

طراحی RNA راهنما به منظور تشخیص سالمونلا تیفیموریوم مبتنی بر کریسپر-Cas12

زهرا مردشتی^۱، مهدی زین الدینی^{۲*}، علی رضا سعیدی نیا^۳

۱- کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی مولکولی، مرکز تحقیقات علوم و فناوری زیستی، دانشگاه صنعتی مالک اشتر، تهران، ایران.

۲- دکترای تخصصی بیوشیمی، دانشیار، مرکز تحقیقات علوم و فناوری زیستی، دانشگاه صنعتی مالک اشتر، تهران، ایران.

۳- دکترای تخصصی ژنتیک مولکولی، مرکز تحقیقات علوم و فناوری زیستی، دانشگاه صنعتی مالک اشتر، تهران، ایران.

* صندوق پستی ۱۵۸۷۵-۱۷۷۴، تهران، ایران

zeinoddini52@mut.ac.ir

پذیرش: ۱۴۰۴/۰۱/۳۱

دریافت: ۱۴۰۳/۰۵/۱۱

چکیده

روش‌های شناسایی مبتنی بر کریسپر، به عنوان یک رویکرد تحول آفرین برای تشخیص ژن‌های پاتوژن‌ها استفاده می‌شود. در این راستا، اولین گام طراحی RNA راهنما (gRNA) با استفاده از ابزارهای بیوانفورماتیکی است. gRNA در سیستم‌های کریسپری جزئی است که منجر به شناسایی هدف، استقرار کمپلکس کریسپری روی آن و فعال شدن عملکرد برشی Cas می‌شود. هدف از پژوهش حاضر، طراحی gRNA برای شناسایی سه ژن *fimA*، *invA* و *fimY* از سالمونلا تیفیموریوم برای استفاده در کیت تشخیص این باکتری است. در این پژوهش از دو نرم‌افزار chop chop (ورژن ۳) و cas designer (ورژن ۲۰۱۶) برای این طراحی استفاده شد و ساختار ثانویه توالی‌های طراحی شده توسط نرم‌افزار RNA Fold بررسی شد. با توجه به برنامه‌ریزی برای تکثیر اولیه ژن مورد نظر با روش ایزوترمال LAMP، پرایمرهای مربوطه توسط ابزار برخط NEB LAMP Primer Designer طراحی شد. همچنین، طراحی RNA راهنما با در نظر گرفته شدن پروتئین Cas12a برای استفاده در کمپلکس کریسپر، انجام شد. برای اطمینان بیشتر از طراحی صورت گرفته، توالی به دست آمده از دو نرم‌افزار با یکدیگر مقایسه و نتایج با بهره‌گیری از پایگاه داده RNA Fold، تفسیر شدند تا بهترین توالی برگزیده شود. در نهایت برای هر کدام از اهداف ژنی، بهترین توالی انتخاب و برای مسیر تشخیصی بعدی مبتنی بر LAMP و کریسپر-Cas12، پیشنهاد

کپی‌رایت © ۲۰۲۵، انتشارات دانشگاه تربیت مدرس (TMU Press). این مقاله به صورت دسترسی آزاد منتشر شده و تحت مجوز بین‌المللی Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 قرار دارد. بر اساس این مجوز، شما می‌توانید این مطلب را در هر قالب و رسانه‌ای کپی، باز نشر و بازآفرینی کنید و یا آن را ویرایش و بازسازی نمایید، به شرط آنکه نام نویسنده را ذکر کرده و از آن برای مقاصد غیرتجاری استفاده کنید.

داده شد. در نتیجه با استفاده از مطالعات شبیه سازی در طراحی gRNA و با به کارگیری توالی های حاصله، تشخیص ژنوم پاتوژن در غذاهای آلوده، به صورت دقیق و بدون جواب مثبت کاذب، قابل حصول است.

کلید واژگان: RNA راهنما، سالمونلا، کریسپر، تشخیص ایزوترمال.

۱-مقدمه

سیستم های کریسپری به عنوان سیستم های تطبیقی دفاعی باکتری ها و آرکی ها در برابر فاژها در طبیعت شناخته شده اند. این سیستم ها از دو جزء آنزیم کریسپری تحت عنوان آنزیم cas و RNA راهنما تشکیل شده اند. آنزیم های کریسپری ثابت می باشند اما gRNA جزئی است که از هر باکتری به باکتری دیگر متغیر بوده و منجر به شناسایی پاتوژن مهاجم و متعاقباً راه اندازی پاسخ ایمنی می شود. همین ویژگی باعث شد که پژوهشگران بتوانند سیستم های کریسپری را طبق اهداف خودشان در محیط آزمایشگاهی و توسط ابزارهای بیوانفورماتیکی مهندسی کنند [۱ و ۲]. gRNA های مهندسی شده از دو بخش spacer و repeat تشکیل شده اند. repaet ها نواحی ثابت gRNA ها هستند که پس از سنتز شدن باعث واکنش و اتصال به آنزیم cas می شوند. این نواحی برای هر نوع آنزیم cas توالی ثابت و منحصر به فردی دارد که توسط پژوهشگران کشف و در مقالات معتبر علمی گزارش شده است. spacer ها نواحی قابل برنامه و متغیری هستند که توسط نرم افزارها طراحی شده و باید مورد آنالیزهای بیوانفورماتیکی قرار بگیرند. این نواحی برای هر ناحیه ژنومی متفاوت بوده و به نوعی اختصاصیت روش های کریسپری را تعیین می کند [۳-۵]. فناوری کریسپر در ابتدا به عنوان یک روش ویرایشی ابداع شد. اما، پس از مدتی نشان داد که می تواند کاربردهای خارق العاده ای در تشخیص اهداف نوکلئیک اسیدی و غیرنوکلئیک اسیدی داشته باشد. ویژگی آنزیم های کریسپری cas12، cas13 و cas14 در ایجاد برش های خارج هدفی که دارند، منجر به توسعه روش های تشخیصی کریسپری شد. این آنزیم ها پس از اتصال به

ناحیه هدف و برش آنجا، شروع به بریدن هر ژنومی موجود در اطراف خود می کنند. همین ویژگی باعث شد پژوهشگران بتوانند ویژگی تشخیصی کریسپری را کشف کنند. به این ترتیب می توان تعدادی گزارشگر نوکلئیک اسیدی برچسب گذاری شده با مواد گزارشگر-خاموش کننده (فلورفور-کوینیچر) در اختیار مخلوط تشخیصی کریسپر قرار داد تا پس از تشخیص ناحیه هدف توسط کمپلکس کریسپری و برش خوردن، آنزیم های کریسپری گزارشگرها را برش داده و منجر به ساطع شدن سیگنال های قابل ردیابی شوند [۶]. جدای از cas های برشی، cas9 و dcas9 نیز توانایی تشخیصی دارند اما روش های توسعه یافته با این دو آنزیم از پیچیدگی بیشتری برخوردار بوده و عموماً توانایی ابداع آزمون های نقطه مراقبت^۱ (POCT) با آنها وجود ندارد [۷].

