مقاله علمی پژوهشی
مجله دوفصل نامه
مهندسی ژنتیک و ایمنی زیستی
ISSN 2588-5073 چاپی
ISSN 2588-5081 الکترونیکی
دوره ۱۲، شماره ۱، بهار و تابستان ۱۴۰۲
صفحه ۱۵۶-۱۴۵

https://dorl.net/dor/20.1001.1.25885073.1402.12.1.8.2

DOR:20.1001.1.25885073.1402.12.1.8.2

Research Article
Genetic Engineering and Biosafety Journal 2023
Volume 12, Number 1, Pages: 145-156

http://gebsj.ir/

https://ecc.isc.ac/showJournal/23064

روش‌های انتقال سیستم ویرایش ژنوم با واسطه کریسپر

Delivery methods of CRISPR/Cas-mediated genome editing system

زهرا کردزاده کرمانی[1*]، رضا خیراندیش[2*]، حسینعلی ساسان[3]

Zahra Kordzadeh-Kermani[1*], Reza Kheirandish[2*], Hosseinali Sasan[3]

۱- دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، ایران
۲- گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، ایران
۳- بخش زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شهید باهنر کرمان، ایران

1. Faculty of VeterinaryMedicine, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran
2. Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran
3. Department of Biology, Faculty of Science, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: *Corresponding Author, Email
kheirandish@uk.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۱۱/۲۲ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۳/۵)

چکیده

سیستم‌های کریسپر یا تکرارهای کوتاه پالیندرومی فاصله‌دار منظم خوشه‌ای و پروتئین‌های مرتبط با آن، سیستم‌های ایمنی طبیعی میکروبی هستند که به عنوان وسیله‌ای برای ویرایش ژنی مورد استفاده قرار گرفته‌اند. برای ایجاد اثرهای درمانی، اجزای کریسپر باید به طور مستقیم به سلول‌های هدف منتقل شود. روش‌های متفاوتی برای انتقال وجود دارد. در این مطالعه به برخی سیستم‌های انتقال از طریق غشای سلول، شامل سیستم‌های انتقال ویروسی و غیر ویروسی پرداخته شده است. سیستم انتقال ویروسی، استفاده از ویروس‌هایی مانند وکتور ویروس وابسته به آدنو است ولی نگرانی‌هایی در استفاده بالینی آن وجود دارد. در روش انتقال فیزیکی دوز، مدت زمان و اختصاصیت انتقال دقیق‌تر کنترل می‌شود که شامل روش‌های الکتروپوراسیون، تزریق هیدرودینامیکی و میکروواینجکشن می‌باشد. در روش الکتروپوراسیون ممکن است تغییرهای غیرقابل برگشت در فیزیولوژی غشا ایجاد شود که زنده‌مانی سلول را تهدید می‌کند. در تزریق هیدرودینامیکی حجم لازم برای شروع تزریق زیاد است و روش مناسبی برای کاربردهای انسانی نیست. میکروواینجکشن دارای کارایی بالا و دوز دقیق کنترل شده است ولی برای کاربرد زیاد غیر عملی است. اگرچه رویکردهای فیزیکی به طور معمول در محیط آزمایشگاه بسیار موفق هستند، اما به طور کلی مقیاس خوبی ندارند و بنابراین برای انتقال در شرایط زنده یا برنامه‌های با ظرفیت بالا در آزمایشگاه کمتر کاربرد دارد. در روش‌های انتقال شیمیایی، به جای القای تغییر در سلول هدف، خود محموله قابل انتقال می‌تواند تغییر یابد. انتقال شیمیایی به دو شکل شامل روش کپسوله‌سازی و روش تغییر شیمیایی ماده انتقال پذیر وجود دارد. کپسوله‌سازی می‌تواند محموله را از تخریب آنزیمی یا پاسخ‌های ایمنی محافظت کند و اختصاصی بودن انتقال را ارتقا بخشد. انتقال با تغییر ماده انتقال پذیر، محافظت در مقابل تخریب توسط پروتئازها را تامین نمی‌کند، همچنین قادر به هدف‌گیری خاص سلول نیستند. بنابراین استفاده موفقیت آمیز نیاز به ترکیب با روش کپسوله‌سازی یا سایر روش‌های انتقال دارد. با توجه به این که هر کدام از روش‌های انتقال دارای عیب‌ها و مزیت‌هایی هستند، لازم است موثرترین روش انتقال انتخاب شود، تا سیستم کریسپر برای ویرایش ژن کارآمد باشد.

