

مقایسه‌ی عملکرد آنزیم T7 اندونوکلاز I و سیستم الکتروفورز ژل پلی آکریل آمید در ارزیابی کارایی برش سیستم CRISPR/Cas9

نسیم مایلی فریدنی^۱، حمید گله‌داری^۲، الهام حویزی^۳، منیره عجمی^۴

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: ارزیابی کارایی برش آنزیم Cas9 در سیستم CRISPR (Clustered Regularly Interspersed Short Palindromic Repeat) و غربال‌گری جهش‌های ایجاد شده، یکی از چالش‌های این سیستم می‌باشد. این مطالعه روشی مبتنی بر استفاده از سیستم پلی‌اکریل‌امید غیردنا توره، بدون نیاز به تشکیل هتروپلکس با کارایی بالا را پیشنهاد می‌کند.

روش‌ها: در این مطالعه، به منظور بررسی عملکرد سیستم CRISPR-Cas9، ابتدا توالی RNA راهنمای مناسب با توالی هدف، طراحی و سنتز شد. وکتور (PX458) pSpCas9(BB)-2A-GFP با استفاده از آنزیم BbsI برش داده و RNA راهنمای در جایگاه برش کلون شد. پلاسمید نو ترکیب، استخراج و پس از تأیید صحت کلونینگ با استفاده از تکنیک توالی‌یابی، به رده‌ی سلولی HEK293T ترانسفکت گردید. پس از تأیید انتقال و تعیین درصد ترانسفکت توسط دستگاه فلوسایتومتری، DNA ژنومی سلول‌های حامل وکتور نو ترکیب استخراج شد. دو واکنش PCR (Polymerase chain reaction) مختلف در ناحیه‌ی مورد نظر بر روی ژن بتاگلوبین انجام شد و درصد عملکرد آنزیم Cas9 با استفاده از آنزیم اندونوکلاز T7I (T7EndonucleaseI) و سیستم پلی‌اکریل‌امید غیردنا توره کننده ارزیابی گردید.

یافته‌ها: نتایج هضم آنزیمی T7E1 بر روی ژنوم، نشان‌دهنده‌ی عملکرد ۳۲ درصدی آنزیم Cas9 و نتایج سیستم پلی‌اکریل‌امید غیردنا توره کننده، نشان‌دهنده‌ی عملکرد ۶۶ درصدی آنزیم بود. به این ترتیب سیستم پلی‌اکریل‌امید غیردنا توره به طور قابل اعتمادی تغییرات کوچک به اندازه‌ی ۵-۱۰ جفت باز (bp) در طول اسید نوکلئیک در محل مورد نظر را نیز تشخیص می‌دهد.

نتیجه‌گیری: تکنیک PAGE می‌تواند جایگزین سنجش T7E1 به عنوان یک پروتکل معمول آزمایشگاهی برای ژنوتیپ کردن رده‌های سلولی انسانی تولید شده با سیستم CRISPR/Cas9 شود.

واژگان کلیدی: الکتروفورز ژل پلی‌اکریل‌امید؛ آنزیم T7 اندونوکلاز I؛ CRISPR/Cas9؛ جهش ایندل

ارجاع: مایلی فریدنی نسیم، گله‌داری حمید، حویزی الهام، عجمی منیره. مقایسه‌ی عملکرد آنزیم T7 اندونوکلاز I و سیستم الکتروفورز ژل پلی‌اکریل‌امید در ارزیابی کارایی برش سیستم CRISPR/Cas9. مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۴۰۲؛ ۴۱ (۷۴۰): ۹۳۷-۹۲۹

مقدمه

استفاده از اندونوکلازهای اختصاصی جهت ایجاد برش در ناحیه‌ی مشخصی از یک ژن به منظور تحریک مکانیسم‌های ترمیم DNA، به طور قابل توجهی کارایی تکنیک‌های تصحیح ژن را در شرایط آزمایشگاهی بهبود بخشیده است (۱). تاکنون از کلاس‌های مختلفی از اندونوکلازهایی با قابلیت برنامه‌ریزی جهت ویرایش ژنوم استفاده

شده است که عبارتند از مگانوکلازها (Meganucleases)، نوکلئازهای انگشت-روی (Zinc-Finger Nucleases) ZFNs، افکتور نوکلئازهای شبه فعال‌کننده رونویسی (Transcription Activator-Like Effector Nucleases) TALENs و سیستم‌های نوکلئاز مبتنی بر تناوب‌های کوتاه پالیندروم فاصله‌دار منظم خوشه‌ای (CRISPR) (۲-۴).

۱- دانشجوی دکتری، گروه زیست‌شناسی، دانشکده‌ی علوم، دانشگاه شهیدچمران اهواز، اهواز، ایران

۲- استاد، گروه زیست‌شناسی، دانشکده‌ی علوم، دانشگاه شهیدچمران اهواز، اهواز، ایران

۳- دانشیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده‌ی علوم، دانشگاه شهیدچمران اهواز، اهواز، ایران

۴- استادیار، گروه هماتولوژی، دانشکده‌ی پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد، تهران، ایران

نویسنده‌ی مسؤول: حمید گله‌داری؛ استاد، گروه زیست‌شناسی، دانشکده‌ی علوم، دانشگاه شهیدچمران اهواز، اهواز، ایران

