cas9 3. RNA-guided FokI-nucleases 4. Promoter

بسیاری از دیگر فرآورده‌های تخمیری وجود دارد و در این میان محیط‌های کشت آغازگر[1] نقش بسیار مهمی در تولید این مواد غذایی به عهده دارند. کشت های آغازگر و پروبیوتیک‌ها میکروارگانیسم‌های مفیدی هستند که چندین نقش در فرآوری ماده غذایی دارند. این ارگانیسم‌ها در انجام فرآیندهای تخمیری باید به صورت خالص باشند و فرآیند تخمیر را انجام دهند، اما زیر تاثیر باکتریوفاژها عملکرد آن‌ها دچار اختلال می‌شود. هر دو گروه باکتری‌هایی که به عنوان محیط‌های کشت آغازگر و پروبیوتیک استفاده می‌شوند دارای سیستم کریسپر می‌باشند. این سیستم در ۶۲٪ ژنوم *Lactobacillus* و ۷۷٪ ژنوم *Bifidobacteria* مشاهده شد. وجود سیستم کریسپر در این میکروارگانیسم‌ها و تنوع این سیستم، بایگانی تاریخی از انواع مختلف فاژها در بخش زیادی از محصول‌های تخمیری را به وجود آورده است و در این میان سیستم کریسپر می‌تواند به عنوان ابزاری قدرتمند در مدیریت فرآورده‌های تخمیری برای استفاده از آن در افزایش مقاومت فاژی، واکسینه‌شدن پلاسمیدی، ویرایش ژنوم و فعالیت‌های ضدباکتریایی مورد استفاده قرارگیرد. فناوری کریسپر ابزاری است که می‌تواند در میکروارگانیسم های بیماری‌زا و عامل فساد مفید باشد (Rainha *et al.* 2020).



شکل۶- اصلاح کردن ها جهت کارامد تر کردن پروتئین Cas9.

نوع سویه[2]

صنعت تولید محیط‌های کشت آغازگر نیاز به روش‌هایی دارد تا بتوان به صورت دقیق نوع سویه باکتری را مشخص‌کرد. داشتن توانایی تشخیص دقیق تفاوت‌ها بین سویه‌های مختلف به ویژه در مورد محیط‌کشت‌های آغازگر برای بهینه‌کردن، جداسازی و تشخیص پتانسیل‌های آغازگرهای جدید برای استفاده در صنعت ضروری می‌باشد که شماری از این روش‌ها شامل استفاده از ژل‌های الکتروفورز، PCR و مانند این‌ها است. همه این روش‌ها با این هدف استفاده می‌شوند که بتوان با سرعت زیاد و هزینه کم و دقت زیاد سویه‌های مختلف را جداسازی کرد. آرایه کریسپر یک روش بسیار مناسبی است که می‌توان این کار را انجام دهد. وجود آرایه کریسپر در سویه باکتری می‌تواند یک عامل مهم برای استفاده از کارایی آن باشد. کریسپر به صورت موفق برای جداسازی و شناخت میکروارگانیسم‌ها در صنعت قابل استفاده است. آرایه کریسپر به صورت ترکیب با ژن‌های Cas برای جداسازی سویه های *Lactobacillus casei and*

1. Starter culture
2. Strain typing

paracasei استفاده شد که نشان داد کریسپر در سویه های مختلف بخش‌های متفاوتی از ژنوم را شامل می‌شود. نژادگان[1] پایه کریسپر در *Lactobacillus* و سایر میکروارگانیسم‌ها که در صنایع مورد استفاده قرار می‌گیرد، می‌تواند متفاوت باشد. کریسپر برای دیگر میکروارگانیسم‌های غیرآغازگر مانند *Enterococcus faecali* نیز استفاده می‌شود. اگرچه وجود تفاوت در توالی کریسپر را نمی‌توان مبنایی برای تفاوت در سطح نژاد قرار داد، اما می‌تواند تفاوت بین سویه‌های مختلف را به وسیله این روش تعیین کرد. درنتیجه، بصورت چکیده می‌توان گفت که نژادگان کریسپر می‌تواند یک روش مؤثر برای تشخیص میکروارگانیسم‌های مفید در صنعت غذا باشد. برای نمونه، در باکتری *Lactobacillus buchneri*که عامل فساد است نوع II کریسپر وجود دارد و به طور معمول در خیارشور تخمیری دیده می‌شود. از این رو، می‌توان به صورت معمول از گونه‌هایی که دارای سیستم کریسپر هستند برای تخمین شمار باکتری‌های عامل فساد استفاده‌کرد.