واژه‌های کلیدی

انتقال غیر ویروسی،
انتقال ویروسی،
پروتئین Cas9،
کریسپر،
ویرایش ژنی

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-29]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1402.12.1.8.2]

Genetic Engineering and Biosafety Journal
Volume 12, Number 1, 2023

Abstract

CRISPR systems or clustered regularly interspaced short palindromic repeats and related proteins are natural microbial immune systems, which have been used as a tool for gene editing. To produce therapeutic effects, CRISPR components must be delivered directly to the target cells. There are different methods of delivery. In this study, some delivery systems through the cell membrane have been reviewed, including viral and non-viral delivery systems. The viral delivery system is the use of viruses such as adeno-associated virus vectors but there are concerns in its clinical use. The non-viral delivery system consists of various methods, including physical delivery and chemical delivery. In the physical delivery; the dose, duration, and specificity of the transfer are controlled more precisely, which includes the methods of electroporation, hydrodynamic injection, and microinjection. In the electroporation method, irreversible changes may occur in the physiology of the membrane, which threatens the cell's viability. In hydrodynamic injection, the volume required to start the injection is large and it is not a suitable method for human applications. Microinjection has high efficiency and precisely controlled dose, but it is very impractical for high-capacity cases. Although physical approaches are typically very successful in the laboratory, they generally do not scale well and are therefore less applicable for delivery to live conditions or high-throughput applications in the laboratory. In chemical delivery methods, instead of inducing a change in the target cell, the transferable cargo itself can be changed. There are two main forms of chemical delivery, including the method of encapsulation of the transferable substance and the method of modification of the transferable substance. Encapsulation can protect the cargo from enzymatic degradation or immune responses and enhance the specificity of delivery. Modification does not protect against degradation by proteases, nor are they capable of specific cell targeting. Therefore, successful use needs to be combined with encapsulation or other delivery methods. Considering that each delivery method has advantages and disadvantages, it is necessary to choose the most effective delivery method so that the CRISPR system be efficient for gene editing.

Keywords: Cas9, CRISPR/Cas, Genome editing, Nonviral delivery, Viral delivery

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-29]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1402.12.1.8.2]

