

۲۱۸۴۸۲

بِسْمِ اللّٰهِ الرَّحْمٰنِ الرَّحِیْمِ

ویرایش ژنوم
با فناوری کریسپر و کاربردهای آن در علوم زیستی

www.ketab.ir

مجتبی خیام نکویی

محسن مردی

سعید کدخدایی

علی موحدی



عنوان و نام پدیدآور: ویرایش ژنوم با فناوری کریسپر و کاربردهای آن در علوم زیستی / مجتبی خیام‌نکویی... [و دیگران].
مشخصات نشر: تهران: دانشگاه تربیت مدرس، مرکز نشر آثار علمی، ۱۳۹۹.
مشخصات ظاهری: ۳۶۰ص.

شابک: ۹۷۸-۶۲۲-۷۰۳۴-۲۰-۲

وضعیت فهرست نویسی: فیبا

یادداشت: مجتبی خیام‌نکویی، محسن مردی، سعید کدخدایی، علی موحدی.

موضوع: سیستم‌های کریسپر کس

CRISPR-Cas systems

موضوع: ویرایش ژنوم

Gene editing

شناسه افزوده: خیام‌نکویی، مجتبی، ۱۳۴۰ -

شناسه افزوده: دانشگاه تربیت مدرس، مرکز نشر آثار علمی

Tarbiat Modares University, TMU Press

رده بندی کنگره: QP۴۴۰

رده بندی دیویی: ۵۷۷۵

شماره کتابشناسی ملی: ۷۵۴۲۳۹۷

وضعیت رکورد: فیبا

ویرایش ژنوم با فناوری کریسپر و کاربردهای آن در علوم زیستی

گردآوری: مجتبی خیام‌نکویی، محسن مردی، سعید کدخدایی، علی موحدی

ویراستار ادبی و فنی: فاطمه کلاتری خلیل‌آبادی

طراح جلد: ترنج

صفحه‌آرایی: سمیه زهانی

شماره انتشار: ۲۷۲

شماره پیاپی: ۴۱۷

تاریخ انتشار: ۱۳۹۹

شمارگان: ۵۰۰

شابک: ۹۷۸-۶۲۲-۷۰۳۴-۲۰-۲

ناشر: انتشارات دانشگاه تربیت مدرس

نوبت چاپ: اول

کارشناس اجرایی: فاطمه طالبی

ناظر چاپ: مصطفی جانجانی

لیتوگرافی: ایران گرافیک

چاپ و صحافی: قشقایی

مرکز پخش: قطاع بزرگراه‌های آل‌احمد و دکتر چمران، انتشارات دانشگاه تربیت مدرس، صنلوق پستی: ۱۴۱۱۵-۳۱۸

تلفن: ۸۲۸۸۳۰۹۶

دورنگار: ۸۲۸۸۳۰۳۲

آدرس اینترنتی فروش: pub.Modares.ac.ir

بها: ۶۵۰۰۰۰ ریال

هزینه چاپ صفحات رنگی برعهده نویسندگان بوده است.

مسئولیت صحت مطالب کتاب برعهده نویسندگان است.

فهرست مطالب

| | |
|----|--|
| ک | پیشگفتار..... |
| ۱ | فصل ۱ مقدمه‌ای بر ویرایش ژنومی..... |
| ۲ | ۱-۱ نوترکیبی کری-لاکس..... |
| ۴ | ۲-۱ نوترکیبی هومولوگ و کریسپر/کس۹..... |
| ۵ | ۳-۱ نوکلئازهای انگکت روی..... |
| ۶ | ۴-۱ آنزیم‌های برشی افکتور شبیه فعال‌کننده رونویسی (تالین)..... |
| ۷ | ۵-۱ کریسپر..... |
| ۹ | ۶-۱ سایر روش‌های مهندسی ژنوم..... |
| ۱۴ | ۷-۱ نتیجه‌گیری..... |
| ۱۵ | منابع..... |
| ۱۷ | فصل ۲ کریسپر چیست؟..... |
| ۱۷ | ۱-۲ تاریخچه کریسپر..... |
| ۱۷ | ۲-۲ کریسپر: سامانه ایمنی اکتسابی..... |
| ۲۰ | ۳-۲ مبارزه متقابل: تکامل ژن ضد کریسپر در فاژ..... |
| ۲۱ | ۴-۲ کاربردهای مهندسی ژنوم..... |
| ۲۴ | ۵-۲ استفاده از کریسپر برای کاربردهای غیر از ویرایش ژنوم..... |
| ۲۵ | ۶-۲ چشم‌انداز آینده..... |
| ۲۶ | منابع..... |
| ۳۱ | فصل ۳ اجزای کریسپر/کس۹..... |

