



Targeted Genome Editing Techniques and its Bioinformatic Tools: A Survey

ARTICLE INFO

Article Type

Analytic Review

Authors

Emamjomeh A.A.^{*1} PhD,
Adim H.² MSc,
Zahiri J.³ PhD

How to cite this article

Emamjomeh A.A, Adim H, Zahiri J. Targeted Genome Editing Techniques and its Bioinformatic Tools: A Survey. Modares Journal of Biotechnology. 2019;10(2):263-286.

¹Bioinformatics Department, Basic Science Faculty, University of Zabol, Zabol, Iran

²North Khorasan Agricultural & Natural Resources Research Center, North Khorasan Agricultural and Natural Resources Research Center (AREEO), Bojnurd, Iran

³Biophysics Department, Biological Sciences Faculty, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

*Correspondence

Address: Agriculture Faculty, University of Zabol, Zabol, Iran. Postal Code: 9861335856
Phone: +98 (54) 31232146
Fax: +98 (54) 31232100
aliemamjomeh@uoaz.ac.ir

Article History

Received: January 29, 2018

Accepted: February 21, 2018

ePublished: June 20, 2019

ABSTRACT

Genome editing using targetable nucleases is an emerging technology for precise genome modification in many organisms with high ability and capability. All targeted genome engineering relies on the introduction of a site-specific double-strand break (DSB) in a pre-determined genomic locus by a rare-cutting DNA endonuclease. Subsequent repair of this DSB by non-homologous end joining (NHEJ) or homology-directed repair (HDR) generates the desired genetic modifications such as gene disruption, gene insertion, gene correction, etc. Three types of endonucleases, namely ZFNs (zinc finger nucleases), TALENs (transcription activator-like effector nucleases), and the CRISPR (clustered regularly interspersed short palindromic regions) associated (Cas9) system have been predominantly utilized for gene editing. Targeted genome engineering or editing enables researchers to modify genomic loci of interest in a precise manner, which has a turning point in medicine, biological research, and biotechnology. Treatment of human immunodeficiency virus (HIV) infection with ZFN-mediated CCR5 gene disruption is one of the indicator examples of the ability of ZFNs in genome editing. The emergence of TALENs in 2010 has enabled the genome modification of non-model organisms, while the emergence of the CRISPR/Cas9 system in 2013 as a revolutionary genome-editing tool has allowed us to anticipate the forthcoming new era of genome editing research. Soon, it is likely that genome editing also will provide the possibility of treating genetic diseases. Genome editing is also hoped to be available for use in the generation of crops and livestock with useful traits. An example would be the production of edible fungi resistant to browning by inactivation of the genes encoding polyphenol oxidase in 2016 under the non-GMO genetically edited crop plants and production of herbicide-resistant rice and rapeseed using CRISPR/Cas9 systems. In this article, we review essential genome editing tools, summarize their applications in crop improvement, as well as, next-generation crop breeding and their computational resources will be discussed.

Keywords Algorithm

CITATION LINKS

[1] Advances ... [2] Engineering ... [3] Genome ... [4] A widely ... [5] Cas9 as ... [6] Repetitive ... [7] Hybrid ... [8] DNA ... [9] FokI ... [10] Development ... [11] New restriction ... [12] Enhancing ... [13] Homologous ... [14] DNA ... [15] Pathways ... [16] The mechanism ... [17] Double ... [18] Using ... [19] Programmable ... [20] The discovery ... [21] Redesigning ... [22] An improved ... [23] Unexpected ... [24] Revealing ... [25] Requirements ... [26] FokI ... [27] Design ... [28] An online ... [29] Codon ... [30] Expanding ... [31] Zinc ... [32] Selection ... [33] Zinc ... [34] TAL effectors ... [35] Breaking ... [36] A simple ... [37] Differential ... [38] A large ... [39] TALE ... [40] Efficient ... [41] A transcription ... [42] Engineering ... [43] FLASH ... [44] Nucleotide ... [45] CRISPR ... [46] RNA-guided ... [47] Evolution ... [48] Diverse ... [49] A programmable ... [50] RNA-guided ... [51] Multiplex ... [52] Intervening ... [53] CRISPR ... [54] CRISPR ... [55] The CRISPR/Cas ... [56] CRISPR ... [57] Small ... [58] Crystal ... [59] Cas9-crRNA ... [60] A Cas9-guide ... [61] Structures ... [62] Type ... [63] Application ... [64] Diversity ... [65] DNA ... [66] Cas9 ... [67] DNA ... [68] High ... [69] Genome ... [70] High ... [71] Rationally ... [72] GUIDE ... [73] Digenome ... [74] Improving ... [75] Double ... [76] Efficient ... [77] Genome ... [78] Dimeric ... [79] Fusion ... [80] Cpf1 ... [81] The crystal ... [82] The CRISPR ... [83] Non-viral ... [84] Therapeutic ... [85] A robust ... [86] Large ... [87] Mutational ... [88] DNA ... [89] Targeted ... [90] The Global ... [91] Opportunities ... [92] Nat ... [93] Recent ... [94] Repurposing ... [95] CRISPR ... [96] RNA-guided ... [97] Beyond ... [98] Demonstration ... [99] Targeted ... [100] Targeted ... [101] TALEN ... [102] Biosynthesis ... [103] Simultaneous ... [104] Improved ... [105] Improving ... [106] Conferring ... [107] CRISPR ... [108] Point ... [109] High ... [110] Targeted ... [111] Cheating ... [112] Novel ... [113] CRISPR ... [114] Gene ... [115] Genetic ... [116] CRISPR ... [117] Perspectives ... [118] CRISPR ... [119] A simple ... [120] A CRISPR ... [121] Characteristics ... [122] ge-CRISPR ... [123] Rational ... [124] WU-CRISPR ... [125] Unraveling ... [126] CRISPRseek ... [127] A fast ... [128] COSMID ... [129] Cas9-chromatin ... [130] CasFinder ... [131] E-CRISPR ... [132] CHOPCHOP ... [133] ZiFiT ... [134] CasOT ... [135] A high ... [136] CRISPR ... [137] ARGOS8 ... [138] Engineering ... [139] Development ... [140] Advances ... [141] Gene ... [142] Applications ... [143] Scientific ... [144] Precise ... [145] Towards ... [146] Gene ... [147] CRISPR ... [148] Not all predicted ... [149] CRISPR ... [150] Genome ... [151] CRISPR ... [152] CRE ... [153] Cas ... [154] Guide ... [155] CRISPRAnalyzeR ... [156] CRISPRtools ... [157] ANNOgesic ... [158] SAVE ... [159] A fast ... [160] PhytoCRISPR ... [161] Evaluation ... [162] CRISPRdigger ... [163] BATCH ... [164] Characterizing ... [165] CRISPR ... [166] Breaking ... [167] CT-Finder ... [168] Scalable ... [169] CRISPR ... [170] CRISPy ... [171] CRISPRDetect ... [172] EuPaGDT ... [173] Sequence ... [174] Cas ... [175] CRISPR ... [176] CRISPR ... [177] CCTop ... [178] CRISPResso ... [179] CRISPRscan ... [180] Flexible ... [181] CRISPR ... [182] CRISPR ... [183] CRISPRdirect ... [184] Highly ... [185] GT-Scan ... [186] sgRNACas9 ... [187] SSFinder ... [188] Genome ... [189] Easy ... [190] Crass ... [191] A guide ... [192] Cpf1 ... [193] Anti ... [194] GenomeCRISPR ... [195] PICKLES ... [196] IMG/M ... [197] Cas ... [198] Identification ... [199] grID ... [200] CRISPRz ... [201] WGE ... [202] CrisprGE ... [203] EENdb ... [204] CRISPI ... [205] SAPTA ... [206] TALENoffer ... [207] E-TALEN ... [208] Mojo ... [209] Rapid ... [210] A library ... [211] ZFN ... [212] Zinc ... [213] ZiFiBASE ...

مرور جامعی بر تکنیک‌های ویرایش هدفدار ژنوم و ابزارهای بیوانفورماتیکی آن

عباسعلی امام جمعه* PhD

گروه بیوانفورماتیک، دانشکده علوم پایه، دانشگاه زابل، زابل، ایران

حسین ادیم MSc

مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی خراسان شمالی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، بجنورد، ایران

جواد ظهیری PhD

گروه بیوفیزیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

چکیده

مهندسی هدفدار ژنوم تغییر دقیق ژنوم در بسیاری از موجودات زنده با استفاده از نوکلئازهای مهندسی شده که امروزه به عنوان یک تکنولوژی نوظهور با قابلیت و قدرت بالا مطرح شده، است. همه ابزارهای مهندسی ژنوم مبتنی بر ایجاد شکست دورشته‌ای (DSBs) در جایگاه هدف و سپس ترمیم متعاقب آن از طریق یکی از دو مسیر نوترکیبی همولوگ (HDR) یا اتصال انتهای غیرهمولوگ (NHEJ) هستند که از این طریق قادرند تا تغییرات ژنتیکی مورد نظر و دلخواه را ایجاد کنند. ابزارهای اصلی ویرایش ژنوم شامل اندونوکلئازهای انگشت‌روی (ZFNs)، اندونوکلئازهای افکتور شبه‌فعال‌کننده رونویسی (TALENs) و سیستم کریسپرکاس (Crispr/Cas9) هستند. این قبیل ابزارها با ایجاد تغییرات دقیق در اطلاعات ژنتیکی برای اهداف مختلف، تحول بزرگی را در علوم مختلف به خصوص پزشکی، تحقیقات بیولوژیک و بیوتکنولوژی ایجاد نموده‌اند. بهبود بیماری نقص ایمنی اکتسابی (AIDS) از طریق تخریب ژن *CCR5* با میانجی‌گری ZFN یکی از مثال‌های شاخص به منظور نشان دادن قابلیت بالای ZFNs در ویرایش ژنوم است. تغییر ژنوم در موجودات زنده غیرمدل با پیدایش TALENs در سال ۲۰۱۰ امکان پذیر شد. سپس در سال ۲۰۱۳، سیستم CRISPR/Cas9 باعث شد تا دوره جدیدی از تحقیقات مربوط به ویرایش ژنوم آغاز شود، به طوری که از آن به عنوان انقلابی در بیولوژی یاد می‌شود. همچنین به زودی ویرایش ژنوم امکان درمان بیماری‌های ژنتیکی را نیز فراهم خواهد آورد. چشم‌انداز ویرایش ژنوم در تولید محصولات و دام‌های با ویژگی‌های مفید نیز امیدبخش است. به عنوان مثال می‌توان به تولید قارچ خوراکی مقاوم به قهوه‌ای شدن اشاره نمود، که این محصول با غیرفعال کردن ژن‌های کدکننده پلی‌فنول اکسیداز تولید شده است. تولید کلزا و برنج مقاوم به علفکش با سیستم CRISPR/Cas9 نیز از این موارد است. این قبیل محصولات تحت عنوان محصول ویرایش‌شده‌ای که تراریخته (GMOs) نیستند، شناخته شده‌اند. در این مرور به ابزارهای اصلی ویرایش ژنوم، خلاصه‌ای از کاربرد آنها در بهبود محصولات زراعی و نسل آینده اصلاح گیاهان زراعی و منابع اصلی محاسباتی آنها پرداخته خواهد شد.

کلیدواژه‌ها: الگوریتم، پایگاه داده، تکنیک‌های ویرایش ژنوم، نرم‌افزار، ویرایش هدفدار ژنوم

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۱۱/۹

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۱۲/۲

* نویسنده مسئول: aliimamjomeh@uoz.ac.ir

مقدمه

ویرایش هدفدار ژنوم از طریق ایجاد تغییرات دقیق در اطلاعات ژنتیکی برای اهداف مختلفی مانند مطالعه کارکرد ژن، مکانیزم‌های بیولوژیکی و آسیب‌شناسی بیماری‌ها به کار می‌رود. این روش‌ها برخلاف روش‌های جهش‌زایی تصادفی که فنوتیپ‌های غیرقابل پیش‌بینی را ایجاد می‌نمایند، محققین را قادر ساخته تا تغییرات مورد نظر خود را به صورت هدفدار ایجاد نمایند. تغییرات مورد نظر شامل جهش‌زایی هدفدار ژن، درج و جایگزینی هدفدار ژن، سرکوب یا فعال کردن بیان ژن و بازآرایی کروموزومی به صورت هدفدار است.

به طور کلی ویرایش هدفدار ژنوم مبتنی بر ایجاد شکست‌های دورشته‌ای (DSBs) اختصاصی جایگاه در ژن هدف به وسیله اندونوکلئازهای مهندسی شده و سپس ترمیم نهایی این شکست‌های دورشته‌ای به وسیله نوترکیبی همولوگ (HDR) یا اتصال انتهای غیرهمولوگ (NHEJ) است که تغییرات ژنتیکی مورد نظر و دلخواه را ایجاد می‌کنند^[1]. سازوکار نوترکیبی همولوگ سلول به طور طبیعی از اطلاعات مندرج در DNA کروماتید خواهری به عنوان الگو برای ترمیم شکست استفاده می‌کند. در حالی که در سازوکار اتصال انتهای غیرهمولوگ، حذف یا درج‌های کوچک منجر به جهش‌های تغییر چارچوب و در نهایت تخریب ژن می‌شوند^[2].

سه کلاس اصلی از اندونوکلئازها شامل اندونوکلئازهای انگشت‌روی (ZFNs)^[3]، اندونوکلئازهای افکتور شبه‌فعال‌کننده رونویسی (TALENs)^[4] و سیستم کریسپر (Crispr/Cas9)^[5] به عنوان ابزارهای اصلی در مهندسی ژنوم مطرح هستند:

۱- نوکلئازهای انگشت‌روی (ZFNs)

اولین موتیف انگشت‌روی که دارای تمایل اتصال ویژه به DNA بود به عنوان قسمتی از فاکتور نسخه‌برداری TFIIIA در زئوپوس توسط میلر در ۱۹۸۵ کشف شد^[6]. با این وجود ZFNs تاریخچه کوتاه‌تری دارند، به طوری که ۱۵ سال پس از میلر، اولین نوکلئاز انگشت‌روی اختصاصی کشف شد^[7]. موتیف Cys2 Hys2 فراوان‌ترین موتیف متصل به DNA در ژنوم انسان است. در این موتیف، هر دمین انگشت‌روی شامل ۳۰ اسیدآمینه است که از دو صفحه بتا موازی ناهمسو مقابل یک آلفاهلیکس تشکیل شده است و یک اتم روی دارد که با دو اسیدآمینه سیستئین و دو اسیدآمینه هیستیدین (Cys2 Hys2) پیوند غیرکووالان برقرار می‌کند^[8]. در ZFNs جایگاه اتصال به DNA متشکل از سه یا چهار مائول با یک ساختار انگشت‌روی است. یک ماریپیج آلفا در هر دمین انگشت‌روی، یک توالی اختصاصی سه‌تایی از DNA را شناسایی می‌کند^[6,8]. بنابراین یک جایگاه هدف با سه مائول قادر به شناسایی ۹ جفت‌باز است. همچنین با توجه به ویژگی مائولاریتی می‌توان دمین‌های انگشت‌روی (ZF) را برای اتصال به مناطق از پیش تعیین شده توالی DNA در جایگاه ژنومی مورد علاقه به صورت هدفدار طراحی نمود^[9,3]. اگرچه اثرات هم‌افزایی مائول‌های مجاور بر هم دیگر پیش‌بینی کارایی واقعی هر ZFNs طراحی شده را مشکل می‌کند^[10].

موتیف ZFNs شامل یک پروتئین انگشت‌روی متصل به دمین برش‌دهنده آنزیم محدودکننده FokI هستند که در ابتدا به عنوان آنزیم‌های محدودکننده شیمیر نام‌گذاری و بعد ZFNs نام گرفت (شکل ۱). آنزیم FokI در سال ۱۹۸۱ کشف شد و کارکرد آن به صورت همودایمر است^[11]. دمین‌های آنزیم FokI که شامل دمین شناسایی و دمین برش است در جایگاه هدف، برش ایجاد می‌کنند^[3].

سلول‌های یوکاریوتیک بعد از برش با میانجی‌گری ZFN، دو مسیر را برای ترمیم شکست انتخاب می‌کنند. مسیر اول نوترکیبی همولوگ است که در آن با توجه به این که برش ناشی از آنزیم منجر به ازدست‌رفتن قسمتی از اطلاعات در ناحیه برش می‌شود، توالی‌های ازدست‌رفته در منطقه آسیب‌دیده با سازوکار کپی و چسبانیدن با استفاده از اطلاعات مندرج در DNA کروماتید خواهری به طور کامل برگشت داده می‌شود. مسیر دوم اتصال

۱-۱- اختصاصیت ZFNs

به‌طور کلی پروتئین‌های متصل‌شونده به DNA نه فقط قابلیت اتصال به جایگاه‌های هدف با تمایل بالا بلکه قابلیت اتصال به جایگاه‌های مشابه یا جایگاه‌های خارج از هدف با تمایل کمتر را نیز دارند. در این حالت اثرات خارج از هدف منجر به جهش‌های ناخواسته و سمیت می‌شود^[24]. بنابراین برای ویرایش دقیق ژنوم انتخاب نوکلئازهای هدفدار با اختصاصیت بالا بسیار اهمیت دارد. در این خصوص با توجه به این که دمین‌های نوکلئاز FokI برای ایجاد برش باید به‌صورت دایمر باشند، بنابراین برای شکل‌گیری نوکلئازهای عملکردی انگشت‌روی باید دو مولکول ZFN متصل به DNA هدف در فاصله نزدیک و جهت‌گیری مناسبی نسبت به هم باشند^[25]. همچنین اختصاصیت به مقدار زیادی بستگی به اتصال درست دو ZFNs به نیم‌جایگاه‌ها با جهت‌گیری و فاصله مناسب از یکدیگر دارد که به دمین‌های FokI اجازه دایمر شدن و برش توالی مابین خود را می‌دهند^[26].

روش‌های مختلفی به‌منظور افزایش اختصاصیت و کاهش سمیت ایجاد شده‌اند. به‌عنوان مثال استفاده از آرایه‌های چندتایی انگشت‌روی می‌تواند منجر به اتصال به DNA با تمایل بالاتر شود^[27]. در یک بررسی که برش‌های هدف و غیرهدف با سه و چهار جفت انگشت‌روی ایجاد شد، مشخص شد که ZFN با چهار جفت انگشت، برش‌های هدف بالاتر و خارج از هدف پایین‌تری را ایجاد نماید^[28]. هرچند که دمین‌های بیشتر همیشه نمی‌تواند اختصاصیت بیشتر را تضمین کند. به‌عنوان مثال مقدار بالایی از برش خارج از هدف در سلول‌های موش با ZFNs با پنج جفت انگشت مشاهده شد^[29]. تغییر طول رابط بین دمین‌های انگشت‌روی و دمین FokI منجر به تغییر در نیاز فضایی در نیم‌جایگاه می‌شود که این امر نیز می‌تواند قرارگرفتن جایگاه‌های برش هدف و غیرهدف را تحت تاثیر قرار دهد^[30]. علاوه بر این برای به حداقل رساندن برش‌های خارج از هدف می‌توان واریانتهایی از آنزیم FokI ایجاد نمود که تنها ساختار هتروداایمر تشکیل دهند و همودایمرهای حاصل از آن ناپایدار باشند^[26]. مشخص شده است که همودایمرها عملاً به‌طور غیرمتناسبی دارای فعالیت در جایگاه‌های خارج از هدف هستند. بنابراین یک راهکار برای افزایش اختصاصیت جلوگیری از ایجاد همودایمرها است^[22]. گزینه دیگر برای کاهش فعالیت خارج از هدف، استفاده از آنزیم‌هایی است که فقط درز ایجاد می‌کنند. نشان داده شده است که ZFNickases می‌تواند مسیر HDR را در جایگاه هدف تحریک کند. در این حالت با فعالیت آنزیمی یکی از مونومرها، یک درز ایجاد می‌شود و سلول برای ترمیم آن در بیشتر موارد از سازوکار نوترکیبی همولوگ استفاده می‌کند^[18]. در نیکازهای انگشت‌روی، فعالیت کاتالیتیکی یکی از دمین‌های آنزیم از دست رفته است اما این امر تاثیری بر فرآیند دایمریزاسیون ندارد.