کریسپر برای تشخیص و تعیین باکتری‌های بیماری‌زای غذازاد[2] مانند *Salmonella* نیز استفاده می‌شود. افزون بر این، شماری از بیماری‌زاها مانند *Campylobacter jejuni*، *Clostridium difficile*، *Corynebacterium diphtheria*، *Staphylococcus aureus* و *Vibrio parahaemolyticus* نیز به صورت پایه‌ای دارای ساختار کریسپر هستند.

گونه‌های مختلف باکتریایی با هم به مقدار زیادی مشابه هستند و گاهی تا ۹۹٪ تشابه دارند و تفاوت بین آن‌ها بسیار اندک است. برای جداسازی این گونه‌ها روش‌های مختلف ژنتیکی وجود دارد که بسیار زمان‌بر بوده و از این رو، از روش کریسپر برای جداسازی آن‌ها استفاده می‌شود.

برای توالی ویژه که در یک گونه نسبت به گونه مورد نظر برای جداسازی متفاوت است و هدف این است که این گونه از بین برود یک gRNA طراحی می‌شود و با مجموعه کریسپر وارد مجموعه باکتریایی مورد نظر می‌شود. بنابراین، به تمام باکتری‌ها وارد شده و تنها در گونه‌ای که توالی مکمل دارد، متصل می‌شود و موجب از بین رفتن باکتری می‌شود. باکتری‌هایی که این توالی مکمل را ندارند از فعالیت کریسپر در امان می‌مانند و از این رو خالص‌سازی می‌شوند. این روش برای تفاوت در یک نوکلئوتید نیز انجام‌شدنی است (Parsaeimehr *et al*., 2022; Stout *et al*.2017; Bikard & Barrangou, 2017).

مقاومت فاژی

فاژها امروزه به عنوان چالشی در صنعت غذاها و صنایع تخمیری مطرح هستند و موجب ایجاد خسارت‌های اقتصادی می‌شوند. در صنعت غذا برای کاهش این خسارت‌ها برخی از کارها انجام می‌شود؛ از جمله تغییردادن عامل‌های طراحی، دستورکارهای فرآیند، تغییر محیط کشت و مانند این ها. وجود فاژها یکی از دلیل‌های آهسته یا انجام نشدن فرآیند تخمیر در صنعت غذا به حساب می‌آیند. فاژها توسط مواد اولیه وارد شده و در برابر دما، فشار بالا، پرتوهای رادیویی و پاستوریزه کردن مقاومند. سیستم کریسپر سازوکاری است که یاخته برای محافظت خود در مقابل DNA خارجی از آن استفاده می‌کند. برای بررسی این مسئله، باکتری *Streptococcus thermophilus* در ۴ مرحله در برابر ۴ فاژ متفاوت قرار گرفت و در هر مرحله، باکتری‌هایی که نسبت به فاژ مقاوم نبودند از بین رفته و باکتری‌های مقاوم باقی می‌مانند. پس از انجام ۴ مرحله، مشخص شد که باکتری‌های باقی مانده نسبت به هر ۴ فاژ مقاوم شده‌اند که دلیل آن قرار گرفتن بخشی از ژنوم فاژهای مربوطه در داخل ساختار کریسپر باکتری بوده است. سودمندی این مسئله این است که این یک ساختار طبیعی بوده و در

1. Genotype
2. Foodborne disease

شماری از میکروارگانیسم‌های عامل تخمیر وجود دارد که می‌توان از آن برای ایمن‌سازی در برابر فاژها استفاده نمود (Barrangou *et al.* 2013).