امروزه یکی از قدرتمندترین ابزارهای ویرایش ژنی، نوکلئازهای مرتبط با سیستم CRISPR می‌باشند (۲، ۵). سیستم نوکلئازی CRISPR /Cas9 کلاسی جدید از نوکلئازهای قابل برنامه‌ریزی است که از یک RNA راهنما به منظور آغاز فرایند شناخت توالی هدف استفاده می‌کند (۶)، در حالی‌که دومین قابل برنامه‌ریزی در مگانوکلئاز، ZFNs و TALENs بر پایه‌ی یک ساختار پروتئینی می‌باشند (۷، ۸). فعالیت کارآمد نوکلئاز Cas9 نیازمند حضور یک توالی RNA مکمل (crRNA) و توالی فعال‌کننده‌ی ترانس ساختار (Trans-activating CRISPR (tracr) RNA) می‌باشد. ساختار tracrRNA: crRNA می‌تواند یا به صورت RNA دوتایی (۹) و یا یک راهنمای تک کیمریک (single guide RNA) مورد استفاده قرار گیرد (۱۰، ۱۱). RNA راهنما با توالی DNA مکمل خود هیبرید شده و اندونوکلئاز Cas9 را جهت اتصال و برش محل DNA مورد نظر به شرط حضور توالی PAM، به محل مورد نظر هدایت می‌کند (۱۲-۱۴). نوکلئاز Cas9 عمدتاً از طریق فعالیت دو دومین خود که بطور مستقل رشته‌ی مکمل (دومین NHN) و رشته‌ی غیر مکمل (دومین Ruvc) را برش می‌زنند، شکست دورشته‌ای کور ایجاد می‌کند (۱۵). پس از تشخیص شکست دورشته‌ای، محل شکست توسط یک سیگنال مولکولی و اتصال ماشین‌های ترمیم از طریق سیستم ترمیم اتصال انتهاهای غیرهمولوگ (NHEJ (Non-Homologous End Joining) یا ترمیم همولوگ مستقیم در حضور یک DNA الگوی دهنده، تحریک می‌گردد (۱۶). در مسیرهای وابسته به برش، تخریب نوکلئولیتیک در انتهای ۵' DNA در محل شکست تحریک می‌شود و در نهایت می‌تواند منجر به ایجاد ایندل‌های ۱-۲۵ جفت بازی گردد (۱۷). ارزیابی کارایی نوکلئاز، یک گام اساسی برای ویرایش موفق ژنوم است، به ویژه در آزمایش‌هایی که در موجودات زنده و برای اهداف درمانی انجام می‌شود (۱۸). طیف گسترده‌ای از تکنیک‌های مختلف جهت ارزیابی اثربخشی ویرایش نوکلئازها استفاده می‌گردد. این روش‌ها از نظر هزینه، زمان مورد نیاز و داده‌های به دست آمده، با یکدیگر متفاوت می‌باشند. علاوه بر این، آن‌ها به تجهیزات مختلفی نیاز دارند که ممکن است از ابتدایی‌ترین ماشین‌های PCR و سیستم‌های الکتروفورز تا دستگاه‌های توالی‌یابی با توان بالای مدرن را شامل شود (۱۹) که هر کدام از نقاط قوت و محدودیت‌های خاصی برخوردار می‌باشند (۲۰). آنالیزهای (Restriction fragment length tracking of indels by RFLP polymorphism) TIDE (indel detection by amplicon decomposition) IDAA (engineered nuclease-induced translocations) analysis) ENIT (High-Resolution Melting) آنالیز منحنی ذوب DNA با کیفیت بالا (HRM) و T7 اندونوکلئاز (T7E1) همگی از روش‌های مبتنی بر

جهت شناسایی DNA ناهمگن در یک مکان خاص کارآمد هستند. با این حال، این روش‌های سنجش، قادر به شناسایی پلی‌مورفیسم‌های تک نوکلئوتیدی (Single nucleotide polymorphisms) SNPs نیز می‌باشند که گاهاً منجر به ایجاد نتایج مثبت کاذب در ناحیه‌ی ژنی مورد نظر می‌گردند (۲۱). اندونوکلئاز T7E1 که به طور گسترده مورد استفاده قرار می‌گیرد، DNA دو رشته‌ای هترو دوپلکس نامتناسب را هدف قرار داده و هضم می‌کند و در نتیجه دو یا چند قطعه‌ی کوچک‌تر را در یک واکنش آنزیمی تولید می‌کند. قطعات DNA هضم شده را می‌توان با الکتروفورز ژل آگارز مشاهده کرد (۲۲). سنجش بر پایه‌ی آنالیز منحنی ذوب نیز نیازمند دستگاه PCR کمی، تجهیزات و نرم‌افزارهایی پیشرفته‌ای می‌باشد که منجر به افزایش هزینه‌ی آنالیز می‌گردد (۲۳). علاوه بر این، برای تغییرات بیش از ۱۵ جفت باز در طول اسید نوکلئیک در محل هدف مناسب می‌باشد (۲۴). این در حالی است که متوسط اندازه‌ی ایندل ناشی از CRISPR-Cas9 بسته به طول RNA راهنمای از ۶ تا ۱۳ جفت باز می‌باشد (۲۵).

یکی دیگر از مشکلات استفاده از این روش‌های مرسوم، علاوه بر زمان‌بر و پرهزینه بودن برای تعداد نمونه‌های بالا، نیاز به درصد بالایی از سلول‌های ترانسفکت شده جهت بررسی برش می‌باشد که در مورد سلول‌های سخت ترانسفکت شونده مانند سلول‌های بنیادی هماتوپوئیتیک چالشی بزرگ محسوب می‌شود. بنابراین، استفاده از استراتژی‌های ساده و کارآمد برای تأیید حضور جهش‌های ایندل بسیار مطلوب است. در این مطالعه، یک روش مبتنی بر الکتروفورز ژل پلی‌آکریل‌امید (Polyacrylamide Gel Electrophoresis) را برای تأیید برش موفقیت‌آمیز در ناحیه‌ی ژنی مورد نظر و حضور جهش‌های ایندل ناشی از سیستم CRISPR/Cas9، اعمال کرده‌ایم. در مقایسه با روش سنتی T7E1، روش مبتنی بر PAGE ثابت می‌کند که یک استراتژی کارآمدتر، با صرفه‌جویی در زمان و هزینه است.

روش‌ها

این مطالعه، بر روی رده‌ی سلول‌های جنینی کلیه‌ی انسان ترانسفرم شده با آنتی‌ژن T ویروس SV40 (HEK293) تهیه شده از انستیتو پاستور ایران انجام شد. سلول‌های بدست آمده در محیط کشت DMEM حاوی ۱۰ درصد FBS، محلول پنی‌سیلین (۱۰۰ U/mL)، استرپتومایسین (۱۰۰ µg/mL) و ۲ mM L-گلوتامین کشت داده شد و در شرایط دمایی ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد، ۵ درصد CO₂ و رطوبت ۹۵ درصد انکوبه گردید.

طراحی RNA راهنما: به منظور طراحی RNA راهنمای اختصاصی ژن HBB انسانی، توالی gRNA با الگوی 9NGG\GN

منظور خشتی شدن بافر P2 اضافه و تا نمایان شدن ابری سفید رنگ به آرامی مخلوط گردید. مخلوط حاصل به مدت ۲ دقیقه با دور ۱۳۰۰۰ سانتریفوژ شده و سپس محلول رویی به آرامی به ستون منتقل گردید. ستون ۱ دقیقه در دور ۱۳۰۰۰ سانتریفوژ شده و توسط بافرهای شستشو، شستشو داده شد. در نهایت ۵۰ میکرولیتر بافر حل‌کننده به ستون اضافه و ۱ دقیقه با دور ۱۳۰۰۰ سانتریفوژ گردید. کیفیت پلاسمید استخراج شده توسط ژل آگارز ۱ درصد و نانودراپ سنجیده شد. به منظور بررسی صحت همسانه‌سازی، پلاسمید استخراج شده جهت توالی‌یابی سانگر و تأیید حضور gRNA در ساختار پلاسمید ارسال شد.

