# Step by Step Design of Popular and Common Vectors in Genetic Manipulation Using CRISPR/Cas9 System

**Mina Kolahdouzmohammadi[1], Sara Pahlavan[2], Yaser Tahamtani[3,4], Fattah Sotoodehnejadnematalahi[5], Mehdi Totonchi[6,7]**

1. Ph.D. Candidate, Department of Biology, School of Basic Sciences, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran. ORCID ID: 0000-0001-7236-5154
2. Assistant Professor, Department of Stem Cells and Developmental Biology, Cell Science Research Center, Royan Institute for Stem Cell Biology and Technology, ACECR, Banihashem Sq., Banihashem St., Resalat Highway, Tehran, Iran. ORCID ID: 0000-0002-8854-2626
3. Assistant Professor, Department of Stem Cells and Developmental Biology, Cell Science Research Center, Royan Institute for Stem Cell Biology and Technology, ACECR, Banihashem Sq., Banihashem St., Resalat Highway, Tehran, Iran. ORCID ID: 0000-0003-2360-4985
4. Assistant Professor, Reproductive Epidemiology Research Center, Royan Institute for Reproductive Biomedicine, ACECR, Tehran, Iran. ORCID ID: 0000-0003-2360-4985
5. Assistant Professor, Department of Biology, School of Basic Sciences, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran. (Corresponding Author), Tel: 021- 4486 5179, Email: sotoudehnejad@srbiau.ac.ir, ORCID ID: 0000-0002-4287-9792
6. Associate Professor, Department of Stem Cells and Developmental Biology, Cell Science Research Center, Royan Institute for Stem Cell Biology and Technology, ACECR, Banihashem Sq., Banihashem St., Resalat Highway, Tehran, Iran. (Corresponding Author), Tel: 021- 23562737, Email: m.totonchi@royaninstitute.org, ORCID ID: 0000-0002-7285-3155
7. Associate Professor, Department of Genetics, Reproductive Biomedicine Research Center, Royan Institute for Reproductive Biomedicine, ACECR, Tehran, Iran. (Corresponding Author), Tel: 021-23562737, Email: m.totonchi@royaninstitute.org, ORCID ID: 0000-0002-7285-3155

## ABSTRACT

**Background and Aim:** Genome editing is an efficient and accurate method in biological and medical studies. Among the wide range of genome editing techniques, clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR) is one of the simplest and yet promising methods. The CRISPR system consists of two key components; an endonuclease enzyme called Cas9 and guide RNA (gRNA), ensuring that Cas9 enzyme cuts at the right point in the genome. Although CRISPR genome editing is one of the useful methods to modify the genome, there are still multiple challenges in the technique steps.

**Materials and Methods:** sgRNAs were designed and ordered accordingly on the basis of the target site and vector of interest. Cloning procedures were performed and confirmed by sequencing as a gold standard. The list of high efficient sgRNAs for the *LAMP-2* gene was prepared based on the available outstanding databases by analyzing and comparing the specificity and functionality as two main characteristics.

**Results:** In this study, we tried to evaluate the main challenges in the process of preparing CRISPR/Cas9 popular vectors (pX330/pX459). A list of high efficient sgRNAs for an autophagy gene is also prepared as an example for clarification of the sgRNA design procedures.

**Conclusion:** This study tried to depict problems that may be encountered during sgRNA design and plasmid preparation, followed by giving appropriate recommendations.

**Keywords:** CRISPR/Cas9, Genome editing, sgRNA, pX330/pX459, Plasmid

**Received:** Nov 7, 2021 **Accepted:** Dec 6, 2022

**How to cite the article:** Mina Kolahdouzmohammadi, Sara Pahlavan, Yaser Tahamtani, Fattah Sotoodehnejadnematalahi, Mehdi Totonchi. Step by Step Design of Popular and Common Vectors in Genetic Manipulation Using CRISPR/Cas9 System.SJKU 2022;27(4):93-109.

Copyright © 2018 the Author (s). Published by Kurdistan University of Medical Sciences. This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-Non Commercial License 4.0 (CCBYNC), where it is permissible to download, share, remix, transform, and buildup the work provided it is properly cited. The work cannot be used commercially without permission from the journal

[ Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2024-10-12 ]

[ DOI: 10.52547/sjku.27.4.93 ]

# طراحی گام به‌گام وکتورهای محبوب و شایع در دست‌ورزی ژنتیکی با استفاده از سیستم CRISPR/Cas9

**مینا کلاهدوزمحمدی [۱]، سارا پهلوان [۲]، یاسر تهمتنی [۳،۴]، فتاح ستوده نژاد نعمت الهی [۵]، مهدی توتونچی [۶،۷]**

۱. دانشجوی دکتری، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، دانشکده علوم پایه، گروه زیست‌شناسی، تهران، ایران، کد ارکید: ۵۱۵۴-۷۲۳۶-۰۰۰۱-۰۰۰۰

۲. استادیار، پژوهشگاه رویان، پژوهشکده زیست‌شناسی و فناوری سلول‌های بنیادی، گروه پژوهشی قلب و عروق، تهران، ایران، کد ارکید: ۲۶۲۶-۸۸۵۴-۰۰۰۲-۰۰۰۰

۳. استادیار، پژوهشگاه رویان، پژوهشکده زیست‌شناسی و فناوری سلول‌های بنیادی جهاد دانشگاهی، مرکز تحقیقات علوم سلولی، گروه سلول‌های بنیادی و زیست‌شناسی تکوینی، تهران، ایران، کد ارکید: ۴۹۸۵-۲۳۶۰-۰۰۰۳-۰۰۰۰

۴. استادیار، پژوهشگاه رویان، پژوهشکده زیست شناسی و علوم پزشکی تولید مثل جهاد دانشگاهی، مرکز تحقیقات اپیدمیولوژی باروری، تهران، ایران، کد ارکید: ۴۹۸۵-۲۳۶۰-۰۰۰۳-۰۰۰۰

۵. استادیار، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، دانشکده علوم پایه، گروه زیست‌شناسی، تهران، ایران، پست الکترونیک:sotoudehnejad@srbiau.ac.ir ، تلفن: ۰۲۱۴۴۸۸۵۱۷۹ کد ارکید: ۹۷۹۲-۴۲۸۷-۰۰۰۲-۰۰۰۰

۶. دانشیار، پژوهشگاه رویان، پژوهشکده زیست شناسی و فناوری سلول‌های بنیادی جهاد دانشگاهی، مرکز تحقیقات علوم سلولی، گروه سلول‌های بنیادی و زیست‌شناسی تکوینی، تهران، ایران، پست الکترونیک: m.totonchi@royaninstitute.org، تلفن: ۰۲۱۲۳۵۶۲۷۳۷، کد ارکید: ۳۱۵۵-۷۲۸۵-۰۰۰۲-۰۰۰۰

۷. دانشیار، پژوهشگاه رویان، پژوهشکده زیست‌شناسی و علوم پزشکی تولید مثل جهاد دانشگاهی، مرکز تحقیقات پزشکی تولید مثل، گروه ژنتیک، تهران، ایران، پست الکترونیک: m.totonchi@royaninstitute.org، تلفن: ۰۲۱۲۳۵۶۲۷۳۷، کد ارکید: ۳۱۵۵-۷۲۸۵-۰۰۰۲-۰۰۰۰

## چکیده

**زمینه و هدف:** ویرایش ژنوم روشی کارآمد و دقیق در مطالعات بیولوژیکی و پزشکی است. در میان طیف وسیعی از تکنیک‌های ویرایش ژنوم، تکرارهای کوتاه پالیندرومی بافاصله منظم خوشه‌ای (CRISPR) یکی از ساده‌ترین روش‌ها و درعین‌حال بسیار امیدوارکننده است. سیستم CRISPR از دو جزء کلیدی تشکیل شده است. یک آنزیم اندونوکلئاز به نام Cas9 و یک هدایت‌کننده RNA (gRNA) که اطمینان حاصل می‌کند که آنزیم Cas9 نقطه مناسبی از ژنوم را برش می‌دهد. اگرچه ویرایش ژنوم بر پایه CRISPR یکی از روش‌های مفید برای اصلاح ژنوم است؛ اما هنوز چالش‌های متعددی در مراحل این تکنیک وجود دارد.

**مواد و روش‌ها:** RNA های راهنما بر اساس مکان هدف و وکتور موردنظر طراحی و سفارش داده شدند. مراحل کلونینگ انجام شد و با تعیین توالی، به‌عنوان یک روش استاندارد طلایی تأیید شدند. فهرستی از RNA های راهنما کارآمد برای ژن *LAMP-2* بر اساس پایگاه‌های داده برجسته موجود و با تجزیه‌وتحلیل و مقایسه اختصاصیت و عملکرد به‌عنوان دو ویژگی اصلی فراهم شد.