واکسینه‌کردن پلاسمید

پلاسمیدها توالی‌هایی هستند که گاهی برای باکتری‌ها مفید و گاهی نیز زیانبار هستند، چون باکتری برای تکثیر این پلاسمید نیاز به مصرف انرژی زیادی دارد. برای مهندسی کردن فرایند واکسینه شدن باکتری‌ها در مقابل پلاسمید، بخشی از ژنوم پلاسمید (Spacer) که مربوط به ناحیه‌ای خاص از پلاسمید است و بیشتر مربوط به مبدا همانندسازی[1] (ناحیه تکثیر) است را در نظر گرفته و آن را به باکتری منتقل می‌کنند و با این روش باکتری در مقابل پلاسمید مقاوم می‌شود. این بخش دارای اشتراک‌های زیادی در بیشتر پلاسمیدها است و انتقالش به داخل باکتری، آن را در مقابل دامنه وسیعی از پلاسمیدها مقاوم می‌سازد.

پلاسیمدها در حالت طبیعی دارای صفت Malthusian Fitness Burden هستند که آن‌ها را از یاخته میزبان عبور می‌دهد. از این رو، هنگامی‌که پلاسمید با یک یاخته که دارای سیستم کریسپر است برخورد می‌کند، وارد یاخته میزبان شده و یاخته یک توالی از ژنوم پلاسمید را دریافت نموده و آن را در آرایه کریسپر خود قرار می‌دهد و خود در مقابل دریافت این پلاسمید واکسینه می‌شود. سودمندی عمومی این کار این است که یاخته در مقابل خود پلاسمید واکسینه می‌شود.

یکی از دشواری‌های موجود در صنعت غذا مقاومت پادزیستی است و این امکان وجود دارد که سویه‌های دارای ژن‌های مقاومت به پادزیست به عنوان مخزنی برای انتقال به سایر میکروارگانیسم‌ها عمل کنند. از این رو، سودمندی دیگرش این است که یاخته در مقابل دریافت DNAهای نامطلوب مانند ژن‌های مقاومت به پادزیست که بیشتر با پلاسمیدها منتقل می‌شوند نیز واکسینه می‌شود. اگرچه این حالت به صورت طبیعی انجام می‌شود، اما در مهندسی ژنتیک نیز انجام‌پذیر است. با قرار دادن ژن مقاوم به پادزیست در آرایه[2] کریسپر باکتری، این یاخته در مقابل وجود این ژن و ورود پلاسمیدهای ناقلش مقاوم می‌شود که در *Streptococcus thermophilus* این کار با موفقیت انجام شده است. همچنین، ژن‌های مقاومت به پادزیست از یاخته‌هایی که حاوی سیستم کریسپر نبوده‌اند به یاخته‌های حاوی این سیستم منتقل گردید و مقاومت به پادزیست در این یاخته‌های گیرنده نیز تایید شد؛ مانند انتقال از *Staphylococcus* به باکتری *E. coli* و این کار نه تنها در مورد فاژها، بلکه در مورد تمام ژنوم‌های خارجی ورودی نامطلوب مانند ژن‌های مقاومت به پادزیست می‌تواند مؤثر باشد.

ویرایش ژنوم

ویرایش با سیستم کریسپر توسط عامل‌هایی که پیش از این شرح داده شد، انجام می‌شود. برای ایجاد ویرایش ژنی در باکتری، باید یک سری عامل‌ها مانند فیزیولوژی باکتری‌ها و سازوکار هم‌ایستایی[3] DNA توجه شود. برای نمونه، شکستن دو رشته DNA در یاخته به احتمال زیاد به مرگ یاخته می انجامد. البته، در صورتی که سازوکار تعمیر درون DNA در یاخته وجود نداشته باشد. به صورت تئوری می‌توان از وجود سیستم کریسپر برای گزینش نژادگان‌های مناسب برای انجام فرآیندهای صنعتی استفاده کرد.

با استفاده از ویرایش ژنوم می‌توان باکتری‌هایی با توانمندی‌های بیشتر و عملکرد بالاتر برای استفاده در صنعت تولید

