پتانسیل ها و کاربردهای تکنولوژی کریسپر (CRISPR/Cas9) در مهندسی ژنتیک حیوانات اهلی

شاهین اقبال‌سعید[1*]، سید حسین حسینی‌مقدم[2] و احمد پیرعلی[3]

شماره صفحات
۲۹-۵

۱) گروه علوم دامی، واحد اصفهان، دانشگاه آزاد اسلامی، اصفهان، ایران.
۲) دانشیار گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران.
۳) گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران.

*نویسنده مسئول: **shhain080@gmail.com**

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۹/۲۰ تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۶/۱۴

چکیده

در طی چند سال گذشته یک سیستم ایمنی در باکتری‌ها کشف شد که توسعه این سیستم سبب پیدایش یک تکنیک قوی ویرایش ژن به نام CRISPR/Cas9 شد. تکنولوژی کریسپر به‌دلیل سادگی و انعطاف‌پذیری آن منجر به استفاده گسترده ای در بسیاری از زمینه‌های تحقیقاتی مبتنی بر ویرایش ژنوم در علوم حیوانی، میکروبی، پزشکی، داروسازی و گیاهی داشته است. در این مقاله، تاریخچه، مکانیسم‌های پایه و کاربردهای سیستم CRISPR/Cas9 و پتانسیل‌های آن در بهبود عملکرد حیوانات اهلی بحث خواهد شد. با توجه به استقبال گسترده همه موسسات ویرایش ژنوم حیوانی در دنیا از این تکنولوژی و نیز پیشرفت‌هایی که در تکامل و افزایش قابلیت‌های آن انجام شده است، بدیهی است که سیستم CRISPR/Cas9 به زودی تحول چشم‌گیری در ایجاد لاین‌ها و نژادهایی از حیوانات با صفات دلخواه به‌وجود خواهد آورد. علاوه‌براین، پیشرفت‌های گسترده‌ای برای بهبود توانمندی‌ها و بازدهی این تکنولوژی برای ویرایش هدفمند ژنوم و نیز کاهش شانس ویرایش نواحی غیرهدف درحال انجام است.

کلمات کلیدی: کریسپر، مهندسی ژنتیک، ویرایش ژنوم، حیوانات اهلی و CRISPR/Cas9.

مقدمه

تغییر در ژنوم حیوان با استفاده از انتقال یک یا چند ژن خارجی به ژنوم میزبان به‌طوری‌که قابل انتقال به نسل بعد باشد را تراریختگی (Transgenesis) می‌گویند. استفاده از ترانسژنزیز در بهبود تولیدات دامی متداول نیست. امروزه بدون انجام آمیخته-گری بین دو نژاد (Crossbreeding)، وارد کردن یک ژن خارجی و یا ایجاد یک آلل جدید در ژنوم از طریق تکنولوژی‌های ویرایش ژنوم (Genome editing) قابل انجام است. برای مثال، می‌توان آلل‌های افزایش‌دهنده میزان رشد عضلات و یا آلل‌های ایجادکننده مقاومت به یک یا چند بیماری را در یک فرد یا نژاد طی یک نسل ایجاد نمود. با تکامل روش‌های توالی‌یابی کل ژنوم، دانشمندان در سراسر جهان مجذوب چالش‌های جدیدی مانند کشف عملکرد دقیق ژن‌ها و نیز پزشکی خصوصی شده‌اند. ویرایش ژنوم یک فناوری است که ما را قادر می‌سازد تا بتوانیم ژنوم هدف را ویرایش کنیم. می‌توان با حذف و افزودن قطعات DNA خاص در سلول یا ارگانیسم توسط اندونوکلئازهای طراحی شده، نتیجه دلخواه را به‌دست آورد (Doudna *et al*., 2014). در ابتدا، ویرایش ژن‌ها مبتنی بر فناوری هدف‌گیری نوترکیبی همولوگ بودکه بسیار ناکارآمد و مستعد تاثیر بر ژن‌های خارج از هدف بود (Hsu dd *et al*., 2014). توسعه بعدی اندونوکلئازهای هدفمند برای بخش خاصی از ژنوم این وضعیت را تغییر داد. تاکنون، سه نوع اصلی از اندونوکلئازهای هدفمند به‌طور گسترده برای ویرایش ژنوم استفاده شده اند: نوکلئاز انگشت روی (ZNF: Zinc-finger nucleases) یک سیستم ویرایش ژنومی هدفمند است که مبتنی بر یک مجموعه‌ای از اسیدهای آمینه که به‌طور اختصاصی به ژنوم هدف متصل می‌شوند و نیز اندونوکلئاز Fok1 با توالی هدف غیراختصاصی است. در این سیستم، تقریبا هر ۳۰ اسیدآمینه به یک مولکول روی متصل است(Carroll, 2011) . هر انگشت روی به سه نوکلئوتید متوالی متصل می‌شود. در این حالت، یک مجموعه انگشت روی به رشته بالا و یک مجموعه دیگر انگشت روی مکمل رشته پایین بوده و در بین این دو مجموعه یک ناحیه ۵-۶ جفت بازی قرار دارد که محل برش آنزیم Fok1 است که در ادامه هر دو مجموعه انگشت روی بالا و پایین قرار داشته و ایجاد کننده یک آنزیم فعال دیمر است (Carroll, 2011). تکنولوژی ویرایش ژنوم دیگر، اندونوکلئاز فعال‌کننده شبه رونویسی (TALEN: transcription activator-like endonuclease) نام دارد . دو سیستم ویرایش ژنوم TALEN و ZFN مبتنی بر آنزیم برشی دیمر Fok1 بوده که ایجاد کننده برش DNA دورشته یا DNA double strand break (DSB) است (Sun & Zhao, 2013). در سیستم TALEN یک مجموعه‌ای از توالی‌های تکراری که فاکتورهای مشابه فعال‌کننده رونویسی بوده و از باکتری *Xanthomonas* جداشده هاند می‌باشد. هر تکرار ۳۳-۳۵ اسیدآمینه ای شناساگر یک نوکلئوتید است و آخرین تکرار از ۲۰ اسیدآمینه تشکیل شده است. در مقایسه با ZFNs، سیستم TALEN دارای قابلیت طراحی و نیز بازدهی هدفمند بسیار بالایی بوده و امکان ویرایش غیردلخواه یا off-target کم‌تری دارد(Sun & Zhao, 2013) . با این وجود، هر دو سیستم نیازمند سنتز پروتئین بوده که طراحی و امکان ایجاد آن‌را محدود به آزمایشگاه‌های خاص در دنیا کرد. سیستم ویرایش ژنوم سوم، استفاده از توالی‌های کوتاه تکراری دوسرخوانا با فاصله منظم خوشه‌ای (CRISPR/Cas) Clustered regularly interspaced

short palindromic repeat است که مبتنی بر اتصال اسیدآمینه به توالی هدف نبوده و بر مبنای اتصال RNA به توالی هدف کار می‌کند. طراحی و سنتز RNA بسیار ساده بوده و در عمده آزمایشگاه‌های دنیا قابل انجام است. در این مقاله به بررسی این سیتسم ویرایش ژنوم پرداخته خواهد شد.

سیستم کریسپر (CRISPR/Cas9)

اخیرا فن‌آوریCRISPR/Cas9 تغییرات بنیادین در مهندسی ژنوم ایجاد کرده است. تکنولوژی کریسپر برای اولین بار توسط Barango *et al* (2007)گزارش شد. آنها نشان دادند که باکتری S. Thermophilus با استفاده از این سیستم قابلیت از بین بردن ژنوم باکتریوفاژها را دارد (Horvath P *et al*., 2008).

از دیدگاه کاربردی، انتظار می‌رود که این تکنولوژی سبب تحول در ویژگی‌های مختلف دام‌ها به ویژه درمان بیماری‌های ژنتیکی شود. مطالعات نشان می‌دهند که هر کدام از عوامل وابسته به این سیستم، شامل فعالیت پروتئین Cas9، انتخاب مکان هدف، طراحی gRNA، روش‌های انتقال، اثرات مناطق غیر هدف و میزان بروز HDR (Homology-Directed Repair)، تاثیر فراوانی بر روی بازدهی و کاربری این تکنیک می‌گذارند. البته با شناسایی و مشخص کردن هر کدام این فاکتورها در مورد هر پروژه خاص، می‌توانیم از این تکنولوژی بهتر بهره مند شویم. sgRNAs برای اهداف مختلف به‌صورت دستی یا با استفاده از نرم‌افزار مناسب طراحی می‌شوند. sgRNAs را می‌توان با Cas9 در یک وکتور کلون کرد. سپس وکتور کامل شده به داخل سلول‌های هدف منتقل کرد. دستیابی به این هدف مستلزم بهینه‌سازی روش‌های انتقال ژن می‌باشد. معرفی پلاسمیدهایی که به طور همزمان sgRNA و Cas9 را در خود جای می‌دهند و آن را به محل هدف، با استفاده از روش‌های الکتروپوریشین، نوکلئوفکشن و یا لیپوفکتامین منتقل می‌کنند، یک روش سریع و رایج است که می‌تواند برای طیف وسیعی از لاین‌های سلولی اعمال شود(Eghbalsaied *et al*., 2020).

تاریخچه و مراحل کشف پازل مکانیسم کارکرد سیستم کریسپر

تاریخچه کشف و شناخت مکانیسم و کاربردهای سیستم کریسپر در شکل ۱ آمده است. در طی تکامل، باکتری‌ها استراتژی‌های زیادی برای فرار از آلودگی‌های ناشی از ویروس‌ها و فاژها کسب کرده‌اند تا از ورود DNA ویروس در ژنوم خود جلوگیری کنند. در دهه گذشته یک سیستم ایمنی در باکتری‌ها کشف شد که از یک تکنیک منحصر به فرد برای جلوگیری از آلودگی ویروسی در باکتری‌ها بود. این سیستم ایمنی به باکتری اجازه می‌دهد که هم مانع از درج DNA خارجی به داخل ژنوم شود و هم DNA خارجی را برای تخریب مورد هدف قرار دهد. وجود یک توالی تکراری غیرمعمول در ساختار ژنوم E. coli برای اولین بار در سال ۱۹۸۷ گزارش شد(Ishino *et al*., 1987) . با این وجود، کاربرد واقعی این سیستم به‌دلیل نبود داده‌های توالی کافی تا سال ۱۹۹۳ انجام نشد (Ishino *et al*., 2018). سپس، فرانسیسکو موجیکا در دانشگاه Alicante اسپانیا اهمیت

این سیستم شناسایی شد (Mojica *et al*., 1993). وی در سال ۲۰۰۳ در یک گزارشی سیستم کریسپر را به‌عنوان یک سیتسم ایمنی ذاتی باکتریی نوشت. متاسفانه مقاله ایشان در مجلات متعددی نظیر Nature، Proceedings of the National Academy of Sciences، Molecular Microbiology و Nucleic Acid Research رد شد و درنهایت در سال ۲۰۰۵ در مجله Journal of Molecular Evolution پذیرش شد (Mojica *et al*., 2005). وی در تحقیقات بعدی خود اثبات کرد که پروتئین Cas9 از طریق دو دامین کاتالیکی RuvC و HNH اقدام به برش دو رشته DNA می‌کند(Mojica *et al*., 2009). جان ون در اووست (John van der Oost) نقش به‌سزایی در شناسایی سیستم قابل برنامه‌ریزی کریسپر ایفا کرد (Brouns *et al*., 2008). او نشان داد که یک مولکول RNA کوچک هدایت‌کننده مکانیسم دفاعی باکتریایی علیه ویروس هاست (Brouns *et al*., 2008). سیستم کریسپر در باکتری Ecoli از تیپ یک بوده که پیچیده تر از تیپ دوم کریسپر هست. در این باکتری، دو توالی تکراری ۲۹ جفت بازی که به موتیف کریسپر شناسایی شده است که یکی از این توالی ها از ۲۴ نوکلئوتید پایین‌تر از ناحیه‌ی '۳ در پایین دست ژن iap قرار دارد و به تکرار iap و یا CRISPR2 معروف است و دیگری حدود ۲۴ کیلوجفت باز پایین تر از ژن ygcF قرار گرفته که به تکرار Ypest یا CRISPR4 معروف است (Díez-Villaseñor *et al*., 2010). چسبیده به این توالی‌های کریسپر و در همسایگی آن‌ها توالی‌های کدکننده پروتئین اندونکلئازی وجود دارد که آن‌ها را CRISPR-associated protein (Cas) گویند. در تیپ یک به‌جای پروتئین اندونوکلئاز Cas9 یک کمپلکس Cascade که خود شامل پنج پروتئین Cas هست، قرار دارد. جایگاه ژنی کریسپر رونویسی شده و از رونویسی آن یک توالی RNA طولانی پیش‌ساز (long precurcor RNA) نسخه برداری می شود. این طوالی RNA توسط کمپلکس Cascade بریده شده تا یک توالی کوتاه تری به نام CRISPR RNAs، معروف به (crRNAs)، ایجاد کند (Lander, 2016). بررسی توالی crRNAs توسط همین گروه نشان داد که تمامی مولکول های crRNA با یک توالی مشترک تکراری ۸ جفت بازی شروع می شوند و در ادامه یک توالی خاص(spacer) که مکمل توالی هدف در ژنوم میزبان است، قرار می گیرد و مجددا در انتها نیز توالی تکراری دیگری قرار می گیرد (Sorek *et al*., 2008). نتایج آنها نشان داد که توالی های تکراری دو سرخوانا (palindromic) در ایجاد ساختار دوم crRNA نقش دارند. آن‌ها در یک مطالعه اثبات سیستم پیشنهادی خود را با کلون کردن توالی‌های کریسپر که چند ژن اصلی را در باکتریوفاژ لامبدا هدف قرار می‌داد، توانستند سویه‌های مقاومی باکتری ایجاد کنند که نسبت به این باکتریوفاژ مقاوم بود. گروه اووست در این مطالعه با طراحی gRNA که رشته sense را در DNA یا رشته antisense را در RNA هدف قرار می‌داد، مدارک محکمی ارائه دادند که سیستم کریسپر DNA را مورد هدف قرار می‌دهد و نه مولکول‌های RNA (Sorek *et al*,. 2008). فرد دیگری که در شناخت مکانیسم عمل سیستم کریسپر موثر بود، لوسیانو مارافینی (Luciano Marraffini) نام داشت. وی ابتدا این فرضیه را دنبال کرد که سیستم کریسپر از طریق RNA مداخله گر (RNAi) نمی تواند مانع عملکرد باکتریوفاژها گردد، بلکه مکانیسم عمل می بایست از طریق آنزیم های محدودکننده برای برش DNA هدف باشد