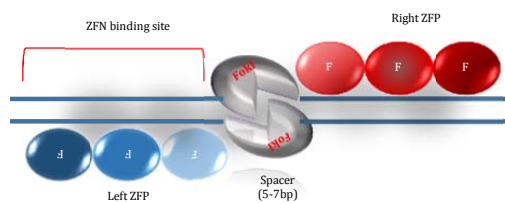
۱-۲- روش‌های طراحی ZFs

روش‌های مختلفی برای طراحی و ساخت پروتئین‌های انگشت‌روی وجود دارد. سرهم‌بندی ماژولار شیوه ساده برای اغلب محققین است که در آن دمین‌های انگشت‌روی اختصاصی به‌صورت جداگانه برای هر توالی سه‌تایی ساخته شده و سپس به هم متصل می‌شوند^[31]. این روش بر این اساس استوار است که هر ماژول به‌طور مستقل از ماژول‌های مجاور به جایگاه شناسایی خود متصل می‌شود که این امر اجازه تولید انگشت‌های جداگانه‌ای را می‌دهد که هر کدام از آنها قادر به اتصال به هر یک از ۶۴ تریپلت ممکن را

انتهاهای غیرهمولوگ (NHEJ) است که مستعد خطا است و اغلب باعث اضافه‌شدن یا حذف‌های کوتاه (InDel) تعداد کمی جفت‌باز (۱۰ تا ۲۰ جفت‌باز) در ناحیه شکست می‌شود^[12].

در گیاهان فراوانی مسیر ترمیم HDR^{۱۰۰-۱۰۰} برابر کمتر از مسیر NHEJ است^[13]. همچنین مسیر HDR فقط طی فاز S/G2 از تقسیم سلولی رخ می‌دهد که کروماتیدهای خواهری به‌عنوان الگو برای ترمیم قسمت آسیب‌دیده حضور دارند. بنابراین کارایی مسیر HDR به‌خصوص در سلول‌های تقسیم‌شده کمتر از مسیر NHEJ است^[14]. در مقابل مسیر NEH در سلول‌های در حال تقسیم یا تقسیم‌شده فعال است و به‌طور غیراختصاصی منجر به حذف و اضافه در ژن‌ها و برهم‌زدن چارچوب خواندن می‌شود^[15]. همچنین اجزای اصلی درگیر در مسیر ترمیم NHEJ شامل پروتئین‌های Ku، DNA-PKcs، کمپلکس Artemis:DNA-PKcs، Pol، Pol mu، lambda و پلی‌نوکلئوتیدکیناز (PNK)^[16] و در مسیر HDR شامل Rad51 و RecA هستند^[17].

ویرایش ژن‌ها را بدون وابستگی به مسیرهای NHEJ و HDR از طریق جایگزینی بازی نیز می‌توان انجام داد. در سیستم ویرایش باز از طریق ادغام سیتیدین دآمیناز به dCas9 از طریق جایگزینی سیتوزین با تیمین می‌توان با دقت و کارایی بالا در جایگاه هدف جهش نقطه‌ای ایجاد نمود. در این سیستم که اخیراً ایجاد شده نیازی به شکست‌های دورشته‌ای و رشته الگوی دهنده ندارد و بنابراین پتانسیل بالایی برای اصلاح ژن‌ها در سلول‌های گیاهی و جانوری دارد^[18, 19] (شکل ۱).



شکل ۱ ساختار ZFN: یک ZFN شامل مونومرهای راست و چپ که هر کدام از آنها به‌طور معمول شامل سه تا چهار پروتئین انگشت‌روی (ZFPs) و آنزیم محدودکننده FokI که DNA را هنگام تشکیل دایمر برش می‌دهد، است. هر ZFP یک توالی اختصاصی سه‌تایی از DNA را شناسایی می‌کند.

در مهره‌داران تقریباً ۲٪ از ژن‌های کدکننده پروتئین‌ها دربردارنده دمین‌های C₂H₂ هستند که قابلیت اتصال به دامنه وسیعی از توالی‌های نوکلئوتیدی را دارد^[20]. بنابراین این دمین‌ها اهداف بالقوه‌ای برای طراحی پروتئین‌های متصل به DNA که به جایگاه‌های تعریف‌شده مورد نظر متصل می‌شوند، هستند. مشخص شده است ZFs می‌توانند طوری مهندسی شوند که اختصاصیت آنها تغییر کند^[21]. بنابراین روش‌های مختلفی برای مهندسی اختصاصیت اتصال ZFs ایجاد شدند. همچنین یکی از جنبه‌های مهم در استفاده از نوکلئازهای انگشت‌روی اختصاصیت آنها است که از طریق ایجاد برش در جایگاه‌های غیرهدف موجب ایجاد جهش‌های ناخواسته و به بیان دیگر باعث ایجاد سمیت می‌شود^[22]. علاوه بر جهش‌های ناخواسته، در دمین‌های انگشت‌روی به‌دلیل اثرات وابسته به محتوی بیرونی و درونی انگشت‌های مجاور که کارایی و اختصاصیت آن را تحت تاثیر قرار می‌دهد ظرفیت محدودی را در هدف قراردادن هر توالی از DNA را دارند^[23].

مهندسی ژنوم TALENs یک نوع پروتئین ترکیبی شامل افکتور TAL و دمین برش اندونوکلاز FokI به‌صورت دایمر است، که از آن به‌منظور برش در جایگاه هدف استفاده می‌شود. هر تکرار در TALENs شامل ۳۰ تا ۳۵ اسیدآمینه است که هر کدام یک نوکلئوتید خاص را شناسایی می‌کند و با توجه به این که آخرین تکرار تنها ۲۰ اسیدآمینه دارد به آن نیم‌تکرار گفته می‌شود [35, 36]. اندازه سازه TALENs به‌طور معمول بزرگ است (بیش از ۵ کیلوگفت‌باز) که این موضوع از نظر قرارگرفتن در ناقل‌های مشخص محدودیت ایجاد نماید [37] (شکل ۲).

۲-۱- اختصاصیت TALENs

بسیاری از بررسی‌ها نشان می‌دهد TALENs فعالیت ویرایشی بیشتر و سمیت کمتر و به بیان دیگر اختصاصیت بیشتر و اثرات خارج از هدف کمتری را نسبت به ZFNs دارد [38]. در این سیستم هر تکرار با یک باز اثر متقابل داشته و اختصاصیت آن به‌وسیله RVDs تعیین می‌شود [36]. با توجه به این که FokI به‌صورت دایمر عمل می‌کند، اتصال دو TALENs به دو نیم‌جایگاه با جهت‌گیری و فاصله مناسب از یکدیگر عامل مهمی در اختصاصیت است [26]. همچنین می‌توان از طریق تولید TALENickases با ایجاد هترودایمرهایی از FokI که در آن جایگاه کاتالیتیک یکی از مونومرها دچار جهش شده، اثرات خارج از هدف را کاهش داد [39].

۲-۲- روش‌های ساخت TALENs

در مقایسه با ZFs کدهای شناسایی TALENs ساده‌تر بوده و فاقد وابستگی به هر نوع اثرات وابسته به زمینه است. به‌دلیل وجود رابطه ساده یک به یک بین هر RVD و نوکلئوتید مورد نظر، دمین‌های TALE به‌آسانی می‌توانند طراحی شوند [35, 36].

۲-۲-۱- سرهم‌بندی مبتنی بر همسانه‌سازی به روش گلدن گیت

(Golden Gate Cloning-Based Assembly)

در این روش از آرشیوی از واحدهای تکراری TALE، آنزیم‌های محدودکننده نوع دو که جایگاه برش و اتصال متفاوتی دارند و DNA لیگاز استفاده می‌شود [40]. ترکیب این آنزیم‌ها و مجموعه مناسبی از پلاسمیدها قادر است دو تا ۱۰ تکرار را در یک واکنش با یک نظم تعریف‌شده متصل کند. از میان روش‌های مختلف ساخت TALENs این روش ساده، سریع و ارزان بوده و به‌وسیله بسیاری از محققین استفاده می‌شود [40].

۲-۲-۲- سرهم‌بندی مبتنی بر PCR به روش گلدن گیت

(Golden Gate PCR-Based Assembly)

در این روش واحدهای تکراری ابتدا با استفاده از چهار پلاسمید تکثیر می‌شوند. هر کدام از این پلاسمیدها، کدکننده یکی از واحدهای تکراری HD, NI, NG و NN هستند که به‌ترتیب نوکلئوتیدهای G, T, A و C را به‌طور اختصاصی شناسایی می‌کنند و توسط پرایمرهای مناسب تکثیر می‌شوند [41]. اختصاصی بودن چهار RVD باعث می‌شود تا بتوان از آنها برای ساخت TAL افکتورهای مصنوعی به‌منظور هدف قراردادن توالی مورد نظر استفاده نمود. قطعات تکثیرشده تخلیص می‌شوند و سپس در اولین مرحله با روش همسانه‌سازی به روش گلدن گیت سر هم می‌شوند. قطعات متصل‌شده مجدداً به‌وسیله PCR تکثیر شده و در مرحله دوم سرهم‌بندی‌کردن به کار می‌روند. این روش در مقایسه با سرهم‌بندی مبتنی بر کلونینگ نیاز به پلاسمید و زمان کمتری دارد.

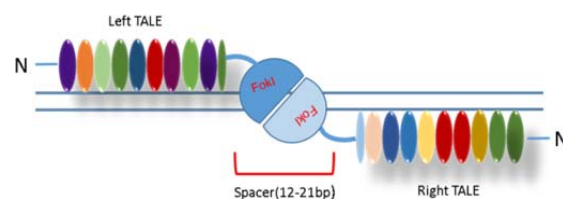
۲-۲-۳- سرهم‌کردن با آنزیم‌های محدودکننده (REAL)

در این روش ابتدا دو تکرار TALE و سپس مجموعه از تکرارهای دوتایی به یکدیگر متصل شده و این عمل به همین ترتیب ادامه

دارد. اگرچه ZFNs مبتنی بر سرهم‌بندی ماژولار فعالیت ویرایشی ضعیف و سمیت بالایی داشته و همچنین ممکن است بهترین ZFs در زمان انتخاب آنها از کتابخانه تصادفی به‌دلیل وابستگی به زمینه از دست بروند [23]. بنابراین به‌منظور جلوگیری از این موضوع روش سرهم‌کردن وابسته به زمینه (CoDA) ایجاد شد [32]. در این روش دو واحد انگشت دوتایی مانند F1F2 و F2F3 که در F2 با یکدیگر مشترک هستند برای ساخت آرایه‌های CoDA به کار می‌روند. واحدهای مذکور از پایگاه ZiFDB انتخاب می‌شوند [33]. به‌عنوان مثال واحد F1F2 CoDA (شناسایی‌کننده توالی 3'-GAGGGG) به واحد F2F3 CoDA (شناسایی‌کننده توالی 3'-GGGGTG) متصل شده و منجر به ایجاد یک آرایه انگشت سه‌تایی که توالی جدید را (3'-GAGGGGGTG) شناسایی می‌کند، می‌شود [33].

۲- نوکلئازهای افکتور شبه‌فعال‌کننده رونویسی (TALENs)

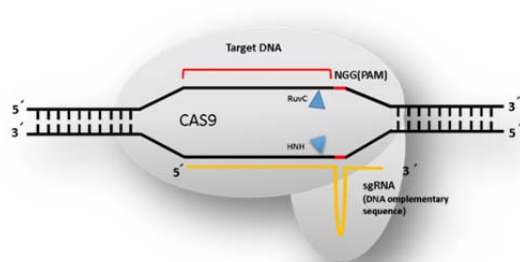
در طبیعت TALEs ها فاکتورهای رونویسی در باکتری‌های بیماری‌زای گیاهی جنس زانتوموناس (Xanthomonas) هستند که از سه بخش اصلی تشکیل شده‌اند: ناحیه N-ترمینال (NTR)، C-ترمینال (CTR) و دمین اتصال به DNA (DBDs) که از تکرارهای چندگانه به‌هم‌پیوسته تشکیل شده است. توالی انتهای N دارای پپتیدهای ترش‌خی و توالی انتهای C دارای پپتیدهای سیگنال موقعیت‌یاب هسته‌ای (NLS) هستند (شکل ۲). این پپتیدها برای انتقال به هسته که در آن TALEs به جایگاه هدف خود متصل شده و نسخه‌برداری را از طریق دمین افکتور (ED) تنظیم می‌کنند مورد نیاز هستند [4]. پروتئین‌های TALEs از طریق سیستم ترش‌خی با کتریابی تیپ سه به داخل سلول‌های میزبان وارد شده و به توالی اختصاصی DNA متصل و بیان برخی از ژن‌های میزبان که گسترش پاتوژن را قادر می‌سازد را افزایش می‌دهند [34]. سازوکار شناخت DNA به‌وسیله پروتئین‌های TALE در ۲۰۰۹ از طریق تجزیه این سیلیکو با استفاده از مجموعه بزرگی از توالی‌های آمینواسیدی دمین‌های اتصال به DNA و توالی‌های هدف آنها شناخته شد [35, 36]. در این بررسی مشخص شد که دو آمینواسید کلیدی در موقعیت‌های ۱۲ و ۱۳ در هر واحد ۳۴ تایی آمینواسیدی در شناخت هدف درگیر هستند. این موقعیت‌ها در میان واحدهای تکراری به‌شدت متغیر است و به‌عنوان متغیر تکراری با ریشه دوگانه (RVD) شناخته می‌شود [35].



شکل ۲ ساختار TALE: یک TALE شامل مونومرهای راست و چپ از پروتئین‌های TALE و آنزیم محدودکننده FokI که DNA را هنگام تشکیل دایمر برش می‌دهد، است. در این سیستم هر پروتئین TALE یک توالی اختصاصی منفرد از DNA را شناسایی می‌کند.

حداقل ۲۳ RVD شناسایی شده است که در میان آنها NI, NG, NN و HD رایج‌تر بوده و به‌ترتیب نوکلئوتیدهای G, T, A و C را به‌طور اختصاصی شناسایی می‌کنند. اختصاصی بودن چهار RVD باعث شد تا بتوان از آنها برای ساخت TAL افکتورهای مصنوعی به‌منظور هدف قراردادن توالی مورد نظر استفاده نمود [35, 36]. در

مهاجم ایجاد می‌کنند [46]. در صورتی که یک میکروارگانیزم از تهاجم یک پاتوژن در امان بماند، سیستم کریسپر در آن توانسته است قطعه‌ای از DNA مهاجم را در ژنوم خود جای داده و از آن برای مقابله با تهاجم‌های بعدی استفاده نماید. در این سیستم باکتری از طریق تلفیق قطعات کوتاهی از DNA مهاجم در ناحیه فاصله‌انداز جایگاه‌های CRISPR و نسخه‌برداری از آن در تهاجم‌های بعدی تحت عنوان CRISPR RNA (crRNA)، همراه با پروتئین یا پروتئین‌های Cas ژنوم مهاجم را تخریب می‌کند. [45, 52, 53]



شکل ۳: ساختار کمپلکس Cas9-sgRNA متصل به DNA هدف (کمپلکس SpCas9- gRNA ابتدا توالی PAM را در ژنوم جست‌وجو نموده و پس از آن با بازکردن DNA دورشته‌ای جفت‌باز DNA-RNA تشکیل می‌شود. در این سیستم توالی PAM در پایین‌دست توالی هدف قرار گرفته و نوکلئاز Cas9 توالی ژنومی که بلافاصله در سمت ۵ پریم توالی PAM قرار گرفته را برش می‌زند).

به‌طور خلاصه ایمنی در باکتری‌ها با استفاده از سیستم کریسپر در سه مرحله انجام می‌شود:

۱) مرحله دریافت یا پذیرش: در این مرحله شناخت و درج قطعات کوتاه DNA ویروس یا پلاسمید به‌عنوان فاصله‌انداز بین دو تکرار مجاور هم در جایگاه‌های کریسپر انجام می‌شود [54, 55].

۲) مرحله بیان: طی این مرحله جایگاه‌های کریسپر تحت عنوان یک Pre-crRNA که دربردارنده مجموعه کاملی از تکرارهای کریسپر و توالی‌های جاسازی‌شده مشتق از عوامل مهاجم بین آنها است نسخه‌برداری می‌شوند [56].

۳) مرحله تداخل: در این مرحله Pre-crRNA توسط یک اندوریبونوکلاز ویژه به توالی‌های کوتاه راهنما یا crRNA برش می‌خورد [56, 57].

۳-۱- ساختار پروتئین Cas9

تعیین ساختار کریستالی پروتئین Cas9 که در استرپتوکوکوس پیوژنز انجام شد، به تعیین اثر متقابل بین اجزای کمپلکس Cas9, crRNA, tracrRNA و DNA هدف در سطح اتمی کمک نمود. به‌طور کلی پروتئین Cas9 شامل یک لوب تشخیص (REC) و یک لوب نوکلئاز (NUC) است. لوب REC که شامل یک هلیکس بلند آلفا، یک دمین REC1 و یک دمین REC2 است، به نوبه خود یک دمین کارکردی ویژه Cas9 محسوب می‌شود. در حالی که لوب NUC از دمین‌های HNH, RuvC و PI (PAM-interacting) تشکیل شده است [58]. دمین‌های HNH و RuvC به‌ترتیب در رشته‌های هدف و غیره هدف برش ایجاد نموده و یک شکست دورشته ای را در بالادست توالی (PAM) ایجاد می‌کنند [58]. این توالی در انتهای ۳' توالی هدف قرار داشته و شناسایی آن را تسهیل می‌کند. همچنین توالی PAM به‌عنوان یک سیستم کنترلی شناسایی sgRNA به‌منظور محافظت از توالی هدف عمل

می‌یابد. این روش ساده‌ترین روش سرهم‌کردن TALEs است، اما به‌دلیل مراحل زیاد کلونینگ، طولانی‌تر است. در حالت بهبودیافته این روش با نام REAL-Fast به‌جای استفاده از واحدهای تکی، از ماژول‌های پیش‌ساخته ۲-۴ تایی استفاده می‌شود [42].

۴-۲- سیستم خودکار فاز جامد مبتنی بر اتصال سریع (FLASH)

تکرارهای به‌کاررفته در این روش تقریباً مانند روش REAL-Fast است [43]. تفاوت اصلی در سرهم‌کردن واحدهای تکراری است که روی دانه‌های مغناطیسی انجام می‌شود. در این روش ابتدا یک واحد برچسب‌دار شده با بیوتین و یک ماژول پیش‌ساخته چهارتایی با هم متصل شده و به دانه‌های مغناطیسی پوشیده با استرپتاویدین آویزان می‌شوند. پس از آن خالص‌سازی، برش و اتصال سریالی برای سرهم‌کردن TALEs انجام می‌شود.

۳- سیستم CRISPR-Cas9

این سیستم که برای اولین بار در ژنوم *شریشیا کلی* کشف شد [44] در بسیاری از باکتری‌ها و آرکی‌ها به‌عنوان یک نوع سازوکار مبتنی بر ایمنی اکتسابی در برابر ژنوم عوامل بیگانه مانند ویروس‌ها و پلاسمیدها عمل می‌کند [45, 46]. سیستم CRISPR-Cas در سه گروه اصلی (I, II, III) طبقه‌بندی می‌شود که هر کدام از آنها دارای سازوکار عملکردی مشخص و خانواده ژنی مرتبط با پروتئین‌های Cas مربوط به خود هستند. به‌طوری که نوع I و III چندین پروتئین Cas را برای فعالیت اندونوکلازی به کار می‌برند، در حالی که نوع II تنها از یک پروتئین (Cas9) به این منظور استفاده می‌کند [47]. از دیدگاه تکاملی به‌دلیل مسابقه دائمی که بین انگل و میزبان در سیستم CRISPR-Cas9 وجود دارد، سرعت تغییر و تحول در آن به‌صورت تنوع ساختاری و کارکردی بسیار بالا است. بر این اساس در دسته‌بندی اخیر سیستم کریسپر به دو کلاس (یک و دو) و شش تیپ (I-VI) تقسیم شده است [48].