ترانسفکشن سلول‌های HEK ۲۹۳ رده‌ی سلولی HEK ۲۹۳ از بانک سلولی شرکت بن‌یاخته با شماره دسترسی BN_0012.1.14 تهیه و در محیط کشت DMEM حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاوی (FBS)، محلول پنی‌سیلین (۱۰۰ U/mL)، استرپتومایسین (۱۰۰ µg/mL) و L-2mM گلوتامین کشت داده شد. سپس در انکوباتور ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد با ۵ درصد CO₂ نگهداری و هر دو روز یک بار محیط کشت آن تعویض گردید و پس از ۳ پاساژ متوالی جهت ترانسفکشن مورد استفاده قرار گرفت. روز قبل از ترانسفکشن ۵×۱۰^۵ سلول در هر چاهک از پلیت ۶ خانه اضافه شد. ترانسفکشن با استفاده از ترکیب پلی‌اتیلن‌ایمین ۲۵ کیلوالتون (PEI) انجام شد. دو ساعت پیش از ترانسفکشن، محیط رویی سلول‌ها با محیط تازه حاوی ۲ درصد FBS تعویض گردید و در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد گرماگذاری شد. بر اساس دستورالعمل شرکت بن‌یاخته، ۱۰۰ میکرولیتر بافر BON1 به میکروتیوب ۱/۵ میلی‌لیتری انتقال داده شد و ۵ میکروگرم وکتور نوترکیب به آن اضافه و به خوبی ورتکس گردید. به میکروتیوب ۱/۵ میلی‌لیتری دیگری، ۶۷۲ میکرولیتر بافر BON2 و ۲۸ میکرولیتر محلول PEI اضافه گردید و به خوبی ورتکس شد. در ادامه ۱۰۰ میکرولیتر از محلول PEI به میکروتیوب حاوی وکتور اضافه شد و بلافاصله پس از افزودن PEI (سه بار، هر بار ۳ ثانیه) ورتکس گردید. مخلوط بدست آمده به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد و در نهایت هر مخلوط DNA/PEI به یک چاهک از پلیت ۶ خانه اضافه گردید. پس از گذشت ۲۰ ساعت، تعویض محیط با محیط حاوی ۱۰ درصد FBS انجام شد و پس از گذشت ۴۸ ساعت شدت نور سبز ساطع شده (به دلیل بیان پروتئین GFP) با استفاده از میکروسکوپ فلورسنت بررسی شد. درصد ترانسفکشن توسط فلوسایتومتری (مدل FACS calibur - آمریکا) تعیین شد.

ارزیابی عملکرد RNA راهنمای طراحی شده: به منظور ارزیابی کارایی عملکرد برش آنزیم Cas9 به واسطه‌ی هدایت RNA

کدکننده‌ی توالی هدف با استفاده از ابزار طراحی آنالین CRISPOR (<http://crispor.tefor.net/>) طراحی شد. به این منظور توالی مورد نظر در سایت ثبت شده و بر اساس جایگاه‌های برش هدف و غیرهدف gRNAهای پیشنهادی، همچنین فاصله‌ی جایگاه برش هر gRNA با ناحیه‌ی جهش مورد نظر، بهترین gRNA جهت سنتز انتخاب شد. همچنین توالی مربوط به ناحیه‌ی برش آنزیم محدودکننده‌ی BbsI، جهت همسانه‌سازی gRNA به درون وکتور pSpCas9(BB)-2A-GFP (PX۴۵۸) به دو انتهای gRNA طراحی شده اضافه گردید.

همسانه‌سازی RNAهای راهنما دو رشته‌ای به درون وکتور (PX۴۵۸): با استفاده از بافر اتصال شامل ۸، ۰، ۱، ۰mM Tris-HCL، ۰۰ mM NaCl، ۱mM EDTA، pH ۸، دو رشته سنس و آنتی‌سنس RNA راهنما به یکدیگر متصل، gRNA دورشته‌ای سنتز و با استفاده از آنزیم T4 ligase (فرمتاز-کانادا) به درون وکتور PX۴۵۸ الحاق و به مدت ۱۶ ساعت در دمای ۱۶°C در دستگاه ترموسایکلر قرار داده شد.

ترانسفورم وکتور نوترکیب جهت تکثیر: کشت شبانه‌ی باکتری *E. coli* سویه *stb13* در 5mL از محیط مایع (Lysogeny Broth) LB با گرماگذاری در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد و چرخش ۲۰۰ دور در دقیقه (rpm) انجام شد. مستعدسازی سلول‌های باکتریایی با استفاده از تیمار شیمیایی کلرید کلسیم (CaCl₂) ۰/۱ مولار و ترانسفورم سلول‌های مستعد به روش شوک حرارتی انجام گرفت. سوسپانسیون باکتریایی حاصل بر روی محیط کشت LB جامد حاوی آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین با غلظت ۱۰۰ µg/mL پخش شده و به مدت یک شب در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار داده شد. کلون‌های رشد کرده توسط colony PCR بررسی گردید. به این منظور حداقل از ۱۰ کلون رشد کرده بر روی محیط واجد آنتی‌بیوتیک استخراج DNA انجام شد. جهت تأیید ورود قطعه‌ی کلون شده از پریمر مربوط به پروموتور وکتور PX۴۵۸ به عنوان پریمر رفت و توالی سنتز شده آنتی‌سنس gRNA کلون شده، به عنوان پریمر برگشت استفاده شد و واکنش PCR انجام شد. مشاهده‌ی باندهای ۱۴۳ جفت بازی بر روی ژل آگارز ۲ درصد نشان‌دهنده‌ی ورود موفقیت‌آمیز توالی gRNA به درون وکتور می‌باشد. پلاسمید نوترکیب R2PX۴۵۸ با استفاده از کیت استخراج پلاسمید شرکت کیاژن (Cat. NO. 04127) و طبق روش مندرج کیت جداسازی شد. بر این اساس، ۲ میلی‌لیتر محیط کشت مایع LB حاوی باکتری حامل وکتور نوترکیب پس از ۱۸ ساعت کشت شبانه به میکروتیوب منتقل گردید و به مدت ۵ دقیقه با دور ۸۰۰۰ سانتریفوژ شد. بر روی رسوب حاصل محلول P1 اضافه و مجدد سوسپانسیون گردید. به مخلوط حاصل بافر P2 اضافه و به آرامی مخلوط و در نهایت بافر N3 به

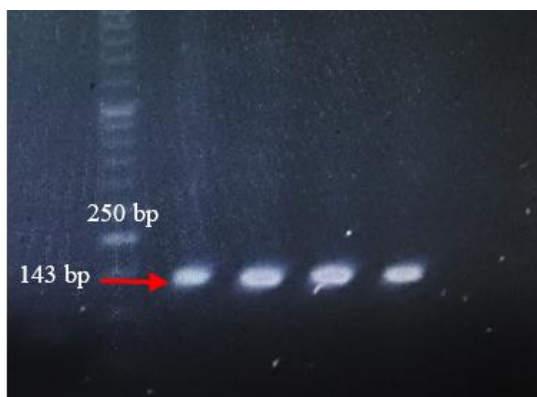
یکپارچه هر محصول برش خورده می‌باشد. توالی‌های تمام پرایمرهای مورد استفاده و gRNA ستنز شده در جدول ۱ فهرست شده‌اند.

$$100 \times (1 - (1 - (b + c) / (a + b + c))^{1/2})$$

این مقاله با کد اخلاق EE/1401.2.24.118699/scu.ac.ir در دانشگاه شهید چمران اهواز تصویب گردید.