(Marraffini & Sontheimer, 2008). مارافانی و سونتیمر از یک spacer که از staphylococcus epidermidis جداشده بود، استفاده کردندکه توالی آن با توالی نیکاز nickase (nes) موجود در تمامی پلاسمیدهای سازگار با استفیلوکوکوس‌ها هوموولوژی داشت. آن‌ها ۹ جهش هدفمند را در داخل توالی nes پلاسمید هدف ایجاد کردند، به‌طوری‌که این جهش‌ها فقط جهش‌های خاموش بودند و در توالی اسیدآمینه هیچ تغییری ایجاد نمی‌کردند ولی هوموولوژی بین پلاسمید و spacer را تغییر می‌دادند. انتقال پلاسمید حامل ژن spacer به داخل باکتری‌ها باعث شد که تنها پلاسمیدهایی که جهش‌دار بودند تکثیر شده و پلاسمیدهای معمولی که توالی آن‌ها با توالی spacer هوموولوگ بود، در داخل باکتری‌ها تکثیر نشد. آن‌ها نشان دادند که سیستم کریسپر مانع از تکثیر پلاسمید حامل یک توالی هدف spacer و نیز فاژهای دارای همین توالی هدف می‌شود. در واقع، آن‌ها اثبات کردند که سیستم کریسپر از طریق هوموولوژی بین توالی spacer و توالی هدف کار می‌کند. با توجه به اینکه توالی spacer کاملا مشابه و (نه مکمل) توالی mRNA ناشی از بیان ژن هدف بود، آن‌ها نتیجه گرفتند که مکانیسم اثر سیستم کریسپر از طریق هدف گرفتن DNA و نه mRNA هدف است (Marraffini & Sontheimer, 2008). علاوه‌بر این مدرک، آن‌ها در آزمایش دیگری یک توالی اینترونیک در داخل توالی هدف spacer در پلاسمید قرار دادند، به‌طوری‌که در mRNA حاصل این توالی انترونیک حذف می‌شد و مجددا توالی هدف در داخل mRNA شکل می‌گرفت. نتایج آن‌ها نشان داد که ایجاد یک اینترون در داخل توالی هدف باعث شد که اثر ممانعت‌کنندگی کریسپر بر تکثیر پلاسمید هدف جلوگیری شود و پلاسمید بتواند تکثیر شود. از سوی دیگر، توالی mRNA ایجادشده پس از حذف اینترون توسط سیستم کریسپر مورد هضم قرار نگرفت. بنابراین، آن‌ها نتیجه گرفتند که سیستم کریسپر از طریق RNAi کار نمی‌کند و بلکه مستقیما توالی DNA را مورد هدف قرار می دهد (Marraffini & Sontheimer, 2008). با این وجود، مکانیسم اثر کریسپر بر DNA هدف ناشناخته ماند.

گروه تحقیقاتی کریستین پورسل (Christine Pourcel) از دانشگاه Paris-Sud فرانسه در سال ۲۰۰۷ پایگاه داده ای کریسپر را براساس مقالات و توالی‌های منتشرشده از کریسپر در باکتری‌ها و آرک‌ها ایجاد کردند (CRISPRdb) و اقدام به آنالیز بیوانفورماتیک این توالی‌ها نمودند. در مجموعه کریسپر، توالی‌های تکراری کوتاه مشابه توالی ژنوم ویروس‌ها بوده و می‌توانند در صورت بیان ژن و رونویسی ایجاد کننده توالی RNA باشند که قطعات آن مکمل نواحی مختلفی از ژنوم ویروس یا ویروس‌های مهاجم است. این توالی‌های تکراری کوتاه که ۲۶-۷۲ جفت باز طول دارند را نواحی Spacer گویند (Grissa *et al*., 2007). هر کدام از spacer ها توسط یک توالی تکراری دربر گرفته شده‌اند به‌طوری‌که توالی‌های تکراری با هم‌دیگر ایجاد یک فرم سنجاق سر یا hairpin می کند. این گروه یک برنامه پیداکننده کریسپر یا CRISPRFinder طراحی کردند که بتواند یک spacer را در ژنوم باکتریایی تشخیص داده و سپس آن مکان ژنی را برای وجود یک کلاستری از ژن‌ها و توالی‌های تکراری کنترل کند. در صورتی‌که یک Spacer به همراه حداقل سه توالی تکراری بود، آن‌را یک ناحیه کریسپر درنظر می‌گرفت. برنامه آن‌ها قادر به تشخیص توالی‌های تکراری مستقیم اطراف spacer از توالی‌های تکراری پشت سرهم که در ژنوم بیش‌تر موجودات

حضـور دارند، بود. درمجموع، برنامه آن‌ها منحصـرا توالی‌هایی را یک مجموعه کریسـپر شـناسـایی می‌کرد که دارای حداقل دو توالی spacer داشـته و هر کدام از این توالی‌ها توسط دو توالی تکراری مستقیم محصور شده باشند، یعنی در مجموع برای یک سـیسـتم کریسپر تعداد دو spacer و سه توالی تکراری مستقیم می‌بایست در کنار هم‌دیگر به‌صورت یک کلاستر باشند. نتایج آن‌ها نشـان داد که برخلاف آرک‌ها، باکتری‌ها دارای اندازه مشـابهی از توالی‌های spacer بوده و به‌طور متوسـط اندازه آن ۳۲ جفت باز بوده و در آرک‌ها از ۲۶ تا ۷۲ جفت باز می‌توانند متفاوت باشـند (Grissa *et al.*, 2007). از سـوی دیگر، طول توالی های تکراری مسـتقیم در باکتری‌ها و آرک‌ها مشـابه بوده و به سه دسته کلی قابل تقسیم‌بندی هستند: ۲۴-۲۵ جفت باز، ۲۸-۳۰ جفت باز و ۳۶-۳۷ جفت باز. در یک باکتری، هر مجموعه کریسپر دارای تعداد ۲ تا ۷۰۰ توالی spacer است (Grissa *et al.*, 2007). از دیگر نتایج جالب این گروه، وجود تفاوت‌های داخل گونه‌ای برای توالی کریســـپر بود. این جهش‌ها و یا تفاوت‌ها به‌دلیل حذف یک یا چند spacer در بین دو توالی تکراری مسـتقیم مشابه بود (Grissa *et al.*, 2007). به‌عبارتی دیگر، توالی های تکراری مســـتقیم مشـــابه همانند tandem repeats عمل کرده و باعث می‌شـــوند که در هنگام همانند ســـازی DNA، آنزیم DNAپلیمراز سـرخورده یا slippage و یک وارینت جدید با توالی حذف شـده یا داپلیکیت شـده ایجاد کند (Bzymek & Lovett., 2001). لـازم به ذکر اســـت که نتایج این تحقیق دارای محدودیت‌هایی بود. برنامه CRISPRFinder این گروه نتوانستند توالی‌های کریسپر را در برخی از باکتری‌هایی که حتی توالی ژنوم آن‌ها نیز به‌طور کامل شناسایی شده تشخیص دهد. برای مثال، آن‌ها نتوانسـتند در Staphylococcus aureus توالی کریسـپر را شـناسـایی کنند ولی بعدا توالی کریسپر در این باکتری شـناسایی شد (SaCas9). پروتئین SaCas9 حدود هزار جفت باز از SpCas9 کوتاه‌تر است و کاربردهای خاص خود را به‌خصـوص برای انتقال ژن از طریق سیستم ویروسی دارد. بررسی این توالی‌های کریسپر نشان دهنده این است که این توالی‌ها در طی زمان از ژنوم خود ویروس هدف به داخل ژنوم باکتری وارد شده‌اند. به عبارتی دیگر، باکتری توانسته یک توالی خاصی از ژنوم ویروس را گرو بگیرد تا براساس آن بتواند یک سیستم دفاعی موثری را علیه آن ویروس ایجاد کند.

گروه دیگری به همکاری موینا‌و (Sylvain Moineau) از دانشگاه Laval در کبک کانادا و بارانگو (Rodolphe Barrangou) از .Danisco USA Inc توانسـتند در تحقیقات مداوم و مرحله به مرحله نشـان دهند که سـیسـتم کریسـپر از طریق پروتئین اندونوکلئاز Cas9 و با هضـم آنزیمی DNA هدف در سه نوکلئوتید بالادست ناحیه proto-spacer adjacent motif (PAM) انجام می شود (Horvath *et al.*, 2008). آن‌ها نشان دادند که یک رابطه تکاملی بین توالی کریسپر و نوع پروتئین Cas در هر گونه باکتری وجود دارد. بررسـی باکتری‌های مختلف نشـان داد که طول توالی تکراری مستقیم بین ۳۲ تا ۳۷ جفت باز و طول پروتئین Cas وابسـته به آن‌ها از ۱۶۲۸ تا ۳۰۲۹ اسـیدآمینه متغیر است (Horvath *et al.*, 2008). بررسی توالی spacer در ۱۲۸ سـویه مختلف از باکتری S. thermophilus نشـان داد که برای CRISPR1 به طور متوسـط در هر واریته ۲۳ spacer وجود دارد که این تعداد از ۲ تا ۵۱ عدد در سویه‌های مختلف این گونه متفاوت بود. CRISPR2 در ۹۲٪ از واریانت ها مشاهده

شـــد و تعداد spacer به طور متوســـط ۳ عدد در هر جایگاه ژنی بود، که از صـــفر تا هشـــت عدد متغیر بود. آن‌ها ســـیســـتم CRISPR3 را در ۸۰٪ از واریانت ها مشاهده کردند و تعداد spacer به طور متوسط ۱۳ عدد در هر جایگاه ژنی بود، که از صفر تا ۲۹ عدد متغیر بود. مهم‌ترین دسـتاورد این تحقیق شـناسـایی توالی موتیف در ناحیه پیش‌ساز spacer و یا proto-spacer هـای دو کلـاســـتر CRISPR1 و CRISPR3 بود که وجود بازهای پورینی آدنین و گوانین در نوکلئوتیدهای ۲-۵ توالی‌های پروتواسـپیسـر را نشان می‌داد. آن‌ها وجود موتیف NNAGAAW از ابتدای proto-spacer در سیستم CRISPR1 را نشانه یک جایگاه اختصـاصی برای تشخیص و هضم اندونوکلئاز پروتیئن CRISPR1-associated protein یا Cas1 و وجود موتیف NGGNG از ابتدای proto-spacer در سیستم CRISPR3 را نشانه یک جایگاه اختصاصی برای تشخیص و هضم اندونوکلئاز پروتیئن CRISPR3-associated protein یا Cas3 ذکر کردند. در مقاله دیگری توسط همین گروه، اهمیت موتیف AGAA به قدری بود که وجود حتی یک جهش در توالی موتیف AGAA باعث ناکارایی سـیسـتم کریسـپر در سرکوب کردن ژن هدف شـد (Deveau *et al.*, 2008). با این وجود، در هر دو مقاله ارائه شـده توسـط این گروه، احتمال مداخله سـیستم کریسپر در سرکوب باکتریوفاژها و همین‌طور پلاسمیدها را از طریق سیستم RNAi که توسط گروه کونین پیشنهاد شده بود (Makarova *et al.*, 2006)، ممکن دانستند (Horvath *et al.*, 2008). در سال ۲۰۱۰، همین گروه به رهبری موییناو از کبک کانادا در یک مقاله که در مجله Nature منتشـر شـد، برای اولین بار اثبات کردند که سـیسـتم کریسپر از طریق هضم آنزیمی در یک ناحیه خاصـی از توالی proto-spacer کار می کند (Garneau *et al.*, 2010). این گروه ابتدا نشان دادند که توالی متصل به proto-sspacer یا proto-spacer adjuscent motif (PAM) در شـناسـایی و اتصال پروتئین Cas به توالی هدف بسیار مهم است. آن‌ها با استفاده از Streptococcus thermophilus CRISPR1/Cas نشان دادند که این سیتسم کریسپر در حالت طبیعی و در داخل باکتری بسـیار پویا بوده و قادر اسـت یک توالی spacer را از پلاسـمید به‌صـورت فعال بگیرد و با داشتن این توالی در مرحله بعد باعث هضـم آنزیمی پلاسـمید شـده و مانع از تکثیر آن شـود (Garneau *et al.*, 2010). در این آزمایش، با انتقال پلاسـمید pNT1 که کدکننده مقاومت به آنتی‌بیوتیک کلرامفینکل بود به داخل باکتری‌ها و سـپس انتخاب یک سـویه مقاوم از آن‌ها و کشـت مداوم این باکتری‌ها برای بیش از ۶۰ پاسـاژ نشان دادند که در ۳ درصد از کلونی‌های ایجاد شده از این باکتری‌ها یک توالی از ژن مقاومت به آنتی‌بیوتیک را به‌عنوان spacer در انتهای جایگاه ژنی کریسـپر خود به‌دسـت آوردند. بدین ترتیب ژن مقاومت به آنتی‌بیوتیک کلرامفینیکل را در پلاسـمیدهایی را که به آن‌ها منتقل شـد را از بین بردند. این گروه برای اولین بار نشان دادند که محل برش جایگاه هدف در سه نوکلئوتید بالادست PAM بوده و هر دو رشته DNA هدف را در پلاسمید هدف و نیز باکتریوفاژ هدف برش می‌دهد (Garneau *et al.*, 2010).