بیشترین مطالعات مربوط به مهندسی ژنوم در سیستم نوع II که از باکتری *استرپتوکوکوس پیوژنز* (*S. pyogenes*; SpCas9) مشتق‌یافته، انجام شده است. مزیت سیستم نوع II مربوط به نیاز آن به فقط یک پروتئین (Cas9) برای فعالیت نوکلئازی است. این سیستم همچنین به دو نوع RNA شامل crRNA که به‌عنوان راهنمای پروتئین Cas برای جفت‌شدن با توالی ژنومی هدف عمل می‌کند و tracrRNA که به‌عنوان فعال‌کننده ترانس crRNA برای بلوغ و فراخوانی Cas9 به جایگاه مورد نظر دارای اهمیت است، نیاز دارد [47, 49]. (شکل ۳). ادغام دو توالی tracrRNA:crRNA به‌صورت یک توالی کایمری تحت عنوان sgRNA که دربردارنده ویژگی‌های هر دو نوع RNA است، باعث شد تا استفاده از این سیستم در ویرایش ژنوم امکان‌پذیر شود [49]. به‌طوری که در انسان از سیستم CRISPR-Cas9 به‌منظور درمان بیماری‌های ژنتیکی استفاده شد [50]. به‌عنوان مثال بیماری دیستروفی عضلانی دوشن (به اختصار DMD) یکی از مواردی بود که حذف و تخریب ناحیه جهش‌یافته دیستروفین به‌وسیله کریسپر باعث شد تا بیان دیستروفین به سطح بالایی برگشته و عملکرد عضلانی به‌طور قابل ملاحظه‌ای بهبود یابد [51]. جایگاه‌های CRISPR دربردارنده تکرارهای پشت سر هم و فاصله‌انداز هستند. تکرارهای پشت سر هم شامل توالی‌های یکسان و توالی‌های فاصله‌انداز منشاگرفته از ژنوم عوامل بیگانه است [52, 53]. جایگاه‌های CRISPR همراه با پروتئین‌های مربوطه (Cas) ایمنی اکتسابی را در برابر DNA

می‌کند [59]. در صورتی که یکی از دمی‌های نوکلئازی غیرفعال شود، آنگاه Cas9 به‌عنوان یک نیکاز عمل کرده و تنها در یک رشته برش انجام می‌دهد [60, 61] (شکل ۳).

۳-۲- اختصاصیت برش

اگرچه اختصاصیت در هدف‌گیری عمدتاً وابسته به توالی gRNA است، با این وجود فعالیت نوکلئازی پروتئین Cas9 در سیستم CRISPR-Cas9، به توالی ویژه PAM وابسته است. در این سیستم، نوکلئاز Cas9 می‌تواند هر توالی ژنومی که بلافاصله در سمت ۵' توالی PAM قرار گرفته است را برش بزند و به بیان دیگر برش توالی هدف در پایین‌دست آن انجام می‌شود [58]. نبود توالی PAM می‌تواند تمایل بین Cas و DNA هدف را تغییر دهد و بنابراین توالی اختصاصی آن می‌تواند به تمایز بین توالی‌های هدف غیرخودی از توالی‌های غیرهدف کمک نماید [62]. بنابراین با وجود اهمیت توالی PAM وجود آن برای کارکرد سیستم CRISPR/Cas به‌صورت مطلق ضروری نیست [63].

توالی PAM در باکتری /ستریپتوکوکوس پیوژنز (SpCas9) به‌صورت 5'-NGG-3' [52] و در /ستریپتوکوکوس ترموفیلوس (StCas9) به‌صورت 5'-NNAGAAW-3' [64] است. مجموعه SpCas9-gRNA ابتدا توالی PAM را در ژنوم جست‌وجو نموده و پس از آن با بازکردن DNA دورشته‌ای، جفت‌باز DNA-RNA تشکیل می‌شود. به‌طور کلی طول توالی شناسایی DNA در منطقه crRNA ۲۰ نوکلئوتید است؛ اما چند جفت‌باز کمتر یا بیشتر از آن می‌تواند اختصاصیت را افزایش دهد. بنابراین توالی ۲۰ جفت‌بازی در gRNA و ۳ جفت‌بازی در PAM اختصاصیت هدف‌گیری را در سیستم CRISPR-Cas9 تعیین می‌کنند [58, 65]. اگرچه یافتن موتیف 5'-NGG3' در برخی موارد همچون مناطقی از ژنوم با توالی بالای AT محدودیت ایجاد می‌کند [66].

۳-۳- برش‌های خارج از هدف

جهش‌زایی خارج از هدف یکی از مشکلات اصلی در به‌کاربردن سیستم CRISPR-Cas9 به‌خصوص در کاربرد آن به‌عنوان ژن‌درمانی است [67, 68]. اگرچه این موضوع در گیاهان نگرانی بزرگی به نظر نمی‌رسد که دلیل آن را می‌توان کارایی ترانسفورماسیون، سطح بیان و ترجیح کدونی در گیاهان دانست. برش‌های خارج از هدف به معنای پذیرش یا تحمل Cas9 به توالی‌های ناجور در sgRNA تعریف می‌شود. در صورت مشابهت بالای توالی gRNA با یک جایگاه خارج از هدف تا کمتر از سه باز ناجور اثرات خارج از هدف بسیار محتمل است [67]. بررسی‌های مختلف نشان می‌دهد که جفت‌های ناجور در انتهای ۳' توالی هدف (معمولاً ۸ تا ۱۴ باز بالادست توالی PAM) کمتر قابل تحمل بوده در حالی که جفت‌های ناجور در انتهای ۵' منطقه هدف نسبت به سمت ۳' بهتر تحمل می‌شود و قابل پذیرش‌تر است [67]. همچنین مقدار Grna و نسبت آن به Cas9 بر اثرات خارج از هدف تأثیر دارد [69].

به‌طور کلی با وجودی که پروتئین cas9 به‌دلیل فعالیت نوکلئازی بالا و دامنه هدف‌گیری گسترده هنوز کاربرد دارد اما به‌دلیل وزن مولکولی بالا و اثرات خارج از هدف آن اما دارای محدودیت است. اگرچه در واریانت‌هایی از Cas9 مانند SpCas9-HF [70] و eSpCas9 [71] جهش‌هایی ایجاد شده که تعامل غیراختصاصی بین پروتئین Cas9 و توالی هدف را کاهش می‌دهد. علاوه بر راهکارهای مختلف برای کاهش اثرات خارج از هدف شیوه‌های آزمایشگاهی مختلفی همچون GUIDE-seq، Digenome-seq و

HTGTS برای شناسایی جایگاه‌های خارج از هدف وجود دارد، [72]

۳-۴- راهکارهای کاهش اثرات خارج از هدف در سیستم CRISPR-Cas9

۳-۴-۱- انتخاب توالی راهنما دارای حداقل جایگاه‌های بالقوه خارج از هدف که به‌وسیله جست‌وجوی همولوژی در کل ژنوم تعیین می‌شود. میان آنها توالی‌هایی انتخاب شوند که جفت‌های ناجور در ناحیه نزدیک به PAM متمرکز باشند، زیرا برای کارکرد Cas9 کمتر تحمل می‌شوند [49, 67].

۳-۴-۲- انتخاب توالی راهنما با طول کوتاه‌تر (tru-gRNA)

در این راهکار gRNA به اندازه ۲-۳ نوکلئوتید در سمت ۵' کوتاه می‌شود. مشخص شده است که انتخاب توالی‌های کوتاه‌تر (۱۷ یا ۱۸ نوکلئوتید) کارایی ویرایش را به مقدار بسیار کمی کاهش می‌دهند اما به‌طور معنی‌داری جهش‌های نامطلوب را کاهش داده و منجر به کاهش اثرات خارج از هدف می‌شوند [74].

۳-۴-۳- استفاده از راهبرد نیکاز جفتی (Cas9n)

از طریق غیرفعال‌کردن یکی از دمی‌های Cas9 Cas9n واریانتی از آن ایجاد شده است که به‌عنوان یک نیکاز عمل می‌کند. با استفاده از یک جفت sgRNA نزدیک به هم، Cas9n می‌تواند دو درز در مجاورت هم در رشته‌های تکی ایجاد و DSB ایجاد نماید. این راهکار فعالیت خارج از هدف را کاهش داده و باعث افزایش اختصاصیت به میزان ۵۰ تا ۱۵۰۰ برابر می‌شود. راهبرد نیکاز جفتی به‌عنوان مثال باعث حذف ژن در تخم‌های موش، بدون کاهش در فعالیت برشی جایگاه‌های هدف شده است [75, 76].

۳-۴-۴- راهبرد Cas9-FokI

نوکلئاز بی‌اثر Cas9 (dCas9) از طریق جلوگیری از فعالیت آنزیمی هر دو دمی HNH و RuvC ایجاد می‌شود [77]، ادغام دمی نوکلئاز FokI با dCas9 در قالب دایمر و با انتخاب یک جفت sgRNAs با فاصله و جهت‌گیری مناسب، می‌تواند DSB تولید نماید. بررسی‌ها نشان داده است که با این روش اختصاصیت به‌طور معنی‌داری افزایش می‌یابد [78, 79].

۳-۵- سیستم CRISPR/Cpf1

پروتئین Cpf1 در سال ۲۰۱۵ در آزمایشگاه [Feng Zhang](#) که یکی از پیشگامان سیستم CRISPR است، به‌عنوان یک کشف مهم ارایه شد. پروتئین Cpf1 نسخه کوچک‌تر و ساده‌تری از Cas9 متعلق به سیستم نوع II و تیپ V است. این پروتئین از باکتری /ستافیلوکوکوس اورئوس به دست آمده و دارای فعالیت ویرایشی با کارایی بالاتری نسبت به Cas9 است. کوچکی اندازه این پروتئین باعث شده است که انتقال آن به درون سلول‌ها و بافت‌ها آسان‌تر شود. علاوه بر این اختصاصیت اندونوکلئاز Cpf1 بسیار بالا بوده و بنابراین اثرات خارج از هدف آن به‌خصوص در سلول‌های انسان قابل چشم‌پوشی است [80].

برخی از تفاوت‌های بین Cpf1 و Cas9 که باعث شد تا سیستم CRISPR/Cpf1 به برخی از محدودیت‌های سیستم CRISPR/Cas9 غلبه نماید عبارت بودند از این که پروتئین Cas9 نیازمند دو مولکول (crRNA و [tracrRNA](#)) و Cpf1 نیازمند یک مولکول RNA (crRNA) برای برش DNA است [81]. Cas9 دربردارنده دمی‌های نوکلئازی HNH و RuvC است و هر دو رشته DNA را در جایگاه یکسانی برش می‌دهد که منجر به ایجاد انتهای صاف می‌شود؛ در حالی که Cpf1 تنها حاوی دمی نوکلئازی

جدید با ارزش ایجاد نموده است^[91]. در اصلاح نباتات بسیاری از صفات مورد نظر مانند مقاومت به تنش‌های زیستی یا غیرزیستی از طریق حذف یا درج ژن‌های مورد نظر به دست می‌آیند. در این خصوص اگرچه تکنیک RNAi در طی ۱۵ سال گذشته به‌عنوان یک ابزار قدرتمند برای سرکوب بیان ژن مطرح بوده است، اما محدودیت‌های آن و ظهور CRISPR در سال ۲۰۱۳ باعث شد تا این روش تقریباً به فراموشی سپرده شود. تداخل RNA یا RNAi مکانیزم خاموشی ژن پس از نسخه‌برداری (PTGS) است که با استفاده از shRNA یا siRNA بدون تغییر در کد ژنتیکی باعث کاهش بیان ژن یا ناک‌داون شدن آن می‌شود^[92] در حالی که تکنیک‌های ویرایش ژنوم از طریق تغییر کد ژنتیکی باعث حذف کامل کارکرد ژن یا ناک‌اوت شدن آن می‌شوند^[34]. همچنین RNAi تنها قادر به هدف‌گیری mRNA سیتوسولیک است در حالی که CRISPRi در هسته رخ داده و بنابراین قادر است ژن‌های هسته و سیتوسولی را هدف قرار دهد^[93].

یکی از اهداف اصلی ویرایش ژنوم در بیوتکنولوژی گیاهی حذف یا درج ژن است. نوکلئاز بی‌اثر از نظر کاتالیتیکی (dCas9) که از طریق جلوگیری از فعالیت آنزیمی هر دو دامین HNH و RuvC با هم ایجاد می‌شود، می‌تواند از طریق ادغام با افکتورهای مختلف دوکارکرد متفاوت را ایجاد نماید. ادغام dCas9 با سرکوبگر تحت عنوان CRISPRi منجر به جلوگیری از بیان ژن شده و می‌توان آن را با انتخاب sgRNAsهای چندگانه و انتقال همزمان آنها برای خاموشی چندین ژن گسترش داد^[94]. همچنین ادغام dCas9 با فعال‌کننده تحت عنوان CRISPRa منجر به افزایش بیان ژن می‌شود^[95, 96]. بر این اساس ادغام dCas9 با افکتورهای مختلف بدون تغییر در توالی DNA امکان ویرایش اپی‌ژنوم را نیز فراهم می‌کند^[97]. به‌عنوان مثال هیستون‌مدیفیکاسیون که از طریق اتصال یک استیل‌ترانسفراز به dCas9 انجام می‌شود، لیزین ۲۷ هیستون H3 را استیل کرده و منجر به افزایش فعالیت نسخه‌برداری در ژن هدف می‌شود. از طرف دیگر اتصال متیل‌ترانسفراز به dCas9 منجر به خاموشی ژن هدف می‌شود^[18]. طی چند سال گذشته از سیستم CRISPR-Cas9 و TALENs به‌طور موفقیت‌آمیزی در ویرایش ژنوم گیاهان مختلفی همچون گیاهان مدل و گیاهان زراعی به‌منظور اهداف مختلفی استفاده شده است. تعدادی از گیاهان ویرایش‌شده شامل *آرابیدوپسیس تالیانا*، تنباکو، برنج، گندم، ذرت، پرتقال شیرین، سورگوم، گوجه فرنگی، سویا و صنوبر هستند^[98-100]. یکی از موارد ویرایش ژنوم در گیاهان زراعی، ایجاد مقاومت به عفک‌های ممانعت‌کننده استولاکتات‌سینتاز (ALS) در برنج با استفاده از ایجاد جهش دوگانه در ژن OsALS با به‌کارگیری سیستم TALENs است^[101]. ALS آنزیم کلیدی در مسیر بیوسنتز آمینواسیدهای شاخه‌دار مانند لوسین، ایزولوسین و والین است^[102]. در گندم هگزپلوئید سه هموآل (TaMLO-A, TaMLO-B, TaMLO-D) که اعطاکنده مقاومت قابل توارث به سفیدک پودری هستند به‌طور همزمان با استفاده از سیستم CRISPR و ویرایش و باعث شکستن مقاومت شدند^[103]. در گندم MLO یک ژن مهم در ایجاد مقاومت به سفیدک پودری است که با proTaU6-sgRNA در پروتوپلاست تخریب شد. تخریب دو ژن دسچوراز (FAD2-1A و FAD2-1B) در سویا که مسئول غیراشباع‌سازی اسیدهای چرب هستند با استفاده از TALENs باعث بهبود کیفیت روغن از طریق افزایش تعداد اسیدهای چرب تک‌اشباع شد^[104]. دسچوراز (FDA)

RuvC است، که با ایجاد برش فقط در یک رشته باعث ایجاد دو انتهای چسبنده در جایگاه‌های هدف می‌شود^[82]. پروتئین Cpf1 برش DNA را در جایگاه‌های متفاوتی انجام داده و گزینه‌های بیشتری را هنگام انتخاب یک جایگاه برای ویرایش پیش روی پژوهشگران قرار می‌دهد. جایگاه برش و جایگاه شناسایی در Cas9 نزدیک به هم است در حالی که در Cpf1 در فاصله دورتری از هم قرار دارند. توالی PAM در Cas9 غنی از G (5'-NGG-3') و در Cpf1 غنی از T (5'-TTTN-3') است^[80].

۳-۶- روش‌های انتقال CRISPR

سازوکار انتقال سیستم کریسپر به داخل سلول‌ها از جنبه ویرایش هدف‌دار و کارآمد و همچنین کاربرد نهایی آن (به‌صورت دارو) اهمیت دارد^[83]. انتقال سازه کریسپر می‌تواند به شکل DNA، mRNA یا به‌صورت یک ریبونوکلوپروتئین انجام شود. انتقال آنها نیز می‌تواند براساس نوع آنها به‌صورت انتقال مستقیم از طریق ریزتریقی و الکتروپوریشن، ناقل‌های ویروسی و ناقل‌های غیرویروسی همچون ذرات نانو و لیپوزوم‌ها انجام شود^[84].

۳-۷- مقایسه سیستم CRISPR-Cas9، TALENs و ZFNs

سیستم CRISPR-Cas9 مبتنی بر تعامل DNA:RNA و طراحی آسان مولکول RNA برای هر توالی ویژه است؛ ولی ZFNs و TALENs مبتنی بر تعامل پروتئین، DNA است، به‌طوری که برای هر توالی DNA هدف نیازمند بازسازی مجدد هستند. این مهم‌ترین مزیت برای CRISPR-Cas9 محسوب می‌شود. این سیستم سه مزیت دیگر را نسبت به TALENs و ZFNs دارد که شامل این موارد است: ۱) سادگی؛ توالی ۲۰ جفت‌باز در sgRNA می‌تواند به‌سادگی برای هدف‌گیری هر توالی جدید DNA طراحی شود، ۲) قابلیت عملکرد چندگانه؛ چندین sgRNAs می‌توانند همراه با یک پروتئین Cas9 به‌طور همزمان روی چندین جایگاه متفاوت عمل کنند که این یکی از مهم‌ترین مزیت‌های این سیستم نسبت به TALENs و ZFNs است^[85]. از این قابلیت در برنج^[86] و آرابیدوپسیس^[87] برای حذف قطعات کروموزومی بزرگ که حاوی چندین ژن است، استفاده شده است. هدف قراردادن همزمان چندین ژن علاوه بر بهبود توام چندین صفت در محصولات زراعی، می‌تواند در تحقیقات پایه نیز برای دانستن نقش هر ژن در یک شبکه پیچیده به کار رود، ۳) غیرحساس بودن به متیلاسیون DNA هدف؛ با این ویژگی سیستم CRISPR-Cas9 قادر به ویرایش آن دسته از جایگاه‌های ژنومی است که به‌شدت تحت تنظیم تغییرات اپی‌ژنتیکی هستند^[67]. این موضوع به‌خصوص در گیاهانی دارای اهمیت است که تقریباً ۷۰٪ جایگاه‌های CpG/CpNpG به‌خصوص جزایر CpG در پروموتور اگزون‌های پروکزیمال آنها به‌صورت متیله شده است^[88]. بنابراین سیستم CRISPR-Cas9 برای ویرایش ژنوم در گیاهان، به‌خصوص برای گیاهان تک‌لپه‌ای مانند برنج که ژنوم آنها دارای مقادیر بالایی GC هستند، مناسب است^[89] (جدول ۱).

بیوتکنولوژی گیاهی در عصر CRISPRs

ویرایش هدفدار ژنوم با استفاده از نوکلئازهای مختص توالی قابلیت گسترده‌ای در بهبود محصولات زراعی به‌منظور تولید پایدار غذا دارد. این موضوع به‌خصوص با توجه به پیش‌بینی‌های مربوط به افزایش جمعیت جهان و کاهش زمین‌های قابل کشت اهمیت دارد^[90]. روش‌های متداول اصلاح نباتات و محدودیت‌های آن نیاز مبرمی برای راهبردهای با کارایی بالاتر همچون سیستم‌های ویرایش ژنوم برای بهبود کارکردهای موجود یا ایجاد محصولات

اسیدچرب تک‌اشباع اولئیک‌اسید را به لینولئیک‌اسید که اسیدچرب چنداشباع بوده و برای مصرف نامطلوب است تغییر می‌دهد. مثال دیگر مربوط به متوقف‌شدن تجمع قندهای احیاشده طی فصل سرد در سیب‌زمینی تتراپلوئید است که از طریق ناک‌اوت‌کردن چهار آلل ژن واکوئلی اینورتاز (*Vlnv*) با استفاده از TALENs به دست آمد و نتیجه آن تولید چپیس‌هایی با مقادیر کاهش‌یافته آکریل‌امید است [105]. همچنین اعطای مقاومت به جمینی‌ویروس‌ها با طراحی sgRNAs برای هدف‌گیری DNA ژنومی ویروس انجام شده است [106].