1. Original replication 2. Array 3. Hemostasis

نمود که این موضوع در تولید آغازگرهایی با توانمندی‌های عملکردی بیشتر و مقاوم‌تر و همچنین افزایش توانمندی‌های باکتری‌های پروبیوتیک در تولید ترکیب‌های مفید و همچنین سایر موردها مطرح است. این روش بیشتر در یاخته‌های یوکاریوتی بوده و در پروکاریوت‌ها خیلی کاربردی ندارد، زیرا بعد از شکسته‌شدن DNA توسط کریسپر سیستم تعمیر DNA باید فعال شده و آن را به هم متصل کند که این سیستم در یاخته‌های پروکاریوتی وجود ندارد. از این رو، وارد کردن سیستم کریسپر به داخل پروکاریوت‌ها و شکسته شدن ژنوم با آن موجب از بین رفتن پروکاریوت‌ها می‌شود؛ در حالی‌که سیستم تعمیر در یوکاریوت‌ها فعال بوده و عمل تعمیر را انجام می‌دهد. این سیستم برای ژنوم‌های خارجی عملکرد مناسبی دارد، اما برای ژنوم خود باکتری موجب مرگ آن می‌شود (Stout *et al*., Bikard & Barrangou, 2017; Parsaeimehr *et al*., 2022; 2017).

فعالیت‌های ضدمیکروبی

باکتری‌ها اغلب بدون سیستم ترمیم DNA هستند و اگر این رشته‌ها با سیستم کریسپر شکسته شوند، باکتری از بین خواهد رفت؛ اگرچه این ویژگی ابزاری در سیستم باکتری‌ها محسوب می‌شود، اما می‌توان از آن به عنوان روشی ضدباکتریایی استفاده کرد که این تخریب با سیستم کریسپر و بازسازی نشدن آن توسط باکتری به کاهش شمار میکروارگانیسم‌ها در محیط می‌انجامد. امروزه استفاده از محیط کشت‌های مخلوط در صنعت بسیار رواج دارد که یکی از دلیل های این رواج کاهش خطر آسیب فاژها در صنعت است. اگرچه محیط کشت‌های مخلوط در صنعت دارای سودمندی‌های زیادی هستند، اما دارای ایرادهایی نیز می‌باشند. برای نمونه، جداسازی سویه‌ها بسیار سخت است، چون گونه‌ها دارای فیزیولوژی نزدیکی هستند و آلوده‌شدن محیط کشت مخلوط با یک موجود خارجی می‌تواند کنترل آن را با دشواری روبه‌رو کند.

در روش‌های تجاری برای جداسازی گونه‌ها و کنترل شرایط جمعیتی مخلوط به موردهایی مانند شرایط رشد پادزیست‌ها، پپتیدهای ضدمیکروبی و باکتریوفاژها باید توجه شود. اگرچه ویژگی ضدمیکروبی کریسپر هنوز در میکروارگانیسم‌های تخمیری صنعتی نشده است، اما کارایی آن در سایر گروه‌های میکروبی نویدبخش این مسئله است که می‌توان ازآن در صنایع نیز استفاده کرد. نشان داده شده است که با استفاده از ویژگی ضدمیکروبی کریسپر می‌توان دو زیرگونه *E. coli* که دارای ۹۹٪ اشتراک در توالی هستند را جداسازی کنند. علت آن است که قطعه‌های Spacer موجود در آرایه کریسپر بسیار اختصاصی هستند. همچنین، مشخص شد هنگامی که حذف کامل مطلوب نباشد از ویژگی ضدمیکروبی کریسپر می‌توان برای تغییر شرایط کشت مخلوط استفاده کرد (Bikard & Barrangou, 2017; Stout *et al*., 2017).

مشخص شده است که سیستم طبیعی کریسپر با توانایی که در حذف انتخابی گونه‌های مختلف در جمعیت میکروبی دارد می‌تواند به عنوان ابزار ضدمیکروبی قوی و قابل برنامه‌ریزی عمل کنند. در روش دیگری که ویژگی ضدمیکروبی کریسپر آزمایش شد به وسیله این سیستم توالی خاصی که مسئول تولید یک نوع ترکیب ویژه و یا پروتئین ویژه‌ای است را تخریب نمودند که این کار موجب کاهش تولید ترکیب و کاهش مقاومت میکروارگانیسم در مقابل داروها و پادزیست‌های مرسوم شد. با استفاده از سیستم کریسپر به عنوان یک پادزیست و ضدمیکروب، مقاومت به پادزیست‌ها نیز به احتمال زیاد حل خواهد شد. هرچند در متن حاضر بیشتر از کارایی کریسپر در موردباکتری‌های غذایی صحبت شد، این فناوری از مزرعه تا تولید نهایی در صنعت و کشاورزی نیز استفاده می‌شود (Stout *et al*., 2017; Bikard & Barrangou, 2017).