ب ویرایش ژنوم با فناوری کریسپر و کاربردهای آن در علوم زیستی

- ۳-۱ اندونوکلاز ۳۱
- ۳-۲ آر.ان.ای راهنمای مصنوعی ۳۳
- ۳-۳ برخی نکته‌های تاریخی ۳۴
- ۳-۴ ملزومات PAM و توسعه کریسپر تا فراتر از SpCas9 ۳۶
- ۳-۴-۱ نیاز به توالی‌های PAM بیشتر ۳۶
- ۳-۴-۲ کس‌های مصنوعی *S. pyogenes* ۳۷
- ۳-۴-۳ شناسایی کس‌های موجود در سایر گونه‌های باکتریایی ۳۸
- ۳-۵ سی.پی.اف.۱: هومولوگی برای کس ۹ ۴۰
- ۳-۵-۱ چگونگی کشف و آزمایش سی.پی.اف.۱ ۴۱
- ۳-۵-۲ مزایای بالقوه سی.پی.اف.۱ نسبت به کس ۹ ۴۲
- ۳-۶ بهبود اختصاصیت برش در سامانه کریسپر/کس ۹ ۴۴
- ۳-۷ القای بیان کس ۹ ۴۷
- ۳-۸ بهبود هدف‌گیری در کریسپر با استفاده از eSpCas9 و SpCas9-HF1 ۴۹
- ۳-۸-۱ مشکل برش غیراختصاصی ۴۹
- ۳-۸-۲ طراحی و آزمایش eSpCas9 ۴۹
- ۳-۸-۳ طراحی و آزمایش SpCas9-HF1 ۵۱
- ۳-۸-۴ پیشرفت‌های آینده ۵۲
- ۳-۹ مزایای استفاده از کریسپر ۵۲
- ۳-۱۰ استفاده از کتابخانه‌های کریسپر برای غربال‌گری ژن‌ها در سطح ژنوم و یافتن مسیرهای زیستی خاص ۵۳
- ۳-۱۱ ویرایش تک‌باز با استفاده از کریسپر ۵۵
- ۳-۱۱-۱ فیورژن پروتئین‌های دی کس ۹ ۵۵
- ۳-۱۱-۲ ویرایش بازی دی کس ۹ نیکاز ۵۶
- ۳-۱۱-۳ آینده ویرایش بازی ۶۰
- منابع ۶۲
- فصل ۴ استفاده از کریسپر در مطالعات مهندسی ژنوم ۶۷
- ۴-۱ از کجا شروع کنیم ۶۷