جدول (۱) مقایسه سیستم‌های CRISPR-Cas9، TALENs و ZFNs

	ZFN	TALEN	CRISPR
نحوه عمل	ایجاد شکست مبتنی بر تعامل پروتئین، DNA	ایجاد شکست مبتنی بر تعامل پروتئین، DNA	ایجاد شکست مبتنی بر تعامل DNA:RNA
طراحی و سرهم‌کردن نوکلئاز	در اغلب سخت و هزینه‌بر	آزمایشگاه‌ها امکان‌پذیر بوده اما بسیار کاربر است	آسان
کارایی طراحی	پایین	بالا	بالا
کارایی هدف‌گیری	متغیر	(۹۹٪) بالا	(۹۰٪) بالا
دامنه هدف‌گیری	به دلیل وابستگی مازول‌های ZF به زمینه محدود می‌شود.	به دلیل عدم نیاز آن به توالی PAM دامنه هدف‌گیری در آن نامحدود است	می‌تواند به وسیله توالی PAM محدود شود اما به طور کلی دامنه هدف‌گیری آن نامحدود است
اثرات خارج از هدف	وجود دارد	وجود دارد	وجود دارد
حساسیت به متیلاسیون DNA	مشخص نشده	حساس به متیلاسیون CpG	غیرحساس به متیلاسیون CpG
هدف‌گیری با توان عملیاتی بالا	خیر	محدود	امکان‌پذیر

در یک بررسی از سیستم CRISPR برای ایمنی و ایجاد مقاومت در مقابل سه جمینی‌ویروس شامل ویروس پیچیدگی و زردی برگ گوجه‌فرنگی (TYLCV)، ویروس پیچیدگی چغندرقد (BCTV) و ویروس موزاییک تنباکو (MeMV) استفاده شد [1007]. نتایج این بررسی نشان داد sgRNA طراحی‌شده برای هدف قراردادن یک توالی حفاظت‌شده (TAATATTAC) در مناطق بین ژنی جمینی‌ویروس‌ها می‌تواند ویروس‌های چندگانه را به طور همزمان هدف قرار دهد. این راهکار می‌تواند به طور موثری باعث ایجاد مقاومت چندگانه به ویروس‌ها در شرایط طبیعی که آلودگی چندگانه رخ می‌دهد، شود. یکی دیگر از موارد کاربرد ویرایش ژنوم در اصلاح نباتات سرکوب بیان ژن *CENH3* از طریق سیستم CRISPR-Cas9 و در نتیجه حذف انتخابی یک مجموعه از کروموزوم‌ها که منجر به تولید گیاهان هاپلوئید در جو، چغندرقد و آرابیدوپسیس شد، است [108]. ژن *CENH3* برای تولید پروتئین سنترومیک هیستون H3 که عضوی از کمپلکس کینتوکور برای تشکیل آن محسوب می‌شود مورد نیاز است. یکی از مثال‌های دیگر تولید گوجه‌فرنگی‌های بنفش است. بررسی‌های زیادی نشان داده است که آنتوسیانین موجود در سبزی‌ها و میوه‌ها خواص آنتی‌اکسیدانی و ضدسرطانی دارد. به این منظور گوجه‌فرنگی‌های بنفش از طریق درج هدفدار یک پروموتور قوی در بالادست ژن *ANT1* که منجر به تجمع آنتوسیانین در آن می‌شود، تولید شده

است [109]. تولید متابولیت‌های ثانویه مورد نظر نیز از طریق مسدودکردن یک مرحله از مسیر و مختل‌کردن تولید یا فعالیت آنزیم مربوط به آن مرحله از طریق کریسپر صورت گرفته است. به‌عنوان مثال در گیاه نوروزک (*Salvia leriifolia* Benth) ناک‌اوت‌کردن ژن *smCPS1* از طریق سدکردن تبدیل GGPP به تانشینون منجر به تغییر مسیر آن و تولید تاکسول می‌شود [110]. *smCPS1* آنزیمی است که ژرانیل‌ژرانیل‌پیروفسفات (GGPP) را به‌عنوان سوپسترا برای تولید تانشینون به کار می‌برد. GGPP همچنین به‌عنوان پیش‌ساز برای تولید تاکسول نیز به کار می‌رود.

یکی دیگر از کاربردهای بالقوه سیستم CRISPR/Cas9 که به‌طور موفقیت‌آمیزی در دروزوفیل به‌دست‌آمده ژن درایو است [111, 112]. ژن درایو فرآیندی است که در آن یک ژن تغییر یافته آلل خواهری خود روی کروموزوم همولوگ را نیز تغییر داده و آن را مدت زمان کوتاهی در محیط گسترش می‌دهد [113]. به‌عنوان مثال می‌توان ژن‌های مقاومت به علفکش را در علف‌های هرز از طریق سیستم CRISPR/Cas9 به‌منظور افزایش حساسیت آنها به علفکش‌ها خاموش نموده و همچنین آنها را از طریق شیوه ژن درایو به محصولات زراعی به‌منظور افزایش مقاومت آنها به علفکش‌ها انتقال داد [114]. مثال شاخص دیگر کاربرد ژن درایو برای سرکوب پشه‌های ماده آنوفل که حامل انگل پلاسمودیوم و ناقل مالاریا هستند و همچنین سایر بیماری‌های ناقل زاد همچون تب دنگو و زیکا است [115]. به‌طور کلی این پدیده از جنبه کنترل آفات و موجودات زیان‌آور که از طریق برهم‌زدن نسبت جنسی به دست می‌آید مفید است [116] با این وجود با توجه به این که تغییرات ژنتیکی ایجادشده می‌تواند سایر موجودات و حتی کل اکوسیستم را تحت تاثیر قرار دهد، بنابراین استفاده از آن به‌خصوص در گیاهان و حشرات که نسل‌های آنها به‌سرعت صورت می‌گیرد نیاز ملاحظات و بررسی‌های جامع‌تری دارد [117].

تغییر رنگ گل‌های زینتی و تجاری نیز از موضوعات مورد علاقه در باغبانی است. در این خصوص برای اولین بار دانشمندان ژاپنی موفق به تغییر رنگ گل‌های گیاه زینتی شکوه صبح (*Ipomoea nil*) از بنفش به سفید شدند. تغییر رنگ مذکور از طریق تخریب ژن کدکننده آنزیم بیوسنتز آنتوسیانین (DFR-B) که ژن اصلی مسئول رنگ در این گونه است با استفاده از تکنولوژی CRISPR انجام شد [118].

به‌طور کلی محصولات به‌دست‌آمده از طریق ویرایش ژنوم نسبت به روش‌های متداول اصلاح نباتات سریع‌تر و ارزان‌تر به بازار معرفی شده و نسبت به آنهایی که حامل DNA خارجی در ژنوم خود هستند قابل پذیرش‌تر هستند. همچنین ژن‌های نشانگر مقاوم به آنتی‌بیوتیک و ژن *Cas9* می‌توانند به‌آسانی در نسل‌های تفکیک برداشته شوند [119, 120]. چالش دیگر در روش‌های متداول مربوط به گیاهان پلی‌پلوئید مانند گندم و اطمینان از اینکه هر کدام مجموعه‌های کروموزومی حاوی ژن مورد نظر است [121].

منابع محاسباتی در ویرایش ژنوم

همزمان با پیشرفت سریع در تحقیقات مربوط به ویرایش ژنوم، دامنه وسیعی از نرم‌افزارهای بیوانفورماتیکی ایجاد شد که انتخاب جایگاه‌های هدف و پیش‌بینی جایگاه‌های خارج از هدف را آسان نمود. با توجه به کارایی و سایر مزیت‌های سیستم CRISPR بیشتر این منابع مربوط به این سیستم هستند، به‌طوری که تنها در دو سال گذشته بیش از ۲۰ نرم‌افزار و پایگاه داده جدید در زمینه آن ایجاد شده است. اگرچه اثرات خارج از هدف القاءشده توسط

در این میان geCRISPR الگوریتمی است که براساس مقایسات انجام‌شده کارایی بالاتری را نسبت به الگوریتم‌های قبلی دارد [122]. در جدول ۲ صحت الگوریتم geCRISPR نسبت به الگوریتم‌های sgRNA Scorer_sp، WU-CRISPR، sgRNA designer، sgRNAScorer_st از جنبه پیش‌بینی sgRNA مقایسه شده است.

علاوه بر شناسایی توالی sgRNA شیوه‌های بسیار مهم‌تری نیز برای دستیابی به عملکرد Cas9 در جایگاه‌های غیرهدف و به عبارت دیگر جایگاه‌هایی که تفاوت نوکلئوتیدی کمی را در مقایسه با جایگاه هدف دارند مورد نیاز است. به این منظور ابزارهای این‌سیلیکو همانند CasOT و Cas-OFFinder ایجاد شده است. در جدول ۳ تعدادی از الگوریتم‌های مهم و خصوصیات آنها ذکر شده است.

جدول ۲) مقایسه کارایی geCRISPR با سایر الگوریتم‌های پیش‌بینی sgRNA (به‌روزشده در تاریخ ۲۰۱۸/۱/۱۵)

الگوریتم	طول sgRNA	صحت (ACC)	ارجاعات
sgRNA designer [123]	۲۰	در دسترس نیست	۴۲۳
WU-CRISPR [124]	۲۰	در دسترس نیست	۴۵
ge-CRISPRc [122]	۲۰	۹۷/۲۸	۵
sgRNA Scorer_sp [125]	۲۳	۷۳/۲	۱۱۴
ge-CRISPRc [122]	۲۳	۷۶/۷	۵
sgRNAScorer_st [125]	۲۷	۸۱/۵	۱۱۴
ge-CRISPRc [122]	۲۷	۸۳/۴۴	۵
ge-CRISPRc_overall	۲۰	۸۷/۱۷	-

Cas9 یک محدودیت بالقوه در استفاده از سیستم CRISPR/Cas9 است اما در بسیاری از موجودات ابزارهای جست‌وجو برای توالی‌های هدف با الگوریتم‌های پیشرفته که جهش‌های خارج از هدف را به حداقل برسانند در دسترس است. الگوریتم‌های قوی، سریع و قابل انعطاف که همه جایگاه‌های ژنومیک را برای کشف توالی‌های غیرهدف جست‌وجو نماید ایجاد شده است. ویژگی هر کدام از این الگوریتم‌ها مبتنی بر کشف جایگاه‌های غیرهمانند با حداکثر تعداد جفت‌های ناجور که یا تعریف شده است یا براساس تعریف کاربر تعیین می‌شود و همچنین نمره‌دهی و رتبه‌بندی آنها است.

اولین قدم در ویرایش ژنوم شناسایی sgRNA است که به این منظور تعداد کمی از ابزارها مانند CRISPRdirect، SSFinder، GT-Scan و E-CRISPR ایجاد شده‌اند [67]. این ابزارها ۲۰ نوکلئوتید مجاور توالی NGG یا موتیف PAM را در ژنوم به‌عنوان sgRNA در نظر می‌گیرند. اگرچه ابزارهای فوق برای یک ژن یا ژنوم مشخص تعدادی sgRNA را شناسایی می‌کنند، اما همگی آنها کارایی یکسانی را ندارند. بر این اساس کارایی ویرایش ژنوم نیز در آنها از بسیار کم تا بسیار بالا متغیر است. همچنین این ابزارها قادر به پیش‌بینی کارایی ویرایش نیستند. بنابراین تمرکز بر ایجاد الگوریتم‌هایی شده است که کارایی واقعی sgRNA را نیز پیش‌بینی نماید. ابزارهایی مانند sgRNA designer، WU-CRISPR، sgRNAScorer و CRISPRscan کتابخانه‌ای از sgRNA را براساس فعالیت آنها از کم تا زیاد دسته‌بندی می‌کنند.

جدول ۳) مقایسه الگوریتم‌های پیش‌بینی‌کننده جایگاه‌های خارج از هدف (به‌روزشده در تاریخ ۲۰۱۸/۱/۱۵)

الگوریتم	ویژگی	ارجاعات
CRISPRseek [126]	کشف جایگاه‌های غیرهمانند با حداکثر تعداد جفت‌های ناجور که براساس تعریف کاربر تعیین می‌شود. نمره‌دهی براساس تعداد و موقعیت جفت‌های ناجور انجام می‌شود. پارامترهای نمره‌دهی و جست‌وجو می‌تواند براساس تعریف کاربر تغییر کند. به‌صورت یک بایوکنداکتور در دسترس است.	۶۴
Cas-OFFinder [127]	کشف جایگاه‌های غیرهمانند تا حد نه جفت ناجور و به میزان دو برآمدگی DNA و RNA قادر به نمره‌دهی و رتبه‌بندی جایگاه‌های خارج از هدف نیست. این برنامه قابل بارگذاری است.	۲۴۴
CRISPR Design Tool [67]	کشف جایگاه‌های غیرهمانند تا حد چهار جفت ناجور نمره‌دهی براساس تعداد و موقعیت جفت‌های ناجور انجام می‌شود. دارای ویژگی‌های قابل تعریف به‌وسیله کاربر نیست.	۱۷۱۰
COSMID [128]	کشف جایگاه‌های غیرهمانند تا حد سه جفت ناجور و دو برآمدگی DNA و RNA نمره‌دهی براساس تعداد و موقعیت جفت‌های ناجور انجام می‌شود.	۸۹
CropIT [129]	کشف جایگاه‌های غیرهمانند تا حد نه جفت ناجور نمره‌دهی براساس تعداد و موقعیت جفت‌های ناجور انجام می‌شود. از ترکیب پروفایل‌های فوق حساس به DNase از مجموعه داده‌های کدگذاری شده برای رتبه‌بندی جایگاه‌های خارج از هدف در ژنوم انسان استفاده می‌کند. محدود به پارامترهای تعریف‌شده توسط کاربر است.	۵۵
CasFinder [130]	کشف جایگاه‌های غیرهمانند را براساس تعداد جفت‌های ناجور که توسط کاربر تعریف می‌شود، انجام می‌دهد. نمره‌دهی براساس تعداد و موقعیت جفت‌های ناجور انجام می‌شود. پارامترها می‌تواند توسط کاربر اصلاح شود. به‌صورت یک برنامه Perl در دسترس است.	۱۰
E-CRISP [131]	کشف جایگاه‌های غیرهمانند تا حد هفت جفت ناجور متوالی در انتهای ۵ یا به‌طور کلی تا حد سه جفت ناجور نمره‌دهی براساس تعداد جفت‌های ناجور و موقعیت ژنومیک و ترکیب توالی جایگاه خارج از هدف انجام می‌شود. محدود به پارامترهای تعریف‌شده توسط کاربر است.	۲۴۹
ChopChop [132]	کشف جایگاه‌های غیرهمانند تا حد دو جفت ناجور جایگاه‌های خارج از هدف را به‌وسیله تعداد جفت‌های ناجور فهرست می‌کند.	۲۴۹
ZiFiT [133]	کشف جایگاه‌های غیرهمانند تا حد سه جفت ناجور در جایی که موقعیت و نوع آن نشان داده شده است.	۲۰۵
CasOT [134]	کشف جایگاه‌های غیرهمانند تا حد شش جفت ناجور این برنامه قابل بارگذاری است.	۱۳۲

ثانویه از طریق افزایش بیان ژن‌های کلیدی مسیرهای متابولیکی با استفاده از ابزارهای مختلف ویرایش ژنوم^[143] یا تولید گیاهان هاپلوئید از طریق سرکوب بیان ژن *CENH3* از طریق سیستم CRISPR-Cas9 و در نتیجه حذف انتخابی یک مجموعه از کروموزوم‌ها^[108]. تمامی این موارد نشان‌دهنده قابلیت گسترده این تکنیک‌ها در بیوتکنولوژی گیاهی است. بر این اساس می‌توان اظهار نمود همان‌طور که CRISPR منجر به انقلابی در بیولوژی شد، در کشاورزی نیز منجر به حداقل تغییر و تحول بزرگی شود. اگرچه یکی از موضوعات بحث‌برانگیز در این خصوص تولید محصولات ویرایش‌شده‌ای است که GMO محسوب نمی‌شوند. در این خصوص ادعا می‌شود با توجه به این که ایونت نهایی حاوی DNA نوترکیب نیست، بنابراین نباید شامل قوانین مربوط به GMOs شود. اگرچه این ادعا هنوز مورد بحث است^[143, 144]، اما نظریه عمومی‌تر در این خصوص این است که در ایونت‌هایی که مبتنی بر تلفیق DNA هترولوگ نیست و به عبارت دیگر در درج و حذف‌های کوچک القا شده با سازوکار اتصال انتهای غیرهمولوگ، شامل قوانین GMOs نمی‌شود. اما در ایونت‌های ایجاد شده با سازوکار نوترکیبی همولوگ با توالی الگوی بیگانه به‌خصوص در مورد یک ژن کامل که انتظار می‌رود منجر به یک موجود با DNA نوترکیب شود، در این صورت باید به‌عنوان یک GMOs شناخته شده و مورد ملاحظه قوانین آن قرار گیرد^[145]. به‌عنوان مثال در قارچ خوراکی مقاوم به قهوه‌ای شدن که از طریق غیرفعال کردن ژن‌های کدکننده پلی‌فنول اکسیداز با استفاده از سیستم CRISPR/Cas9 به دست آمد اگرچه توانست از قوانین مربوط به موجودات GMOs فرار کند، اما مخالفین این محصول بر این باورند که باید آن را مورد ارزیابی مجدد قرار داد^[146].

با وجود ویژگی‌های قدرتمند CRISPR در ویرایش ژنوم این سیستم محدودیت‌هایی نیز دارد. مهم‌ترین چالش در این زمینه اثرات خارج از هدف آن است. کشف پروتئین جدید Cpf1 که دارای فعالیت ویرایشی بالاتری نسبت به Cas9 است، منجر به افزایش کارایی و دقت این سیستم شد. بنابراین تحقیق در زمینه تولید نسخه‌های جدیدتر و با کارایی بالاتر Cas برای افزایش دقت و کاهش برش‌های خارج از هدف ادامه دارد. در این خصوص شاید بتوان از طریق مهندسی پروتئین به نسخه‌های از پیش طراحی‌شده با کارایی بالاتر رسید، اگرچه تاکنون گزارشی در این مورد منتشر نشده است.

یکی دیگر از چالش‌های موجود، افزایش نگرانی‌های اخلاقی ناشی از کاربرد CRISPR است؛ به‌عنوان مثال می‌توان به تغییر سلول‌های ژرم‌لاین انسان برای ایجاد بچه‌های مهندسی‌شده اشاره نمود^[147]. بنابراین ایجاد و تدوین مقررات مربوط به کاربرد روش‌های ویرایش ژنوم در پزشکی و تحقیقات پایه ضروری به نظر می‌رسد.

به‌طور کلی سیستم‌های TALENs و CRISPR-Cas9 به‌دلیل شناخت یک‌به‌یک نوکلئوتیدها که منجر به سادگی در طراحی و ساختار آنها می‌شود، مزیت‌های قابل ملاحظه‌ای نسبت به سیستم ZFNs دارند. همچنین قابلیت‌های سیستم CRISPR-Cas در سه بعد ژنومیکس، ترانسکریپتومیکس و اپی‌ژنومیکس آشکار شده است، که به این روش اجازه می‌دهد تا مجموعه مشخصی از ژن‌ها را به‌طور همزمان القا یا سرکوب نموده و در همان زمان به برنامه‌ریزی مجدد اپی‌ژنوم نیز کمک کنند^[18] (جدول‌های ۴، ۵، ۶، ۷ و ۸).

منابع محاسباتی برای ویرایش دقیق ژنوم می‌تواند به‌طور کلی به سه دسته شامل ابزارها و بسته‌ها، پایگاه داده و منابع شبکه تقسیم‌بندی شود. هر کدام از این منابع خصوصیات منحصربه‌فرد خود را داشته و روی حوزه کاربرد خود تمرکز دارد. برخی از آنها ویژه ژنوم‌های مشخص و اختصاصی بوده و برخی عمومی هستند. برخی از ابزارها روی سرعت و کارایی روی ژنوم‌های بزرگ متمرکز هستند و برخی تابع پارامترهای سخت‌گیرانه الگوریتم اختصاصی خود هستند. نتایج پیش‌بینی برخی از ابزارهایی که در چند سال اخیر ایجاد شده‌اند مانند SAPTA، CRISPR Optimal Target، Finder، COSMID و CCTop اعتبارسنجی شده است و بنابراین اثربخشی آنها مستند است. در حالی که تعداد کمی از آنها مانند CROP-IT و sgrNA Scorer پیش‌بینی را براساس آزمون‌های قبلی نوکلئازهای مهندسی‌شده انجام داده‌اند. در خصوص جست‌وجوی ژنوم برای جایگاه‌های خارج از هدف برخی از ابزارها مانند CasOT و sgrNACas9 علاوه بر تعداد، موقعیت جفت‌های ناجور را نیز جست‌وجو می‌کنند (برای مثال این که آنها در ناحیه non-seed یا seed قرار گرفته‌اند). در حالی که برخی دیگر همچون Cas-OFFinder، CRISPRdirect و COSMID و علاوه بر جفت‌های ناجور جهش‌های indels را نیز برای پیش‌بینی جایگاه‌های خارج از هدف جست‌وجو می‌کنند.

تکنولوژی NGS یک شیوه با توان عملیاتی بالا برای غربالگری کلون‌های CRISPR-Cas9 است^[135]. با این وجود ابزارهای آنالیز داده‌های CRISPR NGS محدود است. ابزارهایی CRISPR-GA، CRISPResso، BATCH-GE و Cas-analyzer قادر به آنالیز تنها یک نمونه بوده و خصوصیات بصری ندارند. همچنین هیچ‌کدام از آنها قادر به نشان‌دادن حذف‌ها و درج‌های بزرگ نیستند. در مقابل CRISPR-DAV برای آنالیز داده‌های CRISPR NGS قادر به آنالیز تعداد زیادی نمونه است. این ابزار از BWA برای هم‌ردیفی اولیه و شناسایی indelها و از ABRA برای بهبود شناسایی indelsهای بزرگ استفاده می‌نماید^[136]. مجموعه‌ای از نرم‌افزارها و پایگاه داده‌های مربوط به سیستم‌های مختلف ویرایش ژنوم در جداول ۷-۲ ارائه شده است.