در حال حاضر، روش های تشخیصی کریسپری حساسیت کمی دارند. بنابراین، نیاز است که آنها توسط روش های تکثیری چند دما یا هم دما تقویت شوند؛ به عبارتی باید پیش از آغاز واکنش کریسپری، یک مرحله تکثیر دمایی برای افزایش غلظت ژنوم هدف اجرا شود. روش های ایزوترمال LAMP و RPA به دلیل ماهیت ساده ای که دارند و تنها با یک دما انجام شده و محتاج ابزارهای پیچیده نمی باشند، تطبیق پذیری بالایی با روش های کریسپری دارند. پرایمرهای واکنش تکثیری باید برای ناحیه حفاظت شده از ژنوم هدف، به گونه ای طراحی شوند که توالی gRNA نیز برای همان ناحیه، هدف گیری شود. به این معنی که پرایمرها منجر به افزایش تعداد یک

^۱ Point-of-care testing

gRNA ها هم به صورت دستی و هم به صورت برخط توسط نرم افزارهای طراحی امکان پذیر می باشد اما به دلیل سختی طراحی های دستی و مراحل زیاد آنالیزها، استفاده از نرم افزارها پیشنهاد می شود [۱۳]. در این پژوهش تلاش شده است در ابتدا برای سه ژن *fimA*، *invA* و *fimY* پرایمرهای LAMP توسط نرم افزار NEB LAMP Primer Designer طراحی شده و سپس پس از بررسی توالی gRNA های طراحی شده توسط هر دو نرم افزار chop chop و cas designer، برای هر ژن، یک gRNA برای شناسایی ناحیه ای مناسب از آمپلیکون حاصله، برای انجام پژوهش های بعدی، برگزیده و پیشنهاد شود.

۲- روش

در ابتدا توالی سه ژن مورد نظر از سایت NCBI استخراج شد. سپس، ژن های مربوطه در توالی تعیین شد و هر ژن به طور کاملاً جداگانه ارزیابی شد. ابتدا پرایمرهای LAMP طراحی شد و سپس gRNA برای آمپلیکون هدف توسط هر دو نرم افزار chop chop و cas designer طراحی شد تا در نهایت یک توالی برای هر ژن برگزیده شود. در مرحله انتهایی توالی های gRNA هم به فرم RNA برای سنتز مستقیم و هم به فرم DNA برای انجام T7 transcription *in vitro* به همراه توالی پروموتور و ترمیناتور مربوطه مورد آنالیزهای نرم افزار RNA Fold قرار گرفت. مشخصات سویه مورد آزمایش به شرح زیر است:

Salmonella enterica subsp. *enterica* serovar
NCBI Typhimurium str. LT2, complete genome
Reference Sequence: NC_003197.2

طراحی پرایمرهای LAMP توسط نرم افزار NEB LAMP Primer Designer برای سه ژن *fimA*، *invA* و *fimY* به شکل زیر انجام شد: واکنش تکثیری هم دما LAMP نیاز به ۶ تا ۸ پرایمر (LF/LB، F3/B3، F2/B2، F1c/B1c) دارد که باید با نسبت های متفاوت به مخلوط واکنش افزوده شوند (جدول ۱). سنتز و استفاده از LF و LB تنها

آمپلیکون حداکثر ۳۰۰ نوکلئوتیدی شده و سپس gRNA ناحیه مورد نظر در آمپلیکون را مورد شناسایی قرار می دهد. در ضمن تشخیص های کریسپری یک یا دو مرحله انجام می گیرند که در حال حاضر، هدف گذاری پژوهشگران روی توسعه روش های یک مرحله ای می باشد. روش های یک مرحله ای، روش هایی هستند که در آنها مخلوط کریسپری و مخلوط واکنش تکثیری به طور همزمان در دو ناحیه متفاوت از میکروتیوب (بخش انتهایی و بخش درب میکروتیوب) قرار گرفته و واکنش تکثیری و واکنش کریسپری به طور همزمان و بدون نیاز به باز شدن درب میکروتیوب انجام می شوند [۸ و ۹].

از سوی دیگر سالمونلا تیفیموریوم یک باکتری گرم منفی با ژنومی از جنس DNA دو رشته ای می باشد که توانایی آلوده سازی مواد غذایی، لبنیات، محصولات گوشتی و سبزیجات را دارا است. در صورت بروز همه گیری این باکتری علاوه بر وارد آمدن خسارت های فراوان به صنعت مواد غذایی و اقتصاد یک جامعه، افراد نیز در خطر بیماری مرگبار این پاتوژن قرار خواهند گرفت. سه ژن شاخص این پاتوژن *fimA*، *invA* و *fimY* است که عموماً این سه ژن هدف طراحی روش های تشخیصی می باشند [۱۰]. آنزیم های *cas12* و *cas14* توانایی تشخیص و برش DNA ها و آنزیم *cas13* توانایی تشخیص و برش RNA را دارد. از بین انواع مختلف، *cas12*، *cas12a* پرکاربردترین آنزیم این خانواده می باشد که توانسته است در همه گیری کرونا برای تجاری سازی کیت های تشخیص خانگی، به جوامع پیشرفته چون کشور آمریکا کمک فراوانی بکند [۱۱]. ترکیب LAMP نیز به دلیل هزینه های پایین تری که نسبت به سایر روش های تکثیری دارد و عدم وابستگی آن به ابزارهای پیچیده، با *cas12a* که می تواند مستقیماً ژنوم هایی که از جنس DNA باشند را مورد شناسایی قرار دهد، یکی از مناسب ترین روش های تشخیصی برای ردیابی سالمونلا تیفیموریوم می باشد [۱۲]. طراحی

در صورتی ضروری است که با ۶ پرایمر دیگر نتوان نتایج دلخواه را کسب کرد. در ابتدا با ورود به نرم افزار برخط NEB LAMP Primer Designer توالی ژن های مربوطه به تفکیک مورد آنالیز قرار گرفت تا پرایمرهایی که ویژگی های مناسبی دارند طراحی شوند. پس از طراحی مجموعه های پرایمری و انتخاب بهترین آن، هر توالی توسط نرم افزار برخط NCBI BLAST، بررسی شد تا از اختصاصیت پرایمرها برای سویه هدف، اطمینان حاصل شود (جدول ۲).

طراحی grNA مربوط به هر ژن برای آمپلیکون هدف نیز توسط نرم افزار chop chop و cas designer به شکل زیر انجام شد: پس از مشخص شدن آمپلیکون هدف توسط پرایمرها از ژن های *fimA*، *invA* و *fimY*، توالی آمپلیکون هر ژن به

تفکیک یکبار در نرم افزار chop chop و یکبار در نرم افزار cas designer وارد شد تا gRNAهای پیشنهادی نمایش داده شوند. در هر دو نرم افزار طراحی، برخی ویژگی ها مورد بررسی قرار می گیرد و به هر توالی یک امتیاز به عنوان درصد عملکرد داده می شود. این درصد نباید کمتر از ۶۰ درصد باشد. ویژگی های مورد بررسی شامل درصد GC (بالاتر از ۴۰ درصد)، تعداد میس مچ ها (صفر و حداکثر ۱) و تعداد ساختارهای ثانویه ای (ترجیحا فاقد ساختار ثانویه) که توالی تشکیل می دهد، می باشد. همچنین، در نرم افزارها ناحیه اتصال توالی به آمپلیکون هدف در مجاورت PAM و مکان احتمالی ایجاد برش روی ژنوم نمایش داده می شود. شایان ذکر است تنها ناحیه spacer به فرم DNA در نرم افزارها طراحی می شود.