مقدمه

سیستم‌های کریسپر در طبیعت به عنوان سیستم ایمنی ذاتی میکروبی و یکی از مهم‌ترین سازوکارهای سیستم ایمنی تطابق-پذیر پروکاریوتی شناخته شده‌اند. این سیستم‌ها به‌عنوان ابزار مهمی برای مهندسی زیستی و ژنتیکی مورد استفاده قرار گرفته‌اند که عیب‌های سیستم‌های ویرایش ژن قدیمی‌تر مانند هزینه بالا و زمان‌بر بودن را ندارد (Ashaar-Ghadim et al., 2022). این ابزارها می‌توانند جهش‌های بیماری‌زا را به طور بالقوه تصحیح کنند. این فناوری می‌تواند باعث توسعه مدل‌های حیوانی برای بیماری‌های مختلف مانند بیماری‌های عصبی در حیوانات بزرگ و پستانداران غیر انسانی شود که می‌تواند درک ما از بیماری‌زایی را افزایش دهد. در واقع سیستم کریسپر یک ابزار اصلاح ژنوم است که می‌تواند هر ژن موجود در ژنوم را در سلول‌های زایا و سوماتیک گونه‌های مختلف به طور موثر مورد هدف قرار دهد (Tu et al., 2015). سیستم کریسپر ممکن است در انسان برای ژن درمانی بیماران مبتلا به بیماری‌های ارثی و اکتسابی مختلف مانند سرطان، دیابت و بیماری‌های قلبی استفاده شود. موفقیت ژن درمانی به انتقال دهنده‌هایی که به طور موثر، انتخابی و با کمترین سمیت یک ژن را به سلول‌های هدف برسانند، وابسته است (Hashemabadi et al., 2023; Mohammadinejad et al., 2019). برای این که اجزای کریسپر اثرهای درمانی را ایجاد کند، باید به طور مستقیم به هسته‌ی سلول‌های هدف منتقل شود. یک مانع مهم در شرایط زنده برای دستکاری ژنتیکی با واسطه کریسپر، یافتن ابزار انتقال‌دهنده‌ی موثر و هدفمند است. بنابراین روش‌های موثر انتقال، برای موفقیت برنامه‌های دستکاری ژنتیکی درمانی اهمیت دارد. برای این منظور، انواع متعددی از وکتورهای انتقال دهنده فیزیکی و شیمیایی برای انتقال Cas9 معرفی شدند. همچنین شکل انتقال اجزای کریسپر مانند Cas9 اهمیت دارد که به طور مناسب انتخاب شود که ممکن است به شکل DNA، mRNA و یا پروتئین به سلول‌ها منتقل شود، که هر کدام از این

شکل‌ها، دارای مزیت‌ها و عیب‌های خاص هستند و به ابزار انتقال‌دهنده‌ی منحصر به فردی نیاز دارند. (Glass et al., 2018; Mohammadinejad et al., 2020). با توجه به اهمیت روش انتقال سیستم کریسپر برای دستیابی به بهترین و کارآمدترین نتیجه، در این مقاله به مرور برخی از شکل‌های مختلف اجزای سیستم کریسپر و روش‌های انتقال این سیستم با تمرکز بر سلول-های انسانی پرداخته شده است.

انتقال سیستم کریسپر

دانشمندان گزینه‌های زیادی برای انتقال اجزای سیستم کریسپر مانند Cas9 و gRNA (guide RNA) به محل مناسب در سلول‌ها و در بازه زمانی مناسب در محیط آزمایشگاهی معرفی کرده‌اند. به عنوان مثال سلول‌ها را می‌توان با لنتی ویروس حمل کننده Cas9 کدگذاری ژنتیکی شده یا از طریق الکتروپوراسیون ترانسفکت کرد. با این حال روش‌های آزمایشگاهی معمول، روش‌های مناسبی برای بیماران انسانی نمی‌باشند. اگرچه بعضی از بیماری‌ها هستند که می‌توانند از طریق ویرایش ژنتیکی خارج از بدن درمان شوند، مانند لوسمی که در آن مغز استخوان ویرایش شده می‌تواند به بیمار پیوند زده شود، ولی بیشتر بیماری‌ها نیاز به تحویل Cas9 و gRNA به داخل بدن دارند. برای رسیدن به این هدف نیاز به روش‌های انتقال قدرتمند وجود دارد تا از انتقال خاص و کارآمد هر دو Cas9 و gRNA به داخل بدن و به دست آوردن نتیجه‌های درمانی مطلوب، اطمینان حاصل شود. برای درمان بیماری‌ها در سطح ژنتیکی، به جای پرداختن به علائم بالینی، بیشتر به در نظر گرفتن زمان دقیق رشد و پیشرفت دوره بیماری نیاز است. به عنوان مثال بسیاری از اختلال‌های ژنتیکی باید در مراحل اولیه توسعه مورد توجه قرار گیرند تا علائم آن‌ها کاهش یابد و همچنین سرطان‌ها باید در سریع‌ترین زمان ممکن مورد هدف قرار گیرند تا از گسترش آن‌ها جلوگیری شود (Glass *et al.*, 2018).