از محدودیت‌های این تکنیک‌ها می‌توان به رقابت این محصولات با نسل جدید گیاهان تراریخته و این که آیا قوانین GMO شامل محصولات ویرایش‌شده نیز می‌شوند یا خیر و همین‌طور سایر ملاحظات اخلاقی اشاره نمود. مهم‌ترین چالش پیش رو نیز اثرات خارج از هدف این تکنیک‌ها است. پژوهش در زمینه تولید نسخه‌های جدیدتر و با کارایی بالاتر Cas به‌منظور افزایش صحت و کاهش برش‌های خارج از هدف نیز می‌تواند برای مطالعات آتی پیشنهاد شود.

نتیجه‌گیری

کشف ابزارهای مختلف ویرایش ژنوم شامل سیستم ZFNs، TALENs و CRISPRs امکان تغییر دقیق و هدفدار ژنوم را در بسیاری از موجودات و بافت‌های مختلف به وجود آورد. فناوری ویرایش ژنوم علاوه بر تحقیقات در حوزه پزشکی و داروسازی، در کشاورزی نیز با بهبود محصولات قادر است تغذیه بهتر و امنیت غذایی را فراهم آورد. به‌عنوان مثال می‌توان به موارد ذیل اشاره نمود: تولید گیاهان زراعی مقاوم به تنش‌های زیستی و غیرزیستی^[137-139]، مبارزه با آفات و پاتوژن‌های زیان‌آور از طریق مداخله CRISPR یا CRISPRi^[140, 141]، تولید متابولیت‌های

ابزار	Interface	موجود زنده	داده‌های ورودی	داده‌های خروجی	آدرس URL	سال	منبع
CRISPRone	Web user interface	باکتری‌ها و آرکئی‌ها	بارگذاری فایل توالی	نتایج پیش‌بینی برای هر توالی گزارش می‌شود. گزارش به‌صورت متنی حاوی آرایه‌های CRISPR و ژن‌های Cas به‌صورت توام یا فقط آرایه‌های CRISPR به‌تنهایی، ژن‌های Cas به‌تنهایی یا هیچ‌کدام از آنها باشد.	http://omics.informatics.indiana.edu/CRISPRone/	۲۰۱۷	[148]
CRISPR-RT	Web user interface	۱۰ موجود مدل از جمله انسان	بارگذاری توالی RNA و رونوشت مرجع	برای هر توالی ورودی جفت‌های هدف یا خارج از هدف در مقابل رونوشت مرجع انتخاب شده را یافته و به‌صورت گرافیکی نمایش داده می‌شود.	http://bioinfolab.miamioh.edu/CRISPR-RT/	۲۰۱۷	[149]
CREATE	Web user interface	اشربشیا کلی	نام ژن، نام کتابخانه، توالی نوکلئوتید، ریشه آمینواسید هدف	کاست ویرایش شده	http://www.thebioverse.org/	۲۰۱۷	[150]
CRISPR-DAV	Command line interface	همه موجودات	فایل‌هایی که مسیرها و پارامترهای نرم‌افزار و جایگاه‌های CRISPR را نشان می‌دهد.	گزارشی که شامل تعداد خوانش‌ها در مراحل مختلف، عمق خوانش‌ها و فراوانی indel در آمپلیکون، تعداد و درصد خوانش‌های indel، فراوانی آلل، SNPs و HDR است و به‌صورت نمودار ارائه می‌شود.	https://github.com/pinetree1/crispr-dav	۲۰۱۷	[136]
CRISPR-FOCUS	Web user interface	انسان و موش	سیمبل ژن، RefSeq ID	در فایل خروجی این نرم‌افزار نتایج مربوط به توالی sgRNA، نام کروموزومی که که توالی هدف در آن قرار گرفته، هماهنگ‌کننده شروع توالی sgRNA، هماهنگ‌کننده پایانی توالی sgRNA، نمره کارایی sgRNA، نمره اختصاصیت sgRNA، تعداد جایگاه‌های بالقوه خارج از هدف که در مناطق غیراگزونی ژنوم قرار گرفته‌اند (در رابطه با بهترین جفت)، تعداد جایگاه‌های بالقوه خارج از هدف بالقوه که در اگزون اما مناطق غیرکدکننده قرار گرفته‌اند (در رابطه با بهترین جفت) و تعداد جایگاه‌های بالقوه خارج از هدف بالقوه که در مناطق کدکننده ژنوم قرار گرفته‌اند (در رابطه با بهترین جفت) نشان داده می‌شود.	http://cistrome.org/crispr-focus/	۲۰۱۷	[151]
CRF	Web user interface	باکتری‌ها و آرکئی‌ها	توالی DNA/RNA با فرمت FASTA	آرایه‌های کریسپر	http://bioinfolab.miamioh.edu/crf/home.php#	۲۰۱۷	[152]
Cas-analyzer	Web user interface	همه موجودات	خوانش‌های با انتهای تک و یا جفتی با فرمت gzipped fastq یا Fastq	نتایج بعد از آنالیز داده‌های NGS که به‌طور نسبی شامل مقدار کمی از داده‌های ورودی است با ژنوم مرجع هم‌مدیف می‌شوند. نتایج هم‌مدیف شده با توجه به نوع جهش دسته‌بندی شده و علاوه بر آن موقعیت و اندازه درج یا حذف به‌صورت نمودار نمایش داده می‌شود. این ابزار برای نوکلئازهای جفتی مانند ZFNs، TALENs، Cas9 nickases، dCas9-FokI و Nucleases و تکی مانند dCas9، CjCas9، SaCas9، SpCas9 و StCas9، NmCas9، AsCpf1/LbCpf1 به کار می‌رود.	http://www.rgenome.net/cas-analyzer/#!	۲۰۱۷	[153]
Guide Picker	Web user interface	انسان و موش	نام ژن	فهرستی از توالی‌های راهنما همراه با مقایسه مربوط به نمره‌های هدف و خارج از هدف ارائه می‌شود. این توالی‌های راهنما سپس می‌توانند در ابزارهای مربوط به درج و حذف ژن موجود در (https://www.deskgen.com/guidebook/) یا در یک جست‌وجوگر با قابلیت مقایسه ژنوم برای تعیین مکان دقیق آنها در رونوشت یا رونوشت‌ها چک شوند.	https://www.deskgen.com/guide-picker/	۲۰۱۷	[154]
CRISPRAnalyzer	Command line interface	همه موجودات	داده‌های ورودی در این ابزار شامل سه نوع فایل متفاوت است: ۱) فایل کتابخانه sgRNA با فرمت FASTA، ۲) فایل توالی‌یابی داده‌های خام با پسوند fastq.g (۳) فایل شمارش با پسوند tx.	حاشیه‌نویسی و مستندسازی ژن‌های کاندید، عملکرد sgRNA و پیش‌بینی جایگاه‌های اتصال sgRNA	https://github.com/boutrosfab/CRISPRAnalyzer	۲۰۱۷	[155]
CRISPRtools	Web user interface	موش	جایگاه جهش نقطه‌ای، Ensembl Exon Ids (e.g. ENSMUSE00000292922)	این ابزار قابلیت طراحی آزمایش را در دو حالت درج ژن یا حذف ژن دارد. نتایج به‌صورت یک فایل فشرده در هر مورد ارائه می‌شود.	http://crispr-tools.jax.org/	۲۰۱۷	[156]
ANNOgesic	Command line interface	باکتری‌ها و آرکئی‌ها	داده‌های RNA-Seq	حاشیه‌نگاری ژنوم با کیفیت بالا، شناسایی خصوصیات مختلف ژنومیک همچون ژن، CDSs، tRNAs و rRNAs، جایگاه‌های شروع نسخه‌برداری (TSSs)، جایگاه‌های پردازش (PSs)، نواحی غیرقابل ترجمه (UTRs) و RNAهای مرتبط با CRISPR	https://github.com/Sung-Huan/ANNOgesic	۲۰۱۷	[157]

منبع	سال	آدرس URL	داده‌های خروجی	داده‌های ورودی	موجود زنده	Interface	ابزار
[158]	۲۰۱۷	http://save.nrihub.org/	گزارش تصویری شامل خلاصه ای از کیفیت داده های توالی یابی شده و انتخاب sgRNAs برای یک ژن	بارگذاری فایل کتابخانه sgRNA با فرمت FASTA	انسان و موش	GUI	save
[159]	۲۰۱۷	https://github.com/HansenHELab/sgTiler	فهرستی از همه sgRNAs های کاندید و غربال شده با فرمت TXT+PDF	فایل مناطق اگزونی ژنوم	همه موجودات	Command line interface	sgTiler
[123]	۲۰۱۶	http://bioinfo.imtech.res.in/manojk/gecrispr/	انتخاب و نمایش بهترین sgRNA همراه با PAM و درصد GC	توالی ژن یا ژنوم مورد نظر با فرمت FASTA	موجودات مدل	Web user interface	ge-CRISPR
[160]	۲۰۱۶	http://www.phytocrispex.biologie.ens.fr/CRISP-Ex/crispexdownloads/	sgRNA	DNA توالی	۱۳	Command line interface	PhytoCRISP-Ex
[161]	۲۰۱۶	http://crispor.tefor.net/	توالی‌های خارج از هدف بالقوه، پیش‌بینی توالی‌های راهنما برای PAMs	توالی ژنومی (کمتر از ۱۰۰۰ جفت‌باز)، توالی PAM	۱۲۰ ژنوم شامل گیاهان و بسیاری از موجودات مدل	Web user interface	CRISPOR
[162]	۲۰۱۶	http://www.healthinformaticslab.org/supp/	حاشیه‌نویسی CRISPRs و شناخت سیگنال‌های تکراری DR (Direct Repeats) و فاصله‌انداز	توالی ژنومی	همه موجودات	Command line interface	CRISPRdigger
[163]	۲۰۱۶	https://github.com/WouterSteyaert/BATCH-GE	ارایه گزارش ریزی از کارآیی ویرایش ژنوم برای هر نمونه، اطلاعاتی درباره HDR و بصری‌کردن خوانش‌ها در جست‌وجوگر UCSC	داده‌های به‌دست‌آمده از توالی‌یابی NGS	همه موجودات	Command line interface	BATCH-GE
[164]	۲۰۱۶	http://www.bioinf.uni-freiburg.de/Software/CRISPRleader/	حاشیه‌نگاری کاملی از آرایه‌های CRISPR، جهت‌گیری رشته و حد و مرز مناطق حفاظت شده که می‌تواند در هر جست‌وجوگر ژنومی بارگذاری شود.	ژنوم کامل یا پیش‌نویس آن	باکتری‌ها و آرکئی‌ها	Command line interface	CRISPRleader
[165]	۲۰۱۶	https://bitbucket.org/jianma/crisprdo	sgRNA	مناطق هدف	انسان، موش، مگس، کرم خاکی و گورماهی	Command line interface	CRISPR-DO
[166]	۲۰۱۶	http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/breakingcas/index.php	اطلاعات ریزی در مورد توالی‌های هدف و خارج از هدف، نمایش نمره، مختصات و همپوشانی ژن‌ها و سایر نتایج به‌صورت ارائه یک جدول	یک یا چندین توالی DNA تا ۲۰۰۰۰ نوکلئوتید	همه موجودات	Web user interface	Breaking-Cas
[167]	۲۰۱۶	https://sourceforge.net/projects/ct-finder/	sgRNA	DNA توالی	موجودات مدل اصلی شامل انسان، موش و آرابیدوپسیس	Web user interface	CT-Finder
[168]	۲۰۱۶	http://crispeta.crg.eu/manual	sgRNA	توالی‌های هدف	انسان، موش، گورماهی، کرم و مگس میوه	Web user interface	CRISPETa
[169]	۲۰۱۶	https://github.com/boutros1ab/cld	sgRNA	CLD نیاز به سه فایل به عنوان ورودی دارد: توالی ژنومی، یک فایل پارامتر و یک فهرست ژن	همه موجودات	Command line interface	CLD

منبع	سال	آدرس URL	داده‌های خروجی	داده‌های ورودی	موجود زنده	Interface	ابزار
[170]	۲۰۱۶	http://crispy.secondarymetabolites.org/	sgRNA	ژن یا توالی هدف	هر نوع ژنوم میکروبی	Command line interface	CRISPy-web
[171]	۲۰۱۶	http://bioanalysis.otago.ac.nz/CRISPRDetect/	پیش‌بینی آرایه‌های CRISPR	توالی ژنومی	باکتری‌ها و آرکئی‌ها	Command line interface	CRISPRDetect
[172]	۲۰۱۵	http://grna.ctegd.uga.edu/	sgRNA	توالی هدف	۲۵	Web user interface	EuPaGDT
[173]	۲۰۱۵	http://crispr.dfci.harvard.edu/SSC/	sgRNA	توالی DNA	هر ژنوم انتخابی	Web user interface	Spacer Scoring for CRISPR (SSC)
[174]	۲۰۱۵	http://www.rgenome.net/cas-designer/	تعداد جفت‌های ناچور، همه sgRNAsهای ممکن	توالی منطقه هدف	۳۰	Command line interface	Cas-Designer
[175]	۲۰۱۵	http://www.multicrispr.net/	sgRNA, GC%	Ensembl transcriptIDs	۱۲	Web user interface	CRISPR multitargeter
[176]	۲۰۱۵	http://crispr-era.stanford.edu/InitAction.action	sgRNAs	توالی هدف	۹	Web user interface	CRISPR-ERA
[177]	۲۰۱۵	http://crispr.cos.uni-heidelberg.de/	فهرستی از جایگاه‌های هدف sgRNA که براساس تعداد جایگاه‌های خارج از هدف پیش‌بینی رتبه‌بندی شده‌اند.	توالی منطقه هدف یا توالی Fasta با ۲۳ تا ۵۰۰ جفت‌باز	۱۵	Web user interface	CCTop
[178]	۲۰۱۵	http://crispresso.rocks/	جایگاه‌های هدف و خارج از هدف بالقوه	CRISPResso نیاز به دو ورودی دارد: (۱) خوانش‌های جفتی (دو فایل) یا خوانش‌های تکی (یک فایل) با فرمت fastq که از آزمایشات توالی‌یابی به دست آمده است. (۲) یک توالی آمپلیکون مرجع برای سنجش و کمی‌کردن کارایی جهش‌زایی هدفدار	هر ژنوم انتخابی	Command line interface	CRISPResso
[179]	۲۰۱۵	http://www.crisprscan.org/	sgRNA	توالی DNA	گورماهی	Web user interface	CRISPRscan
[129]	۲۰۱۵	http://cheetah.bioch.virginia.edu/AdliLab/CROP-IT/homepage.html	نمره‌دهی و رتبه‌بندی جایگاه‌های خارج از هدف بالقوه، تعداد، موقعیت و شناخت جفت‌های ناچور	sgRNA	انسان و موش	Web user interface	CROP-IT
[180]	۲۰۱۵	http://www.protospacer.com	یک منبع آفلاین برای طراحی سریع sgRNA است. از یک پایگاه داده به‌عنوان (front-end) GUI و ابزار نقشه‌یابی توالی استفاده می‌کند.	توالی ژنومی هدف	همه موجودات	GUI	Protospacer WB

منبع	سال	آدرس URL	داده‌های خروجی	داده‌های ورودی	موجود زنده	Interface	ابزار
[125]	۲۰۱۵	http://crispr.wustl.edu/	فهرست sgRNA که به‌وسیله نمره تاثیر رتبه‌بندی شده است.	نماد ژن یا توالی ۲۴- ۳۰۰۰۰ جفت‌بازی	انسان و موش	Web user interface	WU-CRISPR
[127]	۲۰۱۴	http://www.rgenome.net/cas-offinder/	جایگاه‌های خارج از هدف با تعداد و موقعیت جفت‌های ناجور	sgRNA	۲۰	Command line interface	Cas-OFFinder
[134]	۲۰۱۴	http://eendb.zfgenetics.org/casot/	sgRNA و جایگاه‌های خارج از هدف	فایل FASTA	همه موجودات	Command line interface	CasOT
[132]	۲۰۱۴	https://chopchop.rc.fas.harvard.edu/	محاسبه جایگاه‌های خارج از هدف و رتبه‌بندی sgRNA به‌وسیله مقدار GC	ژن، توالی منطقه هدف	۲۲	Web user interface	CHOPCHOP
[128]	۲۰۱۴	https://crispr.bme.gatech.edu/	فهرستی از جایگاه‌های هدف کاملاً منطبق را دسته‌بندی می‌کند	sgRNA	۷	Web user interface	COSMID
[181]	۲۰۱۴	http://cbi.hzau.edu.cn/crispr/	sgRNA، پیش‌بینی جایگاه‌های خارج از هدف و جایگاه‌های برش آنزیم‌های محدودگر برای هر sgRNA	توالی هدف	۳۰ (گیاه)	Web user interface	CRISPR-P
[182]	۲۰۱۷	http://cbi.hzau.edu.cn/CRISPR2/	در این ابزار سیستم نمره‌دهی تغییر یافته‌ای برای سنجش اثرات خارج از هدف ایجاد شده است. طراحی توالی‌های راهنما را برای سیستم‌های متفاوت کریسپر همچون Cpf1 و اندونوکلازهای متفاوت cas9 فراهم می‌کند. آنالیز جامعی از توالی راهنما همچون محتوای GC، جایگاه اندونوکلازهای محدودکننده و ساختار دوم sgRNA در نسخه ۲ فراهم شده است. همچنین در صورتی که ژنوم یا توالی مورد نظر در فهرست انتخاب شده نباشد می‌توان آن را در قسمت مورد نظر بارگزاری و sgRNA را شناسایی کرد.	توالی هدف	۴۹ (گیاه)	Web user interface	CRISPR-P 2.0
[183]	۲۰۱۴	http://crispr.dbcls.jp/	توالی‌های هدف را برای یک رونوشت جست‌وجو می‌کند.	توالی منطقه هدف	۲۰	Web user interface	CRISPRdirect
[126]	۲۰۱۴	http://www.bioconductor.org/packages/release/bioc/html/CRISPRseek.html	به‌عنوان یک بیوکنداکتور در بسته نرم‌افزاری R ایجاد شده است و خروجی آن شامل sgRNAs و جایگاه‌های خارج از هدف است که به‌وسیله سیستم نمره‌دهی متشکل از چریمه جفت‌های ناجور حاصل از داده‌های تجربی به‌دست می‌آید.	هر توالی ورودی	هر ژنوم انتخابی	Command line interface	CRISPRseek
[131]	۲۰۱۴	http://www.e-crisp.org/E-CRISP/	جایگاه هدف CRISPR	نماد ژن، ID یا توالی FASTA	>40	Web user interface	E-CRISP
[184]	۲۰۱۴	http://tools.flycrispr.molbio.wisc.edu/targetFinder/	همه جایگاه‌های CRISPR	توالی منطقه هدف	مگس سرکه	Web user interface	flyCRISPR
[185]	۲۰۱۴	http://gt-scan.braembl.org.au/gt-scan/	sgRNA و جایگاه های ژنومی با صفر تا سه جفت ناجور	توالی یا فایل FASTA	۲۰	Web user interface	GT-Scan

ادامه جدول (۴) ابزارها و بسته‌های نرم‌افزاری مربوط به طراحی sgRNA و پیش‌بینی جایگاه‌های خارج از هدف در سیستم CRISPR-Cas9