جدول ۱ ویژگی های عمومی پرایمرهای LAMP.

Lengths (min/max)	F1c/B1c	20 nt - 22 nt
	F2/B2	18 nt - 20 nt
	F3/B3	18 nt - 20 nt
	LF/LB	15 nt - 25 nt
T _m (min/max)	F1c/B1c	64 °C - 66 °C
	F2/B2	59 °C - 61 °C
	F3/B3	59 °C - 61 °C
	LF/LB	64 °C - 66 °C
% GC	Min/Max	40 % - 65 %
	Min/Max (Loop)	40 % - 65 %
ΔG threshold	5' Stability	-4 Kcal/mol
	3' Stability	-4 Kcal/mol
	3' Stability (Loop)	-2.0 Kcal/mol
	Dimer check	-2.5 Kcal/mol
	Dimer check (Loop)	-3.5 Kcal/mol
Distances (min/max)	(F2-B2)	120 nt - 160 nt
	Loop (F1c-F2)	40 nt - 60 nt
	F2-F3	0 nt - 60 nt
	F1c-B1c	0 nt - 100 nt

پس از بررسی توالی‌ها و انتخاب مناسب‌ترین spacer، چهار نوکلئوتید ابتدایی توالی در سمت 5' که تحت عنوان PAM (یک توالی ۴ نوکلئوتیدی در ژنوم هدف که به شناسایی بهتر ناحیه هدف کمک کرده و نباید در توالی gRNA قرار بگیرد) می‌باشد را حذف کرده، توالی را به فرم RNA برگردانده و به جای PAM توالی repeat مخصوص قرار می‌گیرد.

توالی repeat مربوط به cas12a از مقالات مربوطه استخراج شد که به شرح زیر است [۱۲]:

5' _ UAAUUUCUACUAAGUGUAGAU _ 3'

پس از وارد کردن توالی هر کدام از ژن‌ها درون نرم‌افزارهای chop chop و cas designer، در هر نرم‌افزار بر اساس الگوریتم‌های ارزیابی طراحی شده در آن، تعدادی توالی طراحی و امتیازبندی شد. نواحی spacer طراحی شده به ترتیب اولویت‌بندی براساس درصد عملکرد نمایش داده شده توسط هر دو نرم‌افزار، ارزیابی شد. برای هر ژن دو توالی با بالاترین امتیاز از نرم‌افزار chop chop و دو توالی با بالاترین امتیاز از نرم‌افزار cas designer انتخاب شد، توالی repeat در ابتدای آنها قرار گرفت و ساختار آن با RNA Fold بررسی شد. در نهایت از بین ۴ توالی انتخاب شده، یک توالی که علاوه بر کسب امتیازهای ایده‌آل توسط نرم‌افزارهای طراحی، ساختار مناسبی نیز در RNA Fold کسب کرده بود به عنوان gRNA نهایی گزارش شد. لازم به ذکر است از آنجایی که ناحیه spacer حداقل باید ۱۸ نوکلئوتید داشته باشد، چه در فرم RNA و چه در فرم DNA، در صورت عدم نمایان شدن ساختار مناسب، مجاز به حذف حداکثر ۴ نوکلئوتید از سمت 3' توالی‌های طراحی شده تا تشکیل یک ساختار ثانویه مناسب، می‌باشیم.

توضیحات داده شده در بالا مربوط به زمانی است که پژوهشگر به‌طور مستقیم gRNA را به فرم RNA طراحی و برای سنتز آن اقدام کند. در این صورت RNA طراحی شده مستقیماً وارد مخلوط کریسپری شده، با cas12a

واکنش داده و کمپلکس فعال RNP را تشکیل می‌دهد. نحوه دیگر سنتز RNAهای راهنما آن است که ما ابتدا توالی را به فرم DNA طراحی کنیم، در سمت 5' توالی پروموتور و در سمت 3' آن توالی ترمیناتور را قرار دهیم. سپس، این ساختار با نرم‌افزار RNA Fold مورد تجزیه و تحلیل قرار می‌گیرد. در این حالت gRNA به فرم DNA سنتز می‌شود و سپس پژوهشگر در آزمایشگاه ضمن راه اندازی فرایند in vitro T7 trancription از روی آن RNA مورد نظر را به دست می‌آورد. به این منظور ابتدا gRNAهای برگزیده شده در مرحله قبل به فرم DNA برگردانده شده، سپس توالی ترمیناتور و پروموتور به دو انتهای آنها افزوده می‌شود و ساختارها برای بررسی وارد نرم‌افزار RNA Fold می‌شود. عمل آنزیم T7 transcriptase منوط به حضور یک الی سه گوانین مابین انتهای توالی پروموتور و ابتدای ناحیه spacer می‌باشد و از آنجایی که تعداد بالای G در این ناحیه ممکن است روی نحوه اتصال gRNA به cas اثر منفی بگذارد، بهترین تعداد گوانین‌ها یک و نهایت دو عدد می‌باشد. هر سه توالی نهایی شده در مرحله قبل، با تعدادهای متفاوت گوانین در RNA Fold آنالیز گردید تا بهترین گزینه انتخاب شود. در این مورد هم ما مجاز به حذف حداکثر ۴ نوکلئوتید از انتهای 3' توالی‌های spacer، تا رسیدن به ساختاری مناسب در نرم‌افزار RNA Fold، می‌باشیم.

۳-نتایج

۳-۱ طراحی پرایمرهای LAMP برای ژن‌های invA

fimA و fimY

پس از وارد کردن توالی ژن‌های مورد نظر در نرم‌افزار NEB LAMP Primer Designer، ویژگی مجموعه پرایمرهای نمایش داده شده، مطابق با جدول ۱ بررسی شد. مناسب‌ترین مجموعه پرایمری برگزیده شده برای هر ژن، به تفکیک در جدول ۲ نشان داده شده است.

۲-۳ طراحی gRNA های اختصاصی ژن های *invA*.

fimY و *fimA*

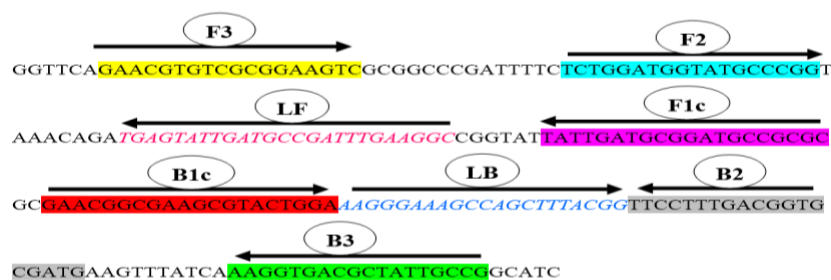
پس از انتخاب دو توالی برتر از نرم افزار chop chop و دو توالی برتر از نرم افزار cas designer، انجام بررسی های مربوطه با نرم افزار RNA Fold قبل و پس از افزودن توالی پروموتور و ترمیناتور به gRNA ها، به شرح زیر بررسی شد:

الف- نتایج طراحی gRNA ها برای سنتز مستقیم به فرم RNA (توالی که با زیرخط مشخص شده ناحیه repeat و توالی زرد رنگ شده ناحیه spacer می باشد):

واکنش تکثیری LAMP برای اجرا شدن به یک آنزیم به نام Bst DNA Polymerase احتیاج دارد و با اعمال یک دما در محدوده ۶۰ تا ۶۵ درجه به مدت ۶۰ الی ۹۰ دقیقه در یک گرمکن ساده، مانند بن ماری های متداول انجام می شود. واکنش برای اجرا شدن به ۶ الی ۸ پرایمر وابسته است که پرایمرها به نواحی مختلفی از ژنوم هدف متصل شده و توسط آنزیم مربوطه تکثیر را انجام می دهند. به دلیل زیاد بودن تعداد پرایمرها، LAMP از اختصاصیت بالایی برخوردار می باشد [۱۴ و ۱۵]. جایگاه اتصال مجموعه پرایمرهای طراحی شده برای ژن *invA* به صورت شماتیک در شکل ۱ نشان داده شده است.