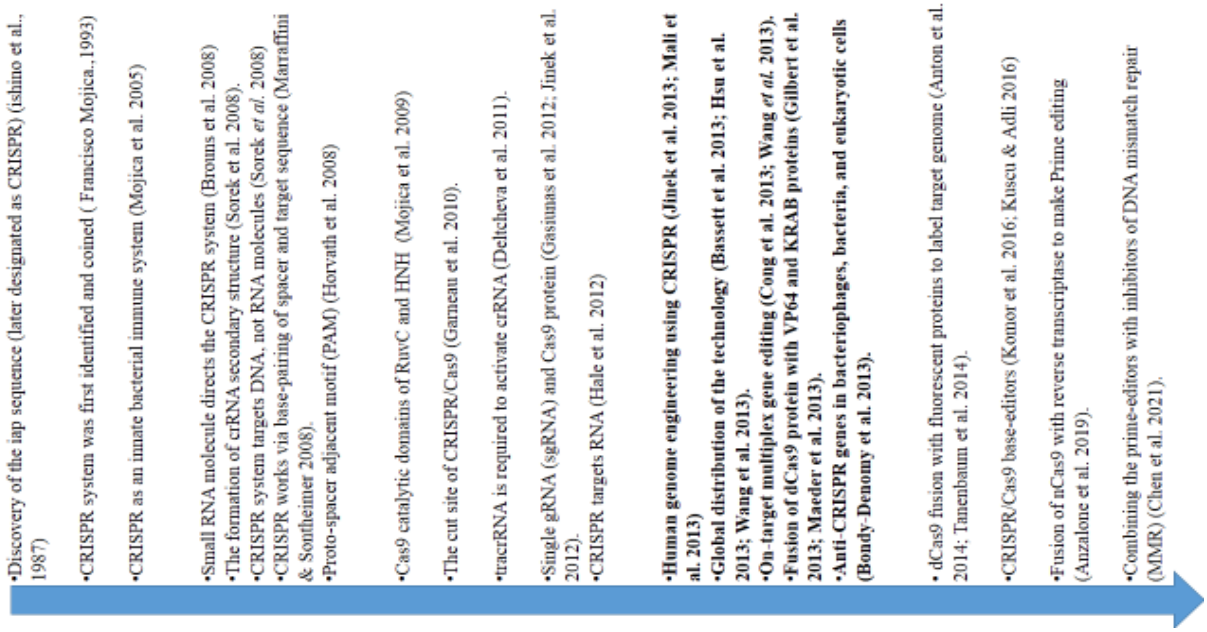
بخش دیگری از معمای مکانیسـم کارکرد سیستم کریسپر توسط امانوئل شارپنتیه (Emmanuelle Charpentier) از دانشگاه Umeå سوئد و دانشگاه Vienna اتریش کشف شد(Deltcheva *et al.*, 2011) . این مولکول trans-activating CRISPR

RNA و یا به اختصار tracrRNA نام دارد که یکی از فراوان ترین non-coding RNA ها را تشکیل می دهد. tracrRNA از ناحیه همسایه جایگاه ژنی کریسپر در رشته ترانس آن رونویسی شده و یک قطعه ۲۵ نوکلئوتیدی که کاملا مکمل توالی کریسپر هست را رونویسی می کند. این tracrRNA به همراه توالی مکمل خود در crRNA ایجاد یک داپلکس RNA نموده که جایگاه فعالی برای برش توسط آنزیم RNaseIII را فراهم می‌کند. بنابراین، tracrRNA برای فعال کردن و ایجاد یک رشته بالغ crRNA لازم هست(Deltcheva *et al.*, 2011) . اهمیت دیگر tracrRNA در اتصال به پروتئین Cas و فعال کردن آن بعدا توسط همکاری گروهی شارپنتیه و جنیفر دودنا و نیز گروه ویرژینیوس سیسکنیس (Virginijus Siksnys) گزارش شد(Gasiunas *et al*., 2012; Jinek *et al*., 2012) .

این سیستم در سال ۲۰۱۲ به طور همزمان توسط دو گروه پژوهشی به صورت مستقل ارائه شد. یک گروه به رهبری. ویرژینیوس سیسکنیس (Virginijus Siksnys) از دانشگاه Vilnius لتونی با استفاده از آنزیم CRISPR-associated (protein 9) Cas9 جداشده از Streptococcus thermophilus (Gasiunas *et al.* 2012) و گروه دیگر به رهبری مشترک خانم‌ها شارپنتیر از دانشگاه Umea سوئد و خانم دودنا از دانشگاه Berkeley آمریکا با استفاده از آنزیم Cas9 جداشده از Streptococcus pyogenes این سیستم را طراحی و توسعه دادند(Jinek *et al.*, 2012) . براساس اطلاعات موجود در وب سایت مجلات منتشر کننده، مقاله گروه سیکسنیس در ماه می ۲۰۱۲ به مجله PNAS ارسال شد و در سپتامبر ۲۰۱۲ به چاپ رسید و مقاله گروه شارپنتیه و دودنا در ژوئن ۲۰۱۲ به مجله Science ارسال و در همان ماه پذیرش شد و در آگوست ۲۰۱۲ منتشر شد. به عبارت دیگر، علیرغم اینکه مقاله سیسکنیس زودتر ارسال شد و دیرتر از مقاله شارپنتیه و دودنا منتشر شد. در هرحال، در هر دو سیستم نیاز به یک RNA راهنما به طول ۲۰-۲۳ نوکلئوتید و یک tracRNA یا RNA که با پروتیئن Cas9 متصل شده تا ساختار فضایی لازم برای فعال شدن آن از طریق gRNA را فراهم کند و نیز یک پروتئین Cas9 هست. هر دو گروه برای اولین بار از ترکیب سیستم CRISPR/Cas9 استفاده کردند. وجود PAM برای اتصال و هضم‌کنندگی Cas9 به DNA دو رشته‌ای ضروری است ولی برای اتصال آن به DNA تک رشته‌ای ضروری نیست(Jinek *et al.*, 2012). همچنین آن‌ها با القای جهش در دو دامین RuvC (D31A) و HNH (N891A) اهمیت این دو جایگاه در هضم آنزیمی DNA دو رشته ای را تایید و اثبات شده که HNH از طریق برش رشته مثبت و RuvC برش رشته منفی را انجام می دهد (Gasiunas *et al.*, 2012). گروه شارپنتیه و دودنا با القای دو جهش متفاوت در SpCas9، جهش RuvC (D10A) و جهش HNH (H840A)، اهمیت RuvC و HNH را اثبات کردند(Mojica *et al.* 2009).

(Jinek *et al.* 2012) . لازم به ذکر است که gRNA مورد استفاده در هر دو مقاله به‌صورت دو تکه بود یا Dual RNA ولی در مطالعه شارپنتیه و دودنا آن‌ها یک RNA یکپارچه سنتتیک را جایگزین crRNA و tracrRNA دوتکه کردند. در ادامه سه گروه اصلی از gRNA یکپارچه یا sgRNA (single guide RNA) استفاده کرده و آن‌را ترویج دادند. این گروه‌ها به رهبری

فنگ ژانگ از موسسه MIT (Massachusetts Institute of Technology) آمریکا (Hsu *et al*., 2013) ، رودولف جنیش از موسسه MIT آمریکا (Wang *et al*., 2013) و جی لانگ لیو از دانشگاه آکسفورد انگلستان (Bassett *et al*., 2013) بودند که این نقش به‌سزایی در ترویج این تکنولوژی داشتند. امروزه هر دو سیستم یکپارچه و دو تکه gRNA استفاده می‌شود. در پلاسمیدها این سیستم یکپارچه است و برای حالت سنتز شده این سیستم می‌تواند یکپارچه یا دو تکه باشد. پس از این مطالعات، گزارشات زیادی مبنی بر تزریق همزمان mRNA مربوط به Cas9 و sgRNA به درون زیگوت به‌عنوان یکی از روش‌های کارآمد به‌منظور تولید حیوانات مدل در موش، گوسفند، میمون و خوک منتشر شده است. محققان توانستند با تزریق پروتئین Cas9 و gRNA به داخل سیتوپلاسم زیگوت‌های موش اقدام به غیرفعال کردن هدفمند چند ژن و یا وارد کردن هم‌زمان چند ژن به داخل ژنوم میزبان نمایند (Wang *et al*., 2013). نکته جالب دیگر در خصوص مکانیسم اثر این تکنولوژی این است که اخیرا ثابت شده است که مولکول gRNA به تنهایی و مستقل از پروتئین Cas9 قادر به تداخل با RNA هدف است و می‌تواند باعث کاهش بیان آن شود (Sharma *et al*., 2022). البته این کار از طریق RNAi انجام خواهد شد و بر توالی DNA هدف در داخل ژنوم تاثیری ندارد. نوع دیگری از CRISPR/Cas با مولکول‌های RNA برهم‌کنش دارد (Hale *et al*., 2012) و پروتئین‌های کاربردی Cas که بر مولکول‌های RNA موثرند، در مطالعه دیگری مشخص شدند (Hale *et al*., 2014). علاوه‌بر این، وجود یک مجموعه ژنی ضد کریسپر در باکتریوفاژها، باکتری‌ها و سلول‌های یوکاریوتی شناسایی شده است (Bondy-Denomy *et al*., 2013; Uribe *et al*., 2019).



شکل ۱: تاریخچه کریسپر: از ابتدای کشف توالی تکراری کریسپر تا نامگذاری این سیستم و شناسایی مکانیسم کارکرد آن و استفاده از این سیستم در ویرایش ژنوم سلولی. در ادامه سیستم های مختلفی که برمبنای کریسپر گرفته شد تا ویرایشگر های تک نوکلئوتیدی و سیستم پرایم ادیتور ذکر شده است.