موانع زیادی برای انتقال Cas9 به درون سلول وجود دارد. از جمله این‌که پروتئین Cas9 یک مولکول بسیار بزرگ است (Jinek *et al.*, 2014)، همچنین gRNA دارای ستون طولانی فسفاتی با بار منفی بالایی می‌باشد. این‌ها به طور دقیق ویژگی‌هایی هستند که مانع از وارد شدن این اجزا به سلول از طریق غشا تکامل یافته سلول می‌شوند (Sun *et al.*, 2017). بنابراین با توجه به این که غشا سلول به عنوان سد محافظت‌کننده‌ای برای سلول است که مانع ورود مواد مختلف به درون سلول می‌شود، پس باید اجزای سیستم کریسپر با شکل‌ها و روش‌های انتقال متفاوت به داخل سلول منتقل شوند تا کارایی هر کدام از روش‌های انتقال مورد ارزیابی قرار گیرد. برای رفع این مشکل تعدادی از رویکردهای مختلف از جمله روش‌های مختلف انتقال و شکل‌های مختلف اجزای سیستم کریسپر مانند پلاسمید، mRNA و پروتئین مورد بررسی قرار گرفته است، که هر کدام از این روش‌های تحویل، مزیت‌ها و عیب‌هایی دارند که باید مورد توجه قرار گیرند.(شکل ۱).

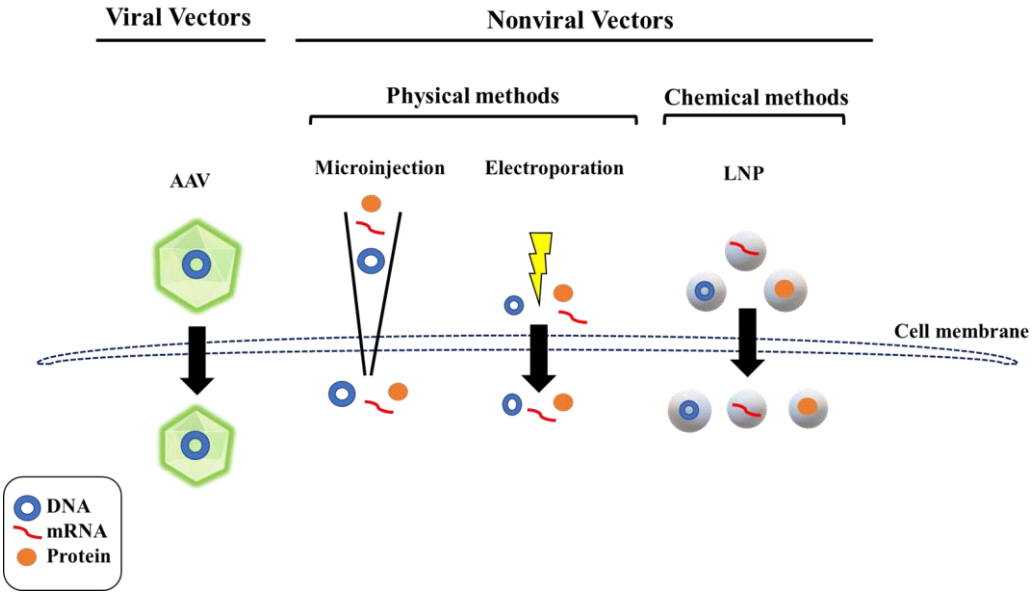
مشکل بزرگ دیگر این است که مشابه سایر محصولات دارویی، مقدار مناسب اجزای سیستم کریسپر باید در بازه زمانی مورد نظر به هدف انتقال داده شوند تا به اثر بخشی درمانی دست یابد. روش انتقال باید مختص بافت‌های مورد نظر باشد تا از رویدادهای نامطلوب ویرایش ژن خارج از هدف جلوگیری شود. مجموعه کریسپر باید از فرآیندهای تخریب سلولی از جمله پروتئازها، لیزوزوم‌ها و RNAse ها فرار کند. همچنین کریسپر باید به گونه‌ای طراحی شود تا پاسخ ایمنی را به حداقل برساند. انتقال دهنده‌ای که به خوبی طراحی شده باشد، یعنی با توجه به شکل اجزای کریسپر و نوع سلول گیرنده برای انتقال هدفمند به داخل سلول انتخاب و بررسی شده باشد، می‌تواند به کاهش این دشواری‌ها کمک کند امروزه این مشکل‌ها با افزایش کارایی سیستم کریسپر و ارتقا انتقال دهنده‌ها تا حدی برطرف شده است (Glass *et al.*, 2018).