جدول ۲ فهرست مجموعه پرایمرهای طراحی شده برای سه ژن شاخص سالمونلا تیغیموریوم

	<i>invA</i>	<i>fimA</i>	<i>fimY</i>
F3	GAACGTGTCGCGGAAGTC	GTGGCTTTCTCTGGTCAGG	CAGTACGCGAAGCCTTGTT
B3	CGGCAATAGCGTCACCTT	GCCTTATAGCGTGCAGTAA	CGAAGAAAGCTTTCCTGTG
LF	GCCTTCAAATCGGCATCAATACTCA	GTAGTGCTATTGTCCGCAGAGG	ATCATCAACCAGTCAGTACGGC
LB	AAGGGAAAGCCAGCTTTACGG		ATCATCGTGTAGTTTACCGGCTTAA
F1c	GCGCGGCATCCGCATCAATA	CTCAATCCCGACGCCGGTTG	AGAGGCGCCTTGCCTAAAG
F2	TCTGGATGGTATGCCCGG	CCCTAATTTGCTGGCTGTCT	CTCCAAACCTCGCTTATCGG
B1c	GAACGGCGAAGCGTACTGGA	TACCTCTTCACCGTTGAAGCCG	TAGCACGTCAGCAAAGCGTACC
B2	CATCGCACCGTCAAAGGAA	CTTCAACCAGCGACTGCT	GGAAGGTTAAGGAGGGTGA



شکل ۱ نمایش مجموعه پرایمرهای طراحی شده برای ژن *invA* روی آمپلیکون هدف

لازم به توضیح است که با استفاده از ابزار RNA Fold ساختار gRNA مورد بررسی و تحلیل قرار می‌گیرد. gRNA باید دارای یک لوپ بزرگ باز و یک لوپ کوچک بسته چسبیده به ساقه باشد تا انرژی آزاد توالی طراحی شده برای اتصال به ناحیه هدف و به cas12 در ایده‌آل ترین سطح قرار داشته باشد. همچنین، ساختار طراحی شده نباید روی خودش تا خورده و توالی با خودش مکمل شود، چراکه در این صورت توانایی اتصال آن به امپلیکون مورد نظر کاهش می‌باشد. ساختار لوپ و ساقه در سمت چپ تصاویر نیز دقیقاً مطابق همان حالتی که ناحیه repeat در شرایط طبیعی به خود می‌گیرد تا به پروتئین cas12a متصل شود.

ب- نتایج طراحی gRNA ها به فرم DNA برای سنتز توسط T7 transcriptase در محیط آزمایشگاهی (توالی آبی رنگ ابتدایی پروموتور، توالی زیرخط‌کشی شده repeat، توالی زرد رنگ شده spacer و توالی آبی رنگ انتهایی ترمیناتور می‌باشد):

gRNA نهایی برای ژن invA به فرم DNA توسط نرم‌افزار cas designer با عملکرد ۷۳/۱ درصد و میزان GC ۵۲/۵ درصد طراحی شد و پس از افزودن توالی پروموتور و ترمیناتور به gRNA طراحی شده با حذف سه نوکلئوتید از انتهای توالی DNA ساختار ثانویه مناسب در نرم‌افزار RNA fold نمایان شد (شکل ۳).

gRNA نهایی برای ژن invA توسط نرم‌افزار cas designer با عملکرد ۷۳/۱ درصد و میزان GC ۵۲/۵ درصد طراحی شد و ضمن حذف دو نوکلئوتید از انتهای توالی RNA ساختار ثانویه مناسب در نرم‌افزار RNA fold نمایان شد (شکل ۲).

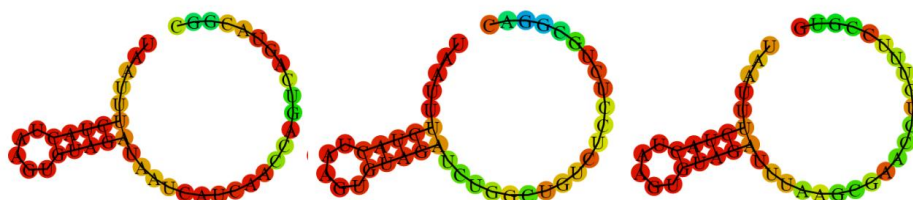
5' UAAUUUCUACUAAGUGUAGAUUUAAGCGA -
ACGUGUUUCCGUG _ 3'

gRNA نهایی برای ژن fimA توسط نرم‌افزار cas designer با عملکرد ۷۳ درصد و میزان GC ۶۰/۹ درصد طراحی شد و ضمن حذف دو نوکلئوتید از انتهای توالی RNA ساختار ثانویه مناسب در نرم‌افزار RNA fold نمایان شد (شکل ۲).

5' UAAUUUCUACUAAGUGUAGAUUCUGGCUGU -
CUCCUCUGCGGAC _ 3'

gRNA نهایی برای ژن fimY توسط نرم‌افزار chop chop با عملکرد ۶۱ درصد و میزان GC ۴۶ درصد طراحی شد و ضمن حذف یک نوکلئوتید از انتهای توالی RNA ساختار ثانویه مناسب در نرم‌افزار RNA fold نمایان شد (شکل ۲).

5' UAAUUUCUACUAAGUGUAGAUAAUCAUCA -
ACCAGUCAGUACGGC _ 3'



شکل ۲ ساختار ثانویه gRNA های طراحی شده به فرم RNA در نرم‌افزار RNA Fold. به ترتیب از سمت راست به چپ: ژن invA، ژن fimA و ژن fimY



شکل ۳ ساختار ثانویه grNA های طراحی شده به فرم DNA، به همراه توالی ترمیناتور و یک گوانین افزوده شده در ابتدای ناحیه repeat در نرم افزار RNA Fold. به ترتیب از سمت راست به چپ: ژن *invA*، ژن *fimA* و ژن *fimY*

و برای فراهم شدن شرایط چسبیدن پروموتور به DNA و شروع فعالیت رونویسی، ساختار RNA Fold در حالت DNA باید دارای یک لوپ بزرگ باز، یک ساختار لوپ و ساقه در سمت چپ و یک ساختار لوپ و ساقه بلند در ناحیه ترمیناتور در سمت راست داشته باشد. همچنین، لازم به ذکر است حین وارد کردن توالی در نرم افزار RNA Fold باید توالی را بدون پروموتور و از ابتدای گوانین های افزوده شده، درون نرم افزار وارد کرد

در پایان باید گفت برای هر ژن دو توالی که درصد عملکرد بالاتری داشتند از نرم افزار chop chop و دو توالی با بالاترین امتیاز از نرم افزار cas designer برگزیده شد و آنالیز شد. در مجموع از چهار توالی برگزیده شده برای هر ژن، بهترین توالی به عنوان grNA نهایی در فرم RNA و فرم DNA گزارش شد. توالی نهایی grNA برای ژن های *invA* و *fimA* توسط cas designer طراحی شد و برای ژن *fimY* نیز توسط نرم افزار chop chop طراحی شد. البته با توجه به اکثر گزارشات منتشر شده توسط مقالات علمی معتبر پیشنهاد می شود ورود به فاز آزمایشگاهی و استفاده از grNA های سنتز شده منوط به یک توالی نباشد و حداقل سه توالی سنتز شود، چرا که تنها در شرایط *in vitro* عملکرد توالی طراحی شده مشخص خواهد شد.