نتیجه گیری

همان طور که بیان شد، برش هدفمند و برنامه ریزی شده مولکول DNA با استفاده از سیستم (CRISPR-Cas9 امکان مهندسی و ویرایش ژنوم را فراهم می آورد که از این فناوری می‌توان در اصلاح ژنتیکی گیاهان، جانوران ، باکتری‌ها و سایر موجودها استفاده نمود. این فناوری هر روزه در حال پیشرفت بوده و کاستی‌های آن برطرف می‌شود اگر چه این فناوری دارای سودمندی‌های زیادی است، اما انکار ناپذیر است که ممکن دارای تأثیرهای خارج از هدف و یا اثرهای جانبی باشد. دانشمندان هنوز در حال پژوهش برای تعیین بی‌خطر و موثر بودن این روش برای استفاده در انسان‌ها می‌باشند. این روش در پژوهش‌ها و آزمایش‌های بالینی برای دامنه گسترده‌ای از بیماری‌ها، از جمله اختلال‌های تک ژنی مانند فیبروز کیستیک، هموفیلی و کم خونی داسی شکل بررسی شده است. همچنین، این سیستم نویدبخش درمان و پیشگیری از بیماری‌های پیچیده‌تر مانند سرطان، بیماری‌های قلبی، بیماری‌های روانی و عفونت ویروس نقص ایمنی انسانی یا HIV[1] است. به هر حال، نگرانی‌های اخلاقی زمانی به وجود می‌آیند که ویرایش ژنوم با استفاده از فناوری‌هایی مانند CRISPR-Cas9 برای تغییر ژنوم انسان استفاده می‌شود.

منابع

بیات، هادی؛ نادری، فاطمه؛ محمدیان، امید؛ رحیم پور، اعظم. (۱۳۹۶). سیستم کریسپر و پیشرفت های اخیر در دقت عملکرد ان. مجله دانشگاه علوم پزشکی جیرفت.

پروین، محمدرضا؛ سیدین، علی. (۱۳۹۶). فناوری ویرایش ژن CRISPER CAS9 از منظر حقوق مالکیت فکری و ایمنی زیستی. فصلنامه حقوق پزشکی.

جدیدی، مطهره؛ عرب، ابوالفضل. (۱۳۹۵). سیستم ژن درمانی CRISPR/Cas ابزاری نوین برای درمان بیماری های ژنتیکی پیچیده. دو فصلنامه علمی دانشجویی زیست شناسی.

ولیان بروجنی، صادق؛ محمدی فارسانی، فرزانه. (۱۳۹۶). تکنولوژی CRISPR/Cas و کاربرد آن در درمان بیمار یهای ژنتیکی. فصلنامه آزمایشگاه و تشخیص . انجمن دکترای علوم آزمایشگاهی تشخیص طبی ایران. ۳۷

Anders, C., Niewoehner, O., Duerst, A., & Jinek, M. (2014). Structural basis of PAM-dependent target DNA recognition by the Cas9 endonuclease. *Nature*, *513*(7519), 569–573. https://doi.org/10.1038/nature13579

Barrangou R. (2015). The roles of CRISPR-Cas systems in adaptive immunity and beyond. *Current opinion in immunology*, *32*, 36–41. https://doi.org/10.1016/j.coi.2014.12.008

Barrangou, R., Coûté-Monvoisin, A. C., Stahl, B., Chavichvily, I., Damange, F., Romero, D. A., Boyaval, P., Fremaux, C., & Horvath, P. (2013). Genomic impact of CRISPR immunization against bacteriophages. *Biochemical Society transactions*, *41*(6), 1383–1391. https://doi.org/10.1042/BST20130160

Bikard, D., & Barrangou, R. (2017). Using CRISPR-Cas systems as antimicrobials. *Current opinion in microbiology*, *37*, 155–160. https://doi.org/10.1016/j.mib.2017.08.005

Brandt, K., & Barrangou, R. (2019). Applications of CRISPR Technologies Across the Food Supply Chain. *Annual review of food science and technology*, *10*, 133–150. https://doi.org/10.1146/annurev-food-032818-121204