یافته‌ها

بررسی صحت همسانه‌سازی: در این مرحله، ۴ کلونی از کلونی‌های رشد یافته انتخاب گردید و جهت تأیید ترانسفورم وکتور نو ترکیب colony PCR انجام شد. نتایج بدست آمده تأییدکننده‌ی حضور وکتور نو ترکیب در کلون‌های منتخب بود (شکل ۱). شکل ۲ نشان‌دهنده‌ی کیفیت وکتور استخراج شده بر روی ژل آگارز ۱ درصد می‌باشد. تعیین توالی وکتور نو ترکیب با استفاده از آغازگر استاندارد وکتور Px458 تأییدکننده‌ی حضور توالی مورد نظر در وکتور نو ترکیب بود (شکل ۳).



شکل ۱. نتایج Colony PCR انجام گرفته بر روی کلون‌های منتخب حاوی وکتور نو ترکیب. PCR با استفاده از پرایمر F بر روی پروموتور U6 و پرایمر R (توالی آنتی‌سنس هر gRNA) انجام شد. M: مارکر با وزن مولکولی ۵۰ جفت باز بر روی ژل آگارز ۲ درصد

راهنمای طراحی شده، استخراج DNA از هر چاهک حاوی سلول‌های HEK ۲۹۳ ترانسفکت شده با استفاده از کیت استخراج DNA (Promega- آمریکا) انجام شد.

سنجش برش با استفاده از T7E1: محصول PCR بدست آمده از ناحیه‌ی ژنومی مورد نظر به طول ۷۷۸ جفت باز توسط کیت خالص‌سازی Qiaquick PCR (Qiagen, 2806) خالص‌سازی شد. به منظور تشکیل هترودوبلکس بین رشته‌ی برش خورده و رشته‌ی سالم، محصولات PCR خالص شده با استفاده از ترموسایکلر و برنامه‌ی ۹۵-درجه-۵ دقیقه، ۹۵-۸۵-درجه با کاهش دما ۲-درجه در ثانیه و ۲۵-۸۵-درجه با کاهش دما ۰/۱-درجه در ثانیه، در ابتدا دناتوره و سپس مجدد رناتوره گردید. به این ترتیب در صورت ایجاد جهش در توالی DNA هترودوبلکس‌ها تشکیل می‌گردند. محصولات PCR هیبرید شده توسط T7 اندونوکلاز I (NEB, M0302L) در بافر (NEB) NEBuffer 2 به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد هضم شدند و تحت الکتروفورز ژل آگارز ۲/۵ درصد قرار گرفتند.

سنجش برش با استفاده از سیستم PAGE: با استفاده از جفت پرایمرهای طراحی شده برای ناحیه‌ی ژنی مورد نظر، PCR جهت بدست آمدن محصولی به طول ۱۸۷ جفت باز انجام شد. قطعات برش خورده موجود در محصول PCR توسط ژل ۱۵ درصد پلی‌اکریل‌امید پس از ۴ ساعت و ۳۰ دقیقه با ولتاژ ۲۰۰ ولت از قطعات برش نخورده تفکیک شدند (۲۶). ژل پلی‌اکریل‌امید توسط نیترات نقره، رنگ‌آمیزی شد. به منظور رنگ‌آمیزی نیترات نقره در ابتدا محلول حاوی متانول و اسیداستیک بر روی ژل پلی‌اکریل‌امید ریخته و به مدت ۱۰ دقیقه بر روی شیکر قرار داده شد. سپس محلول ۱۰ درصد نیترات نقره (شرکت سیگما-آلمان) بر روی ژل ریخته و مجدد به مدت ۱۰ دقیقه بر روی شیکر قرار داده شد. در پایان، ژل توسط محلول NaOH و فرم‌آلدهید به مدت ۴ دقیقه شستشو داده شد و بعد از ظاهر شدن باندها، ژل از محلول خارج گردید. درصد شکل‌گیری ایندل در هر دو تکنیک با استفاده از نرم‌افزار ImageJ و فرمول زیر تعیین و با یکدیگر مقایسه شد. a شدت یکپارچه محصول PCR هضم نشده و b و c شدت

جدول ۱. توالی‌های پرایمرها و gRNA طراحی شده

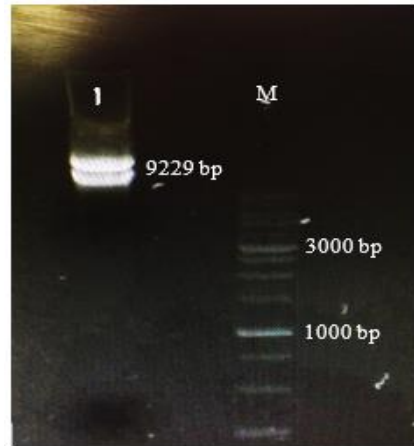
توالی 5'→3'	نام پرایمر
CACCGTCCCACCCTTAGGCTGCTGG	gRNA2- sense
AAACCCAGCAGCCTAAGGGTGGGAC	gRNA2- antisense
GCATGTGGAGACAGAGAAGAC	187F-HBB
CTTGCCATGAGCCTTACACCT	187R-HBB
AACTCCTAAGCCAGTGCCAGAGA	778F-HBB
GCAATCATTCGTCTGTTTCCC	778R-HBB
GAATTTCGATGATGGAGGACGTCGGAATG	U6F
AAACCCAGCAGCCTAAGGGTGGGAC	R.gRNA2

توالی قرمز رنگ مربوط به توالی حاصل از برش آنزیم BbsI می‌باشد.

پلی‌اکریل‌آمید مشاهده شد. همانطور که در شکل ۶ مشاهده می‌گردد، حضور باندهای اضافه در زیر باند اصلی در ۴ کلون متفاوت، نشان‌دهنده‌ی برش آنزیم Cas9 در ناحیه‌ی مورد نظر می‌باشد.