**یافته‌ها:** در این مطالعه سعی شده است تا چالش‌های اصلی در فرایند تهیه وکتورهای محبوب (pX330/pX459) سیستم CRISPR/Cas9 بررسی شوند. همچنین فهرستی از RNA های راهنما کارآمد برای یک ژن اتوفاژی نیز به‌عنوان مثال برای روشن شدن روش‌های طراحی RNA راهنما فراهم آمده است.

**نتیجه‌گیری:** در این مقاله سعی شده است تا مشکلاتی که احتمال می‌رود در طول طراحی RNA راهنما و آماده‌سازی پلاسمید به وجود آید، به تصویر کشیده شوند و به دنبال آن توصیه‌های مناسب برای حل آن‌ها ارائه شود.

**کلمات کلیدی:** CRISPR/Cas9، ویرایش ژنوم، sgRNA، pX330/pX459، پلاسمید

## مقدمه

[ Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2024-10-12 ]

[ DOI: 10.52547/sjku.27.4.93 ]

تکرارهای کوتاه پالیندرومیک خوشه‌ای بافاصله منظم (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats, CRISPR)/ پروتئین ۹ مرتبط با CRISPR (CRISPR Associated Protein 9, Cas9) یک فناوری مهندسی ژنوم است که فرصت‌های بسیاری را برای اصلاح ژنوم در مکان خاص فراهم می‌کند (۱). سیستم CRISPR/Cas9 از RNA های راهنما (guide RNA, gRNA) و یک موتیف مجاور فاصله انداز Protospacer (Adjacent Motif, PAM) برای هدف قرار دادن و جداسازی DNA ژنومی به طور خاص استفاده می‌کند (۲). CRISPR/Cas9 با ایجاد یک شکست دو رشته‌ای (Double Strand Break, DSB) عمل می‌کند. تقریباً سه نوع اصلی (I-III) سیستم‌های CRISPR وجود دارند که نوع II در بین انواع مختلف CRISPR دارای بهترین ویژگی است. سیستم CRISPR با استفاده از توالی RNA راهنما طراحی شده، می‌تواند به هدف خود در سطح DNA متصل شود (۴, ۳). همواره نوکلئاز Cas9، DNA را سه جفت باز در بالادست توالی PAM برش می‌دهد و به این ترتیب تغییر هدفمند را اعمال می‌نماید (۵). پرکاربردترین پروتئین Cas9 از باکتری استرپتوکوک پیوژنز منشأ گرفته می‌شود و دارای 5′-NGG-3′ به عنوان یک توالی PAM است و با نام spCas9 شناخته می‌شود (۶). سیستم CRISPR/Cas9 برای طیف وسیعی از اهداف از جمله ناک‌این (Knock-in) و ناک‌اوت (Knock-out) ژن هدف (۷,۸)، ایجاد کتابخانه‌های غربالگری تلفیقی، برای کشف ژن (۱۰, ۹)، مهندسی ژنتیک حیوانات مدل (۷,۸) و ژن درمانی (۱۱,۱۲) استفاده می‌شود. مهندسی ژنوم بر پایه CRISPR/Cas9 دارای چالش‌های مختلفی در مراحل مختلف از طراحی RNA راهنما و آماده‌سازی پلاسمید تا انتقال به سلول/حیوان و غربالگری‌های بعدی است. این چالش‌ها از آزمایشگاهی به آزمایشگاه دیگر متفاوت هستند. هدف این مطالعه ارائه برخی نکات مهم در مورد طراحی RNA های راهنما و آماده‌سازی پلاسمید است که به طور قابل توجهی کارایی هدف‌گیری ژن را بر اساس تجربه ما بهبود می‌بخشد. دو مورد از اساسی‌ترین مراحل در سیستم CRISPR/Cas9 طراحی RNA های راهنما و ساخت پلاسمید می‌باشند. برای طراحی RNA های راهنما، نگرانی‌هایی در مورد برش خارج از هدف، اختصاصیت و عملکرد وجود دارند (۵). در این مقاله سعی شده است چالش‌هایی که ممکن است در طول طراحی RNA های راهنما و آماده سازی پلاسمید با آن‌ها مواجه شد، تشریح شوند و به دنبال آن توصیه‌هایی مناسب به عنوان راه حل ارائه شود.

## مواد و روش‌ها

طراحی و آماده سازی RNA های راهنما:

ویژگی‌های عمومی RNA های راهنما:

یکی از اساسی‌ترین مراحل در ویرایش ژنوم باواسطه سیستم CRISPR/Cas9 نحوه طراحی RNA راهنما است. برای طراحی RNA راهنما، انواع وب‌گاه‌ها و نرم‌افزارهای پیشرفته و موجود، طراحی را تسهیل می‌کنند (۵,۱۳) در مطالعات با رویکرد حذف ژن (Loss of function) هدف‌گیری دمین‌های کدکننده پروتئین می‌توانند نتایج مطلوب تری را فراهم کنند (۱۴). یک رویکرد رایج این است که RNA راهنماهایی انتخاب شوند که ترجیحاً قسمت انتهای N (N-terminal) اگزون‌های ژن‌های کدکننده پروتئین را هدف قرار دهند (۱۵). همچنین در طراحی RNA راهنما باید دقت شود تا اگزون‌هایی که در بین تمام رونوشت‌های یک ژن مشترک هستند، مورد هدف قرار گیرند. الگوریتم CRISPys به این منظور طراحی شده است تا بتوان توسط آن RNA راهنمایی طراحی کرد که بهینه‌ترین سکانس هدف را برای اعضای متعدد یک خانواده ژنی هدف قرار دهد (۱۶).

به هنگام طراحی RNA راهنما، نوع پلاسمید انتخاب شده جهت انجام ویرایش ژنوم باید مدنظر گرفته شود. به طور مثال اگر پلاسمید انتخاب شده در سیستم CRISPR دارای یک پروموتر U6 باشد و اولین نوکلئوتید توالی RNA



[ Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2024-10-12 ]

[ DOI: 10.52547/sjku.27.4.93 ]

راهنما G نباشد، باید یک نوکلئوتید G قبل از توالی RNA راهنما اضافه شود (۱۷). این G آغازگر به پروموتر U6 کمک می‌کند تا عملکرد بهتری داشته باشد. همچنین برای اتصال RNA راهنما طراحی شده با پلاسمیدهای (در اینجا pX330/pX459) برش داده شده با آنزیم‌های برش‌گر (restriction enzymes) مخصوص، برخی از بازها بر حسب جایگاه برشی آنزیم محدود کننده باید در بالادست/پایین دست توالی اصلی RNA راهنما اضافه شوند. با تمرکز روی pX330/pX459 برش داده شده با آنزیم BbsI، "CACC" و "AAAC" باید به ترتیب در پایین دست توالی راهنما و مکمل معکوس آن اضافه شوند (۱۷).

توصیه‌هایی در طراحی RNA راهنما:

برای مطالعات با هدف حذف ژن (Loss of function) با استفاده از سیستم CRISPR/Cas9، توصیه می‌شود حداقل از دو RNA راهنما مجزا برای هر ژن مورد نظر استفاده شود. بسته به ژن هدف طراحی RNA راهنما متفاوت است. اگر اولین و دومین امینواسید قابل ترجمه یا متیونین واقع در جایگاه شروع رونویسی (transcription start site) از یکدیگر فاصله زیادی داشته باشند، می‌توان اولین متیونین را در نظر گرفت؛ اما ممکن است همیشه یک RNA راهنما عملکردی و مشخص در این ناحیه، وجود نداشته باشد (۱۸). در این حالت دومین کدون ATG یا جای دیگری در اگزون‌های ابتدایی پیشنهاد می‌شود تا به این ترتیب چهارچوب ژن (Open reading frame,ORF) دچار برهم ریختگی شود (۱۵,۱۸,۱۹). هنگام طراحی یک RNA راهنما، به ویژه برای سیستم spCas9 که در آن NGG به عنوان PAM است، برای دقت بیشتر توصیه می‌شود که سه کدون آخر RNA راهنما حاوی NGG نباشند؛ زیرا Cas9 به اشتباه این نوکلئوتیدها را به عنوان PAM تشخیص داده و RNA راهنما را برش می‌دهد (۱۳).

در طراحی RNA راهنما، ارزیابی عملکرد یکی از نکات مهم است. دو RNA راهنما (همانطور که در بالا ذکر شد) بهتر است به دلیل حذف ناحیه مشخصی از ژن هدف دور از یکدیگر طراحی شوند. این رویکرد مرحله بعدی غربالگری با روش PCR معمولی را تسهیل می‌کند. اگرچه فاصله طولانی بین دو RNA راهنما توصیه می‌شود؛ اما تقریباً مهم است که توجه داشته باشید که این فاصله نباید از ۱۵۰۰ جفت باز فراتر برود؛ زیرا فاصله زیاد ممکن است عملکرد هم‌زمان دو RNA راهنما را کاهش دهد. جدول ۱ RNA های راهنما با بالاترین امتیاز را از پنج وب‌گاه متمایز و قابل اعتماد برای اگزون‌های *LAMP-2* نشان می‌دهد.