- ۶۷-۲- انتخاب دست‌کاری ژنتیکی موردنظر.....
- ۶۹-۳- انتخاب سامانه بیانی.....
- ۷۲-۴- انتخاب توالی هدف و طراحی جی.آر.ان.ای.....
- ۷۲-۴-۱- آگاهی از رده سلولی و توالی ژنومی موردنظر.....
- ۷۲-۴-۲- انتخاب ژن و عوامل ژنتیکی موردنظر برای دست‌ورزی.....
- ۷۳-۴-۳- انتخاب جی.آر.ان.ای‌ها براساس فعالیت اختصاصی و غیراختصاصی آنها.....
- ۷۵-۴-۴- سنتز و کلون‌کردن جی.آر.ان.ای‌های موردنظر.....
- ۷۶-۵- انتقال گس ۹ و جی.آر.ان.ای به سلول‌های هدف.....
- ۷۶-۶- تأیید صحت تغییر ژنتیکی صورت گرفته.....
- ۷۸-۷- انتخاب نوع گس ۹ در مطالعات کریسپر.....
- ۷۹-۴-۷-۱- ترمیم برش‌های حاصل از گس ۹ به‌وسیله اتصال دو انتهای غیرهمسان.....
- ۷۹-۴-۷-۱-۱- ناک-اوت‌کردن ژنتیکی با استفاده از SpCas9 استاندارد.....
- ۸۰-۴-۷-۱-۲- اهمیت اختصاصی و در نظر گرفتن واریانت‌های گس ۹ با اختصاصیت بالا.....
- ۸۱-۴-۷-۱-۳- راه‌حل‌های جایگزین در صورت عدم وجود PAM 5'NGG'3.....
- ۸۱-۴-۷-۱-۳-۱- گس ۹‌های سنتتیک با قابلیت تشخیص توالی‌های PAM جدید.....
- ۸۲-۴-۷-۱-۳-۲- گس ۹‌های با منشأ غیر از *S. pyogenes*.....
- ۸۲-۴-۷-۱-۳-۳- سی.پی.اف.۱، اندونوکلاز کریسپر غیرگس ۹.....
- ۸۳-۴-۷-۲- فعال‌سازی و سرکوب ژن‌های هدف با استفاده از گس ۹.....
- ۸۴-۴-۷-۲-۱- سرکوب‌کردن ژن‌های هدف با استفاده از سرکوب‌کننده‌های مبتنی بر دی‌گس ۹.....
- ۸۴-۴-۷-۲-۲- فعال‌سازی ژن‌های هدف با استفاده از فعال‌کننده‌های مبتنی بر دی‌گس ۹.....
- ۸۵-۴-۷-۳- مراحل بعد از انتخاب گس ۹.....
- ۸۵-۴-۷-۳-۱- طراحی یا انتخاب یک جی.آر.ان.ای.....
- ۸۵-۴-۷-۳-۲- انتخاب سامانه بیانی و روش انتقال.....
- ۸۶-۴-۷-۳-۳- بررسی تعیین صحت ویرایش ژنومی انجام‌شده.....
- ۸۶-۴-۷-۳-۳-۱- استفاده از گس ۹ برای ناک-اوت‌کردن ژن‌ها از طریق اتصال دو انتهای غیرهمسان.....
- ۸۸-۴-۷-۱-۱- اتصال دو انتهای غیرهمسان.....
- ۸۹-۴-۷-۲-۱- ترمیم شکاف‌های حاصل از گس ۹ به‌وسیله اتصال دو انتهای غیرهمسان.....

- ۹-۴-۹ ویرایش ژنومی با ترمیم به روش همسانی..... ۹۲
- ۹-۴-۱۰ مکانیسم‌هایی برای ترمیم شکستگی‌های دورشته‌ای دی.ان.ای..... ۹۲
- ۹-۴-۲ ترمیم برش‌های دورشته‌ای و مهندسی ژنوم..... ۹۵
- ۹-۴-۱-۲ ملاحظات کلی برای طراحی یک الگوی ترمیمی جهت ایجاد جهش..... ۹۵
- ۹-۴-۲-۲ در نظر گرفتن مناسب‌ترین الگو: دی.ان.ای پلاسمید یا الیگونوکلیوتیدهای تک رشته‌ای پیش‌فرض؟..... ۹۷
- ۹-۴-۱۰ استفاده از نیکازهای گس ۹ برای افزایش اختصاصیت..... ۹۸
- ۹-۴-۱۱ نحوه طراحی جی.آر.ان.ای برای ویرایش ژنوم از طریق کریسپر..... ۱۰۰
- ۹-۴-۱۱-۱ ملاحظات مهم پیش از شروع کار با کریسپر..... ۱۰۰
- ۹-۴-۱۱-۱-۱ ناکی-اوت زن از طریق اتصال دو انتهای غیرهمسان..... ۱۰۰
- ۹-۴-۱۱-۲ ویرایش از طریق ترمیم همسانی..... ۱۰۱
- ۹-۴-۱۱-۳ فعال‌سازی و یا جلوگیری از بیان ژن از طریق CRISPRa و CRISPRi..... ۱۰۲
- ۹-۴-۱۱-۲ پیش‌بینی فعالیت اختصاصی جی.آر.ان.ای..... ۱۰۳
- ۹-۴-۱۱-۳ کاهش اثرات غیراختصاصی..... ۱۰۴
- ۹-۴-۱۱-۴ کتابخانه‌های حاوی مجموعه‌ای از جی.آر.ان.ای‌ها برای کل ژنوم..... ۱۰۷
- ۹-۴-۱۱-۵ جی.آر.ان.ای‌های معتبر..... ۱۰۸
- ۹-۴-۱۱-۶ ویژگی‌های پایگاه اطلاعات جی.آر.ان.ای‌های معتبر..... ۱۰۹
- ۹-۴-۱۱-۷ روش‌های انتقال..... ۱۱۰
- ۹-۴-۱۱-۸ نتیجه‌گیری..... ۱۱۱
- ۹-۴-۱۲ بررسی صحت انجام ویرایش ژنومی..... ۱۱۲
- ۹-۴-۱۲-۱ شمای کلی..... ۱۱۲
- ۹-۴-۱۲-۲ آزمون برش عدم تطابق برای تشخیص حذف/اضافه‌های کوچک..... ۱۱۳
- ۹-۴-۱۲-۳ تشخیص ترمیم انجام‌شده از طریق ترمیم همسانی..... ۱۱۵
- ۹-۴-۱۲-۴ انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمرز برای تشخیص جهش‌های حذفی..... ۱۱۷
- ۹-۴-۱۲-۵ توالی‌یابی نسل جدید برای تعیین صحت ویرایش‌ها و تشخیص اثرات غیراختصاصی..... ۱۱۷
- ۹-۴-۱۳ روش‌های توالی‌یابی برای تعیین ژنوتیپ کریسپر..... ۱۱۸
- ۹-۴-۱۳-۱ کافی نبودن آزمون‌های مرسوم تأیید صحت..... ۱۱۸