Bennett, E. P., Petersen, B. L., Johansen, I. E., Niu, Y., Yang, Z., Chamberlain, C. A., Met, Ö., Wandall, H. H., & Frödin, M. (2020). INDEL detection, the 'Achilles heel' of precise genome editing: a survey of methods for accurate profiling of gene editing induced indels. *Nucleic acids research*, *48*(21), 11958–11981. https://doi.org/10.1093/nar/gkaa975

Eş, I., Gavahian, M., Marti-Quijal, F. J., Lorenzo, J. M., Mousavi Khaneghah, A., Tsatsanis, C., Kampranis, S. C., & Barba, F. J. (2019). The application of the CRISPR-Cas9 genome editing machinery in food and

1. Human immunodeficiency virus

agricultural science: Current status, future perspectives, and associated challenges. *Biotechnology advances*, *37*(3), 410–421. https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2019.02.006

Gallo, M E. Sarata, A K. Sargent, J F & Cowan, T. (2018). Advanced Gene Editing: CRISPR-Cas9. Congressional Research Service. https://crsreports.congress.govR44824

Hryhorowicz (Boksa), M. Lipiński, D. Zeyland, J & Slomski, R. (2016). CRISPR/Cas9 Immune System as a Tool for Genome Engineering. Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis. 65. 10.1007/s00005-016-0427-5.

Javaid, N., & Choi, S. (2021). CRISPR/Cas System and Factors Affecting Its Precision and Efficiency. *Frontiers in cell and developmental biology*, *9*, 761709. https://doi.org/10.3389/fcell.2021.761709

Jiang, F., & Doudna, J. A. (2017). CRISPR-Cas9 Structures and Mechanisms. *Annual review of biophysics*, *46*, 505–529. https://doi.org/10.1146/annurev-biophys-062215-010822

Pineault, K. M., Novoa, A., Lozovska, A., Wellik, D. M., & Mallo, M. (2019). Two CRISPR/Cas9-mediated methods for targeting complex insertions, deletions, or replacements in mouse. *MethodsX*, *6*, 2088–2100. https://doi.org/10.1016/j.mex.2019.09.003

Lander E. S. (2016). The Heroes of CRISPR. *Cell*, *164*(1-2), 18–28.https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.12.041

Mei, Y., Wang, Y., Chen, H., Sun, Z. S., & Ju, X. D. (2016). Recent Progress in CRISPR/Cas9 Technology. *Journal of genetics and genomics = Yi chuan xue bao*, *43*(2), 63–75. https://doi.org/10.1016/j.jgg.2016.01.001

Meiliana, A. Dewi, N & Wijaya, A. (2017). Genome Editing with Crispr-Cas9 Systems: Basic Research and Clinical Applications. *The Indonesian Biomedical Journal*. 9. 1. 10.18585/inabj.v9i1.272.

Mokarova, K. S., Wolf, Y. I., Alkhnbashi, O. S., Costa, F., Shah, S. A., Saunders, S. J., Barrangou, R., Brouns, S. J., Charpentier, E., Haft, D. H., Horvath, P., Moineau, S., Mojica, F. J., Terns, R. M., Terns, M. P., White, M. F., Yakunin, A. F., Garrett, R. A., van der Oost, J., Backofen, R., … Koonin, E. V. (2015). An updated evolutionary classification of CRISPR-Cas systems. *Nature reviews. Microbiology*, *13*(11), 722–736. https://doi.org/10.1038/nrmicro3569

Mokarova, K. S., Haft, D. H., Barrangou, R., Brouns, S. J., Charpentier, E., Horvath, P., Moineau, S., Mojica, F. J., Wolf, Y. I., Yakunin, A. F., van der Oost, J., & Koonin, E. V. (2011). Evolution and classification of the CRISPR-Cas systems. *Nature reviews. Microbiology*, *9*(6), 467–477. https://doi.org/10.1038/nrmicro2577

Mokarova, K. S., & Koonin, E. V. (2015). Annotation and Classification of CRISPR-Cas Systems. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, *1311*, 47–75. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2687-9_4

Niewoehner, O., Garcia-Doval, C., Rostøl, J. T., Berk, C., Schwede, F., Bigler, L., Hall, J., Marraffini, L. A., & Jinek, M. (2017). Type III CRISPR-Cas systems produce cyclic oligoadenylate second messengers. *Nature*, *548*(7669), 543–548. https://doi.org/10.1038/nature23467