۴- بحث

پس از طراحی پرایمرها و grNA های مربوطه، توالی ها باید سنتز شوند و وارد فاز آزمایشگاهی شود. در روش

5/
_ATTAATACGACTCACTATAGTAATTTCTAC
TAAGTGTAGATTAAAGCGAACGTGTTCCG
T
AACCCCTGCGAGGCCTCTTCGGAGGTCTCGC
AGGGTTTTTTTTT _ 3/
grNA نهایی برای ژن *fimA* توسط نرم افزار cas designer با عملکرد ۷۳ درصد و میزان GC ۶۰/۹ درصد طراحی شد و پس از افزودن توالی پروموتور و ترمیناتور به grNA طراحی شده با حذف چهار نوکلئوتید از انتهای توالی DNA ساختار ثانویه مناسب در نرم افزار RNA fold نمایان شد (شکل ۳).

5/
_ATTAATACGACTCACTATAGTAATTTCTACT
AAGTGTAGATCTGGCTGTCTCCTCTGCGG
AACCCCTGCGAGGCCTCTTCGGAGGTCTCGC
AGGGTTTTTTTTT _ 3/
grNA نهایی برای ژن *fimY* توسط نرم افزار chop chop با عملکرد ۶۱ درصد و میزان GC ۴۶ درصد طراحی شد و پس از افزودن توالی پروموتور و ترمیناتور به grNA طراحی شده با حذف چهار نوکلئوتید از انتهای توالی DNA ساختار ثانویه مناسب در نرم افزار RNA fold نمایان شد (شکل ۳).

5/_ATTAATACGACTCACTATAGTAATTTCTA
CTAAGTGTAGATAATCATCAACCAGTCAGT
ACGG
AACCCCTGCGAGGCCTCTTCGGAGGTCTCGC
AGGGTTTTTTTTT _ 3/

برای داشتن مناسب ترین سطح انرژی آزاد بابت اتصال توالی طراحی شده به ناحیه هدف و به پروتئین کریسپری

های تشخیصی یک مرحله‌ای که در حال حاضر پژوهشگران سراسر جهان برای جایگزینی آنها با روش های دو مرحله‌ای انجام می‌دهند، باید مخلوط کریسپری را بر روی درب میکروتیوب و مخلوط واکنش تکثیری (در روش های یک مرحله‌ای باید از واکنش های همدا مانند LAMP استفاده شود) را در انتهای میکروتیوب تعبیه کرد. سپس، با اعمال دمای واکنش تکثیری شرایط را برای انجام شدن آن فراهم کرده و در انتها با اسپین کردن میکروتیوب، محصول واکنش تکثیری در اختیار مخلوط کریسپری قرار داده می‌شود. به طور کلی، اصلی ترین مزیت ترکیب LAMP با واکنش های کریسپری (که به تنهایی حساسیت پایینی دارند)، بالا بردن حساسیت تشخیص پاتوژن هدف می‌باشد، زیرا علاوه بر افزایش تعداد نسخه های امپلیکون، به نوعی تشخیص دو بار انجام می‌گیرد که این موضوع هم در روش های LAMP-کریسپر دو مرحله ای و هم در یک مرحله مشهود می‌باشد. همچنین، احتمال بروز جواب های مثبت کاذب (که نقص بزرگی در روش LAMP به شمار می رود) تا حد قابل قبولی کاهش می یابد. از آنجایی که، طراحی grNA با توجه به حضور PAM به طور خاص برای ناحیه ای که از ژنوم هدف انجام می‌گیرد، پس از تشخیص اولیه با LAMP و تکثیر امپلیکون حاوی ناحیه هدف grNA، پاتوژن مورد نظر با اختصاصیت قابل قبولی شناسایی خواهد شد. [۱۶-۱۸]. مکانیسم تشخیص با کریسپر cas12a به این صورت است که در دمای انکوباسیون برای اجرا شدن فرایند کریسپری، ابتدا grNA به آنزیم cas متصل شده و کمپلکس فعال کریسپری تحت عنوان RNP تشکیل می‌شود. سپس، کمپلکس توسط grNA و توالی PAM موجود در سویه هدف (PAM برای cas12a یک توالی ۴ نوکلئوتیدی از TTTT می‌باشد)، ناحیه مورد نظر را شناسایی کرده، به آن متصل می‌شود و ژنوم را برش می‌زند. در این مرحله برش های خارج از هدف آنزیم cas12a آغاز شده و

گزارشگرهای موجود در مخلوط کریسپری (ssDNA) کوتاه برچسب شده با مواد فلورفور و کوینیچر) را برش می‌زند و سیگنال های قابل ردیابی را ساعت می‌کند. تشخیص با این قبیل روش های تشخیصی کریسپری می تواند در حداقل ۲۰ دقیقه با حساسیت و اختصاصیتی معادل real time PCR، با کمترین امکانات انجام شود و قابلیت استفاده های میدانی و توسعه کیت های تشخیصی خانگی را نیز دارد [۱۹ و ۲۰].

در مرحله تکثیر واکنش های کریسپری، می توان از روش های هم دما مانند LAMP و RPA و همچنین از روش های چند دما مانند PCR بهره برد. علاوه بر سه واکنش نام برده شده، روش های RCA، NASBA، CHA، RAA نیز قابلیت تطبیق پذیری با روش های تشخیصی کریسپر را دارند که در تعدادی از مقالات استفاده موفقیت آمیز از آنها، گزارش شده است. پژوهشگر بر حسب هدفی که دارد یکی از روش های تکثیری را انتخاب کرده و سایر مراحل واکنش را طراحی می‌کند، اما نکته قابل توجه آن است که استفاده از روش های چند دما، پرهزینه و وابسته به تجهیزات آزمایشگاهی بوده و هدف واکنش های کریسپری POC نمی‌باشد. از همین رو امروزه، به کارگیری LAMP و RPA بیشتر از سایر روش ها توصیه می‌شود. همچنین، LAMP به دلیل تک آنزیمی بودن، هزینه های پایین تر برای پیاده سازی و دقت بالاتر نسبت به RPA، کاربرد گسترده تری پیدا کرده است [۲۰-۲۳]. برای اساس روشی تلفیقی و تشخیصی با LAMP و cas12a در دوران کرونا راه اندازی و منجر به توسعه یک ابزار تشخیصی قابل حمل و سیار با ظرفیت تشخیص همزمان ۵ میکروتیوب، ابداع شد که توانایی تشخیص اهداف پاتوژنی را طی ۴۰ دقیقه توسط کیت های نواری (LFA) دارد. این قبیل روش های تشخیصی قابلیت تعمیم به انواع مختلفی از پاتوژن ها را داشته و به راحتی با تغییر برنامه آنها و طراحی grNA جدید می توان اهداف مختلفی را