واریانت های مختلف سیستم CRISPR/Cas9 در ویرایش ژنوم

همان‌طوری‌که در بخش قبل توضیح داده شد، مکان ژنی کریسپر بیان شده و tracrRNA و pre-crRNA را رونویسی می‌کند و از ژن همراه جایگاه ژنی کریسپر پروتئین Cas9 کددهی می‌شود. سپس با همکاری tracrRNA و RNaseIII ، pre-crRNA یک مولکول crRNA کوتاه ایجاد شده که می‌تواند یک دابلکس فعال tracrRNA-crRNA را شکل دهد. در نهایت، داپلکس crRNA-tracrRNA با آنزیم Cas9 ترکیب شده و ساختار فضایی فعالی را برای این آنزیم ایجاد کرده و کمپلکس CRISPR/Cas9 را به سمت DNA هدف هدایت می کند. مولکول فعال Cas9 اقدام به ایجاد DSB (Double Strand Breaks) در DNA هدف از طریق دو دامین فعال RuvC و HNH می کند.ایجاد DSB باعث فعال شدن سیستم ترمیمی DNA یا DNA repair می شود. مکانیسم ترمیمی اول NHEJ (non_homologous end joining) نام دارد (شکل ۲). در این سیستم، دو انتهای کروموزوم دو تکه شده مجددا به هم‌دیگر براساس سیستم ناهومولوگ متصل می‌شوند. با توجه به اینکه معمولا هر دو کروموزوم دیپلوئید در جایگاه ژنی مورد نظر بریده می‌شود، الگویی که DNA براساس آن ترمیم شود وجود ندارد. از یک سو، به محض بریده شدن توالی هدف در ژنوم میزبان آنزیم‌های اگزونوکلئازی شروع به حذف نوکلئوتیدها از دو انتهای آزاد DNA می‌کنند. از سوی دیگر، سیستم ترمیمی با استفاده از آنزیم DNA پلیمراز و سایر آنزیم‌های مرتبط اقدام به بازسازی دو رشته DNA از دو انتهای آزاد شده می‌کنند. این اقدام، منجر به متصل شدن دو انتهای کروموزوم شده و در محل ترمیم یک مجموعه‌ای از کم و زیادشدن نوکلئوتیدها (insertion/deletions) و یا به اختصار indels به طور تصادفی رخ می دهد. این روش برای ایجاد جهش‌های تصادفی در داخل ژنوم و عمدتا به منظور تغییر چارچوب خوانش یا Reading frame برای یک پروتئین خاص استفاده می شود (Horii & Hatada, 2014). پروتئین جهش یافته عمدتا غیرفعال بوده و اصطلاحا knockout می شود. از این روش برای غیرفعال کردن ژن‌های زیادی در حیوانات اهلی (Eghbalsaied & Kues, 2021) و نیز ژن‌های خارجی وارد شده در ژنوم میزبان در موش استفاده شده است (Eghbalsaied *et al*., 2020).

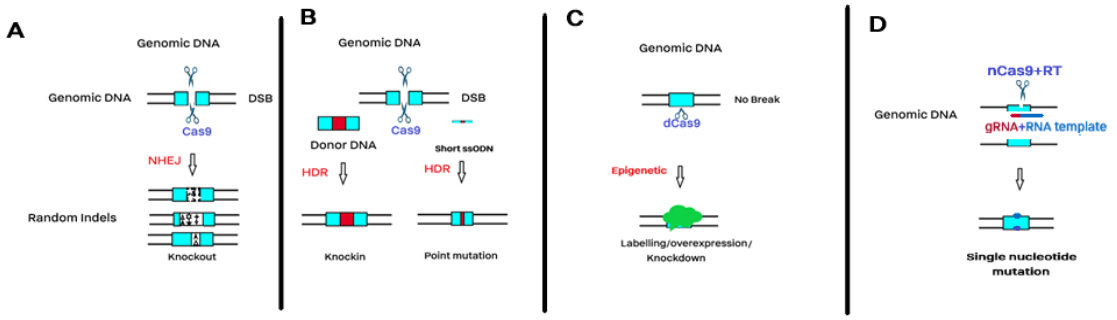
سیستم ترمیمی دیگر، Homology-directed repair (HDR) نام دارد. در این حالت، کروموزوم دارای DSB توسط سیستم ترمیمی براساس یک رشته DNA الگو بازسازی می‌شود (شکل ۲). رشته الگو دارای هومولوژی در بازوی چپ و بازوی راست خود، منطبق بر دو انتهای چپ و راست DSB، می باشد. سیستم ترمیمی از این DNA الگو استفاده می‌کند و بر اساس آن دو قطعه از هم جداشده را کاملا منطبق بر الگو به هم‌دیگر متصل نموده و از ایجاد indels در بین دو قطعه جداشده جلوگیری می‌کند. این روش برای ایجاد جهش‌های تک نوکلئوتیدی دلخواه یا point mutation کاربرد دارد. از این تکنولوژی برای وارد کردن قطعات DNA یا ژن‌های بزرگ هم استفاده می شود (Platt *et al*., 2014). برای مثال، قطعات ۶-۷ کیلو جفت بازی که حدود ۱-۱/۵ کیلو جفت باز سمت راست و ۱-۱/۵ کیلوجفت باز در سمت چپ با محل ورود هدفمند ژن هومولوژی داشتند وارد ژنوم میزبان شده است. DNA دهنده می‌تواند از نوعی تک رشته‌ای یا single strand donor DNA (ssODN) و یا دو

رشـــته ای double strand dodnor DNA (dsODN) باشـــد (Yoshimi *et al*., 2016). برای وارد کردن قطعات بزرگ به داخل ژنوم بهتر اســـت از پلاســـمید و یا کاســـمیده(Nakao *et al*., 2016; Kanca *et al*., 2019) و باک‌ها Bacterial artificial chromosomes (BACs) استفاده کرد (Suenaga *et al*., 2014).

کاربرد دیگر سـیسم کریسپر در مطالعات اپی ژنتیک و تنظیم بیان ژن‌هاست. در این روش از یک پروتئین Cas9 مرده یا dead Cas9 (dCas9) اسـتفاده می شـود. این پروتئین با توجه به وجود gRNA و PAM قابلیت اتصال به DNA هدف را داشته، ولی دو دامین برشـی RuvC و HNH را ندارد. به‌همین دلیل، فقط به جایگاه ژنی هدف متصـل می‌شود. از سوی دیگر، این پروتئین dCas9 به صـورت فیوز شـده با یک پروتئین دیگر اسـت که باعث می شود که پروتئین دیگر بتواند در جایگاه ژنی مورد نظر به انجام فعالیت کاتالیتیکی خود بپردازد (شکل ۲). به این منظور، از فیوز کردن پروتئین dCas9 با پروتئین های افزایش دهنده یا کاهش دهنده فعالیت پروموتور شـــامل Herpes simplex virus-based transcriptional activator VP64 domain (VP64) برای افزایش بیان ژن (Maeder et al. 2013) و Krüppel-associated box repressor domain (KRAB) برای کاهش بیان ژن اسـتفاده شـده اسـت (Gilbert et al. 2013). علاوه براین، فیوز dCas9 به پروتئین های فلورسـنت برای شناسایی و برچسب دار کردن بخش خاصی از ژنوم استفاده شده است(Anton et al. 2014; Tabebordbar et al. 2021).

کاربرد چهارم از سـیسـتم قابل برنامه ریزی ویرایش ژنوم با CRISPR/Cas9 اسـتفاده از آن برای ویرایش هدفمند یک تا چند نوکلئوتید اسـت. این روش Prime editing نامیده می شـود که توسـط گروهی به رهبری دیوید لیو(David Liu) انجام شـده اسـت (Anzalone et al. 2019) . در این سیستم، یک مولکول CRISPR/Cas9 که یکی از دامین های برشی آن غیرفعال شده و قادر به بریدن DNA دو رشـته ای نبوده و فقط یک تک رشـته را برش می دهد و اصطلاحا یک نیک ایجاد می کند و به Cas9 nickase (nCas9) معروف اسـت (شـکل ۲). این مولکول nCas9 با پروتئین(RT) MMLV reverse transcriptase فیوز شـده و یک پروتئین کایمر و کامپلکس ایجاد می کند که قادر اسـت در محل ژن هدف عمل رونویسـی معکوس را ایجاد کند (Anzalone *et al.* 2019). در این روش، علـاوه بر پروتئین فیوز nCas9+RT از یـک رشـــته RNA کایمر بنام pegRNA اسـتفاده می شـود که خود شـامل gRNA، Primer binding site (PBS) و reverse transcript template (RT) هست. این سـه RNA به همدیگر متصـل شـده و تشکیل یک مولکول RNA می‌دهند که یک بخش آن همان gRNA بوده و به ژن هدف متصل می‌شود، یک بخش نقش یک مولکول RNA الگو که حامل جهش‌های دلخواه هست و نیز یک توالی RNA که به عنوان پرایمر برای شـروع عمل رونویسی معکوس از روی RT-RNA استفاده می‌شود، می‌باشد. توالی gRNA هدایت پروتئین فیوزشـده nCas9+RT را به جایگاه هدف انجام می دهد و سـپس آنزیم nCas9 اقدام به برش رشـته DNA که مکمل gRNA هست می کند و یک نیک برای اعمال تغییرات ایجاد می کند. از سوی دیگر، آنزیم RT اقدام به انجام رونویسی معکوس از روی RT-RNA نموده و یک کپی DNA از روی آن می‌سـازد. حال رشـــته کپی شـــده به‌عنوان یک الگو برای انجام ترمیم DNA

هدف که در محل نیک باز شده است، می‌کند. سپس رشته مکمل آن نیز به تناسب تغییر می‌کند و هر دو رشته توالی دلخواه را که شامل یک تا چند نوکلئوتید هست خواهند داشت (Anzalone *et al.*, 2019). اخیرا، همین گروه با استفاده از مهار سیستم ترمیمی DNA ناجور یا DNA mismatch repair (MMR) بازدهی این تکنولوژی به بیش از ۳۷ درصد افزایش یافته است (Chen *et al.*, 2021). با این وجود، استفاده از آن در ویرایش ژنوم حیوانات هنوز گزارش نشده است.



شکل ۲:کاربردهای سیستم CRISPR/Cas9 در ویرایش ژنوم. A) با هدایت sgRNA دومین HNH نوکلئاز Cas9 رشته‌ی متصل به sgRNA را برش می‌دهد و دومین RuvC-like رشته‌ی دیگر DNA را برش می‌دهد، و باعث ایجاد DSB در DNA می‌گردد. B) nCas9(paired Cas9 nikases): sgRNA برای جلوگیری از خارج شدن سیستم از مسیر هدف مورد استفاده قرار می‌گیرند.(جهش در دومین‌های HNH و RuvC-like سبب ایجاد نوکلئاز Cas9 می شود که توانایی برش در یک رشته از DNA را دارد.) C) پروتئین فیوز شده sgRNA-guided dCas9 با پروتئین های فلورسنت و افزایش یا کاهش دهنده بیان ژن که برای مطالعات اپی ژنتیک و نیز افزایش یا کاهش بیان ژنها استفاده می شود. در این روش از dead Cas9 (dCas9) استفاده می شود. D) سیستم Prime editing: در این روش از پروتئین فیوزشده Cas9 nickase (nCas9) به همراه آنزیم reverse transcriptase (RT) استفاده می شود. از سوی دیگر، CRISPR RNA نیز به یک RNA کایمر تبدیل شده که شامل gRNA, Primer binding site, reverse transcription template می باشد(Anzalone et al. 2020).

فاکتورهای کلیدی برای طراحی سیستم CRISPR/Cas9

از زمان شناسایی تا کنون، سیستم کریسپر خود را به عنوان یک ابزار قدرتمند و انعطاف‌پذیر برای ویرایش و تنظیم ژنوم نشان داده است. بازدهی یک سیستم کریسپر وابسته به مجموعه ای از عوامل، شامل انتخاب مکان هدف، طراحی sgRNA، فعالیت Cas9، روش‌های انتقال سیستم کریسپر به داخل سلول و جنین، سیستم ترمیمی DNA ناجور یا MMR و نیز اثرات غیرهدفمند یا off-target می باشد. در زیر به اهمیت هر کدام از این فاکتورها پرداخته خواهد شد.

انتخاب ناحیه هدف اولین و مهمترین نکته کلیدی در انجام ویرایش ژنوم است. بسته به هدف از ویرایش ژنوم این ناحیه میتواند متفاوت باشد. قرار گرفتن یا نزدیک بودن محل ژن هدف به ناحیه هتروکروماتین و یوکروماتین کروموزوم نقش مهمی در بازدهی سیستم کریسپر دارد (Verkuijl & Rots, 2019). با این وجود، مقایسه ژن‌هایی که در یک بافت بیان می‌شود و در بافت دیگر به‌دلیل متیله شدن بیان نمی‌شوند نشان داد که متیله شدن یک ژن تاثیر معنی‌داری بر بازدهی اتصال و کارکرد

سیستم کریسپر نداشت (Cano-Rodriguez *et al*., 2016). عامل دیگری که در تفاوت نواحی هتروکروماتین و یوکروماتین مطرح است، تاثیر نوکلئوزوم (nucleosome) است. نوکلئوزوم به‌عنوان کوچکترین ساختار کروماتین که یک توالی ۱۴۷ جفت بازی از DNA را به دورخود پیچانده، ممکن است بر بازدهی سیستم کریسپر تاثیر بگذارد. هر چند وجود نوکلئوزوم در DNA استخراج شده در شرایط in vitro مانع عملکرد سیستم کریسپر شد، در شرایط سلولی و in vivo وجود نوکلئوزوم مانعی برای عملکرد کریسپر نشد (برای مرور به مقاله (Verkuijl & Rots, 2019)مراجعه فرمایید). با این وجود، انتخاب ناحیه هدف در داخل یک ژن نیز نیاز به درنظرگرفتن نکاتی هست. برای اهداف غیرفعال کردن یک ژن یا gene knockout دو ناحیه هدف می‌توان درنظر گرفت. ناحیه پروموتور و ناحیه اگزون‌ها. با هدف قراردادن ناحیه پروموتور و نواحی محافظت شده پروموتور می‌توان مانع بیان یک ژن شد. از سوی دیگر، با هدف قراردادن کدان شروع یا ATG نیز می‌توان این کار را انجام داد. با این وجود، رایج‌ترین روش غیرفعال کردن یک ژن، ایجاد جهش‌های تصادفی ورود و حذف یا indels در اگزون‌ها می‌باشد. برای این کار، هر چه جایگاه هدف به ابتدای ژن نزدیک‌تر باشد، شانس غیرفعال کردن پروتئین بیش‌تر می‌شود. به‌همین دلیل، معمولا جهش‌ها برای اگزون یک در نظر گرفته می‌شود. با این وجود، اگر پروتئین مورد نظر دارای یک ناحیه سیگنالی در ابتدای خود باشد، بهتر است که بجای اگزون یک از اگزون‌های بعدی استفاده کرد. باید درنظر داشت که ممکن است یک ژن چند وارینت از mRNA تولید می‌کند. بنابراین، برای جلوگیری از تولید وارینت‌های فعال بهتر است اگزون‌های مشترک بین تمامی وارینت ها مورد هدف ویرایش قرار بگیرد. دلیل این امر این است که جهش در یک اگزون خاص که غیرمشترک بین وارینت‌هاست در برخی وارینت‌هایی که این اگزون را ندارند تاثیری ندارد. در بیش‌تر مواقع، به‌جای یک gRNA از دو یا سه gRNA استفاده می‌شود تا شانس ایجاد جهش و غیرفعال کردن ژن حداکثر شود. در این حالت، علاوه‌بر ایجاد indels، امکان حذف یک قطعه از DNA که بین دو gRNA قرار گرفته است وجود دارد (Eghbalsaied *et al*., 2020; Eghbalsaied & Kues, 2021) درمجموع، بهترین روش برای ناک اوت کردن یک ژن طراحی gRNA برای بیش از یک ناحیه از ژن است. معمولا دو اگزون پیاپی که بین همه وارینت‌ها مشترک باشد را مورد هدف قرار می‌دهند.