برای دستیابی به ویرایش ژن با واسطه کریسپر باید در نهایت یک مجموعه ریبونوکلئوپروتئین Cas9 و gRNA عملکردی در هسته سلول وجود داشته باشد. در حالی که انتقال مستقیم این مجموعه ریبونوکلئوپروتئین ممکن است ساده‌ترین گزینه به نظر برسد، ولی انتقال یک پروتئین بزرگ از سراسر غشا سلولی بدون انتخاب روش مناسبی برای انتقال هدفمند می‌تواند بسیار بحث برانگیز و دشوار باشد. بنابراین علاوه بر روش انتقال این پروتئین، مطالعه‌ها

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-29]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1402.12.1.8.2]

بر روی انتقال مواد ژنتیکی تمرکز دارند که سلول بتواند پروتئین Cas9 خود را در محل تولید کند (جدول ۱). انتقال DNA (به شکل پلاسمید یا کدگذاری شده در ژنوم ویروسی) یا mRNA می‌تواند به بیان پروتئین Cas9 در داخل سلول هدف و در نهایت به ویرایش ژن با واسطه Cas9 منجر شود (Liang *et al.*, 2015).

هر کدام از روش‌های تحویل، مزیت‌ها و عیب‌هایی در اثر بخشی کلی دارند و موانع انتقال منحصر به فردی برای هر کدام از روش‌ها وجود دارد (شکل ۲). آن‌ها همچنین ممکن است دوره‌های زمانی بیان متفاوتی را نشان دهند (Liang *et al.*, 2015)، که باید در هنگام طراحی یک روند درمانی مورد توجه قرار گیرند.



شکل ۱- روش‌های تحویل Cas9. مولکول Cas9 ممکن است به عنوان DNA یا mRNA که ژن Cas9 را کدگذاری می‌کند، یا به عنوان یک ریبونوکلئوپروتئین عملکردی (RNP) تحویل داده شود. بزرگترین چالش، انتقال از طریق غشای سلولی است. انواع روش‌های انتقال ویروسی و غیر ویروسی برای رسیدن به انتقال موفقیت آمیز در سراسر غشای سلولی بیان شده است. AAV: ویروس مرتبط با آدنو، LNP: نانو ذرات لیپیدی

Fig 1. Methods of Cas9 Delivery. Cas9 may be delivered as DNA or mRNA, encoding for the Cas9 gene, or it may be delivered as a functional ribonucleoprotein (RNP). The largest challenge is delivery across the cell membrane. A variety of viral and nonviral delivery methods have been mentioned to achieve successful delivery across the cell membrane. AAV: adeno-associated virus, LNP: lipid nanoparticle.