Parsaeimehr, A., Ebirim, R. I., & Ozbay, G. (2022). CRISPR-Cas technology a new era in genomic engineering. *Biotechnology reports (Amsterdam, Netherlands)*, *34*, e00731. https: //doi.org/ 10.1016/j.btre. 2022.e00731

Selle, K., & Barrangou, R. (2015). CRISPR-Based Technologies and the Future of Food Science. *Journal of food science*, *80*(11), R2367–R2372. https://doi.org/10.1111/1750-3841.13094

Rainha, J., Rodrigues, J. L., & Rodrigues, L. R. (2020). CRISPR-Cas9: A Powerful Tool to Efficiently Engineer *Saccharomyces cerevisiae*. *Life (Basel, Switzerland)*, *11*(1), 13. https://doi.org/ 10.3390/life11010013

Stout, E., Klaenhammer, T., & Barrangou, R. (2017). CRISPR-Cas Technologies and Applications in Food Bacteria. *Annual review of food science and technology*, *8*, 413–437. https://doi.org/10.1146/annurev-food-072816-024723

Wei, Y., Terns, R. M., & Terns, M. P. (2015). Cas9 function and host genome sampling in Type II-A CRISPR-Cas adaptation. *Genes & development*, *29*(4), 356–361. https://doi.org/10.1101/gad.257550.114

Yao, R., Liu, D., Jia, X., Zheng, Y., Liu, W., & Xiao, Y. (2018). CRISPR-Cas9/Cas12a biotechnology and application in bacteria. *Synthetic and systems biotechnology*, *3*(3), 135–149. https://doi.org/ 10.1016/j.synbio.2018.09.004

Zhang, X. H., Tee, L. Y., Wang, X. G., Huang, Q. S., & Yang, S. H. (2015). Off-target Effects in CRISPR/Cas9-mediated Genome Engineering. *Molecular therapy. Nucleic acids*, *4*(11), e264. https://doi.org/10.1038/mtna.2015.37

Joberty, G., Fälth-Savitski, M., Paulmann, M., Bösche, M., Doce, C., Cheng, A. T., Drewes, G., & Grandi, P. (2020). A Tandem Guide RNA-Based Strategy for Efficient CRISPR Gene Editing of Cell Populations with Low Heterogeneity of Edited Alleles. *The CRISPR journal*, *3*(2), 123–134. https://doi.org/10.1089/crispr.2019.0064

Ishino, Y., Krupovic, M., & Forterre, P. (2018). History of CRISPR-Cas from Encounter with a Mysterious Repeated Sequence to Genome Editing Technology. *Journal of bacteriology*, *200*(7), e00580-17. https: //doi.org/10.1128/JB.00580-17

Strategic Research Journal of Agricultural Sciences and Natural Resources 9(1):1-18 (2024)

Crisper Technology and Its Application in Food Industries

Yazdanpanah, E.[1], Eghbalsaid Abueshaghi, S. and Khomeiri, M.[2]

Increasing world population and food supply is one of the challenges facing mankind. One of the most important and effective ways to increase food production is the use of genetic engineering; and CrisperCas9 is one of the new known and accurate genome editing methods. Simplicity of use, cheaper, accuracy and proper efficiency are among the most important features of this technology that make it different from other similar methods. CrisperCas9 is somehow related to the immune system related to a short sequence of DNA. In fact, CRISPR is the prokaryotic immune system that creates resistance to external threats, such as DNA phages, plasmids, and viruses. This system has three main parts. A part of it is CrRNA which has a repetitive sequence. which is complementary to the sequence in Trac RNA. CrRNA binds to the target site through its complement, and the Trac RNA sequence also binds to its complement, which is the repetitive sequences in CrRNA. This spatial structure causes the Cas9 protein to be called to the target site. In the food industry, the CRISPR system can be used as a powerful tool in the management of fermentation products for its use in increasing phage resistance, plasmid vaccination, genome editing, and antibacterial activities, which are reviewed in this article.

Key words: Cas9, CRISPR technology, Food industry, Genome.

1. Corresponding author, Email: ehsany81@yahoo.com
2. Ph.D. Student of Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Professor of Islamic Azad University, Khorasan Branch and Professor of Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, respectively.