درصورتی‌که هدف ایجاد یک جهش هدفمند باشد، از دو روش می‌توان استفاده کرد: روش HDR که مبتنی بر برش DNA دورشته ای است و روش Prime editing که مبتنی بر برش در یک رشته از DNA و ایجاد نیک است. بنابراین، طراحی gRNA به ناچار محدود به ناحیه‌ای است که قرار است ویرایش شود. در روش HDR، برای یک ناحیه نزدیک به محل ویرایش دلخواه یا دو ناحیه در دو طرف محل دلخواه gRNA طراحی می‌شود. سپس یک قطعه DNA دهنده که برای قطعات کوچک (۶۰-۱۰۰۰ جفت باز) می‌تواند سنتز شده تک رشته‌ای یا دورشته‌ای باشد و برای قطعات بزرگ از پلاسمید یا BAC باشد برای آن طراحی می‌شود. این قطعه باید دارای هومولوژی در ناحیه چپ و راست محل ویرایش بوده (۳۰-۶۰ جفت باز برای ویرایش تک نوکلئوتیدی و ۱-۲ کیلو جفت باز برای واردکردن قطعات ژنی بزرگ) و در بین آن‌ها ویرایش دلخواه (جهش تک

نوکلئوتیـدی یـا قطعه بزرگ ژنی برای وارد شـــدن) قرار می گیرد. برای انجام این کار می توان از نرم افزار آنلاین Chopchop، گزینه Knock-in استفاده کرد (http://chopchop.cbu.uib.no/).

در روش دیگر، برمبنـای تکنولوژی Prime-editing برای یـک محـل نزدیـک بـه توالی مورد نظر برای ویرایش یـک gRNA طراحی می شـود. محل gRNA بهتر اسـت در فاصـله ۵۰ تا ۷۰ جفت باز از محل ویرایش قرار بگیرد (Chen *et al*,. 2021). همان‌طوری‌که در بخش قبل توضـیح داده شـد، در این سـیسـتم، علاوه‌بر gRNA، نیاز به یک توالی RNA که شـامل جهش دلخواه هسـت، می‌باشـد. مجموعه این gRNA و توالی‌های RNA برای رونویس معکوس و نیز پرایمر برای شـروع رونویسی در قالب یک قطعه RNA کایمر قرار گرفت که تحت یک پروموتور بیان می‌شـــود (Chen *et al.*, 2021). برای طراحی gRNA، PBS و توالی RT حـامـل تغییر چنـدنوکلئوتیـدی مورد نظر می‌توان از نرم افزار آنلـاین (http://pegfinder.sidichenlab.org/) اسـتفاده کرد. محدودیت این روش این اسـت که برای ایجاد جهش های تک نوکلئوتیدی یا ورود و حذف چندنوکلئوتیدی قابل اسـتفاده است و برای ورود ژنهای بزرگ غیرقابل استفاده است. هر چند ممکن است این تکنولوژی نوپا به زودی بهبود پیدا کند و این محدودیت نیز برطرف شود.

انتخاب منشـا آنزیم Cas9 هم می‌تواند در برخی مطالعات مهم باشـد. هرچند که همزمان هم SpCas9 و StCas9 توسـط دو گروه مختلف منتشر شد (Gasiunas *et al.*, 2012; Jinek *et al.*, 2012)استفاده از SpCas9 به‌دلیل در دسترس قرار گرفتن آن توسـط گروه ژانگ بیش‌تر مورد اسـتفاده است. اکثر نرم افزارهای آنلاین این گزینه را دارند که براساس منشا Cas9 طراحی gRNA انجام دهند. در واقع، توالی PAM برای Cas9 های مختلف متفاوت است. در مطالعاتی که از ویروس‌ها برای انتقال ژن استفاده می‌شود، با توجه به محدودیت اندازه ژن برای انتقال از SaCas9 (Staphylococcus aureus Cas9) استفاده می‌شود (Tabebordbar *et al.*, 2021) در جدول زیر نرم افزارهای آنلاین طراحی gRNA ذکر شده است.

جدول ۱: ابزارهای آنلاین طراحی gRNA برای سیستم کریسپر.

Tool name	Off-target analysis	Webpage link
CRISPR Design Tool	Yes	https://www.synthego.com/products/bioinformatics/crispr-design-tool/
PNA Bio	Yes	https://www.pnabio.com/support/gRNATool.htm
Cas-Designer	No	http://www.rgenome.net/cas-designer/
CRISPR MultiTargeter	No	http://www.multicrispr.net/
CRISPR Genome Analysis Tool	Yes	http://cbc.gdcb.iastate.edu/cgat/
GeneArt	Yes	https://www.thermofisher.com/sa/en/home/life-science/genome-editing/geneart-crispr/geneart-crisprsearch-and-design-tool.html/
ZiFiT Targeter Version 4.2	No	http://zifit.partners.org/ZiFiT/ChoiceMenu.aspx/
CRISPR/Cas9 target online predictor	Yes	https://crispr.cos.uni-heidelberg.de/
Cas9 online designer	Yes	http://www.rgenome.net/cas-designer/
CHOPCHOP	Yes	http://chopchop.cbu.uib.no/
sgRNAcas9	Yes	http://www.biootools.com/col.jsp?id=103/
E-CRISP	Yes	http://www.e-crisp.org/E-CRISP/

اثرات غیر هدف (Off-target)

سیستم CRISPR/Cas9 با اثر پروتئین Cas9 بر توالی هدف (On-target) عمل می‌کند. با این وجود، مطالعات اولیه بر روی سیستم کریسپر نشان داد که این سیستم می‌تواند مقادیر قابل توجهی از جهش‌های غیر هدف)Off-target) را ایجاد کند(Fu *et al.*, 2013). این اثرات غیر هدفمند ممکن است باعث ایجاد تغییرات فنوتیپی غیردلخواه و حتی مرگ سلولی گردد. عمده نرم افزارهای آنلاین که طراحی gRNA را انجام می‌دهند، توالی‌های off-target را نیز گزارش می‌دهند. علاوه‌براین، می‌توان با استفاده از نرم افزار آنلاین زیر توالی‌های off-target را در داخل ژنوم برای gRNA طراحی شده پیش‌بینی کرد (http://www.rgenome.net/cas-offinder/). برای کاهش احتمال وقوع جهش ها در مکانهای ژنی غیردلخواه یا off-target راهکارهای زیر پیشنهاد شده است:

الف) انتخاب مکان‌های هدف مناسب و طراحی دقیق sgRNA، به طوری که موثرترین رویکرد دیده شود. تجربه نشان داده است که توالی مکان هدف با محتوای نسبتا کم GC تقریبا ۳۵ درصد اثرات خارج از هدف کمتری دارد. در صورتی که محتوای بالای GC باعث می شود که هیبرید RNA و DNA پایدار شود و قدرت تحمل غیر انطباق نوکلئوتیدی افزایش یابد (Jiang *et al.*, 2013).علاوه‌بر این توالی هدف و توالی PAM دارای حداقل سه ناحیه‌ی عدم انطباق نوکلئوتیدی هستند که از شکل برآمدگی DNA در انتهاهای '۳ و '۵ و ۵ تا ۷ نوکلئوتید مجاور PAM جلوگیری می‌کند.

ب) استفاده از paired Cas9 nickase: سیستم Cas9 nickase فقط یک رشته از DNA را برش می دهد (Cho *et al.*, 2014). اگر در هر کدام از دومین‌های HNH یا RuvC-like جهش ایجاد شود، Cas9 ایجادشده قابلیت ایجاد برش در یک رشته‌ی DNA را دارد. با استفاده از Cas9 nickase و دو sgRNA که هر کدام مربوط به یک رشته از DNA باشند، تشکیل برش‌های تک رشته‌ای را می‌توان طوری هدایت کرد که در نهایت قابلیت تشکیل DSB ایجاد شده و حداقل Off-target ایجاد شود(Kim *et al.*, 2015) .

ج) استفاده از دایمرsgRNA-guided fCas9: (dCas9 به دومین نوکلئازی Fokl الحاق می شود) همانند Case9 nickase، دایمر dCase9 و Fokl می‌توانند endogenous را به وسیله‌ی تشکیل دادن یک اندونوکلئاز Fokl عملکردی ویرایش کنند. fCas9 نشان داده است که عملکرد بهتری برای نواحی هدف نسبت به Cas9 در رده‌های سلول انسانی دارد و اثرات غیر هدف کم‌تری را نیز دارا می‌باشد. اگرچه این استراتژی‌ها به طور خاص اثرات تشخیص ناحیه‌ی هدف را بهبود می‌بخشند. اما هم‌چنان نقص‌هایی نیز دارند. از قبیل: اندازه‌ی بزرگ پروتئین Cas، نیاز به چندین sgRNA، اجتناب کامل از نواحی غیر هدف و کاهش کارایی در نواحی هدف. پیشرفت‌های بیش‌تر در زمینه‌ی طراحی sgRNA، بهینه‌سازی روش‌های انتقال و یا کشف ویژگی‌های جدید در پروتئین‌های Cas می‌تواند در آینده کمک‌های چشم‌گیری به سیستم کریسپر کند.

د) اســتفاده از High fiedelity SpCas9 (Cas9-HF) که بسیار حساس تر نسبت به wild type SpCas9 بوده و به یک باز ناجور در توالی هدف با gRNA حســاس بوده و برش نمی دهد (Kleinstiver *et al*., 2016). با این وجود، اســتفاده از SpCas9-HF به دلیل بازدهی کم‌تر برای ویرایش on-target با استفبال زیادی مواجه نشده است.

کاربردهای سیستم کریسپر در حیوانات

تولید فنوتیپ های جدید و متغیر از طریق تغییر مستقیم توالی های DNA ایده جالبی است که کنجکاوی طیف گسترده‌ای از محققان را در چند دهه گذشــته برانگیخته اســت. بر اســاس تلاش‌های قابل توجه، پیشــرفت‌های فوق العاده‌ای در ژنتیک حیوانات به‌دست آمده است. روش ویرایش ژنوم به ما این امکان را می‌دهد که تغییرات دقیق و بدون خطا در ژنوم یک دام انجام دهیم تا بهره‌وری در تولید و مقاومت در برابر عفونت‌ها را فزایش دهیم. ما ده موضوع مختلف را در این مطالعه آورده‌ایم.

ایجاد ماهیچه مضاعف در حیوانات

در منطقه ویرایش ژنوم، ویرایش ژن هدفمند ژن میوســتاتین یک هدف محبوب برای افزایش رشــد و تولید عضله است. که این ایده ابتدا در گوســفندها و گاوهای با ماهیچه‌های ســنگین مانند گاوهای Piedmontese و بلژیکی آبی و نژاد Texel مورد توجه قرار گرفت. علاوه‌بر این، کشــف شــد که کاهش بیان ژن میوســتاتین (همچنین به‌عنوان GDF8 یا فاکتور تمایز رشــد ۸ شــناخته می شــود) منجر به افزایش رشــد عضلانی می‌شود. با این روش که یک روش کار آمد در تغییر ژنوم با مزایایی همچون عملیات ســاده‌تر و کم هزینه‌تر در حیواناتی نظیر موش‌ها (Horii & Hatada, 2014; Eghbalsaied *et al*., 2020)، میمون (Kang *et al*., 2015)، خوک(Wang *et al*., 2015b) برخی دام ها نظیر گوسفند (Crispo *et al*., 2015) و بز (Wang *et al*., 2015a) استفاده شده است. محققان موفق به ایجاد بز و خرگوش فاقد ژن فعال میوستاتین (MSTN KO) با استفاده از ســیســتم کریســپرCas9 / با راندمان بالا و موثر برای افزایش رشــد عضــلات شــده اند (Lv *et al*., 2016). غیرفعال کردن (knockout) ژن میوستاتین در خوک منجر به بروز جزیی صفت ماهیچه مضاعف شد (Wang *et al*., 2017).