عملکرد ویرایش ژنوم به شدت به توالی RNA راهنما و ساختار ثانویه آن وابسته است (۲۰). اگر چه توصیه‌های کلی برای طراحی RNA راهنما سازگار نیست؛ اما برخی از ویژگی‌های طراحی را عموماً می‌توان در نظر گرفت. در طراحی RNA راهنما درصد نوکلئوتیدهای GC در بهترین حالت بین ۳۰ تا ۸۰ درصد است (۲۱). با توجه به مطالعات اخیر توصیه می‌شود تا برای کارایی بهتر، RNA راهنما برای رشته رونویسی نشونده (non-transcribed) طراحی شود. برای اتصال بهتر RNA راهنما به پروتئین Cas9 به ویژه در سلول‌های انسانی توصیه می‌شود چهار نوکلئوتید آخر از بازهای پورینی باشند (۲۲). همچنین ساختار ثانویه RNAراهنما در عملکرد آن بسیار مؤثر گزارش شده است (۲۳,۲۴). بر اساس مطالعه Liu و همکاران در سال ۲۰۱۶ مشاهده شد که بر حسب تجزیه و تحلیل Chi-square، بازهای موقعیت ۳ و ۲۰ با کارایی برش آنزیم مرتبط می‌باشند (۲۵). مطالعات روی ساختار کریستالی CRISPR/Cas9 نشان می‌دهد که نوکلئوتید در موقعیت ۲۰ جداسازی دو رشته DNA را القا می‌کند و مسئول شروع تشکیل حلقه R (R-Loop) است (۲۶).

طراحی RNA راهنما:



[ Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2024-10-12 ]

[ DOI: 10.52547/sjku.27.4.93 ]

با استفاده از پایگاه داده‌ای NCBI توالی DNA ژنومی انسان قابل‌دسترسی است. همچنین وب‌گاه‌های دیگری نیز برای این منظور وجود دارند (به‌عنوان‌مثال genome.ucsc.edu). با استفاده از قالب FASTA تحت عنوان یک فایل gb، می‌توان توالی به دست آمده را به نرم افزار CLC Workbench.v12 یا SnapGene وارد کرد. در این مطالعه از این دو پایگاه به صورت هم‌زمان برای افزایش دقت استفاده شد. بسیاری از وب‌گاه‌ها مانند https://chopchop.cbu.uib.no/، http://crispor.tefor.net/، https://www.benchling.com/crispr/ و غیره می‌توانند RNA راهنما مناسب را با استراتژی‌های مختلف طراحی کنند. هر یک از این پایگاه‌ها دارای ویژگی‌های منحصربه‌فرد می‌باشند. به طور مثال سیستم نمره دهی برای کارآمدی RNA راهنما، تعداد گونه‌هایی که در آن‌ها مورد بررسی قرار گرفته‌اند و همچنین انواع پروتئین‌های Cas موجود قابل بررسی در آن ها متفاوت است. هم‌چنین هر وب‌گاه معیارهای خاصی برای اندازه‌گیری اختصاصیت و عملکرد یک RNA راهنما دارد (۲۷,۲۸). مقایسه مزایا یا معایب این وب‌گاه‌ها دشوار است؛ اما می‌توان از داده‌های آن‌ها نتیجه‌گیری کرد (جدول ۱).

جدول۱. RNA های راهنما موجود با بالاترین امتیاز برای اگزون‌های ژن *LAMP-2*. میانگین کارآمدی بر اساس پایگاه‌های داده‌ای ChopChop،Crispor،Benchling،Vector builder و Portals Institute، میانگین اختصاصیت بر اساس پایگاه‌های داده‌ایCrispor،Benchling و Portals Institute و میانگین عملکرد خارج از هدف (off-target) بر اساس پایگاه‌های داده ایCrispor و Portals Institute بررسی شدند.

| شماره اگزون | سکانس هدف | میانگین کارآمدی ٪ (ChopChop/Crispor/Benchling/Vector builder/Portals Institute) | میانگین اختصاصیت ٪ (Crispor/Benchling/ Portals Institute) | میانگین عملکرد خارج از هدف ٪ (Crispor/ Portals Institute) |
|---|---|---|---|---|
| I | TCCGGGCTCAGGGCTCGTTC | ۴۱/۲ | ۶۴ | ۷۴/۵ |
| | CGAGCCCTGAGCCCGGAACC | ۴۸/۵ | ۴۹/۷ | ۳۰/۵ |
| | AGTGCGAGTCATAAGACTAG | ۳۳/۲ | ۴۶/۳ | ۶۸ |
| | GGTCCAGCGAGCCTTTTCCC | ۳۱/۵ | ۵۰/۸ | ۹۱ |
| | ACAACAACAGCTGCAACACC | ۳۱/۸ | ۴۳/۸ | ۱۹ |
| II | AGCTGTGCGGTCTTATGCAT | ۳۲/۹ | ۳۰/۵ | ۴۹/۵ |
| III | ATAGCAGTGCAGTTCGGACC | ۵۶/۶ | ۵۰/۳ | ۲۶ |
| | CTTGGTAAAATTCGCAATCC | ۵۴/۹ | ۵۱/۵ | ۳۷ |
| | TTCGCAATCCAGGAAAAGCC | ۵۲/۳ | ۳۹/۵ | ۶۹ |
| | CATTATATGTCACAGTGCCA | ۴۵/۵ | ۳۹/۵ | ۷۵/۵ |
| IV | TGATGTTGTCCAACACTACT | ۳۳/۴ | ۴۴/۵ | ۵۶/۵ |
| V | GGAACCTATTCAGTTAATAA | ۴۳/۸ | ۴۵/۳ | ۸۷/۵ |
| VI | GTGAGAACGGCAGCTGCCTG | ۳۸/۴ | ۲۱/۳ | ۲/۵ |
| | CCCAATACAACTCACTCCAC | ۳۱/۵ | ۲۸/۸ | ۵۱/۵ |
| VIII | GCACATATAAGAACTTCCCA | ۳۶ | ۲۷/۲ | ۷۰ |
| | CATATAAGAACTTCCCAGGG | ۴۱/۲ | ۲۴/۵ | ۷۳ |



[ Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2024-10-12 ]

[ DOI: 10.52547/sjku.27.4.93 ]

از بین همه RNA های راهنما پیشنهادی در هر وب‌گاه، توالی‌های هدف با کمترین امتیاز خارج از هدف (off-target) و بالاترین امتیاز درون هدف (on-target) باید انتخاب شوند. توصیه می‌شود که RNA های راهنما از وب‌گاه‌های مختلف مقایسه شوند تا اطلاعات مربوط به یک RNA راهنما با دقت بیشتری بررسی شود؛ زیرا سیستم امتیازدهی برای اختصاصیت و عملکرد RNA ها در وب‌گاه‌های مختلف متفاوت است. هنگامی که RNA راهنما مناسب انتخاب شد برای سفارش توالی مدنظر سکانس نوکلئوتیدی PAM (در اینجا برای spCas9، NGG) باید از توالی اصلی حذف گردد. همچنین، اگر اولین نوکلئوتید سکانس RNA راهنما در سیستم spCAS9 و وکتور انتخابی با پروموتر U6، G نباشد باید یک نوکلئوتید G به ابتدای آن افزود. علاوه بر این، برای برش پلاسمید مدنظر pX459 یا pX330 با آنزیم محدودکننده Bbs1 و به دلیل سکانس جایگاه برشی این آنزیم در دو وکتور مذکور باید توالی 'CACCG' به انتهای '۵ توالی RNA راهنما و 'AAAC' به انتهای '۵ رشته مکمل اضافه شوند تا امکان اتصالRNA راهنما و پلاسمید مربوطه فراهم شود.

آماده‌سازی و انیل کردن RNA راهنما:

برای هر RNA راهنما و مکمل معکوس آن مخلوط واکنش ۱۰µL حاوی gRNA (۱۰۰µM) ۱/۵µL، ۱/۵µL مکمل معکوس gRNA (۱۰۰µM)، ۱µL بافر T4 لیگاز ۱۰X (Thermo Scientific، شماره کاتولوگ E۱۰۰۱۶)، µL ۶ddH2O تهیه شد (جدول ۲).

**جدول ۲. مواد لازم جهت انجام واکنش انیل کردن**

| مقدار | ماده |
|---|---|
| ۱/۵µL | پرایمر F |
| ۱/۵µL | پرایمر R |
| ۱µL | بافر لایگیشن |
| ۶µL | آب مقطر (DDW) |
| ۱۰µL | حجم نهایی |

واکنش انیل شدن در دستگاه ترموسایکلر به شرح زیر انجام گرفت: ۹۷ درجه سانتیگراد به مدت ۳ دقیقه. ۷۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ دقیقه و سپس کاهش دما تا ۲۵ درجه سانتی‌گراد به‌صورت ۵ درجه سانتی‌گراد در هر ۲ دقیقه (۱۳,۲۹)

طراحی پرایمرهای غربالگری:

مشخصات کلی پرایمرهای غربالگری:

طراحی پرایمر جهت غربالگری یکی از نکات مهم در سیستم CRISPR/cas9 است. همواره توصیه می‌شود یک مجموعه از پرایمرها در داخل توالی هدف که باید حذف شود، طراحی شوند و مجموعه دیگری از پرایمرها در بالادست و پایین دست محل های برش RNA راهنما طراحی شوند (۱۷).