بحث

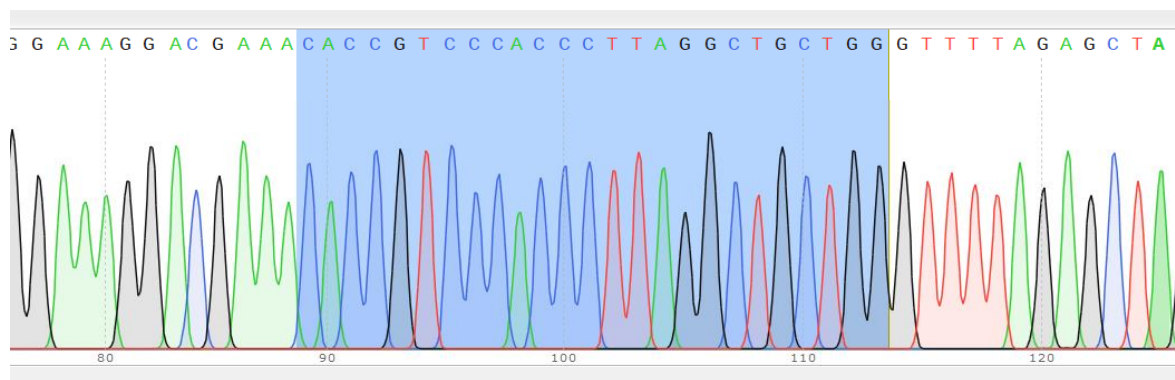
در این مطالعه به منظور بررسی کارایی برش آنزیم Cas9 در قالب سیستم CRISPR/Cas9، در ابتدا توالی RNA راهنما به صورت دو رشته‌ی سنس و آنتی‌سنس، جهت هدایت آنزیم Cas9 به جایگاه هدف برش بر روی آگزون ۲ ژن بتاگلوبین طراحی و پس از انجام فرایند اتصال دو رشته‌ی سنس و آنتی‌سنس به یکدیگر، به درون وکتور فرایند pSpCas9(BB)-2A-GFP (PX458) منتقل گردید. پس از تأیید کلونینگ قطعه‌ی مورد نظر، ترانسفورماسیون وکتور حامل RNA راهنما به درون سویه *Stb13* باکتری *اشرشیاکلی* با موفقیت انجام شد. پس از مشاهده‌ی کلون‌های باکتریایی و انجام تکنیک کلونی-PCR، کلون‌های مثبت حاوی وکتور نوترکیب جهت استخراج پلاسمید در محیط حاوی آنتی‌بیوتیک کشت داده شد و استخراج وکتور با غلظت بالا انجام گردید. رده‌ی سلولی HEK293T از رشد سلول‌های جنینی کلیه انسان در محیط کشت حاصل شده است. با توجه به رشد مناسب و قابلیت ترانسفیکاسیون مناسب، سلول‌های HEK293T به صورت گسترده در تحقیقات زیست‌شناسی سلولی مورد استفاده قرار می‌گیرند (۲۷). همچنین رده‌ی HEK293T، از محدود رده‌های سلولی بیان‌کننده ژن بتاگلوبین می‌باشد، به این ترتیب جهت ارزیابی عملکرد آنزیم Cas9 بر روی ژن گلوبین بسیار مناسب می‌باشد (۲۸). در ادامه وکتور نوترکیب حامل RNA راهنما و آنزیم Cas9، با استفاده از پلیمر پلی‌اتیلین ایمین (PEI) ۲۵ کیلودالتونی به رده‌ی سلولی HEK293T ترانسفکت گردید. گروه‌های آمین PEI می‌توانند در محیط اسیدی اندوزوم پروتونه شوند و DNA اندوسیتوز شده را از تجزیه توسط نوکلئازهای لیزوزومی حفاظت کنند (۲۹).



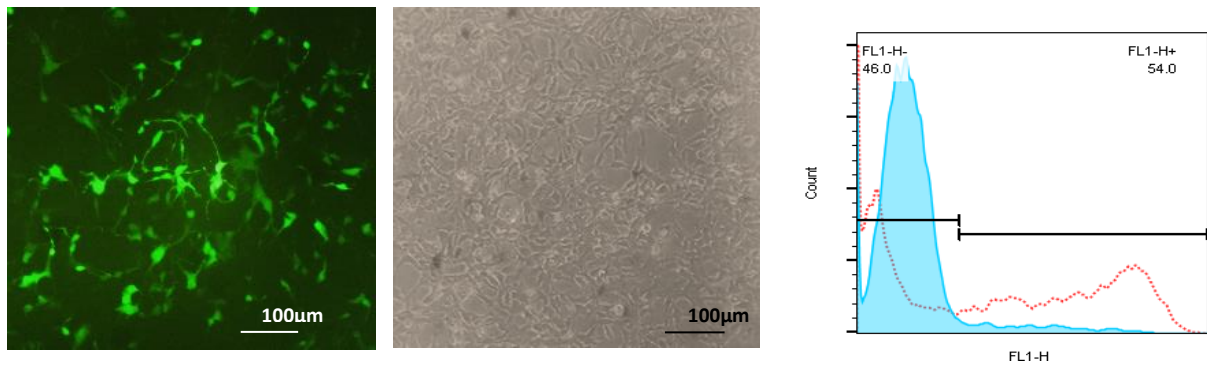
شکل ۲. الکتروفورز پلاسمید نوترکیب PX458 استخراج شده، چاهک (۱) پلاسمید R2.PX 458 غلظت ۳۶۰ نانوگرم در میکرولیتر. چاهک (۲) مارکر 1kb بر روی ژل آگارز ۱ درصد

تأیید انتقال پلاسمید نوترکیب به سلول‌های HEK293 ارزیابی سلول‌های GFP⁺ در جمعیت سلول‌های HEK293 ترانسفکت شده با وکتور گزارشگر GFP، ۴۸ ساعت پس از انتقال صورت پذیرفت. داده‌های دستگاه فلوسایتومترگویی جمعیت ۵۴ درصد از سلول‌های GFP⁺ در همراهی با تصویر میکروسکوپ فلورسنت نشان‌دهنده‌ی بیان موفق آنزیم cas9 در سلول‌های HEK293 بود (شکل ۴).