ایجاد حیوانات مقاوم به بیماری

بیماری‌هایی که دام‌ها را تحت تأثیر قرار می‌دهد می تواند تأثیر مخربی بر بهره‌وری و تولید دام، تجارت حیوانات زنده، گوشــت و ســایر محصولات حیوانی، سلامت انسان و در نتیجه بر روند کلی توسعه اقتصادی داشته باشد. ویرایش ژنوم، که شامل درج، حذف یا اصلاح یک یا چند ژن در توالی DNA است، به‌سرعت در حال پیشرفت است و ممکن است سریع‌تر از آنچه تصور می‌شود به یک واقعیت تجاری تبدیل شود. سیستم کریسپر) اخیراً به عنوان یک ابزار قدرتمند برای ویرایش ژنوم در تولید مواد غذایی کشــاورزی از جمله مدیریت بیماری‌های دام ظاهر شــده است (Islam *et al*., 2020). سل یکی از بیماری‌های عفونی و قابل انتقال بین انســان و حیوان اســت. عامل ســل باکتری میکوباکتریوم (Mycobacterium) می باشــد. عامل ســل گاوی به

نام *میکوباکتریوم بویس* یکی از اعضـاء کمپلکس *میکوباکتریوم توبرکولوزیس* (عامل سـل انسـانی) نامیده می شـود. سـل از بیماری‌های مهم نشـخوارکنندگان به ویژه گاو و بز در سـراسـر جهان از جمله ایران می باشـد. باسـیل سـل علاوه بر انسـان و نشـخوارکنندگان، حیوانات خانگی و حیات وحش را نیز مبتلا می‌کند، لذا امر کنترل و مبارزه با این بیماری مشـکل اسـت. با اسـتفاده از سـیسـتم CRISPR/Cas9 محققان توانسته اند گاو های اصلاح‌شده ژنتیکی مقاوم به سل را ایجاد کنند. آنها ۹ گاو ایجاد کرده اند که در برابر سـل مقاومت نشـان دادند(Gao *et al*., 2017). بیماری تب مالت یکی از مهم‌ترین بیماری‌های مشترک انسان و دام بوده و به‌شدت مسری است. مصرف شیر غیرپاستوریزه، گوشت خام یا نیمه‌خام و تماس نزدیک با ترشحات بدن حیوان مبتلا به بیماری، از دلایل اصـلی انتقال این بیماری به انسـان هستند. این بیماری با نام‌های بروسلوز، تب مدیترانه و تب ناخواسـته نیز شناخته می‌شود. کارپونی و همکاران. سلول‌های آلوده را با ناقل‌های لنتی ویروسی حاوی سیستم ویرایش ژن CRISPR/Cas9 برای غیرفعال کردن یک ژن درگیر در تکثیر بروسـلا در سـلول‌های میزبان، به‌ویژه ژن مرتبط با حدت virB10 یـا RpolA (زیر واحـد A RNA پلیمراز) انتقال دادند. آن‌ها گزارش کردند که در روز اول و چهارم پس از انتقال با ناقل CRISPR/Cas9 علیه RpolA باکتریایی با نرخ چندگانگی عفونت 60 (MOI)، تعداد بروسـلا/سـلول‌های درونی شـده به شـدت کاهش یافته اسـت (Karponi *et al*., 2019). سـندرم تناسـلی و تنفسـی خوک (PRRS) یک بیماری ویروسـی است. عوارض تولید مثل و بیماری‌های تنفسـی در خوک‌ها در هر سنی. PRRS مهم‌ترین بیماری از نظر اقتصادی است که از زمان ریشه‌کنی تب خوکی کلاسـیک بر تولید خوکی ایالات متحده تأثیر می‌گذارد و سـالانه حدود ۶۵۰ میلیون دلار برای صـنعت خوک ایالات متحده هزینه دارد و برآوردهای اخیر در اروپا نشـان می‌دهد که هزینه آن تقریباً ۱,۵ میلیارد یورو در سـال اسـت.حذف گیرنده های CD163، خوک های دسـتکاری شـده ژنتیکی را تولید می‌کند که در برابر ویروس سـندرم تولید مثل و تنفسـی خوک (PRRSV) از طریق تکنیک CRISPR-Cas9 مقاوم هسـتند. تمام دام‌هایی که گیرنده‌های CD163 حذفی دارند در برابر PRRSV محافظت می شـوند و هرگز علائم این عفونت را نشـان ندادند(Whitworth *et al*., 2016). بیماری جنون گاوی، بیماری تحلیل برنده نورون های عصبی است که به‌دلیل تاخوردگی غیرمعمول پروتئین پریون در مغز که باعث ایجاد فرم مقاوم این پروتئین می‌شـود، بوجود می‌آید . محققان برای اولین با استفاده از ویرایشگرهای ژنوم CRISPR-Cas را برای معرفی انواع آللی جدید PRNP گزارشـی ارائه کردند (Park *et al*., 2020). کمبود آنزیم انشـعاب گلیکوژن (GBED) یک بیماری کشنده در جنین های در حال رشـد یا کره های تازه متولد شـده است. اسب های مبتلا فاقد آنزیم لازم برای ذخیره گلیکوژن (مولکول قند ذخیره کننده) به شـکل شاخه‌ای آن هستند و بنابراین نمی توانند مولکول های قند مورد نیاز قلب و ماهیچه های اسکلتی، کبد و مغز را ذخیره کنند. در نتیجه این اندام ها نمی توانند به درسـتی کار کنند. با پیشـرفت های اخیر در ویرایش ژنوم، می تـوان این نوع جهش ژنتیکی را دقیقـاً ترمیم کرد. در مطـالعـه ای، محققـان از CRISPR/Cas9 برای تصـحیح جهش GBE1102C>A در یک رده سـلولی اولیه فیبروبلاسـت که از یک هتروزیگوت شـایستگی ژنتیکی بالا مشتق شده است استفاده

کردند. این چارچوب می تواند برای هدف قرار دادن سایر بیماری های مضر در جمعیت حیوانات استفاده شود(Pinzon-Arteaga et al. 2020).

تعیین جنسیت

نتایج لی و همکاران به ما نشان می‌دهد که این روش قدرتمند ویرایش ژنوم می‌تواند برای توسعه و تعیین جنسیت بسیاری از مدل‌های مرغ مورد استفاده قرار گیرد و به طور قابل توجهی گسترش یابد (Lee et al. 2019). در حال حاضر، تعیین جنسیت اسپرم از طریق مرتب سازی سلولی فعال شده با فلورسانس (FACS) تنها در گاو به کاربرد تجاری رسیده است. با این وجود، فناوری تعیین جنسیت اسپرم هنوز باید با توجه به کارایی و قابلیت اطمینان بهبود یابد. ناحیه تعیین کننده جنسیت در کروموزوم Y (SRY) به عنوان کلید ژنتیکی اصلی رشد جنسیت مرد عمل می کند. این فناوری‌های جدید فرصت‌های خوبی برای از پیش تعیین جنسیت کردن در خوک‌ها می باشد (Kurtz & Petersen 2019).این رویکرد CRISPR-Cas9، ممکن است برای سایر گونه‌های مهره‌دار قابل اجرا باشد و گام‌هایی را به سوی پیشرفت‌های اخلاقی برای تحقیقات آزمایشگاهی و کشاورزی ارائه می‌کند.

ویرایش رنگ

جهش در ژن تیروزیناز (Tyr) به عنوان عامل آلبینیسم مغلوب در انسان و سایر گونه ها شناخته شده است. در مطالعه ای ، برای آزمایش اینکه آیا سیستم CRISPR/Cas9 روی جهش ناحیه تنظیم‌کننده UTRs در خرگوش کار می‌کند یا خیر، UTR 3' ژن Tyr خرگوش توسط یک سیستم CRISPR/Cas9 هدایت‌شده با sgRNA دوگانه حذف شد. همانطور که انتظار می رفت، رنگ خاکستری و کاهش ملانین در فولیکول های مو و عنبیه در خرگوش جهش یافته، مشاهده شد، بنابراین اطمینان در ارتباط جهش Tyr 3' UTR با خاکستری شدن در خرگوش افزایش یافت. فنوتیپ خاکستری در نسل F1 نیز یافت شد که نشان دهنده توانایی انتقال آلل جهش یافته به طور پایدار از والدین به فرزندان است. بنابراین، شواهد نشان می‌دهد کاهش ملانین و خاکستری شدن می‌تواند با حذف Tyr 3' UTR در خرگوش‌ها ایجاد شود. علاوه بر این، حذف قطعات بزرگ با واسطه CRISPR/Cas9 می‌تواند مطالعات ژنوتیپ به فنوتیپ UTRs یا RNAهای غیر کدکننده را در آینده تسهیل کند(Song *et al.*, 2017). در آینده با این سیستم محققان خواهند توانست برترین رنگ را برای حیوانات مختلف در میادین مختلف ارضه کنند.

افزایش کیفیت شیر

ملاتونین به عنوان یک آنتی اکسیدان قوی ارزش غذایی و دارویی مهمی را نشان می دهد. تولید شیر غنی شده با ملاتونین به نفع مصرف کنندگان خواهد بود. در مطالعه ای، یک بیوراکتور گوسفندی که شیر غنی شده با ملاتونین تولید می‌کند، با

موفقیت با فناوری ترکیبی از سیستم CRISPR/Cas9 و میکرواینجکشن توسعه یافته است. RT-PCR و وسترن بلات نشان دادند که بره‌ها این ژن‌ها را در سلول‌های اپیتلیال پستانی خود بیان کردند و این حیوانات شیر غنی‌شده با ملاتونین تولید کردند. این اولین گزارشی است که یک مدل حیوانی تراریخته AANAT و ASMT را نشان می‌دهد که سطوح قابل توجهی شیر ملاتونین را در مقایسه با همتایان نوع وحشی خود تولید می‌کند. فن‌آوری‌های پیشرفته مورد استفاده در این مطالعه، پایه‌ای برای تولید دام‌های بزرگ تراریخته، به عنوان مثال، گاوها، که می‌توانند سطح بالایی از شیر ملاتونین تولید کنند، ایجاد کرد (Ma et al. 2017). لاکتوگلوبولین (BLG) یکی از بزرگترین آلرژن های شیر گاو است که باعث هضم کم شیر می شود .در سال ۲۰۱۷ بزهای ویرایش شده ژنی با ژن BLG مختل تولید شدند(Zhou et al. 2017). چهار بنیانگذار از ۲۶ (۱۵,۳۸٪) ویرایش های BLG بودند که نشان دهنده کاهش بیان BLG و لغو تولید پروتئین BLG در شیر بودند . این مطالعه یک مدل بزی مفید ارائه می دهد که می تواند شیر بدون BLG تولید کند (Zhou *et al.* 2017).

افزایش تولید پشم

در پرورش گوسفند، طول پشم یکی از مهمترین صفات کیفی پشم است. فاکتور رشد فیبروبلاست ۵ (FGF5) یک مهارکننده غالب در چرخه پشم است. حذف یا خاموش شدن ژن FGF5 منجر به ایجاد پوشش پشمی در حیوانات شده است . محققان کشف کردند که طول پشم در گوسفندان جهش یافته به طور قابل توجهی بیشتر از انواع وحشی بود ($P < ۰/۰۵$). در مجموع، گوسفند حذفی FGF5 با فنوتیپ طول پشم طولانی تر، راهی کارآمد برای بهبود سریع ژنتیکی پرورش گوسفند و ترویج توسعه صنعت پشم خواهد بود (Hu et al. 2017) . نژاد بز کاشمیر به ارائه الیاف با کیفیت عالی معروف است. محققان با موفقیت با استفاده از فناوری CRISPR/Cas9، افزایش عملکرد را به میزان ۷۴,۵٪ بدون تأثیر بر ظرافت و کیفیت نشان دادند (Li *et al*., 2019).

افزایش عملکرد تولیدمثلی

بهبود عملکرد تولیدمثلی یکی از جنبه های مهم و اقتصادی در اصلاح نژاد دام است. جهش در ژن BMPR-IB (FecB) و GDF9 در گوسفند و بز نشان داده است که باعث افزایش نرخ تخمک گذاری می شود. محققان در سال ۲۰۱۸ گوسفند ویرایش شده ژن BMPR-1B ایجاد کردند(Zhou et al. 2018) . محققان بزهای ویرایش شده ژن فاکتور تمایز رشد ۹ (GDF9) را با استفاده از سیستم CRISPR Cas9 تولید کردند (Niu et al. 2018). در مطالعه ای از CRISPR-Cas9 برای حذف جایگاه FecXGr ژن BMP 15 در سلول های گرانولوزای بز استفاده شد (Tripathi et al. 2021).