توصیه هایی برای طراحی پرایمرهای غربالگری:

اگر از دو یا سه مجموعه RNA راهنما استفاده می‌شود، توصیه می‌شود پرایمرهای غربالگری طوری طراحی شوند که تمام توالی‌های RNA های راهنما را در برگیرند. هنگامی که RNA راهنماهای طراحی شده به‌اندازه کافی دور قرار می‌گیرند (نه خیلی دور که کارایی کاهش یابد)، می‌توان از این پرایمرها برای نشان دادن تغییرات اعمال شده استفاده کرد. مجموعه پرایمرها همچنین می‌توانند برای توالی‌یابی بعدی به‌عنوان روش استاندارد طلایی استفاده شوند. همچنین توصیه می‌شود از پرایمری استفاده شود که



[ Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2024-10-12 ]

[ DOI: 10.52547/sjku.27.4.93 ]

حداقل bps ۱۰۰ از نقطه شروع توالی هدف فاصله داشته باشد و این فاصله بیش از bps ۸۰۰ نباشد (شرکت‌های مختلف توالی‌یابی دارای محدودیت‌های خاص خود می‌باشند و توصیه می‌شود قبل از هر اقدامی از قوانین توالی‌یابی شرکت مدنظر اطلاع حاصل شود). در این مطالعه، پرایمر برای اگزون ۱ بر اساس مکان RNA های راهنما طراحی شد. لیست پرایمرها را می توان در جدول ۳ یافت.

**جدول . فهرست RNA های راهنما و پرایمرهای غربالگری**

| مکان | سکانس | نوع |
|---|---|---|
| اگزون ۱ | CACC**G**CGTTCTGGTCTGCCTAGTCC | sgRNA-1F |
| اگزون ۱ | AAACGGACTAGGCAGACCAGAACG**C** | sgRNA-1R |
| اگزون ۱ | CACC**G**TCTCGCCGCTTTCAAGCGCG | sgRNA-2F |
| اگزون ۱ | AAACCGCGCTTGAAAGCGGCGAGA**C** | sgRNA-2R |
| اگزون ۱ | TCAGGAGCATAGGAAGGGCT | PrimerF |
| اگزون ۱ | GTTACCGGCCCCTTCTTACT | PrimerR |
| - | AAGAGGGCCTATTTCCCATGA | U6F |

Primer Blast و GeneRunner v6.52 به ترتیب برای تجزیه و تحلیل اختصاصیت پرایمرها و ارزیابی خصوصیات آن ها استفاده شدند. همچنین توصیه می‌شود مجموعه‌ای از پرایمرها بر اساس فعالیت خارج از هدف RNA راهنما (عدم اختصاصیت کامل) برای بررسی‌های نهایی طراحی شوند.

تولید پلاسمید برای سیستم CRISPR/Cas9:

نکات کلی برای تولید پلاسمید در سیستم CRISPR/Cas9:

مناسب‌ترین پلاسمیدهای مورد استفاده برای سیستم CRISPR/Cas9 را می‌توان در وب‌گاه های معرفی شده یافت. برخی از پلاسمیدها را می‌توان برای دو RNA راهنما به طور هم‌زمان استفاده کرد، در حالی که برخی از پلاسمیدها فقط برای یک RNA راهنما کاربرد دارند. در نهایت بسته به هدف مطالعه باید پلاسمید مناسب انتخاب شود. در شکل ۱ وب گاه های مناسب طراحی sgRNA ، انتخاب پلاسمید و سنجش اختصاصیت sgRNA آورده شده اند.

[ Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2024-10-12 ]

[ DOI: 10.52547/sjku.27.4.93 ]

**شکل ۱.پایگاه‌های داده در مطالعات بر پایه سیستمCRISPR/Cas9.** (الف) شناخته شده ترین وب‌گاه‌های قابل استفاده برای طراحی RNA راهنما (ب) شناخته شده ترین وب‌گاه‌های قابل استفاده برای طراحی پلاسمید (ج) وب‌گاه هایی برای تجزیه و تحلیل کارایی RNA راهنما

هر پلاسمید بر پایه سیستم CRISPR/Cas9 دارای یک محل آنزیم محدودکننده خاص است. بر اساس محل اثر آنزیم محدودالاثر (restriction enzyme)، به RNA راهنما باید سکانس‌های نوکلئوتیدی ویژه‌ای اضافه شوند که به‌این‌ترتیب اتصال پلاسمید به RNA راهنما بتواند به درستی بر اساس قوانین واتسون-کریک صورت پذیرد.

در این مطالعه، pX330 و pX459 برای رویکرد حذف عملکرد ژن مورداستفاده قرار گرفتند و توسط آنزیم BbsI که آنزیم محدود کننده از نوع Type-IIS است، هضم شدند. پلاسمید pX330 به دلیل اندازه تقریباً کوچک خود (حدوداً ۸ کیلوباز) همواره مورد توجه جهت استفاده در سیستم CRISPR/Cas9 بوده است؛ اما با توجه به اینکه این پلاسمید فاقد هرگونه مارکر انتخابی (selectable marker) جهت غربالگری است، در نتیجه از یک پلاسمید مشابه آن با نام pX459 (حدوداً ۹ کیلوباز) با مارکر غربالگری آنتی بیوتیکی (پرومایسین) می‌توان استفاده کرد (۳۰). بر اساس مکان آنزیم محدودکننده BbsI، 'CACCG' به انتهای '۵ توالی RNA راهنما و 'AAAC' به انتهای '۵ رشته مکمل اضافه شد (۱۷).

نکات کلی هضم پلاسمید:

غلظت وکتور تخلیص شده pX459/pX330 با اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد. پلاسمید pX459/pX330 با آنزیم BbsI با استفاده از ترکیب زیر هضم شد: ۳-۱ µg پلاسمید، ۱µL آنزیم FastDigest Bbs1 (Thermo Scientific، شماره کاتالوگ ER ۱۰۱۲)، ۲µL بافر X ۱۰FastDigest و حجم کافی آب بدون نوکلئاز برای رساندن حجم کلی واکنش به ۲۰µL استفاده شد (جدول ۴) (۱۳). مخلوط هضم شده به مدت ۳ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد تا از هضم کامل اطمینان حاصل شود (گاهی اوقات انکوباسیون بیشتر ممکن است منجر به فعالیت ستاره‌ای (star activity) آنزیم شود؛ بنابراین بسیار توصیه می‌شود که زمان انکوباسیون بهینه تخمین زده شود). پس از انکوباسیون، مخلوط هضم شده در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه انکوبه شد تا به غیرفعال شدن آنزیم کمک کند (۳۱).



[ Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2024-10-12 ]

[ DOI: 10.52547/sjku.27.4.93 ]

**جدول ٤. مواد لازم جهت انجام واکنش هضم آنزیمی**

| مقدار | ماده |
|---|---|
| ۱-۳µg | پلاسمید |
| ۱µL | آنزیم BbsI |
| ۲µL | بافر ۱۰X FastDigest |
| ۱۴µL | آب (DDW) |
| ۲۰µL | حجم نهایی |

توصیه هایی برای هضم پلاسمید:

قابل‌ذکر است که آنزیم BbsI خارج از توالی تشخیص خود برش می‌دهد و طراحی محل کلونینگ در این پلاسمیدها باعث ایجاد اورهنگ‌های ناسازگار می‌شود که از خود اتصالی جلوگیری می‌کنند. این بدان معنی است که فسفات '۵ از پلاسمید حذف می‌شود و فسفوریلاسیون الیگوهای دوبلکس سنتز شده (RNA های راهنما) ضروری نیست. بااین‌حال، هنگام طراحی هر آزمایش خاص، هر پلاسمید باید به‌دقت برای نیازهای آن موردمطالعه قرار گیرد (۱۷).

نکات کلی اتصال (Ligation) پلاسمید:

الیگوهای دو رشته به داخل پلاسمید خطی حاصل از هضم با آنزیم BbsI الحاق شد. اتصال با نسبت وکتور ۱: ۳ الیگو به شرح زیر انجام داده شد. ۳۰۰ng پلاسمید هضم شده با آنزیم Bbs1، ۲/۵µL از الیگو دوپلکس های آماده شده، ۲/۵µL بافر اتصال سریع ۵X، ۱µL لیگاز T4 و حجم کافی آب بدون نوکلئاز برای به دست آوردن حجم کل واکنش ۲۵µL با استفاده از ddH2O استفاده شد. مخلوط اتصال به مدت ۱ ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و سپس یک شب در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید (جدول ۵) (۲۹, ۱۳).