ارزیابی حساسیت روش PAGE و T7E1 دو واکنش PCR مختلف بر روی ژنوم جداسازی شده از ۱۰ کلون متفاوت از سلول‌های ترانسفکت شده انجام شد. در سنجش برش T7E1 باند مربوط به قطعه‌ی به طول ۷۷۸ جفت باز به همراه تک باند مشاهده شده در زیر باند اصلی در ۲ کلون سلولی مشاهده شد که نشان‌دهنده‌ی عملکرد آنزیم اندونوکلاز T7E1 در ناحیه‌ی هترو دوپلکس ایجاد شده در ژنوم می‌باشد (شکل ۵). در واکنش PCR دوم بر روی ژنوم ۱۰ کلون ترانسفکت شده، قطعه‌ی به طول ۱۷۸ جفت باز بر روی ژل



شکل ۳. نتیجه‌ی تعیین توالی وکتور نوترکیب حامل gRNA طراحی شده (R2.PX458)

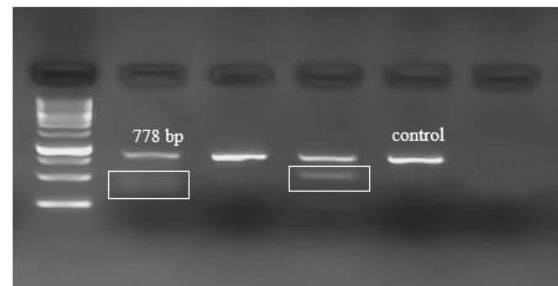


شکل ۴. تصویر میکروسکوپ فلورسنت و نوری سلول‌های HEK293T ترانسفکت شده با PEI به همراه هیستوگرام فلوسایتمتری جهت تعیین درصد ترانسفکت

grNA طراحی شده استفاده و میزان عملکرد آن‌ها در ارزیابی برش یا یکدیگر مقایسه گردید. دستیابی به کلون‌های ویرایش شده/ یا حامل جهش‌های جدید و سپس آنالیز ژنوم آن‌ها، از زمان برترین و پرهزینه‌ترین مراحل استفاده از تکنیک CRISPR-Cas9 در روش‌های ویرایش ژنوم و ژن درمانی می‌باشد (۳۰). روش مبتنی بر آنزیم نوکلئاز T7E1 به طور گسترده‌ای جهت ارزیابی نتایج برش ژنوم بر اساس ایجاد قطعات هترو دوپلکس DNA بر روی ژل آگارز، استفاده می‌گردد. هنگامی که قطعات تک رشته‌ای حاوی جهش‌های ایندل به قطعات DNA نوع وحشی متصل می‌شوند، هترو دوپلکس‌ها را تشکیل می‌دهند که متعاقباً در مکان‌های عدم تطابق توسط نوکلئاز T7 شکسته می‌شوند (۳۱).

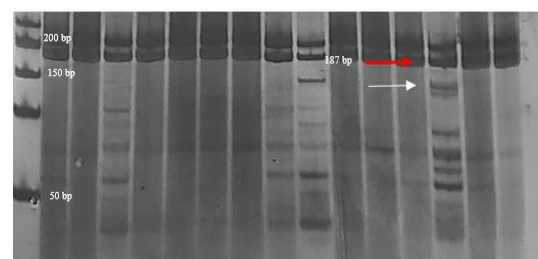
لازم به ذکر است که اگرچه روش سنجش T7E1 بسیار مورد استفاده قرار می‌گیرد، اما تنها تخمین تقریبی از سطح تشکیل شکست‌های دورشته‌ای DNA را ارائه می‌دهد، T7E1 نسبت به ایندل‌های بزرگ حساسیت بالاتری دارد (می‌تواند مولکول‌های حاوی ایندل را که ۰/۵ درصد کل جمعیت مولکول‌های DNA را تشکیل می‌دهند، تشخیص دهد) اما برای شناسایی و برش ایندل‌های کوتاه، به ویژه جهش‌های تک نوکلئوتیدی کارایی بسیار کمتری دارد. اثربخشی T7E1 به شرایط انکوباسیون، نسبت DNA/آنزیم و سایر پارامترهای واکنش بستگی دارد که باید در هر مورد خاص بهینه‌سازی گردد (۳۲). نتایج هضم آنزیمی T7E1 در مطالعه‌ی حاضر، نشان‌دهنده‌ی عملکرد ۳۲ درصدی آنزیم Cas9 در برش ناحیه‌ی هدف بر روی ژن بتاگلوبین در رده‌ی سلولی HEK293T بود. در مطالعه‌ی مشابه، Lotfi و همکاران، کارایی برش آنزیم cas9 بر روی ژن بتاگلوبین در رده‌ی سلولی HEK293T را با استفاده از تکنیک T7E1 مورد بررسی قرار دادند و نتایج بدست آمده نشان‌دهنده‌ی عملکرد ۳۷/۵ درصد آنزیم Cas9 بود (۳۳).

به منظور تسهیل غربالگری، ما از سیستم PAGE غیردنا توره‌کننده به عنوان یک روش سریع و حساس برای شناسایی جهش‌یافته‌های



شکل ۵. نتایج T7E1 جهت ارزیابی عملکرد g2.PX458. کادر سفید رنگ نشان‌دهنده‌ی قطعات حاصل از تشکیل هترو دوپلکس می‌باشد و تأییدکننده‌ی بروز جهش ایندل در ناحیه‌ی ژنی مورد نظر است.

۷۲ ساعت پس از انتقال وکتور به سلول‌های HEK293T، کسب اطمینان از بیان ژن Cas9 با استفاده از آنالیز فلوسایتمتری، استخراج DNA ژنومی سلول‌های ترانسفکت شده، به منظور بررسی ژن بتاگلوبین در ناحیه‌ی هدف انجام شد.



شکل ۶. نتیجه‌ی ارزیابی برش آنزیم Cas9 بر روی ژل پلی‌اکریل آمید ۱۵ درصد. باندهای مشاهده شده مربوط به عملکرد grNA2 (۶۶ درصد). فلش قرمز رنگ نشان‌دهنده‌ی قطعه‌ی اصلی با طول ۱۸۷ جفت باز و فلش سفید رنگ نشان‌دهنده‌ی باند تولید شده در نتیجه برش آنزیم Cas9 می‌باشد. M. مارکر با وزن مولکولی ۵۰ bp

در مطالعه‌ی حاضر، از دو تکنیک غربالگری PAGE غیردنا توره‌کننده و هضم آنزیمی T7E1 جهت ارزیابی عملکرد برش

نتیجه‌گیری

در این مطالعه از سیستم ژل پلی‌اکریل ۱۵ درصد غیردنا توره‌کننده به منظور ارزیابی کارایی آنزیم Cas9 جهت ایجاد برش در ناحیه‌ی مشخصی از ژنوم استفاده شد و نتایج بدست آمده از این روش با نتایج بدست آمده از روش مرسوم ارزیابی عملکرد Cas9 (سنجش توسط آنزیم T7EI) مقایسه گردید. نتیجه‌ی بدست آمده نشان‌دهنده‌ی قدرت تفکیک بالای این سیستم جهت شناسایی قطعات برش خورده در یک جمعیت ناهمگن سلولی می‌باشد. از دیگر مزایای اصلی استفاده از تکنیک PAGE غیردنا توره‌کننده در مقایسه با سایر روش‌ها، می‌توان به کوتاه بودن مدت زمان اجرا و هزینه‌ی انجام آزمایش اشاره داشت. این روش امکان ارائه‌ی اطلاعات مهم و مختلفی از جهش‌های ایجاد شده را در یک آزمایش فراهم می‌کند. استفاده از PCR و PAGE نشان می‌دهد که آیا سلول‌های مورد بررسی دچار برش در ناحیه‌ی هدف شده‌اند یا خیر. همچنین نوع نسبی جهش‌های موجود (درج در مقابل حذف) و تعداد انواع جهش‌ها را به واسطه‌ی حساسیت بالا در نشان دادن قطعات پلی‌نوکلئوتیدی با طول کوتاه را نشان داده و قطعاتی با تفاوت نوکلئوتیدی بسیار کم را از یکدیگر تمیز می‌دهد. در نتیجه، این روش یک پروتکل ساده، سریع، کم هزینه و قابل اجرا در هر آزمایشگاه تحقیقاتی، برای تشخیص جهش‌های ایندل در پروسه‌های ویرایش ژنی و جهش‌زایی را فراهم می‌سازد.