بهبود رفاه حیوانات

در پرورش گاوهای شیری مدرن، تعداد زیادی از گاوها دارای فنوتیپ شاخدار هستند. خطر آسیب یا آسیب به حیوان و همچنین کشاورزان را افزایش می دهد. محققان نشان دادند میتوان با استفاده از تکنیک CRISPR/Cas12a نیاز به شاخ زدایی و را از بین برد (Schuster *et al*., 2020). این سیستم نیاز به شاخزدایی دردناکی را که به طور معمول در صنعت کشاورزی انجام می شود برای محافظت از گاوها و کشاورزان در برابر آسیب را برطرف می‌کند.

افزایش عملکرد در حیوانات ورزشی

استفاده از فن‌آوری‌های جدید برای ویرایش ژن در اسب‌ها، برای ایجاد اسب های کارآمدتر را فراهم می کند. در اینجا، هدف محققین حذف ژن میوستاتین (MSTN)، یک تنظیم کننده منفی رشد توده عضلانی، با استفاده از CRISPR/Cas9 و تولید جنین های ویرایش شده برای اولین بار در اسب ها صورت گرفت .محققان به این نتیجه رسیدند که با استفاده از سیستم CRISPR/Cas9 که یک روش کارآمد است میتوان برای ویرایش ژنوم اسب های کمک گرفت . با این فناوری می‌توان آلل‌های مفیدی را تولید کرد و یک برنامه اصلاح دقیق را توسعه داد(Moro *et al*., 2020).

کمک به تولید اعضای بدن انسان در حیوانات

با استفاده از سیستم CRISPR/Cas9 ، سلول‌های بنیادی پرتوان القایی (iPS) برای انجام چندین کار مهندسی بافت، از جمله ایجاد مدل‌های بیماری یا آماده‌سازی بافت‌های اهداکننده خاص برای پیوند توسط محققین انجام گرفت (Cai et al. 2016). یکی از مشکلات عمده در پیوند اعضای بدن خوک به انسان وجود اجزای رتروویروسی در ژنوم آن ها است که می تواند منجر به بروز بیماری در انسان شود. وجود این ویروس ها که در مورد خوک آن ها را PERVs می نامند. این امر می تواند استفاده از پیوند بیگانه خوک به انسان را میسر کند. مطالعات نشان داده است که کلیه های خوک می تواند در آزمایشگاه ماه ها برای بابون دارای عملکرد باشد. اما ترس از این رتروویروس ها سال ها برای انجام پیوند بیگانه وجود داشته است. در سال ۲۰۱۱۷ محققان برای غیر فعال سازی رتروویروس هایی که در ژنوم خوک وجود دارند از سیستم crispr/cas9 استفاده کردند. نی و همکاران توانسته اند با استفاده از کریسپر رتروویروس ها را از ژنوم حذف کنند (Niu *et al*., 2017). فن و همکاران یک مدل گوسفند جالب برای بررسی فیبروز کیستیک انسانی (CF) با استفاده از CRISPR/Cas9 و SCNT ارائه کرده‌اند(Fan *et al*., 2017) . CF یک اختلال ارثی است که بیشتر ریه ها و سایر اندام های بدن را درگیر می کند. نویسندگان هدف قرار دادن ژن تنظیم کننده هدایت گذر غشایی CF (CFTR) را معرفی کرده اند و بره های CFTR-/- و همچنین CFTR+/- با فنوتیپ شدید آسیب شناسی CF شبیه به انسان تولید شده اند.Xenotransplantation به عنوان یک راه حل امیدوارکننده برای

تقاضـای فزاینده برای اعضای اهداکننده مناسب برای پیوند در نظر گرفته می شود. با سیستم کریسپر ، خوک های اصلاح شدند که می توانند برای پزشکی استفاده شوند (Petersen *et al*., 2016).

جمع بندی

تکنولوژی کریسـپر یک تکنولوژی نوظهور در مهندسی ژنتیک و ویرایش ژنوم است. به دلیل سادگی تکنولوژی و موثر بودن آن اسـتفاده از آن به سـرعت در تمامی موسـسـات مهم دنیا که در زمینه ایجاد حیوانات ویرایش ژنوم شـده کار می کنند مورد قبول واقع شـده اسـت. از سـوی دیگر، در کمتر از یک دهه از عمر این تکنولوژی، پیشـرفت های زیادی در حوزه های مختلف اسـتفـاده از آن برای افزایش بـازدهی ناک اوت، ورود یک ترانسـژن (ناک این)، ویرایش هدفمند تک نوکلئوتیدی، افزایش یا کاهش بیان ژنها و نیز شـناسـایی محل یک ژن یا ترانسژن در داخل ژنوم میزبان انجام شده است. در علوم دامی، این تکنولوژی به سـرعت توسـط موسـسات مختلف دنیا برای بهبود صفات تولیدی، تولیدمثلی، مقاومت به بیماری و نیز صفات کیفی و پیوند بافت و ارگان بیگانه (زنوگرفت) مورد اسـتفاده قرار گرفته اسـت. پیش بینی می شـود که این تکنولوژی هر تغییر دلخواه را در ژنوم نژادهای مختلف حیوانی ایجاد کند و ضـمن حفظ نژادها از آمیخته شـدن ژنوم آنها با همدیگر و ایجاد تغییرات نامناسـب جلوگیری کند.

منابع

Anton, T., Bultmann S., Leonhardt, H. & Markaki, Y. (2014) Visualization of specific DNA sequences in living mouse embryonic stem cells with a programmable fluorescent CRISPR/Cas system. Nucleus 5, 163-72.

Anzalone, A.V., Koblan, L.W. & Liu, D.R. (2020) Genome editing with CRISPR–Cas nucleases, base editors, transposases and prime editors. Nature biotechnology 38, 824-44.

Anzalone, A.V., Randolph, P.B., Davis, J.R., Sousa, A.A., Koblan, L.W., Levy, J.M., Chen, P.J., Wilson, C., Newby, G.A. & Raguram, A. (2019) Search-and-replace genome editing without double-strand breaks or donor DNA. Nature 576, 149-57.

Bassett, A.R., Tibbit, C., Ponting, C.P. & Liu, J.-L. (2013) Highly efficient targeted mutagenesis of Drosophila with the CRISPR/Cas9 system. Cell reports 4, 220-8.

Bondy-Denomy, J., Pawluk, A., Maxwell, K.L. & Davidson, A.R. (2013) Bacteriophage genes that inactivate the CRISPR/Cas bacterial immune system. Nature 493, 429-32.

Brouns, S.J., Jore, M.M., Lundgren, M., Westra, E.R., Slijkhuis, R.J., Snijders, A.P., Dickman, M.J., Makarova, K.S., Koonin, E.V. & Van, Der Oost, J. (2008) Small CRISPR RNAs guide antiviral defense in prokaryotes. Science 321, 960-4.

Bzymek, M. & Lovett, S.T. (2001) Instability of repetitive DNA sequences: the role of replication in multiple mechanisms. Proceedings of the National Academy of Sciences 98, 8319-25.

Cai, L., Fisher, A.L., Huang, H. & Xie, Z. (2016) CRISPR-mediated genome editing and human diseases. Genes & diseases 3, 244-51.

Cano-Rodriguez, D., Gjaltema, R.A.F., Jilderda, L.J., Jellema, P., Dokter-Fokkens, J., Ruiters, M.H.J. & Rots, M.G. (2016) Writing of H3K4Me3 overcomes epigenetic silencing in a sustained but context-dependent manner. Nature communications 7, 1-11.

Carroll D. (2011) Genome engineering with zinc-finger nucleases. Genetics 188, 773-82.

Chen, P.J., Hussmann J.A., Yan, J., Knipping, F., Ravisankar, P., Chen, P.-F., Chen, C., Nelson, J.W., Newby, G.A. & Sahin, M. (2021) Enhanced prime editing systems by manipulating cellular determinants of editing outcomes. cell 184, 5635-52. e29.

Cho, S.W., Kim, S., Kim, Y., Kweon, J., Kim, H.S., Bae, S. & Kim, J.-S. (2014) Analysis of off-target effects of CRISPR/Cas-derived RNA-guided endonucleases and nickases. Genome research 24, 132-41.

Crispo, M., Mulet, A., Tesson, L., Barrera, N., Cuadro, F., dos Santos-Neto, P., Nguyen, T., Crénéguy, A., Brusselle, L. & Anegón, I. (2015) Efficient generation of myostatin knock-out sheep using CRISPR/Cas9 technology and microinjection into zygotes. PloS one 10, e0136690.

Deltcheva, E., Chylinski, K., Sharma, C.M., Gonzales, K., Chao, Y., Pirzada, Z.A., Eckert, M.R., Vogel, J. & Charpentier, E. (2011) CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III. Nature 471, 602-7.

Deveau, H., Barrangou, R., Garneau, J.E., Labonté, J., Fremaux, C., Boyaval, P., Romero, D.A., Horvath, P. & Moineau, S. (2008) Phage response to CRISPR-encoded resistance in Streptococcus thermophilus. Journal of bacteriology 190, 1390-400.

Díez-Villaseñor, C., Almendros, C., García-Martínez, J. & Mojica, F.J. (2010) Diversity of CRISPR loci in Escherichia coli. Microbiology 156, 1351-61.

Eghbalsaied, S., Hyder, I. & Kues, W.A. (2020) A versatile bulk electrotransfection protocol for murine embryonic fibroblasts and iPS cells. Scientific reports 10, 1-10.

Eghbalsaied, S. & Kues, W.A. (2021) An electrochemical protocol for CRISPR-mediated gene-editing of sheep embryonic fibroblast cells. Cells Tissues Organs.

Fan, Z., Regouski, M., Yang, M., Gash, K., Meng, Q. & Davies, C. (2017) Generation of interferon α/β receptor knockout sheep using CRISPR/Cas9 and SCNT techniques. In: *program and abstracts of the 14th transgenic technology meeting (TT2017). Transgenic Res*, pp. 1-45.

Fu, Y., Foden, J.A., Khayter, C., Maeder, M.L., Reyon, D., Joung, J.K. & Sander, J.D. (2013) High-frequency off-target mutagenesis induced by CRISPR-Cas nucleases in human cells. Nature biotechnology 31, 822-6.

Gao, Y., Wu, H., Wang, Y., Liu, X., Chen, L., Li, Q., Cui, C., Liu, X., Zhang, J. & Zhang, Y. (2017) Single Cas9 nickase induced generation of NRAMP1 knockin cattle with reduced off-target effects. Genome biology 18, 1-15.

Garneau, J.E., Dupuis, M.-È., Villion, M., Romero, D.A., Barrangou, R., Boyaval, P., Fremaux, C., Horvath, P., Magadán, A.H. & Moineau, S. (2010) The CRISPR/Cas bacterial immune system cleaves bacteriophage and plasmid DNA. Nature 468, 67-71.

Gasiunas, G., Barrangou, R., Horvath, P. & Siksnys, V. (2012) Cas9–crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria. Proceedings of the National Academy of Sciences 109, E2579-E86.

Gilbert, L.A., Larson, M.H., Morsut, L., Liu, Z., Brar, G.A., Torres, S.E., Stern-Ginossar, N., Brandman, O., Whitehead, E.H. & Doudna, J.A. (2013) CRISPR-mediated modular RNA-guided regulation of transcription in eukaryotes. cell 154, 442-51.

Grissa, I., Vergnaud, G. & Pourcel, C. (2007) The CRISPRdb database and tools to display CRISPRs and to generate dictionaries of spacers and repeats. BMC bioinformatics 8, 1-10.

Hale, C.R., Cocozaki, A., Li, H., Terns, R.M. & Terns, M.P. (2014) Target RNA capture and cleavage by the Cmr type III-B CRISPR–Cas effector complex. Genes & development 28, 2432-43.

Hale, C.R., Majumdar, S., Elmore, J., Pfister, N., Compton, M., Olson, S., Resch, A.M., Glover, III C.V., Graveley, B.R. & Terns, R.M. (2012) Essential features and rational design of CRISPR RNAs that function with the Cas RAMP module complex to cleave RNAs. Molecular cell 45, 292-302.

Horii T. & Hatada I. (2014) Genome engineering using the CRISPR/Cas system. World Journal of Medical Genetics 4, 69-76.

Horvath, P., Romero, D.A., Coûté-Monvoisin, A.-C., Richards, M., Deveau, H., Moineau, S., Boyaval, P., Fremaux, C. & Barrangou, R. (2008) Diversity, activity, and evolution of CRISPR loci in Streptococcus thermophilus. Journal of bacteriology 190, 1401-12.

Hsu, P.D., Scott, D.A., Weinstein, J.A., Ran, F.A., Konermann, S., Agarwala, V., Li, Y., Fine, E.J., Wu, X. & Shalem, O. (2013) DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases. Nature biotechnology 31, 827-32.