ابزار	Interface	موجود زنده	داده‌های ورودی	داده‌های خروجی	آدرس URL	سال	منبع
sgRNAcas9	Command line interface	همه موجودات	توالی منطقه هدف	فایل چندگانه که شامل همه طرح‌های ممکن برای یک توالی داده است (در این بسته نرم‌افزاری چهار مرحله اصلی شامل شناخت جایگاه‌های هدف CRISPR، ارزیابی خارج از هدف‌ها به وسیله نقشه‌یابی کل ژنوم، طراحی الیگونوکلوئتیدها برای ساخت وکتور بیانی sgRNA و در پایان طراحی پرایمرهای PCR برای جایگاه‌های برش هدف برای تایید فعالیت Cas9 است).	http://www.biotoools.com/col.jsp?id=103	۲۰۱۴	[186]
SSFinder	Command line interface	همه موجودات	فایل FASTA	NGG-PAM	https://code.google.com/p/sfinder/	۲۰۱۴	[187]
CRISPR-GA	Web user interface	هر ژنوم انتخابی	منطقه ژنومی مورد نظر با PCR تکثیرشده و پس از توالی‌یابی به عنوان ورودی بارگزاری می‌شود	InDel شامل مکان و خصوصیات	http://54.80.152.219/	۲۰۱۴	[188]
TIDE	Command line interface	همه موجودات	فایل داده های توالی یابی شده با پسوند abif یا scf format	InDel شناسایی و کمیت	http://tide.nki.nl/	۲۰۱۴	[189]
Crass	Command line interface	همه موجودات	فایل fasta یا fastq	همه جایگاه‌های شناسایی شده CRISPRs	http://bioinformatics.ninja/crass/	۲۰۱۳	[190]
Cas9 Design	Web user interface	۱۰	توالی منطقه هدف	sgRNA, AT%	http://cas9.cbi.pku.edu.cn/	۲۰۱۳	[191]
CRISPR design	Web user interface	۱۵	توالی منطقه هدف (تکی یا دسته‌بندی‌شده)	جفت‌های ناجور	http://crispr.mit.edu/	۲۰۱۳	[67]
ZiFiT	Web user interface	۹	توالی منطقه هدف (تکی یا دسته‌بندی‌شده)	SgRNA جایگاه‌های خارج از هدف با صفر تا سه جفت ناجور، موقعیت و شناسایی جفت‌های ناجور، موقعیت ژنومی جایگاه‌های خارج از هدف	http://zifit.partners.org/ZiFiT/	۲۰۱۰	[133]

جدول (۵) پایگاه داده‌ها در سیستم CRISPR-Cas9

ابزار	موجود زنده	توصیف	سال	URL	منبع
Cpf1-Database	۱۲	این ابزار برای طراحی sgRNA در سیستم CRISPR-Cpf1 است. حاوی همه اهداف از پیش جست‌وجوشده برای ارتولوگ‌های مختلف Cpf1 همچون نوکلئارهای AsCpf1 و LbCpf1 که توالی 5-TTTN-3 را در ۱۲ ژنوم شناسایی می‌کنند و همچنین به‌طور موفقیت‌آمیزی در ویرایش سلول‌های انسانی به‌صورت in vivo به کار رفته‌اند، است.	۲۰۱۷	http://www.rgenome.net/cpf1-database/	[192]
Anti-CRISPRdb	موجودات مختلف	این پایگاه یک منبع آنلاین دسترسی به اطلاعات مربوط به بیش از ۴۰۰ پروتئین ضد CRISPR است که با روش‌های تجربی و بیوانفورماتیک به دست آمده‌اند. این پایگاه داده به کاربران اجازه می‌دهد تا پروتئین‌های anti-CRISPR خود را جست‌وجو، غربالگری و بلاست نموده و همچنین آنها را با سایر جوامع علمی مرتبط به اشتراک گذارند.	۲۰۱۷	http://cefg.uestc.edu.cn/anti-CRISPRdb/	[193]
GenomeCRISPR	انسان (به سایر موجودات قابل بسط است)	این پایگاه برای آزمایشات غربالگری CRISPR/Cas9 با توان عملیاتی بالا است. در بردارنده داده‌های بیش از ۵۵۰۰۰۰ sgRNA که در بیشتر از ۸۰ آزمایش متفاوت در ۴۸ سلول انسانی متفاوت به‌کاررفته است. حاوی گزینه‌ها و ابزارهایی است که به کاربر اجازه می‌دهد به‌آسانی نتایج اسکرین‌های متفاوت را بررسی و مقایسه کند.	۲۰۱۷	http://genomecrispr.dkfz.de/#/	[194]
PICKLES	انسان	در این پایگاه کاربر میتواند داده‌های مورد نظر خود را در مجموعه بزرگی از کتابخانه‌های ناک‌اوت و ناک‌داون غربال شده در عمدتاً سلول‌های سرطانی شامل بیش از ۱۸۰۰۰ ژن و بیش از ۵۰ سلول‌های جست‌جو و دانلود نماید.	۲۰۱۷	http://pickles.hart-lab.org	[195]

منبع	URL	سال	توصیف	موجود زنده	ابزار
[196]	https://img.jgi.doe.gov/cgi-bin/m/main.cgi?section=Help&page=using_index	۲۰۱۶	در این پایگاه آنالیز و حاشیه‌نویسی ژنوم و متاژنوم در آرکئی‌ها، باکتری‌ها، پلاسמידها و ویروس‌ها به‌صورت مقایسه‌ای انجام می‌شود. دارای ویژگی‌های پیش‌بینی شامل ژن‌های کدکننده پروتئین، rRNAs های غیرکدکننده و تنظیمی و همچنین عناصر CRISPR است.	آرکئی‌ها، باکتری‌ها، پلاسמידها و ویروس‌ها	IMG/M
[197]	http://www.rgenome.net/cas-database/	۲۰۱۶	این پایگاه ابزاری مبتنی بر شبکه با کاربری ساده برای طراحی sgRNA در مقیاس ژنوم است. این ابزار می‌تواند برای ساخت کتابخانه‌های بهینه sgRNA که هزاران توالی کدکننده را در ۱۲ موجود متفاوت هدف‌گیری می‌کند، به کار رود.	۱۲	Cas-Database
[198]	http://biodb.sdu.edu.cn/gc/index.html	۲۰۱۶	پایگاه اختصاصی مربوط به انگور است که حاوی ۳۰ میلیون spacers است. کارکرد مهم این پایگاه کاربرد سیستم CRISPR/Cas9 به‌عنوان یک ابزار ویرایش ژنوم برای اصلاح مولکولی در انگور است. دارای دو بخش اصلی جست‌وجو و طراحی است. در بخش جست‌وجو کاربر می‌تواند جایگاه‌های protospacers و موتیف مجاور آن (PAM) را در یک ژن به‌وسیله اطلاعات مشخصی همچون ID ژن یا Pfam ID جست‌وجو کند. در بخش طراحی کاربر protospacers و PAM را در توالی مورد نظر شناسایی و طراحی نماید.	انگور	Grape-CRISPR
[199]	http://crispr.technology	۲۰۱۶	این پایگاه یک سیستم حاشیه‌نگاری جامعی را برای سیستم CRISPR ایجاد نموده است. مجموعه کاملی از خصوصیات gRNA شامل تنوع و توالی، مولفه‌های ترمودینامیک، آنالیزهای خارج از هدف و جایگاه‌های PAM است. جست‌وجو در این پایگاه به‌وسیله توالی مرجع در NCBI (Ref Seq)، سمبل ژن یا هر تولی ۲۳ جفت‌بازی به شکل N20NGG انجام می‌شود. در قسمت جست‌وجوی پیشرفته نیز کاربر می‌تواند با اعمال فیلترهای مورد نظر اهداف CRISPR را در یک ژن یا ناحیه مشخصی از آن شناسایی کند.	موجودات مختلف	grID
[200]	http://research.nhgri.nih.gov/CRISPRz/	۲۰۱۵	این پایگاه حاوی توالی‌های هدف CRISPR/Cas9 است که به‌طور آزمایشگاهی در گورماهی اعتبارسنجی شده‌اند. این پایگاه در تلاش برای ایجاد فهرست جامعی از اهداف CRISPR دارای اعتبار از منابع منتشر شده و همین‌طور پروژه در حال اجرای ژنوم گورماهی ایجاد شد.	انسان، موش و گورماهی	CRISPRz
[201]	http://www.sanger.ac.uk/hgtg/wge/	۲۰۱۵	پایگاه WGE در حال حاضر جایگاه‌های تکی و جفتی CRISPR را ذخیره و اطلاعات خارج از هدف که در آگروم موش و انسان قرار گرفته است را محاسبه می‌کند. نمره‌دهی و نمایش جایگاه‌های خارج از هدف ساده بوده و شناخت جایگاه‌های CRISPR با کیفیت به‌سرعت می‌تواند فیلتر شود. این پایگاه همچنین ابزاری برای طراحی و نمایش ناقل‌های هدف‌گیری ژن مهیا نموده است. از یک جست‌وجوگر ژنوم به نام Genoverse استفاده می‌کند. به‌طور کلی سیستم WGE شامل چهار قسمت است. یک ابزار آنالیزکننده برای محاسبه جایگاه‌های خارج از هدف، یک پایگاه برای ذخیره همه داده‌های محاسبه شده، یک وب‌سایت برای محاسبه نمره به‌صورت بلادرنگ و یک طراح ناقل که همه داده‌ها را از طریق یک برنامه کاربردی در دسترس می‌سازد.	انسان و موش	WGE
[202]	http://crdd.osdd.net/serve rs/crisprge/	۲۰۱۵	CrisprGE یک هاب مرکزی مربوط به CRISPR/Cas در ویرایش ژنوم است. در حال حاضر این پایگاه تعداد ۴۶۸۰ ژن ویرایش‌شده با سیستم CRISPR که شامل ۲۲۳ ژن منحصر به فرد از ۳۲ موجود مدل و سایر موجودات است را نگهداری می‌کند و حاوی اطلاعاتی درباره موجود زنده، ژن، توالی ژن هدف، تغییرات ژنتیکی، کارایی ویرایش ژنوم، سلول‌های بنیادی و غیره است. تسهیل جست‌وجو همرا با بازیابی آسان داده‌ها این ابزار را کاربرپسند نموده است. این پایگاه همچنین شامل ابزارهای مفیدی همچون BLAST، CrisprGE، BLAST NTdb و CRISPR Mapper است.	۳۲ مدل و سایر موجودات	CrisprGE
[203]	http://eendb.zfgenetics.org/	۲۰۱۲	جدیدترین نسخه این پایگاه (نسخه ۱/۱) حاوی گزارشات مربوط به CRISPR/Cas و TALENs، ZFNs در موجودات مختلف است.	موجودات مختلف	EENdb
[204]	http://crispi.genouest.org/	۲۰۰۹	یک محیط اختصاصی CRISPR در ژنوم های پروکاریوتیک شامل ۷۱ آرکئی با ۲۹۱ CRISPR و ۹۸۷ باکتری با ۲۱۰۳ CRISPR و فهرست جامعی از ژن های Cas می باشد. کاربرپسند بوده و شامل ابزارها و کارکردهای مختلف گرافیکی که به کاربر اجازه استخراج نتایج خود را می دهد.	پروکاریوتها	CRISPI

جدول ۶) ابزارها و بسته‌های نرم افزاری مربوط به طراحی TALENs

منبع	URL	سال	داده خروجی	داده ورودی	موجود زنده	Interface	ابزار
[132]	https://chopchop.rc.fas.harvard.edu/	۲۰۱۴	دسته‌بندی براساس موارد زیر انجام می‌شود: (۱) تعداد جایگاه‌های غیرهدف (۲) آیا جایگاه‌های غیرهدف دارای جفت‌های ناجور هستند یا بی‌نقص می‌باشند. (۳) آیا جایگاه‌های هدف درون ساختار ژن قرار گرفته‌اند.	ژن، توالی منطقه هدف	۲۳	Web user interface	CHOPCHOP
[28]	http://bit.ly/PROGNOS	۲۰۱۴	رتبه‌بندی براساس نزدیک‌ترین ژن، تعداد جفت‌های ناجور و اندازه محصول PCR انجام می‌شود.	توالی هدف	هر ژنوم انتخابی	Command line interface	PROGNOS
[205]	http://bao.rice.edu/Research/BioinformaticTools/TAL_targeter.html	۲۰۱۴	فهرستی از جایگاه‌های بالقوه هدف TALEN	توالی ژن مورد نظر	هر ژنوم انتخابی	Web user interface	SAPTA
[206]	http://galaxy.informatik.uni-halle.de	۲۰۱۳	جایگاه‌های بالقوه هدف و خارج از هدف TALEN	توالی ژن مورد نظر	هر ژنوم انتخابی	Command line interface	TALENOffer
[133]	http://zifit.partners.org/ZiFiT/	۲۰۱۳	جایگاه‌های بالقوه اتصال ZFN	توالی منطقه هدف (تکی و دسته‌بندی شده)	هر ژنوم انتخابی	Web user interface	ZiFiT
[207]	http://www.e-talen.org/E-TALEN/	۲۰۱۳	خروجی آماری از تعداد موفقیت‌آمیز و ناموفق طراحی TALEN	توالی RVD ژن و شناسه	انسان، موش، گورماهی، مگس سرکه و آرابیدوپسیس	Web user interface	E-TALEN
[208]	http://www.talendesign.org/	۲۰۱۳	جایگاه‌های ممکن اتصال، محدودکننده مناسب و RVDs	Entrez ژن یا فایل متنی حاوی توالی با فرمت FASTA	هر ژنوم انتخابی	Web user interface	Mojo Hand
[209]	http://idtale.kaust.edu.sa/index.html	۲۰۱۲	جایگاه‌های بالقوه هدف و خارج از هدف	توالی یا ID ژن	موجودات مدل مختلف	Web user interface	idTALE

جدول ۷) پایگاه داده‌ها در سیستم TALENs

منبع	URL	سال	داده خروجی	داده ورودی	موجود زنده	شناسه	ابزار
[210]	http://www.talenlibrary.net/	۲۰۱۳	این پایگاه مجموعه‌ای از نوکلئازهای TALE و مجموعه‌ای از ژن‌های کدکننده پروتئین‌های انسان و ژن‌های microRNA در مقیاس ژنوم است و دربردارنده ۱۸۷۴۰ جفت TALEN برای ژن‌های کدکننده پروتئین در انسان و ۵۴۰ جفت TALENs برای ۲۷۴ جایگاه miRNA است.	انسان			TALEN Library Resource
[203]	http://eendb.zfgenetics.org/	۲۰۱۲	جدیدترین نسخه این پایگاه (نسخه ۱/۱) حاوی گزارشات مربوط به ZFNs، TALENs و CRISPR/Cas در موجودات مختلف است.	موجودات مختلف			EENdb

جدول ۸) ابزارها و بسته‌های نرم‌افزاری مربوط به طراحی نوکلئاز انگشت‌روی ZFNs

منبع	URL	سال	داده خروجی	داده ورودی	موجود زنده	Interface	ابزار
[28]	http://bit.ly/PROGNOS	۲۰۱۴	دسته‌بندی براساس نزدیک‌ترین ژن، تعداد جفت‌های ناجور و اندازه محصول PCR انجام می‌شود.	توالی هدف DNA	هر ژنوم انتخابی	Command line interface	PROGNOS
[211]	http://ccg.vital-it.ch/tagger/targetsearch.html	۲۰۱۱	جفت‌های ZFN که دارای حداقل جایگاه‌های خارج از هدف بالقوه است.	توالی منطقه هدف یا اطلاعاتی درباره اختصاصیت اتصال ZFN's	۱۲	Web user interface	ZFN-Site
[133]	http://zifit.partners.org/ZiFiT/	۲۰۱۰	شناسایی جایگاه‌های بالقوه اتصال ZFN با استفاده از دو روش عمومی طراحی ZFP شامل سرهم‌بندی مازولار و OPEN. (نسخه جدید این وب سرور (ver 4.2) شامل ویژگی‌هایی برای طراحی CRISPR و TALENs نیز است).	توالی منطقه هدف (تکی و دسته‌بندی شده)	هر ژنوم انتخابی	Web user interface	ZiFiT
[212]	http://www.scripps.edu/barbas/zfdesign/zfdesignhome.php	۲۰۰۶	جایگاه‌های هدف پروتئین انگشت‌روی (ZFP)	تا ۱۰ کیلوباز DNA توالی	هر ژنوم انتخابی	Web user interface	Zink Finger Tools

منبع	URL	سال	توصیف	موجود زنده	ابزار
[203] http://eendb.zfgenetics.org/		۲۰۱۲	جدیدترین نسخه این پایگاه (نسخه ۱/۱) حاوی گزارشات مربوط به ZFNs، CRISPR/Cas و TALENs در موجودات مختلف است.	موجودات مختلف	EENdb
[33] http://zifdb.msi.umn.edu		۲۰۱۲	در این پایگاه کاربران اجازه دارند ZFs و ZFAsهای جدید را وارد کنند. یک پایگاه در سایه به‌طور موقتی داده‌های ارایه‌شده به‌وسیله کاربر را تا زمانی که به‌وسیله مسئول پایگاه تایید شود ذخیره می‌کند و پس از آن در پایگاه دائمی بارگیری می‌شود. این پایگاه حاوی ۳۱۹ واحد F1F2 و ۳۳۴ واحد F2F3 است که می‌تواند برای ساخت آرایه‌های CoDA به کار رود. به‌طور کلی نسخه جدید پایگاه ZifDB حاوی ۱۲۲۶ ZFs و ۱۱۲۳ ZFAs است.	موجودات مختلف	ZifDB
[213] http://web.iitd.ac.in/~sundar/zifbase/ZFs		۲۰۰۹	ZifBASE اطلاعاتی را در مورد پروتئین‌های انگشت‌روی (هم طبیعی و هم مهندسی‌شده)، تعداد واحدهای انگشت هر پروتئین انگشت‌روی (با انگشت‌های چندگانه) و هماهنگی بین انگشت‌های مجاور و موقعیت آنها نسبت به هم را فراهم می‌کند. مهم‌ترین مشکل این پایگاه این است که از اولین انتشار آن در ۲۰۰۹ که فقط شامل ۱۳۹ ZFPs است، تاکنون به‌روز نشده است.	موجودات مختلف	ZifBASE

the construction of artificial transcription factors. *J Biol Chem.* 2001;276(31):29466-78.

11- Hiroyuki S, Susumu K. New restriction endonucleases from *Flavobacterium okeanoicoites* (FokI) and *Micrococcus luteus* (MluI). *Gene.* 1981;16(1-3):73-8.

12- Bibikova M, Beumer K, Trautman JK, Carroll D. Enhancing gene targeting with designed zinc finger nucleases. *Science.* 2003;300(5620):764.

13- Lieberman-Lazarovich M, Levy AA. Homologous recombination in plants: An antireview. In: Birchler J, editor. *Plant chromosome engineering, methods in molecular biology (methods and protocols).* 701st Volume. Totowa NJ: Humana Press; 2011. pp. 51-65.

14- Pardo B, Gómez-González B, Aguilera A. DNA repair in mammalian cells: DNA double-strand break repair: How to fix a broken relationship. *Cell Mol Life Sci.* 2009;66(6):1039-56.

15- Rothkamm K, Krüger I, Thompson LH, Löbrich M. Pathways of DNA double-strand break repair during the mammalian cell cycle. *Mol Cell Biol.* 2003;23(16):5706-15.

16- Lieber MR. The mechanism of double-strand DNA break repair by the nonhomologous DNA end-joining pathway. *Annu Rev Biochem.* 2010;79:181-211.

17- Aguilera A. Double-strand break repair: Are Rad51/RecA-DNA joints barriers to DNA replication? *Trends Genet.* 2001;17(6):318-21.

18- Puchta H. Using CRISPR/Cas in three dimensions: Towards synthetic plant genomes, transcriptomes and epigenomes. *Plant J.* 2016;87(1):5-15.

19- Komor AC, Kim YB, Packer MS, Zuris JA, Liu DR. Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage. *Nature.* 2016;533(7603):420-4.

20- Klug A. The discovery of zinc fingers and their applications in gene regulation and genome manipulation. *Annu Rev Biochem.* 2010;79:213-31.

21- Desjarlais JR, Berg JM. Redesigning the DNA-binding specificity of a zinc finger protein: A data base-guided approach. *Proteins.* 1992;12(2):101-4.

22- Miller JC, Holmes MC, Wang J, Guschin DY, Lee YL, Rupniewski I, et al. An improved zinc-finger nuclease architecture for highly specific genome editing. *Nat Biotechnol.* 2007;25(7):778-85.

23- Ramirez CL, Foley JE, Wright DA, Müller-Lerch F, Rahman SH, Cornu TI, et al. Unexpected failure rates for modular assembly of engineered zinc fingers. *Nat*

تشکر و قدردانی: موردی از سوی نویسندگان گزارش نشده است.

تأییدیه اخلاقی: موردی از سوی نویسندگان گزارش نشده است.

تعارض منافع: نویسندگان اعلام می‌دارند هیچ‌گونه تعارض منافی وجود ندارد.

سهم نویسندگان: عباسعلی امام‌جمعه (نویسنده اول)، روش‌شناس/تحلیلگر (۴۵٪)؛ حسین ادیم (نویسنده دوم)، پژوهشگر اصلی (۳۵٪)؛ جواد ظهیری (نویسنده سوم)، پژوهشگر کمکی (۲۰٪)

منابع مالی: پژوهش حاضر با استفاده از پژوهانه (گرات) اخذشده از دانشگاه زابل به شماره 9618-9 UOZ-GR انجام شده است.