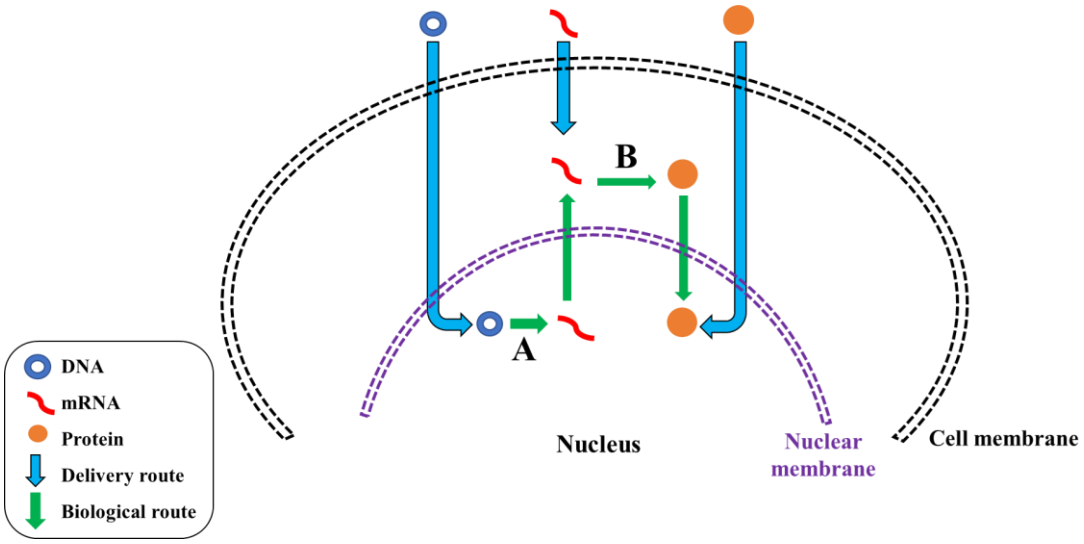
جدول ۱- شکل‌های انتقال: نمونه‌هایی از تحویل کریسپر به صورت DNA، mRNA و پروتئین

Table 1. Delivery Format: Examples of CRISPR Delivery as DNA, mRNA, and Protein

Delivery format	Editing target	Model system	Study objective	References
Plasmid DNA	*DMD23*	Mouse primary satellite cells	Functional gene knockdown	(Tabebordbar et al., 2016)
mRNA	*DNMT1*	HEK293 cell culture	Engineering of mRNA molecules for optimal translation efficiency	(B. Li et al., 2017)
	HBV *PCSK9*	Mouse *in vivo* model	Functional viral resistance Functional gene knockdown	(Jiang et al., 2017)
	GFP *PCSK9*	GFP-HEK293 cell culture Mouse *in vivo* model	Engineering of sgRNA molecules for optimal translation efficiency	(Yin et al., 2017)
	HTI *Fah* gene	Mouse *in vivo* model	HDR-mediated repair of genetic mutation	(Yin et al., 2016)
Protein RNP	*GFP*	GFP-HEK293 cell culture	Functional gene knockdown	(Ming Wang et al., 2016)
	Mdx	Mouse *in vivo* model	HDR-mediated repair of genetic mutation	(Lee et al., 2017)

DMD: Duchenne muscular dystrophy, HBV: hepatitis B virus.

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-29]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1402.12.1.8.2]



شکل ۲- تحویل Cas9 به عنوان DNA، mRNA یا پروتئین. برای دستیابی به ویرایش ژن موفق، پروتئین Cas9 ممکن است به شکل DNA، mRNA یا پروتئین تحویل داده شود. هر شکل، چالش‌های تحویل خاص خود را دارد. در حالی که تحویل ریبونوکلئوپروتئین‌های Cas9 (RNPs) منجر به سریع‌ترین شروع ویرایش ژن می‌شود، می‌تواند بسیار گذرا باشد و چالش اضافی تحویل از طریق دو مانع سلولی (غشای سلولی و غشای هسته‌ای) را دارد. تحویل DNA کد کننده برای ژن Cas9 ممکن است پایدارترین بیان پروتئین Cas9 را ارائه دهد، با این حال ژن باید قبل از تحقق اثر درمانی تحت فرآیندهای زیست شناسی رونویسی (A) و ترجمه (B) قرار گیرد، که منجر به تاخیر در شروع ویرایش ژن می‌شود. mRNA لازم نیست به هسته تحویل داده شود، زیرا فرآیند ترجمه سلولی در سیتوپلاسم است. با این حال، mRNA ها به شدت مستعد تخریب آنزیمی هستند و اثر درمانی تا حدودی به تعویق می‌افتد تا فرآیند ترجمه تکمیل شود.