**جدول ۵. مواد لازم جهت انجام واکنش اتصال**

| مقدار | ماده |
|---|---|
| ۳۰۰ng | پلاسمید |
| ۲/۵µL | الیگو دوپلکس های آماده شده |
| ۲/۵µL | بافر اتصال سریع ۵X |
| ۱µL | آنزیم لیگاز T4 |
| به حجم نهایی ۲۵µL برسد | آب (DDW) |
| ۲۵µL | حجم نهایی |

توصیه‌هایی برای اتصال پلاسمید:

توصیه می‌شود که یک اتصال به‌عنوان کنترل، متشکل از پلاسمید هضم شده با آنزیم Bbs1 بدون الیگو دوبلکس در نظر گرفته شود. وب‌گاه‌های مختلفی مانند https://nebiocalculator.neb.com، Ligation Calculator از Omni Calculator و سایر وب‌گاه‌های موجود می‌توانند به محاسبه مقادیر واکنش اتصال کمک کنند.

تکثیر و خالص‌سازی پلاسمید:

نکات کلی در مورد آماده‌سازی سلول‌های مستعد:



[ Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2024-10-12 ]

[ DOI: 10.52547/sjku.27.4.93 ]

برای ترنسفرماسیون، *E. coli* مستعد در یک پروسه سه‌روزه تولید شد. در روز اول، مقدار کمی از *TOP10 E. coli* منجمد در ۲mL محیط LB (Luria-Bertani) حل شد و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت یک شب (۱۶-۲۰ ساعت) انکوبه گردید.

در روز دوم، ۵۰µL از محیط کشت روز قبل در یک فالکون سترون ۵۰mL حاوی ۳۵mL محیط LB سترون در زیر هود بیولوژیکی روی شعله روشن ریخته شد و در انکوباتور شیکردار به مدت ۳ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. برای آماده‌سازی سلول مستعد، غلظت بین ۰/۶µg/µL- ۰/۳ در OD=۶۰۰nm مورد نظر است و بیشتر از این غلظت به این معنی است که باکتری ممکن است دیگر مناسب نباشد؛ بنابراین، زمان مناسب انکباسیون باید اعمال شود. سپس مخلوط واکنش به مدت ۱۵ دقیقه روی یخ انکوبه گردید و بلافاصله به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد در ۴۰۰۰×g سانتریفیوژ شد. سلول‌ها در بقیه مراحل تحت شرایط سرما و بر روی یخ نگه‌داری شدند. مایع رویی دور ریخته شد و رسوب در ۱۰/۵mL $CaCl_2$ ۰/۱ مولار در شرایط سترون حل شد. مخلوط به مدت ۳۰ دقیقه در شرایط سترون روی یخ انکوبه گردید. سپس به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد در ۴۰۰۰×g سانتریفیوژ گردید. مایع رویی دور ریخته شد و رسوب در ۲.۱mL گلیسرول ۱۵٪ و CaCl2 ۰/۱ مولار حل شد. سلول‌های حاصله در مقادیر مناسب الیکه شدند و در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. پس از ۲۴ ساعت، کارایی سلول‌های مستعد به شرح زیر بررسی شد: ۱ng، ۱۰ng و ۱۰۰ng از هر پلاسمید مقاوم به آمپی سیلین روی پلیت LB حاوی آمپی سیلین ترنسفورم شد (۳۲-۳۴).

توصیه‌هایی برای تهیه سلول‌های مستعد:

توصیه می‌شود برای بررسی کارآمدی سلول‌های مستعد از یک DNA تائید شده در مطالعات قبلی به عنوان کنترل مثبت استفاده شود. هم‌چنین به عنوان یک کنترل منفی می‌توان از سازه فاقد DNA استفاده کرد. علاوه بر این پیشنهاد می‌شود تا کارایی، زنده مانی و مقاومت به آنتی بیوتیک پلاسمید با یک غلظت ثابت از DNA (۱ng) سنجیده شود (۳۵). همچنین پیشنهاد می‌شود با توجه به سویه مورد استفاده جهت تهیه سلول‌های مستعد بهترین روش مناسب برگزیده شود. به طور مثال در مطالعه مقایسه‌ای که توسط Chan و همکاران در سال ۲۰۱۳ صورت گرفت نشان داد که برای سویه *TOP10* بهتر است از روش $CaCl_2$ استفاده شود و این در حالی است که برای سویه *DH5α* روش Hanahan به کار گرفته شود (۳۶).

نکات کلی ترنسفورماسیون:

محصول اتصال با ۲۵۰µL از *E.coli* مستعد تحت شرایط سترون مخلوط شد. مخلوط در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه و سپس در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۰ ثانیه و مجدداً در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه انکوبه گردید. دو برابر مقدار *E.coli* مستعد، در اینجا ۵۰۰µL از محیط کشت LB (فاقد آنتی بیوتیک) به مخلوط اضافه گردید و به منظور بیان ژن مقاومت به آنتی بیوتیک به مدت یک ساعت در انکوباتور شیکردار در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شد. پس از گذشت زمان انکوباسیون، ۱۰۰µL از مخلوط به پلیت حاوی آگار-آمپی سیلین اضافه شد و پلیت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت یک شب انکوبه شد (۳۴).

برداشت کلونی‌ها و تأیید آن‌ها:

پس از انتخاب کلونی‌های تک و جدا افتاده می‌توان علاوه بر تهیه پلیت پشتیبان، برای تأیید صحت انجام کلونینگ از PCR کمک گرفت (۳۷). برای تهیه پلیت پشتیبان کلونی‌ها از دو روش استفاده شد. در روش اول، با نوک پیپت مقدار کمی از کلونی انتخاب شد و سپس در یک پلیت پشتیبان جدید آگار-LB قرار داده شد. در روش دوم، هر کلونی در محیط LB از طریق روش مینی کشت داده شد. برای



[ Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2024-10-12 ]

[ DOI: 10.52547/sjku.27.4.93 ]

نگه‌داری از دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد و مخلوط ۵۰۰µL از محیط کشت و۵۰۰µL محیط LB-گلیسرول استفاده شد. برای تأیید صحت ورود الیگوها در پلاسمید از روش زیر استفاده شد. ۲۰µL واکنش PCR با اجزای زیر آماده شد: ۵µL از مخلوط واکنش PCR (Royan TuCAGene)، ۰/۵µLپرایمر U6 فوروارد (۰/۵µM)، ۰/۵µL پرایمر معکوس RNA راهنما (۰/۵µM)، مقدار کمی از کلونی و حجم کافی از $ddH_2O$ برای به‌دست‌آوردن حجم کل واکنش به مقدار ۱۰µL (جدول ۶) (۳۷).

**جدول ٦. مواد لازم جهت انجام واکنش کلونی PCR**

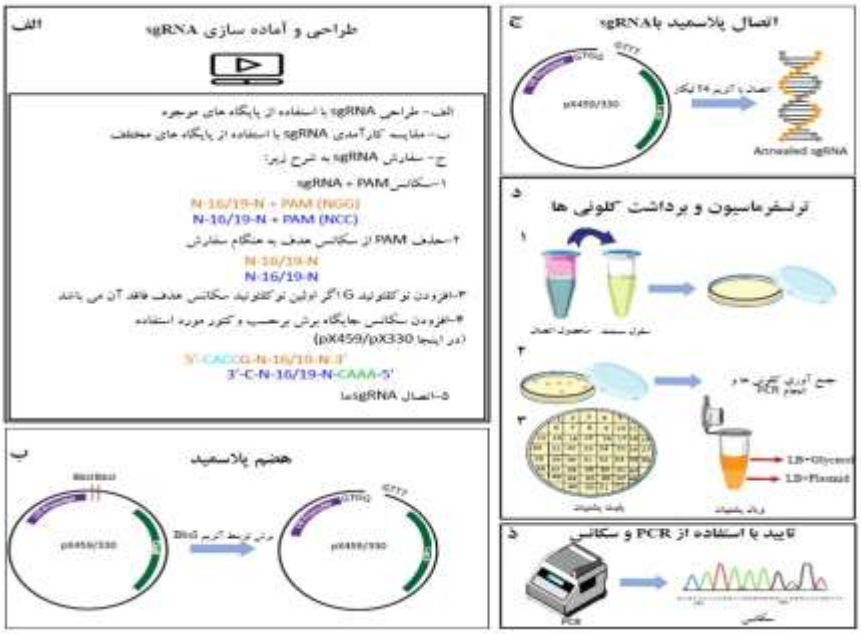
| مقدار | ماده |
|---|---|
| ۵µL | مخلوط واکنش PCR |
| ۰/۵µL | پرایمر U6 فوروارد |
| ۰/۵µL | پرایمر معکوس RNA راهنما |
| به مقدار سر تیپ سمپلر | کلونی |
| به حجم نهایی ۱۰µL برسد | آب (DDW) |
| ۱۰µL | حجم نهایی |

نمونه‌ها در ترموسایکلر به شرح زیر قرار داده شدند (۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۷ دقیقه، ۳۵ سیکل (۹۴ درجه سانتی گراد برای ۳۰ ثانیه، ۵۴ درجه سانتی گراد برای ۴۰ ثانیه، ۷۲ درجه سانتی گراد برای ۳۰ ثانیه) و ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه). سپس نمونه‌ها بر روی ژل آگارز ۱٪/۵ با استفاده از بافر ۱(x Tris-acetate-EDTA TAE) برده شدند. کلونی‌های آزمایش شده که باند صحیح روی ژل آگارز نشان دادند، در ۷mL محیط کشت LB حاوی ۱µg/mL آمپی سیلین (Sigma، شماره کاتولوگ. ۵۳۵۴ A) در یک انکوباتور شیکردار در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت یک شب کشت داده شدند.