توسط آنها پوشش داد [۲۴]. روش دیگری که از cas12a و LAMP برای ردیابی دو گونه شاخص سالمونلا تیفیموریوم توسعه یافته LAMP-CRISPR cas12a based نام دارد که تشخیص‌ها را طی ۷۰ دقیقه انجام می‌دهد و نتایج کیفی را توسط حسگرهای زیستی جریان جانبی (LFB) نمایان می‌کند. gRNA مورد استفاده در این روش ژن invA را شناسایی کرده و دقت روش، معادل real time PCR تخمین زده شده است [۱۲]. همانطور که عنوان شد cas9 و dcas9 نیز قابلیت‌های تشخیصی دارند، به‌عنوان مثال در روشی تشخیصی تحت عنوان CALL (dCas9-assisted LAMP-based LFB)، از روش LAMP به کمک dcas9 و طی ۴۰ دقیقه می‌توان سالمونلا را در نمونه ردیابی و نتایج را با LFB شناسایی کرد. اما، نقص این دسته از روش‌ها مراحل زیاد انجام شدن فرایند تشخیصی و بیشتر بودن هزینه‌ها نسبت به روش‌هایی است که با cas12 و cas13 فعالیت می‌کند. همچنین، پیچیدگی استفاده از cas9 و dcas9 و طراحی تکنیک‌های تشخیصی با آنها بیشتر می‌باشد و عموم روش‌های POC با این دو پروتئین توسعه نیافته‌اند. cas12a نسبت به cas13 در تشخیص سالمونلا این مزیت را دارد که می‌تواند مستقیماً ژنومی که از جنس DNA باشد را تشخیص داده و آن را برش دهد. بنابراین، توسعه روش‌های تشخیصی برای ابداع کیت‌ها بیشتر از cas12 مورد نظر است [۱۲ و ۲۵]. همچنین، cas12a نسبت به cas14 ضمن داشتن gRNA کوتاه‌تر که یکی از مزایای استفاده از آن می‌باشد، توسعه بیشتری داشته و چالش‌های استفاده از آن کمتر می‌باشد. اما، به‌طور کلی و با توجه به پژوهش‌های انجام شده، cas14 به دلیل اندازه کوچک و عدم نیازمندی به ناحیه PAM، پتانسیل تبدیل شدن به یکی از اصلی‌ترین پروتئین‌های تشخیصی را دارد [۶].

برای تشخیص سالمونلا تیفیموریوم، روش استاندارد طلایی، real time PCR می‌باشد که جدای از دقت و حساسیت بالایی که دارد نمی‌توان آن را به‌عنوان یک روش POC مدنظر قرار داد، چراکه علاوه بر وابستگی به تجهیزات آزمایشگاهی نیازمند نیروهای متخصص و آموزش دیده نیز می‌باشد و پیاده‌سازی آن هزینه‌های نسبتاً زیادی را تحمیل می‌کند. از بین روش‌های دیگر، آپتامرها، PCR و LAMP نیز در ردیابی‌های سالمونلا استفاده شده‌اند. اما عموم این روش‌ها در آزمایشگاه‌های تحقیقاتی کاربرد دارند و هنگام شیوع پاتوژن نمی‌توان آن‌ها را به‌طور گسترده به‌کار گرفت. علاوه بر این، روش‌های ایمنی‌سنجی و مبتنی بر آنتی‌بادی‌ها مانند الایزا و همچنین کشت سلولی نیز به‌عنوان روش‌های تشخیصی پرکاربرد برشمرده می‌شوند که همگام با حساسیت بالا نتایج قابل اعتمادی ارائه می‌کند، اما نقص این دسته از روش‌های تشخیصی زمان‌بر بودن فرایند و وابستگی به محیط آزمایشگاه می‌باشد. با گذشت حدوداً یک دهه از معرفی شدن تکنیک‌های تشخیصی مبتنی بر کریسپر، توسعه انواع مختلفی از کیت‌های تشخیصی و فعالیت شرکت‌هایی نظیر ماموت و شرلوک، این فناوری اثبات کرد می‌تواند جایگزین مناسبی برای روش‌های تشخیصی قبلی باشد، نتایجی قابل مقایسه با real time PCR ارائه کند و محدودیت‌های دست و پاگیر آنها را نداشته باشد. بنابراین، توسعه کیت‌های کریسپری و به دنبال آن رسیدن به ریزآرایه‌های کریسپری یکی از اهداف اصلی پژوهشگران حوزه تشخیص می‌باشد. بهینه‌سازی‌ها در این قبیل روش‌ها عموماً به‌صورت طراحی یک بازه برای فعالیت جداگانه هر المنت انجام می‌گیرد؛ به‌عنوان مثال، چندین زمان برای انتخاب بهینه‌ترین زمان فعالیت آنزیم کریسپری در نظر گرفته می‌شود و میزان ساتع شدن فلورفورهای بریده شده، اندازه‌گیری می‌شود تا بتوان بهترین شرایط را برگزید. همچنین، با پیاده‌سازی هر

آزمایش در حداقل سه مرتبه و ثبت نتایج حاصل از آن، می‌توان به نوعی تکرارپذیری آزمون‌ها را اثبات کرد. هدف دیگر پژوهشگران ابداع روش‌هایی است که بتوانند ضمن حفظ کردن حساسیت و اختصاصیت مورد نظر، مستقیماً پاتوژن را در نمونه‌های طبیعی ردیابی کنند. به این معنی که، نیازی به جداسازی باکتری از نمونه مشکوک به آلودگی و سپس استخراج ژنوم از سالمونلا نباشد چراکه اصلی‌ترین چالش‌ها در تشخیص این باکتری، شناسایی زودهنگام آن در مراحل ابتدایی آلوده سازی و ردیابی مستقیم آن در نمونه‌های طبیعی می‌باشد [۲۶-۲۸].

طراحی grNA برای روش‌های تشخیصی نسبت به روش‌های ویرایشی پیچیده و دشوار نیست که شاید مهم‌ترین دلیل آن باشد که در روش‌های تشخیصی هدف رخ دادن برش‌های خارج از هدف می‌باشد، اما در روش‌های ویرایشی باید تا حد امکان این برش‌ها را کاهش داد. تعداد زیادی نرم‌افزار برای طراحی grNAها توسعه یافته است و هر نرم‌افزار قابلیت‌های منحصر به فردی در اختیار کاربران قرار می‌دهد. حتی امروزه چند نرم‌افزار برای طراحی کتابخانه‌های grNA برای انجام ویرایش‌ها و یا تشخیص‌های چندگانه در حال توسعه می‌باشند. مهمترین نکته در انتخاب نرم‌افزار برای طراحی grNA پوشش دادن سویه هدف توسط نرم‌افزار و حضور cas مربوطه به عنوان یکی از گزینه‌ها برای طراحی می‌باشد، زیرا همانطور که گفته شد به دلیل متفاوت بودن توالی‌های repeat برای هر cas، انتخاب cas صحیح در طراحی‌ها حائز اهمیت می‌باشد چراکه توالی spacer از grNA به شدت می‌تواند روی اتصال آن به cas12a اثرگذار باشد. از طرفی هر نرم‌افزار فاکتورهای مخصوص به خود را برای اولویت‌بندی توالی‌ها دارد. اما، به‌طورکلی میزان GC توالی‌ها نباید کمتر از ۴۰ درصد باشد و میس‌مچ‌ها در ناحیه‌ای که توالی با ژنوم هدف مکمل می‌شود، ترجیحاً نباید از