پیشگفتار

در دهه‌های گذشته، نوآوری‌های شاخصی سبب تحول و انقلاب در علوم مختلف شده است. در حوزه علوم زیستی پس از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز، ابداع فناوری کریسپر را می‌توان مهم‌ترین تحول در این حوزه دانست. فناوری کریسپر پس از معرفی در سال ۲۰۱۲ به‌عنوان یک ابزار قدرتمند ویرایش ژنوم به‌طور بسیار گسترده‌ای مورد توجه قرار گرفت که کاربردهای گوناگون و امیدبخشی را به‌ویژه در حوزه درمانی به همراه داشته است.

با توجه به اهمیت روزافزون مباحث ویرایش و مهندسی ژنوم در دنیا و به تبع آن در ایران و نیز عدم وجود منابع علمی و تخصصی بدون قارسی در این زمینه در کشور، اقدام به تدوین کتاب حاضر شد. در این کتاب سعی شده است تا در حد امکان به معرفی و تشریح جنبه‌های مختلف این فناوری پرداخته شود. چارچوب اصلی کتاب حاضر از کتاب مبانی و راهنمای عملی کریسپر (CRISPR Desktop Resource, 2017) گرفته شده که با استفاده از سایر منابع علمی جدید، سعی در به‌روز کردن مطالب آن متناسب با کاربردهای توسعه‌یافته شده است. در فصل‌های مختلف این کتاب به‌ترتیب به شرح مبانی، روش‌ها و کاربردهای این فناوری و نیز در انتها به جنبه‌های ایمنی زیستی آن پرداخته شده است. رویکرد ارائه مباحث در این کتاب به‌گونه‌ای است که در هر بخش به تناسب و تا حدی به صورت مجزا به ارائه مقدمه مختصری از مبحث ویرایش ژنوم و سپس مطالب مربوط به آن بخش پرداخته می‌شود. بنابراین مخاطب می‌تواند بدون نیاز به مطالعه کتاب از آغاز، به مطالعه بخش مورد نظر خود بپردازد. با توجه به گستردگی منابع لاتین و لزوم رجوع خوانندگان به این منابع سعی شد تا در این کتاب، واژه‌های معادل به شکل زیرنویس و در انتهای کتاب به صورت واژه‌نامه ارائه شوند.

بی‌تردید به‌رغم تلاش فراوان نگارندگان در جهت ارائه بدون اشکال کتاب، نقص و کاستی‌هایی در کتاب وجود خواهد داشت که از دید متخصصان و پژوهشگران محترم پوشیده

ل ویرایش ژنوم با فناوری کریسپر و کاربردهای آن در علوم زیستی

نخواهد بود. از این رو پیشنهادها و رهنمودهای سازنده در این رابطه از سوی خوانندگان محترم به برطرف کردن نقایص کتاب در ویرایش‌های آینده کمک خواهد کرد.

امید است این کتاب بتواند در جهت آشنایی و به‌کارگیری اصول پایه و اساسی مهندسی ژنوم و کاربردهای آن در حوزه‌های مختلف علوم زیستی مورد استفاده دانش‌پژوهان و پژوهشگران کشور قرار گیرد.

www.ketab.ir