تشکر و قدردانی

این مقاله منتج از پایان‌نامه‌ی مقطع دکتری رشته‌ی ژنتیک با کد ۱۱۸۶۹۹ می‌باشد که در دانشگاه شهید چمران اهواز تصویب گردید و با حمایت مالی دانشگاه به انجام رسیده است.

CRISPR-Cas9 استفاده کردیم. پیش از این در مطالعات مختلفی از سیستم PAGE دنا توره‌کننده برای شناسایی جهش‌های ناشی از CRISPRCas9 در گورخرماهی، موش و سلول‌های انسانی استفاده شد. با این حال، این سنجش نیاز به تشکیل هتروودوپلکس قبل از انجام PAGE داشت (۲۰، ۳۴). در این مطالعه پیشنهاد شد می‌توان مستقیماً محصولات PCR ناشی از عملکرد آنزیم cas9 را از طریق سیستم PAGE کلاسیک و فقط بر اساس تفاوت اندازه در طول آمپلیکون مورد بررسی قرار داد و نیازی به تشکیل و تشخیص هتروودوپلکس‌ها یا برش آنزیمی در نقاط عدم تطابق DNA در نمونه‌های مورد آزمایش نمی‌باشد. تشخیص تغییرات کوچک در طول DNA مورد بررسی، به یک ژل پلی‌اکریل آمید با درصد بالا نیاز دارد. به این ترتیب از ژل پلی‌اکریل آمید ۱۵ درصد برای به دست آوردن قدرت تفکیک کافی در آمپلیکون‌های ۲۵-۱۵۰ جفت باز استفاده شد و نتایج آن نشان‌دهنده‌ی عملکرد ۶۶ درصدی آنزیم Cas9 در شناسایی و برش ناحیه‌ی هدف بود. به این ترتیب یک روش غربالگری کارآمد تک مرحله‌ای و ارزان قیمت را برای ژنوتیپ کردن جهش‌های ایندل ایجاد شده با استفاده از سیستم CRISPR/Cas9 در رده‌ی سلول‌های انسانی ارائه نمودیم. نتایج بدست آمده بیانگر قدرت تفکیک دو برابر و وضوح بالای سیستم PAGE برای تشخیص تغییرات کوچک به اندازه‌ی ۵-۱۰ جفت باز در طول اسید نوکلئیک در محل مورد نظر با حساسیت و همچنین کارایی بالا می‌باشد. این نتایج با مطالعه‌ی Zhu و همکاران مطابقت داشت. با این تفاوت که آن‌ها از تکنیک PAGE دنا توره‌کننده بر پایه‌ی تشکیل هتروودوپلکس استفاده کرده و نشان دادند که این تکنیک به خوبی قادر به ژنوتیپ کردن و شناسایی جهش‌های ناشی از CRISPR-Cas9 در رده‌های مختلف سلولی می‌باشد (۳۴).

References

1. Yang H, Ren S, Yu S, Pan H, Li T, Ge S, et al. Methods favoring homology-directed repair choice in response to CRISPR/Cas9 induced-double strand breaks. *Int J Mol Sci* 2020; 21(18): 6461.
2. Cox DBT, Platt RJ, Zhang F. Therapeutic genome editing: Prospects and challenges. *Nat Med* 2015; 21(2): 121-31.
3. Kim H, Kim JS. A guide to genome engineering with programmable nucleases. *Nat Rev Genet* 2014; 15(5): 321-34.
4. Gupta D, Bhattacharjee O, Mandal D, Sen MK, Dey D, Dasgupta A, et al. CRISPR-Cas9 system: A new-fangled dawn in gene editing. *Life Sci* 2019; 232: 116636.
5. Finotti A, Breda L, Lederer CW, Bianchi N, Zuccato C, Kleanthous M, et al. Recent trends in the gene therapy of β -thalassemia. *J Blood Med* 2015; 6: 69-85.
6. Asmamaw M, Zawdie B. Mechanism and applications of CRISPR/Cas-9-Mediated genome editing. *Biologics* 2021; 15: 353-61.
7. Sander JD, Joung JK. CRISPR-Cas systems for genome editing, regulation and targeting. *Nat Biotechnol* 2014; 32(4): 347-55.
8. Silva G, Poirot L, Galetto R, Smith J, Montoya G, Duchateau P, et al. Meganucleases and other tools for targeted genome engineering: Perspectives and challenges for gene therapy. *Curr Gene Ther* 2011; 11(1): 11-27.
9. Cho SW, Kim S, Kim Y, Kweon J, Kim HS, Bae S, et al. Analysis of off-target effects of CRISPR/Cas-derived RNA-guided endonucleases and nickases. *Genome Res* 2014; 24(1): 132-41.
10. Mali P, Yang L, Esvelt KM, Aach J, Guell M, DiCarlo JE, et al. RNA-guided human genome engineering via