یک عدد تجاوز کند. درصد عملکرد نمایش داده شده توسط نرم‌افزارها که نباید کمتر از ۶۰ درصد باشد، علاوه بر دو فاکتور گفته شده به بررسی‌هایی که خود نرم‌افزار در جهت عدم تشکیل شدن ساختارهای ثانویه انجام می‌دهد و مکان برشی cas نیز بستگی دارد. در این راستا هوش مصنوعی به‌صورت خودکار تمامی موارد بالا را بررسی کرده و در نهایت توالی‌های طراحی شده را نمایش می‌دهد. آنالیزهای ثانویه grNAها در موارد ویرایشی از اهمیت بالاتری برخوردار می‌باشد. اما در روش‌های تشخیصی عموماً این آنالیزها، مطالب اضافه‌تری از نرم‌افزارهای طراحی ارائه نخواهند داد. آنالیزهای بیوانفورماتیکی برای انتخاب توالی با بهترین عملکرد و جوابدهی قابل قبول در شرایط آزمایشگاهی می‌باشد. اما نباید فراموش کرد که فعالیت توالی‌های طراحی شده حتی با بالاترین درصد عملکرد و مناسب‌ترین ساختار ثانویه هم ۵۰ درصد تخمین زده می‌شود که ممکن است در محیط in vitro جواب بدهد یا جاب ندهد. بهترین راهکار برای غلبه بر این عدم اطمینان، طراحی و سنتز حداقل سه توالی برای ورود به فاز آزمایشگاهی و سپس انتخاب مناسب‌ترین توالی از بین آنها می‌باشد. لازم به ذکر است طبق استناد به مقالات متعدد منتشر شده در حوزه کریسپری، مناسب‌ترین پروموتور، T7 بوده و عموم پژوهشگران از این نوع پروموتور استفاده کرده‌اند [۲۹ و ۳۰].

۵- نتیجه‌گیری

با پیشرفت‌های نوین در زیست‌فناوری و معرفی تعداد زیادی از نرم‌افزارهای بیوانفورماتیکی برای طراحی‌های زیستی و آنالیزهای ثانویه، مباحث مربوط به طراحی پرایمرها و grNAهای کریسپری مانند سابق پیچیده و دشوار نمی‌باشد. از بین سه نرم‌افزار شاخص برای طراحی پرایمرهای LAMP به نام‌های LAMP Designer، NEB LAMP Primer Designer و PrimerExplorer V5

- [1] Wang, J. Y., & Doudna, J. A. (2023). CRISPR technology: A decade of genome editing is only the beginning. *Science*, 379(6629), eadd8643.
- [2] Isaacson, W. (2021). *The code breaker: Jennifer Doudna, gene editing, and the future of the human race*. Simon and Schuster.
- [3] Zhu, H., & Liang, C. (2019). CRISPR-DT: designing gRNAs for the CRISPR-Cpf1 system with improved target efficiency and specificity. *Bioinformatics*, 35(16), 2783-2789.
- [4] Yang, Y., Wang, D., Lü, P., Ma, S., & Chen, K. (2023). Research progress on nucleic acid detection and genome editing of CRISPR/Cas12 system. *Molecular Biology Reports*, 50(4), 3723-3738.
- [5] Leung, R. K. K., Cheng, Q. X., Wu, Z. L., Khan, G., Liu, Y., Xia, H. Y., & Wang, J. (2022). CRISPR-Cas12-based nucleic acids detection systems. *Methods*, 203, 276-281.
- [6] Hillary, V.E., Ceasar, S.A. (2023) A review on the mechanism and applications of CRISPR/Cas9/Cas12/Cas13/Cas14 proteins utilized for genome engineering. *Molecular Biotechnology*. 65(3), 311-325.
- [7] Jiang, H., Wu, Q., Zhao, Q., Liu, K., Bo, Q., Qin, X., ... & Qin, P. (2023). Using dCas9 as an intermediate bridge of loop-mediated isothermal amplification-based lateral flow colorimetric biosensor for point-of-care *Salmonella* detection. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 396, 134581.
- [8] El-Tholoth, M., Bau, H.H., Song, J. (2021) A single and two-stage, closed-tube, molecular test for the 2019 novel coronavirus (COVID-19) at home, clinic, and points of entry. ChemRxiv [Preprint]. *Analytical Chemistry*. 93(38),13063-13071.
- [9] Shoushtari, M., Zeinoddini, M., Fathi, J., Alikhani, H. K., & Shiekhi, F. (2024). One-step and Rapid Identification of SARS-CoV-2 using Real-Time Reverse Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification (RT-LAMP). *Avicenna Journal of Medical Biotechnology*, 16(1), 3.
- [10] Ownagh, A., Etemadi, N., Khademi, P., Tajik, H. (2023) Identification of *Salmonella* carriers by amplification of *FimA*, *Stn* and *InvA* genes and bacterial culture methods in fecal samples of buffalo. *Veterinary Research Forum*. 14(1),21-28.

نرم افزار برخط NEB LAMP Primer Designer به دلیل سادگی کار با آن، به روز بودن و نمایش اطلاعات جامع تر برای طراحی های موجود در این پژوهش برگزیده شد. همچنین، با پیشرفت سریع فناوری کریسپر و ابزارهای بیوانفورماتیکی مربوطه، تعداد بسیار زیادی نرم افزار برای طراحی gRNA ها توسعه یافته اند که به دلیل کثرت، نام بردن آنها دشوار می باشد. اما مشهورترین و مورد اعتمادترین این نرم افزارها، سه نرم افزار chop chop، CRISPOR و cas designer می باشد. از این بین تنها دو نرم افزار chop chop و cas designer سویه سالمونلا تیفیموریوم را پشتیبانی می کنند. بنابراین، بررسی های حاصله در این پژوهش توسط این دو نرم افزار انجام شد. gRNA های انتخابی در پژوهش فوق درصد عملکرد بالای ۶۰ و میزان GC بالای ۴۰ درصد داشتند تا این اطمینان حاصل شود که ضمن برقراری یک اتصال محکم و کارآمد بین gRNA و آمپلیکون هدف و بین ناحیه repeat با cas12a، آنزیم کریسپری توانایی فعال شدن و ایجاد برش های خارج از هدف، تا شناسایی دقیق سویه سالمونلا تیفیموریوم را خواهد داشت. در نتیجه از پرایمرها و gRNA های طراحی شده در این پژوهش می توان برای تشخیص تلفیقی سالمونلا تیفیموریوم با دو روش LAMP و کریسپر-cas12 استفاده کرد.

تضاد منافع

نویسندگان این مقاله هیچ تضاد منافی را اعلام نمی کنند.

تشکر و قدردانی

این پژوهش با حمایت بنیاد علم ایران با کد طرح ۴۰۲۵۰۳۴ انجام شده است، همچنین مطالعات فوق در پژوهشکده علوم و فناوری زیستی دانشگاه صنعتی مالک اشتر انجام گرفته است. بنابراین، جا دارد تا از زحمات مسئولین بنیاد علم ایران و دانشگاه، صنعتی مالک اشتر سپاسگزاری شود.