منابع

- 1- Perez-Pinera P, Ousterout DG, Gersbach CA. Advances in targeted genome editing. *Curr Opin Chem Biol.* 2012;16(3-4):268-77.
- 2- Pauwels K, Podevin N, Breyer D, Carroll D, Herman P. Engineering nucleases for gene targeting: Safety and regulatory considerations. *New Biotechnol.* 2014;31(1):18-27.
- 3- Urnov FD, Rebar EJ, Holmes MC, Zhang HS, Gregory PD. Genome editing with engineered zinc finger nucleases. *Nat Rev Genet.* 2010;11(9):636-46.
- 4- Joung JK, Sander JD. TALENs: A widely applicable technology for targeted genome editing. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2013;14(1):49-55.
- 5- Mali P, Esvelt KM, Church GM. Cas9 as a versatile tool for engineering biology. *Nat Methods.* 2013;10(10):957-63.
- 6- Miller J, Mc Lachlan AD, Klug A. Repetitive zinc-binding domains in the protein transcription factor IIIA from *Xenopus oocytes*. *EMBO J.* 1985;4(6):1609-14.
- 7- Kim YG, Cha J, Chandrasegaran S. Hybrid restriction enzymes: Zinc finger fusions to Fok I cleavage domain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996;93(3):1156-60.
- 8- Wolfe SA, Neklodova L, Pabo CO. DNA recognition by Cys2His2 zinc finger proteins. *Annu Rev Biophys Biomol Struct.* 2000;29:183-212.
- 9- Vanamee ES, Santagata S, Aggarwal AK. FokI requires two specific DNA sites for cleavage. *J Mol Biol.* 2001;309(1):69-78.
- 10- Dreier B, Beerli RR, Segal DJ, Flippin JD, Barbas CF. Development of zinc finger domains for recognition of the 5'-ANN-3' family of DNA sequences and their use in

- locus. *Biochem Biophys Res Commun.* 2014;446(1):261-6.
- 40- Cermak T, Doyle EL, Christian M, Wang L, Zhang Y, Schmidt C, et al. Efficient design and assembly of custom TALEN and other TAL effector-based constructs for DNA targeting. *Nucleic Acids Res.* 2011;39(12):e82.
- 41- Sanjana NE, Cong L, Zhou Y, Cunniff MM, Feng G, Zhang F. A transcription activator-like effector toolbox for genome engineering. *Nat Protoc.* 2012;7(1):171-92.
- 42- Reyon D, Khayter C, Regan MR, Keith Joung J, Sander JD. Engineering designer Transcription Activator-Like Effector Nucleases (TALENs) by REAL or REAL-Fast assembly. *Curr Protoc Mol Biol.* 2012;100(1):12.15.1-14.
- 43- Reyon D, Tsai SQ, Khayter C, Foden JA, Sander JD, Joung JK. FLASH assembly of TALENs for high-throughput genome editing. *Nat Biotechnol.* 2012;30(5):460-5.
- 44- Ishino Y, Shinagawa H, Makino K, Amemura M, Nakata A. Nucleotide sequence of the iap gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. *J Bacteriol.* 1987;169(12):5429-33.
- 45- Bhaya D, Davison M, Barrangou R. CRISPR-Cas systems in bacteria and archaea: Versatile small RNAs for adaptive defense and regulation. *Annu Rev Genet.* 2011;45:273-97.
- 46- Wiedenheft B, Sternberg SH, Doudna JA. RNA-guided genetic silencing systems in bacteria and archaea. *Nature.* 2012;482(7385):331-8.
- 47- Makarova KS, Haft DH, Barrangou R, Brouns SJ, Charpentier E, Horvath P, et al. Evolution and classification of the CRISPR-Cas systems. *Nat Rev Microbiol.* 2011;9(6):467-77.
- 48- Mohanraju P, Makarova KS, Zetsche B, Zhang F, Koonin EV, Van Der Oost J. Diverse evolutionary roots and mechanistic variations of the CRISPR-Cas systems. *Science.* 2016;353(6299):aad5147.
- 49- Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science.* 2012;337(6096):816-21.
- 50- Mali P, Yang L, Esvelt KM, Aach J, Guell M, Di Carlo JE, et al. RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science.* 2013;339(6121):823-6.
- 51- Ousterout DG, Kabadi AM, Thakore PI, Majoros WH, Reddy TE, Gersbach CA. Multiplex CRISPR/Cas9-based genome editing for correction of dystrophin mutations that cause Duchenne muscular dystrophy. *Nat Commun.* 2015;6:6244.
- 52- Mojica FJ, Díez-Villaseñor C, García-Martínez J, Soria E. Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements. *J Mol Evol.* 2005;60(2):174-82.
- 53- Pourcel C, Salvignol G, Vergnaud G. CRISPR elements in *Yersinia pestis* acquire new repeats by preferential uptake of bacteriophage DNA, and provide additional tools for evolutionary studies. *Microbiology.* 2005;151(Pt 3):653-63.
- 54- Barrangou R, Fremaux C, Deveau H, Richards M, Boyaval P, Moineau S, et al. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science.* 2007;315(5819):1709-12.
- 55- 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;468:67-71.
- Methods. 2008;5(5):374-5.
- 24- Pattanayak V, Ramirez CL, Keith Joung J, Liu DR. Revealing off-target cleavage specificities of zinc-finger nucleases by in vitro selection. *Nat Methods.* 2011;8:765-70.
- 25- Smith J, Bibikova M, Whitby FG, Reddy AR, Chandrasegaran S, Carroll D. Requirements for double-strand cleavage by chimeric restriction enzymes with zinc finger DNA-recognition domains. *Nucleic Acids Res.* 2000;28(17):3361-9.
- 26- Bitinaite J, Wah DA, Aggarwal AK, Schildkraut I. FokI dimerization is required for DNA cleavage. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95(18):10570-5.
- 27- Moore M, Choo Y, Klug A. Design of polyzinc finger peptides with structured linkers. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98(4):1432-6.
- 28- Fine EJ, Cradick TJ, Zhao CL, Lin Y, Bao G. An online bioinformatics tool predicts zinc finger and TALE nuclease off-target cleavage. *Nucleic Acids Res.* 2014;42(6):e42.
- 29- Abarrategui-Pontes C, Crénéguy A, Thinard R, Fine EJ, Thepenier V, Fournier le RL, et al. Codon swapping of zinc finger nucleases confers expression in primary cells and in vivo from a single lentiviral vector. *Curr Gene Ther.* 2014;14(5):365-76.
- 30- Händel EM, Alwin S, Cathomen T. Expanding or restricting the target site repertoire of zinc-finger nucleases: The inter-domain linker as a major determinant of target site selectivity. *Mol Ther.* 2009;17(1):104-11.
- 31- Durai S, Mani M, Kandavelou K, Wu J, Porteus MH, Chandrasegaran S. Zinc finger nucleases: Custom-designed molecular scissors for genome engineering of plant and mammalian cells. *Nucleic Acids Res.* 2005;33(18):5978-90.
- 32- Sander JD, Dahlborg EJ, Goodwin MJ, Cade L, Zhang F, Cifuentes D, et al. Selection-free zinc-finger-nuclease engineering by context-dependent assembly (CoDA). *Nat Methods.* 2011;8(1):67-9.
- 33- Fu F, Voytas DF. Zinc Finger Database (ZiFDB) v2.0: A comprehensive database of C₂H₂ zinc fingers and engineered zinc finger arrays. *Nucleic Acids Res.* 2013;41(Database issue):D452-5.
- 34- Bogdanove AJ, Voytas DF. TAL effectors: Customizable proteins for DNA targeting. *Science.* 2011;333(6051):1843-6.
- 35- Boch J, Scholze H, Schornack S, Landgraf A, Hahn S, Kay S, et al. Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III effectors. *Science.* 2009;326(5959):1509-12.
- 36- Moscou MJ, Bogdanove AJ. A simple cipher governs DNA recognition by TAL effectors. *Science.* 2009;326(5959):1501.
- 37- Holkers M, Maggio I, Liu J, Janssen JM, Miselli F, Mussolino C, et al. Differential integrity of TALE nuclease genes following adenoviral and lentiviral vector gene transfer into human cells. *Nucleic Acids Res.* 2013;41(5):e63.
- 38- Chen S, Oikonomou G, Chiu CN, Niles BJ, Liu J, Lee DA, et al. A large-scale in vivo analysis reveals that TALENs are significantly more mutagenic than ZFNs generated using context-dependent assembly. *Nucleic Acids Res.* 2013;41(4):2769-78.
- 39- Wu Y, Gao T, Wang X, Hu Y, Hu X, Hu Z, et al. TALE nickase mediates high efficient targeted transgene integration at the human multi-copy ribosomal DNA

- 2015;12(3):237-43.
- 74- Fu Y, Sander JD, Reyon D, Cascio VM, Joung JK. Improving CRISPR-Cas nuclease specificity using truncated guide RNAs. *Nat Biotechnol.* 2014;32(3):279-84.
- 75- Ran FA, Hsu PD, Lin CY, Gootenberg JS, Konermann S, Trevino AE, et al. Double nicking by RNA-guided CRISPR Cas9 for enhanced genome editing specificity. *Cell.* 2013;154(6):1380-9.
- 76- Shen B, Zhang W, Zhang J, Zhou J, Wang J, Chen L, et al. Efficient genome modification by CRISPR-Cas9 nickase with minimal off-target effects. *Nat Methods.* 2014;11(4):399-402.
- 77- Wu X, Scott DA, Kriz AJ, Chiu AC, Hsu PD, Dadon DB, et al. Genome-wide binding of the CRISPR endonuclease Cas9 in mammalian cells. *Nat Biotechnol.* 2014;32(7):670-6.
- 78- Tsai SQ, Wyvekens N, Khayter C, Foden JA, Thapar V, Reyon D, et al. Dimeric CRISPR RNA-guided FokI nucleases for highly specific genome editing. *Nat Biotechnol.* 2014;32(6):569-76.
- 79- Guilinger JP, Thompson DB, Liu DR. Fusion of catalytically inactive Cas9 to FokI nuclease improves the specificity of genome modification. *Nat Biotechnol.* 2014;32:577-82.
- 80- Zetsche B, Gootenberg JS, Abudayyeh OO, Slaymaker IM, Makarova KS, Essletzbichler P, et al. Cpf1 is a single RNA-guided endonuclease of a class 2 CRISPR-Cas system. *Cell.* 2015;163(3):759-71.
- 81- Dong D, Ren K, Qiu X, Zheng J, Guo M, Guan X, et al. The crystal structure of Cpf1 in complex with CRISPR RNA. *Nature.* 2016;532(7600):522-6.
- 82- Fonfara I, Richter H, Bratovič M, Le Rhun A, Charpentier E. The CRISPR-associated DNA-cleaving enzyme Cpf1 also processes precursor CRISPR RNA. *Nature.* 2016;532:517-21.
- 83- He ZY, Men K, Qin Z, Yang Y, Xu T, Wei YQ. Non-viral and viral delivery systems for CRISPR-Cas9 technology in the biomedical field. *Sci China Life Sci.* 2017;60(5):458-67.
- 84- Yin H, Song CQ, Dorkin JR, Zhu LJ, Li Y, Wu Q, et al. Therapeutic genome editing by combined viral and non-viral delivery of CRISPR system components in vivo. *Nat Biotechnol.* 2016;34(3):328-33.
- 85- Ma X, Zhang Q, Zhu Q, Liu W, Chen Y, Qiu R, et al. A robust CRISPR/Cas9 system for convenient, high-efficiency multiplex genome editing in monocot and dicot plants. *Mol Plant.* 2015;8(8):1274-84.
- 86- Zhou H, Liu B, Weeks DP, Spalding MH, Yang B. Large chromosomal deletions and heritable small genetic changes induced by CRISPR/Cas9 in rice. *Nucleic Acids Res.* 2014;42(17):10903-14.
- 87- Zhao C, Zhang Z, Xie S, Si T, Li Y, Zhu JK. Mutational evidence for the critical role of CBF transcription factors in cold acclimation in arabidopsis. *Plant Physiol.* 2016;171(4):2744-59.
- 88- Vanyushin BF, Ashapkin VV. DNA methylation in higher plants: Past, present and future. *Biochimica et Biophysica Acta Gene Regulatory Mechanisms.* 2011;1809(8):360-8.
- 89- Miao J, Guo D, Zhang J, Huang Q, Qin G, Zhang X, et al. Targeted mutagenesis in rice using CRISPR-Cas system. *Cell Res.* 2013;23(10):1233-6.
- 90- Haddad L, Achadi E, Bendeck MA, Ahuja A, Bhatia K, Bhutta Z, et al. The Global Nutrition Report 2014: Actions and accountability to accelerate the world's progress on
- 56- Deltcheva E, Chylinski K, Sharma CM, Gonzales K, Chao Y, Pirzada ZA, et al. CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III. *Nature.* 2011;471:602-7.
- 57- Brouns SJ, Jore MM, Lundgren M, Westra ER, Slijkhuys RJ, Snijders AP, et al. Small CRISPR RNAs guide antiviral defense in prokaryotes. *Science.* 2008;321(5891):960-4.
- 58- Nishimasu H, Ran FA, Hsu PD, Konermann S, Shehata SI, Dohmae N, et al. Crystal structure of Cas9 in complex with guide RNA and target DNA. *Cell.* 2014;156(5):935-49.
- 59- Gasiunas G, Barrangou R, Horvath P, Siksnys V. Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012;109(39):E2579-86.
- 60- Jiang F, Zhou K, Ma L, Gressel S, Doudna JA. A Cas9-guide RNA complex preorganized for target DNA recognition. *Science.* 2015;348(6242):1477-81.
- 61- Jinek M, Jiang F, Taylor DW, Sternberg SH, Kaya E, Ma E, et al. Structures of Cas9 endonucleases reveal RNA-mediated conformational activation. *Science.* 2014;343(6176):1247997.
- 62- Westra ER, Semenova E, Datsenko KA, Jackson RN, Wiedenheft B, Severinov K, et al. Type I-E CRISPR-cas systems discriminate target from non-target DNA through base pairing-independent PAM recognition. *PLoS Genet.* 2013;9(9):e1003742.
- 63- Mao Y, Zhang H, Xu N, Zhang B, Gou F, Zhu JK. Application of the CRISPR-Cas system for efficient genome engineering in plants. *Mol Plant.* 2013;6(6):2008-11.
- 64- Horvath P, Romero DA, Coûté-Monvoisin AC, Richards M, Deveau H, Moineau S, et al. Diversity, activity, and evolution of CRISPR loci in *Streptococcus thermophilus*. *J Bacteriol.* 2008;190(4):1401-12.
- 65- Sternberg SH, Redding S, Jinek M, Greene EC, Doudna JA. DNA interrogation by the CRISPR RNA-guided endonuclease Cas9. *Nature.* 2014;507:62-7.
- 66- Nakade S, Yamamoto T, Sakuma T. Cas9, Cpf1 and C2c1/2/3-what's next?. *Bioengineered.* 2017;8(3):265-73.
- 67- Hsu PD, Scott DA, Weinstein JA, Ann Ran F, Konermann S, Agarwala V, et al. DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases. *Nat Biotechnol.* 2013;31:827-32.
- 68- Fu Y, Foden JA, Khayter C, Maeder ML, Reyon D, Keith Joung J, et al. High frequency off-target mutagenesis induced by CRISPR-Cas nucleases in human cells. *Nat Biotechnol.* 2013;31(9):822-6.
- 69- Ran FA, Hsu PD, Wright J, Agarwala V, Scott DA, Zhang F. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nat Protoc.* 2013;8(11):2281-308.
- 70- Kleinstiver BP, Pattanayak V, Prew MS, Tsai SQ, Nguyen NT, Zheng Z, et al. High-fidelity CRISPR-Cas9 nucleases with no detectable genome-wide off-target effects. *Nature.* 2016;529(7587):490-5.
- 71- Slaymaker IM, Gao L, Zetsche B, Scott DA, Yan WX, Zhang F. Rationally engineered Cas9 nucleases with improved specificity. *Science.* 2016;351(6268):84-8.
- 72- Tsai SQ, Zheng Z, Nguyen NT, Liebers M, Topkar VV, Thapar V, et al. GUIDE-seq enables genome-wide profiling of off-target cleavage by CRISPR-Cas nucleases. *Nat Biotechnol.* 2015;33(2):187-97.
- 73- Kim D, Bae S, Park J, Kim E, Kim S, Yu HR, et al. Digenome-seq: Genome-wide profiling of CRISPR-Cas9 off-target effects in human cells. *Nat Methods.*

- 109- Čermák T, Baltes NJ, Čegan R, Zhang Y, Voytas DF. High-frequency, precise modification of the tomato genome. *Genome Biol.* 2015;16:232.
- 110- Li B, Cui G, Shen G, Zhan Z, Huang L, Chen J, et al. Targeted mutagenesis in the medicinal plant *Salvia miltiorrhiza*. *Sci Rep.* 2017;7:43320.
- 111- Champer J, Buchman A, Akbari OS. Cheating evolution: engineering gene drives to manipulate the fate of wild populations. *Nat Rev Genet.* 2016;17(3):146-59.
- 112- Champer J, Reeves R, Oh SY, Liu C, Liu J, Clark AG, et al. Novel CRISPR/Cas9 gene drive constructs in *Drosophila* reveal insights into mechanisms of resistance allele formation and drive efficiency in genetically diverse populations. *BioRxiv.* 2017 Feb.
- 113- Ledford H. CRISPR, the disruptor. *Nature.* 2015;522(7554):20-4.
- 114- National Academies of Sciences, Engineering, and Medicine. Gene drives on the horizon: Advancing science, navigating uncertainty, and aligning research with public values. Washington DC: National Academies Press; 2016.
- 115- Alphe L. Genetic control of mosquitoes. *Annu Rev Entomol.* 2014;59:205-24.
- 116- McFarlane GR, Whitelaw CBA, Lillico SG. CRISPR-based gene drives for pest control. *Trends Biotechnol.* 2018;36(2):130-3.
- 117- Duke SO. Perspectives on transgenic, herbicide-resistant crops in the United States almost 20 years after introduction. *Pest Manag Sci.* 2015;71(5):652-7.
- 118- Watanabe K, Kobayashi A, Endo M, Sage-Ono K, Toki S, Ono M. CRISPR/Cas9-mediated mutagenesis of the dihydroflavonol-4-reductase-B (DFR-B) locus in the Japanese morning glory *Ipomoea (Pharbitis) nil*. *Sci Rep.* 2017;7:10028.
- 119- Kim H, Kim ST, Ryu J, Choi MK, Kweon J, Kang BC, et al. A simple, flexible and high-throughput cloning system for plant genome editing via CRISPR-Cas system. *J Integr Plant Biol.* 2016;58(8):705-12.
- 120- Xing HL, Dong L, Wang ZP, Zhang HY, Han CY, Liu B, et al. A CRISPR/Cas9 toolkit for multiplex genome editing in plants. *BMC Plant Biol.* 2014;14:327.
- 121- Zhu C, Bortesi L, Baysal C, Twyman RM, Fischer R, Capell T, et al. Characteristics of genome editing mutations in cereal crops. *Trends Plant Sci.* 2017;22(1):38-52.
- 122- Kaur K, Gupta AK, Rajput A, Kumar M. ge-CRISPR - an integrated pipeline for the prediction and analysis of sgRNAs genome editing efficiency for CRISPR/Cas system. *Sci Rep.* 2016;6:30870.
- 123- 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.
- 124- Wong N, Liu W, Wang X. WU-CRISPR: Characteristics of functional guide RNAs for the CRISPR/Cas9 system. *Genome Boil.* 2015;16:218.
- 125- Chari R, Mali P, Moosburner M, Church GM. Unraveling CRISPR-Cas9 genome engineering parameters via a library-on-library approach. *Nat Methods.* 2015;12(9):823-6.
- 126- Zhu LJ, Holmes BR, Aronin N, Brodsky MH. CRISPRseek: A bioconductor package to identify target-specific guide RNAs for CRISPR-Cas9 genome-editing systems. *PLoS One.* 2014;9(9):e108424.
- 127- Bae S, Park J, Kim JS. Cas-OFFinder: A fast and versatile algorithm that searches for potential off-target sites of Cas9 RNA-guided endonucleases. *Bioinformatics.* 2015;31(2):227-31.
- 128- Jinek M, Chylinski K, Cui Y, Wilson JA, Doudna JA. A CRISPR-Cas9 genome editor for targeted genome modification in *Arabidopsis thaliana*. *Nat Methods.* 2013;10(10):977-9.
- 129- Jiang W, Zhou H, Bi H, Fromm M, Yang B, Weeks DP. Demonstration of CRISPR/Cas9/sgrRNA-mediated targeted gene modification in *Arabidopsis*, tobacco, sorghum and rice. *Nucleic Acids Res.* 2013;41(20):e188.
- 130- Liang Z, Zhang K, Chen K, Gao C. Targeted mutagenesis in *Zea mays* using TALENs and the CRISPR/Cas system. *J Genet Genomics.* 2014;41(2):63-8.
- 131- Jia H, Wang N. Targeted genome editing of sweet orange using Cas9/sgrRNA. *PLoS One.* 2014;9(4):e93806.
- 132- Li T, Liu B, Chen CY, Yang B. TALEN-mediated homologous recombination produces site-directed DNA base change and herbicide-resistant rice. *J Genet Genomics.* 2016;43(5):297-305.
- 133- Chipman D, Barak Z, Schloss JV. Biosynthesis of 2-aceto-2-hydroxy acids: Acetolactate synthases and acetohydroxyacid synthases. *Biochimica et Biophysica Acta Protein Structure and Molecular Enzymology.* 1998;1385(2):401-19.
- 134- Wang Y, Cheng X, Shan Q, Zhang Y, Liu J, Gao C, et al. Simultaneous editing of three homoeoalleles in hexaploid bread wheat confers heritable resistance to powdery mildew. *Nat Biotechnol.* 2014;32:947-51.
- 135- Haun W, Coffman A, Clasen BM, Demorest ZL, Lowy A, Ray E, et al. Improved soybean oil quality by targeted mutagenesis of the fatty acid desaturase 2 gene family. *Plant Biotechnol J.* 2014;12(7):934-40.
- 136- Clasen BM, Stoddard TJ, Luo S, Demorest ZL, Li J, Cedrone F, et al. Improving cold storage and processing traits in potato through targeted gene knockout. *Plant Biotechnol J.* 2016;14(1):169-76.
- 137- Baltes NJ, Hummel AW, Konecna E, Čegan R, Bruns AN, Bisaro DM, et al. Conferring resistance to geminiviruses with the CRISPR-Cas prokaryotic immune system. *Nat Plants.* 2015;1:15145.
- 138- Ali Z, Abulfaraj A, Idris A, Ali Sh, Tashkandi M, Mahfouz MM. CRISPR/Cas9-mediated viral interference in plants. *Genome Biol.* 2015;16:238.
- 139- Karimi Ashtiyani R, Ishii T, Niessen M, Stein N, Heckmann S, Gurushidze M, et al. Point mutation impairs centromeric CENH3 loading and induces haploid plants. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2015;112(36):11211-6.