- Cas9. *Science* 2013; 339(6121): 823-6.
11. Jiang F, Doudna JA. CRISPR-Cas9 structures and mechanisms. *Annu Rev Biophys* 2017; 46: 505-29.
 12. Jinek M, East A, Cheng A, Lin S, Ma E, Doudna J. RNA-programmed genome editing in human cells. *Elife* 2013; 2: e00471.
 13. Cong L, Ran FA, Cox D, Lin S, Barretto R, Habib N, et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science* 2013; 339(6121): 819-23.
 14. Cho S, Kim S, Kim JM, Kim J. Targeted genome engineering in human cells with the Cas9 RNA-guided endonuclease. *Nat Biotechnol* 2013; 31(3): 230-2.
 15. 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.
 16. Xue C, Greene EC. DNA repair pathway choices in CRISPR-Cas9-Mediated genome editing. *Trends Genet* 2021; 37(7): 639-56.
 17. Ceccaldi R, Rondinelli B, D'Andrea AD. Repair pathway choices and consequences at the double-strand break. *Trends Cell Biol* 2016; 26(1): 52-64.
 18. Bravo JP, Liu MS, Hibshman GN, Dangerfield TL, Jung K, McCool RS, et al. Structural basis for mismatch surveillance by CRISPR-Cas9. *Nature* 2022; 603(7900): 343-7.
 19. Burger A, Lindsay H, Felker A, Hess C, Anders C, Chiavacci E, et al. Maximizing mutagenesis with solubilized CRISPR-Cas9 ribonucleoprotein complexes. *Development* 2016; 143(11): 2025-37.
 20. Ota S, Hisano Y, Muraki M, Hoshijima K, Dahlem TJ, Grunwald DJ, et al. Efficient identification of TALEN-mediated genome modifications using heteroduplex mobility assays. *Genes Cells* 2013; 18(6): 450-8.
 21. Zhou J, Shen B, Zhang W, Wang J, Yang J, Chen L, et al. One-step generation of different immunodeficient mice with multiple gene modifications by CRISPR/Cas9 mediated genome engineering. *Int J Biochem Cell Biol* 2014; 46: 49-55.
 22. Wijshake T, Baker DJ, van de Sluis B. Endonucleases: new tools to edit the mouse genome. *Biochim Biophys Acta* 2014; 1842(10): 1942-50.
 23. Dahlem TJ, Hoshijima K, Juryneć MJ, Gunther D, Starker CG, Locke AS, et al. Simple methods for generating and detecting locus-specific mutations induced with TALENs in the zebrafish genome. *PLoS Genet* 2012; 8(8): e1002861.
 24. D'Agostino Y, Locascio A, Ristatore F, Sordino P, Spagnuolo A, Borra M, et al. A rapid and cheap methodology for CRISPR/Cas9 zebrafish mutant screening. *Mol Biotechnol* 2016; 58(1): 73-8.
 25. Zhang JP, Li XL, Neises A, Chen W, Hu LP, Ji GZ, et al. Different effects of sgRNA length on CRISPR-mediated gene knockout efficiency. *Sci Rep* 2016; 6: 28566.
 26. Chandrasekaran AR, Halvorsen K. Nuclease degradation analysis of DNA nanostructures using gel electrophoresis. *Curr Protoc Nucleic Acid Chem* 2020; 82(1): e115.
 27. Pulix M, Lukashchuk V, Smith DC, Dickson AJ. Molecular characterization of HEK293 cells as emerging versatile cell factories. *Curr Opin Biotechnol* 2021; 71: 18-24.
 28. Kalkan BM, Kala EY, Yuçe M, Alpaslan MK, Kocabas F. Development of gene editing strategies for human β -globin (HBB) gene mutations. *Gene* 2020; 734: 144398.
 29. González-Domínguez I, Grimaldi N, Cervera L, Ventosa N, Gòdia F. Impact of physicochemical properties of DNA/PEI complexes on transient transfection of mammalian cells. *N Biotechnol* 2019; 49: 88-97.
 30. 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.
 31. Vouillot L, Thélie A, Pollet N. Comparison of T7E1 and surveyor mismatch cleavage assays to detect mutations triggered by engineered nucleases. *G3 (Bethesda)* 2015; 5(3): 407-15.
 32. Lomov NA, Viushkov VS, Petrenko AP, Syrkina MS, Rubtsov MA. Methods of evaluating the efficiency of CRISPR/Cas genome editing. *Mol Biol (Mosk)* 2019; 53(6): 982-97.
 33. Lotfi M, Ashouri A, Mojarrad M, Mozaffari-Jovin S, Abbaszadegan MR. Design principles of a novel construct for HBB gene-editing and investigation of its gene-targeting efficiency in HEK293 cells. *Mol Biotechnol* 2023; 1-14.
 34. Zhu X, Xu Y, Yu S, Lu L, Ding M, Cheng J, et al. An efficient genotyping method for genome-modified animals and human cells generated with CRISPR/Cas9 system. *Sci Rep* 2014; 4: 6420.

A Comparison of the Efficiency of the T7-Endonuclease I Enzyme and Polyacrylamide Gel Electrophoresis System in Evaluating the Cleavage Efficiency of the CRISPR/Cas9 System

Nasim Mayeli Fereydani¹, Hamid Galehdari², Elham Hoveizi³, Monireh Ajami⁴

Original Article

Abstract

Background: Assessment of Cas9 cleavage in CRISPR (Clustered Regularly Interspersed Short Palindromic Repeat) system and screening of mutations is one of the challenges of this system. This study suggests a high-efficiency PCR-based method using non-denaturing PAGE that does not depend on the formation of heteroduplexes.

Methods: In this study, to investigate the CRISPR-Cas9 function, first, a proper guide RNA sequence with the target sequence was designed and synthesized. The BbsI digested pSpCas9(BB)-2A-GFP (PX458) vector and the guide RNA were cloned into the cleavage site. The recombinant plasmid was extracted, and after confirming the correctness of cloning using the sequencing technique, it was transfected into the HEK293T cell line. After confirming and determining the transfected percentage by flow cytometry, the genomic DNA of the cells carrying the recombinant vector was extracted. Two different PCR reactions were performed to check the function of the Cas9 enzyme in the desired region on the Beta-globin gene, and the cutting percentage was evaluated.

Findings: The enzymatic digestion of T7EI on the genome showed 32%, and the polyacrylamide gel electrophoresis system results showed a 66% function of the Cas9 enzyme. In this way, the PAGE system reliably detects changes as small as 5-10 base pairs in the length of the nucleic acid at the desired location.

Conclusion: The PAGE-based technique can replace the T7EI assay as a routine laboratory protocol for genotyping human cell lines produced by the CRISPR/Cas9 system.

Keywords: Polyacrylamide gel electrophoresis; T7-Endonuclease I enzyme; CRISPR-Cas; Indel mutation

Citation: Mayeli Fereydani N, Galehdari H, Hoveizi E, Ajami M. A Comparison of the Efficiency of the T7-Endonuclease I Enzyme and Polyacrylamide Gel Electrophoresis System in Evaluating the Cleavage Efficiency of the CRISPR/Cas9 System. J Isfahan Med Sch 2023; 41(740): 929-37.

1- PhD Candidate, Department of Biology, Faculty of Sciences, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

2- Professor, Department of Biology, Faculty of Sciences, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

3- Associate Professor, Department of Biology, Faculty of Sciences, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

4- Assistant Professor, Department of Hematology, School of Paramedical Sciences, Tehran Medical Sciences, Islamic Azad University, Tehran, Iran

Corresponding Author: Hamid Galehdari, Professor, Department of Biology, Faculty of Sciences, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran; Email: galehdari187@yahoo.com