۶- منابع

- RT-PCR, NASBA and RT-LAMP methods for detection of Cocksackievirus B3. *Biomacromolecular Journal*, 3(2), 100-106.
- [22] Augustine, R., Hasan, A., Das, S., Ahmed, R., Mori, Y., Notomi, T., ... & Thakor, A. S. (2020). Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): a rapid, sensitive, specific, and cost-effective point-of-care test for coronaviruses in the context of COVID-19 pandemic. *Biology*, 9(8), 182.
- [23] Moehling, T. J., Choi, G., Dugan, L. C., Salit, M., & Meagher, R. J. (2021). LAMP diagnostics at the point-of-care: emerging trends and perspectives for the developer community. *Expert Review of Molecular Diagnostics*, 21(1), 43-61.
- [24] Rezaei, M., Razavi Bazaz, S., Morshedi Rad, D., Shimon, O., Jin, D., Rawlinson, W., & Ebrahimi Warkiani, M. (2021). A portable RT-LAMP/CRISPR machine for rapid COVID-19 screening. *Biosensors*, 11(10), 369.
- [25] An, B., Zhang, H., Su, X., Guo, Y., Wu, T., Ge, Y., ... & Cui, L. (2021). Rapid and sensitive detection of salmonella spp. using CRISPR-Cas13a combined with recombinase polymerase amplification. *Frontiers in Microbiology*, 12, 732426.
- [26] Awang, M. S., Bustami, Y., Hamzah, H. H., Zambry, N. S., Najib, M. A., Khalid, M. F., ... & Abd Manaf, A. (2021). Advancement in Salmonella detection methods: From conventional to electrochemical-based sensing detection. *Biosensors*, 11(9), 346.
- [27] Shao, N., Han, X., Song, Y., Zhang, P., & Qin, L. (2019). CRISPR-Cas12a coupled with platinum nanoreporter for visual quantification of SNVs on a volumetric bar-chart chip. *Analytical chemistry*, 91(19), 12384-12391.
- [28] Sun, H., Wan, Y., Du, P., & Bai, L. (2020). The epidemiology of monophasic Salmonella Typhimurium. *Foodborne Pathogens and Disease*, 17(2), 87-97.
- [29] Crone, M. A., MacDonald, J. T., Freemont, P. S., & Siciliano, V. (2022). gDesigner: computational design of synthetic gRNAs for Cas12a-based transcriptional repression in mammalian cells. *NPJ Systems Biology and Applications*, 8(1), 34.
- [11] Zeinoddini, M. (2021). Genome-based Detection of Novel Coronavirus: An Overview Study. *Journal of Inflammatory Diseases*, 25(1), 51-60.
- [12] Lee, S. Y., & Oh, S. W. (2023). Lateral flow biosensor based on LAMP-CRISPR/Cas12a for sensitive and visualized detection of Salmonella spp. *Food Control*, 145, 109494.
- [13] Fulga, T.A., Knapp, D.J.H.F., Ferry, Q.R.V. CRISPR guide RNA design: Methods and protocols, Springer, 2021.
- [14] Sheikhi, F., Zeinoddini, M., Jalili, S. (2023) Optimization for Rapid Detection of *Staphylococcus aureus* using Real-time LAMP. *Journal of Applied Biotechnology Reports*, 10(2), 984-991.
- [15] Mousavi, S. M., Zeinoddini, M., Saeedinia, A. R., & Xodadadi, N. (2020). Specific and Rapid Detection of Zonula Occludens Toxin-producing *Vibrio Cholerae* Using LAMP. *Biomacromolecular Journal*, 6(2), 139-146.
- [16] Aman, R., Marsic, T., Sivakrishna Rao, G., Mahas, A., Ali, Z., Alsanea, M., ... & Mahfouz, M. (2022). iSCAN-V2: A one-pot RT-RPA-CRISPR/Cas12b assay for point-of-care SARS-CoV-2 detection. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 9, 800104.
- [17] Ali, Z., Aman, R., Mahas, A., Rao, G. S., Tehseen, M., Marsic, T., ... & Mahfouz, M. M. (2020). iSCAN: An RT-LAMP-coupled CRISPR-Cas12 module for rapid, sensitive detection of SARS-CoV-2. *Virus Research*, 288, 198129.
- [18] Atçeken, N., Yigci, D., Ozdalgiç, B., & Tasoglu, S. (2022). CRISPR-Cas-Integrated LAMP. *Biosensors*, 12(11), 1035.
- [19] Lee, S., Nam, D., Park, J. S., Kim, S., Lee, E. S., Cha, B. S., & Park, K. S. (2022). Highly efficient DNA reporter for CRISPR/Cas12a-based specific and sensitive biosensor. *BioChip Journal*, 16(4), 463-470.
- [20] Zhang, G., Zhang, L., Tong, J., Zhao, X., & Ren, J. (2020). CRISPR-Cas12a enhanced rolling circle amplification method for ultrasensitive miRNA detection. *Microchemical Journal*, 158, 105239.
- [21] Zeinoddini, M., Monazah, A., & Saeedinia, A. R. (2017). Comparison between

Design of guide RNA for CRISPR-Cas12-based detection of *Salmonella typhimurium*

Zahra Mardashti¹, Mehdi Zeinoddini^{2*}, Ali Reza Saeedinia³

1. Master's student in Molecular Biotechnology, Research Center of Science and Biotechnology, Malek Ashtar University of Technology, Tehran, Iran.
2. PhD in Biochemistry, Associate Professor, Research Center of Science and Biotechnology, Malek Ashtar University of Technology, Tehran, Iran.
3. PhD in Molecular Genetics, Research Center of Science and Biotechnology, Malek Ashtar University of Technology, Tehran, Iran.

zeinoddini52@mut.ac.ir

Receipt: 2024/08/01

Accepted: 2025/04/20

Abstract

CRISPR-based detection methods are used as a revolutionary approach to detect pathogen genes. In this regard, the first step is the design of guide RNA (gRNA) using bioinformatics tools. gRNA is a component in CRISPR systems that leads to the recognition of the target, the establishment of the CRISPR complex on it and the activation of Cas cleavage activities. The aim of the current research is designing gRNA to identify *invA*, *fimA* and *fimY* genes from *Salmonella Typhimurium* to be used in its detection kit. In this research, Chop Chop (version 3) and Cas Designer (version 2016) software were used for design, and the secondary structure of the designed sequences was analyzed by RNA Fold software. According to the planning of the primary amplification by the isothermal LAMP method, the relevant primers were designed by NEB LAMP Primer Designer online tool. Also, the design of the guide RNA was carried out considering the Cas12a protein for use in the CRISPR complex. To be more sure of the design, the sequences obtained from two software were compared with each other and the results were interpreted using the RNA Fold database to select the best sequence. Finally, for each of the gene targets, the best sequence was selected and suggested for the next diagnostic path based LAMP and CRISPR-Cas12. By using simulation studies in the design of guide RNA and by using the resulting sequences, it is possible to detect the genome of the pathogen in contaminated food accurately and without false positive results.

Keywords: guide RNA, *Salmonella*, CRISPR, isothermal detection.