۴-۵-استخراج پلاسمید به روش مینی و نکات کلی:
DNA کلونی‌های کشت شده با استفاده از کیت مینی (Bioneer، شماره کاتولوگ ۳۰۳۲) استخراج گردید. غلظت پلاسمیدهای استخراج شده با دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه گیری شد و مقدار مناسبی از پلاسمیدها برای تعیین توالی ارسال گردید.داده‌های حاصل از توالی یابی با نرم افزار CLC Workbench.v12 تجزیه و تحلیل گردید. کلیه مراحل از طراحی RNA راهنما تا تائید کلونی‌ها در شکل ۲ آورده شده اند.

[ Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2024-10-12 ]

[ DOI: 10.52547/sjku.27.4.93 ]




شکل ۲. فرآیند کلی آماده سازی پلاسمید جهت ویرایش ژنتیکی بر پایه سیستم CRISPR/Cas9 (الف) طراحی و آماده سازی RNA راهنما، بر اساس ژن و پلاسمید مورد نظر که نوکلئوتیدهای مناسب باید اضافه یا حذف شوند (ب) هضم پلاسمید، هر پلاسمید دارای یک مکان برش با آنزیم محدودکننده مشخص است که در اینجا pX330 و pX459 توسط آنزیم BbsI هضم شدند (ج) اتصال پلاسمید هضم شده که باید با RNA های راهنمای آماده شده کلون شود (د) ترنسفورماسیون، برای به دست آوردن کلونی‌های تائید شده (ذ). توالی یابی، یک روش استاندارد طلایی برای تائید کلونینگ.

توالی یابی و نکات کلی:

توالی‌یابی را می‌توان در یک یا دو جهت انجام داد. توصیه می‌شود پرایمر توالی‌یابی را در فاصله مناسب جایگاه هدف انتخاب کرد. بهتر است فاصله قرار گرفتن پرایمرها از یکدیگر کمتر از ۷۰ جفت باز و بیش از ۷۰۰ جفت باز نباشد. ضمناً مشاوره با شرکت موردنظر قبل از ارسال نمونه‌ها بسیار توصیه می گردد.

استخراج پلاسمید به روش ماکسی پرپ و نکات کلی:

هر کلونی تأیید شده (یک کلونی برای هر RNA راهنما) در ۲۵۰mL محیط LB کشت داده شد و در انکوباتور شیکردار در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت یک شب انکوبه گردید. روز بعد، کلونی‌های کشت شده با استفاده از کیت استخراج پلاسمید ماکسی کیاژن (Qiagen، شماره کاتولوگ. ۱۲۶۶۳) استخراج گردیدند. همچنین ذکر این نکته مهم است که DNA پلاسمید تکثیر شده در *E. coli* برای انتقال به سلول‌های بنیادی باید مورد تخلیص قرار گیرد؛ زیرا سلول‌های بنیادی انسان به اندوتوکسین مشتق شده از *E.coli* حساس می‌باشند (۳۸, ۳۷).

## یافته‌ها

برای نشان دادن بهتر مراحل و روش‌های ذکر شده در بالا، ما یکی از ژن‌های اصلی تنظیم‌کننده اتوفاژی به نام *LAMP-2* را بر اساس علاقه تحقیقاتی خود انتخاب کردیم. *LAMP-2* همجوشی اتوفاگوزوم و لیزوزوم را تنظیم می کند. حذف ژن



[ Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2024-10-12 ]

[ DOI: 10.52547/sjku.27.4.93 ]

*LAMP-2* یا عملکرد نادرست آن مسئول بیماری Danon است که یک بیماری ذخیره گلیکوژن با علائم چند سیستمی است. فهرستی از RNA های راهنما با بالاترین امتیاز برای ژن *LAMP-2* به عنوان اثبات مفهومی برای نشان دادن بهترین استراتژی طراحی RNA راهنما از دیدگاه ما تهیه شده است (جدول ۱). مشکلات مواجه شده و راه حل‌های احتمالی در مورد کلونینگ RNA های راهنما ژن *LAMP-2* در پلاسمیدهای pX330/pX459 بر این اساس مورد بررسی قرار گرفتند.

۱-طراحی RNA راهنما برای ژن LAMP-2 (NG_007995.1) از بین وب‌گاه‌های مختلف بر اساس کارایی و امتیازات خارج از هدف انجام گرفت.

دو سری RNA راهنمای کاندید جهت هدف قرار دادن ژن *LAMP-2* انتخاب گردید.

sgRNA-1 Forward; 5′-CGTTCTGGTCTGCCTAGTCCTGG-3′(PAM)

sgRNA-1 Reverse; 5′-CCAGGACTAGGCAGACCAGAACGC-3′

sgRNA-2 Forward; 5′-GTCTCGCCGCTTTCAAGCGCGGGG-3′(PAM)

sgRNA-2 Reverse; 5′-CCCCGCGCTTGAAAGCGGCGAGAC-3′

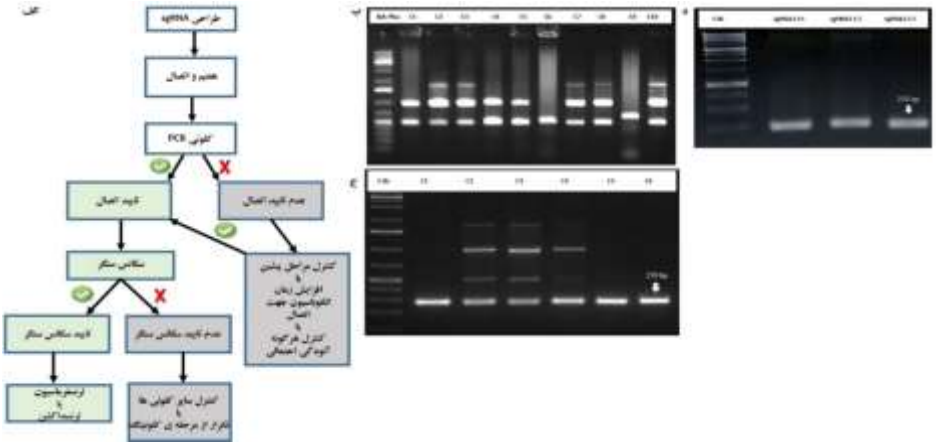
RNA های راهنما انتخاب شده بر اساس روش‌هایی که قبلاً توضیح داده شد، سفارش داده و انیل شدند.

۲-کلون کردن RNA راهنما و پلاسمید:

پلاسمیدهای pX330 و pX459 که با آنزیم محدود کننده مورد هضم آنزیمی واقع شده بودند، به ترتیب با sgRNA-۱ و sgRNA-۱ و sgRNA-۲ به طور جداگانه کلون شدند. سپس کلونی‌ها از طریق سلول‌های مستعد *E.Coli Top10* ترنسفورم شدند.

تائید کلونی PCR:

مقدار مناسبی از کلونی‌ها برای آنالیز کلونی PCR انتخاب شدند. در ابتدا، هیچ کلونی مثبتی یافت نشد. با توجه به این نتیجه، عیب‌یابی در دستور کار قرار گرفت (شکل ۳-الف). فرآیند اتصال دو بار دیگر، یکی با همان روش قبل و نوبت دوم با زمان انکوباسیون بیشتر برای اتصال (تقریباً ۱۸ ساعت) تکرار شد. با توجه به اطلاعات به‌دست‌آمده بر اساس ده کلون (شکل ۳-ب)، فرض بر این بود که آلودگی سلول‌های مستعد ممکن است رخ دهد؛ بنابراین، سلول‌های مستعد در یک پلیت آگار-LB بدون آنتی بیوتیک مجدداً بررسی شدند. روز بعد، کلونی‌هایی در پلیت وجود داشت که نشان دهنده آلودگی بود؛ بنابراین اتصال از مرحله اول با سلول‌های مستعد جدید تکرار شد. در نهایت با کلونی PCR کلون شدن sgRNA-۱ در pX330 (شکل ۳-ج) و sgRNA-۱ و sgRNA-۲ در pX459 تائید شد (شکل ۳-د).





[ Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2024-10-12 ]

[ DOI: 10.52547/sjku.27.4.93 ]

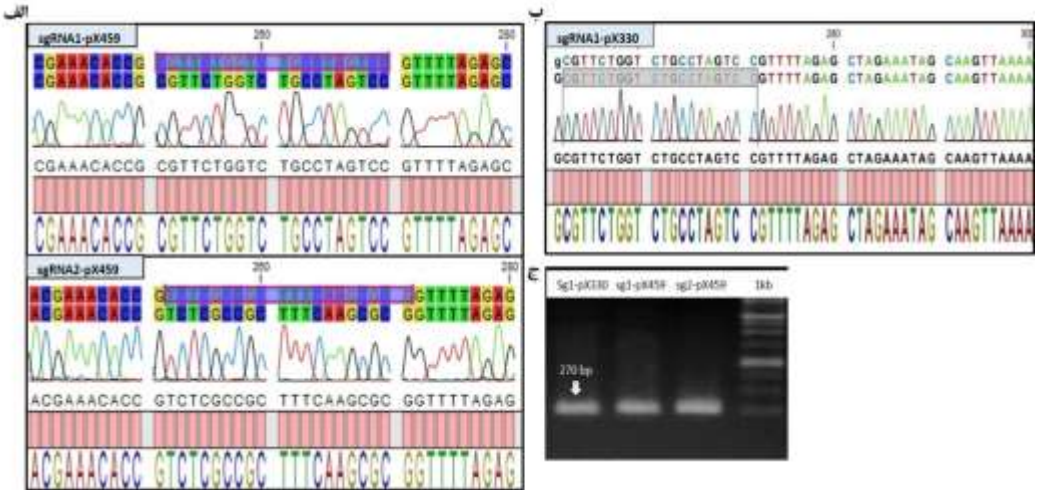
**شکل ۳. (الف) بررسی مرحله به مرحله آماده سازی پلاسمید و چالش های پیش رو در سیستم CRISPR/Cas9 (ب) نمونه‌ای از آلودگی ترنسفورماسیون (ج) تأیید کلونی PCR برای sgRNA-1-pX330 (د) تأیید کلونی PCR برای sgRNA-1-pX459 و sgRNA-2-pX459**

توالی یابی سنگر:

کلونی‌های تائید شده برای استخراج پلاسمید به روش کشت مینی، کشت داده شدند. سپس پلاسمیدهای استخراج شده برای تعیین توالی سنگر توسط U6 به‌عنوان پرایمر پیشرو فرستاده شدند. نتایج توالی‌یابی سنگر توسط نرم‌افزار CLC Workbench.v12 تجزیه و تحلیل شد و کلون کردن RNA راهنما در هر وکتور تائید شد (شکل ۴-الف و ب).

۵-کشت و استخراج پلاسمید به روش ماکسی پرپ و تأیید نهایی با PCR:

کلونی‌های تائید شده توسط کیت استخراج پلاسمید ماکسی استخراج شدند و هر پلاسمید استخراج شده توسط PCR همان‌طور که پیش تر توضیح داده شد، بررسی شد (شکل ۴-ج).




**شکل ٤. (الف) تجزیه و تحلیل داده‌های توالی یابی سنگر توسط نرم افزار CLC، تائید ورود RNA های راهنمای ۱ و ۲ در پلاسمید pX459 (ب) تجزیه و تحلیل داده‌های توالی یابی سنگر توسط نرم افزار CLC، تائید ورود RNA راهنمای ۱ در پلاسمید pX330 (ج) استخراج پلاسمید به روش ماکسی پرپ و تائید PCR برای ورود RNA های راهنمای ۱ و ۲ در پلاسمید pX459 و RNA راهنمای ۱ در پلاسمید pX330.**

## بحث

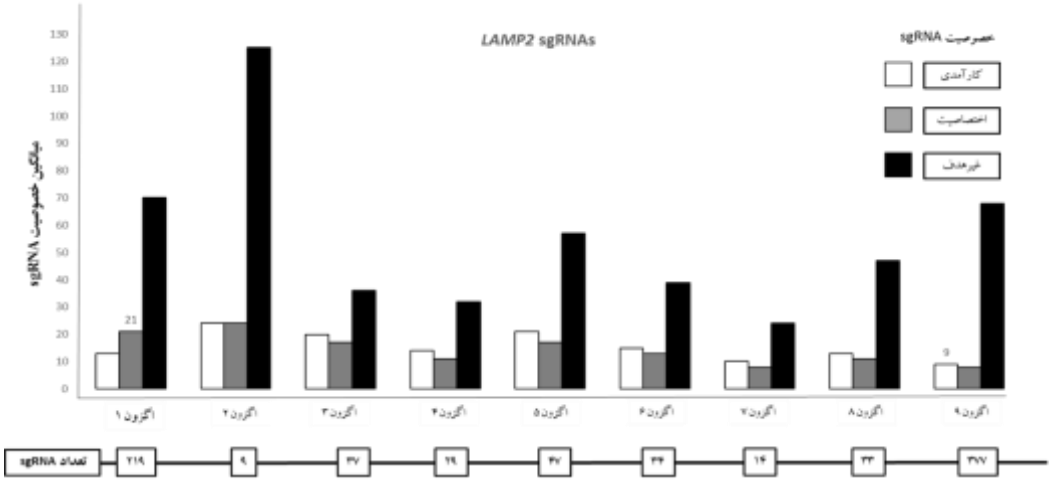
ویرایش ژنوم بر پایه CRISPR کاربردهای گسترده‌ای به‌صورت *in vitro / in vivo* دارد. این مطالعه باهدف به اشتراک گذاشتن تجربیات مرتبط در مورد طراحی RNA راهنما برای سیستم CRISPR/Cas9 و تهیه پلاسمید انجام شد. در این مطالعه سعی شد تا چالش‌های احتمالی در هر مرحله به‌دقت بررسی و راه‌حل‌های مرتبط توصیه شوند. آنچه اهمیت این مطالعه را نشان می دهد توجه به پیش افتاده ترین مسائل از طراحی تا سنتز وکتور مد نظر است. به طور مثال آلودگی سلول‌های مستعد همواره یکی از چالش‌ها در زمینه تولید وکتور است که در این مقاله سعی شد تا با به اشتراک‌گذاری تصویری از آلودگی در این سلول‌ها به یکی از چالش ها پاسخ داده شود. همچنین با انتخاب یک ژن بزرگ و الگو قرار دادن آن جهت طراحی RNA راهنما سعی شد تا قدم به قدم طراحی و سفارش دهی RNA های راهنما توضیح داده شوند (شکل ۵). در این مطالعه تنها به



[ Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2024-10-12 ]

[ DOI: 10.52547/sjku.27.4.93 ]

بخش طراحی RNA راهنما و آماده سازی پلاسمید مربوطه پرداخته شد. قدم بعدی بررسی کیفیت و دقت عملکرد RNA راهنمای قرار گرفته در پلاسمید است که آن نیز بسته به نوع سلول هدف و نوع معرفی سازه دارای چالش‌های احتمالی است.




**شکل ۵. تعداد کل RNA های راهنمای ژن *LAMP-2* در هر اگزون در کادرهای زیر نمودار ذکر شده است. نمودار میله‌ای میانگین کارایی (سفید)، اختصاصیت (خاکستری) و عملکرد خارج از هدف (سیاه) را برای RNA های راهنما در هر اگزون *LAMP-2* نشان می‌دهد. داده‌های هر اگزون از پایگاه‌های داده ای ChopChop، Crispor، Benchling، موسسه Portals Broad، Vector Builder و Rgenome استخراج شدند. داده‌های استخراج شده بر اساس اطلاعات منحصر به فرد برای هر وب‌گاه، تجزیه وتحلیل و خلاصه شدند. میانگین کارایی، اختصاصیت و عملکرد خارج از هدف بر اساس اطلاعات پایگاه‌های مذکور به طور خلاصه در نمودار فوق ارائه شد.**

## نتیجه‌گیری

در این مطالعه، مراحل کار و چالش‌های طراحی RNA راهنما و کلون کردن آن‌ها در پلاسمیدهای مربوطه جهت ویرایش ژنوم با سیستم CRISPR/Cas9 شرح داده شدند. در این مطالعه سعی شد تا نکات و مراحل ساخت سازه‌های ویرایش ژنوم توسط سیستم CRISPR به صورت ساده و مرحله به مرحله بیان شوند. اگرچه سایر مطالعات مرتبط روش‌های موجود در این زمینه را ذکر کرده‌اند؛ اما در این مطالعه سعی کردیم تا باتوجه به تجربیات خود در محیط آزمایشگاه نکات حائز اهمیتی را به صورت برجسته‌تر عنوان کنیم.