- 145- Araki M, Ishii T. Towards social acceptance of plant breeding by genome editing. *Trends Plant Sci.* 2015;20(3):145-9.
- 146- Waltz E. Gene-edited CRISPR mushroom escapes US regulation. *Nature.* 2016;532(7599):293.
- 147- Liang P, Xu Y, Zhang X, Ding C, Huang R, Zhang Z, et al. CRISPR/Cas9-mediated gene editing in human triploid zygotes. *Protein Cell.* 2015;6(5):363-72.
- 148- Zhang Q, Ye Y. Not all predicted CRISPR-Cas systems are equal: Isolated cas genes and classes of CRISPR like elements. *BMC Bioinform.* 2017;18:92.
- 149- Zhu H, Richmond E, Liang C. CRISPR-RT: A web service for designing CRISPR-C2c2 crRNA with improved target specificity. *BioRxiv.* 2017 Jan.
- 150- Garst AD, Bassalo MC, Pines G, Lynch SA, Halweg-Edwards AL, Liu R, et al. Genome-wide mapping of mutations at single-nucleotide resolution for protein, metabolic and genome engineering. *Nat Biotechnol.* 2017;35(1):48-55.
- 151- Cao Q, Ma J, Chen CH, Xu H, Chen Z, Li W, et al. CRISPR-FOCUS: A web server for designing focused CRISPR screening experiments. *PLoS One.* 2017;12(9):e0184281.
- 152- Wang K, Liang C. CRF: Detection of CRISPR arrays using random forest. *PeerJ.* 2017;5:e3219.
- 153- Park J, Lim K, Kim JS, Bae S. Cas-analyzer: An online tool for assessing genome editing results using NGS data. *Bioinformatics.* 2017;33(2):286-8.
- 154- Hough SH, Kancleris K, Brody L, Humphries-Kirilov N, Wolanski J, Dunaway K, et al. Guide Picker is a comprehensive design tool for visualizing and selecting guides for CRISPR experiments. *BMC Bioinform.* 2017;18:167.
- 155- Winter J, Schwering M, Pelz O, Rauscher B, Zhan T, Heigwer F, et al. CRISPRAnalyzeR: Interactive analysis, annotation and documentation of pooled CRISPR screens. *BioRxiv.* 2017 Feb.
- 156- Peterson KA, Beane GL, Goodwin LO, Kutny PM, Reinholdt LG, Murray SA. CRISPRtools: A flexible computational platform for performing CRISPR/Cas9 experiments in the mouse. *Mamm Genome.* 2017;28(7-8):283-90.
- 157- Yu SH, Vogel J, Förstner KU. ANNOgesic: A pipeline to translate bacterial/archaeal RNA-Seq data into high-resolution genome annotations. *BioRxiv.* 2017 May.
- 158- Jeong HH, Kim SY, WC Rosseaux M, Zoghbi HY, Liu Z. SAVE: A secure cloud-based pipeline for CRISPR pooled screen deconvolution. *BioRxiv.* 2017 Feb.
- 159- Ahmed M, He HH. SgTiler: A fast method to design tiling sgRNAs for CRISPR/Cas9 mediated screening. *BioRxiv.* 2017 Nov.
- 160- Rastogi A, Murik O, Bowler C, Tirichine L. PhytoCRISP-Ex: A web-based and stand-alone application to find specific target sequences for CRISPR/CAS editing. *BMC Bioinform.* 2016;17:261.
- 161- Haeussler M, Schönig K, Eckert H, Eschstruth A, Mianné J, Renaud JB, et al. Evaluation of off-target and on-target scoring algorithms and integration into the guide RNA selection tool CRISPOR. *Genome Biol.* 2016;17(1):148.
- 162- Ge R, Mai G, Wang P, Zhou M, Luo Y, Cai Y, et al. CRISPRdigger: Detecting CRISPRs with better direct repeat annotations. *Sci Rep.* 2016;6:32942.
- 163- Boel A, Steyaert W, De Rocker N, Menten B, Callewaert B, De Paepe A, et al. BATCH-GE: Batch analysis of next-generation sequencing data for genome 2014;30(10):1473-5.
- 128- Cradick TJ, Qiu P, Lee CM, Fine EJ, Bao G. COSMID: A web-based tool for identifying and validating CRISPR/Cas off-target sites. *Mol Ther Nucleic Acids.* 2014;3:e214.
- 129- Singh R, Kusc C, Quinlan A, Qi Y, Adli M. Cas9-chromatin binding information enables more accurate CRISPR off-target prediction. *Nucleic Acids Res.* 2015;43(18):e118.
- 130- Aach J, Mali P, Church GM. CasFinder: Flexible algorithm for identifying specific Cas9 targets in genomes. *BioRxiv.* 2014 May.
- 131- Heigwer F, Kerr G, Boutros M. E-CRISP: Fast CRISPR target site identification. *Nat Methods.* 2014;11(2):122-3.
- 132- Montague TG, Cruz JM, Gagnon JA, Church GM, Valen E. CHOPCHOP: A CRISPR/Cas9 and TALEN web tool for genome editing. *Nucleic Acids Res.* 2014;42(Web Server issue):W401-7.
- 133- Sander JD, Maeder ML, Reyon D, Voytas DF, Joung JK, Dobbs D. ZiFiT (Zinc Finger Targeter): An updated zinc finger engineering tool. *Nucleic Acids Res.* 2010;38(Web Server issue):W462-8.
- 134- Xiao A, Cheng Z, Kong L, Zhu Z, Lin S, Gao G, et al. CasOT: A genome-wide Cas9/gRNA off-target searching tool. *Bioinformatics.* 2014;30(8):1180-2.
- 135- Bell CC, Magor GW, Gillinder KR, Perkins AC. A high-throughput screening strategy for detecting CRISPR-Cas9 induced mutations using next-generation sequencing. *BMC Genom.* 2014;15:1002.
- 136- Wang X, Tilford C, Neuhaus I, Mintier G, Guo Q, Feder JN, et al. CRISPR-DAV: CRISPR NGS data analysis and visualization pipeline. *Bioinformatics.* 2017;33(23):3811-2.
- 137- Shi J, Gao H, Wang H, Lafitte HR, Archibald RL, Yang M, et al. ARGOS8 variants generated by CRISPR-Cas9 improve maize grain yield under field drought stress conditions. *Plant Biotechnol J.* 2017;15(2):207-16.
- 138- Shan-e-Ali Zaidi S, Tashkandi M, Mansoor Sh, Mahfouz MM. Engineering plant immunity: Using CRISPR/Cas9 to generate virus resistance. *Front Plant Sci.* 2016;7:1673.
- 139- Chandrasekaran J, Brumin M, Wolf D, Leibman D, Klap C, Pearlsman M, et al. Development of broad virus resistance in non-transgenic cucumber using CRISPR/Cas9 technology. *Mol Plant Pathol.* 2016;17(7):1140-53.
- 140- Chen L, Wang G, Zhu YN, Xiang H, Wang W. Advances and perspectives in the application of CRISPR/Cas9 in insects. *Zool Res.* 2016;37(4):220-8.
- 141- Perkin LC, Adrianos SL, Oppert B. Gene disruption technologies have the potential to transform stored product insect pest control. *Insects.* 2016;7(3):pii:E46.
- 142- Leitão AL, Costa MC, Enguita FJ. Applications of genome editing by programmable nucleases to the metabolic engineering of secondary metabolites. *J Biotechnol.* 2017;241:50-60.
- 143- Andersson HC, Arpaia S, Bartsch D, Casacuberta J, Davies HV, Du Jardin P, et al. Scientific opinion addressing the safety assessment of plants developed through cisgenesis and intragenesis. *EFSA J.* 2012;10(2):2561.
- 144- Hartung F, Schiemann J. Precise plant breeding using new genome editing techniques: Opportunities, safety and regulation in the EU. *Plant J.* 2014;78(5):742-52.

- P 2.0: An improved CRISPR-Cas9 tool for genome editing in plants. *Mol Plant*. 2017;10(3):530-2.
- 183- Naito Y, Hino K, Bono H, Ui-Tei K. CRISPRdirect: Software for designing CRISPR/Cas guide RNA with reduced off-target sites. *Bioinformatics*. 2015;31(7):1120-3.
- 184- Gratz SJ, Ukken FP, Dustin Rubinstein C, Thiede G, Donohue LK, Cummings AM, et al. Highly specific and efficient CRISPR/Cas9-catalyzed homology-directed repair in *Drosophila*. *Genetics*. 2014;196(4):961-71.
- 185- O'Brien A, Bailey TL. GT-Scan: Identifying unique genomic targets. *Bioinformatics*. 2014;30(18):2673-5.
- 186- Xie S, Shen B, Zhang C, Huang X, Zhang Y. sgRNACas9: A software package for designing CRISPR sgRNA and evaluating potential off-target cleavage sites. *PLoS One*. 2014;9(6):e100448.
- 187- Upadhyay SK, Sharma S. SSFinder: High throughput CRISPR-Cas target sites prediction tool. *Biomed Res Int*. 2014;2014:742482.
- 188- Güell M, Yang L, Church GM. Genome editing assessment using CRISPR Genome Analyzer (CRISPR-GA). *Bioinformatics*. 2014;30(20):2968-70.
- 189- Brinkman EK, Chen T, Amendola M, Van Steensel B. Easy quantitative assessment of genome editing by sequence trace decomposition. *Nucleic Acids Res*. 2014;42(22):e168.
- 190- Skennerton CT, Imelfort M, Tyson GW. Crass: Identification and reconstruction of CRISPR from unassembled metagenomic data. *Nucleic Acids Res*. 2013;41(10):e105.
- 191- Ma M, Ye AY, Zheng W, Kong L. A guide RNA sequence design platform for the CRISPR/Cas9 system for model organism genomes. *Biomed Res Int*. 2013;2013:270805.
- 192- Park J, Bae S. Cpf1-Database: Web-based genome-wide guide RNA library design for gene knockout screens using CRISPR-Cpf1. *Bioinformatics*. 2018;34(6):1077-9.
- 193- Dong C, Hao GF, Hua HL, Liu S, Labena AA, Chai G, et al. Anti-CRISPRdb: A comprehensive online resource for anti-CRISPR proteins. *Nucleic Acids Res*. 2018;46(D1):D393-8.
- 194- Rauscher B, Heigwer F, Breinig M, Winter J, Boutros M. GenomeCRISPR - a database for high-throughput CRISPR/Cas9 screens. *Nucleic Acids Res*. 2017;45(Database issue):D679-86.
- 195- Lenoir WF, Lim TL, Hart T. PICKLES: The database of pooled in-vitro CRISPR knockout library essentiality screens. *Nucleic Acids Res*. 2018;46(D1):D776-80.
- 196- Chen IA, Markowitz VM, Chu K, Palaniappan K, Szeto E, Pillay M, et al. IMG/M: Integrated genome and metagenome comparative data analysis system. *Nucleic Acids Res*. 2017;45(D1):D507-16.
- 197- Park J, Kim JS, Bae S. Cas-Database: Web-based genome-wide guide RNA library design for gene knockout screens using CRISPR-Cas9. *Bioinformatics*. 2016;32(13):2017-23.
- 198- Wang Y, Liu X, Ren C, Zhong GY, Yang L, Li Sh, et al. Identification of genomic sites for CRISPR/Cas9-based genome editing in the *Vitis vinifera* genome. *BMC Plant Boil*. 2016;16:96.
- 199- Jaskula-Ranga V, Zack DJ. grID: A CRISPR-Cas9 guide RNA database and resource for genome-editing. *BioRxiv*. 2016 Dec.
- 200- Varshney GK, Zhang S, Pei W, Adomako-Ankomah A, Fohitung J, Schaffer K, et al. CRISPRz: A database of zebrafish validated sgRNAs. *Nucleic Acids Res*. editing assessment. *Sci Rep*. 2016;6:30330.
- 164- Alkhnbashi OS, Shah SA, Garrett RA, Saunders SJ, Costa F, Backofen R. Characterizing leader sequences of CRISPR loci. *Bioinformatics*. 2016;32(17):i576-85.
- 165- Ma J, Köster J, Qin Q, Hu S, Li W, Chen C, et al. CRISPR-DO for genome-wide CRISPR design and optimization. *Bioinformatics*. 2016;32(21):3336-8.
- 166- Oliveros JC, Franch M, Tabas-Madrid D, San-León D, Montoliu L, Cubas P, et al. Breaking-Cas-interactive design of guide RNAs for CRISPR-Cas experiments for ENSEMBL genomes. *Nucleic Acids Res*. 2016;44(W1):W267-71.
- 167- Zhu H, Misel L, Graham M, Robinson ML, Liang C. CT-Finder: A web service for CRISPR optimal target prediction and visualization. *Sci Rep*. 2016;6:25516.
- 168- Pulido-Quetglas C, Aparicio-Prat E, Arnan C, Polidori T, Hermoso T, Palumbo E, et al. Scalable design of paired CRISPR guide RNAs for genomic deletion. *BioRxiv*. 2016 May.
- 169- Heigwer F, Zhan T, Breinig M, Winter J, Brügemann D, Leible S, et al. CRISPR Library Designer (CLD): Software for multispecies design of single guide RNA libraries. *Genome Biol*. 2016;17:55.
- 170- Blin K, Pedersen LE, Weber T, Lee SY. CRISPy-web: An online resource to design sgRNAs for CRISPR applications. *Synthetic Syst Biotechnol*. 2016;1(2):118-21.
- 171- Biswas A, Staals RHJ, Morales SE, Fineran PC, Brown CM. CRISPRDetect: A flexible algorithm to define CRISPR arrays. *BMC Genomics*. 2016;17:356.
- 172- Peng D, Tarleton R. EuPaGDT: A web tool tailored to design CRISPR guide RNAs for eukaryotic pathogens. *Microb Genom*. 2015;1(4):e000033.
- 173- Xu H, Xiao T, Chen CH, Li W, Meyer CA, Wu Q, et al. Sequence determinants of improved CRISPR sgRNA design. *Genome Res*. 2015;25(8):1147-57.
- 174- Park J, Bae S, Kim JS. Cas-Designer: A web-based tool for choice of CRISPR-Cas9 target sites. *Bioinformatics*. 2015;31(24):4014-6.
- 175- Prykhodzhiy 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.
- 176- Liu H, Wei Z, Dominguez A, Li Y, Wang X, Qi LS. CRISPR-ERA: A comprehensive design tool for CRISPR-mediated gene editing, repression and activation. *Bioinformatics*. 2015;31(22):3676-8.
- 177- Stemmer M, Thumberger T, Del Sol Keyer M, Wittbrodt J, Mateo JL. CCTop: An intuitive, flexible and reliable CRISPR/Cas9 target prediction tool. *PLoS One*. 2015;10(4):e0124633.
- 178- Pinello L, Canver MC, Hoban MD, Orkin SH, Kohn DB, Bauer DE, et al. CRISPResso: Sequencing analysis toolbox for CRISPR-Cas9 genome editing. *BioRxiv*. 2015 Nov.
- 179- Moreno-Mateos MA, Vejnar CE, Beaudoin JD, Fernandez JP, Mis EK, Khokha MK, et al. CRISPRscan: Designing highly efficient sgRNAs for CRISPR-Cas9 targeting in vivo. *Nat Methods*. 2015;12(10):982-8.
- 180- Mac Pherson CR, Scherf A. Flexible guide-RNA design for CRISPR applications using protospacer workbench. *Nat Biotechnol*. 2015;33(8):805-6.
- 181- Lei Y, Lu L, Liu HY, Li S, Xing F, Chen LL. CRISPR-P: A web tool for synthetic single-guide RNA design of CRISPR-system in plants. *Mol Plant*. 2014;7(9):1494-6.
- 182- Liu H, Ding Y, Zhou Y, Jin W, Xie K, Chen LL. CRISPR-

2013;41(20):e190.

208- Neff KL, Argue DP, Ma AC, Lee HB, Clark KJ, Ekker SC. Mojo Hand, a TALEN design tool for genome editing applications. *BMC Bioinform.* 2013;14:1.

209- Li L, Piatek MJ, Atef A, Piatek A, Wibowo A, Fang X, et al. Rapid and highly efficient construction of TALE-based transcriptional regulators and nucleases for genome modification. *Plant Mol Biol.* 2012;78(4-5):407-16.

210- Kim Y, Kweon J, Kim A, Chon JK, Yoo JY, Kim HJ, et al. A library of TAL effector nucleases spanning the human genome. *Nat Biotechnol.* 2013;31:251-8.

211- Cradick TJ, Ambrosini G, Iseli C, Bucher P, McCaffrey AP. ZFN-site searches genomes for zinc finger nuclease target sites and off-target sites. *BMC Bioinform.* 2011;12:152.

212- Mandell JG, Barbas III CF. Zinc finger tools: Custom DNA-binding domains for transcription factors and nucleases. *Nucleic Acids Res.* 2006;34(Web Server issue):W516-23.

213- Jayakanthan M, Muthukumaran J, Chandrasekar S, Chawla K, Punetha A, Sundar D. ZifBASE: A database of zinc finger proteins and associated resources. *BMC Genomics.* 2009;10:421.

2016;44(Database issue):D822-6.

201- Hodgkins A, Farne A, Perera S, Grego T, Parry-Smith DJ, Skarnes WC, et al. WGE: A CRISPR database for genome engineering. *Bioinformatics.* 2015;31(18):3078-80.

202- Kaur K, Tandon H, Gupta AK, Kumar M. CrisprGE: A central hub of CRISPR/Cas-based genome editing. Database (Oxford). 2015;2015:bav055.

203- Xiao A, Wu Y, Yang Z, Hu Y, Wang W, Zhang Y, et al. EENdb: A database and knowledge base of ZFNs and TALENs for endonuclease engineering. *Nucleic Acids Res.* 2013;41(Database issue):D415-22.

204- Rousseau C, Gonnet M, Le Romancer M, Nicolas J. CRISPI: A CRISPR interactive database. *Bioinformatics.* 2009;25(24):3317-8.

205- Lin Y, Fine EJ, Zheng Z, Antico CJ, Voit RA, Porteus MH, et al. SAPTA: A new design tool for improving TALE nuclease activity. *Nucleic Acids Res.* 2014;42(6):e47.

206- Grau J, Boch J, Posch S. TALENoffer: Genome-wide TALEN off-target prediction. *Bioinformatics.* 2013;29(22):2931-2.

207- Heigwer F, Kerr G, Walther N, Glaeser K, Pelz O, Breinig M, et al. E-TALEN: A web tool to design TALENs for genome engineering. *Nucleic Acids Res.*