Hu, R., Fan, Z., Wang, B., Deng, S., Zhang, X., Zhang, J., Han, H. & Lian, Z. (2017) RAPID COMMUNICATION: Generation of FGF5 knockout sheep via the CRISPR/Cas9 system. Journal of animal science 95, 2019-24.

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, e00580-17.

Ishino, Y., Shinagawa, H., Makino, K., Amemura, M. & Nakata, A. (1987) Nucleotide sequence of the iap gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in Escherichia coli, and identification of the gene product. Journal of bacteriology 169, 5429-33.

Islam, M., Rony, S.A., Rahman, M.B., Cinar, M.U., Villena, J., Uddin, M.J. & Kitazawa, H. (2020) Improvement of disease resistance in livestock: application of immunogenomics and CRISPR/Cas9 technology. Animals 10, 2236.

Jiang, W., Bikard, D., Cox, D., Zhang, F. & Marraffini, L.A. (2013) RNA-guided editing of bacterial genomes using CRISPR-Cas systems. Nature biotechnology 31, 233-9.

Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J.A. & Charpentier, E. (2012) A programmable dual-RNA–guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. Science 337, 816-21.

Kanca, O., Zirin, J., Garcia-Marques, J., Knight, S.M., Yang-Zhou, D., Amador, G., Chung, H., Zuo, Z., Ma, L. & He, Y. (2019) An efficient CRISPR-based strategy to insert small and large fragments of DNA using short homology arms. Elife 8, e51539.

Kang, Y., Zheng, B., Shen, B., Chen, Y., Wang, L., Wang, J., Niu, Y., Cui, Y., Zhou, J. & Wang, H. (2015) CRISPR/Cas9-mediated Dax1 knockout in the monkey recapitulates human AHC-HH. Human molecular genetics 24, 7255-64.

Karponi, G., Kritas, S.K., Papadopoulou, G., Akrioti, E.-K., Papanikolaou, E. & Petridou, E. (2019) Development of a CRISPR/Cas9 system against ruminant animal brucellosis. BMC veterinary research 15, 1-10.

Kim, D., Bae, S., Park, J., Kim, E., Kim, S., Yu, H.R., Hwang, J., Kim, J.-I. & Kim, J.-S. (2015) Digenome-seq: genome-wide profiling of CRISPR-Cas9 off-target effects in human cells. Nature methods 12, 237-43.

Kleinstiver, B.P., Pattanayak, V., Prew, M.S., Tsai, S.Q., Nguyen, N.T., Zheng, Z. & Joung, J.K. (2016) High-fidelity CRISPR–Cas9 nucleases with no detectable genome-wide off-target effects. Nature 529, 490-5.

Kurtz, S. & Petersen, B. (2019) Pre-determination of sex in pigs by application of CRISPR/Cas system for genome editing. Theriogenology 137, 67-74.

Lander, E.S. (2016) The heroes of CRISPR. Cell 164, 18-28.

Lee, H.J., Yoon, J.W., Jung, K.M., Kim, Y.M., Park, J.S., Lee, K.Y., Park, K.J., Hwang, Y.S., Park, Y.H. & Rengaraj, D. (2019) Targeted gene insertion into Z chromosome of chicken primordial germ cells for avian sexing model development. The FASEB Journal 33, 8519-29.

Li, X., Hao, F., Hu, X., Wang, H., Dai, B., Wang, X., Liang, H., Cang, M. & Liu, D. (2019) Generation of Tβ4 knock-in Cashmere goat using CRISPR/Cas9. International journal of biological sciences 15, 1743.

Lv, Q., Yuan, L., Deng, J., Chen, M., Wang, Y., Zeng, J., Li, Z. & Lai, L. (2016) Efficient generation of myostatin gene mutated rabbit by CRISPR/Cas9. Scientific reports 6, 1-8.

Ma, T., Tao, J., Yang, M., He, C., Tian, X., Zhang, X., Zhang, J., Deng, S., Feng, J. & Zhang, Z. (2017) An AANAT/ASMT transgenic animal model constructed with CRISPR/Cas9 system serving as the mammary gland bioreactor to produce melatonin-enriched milk in sheep. Journal of Pineal Research 63, e12406.

Maeder, M.L., Linder, S.J., Cascio, V.M., Fu, Y., Ho, Q.H. & Joung, J.K. (2013) CRISPR RNA–guided activation of endogenous human genes. Nature methods 10, 977-9.

Makarova, K.S., Grishin, N.V., Shabalina, S.A., Wolf , Y.I. & Koonin, E.V. (2006) A putative RNA-interference-based immune system in prokaryotes: computational analysis of the predicted enzymatic machinery, functional analogies with eukaryotic RNAi, and hypothetical mechanisms of action. Biology direct 1, 1-26.

Marraffini, L.A. & Sontheimer, E.J. (2008) CRISPR interference limits horizontal gene transfer in staphylococci by targeting DNA. Science 322, 1843-5.

Mojica, F.J., Díez-Villaseñor, C., García-Martínez, J. & Almendros, C. (2009) Short motif sequences determine the targets of the prokaryotic CRISPR defence system. Microbiology 155, 733-40.

Mojica, F.J., García-Martínez, J. & Soria, E. (2005) Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements. Journal of molecular evolution 60, 174-82.

Mojica, F.J., Juez, G. & Rodriguez-Valera, F. (1993) Transcription at different salinities of Haloferax mediterranei sequences adjacent to partially modified PstI sites. Molecular microbiology 9, 613-21.

Moro, L.N., Viale, D.L., Bastón, J.I., Arnold, V., Suvá, M., Wiedenmann, E., Olguín, M., Miriuka, S. & Vichera, G. (2020) Generation of myostatin edited horse embryos using CRISPR/Cas9 technology and somatic cell nuclear transfer. Scientific reports 10, 1-10.

Nakao, H., Harada, T., Nakao, K., Kiyonari, H., Inoue, K., Furuta, Y. & Aiba, A. (2016) A possible aid in targeted insertion of large DNA elements by CRISPR/Cas in mouse zygotes. Genesis 54, 65-77.

Niu, D., Wei, H.-J., Lin, L., George, H., Wang, T., Lee, I.-H., Zhao, H.-Y., Wang, Y., Kan, Y. & Shrock, E. (2017) Inactivation of porcine endogenous retrovirus in pigs using CRISPR-Cas9. Science 357, 1303-7.

Niu, Y., Zhao, X., Zhou, J., Li, Y., Huang, Y., Cai, B., Liu, Y., Ding, Q., Zhou, S. & Zhao, J. (2018) Efficient generation of goats with defined point mutation (I397V) in GDF9 through CRISPR/Cas9. Reproduction, Fertility and Development 30, 307-12.

Park, K.-E., Frey, J.F., Waters, J., Simpson, S.G., Coutu, C., Plummer, S., Campbell, M., Donovan, D.M. & Telugu, B.P. (2020) One-step homology mediated CRISPR-Cas editing in zygotes for generating genome edited cattle. The CRISPR Journal 3, 523-34.

Petersen, B., Frenzel, A., Lucas-Hahn, A., Herrmann, D., Hassel, P., Klein, S., Ziegler, M., Hadeler K.G. & Niemann, H. (2016) Efficient production of biallelic GGTA 1 knockout pigs by cytoplasmic microinjection of CRISPR/Cas9 into zygotes. Xenotransplantation 23, 338-46.

Pinzon-Arteaga, C., Snyder, M.D., Lazzarotto, C.R., Moreno, N.F., Juras, R., Raudsepp, T., Golding, M.C., Varner, D.D. & Long, C.R. (2020) Efficient correction of a deleterious point mutation in primary horse fibroblasts with CRISPR-Cas9. Scientific reports 10, 1-11.

Platt, R.J., Chen, S., Zhou, Y., Yim, M.J., Swiech, L., Kempton, H.R., Dahlman, J.E., Parnas, O., Eisenhaure, T.M. & Jovanovic, M. (2014) CRISPR-Cas9 knockin mice for genome editing and cancer modeling. cell 159, 440-55.

Schuster, F., Aldag, P., Frenzel, A., Hadeler, K.-G., Lucas-Hahn, A., Niemann, H. & Petersen, B. (2020) CRISPR/Cas12a mediated knock-in of the Polled Celtic variant to produce a polled genotype in dairy cattle. Scientific reports 10, 1-9.

Sharma, V.K., Marla, S., Zheng, W., Mishra, D., Huang, J., Zhang, W., Morris, G.P. & Cook, D.E. (2022) CRISPR guides induce gene silencing in plants in the absence of Cas. Genome biology 23, 1-24.

Song, Y., Xu, Y., Deng, J., Chen, M., Lu, Y., Wang, Y., Yao, H., Zhou, L., Liu, Z. & Lai, L. (2017) CRISPR/Cas9-mediated mutation of tyrosinase (Tyr) 3′ UTR induce graying in rabbit. Scientific reports 7, 1-8.

Sorek, R., Kunin, V. & Hugenholtz, P. (2008) CRISPR—a widespread system that provides acquired resistance against phages in bacteria and archaea. Nature Reviews Microbiology 6, 181-6.

Suenaga, T., Kohyama, M., Hirayasu, K. & Arase, H. (2014) Engineering large viral DNA genomes using the CRISPR-Cas9 system. Microbiology and immunology 58, 513-22.

Sun, N. & Zhao, H. (2013) Transcription activator-like effector nucleases (TALENs): a highly efficient and versatile tool for genome editing. Biotechnology and bioengineering 110, 1811-21.

Tabebordbar, M., Lagerborg, K.A., Stanton, A., King, E.M., Ye, S., Tellez, L., Krunnfusz, A., Tavakoli, S., Widrick, J.J. & Messemer, K.A. (2021) Directed evolution of a family of AAV capsid variants enabling potent muscle-directed gene delivery across species. cell 184, 4919-38. e22.

Tripathi, M.K., Jose, B., Khanna, S., Kumar, P., Konda, A., Chauhan, V.S., Sarkar, M. & Singh, G. (2021) CRISPR mediated BMP15 gene knockout in Caprine granulosa cells. Pharma Innovation 10, 252-5.

Uribe, R.V., van der Helm, E., Misiakou, M.-A., Lee, S.-W., Kol, S. & Sommer, M.O. (2019) Discovery and characterization of Cas9 inhibitors disseminated across seven bacterial phyla. Cell host & microbe 25, 233-41. e5.

Verkuijl, S.A. & Rots, M.G. (2019) The influence of eukaryotic chromatin state on CRISPR–Cas9 editing efficiencies. Current opinion in biotechnology 55, 68-73.

Wang, H., Yang, H., Shivalila, C.S., Dawlaty, M.M., Cheng, A.W., Zhang, F. & Jaenisch, R. (2013) One-step generation of mice carrying mutations in multiple genes by CRISPR/Cas-mediated genome engineering. cell 153, 910-8.

Wang, K., Tang, X., Xie, Z., Zou, X., Li, M., Yuan, H., Guo, N., Ouyang, H., Jiao, H. & Pang, D. (2017) CRISPR/Cas9-mediated knockout of myostatin in Chinese indigenous Erhualian pigs. Transgenic research 26, 799-805.

Wang, X., Yu, H., Lei, A., Zhou, J., Zeng, W., Zhu, H., Dong, Z., Niu, Y., Shi, B. & Cai, B. (2015a) Generation of gene-modified goats targeting MSTN and FGF5 via zygote injection of CRISPR/Cas9 system. Scientific reports 5, 1-9.

Wang, Y., Du, Y., Shen, B., Zhou, X., Li, J., Liu, Y., Wang, J., Zhou, J., Hu, B. & Kang, N. (2015b) Efficient generation of gene-modified pigs via injection of zygote with Cas9/sgRNA. Scientific reports 5, 1-9.

Whitworth, K.M., Rowland, R.R., Ewen, C.L., Trible, B.R., Kerrigan, M.A., Cino-Ozuna, A.G., Samuel, M.S., Lightner, J.E., McLaren, D.G. & Mileham, A.J. (2016) Gene-edited pigs are protected from porcine reproductive and respiratory syndrome virus. Nature biotechnology 34, 20-2.

Yoshimi, K., Kunihiro, Y., Kaneko, T., Nagahora, H., Voigt, B. & Mashimo, T. (2016) ssODN-mediated knock-in with CRISPR-Cas for large genomic regions in zygotes. Nature communications 7, 1-10.

Zhou, S., Yu, H., Zhao, X., Cai, B., Ding, Q., Huang, Y., Li, Y., Li, Y., Niu, Y. & Lei, A. (2018) Generation of gene-edited sheep with a defined Booroola fecundity gene (FecBB) mutation in bone morphogenetic protein receptor type 1B (BMPR1B) via clustered regularly interspaced short palindromic repeat (CRISPR)/CRISPR-associated (Cas) 9. Reproduction, Fertility and Development 30, 1616-21.

Zhou, W., Wan, Y., Guo, R., Deng, M., Deng, K., Wang, Z., Zhang ,Y. & Wang, F. (2017) Generation of beta-lactoglobulin knock-out goats using CRISPR/Cas9. PloS one 12, e0186056.