## تشکر و قدردانی

از مؤسسه رویان برای کمک‌های مالی و پشتیبانی فنی در انجام این طرح پژوهشی تشکر به عمل می‌آید. همچنین کد اخلاق طرح به شماره IR.ACECR.ROYAN.REC.1398.67 است و هیچ‌کدام از نویسندگان این مطالعه، افراد و یا دستگاه ها تعارض منافعی برای انتشار این مقاله ندارند.

## منابع

1.Cong LE, Ran FA, Cox D, Lin S, Barretto R, Habib N, et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. Science. 2005;339(6121):819-23.
2.Horvath P, Barrangou R. CRISPR/Cas, the immune system of bacteria and archaea. Science. 2010;327(5962):167-70.



[ Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2024-10-12 ]
[ DOI: 10.52547/sjku.27.4.93 ]

3.Gasiunas G, Barrangou R, Horvath P, Siksnys V. Cas9–crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria. PNAS. 2012; 109(39):2579-86.
4.Garneau JE, Dupuis MÈ, Villion M, Romero DA, Barrangou R, Boyaval P, et al. The CRISPR/Cas bacterial immune system cleaves bacteriophage and plasmid DNA. Nature. 2010;468(7320):67-71.
5.Gupta N, Susa K, Yoda Y, Bonventre JV, Valerius MT, Morizane R. CRISPR/Cas9-based Targeted Genome Editing for the Development of Monogenic Diseases Models with Human Pluripotent Stem Cells. Curr Protoc Stem Cell Biol. 2018;45(1):e50.
6.Mali P, Yang L, Esvelt KM, Aach J, Guell M, DiCarlo JE, et al. RNA-guided human genome engineering via Cas9. Science. 2013;339(6121):823-6.
7.Yang H, Wang H, Shivalila C, Cheng A, Shi L. One-step generation of mice carrying reporter and conditional alleles by CRISPR/Cas-mediated genome engineering. Cell. 2013;154(6):1370-9.
8.Wang H, Yang H, Shivalila CS, Dawlaty MM, Cheng AW, Zhang F, et al. One-step generation of mice carrying mutations in multiple genes by CRISPR/Cas-mediated genome engineering. Cell. 2013;153(4):910-8.
9.Wang T, Wei JJ, Sabatini DM, Lander ES. Genetic screens in human cells using the CRISPR-Cas9 system. Science. 2014;343(6166):80-4.
10.Shalem O, Sanjana NE, Hartenian E, Shi X, Scott DA, Mikkelsen TS, et al. Genome-scale CRISPR-Cas9 knockout screening in human cells. Science. 2014;343(6166):84-7.
11.Schwank G, Koo BK, Sasselli V, Dekkers JF, Heo I, Demircan T, et al. Functional repair of CFTR by CRISPR/Cas9 in intestinal stem cell organoids of cystic fibrosis patients. Cell Stem Cell. 2013;13(6):653-8.
12.Li J, Shou J, Guo Y, Tang Y, Wu Y, Jia Z, et al. Efficient inversions and duplications of mammalian regulatory DNA elements and gene clusters by CRISPR/Cas9. J Mol Cell Biol. 2015;7(4):284-98.
13.Ran FA, Hsu PD, Wright J, Agarwala V, Scott DA, Zhang F. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. Nat Protoco. 2013;8(11):2281-308.
14.Shi J, Wang E, Milazzo JP, Wang Z, Kinney JB, Vakoc CR. Discovery of cancer drug targets by CRISPR-Cas9 screening of protein domains. Nat Biotechnol. 2015;33(6):661-7.
15.Campenhout CV, Cabochette P, Veillard AC, Laczik M, Zelisko-Schmidt A, Sabatel C, et al. Guidelines for optimized gene knockout using CRISPR/Cas9. Biotechniques. 2019;66(6):295-302.
16.Hyams G, Abadi S, Lahav S, Avni A, Halperin E, Shani E, et al. CRISPys: optimal sgRNA design for editing multiple members of a gene family using the CRISPR system. J Mol Biol. 2018;430(15):2184-95.
17.Bauer DE, Canver MC, Orkin SH. Generation of genomic deletions in mammalian cell lines via CRISPR/Cas9. J Vis Exp. 2015;3(95):e52118.
18.Joberty G, Fälth-Savitski M, Paulmann M, Bösche M, Doce C, Cheng AT, et al. A tandem guide RNA-based strategy for efficient CRISPR gene editing of cell populations with low heterogeneity of edited alleles. CRISPR J. 2020;3(2):123-34.
19.Endo M, Mikami M, Toki S. Multigene knockout utilizing off-target mutations of the CRISPR/Cas9 system in rice. Plant Cell Physiol. 2015;56(1):41-7.
20.Bortesi L, Zhu C, Zischewski J, Perez L, Bassié L, Nadi R, et al. Patterns of CRISPR/Cas9 activity in plants, animals and microbes. Plant Biotechnol J. 2016;14(12):2203-16.
21.Bruegmann T, Deecke K, Fladung M. Evaluating the efficiency of gRNAs in CRISPR/Cas9 mediated genome editing in poplars. Int J Mol Sci. 2019;20(15):3623.
22.Wang T, Wei JJ, Sabatini DM, Lander ES. Genetic screens in human cells using the CRISPR-Cas9 system. Science. 2014;343(6166):80-4.
23.Doench JG, Hartenian E, Graham DB, Tothova Z, Hegde M, Smith I, et al. Rational design of highly active sgRNAs for CRISPR-Cas9–mediated gene inactivation. Nat Biotechnol. 2014;32(12):1262-7.
24.Wong N, Liu W, Wang X. WU-CRISPR: characteristics of functional guide RNAs for the CRISPR/Cas9 system. Genome Biol. 2015;16(1):1-8.



[ Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2024-10-12 ]

[ DOI: 10.52547/sjku.27.4.93 ]

25.Liu X, Homma A, Sayadi J, Yang S, Ohashi J, Takumi T. Sequence features associated with the cleavage efficiency of CRISPR/Cas9 system. Sci Rep. 2016;6(1):1-9.
26.Geny S, Pichard S, Brion A, Renaud J-B, Jacquemin S, Concordet J-P, et al. Tagging Proteins with Fluorescent Reporters Using the CRISPR/Cas9 System and Double-Stranded DNA Donors. Methods Mol Biol. 2021;2247:39-57.
27.Prykhozhij SV, Rajan V, Gaston D, Berman JN. CRISPR multitargeter: a web tool to find common and unique CRISPR single guide RNA targets in a set of similar sequences. PloS One. 2015;10(3):e0119372.
28.Liu G, Zhang Y, Zhang T. Computational approaches for effective CRISPR guide RNA design and evaluation. Comput Struct Biotechnol J. 2020;18:35-44.
29.Santos DP, Kiskinis E, Eggan K, Merkle FT. Comprehensive protocols for CRISPR/Cas9-based gene editing in human pluripotent stem cells. Curr Protoc Stem Cell Biol. 2016;38(1):5B. 6.1-5B. 6.60.
30.Oji A, Noda T, Fujihara Y, Miyata H, Kim YJ, Muto M, et al. CRISPR/Cas9 mediated genome editing in ES cells and its application for chimeric analysis in mice. Sci Rep. 2016;6:31666
31.Rossino R, Gosalvez J, Mezzanotte R. The effects of enzyme inactivation and incubation buffer on digestion in situ with restriction endonucleases. Biotech Histochem. 1998;73(6):325-8.
32.Majeed MT, Hussain K, Noreen M, Izhar M. Optimum range of plasmid supercoiled DNA for preparation of competent *Top 10 E. coli*. Arch Pharm Pract. 2011;2(2):76-9.
33.Liu X, Liu L, Wang Y, Wang X, Ma Y, Li Y. The Study on the factors affecting transformation efficiency of *E. coli* competent cells. Pak J Pharm Sci. 2014; 27(3 Suppl):679-84.
34.Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd ed. Cold Spring Harbor, New York, 1989.
35.Chang AY, Chau V, Landas JA, Pang Y. Preparation of calcium competent Escherichia coli and heat-shock transformation. JEMI methods. 2017;1:22-5.
36.Chan W-T, Verma CS, Lane DP, Gan SK-E. A comparison and optimization of methods and factors affecting the transformation of Escherichia coli. Biosci Rep. 2013;33(6):e00086.
37.Gao P, Dong X, Wang Y, Wei G-H. Optimized CRISPR/Cas9-mediated single nucleotide mutation in adherent cancer cell lines. STAR Protoc. 2021;2(2):100419.
38.Lieder R, Gaware VS, Thormodsson F, Einarsson JM, Ng C-H, Gislason J, et al. Endotoxins affect bioactivity of chitosan derivatives in cultures of bone marrow-derived human mesenchymal stem cells. Acta Biomater. 2013;9(1):4771-8.

[ Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2024-10-12 ]

[ DOI: 10.52547/sjku.27.4.93 ]