Fig 2. Cas9 Delivery as DNA, mRNA, or Protein. Cas9 may be successfully delivered in either DNA, mRNA, or protein format to achieve successful gene editing. Each format has its particular delivery challenges. While delivery of Cas9 ribonucleoproteins (RNPs) results in the most immediate onset of gene editing, it can be extremely transient and has the additional challenge of delivery across two cellular barriers (the cell membrane and the nuclear membrane). Delivery of DNA, encoding for the Cas9 gene, may offer the most stable expression of the Cas9 protein. However, the gene must undergo the biological processes of transcription (A) and translation (B) before the therapeutic effect can be realized, which leads to a delay in the onset of gene editing. mRNA does not need to be delivered into the nucleus because the cellular translation is in the cytoplasm. However, mRNAs are highly susceptible to enzymatic degradation, and the therapeutic effect is somewhat delayed until the process of translation is completed.

در شرایط آزمایشگاهی، DNA پلاسمید پایدار و ارزان است که باعث شده است پلاسمید کد کننده Cas9 یک راه تحویل مناسبی در تحقیق‌ها باشد (Liang *et al.*, 2015; Tabebordbar *et al.*, 2016). برای این که انتقال DNA کدگذاری شده در سلول‌های یوکاریوتی موثر باشد، باید بتواند به هر دو غشا سلولی و هسته‌ای نفوذ کند. در این شیوه‌ی تحویل باید دقت شود که توالی پیشبر (promoter) یا در صورت لزوم توالی تکثیر رمزگذاری شده در پلاسمید، برای هدایت بیان Cas9 در نظر گرفته شود. یک پلاسمید حاوی پیشبر بیان باکتریایی، ممکن است با سلول‌های پستانداران سازگار نباشد. معرفی پلاسمیدها در مقایسه با سایر روش‌های تحویل، زمان بیان را افزایش می‌دهد. همچنین اگر بیان پایدار برای ویرایش مورد نیاز باشد، روش تحویل پلاسمید سودمند خواهد بود، ولی ممکن است به دلیل پایداری بیشتر و در نتیجه حضور طولانی‌تر، باعث افزایش اثرهای خارج از هدف و ویرایش‌های نامطلوب شود که نگرانی‌های ایمنی را افزایش می‌دهد. علاوه بر این، شواهدی وجود دارد که نشان می‌دهد تحویل پلاسمید باعث ایجاد پاسخ ایمنی‌زایی می‌شود (Hughes *et al.*, 2009).

یک جایگزین برای رمز گذاری Cas9 در DNA پلاسمید، رمز گذاری آن به عنوان mRNA است که می‌تواند توسط ریبوزوم‌های موجود در سیتوپلاسم بیان شود. این روش از چالش عبور از غشای هسته‌ای جلوگیری می‌کند. در تحقیق صورت گرفته برای مقایسه روش‌های تحویل نشان داده شد که تحویل Cas9 به شکل mRNA به کشت سلولی، در مقایسه با روش تحویل پلاسمید منجر به شروع سریع‌تر ویرایش ژن می‌شود، در حالی که DNA

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-29]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1402.12.1.8.2]

پلاسمید Cas9 ابتدا باید به mRNA رونویسی شود (Liang *et al*., 2015). از نتایج این شروع سریع‌تر این است که تحویل mRNA منجر به بیان گذرا پروتئین می‌شود. از این گذرا بودن بیان پروتئین می‌توان برای کنترل بیشتر مقدار و مدت حضور Cas9 در سلول استفاده نمود که ممکن است به محدود کردن اثرهای خارج از هدف کمک کند. اما بیان پایدار Cas9، که ممکن است برای دستیابی به سطح‌های مفیدی از ویرایش ژن مورد نیاز باشد، در این روش تحویل به دست نیاید. همچنین mRNA نسبت به DNA پایداری کمتری داشته و به تخریب توسط آنزیم‌های RNAse، هم در شرایط آزمایشگاهی و هم در داخل بدن حساس است. بنابراین ممکن است انتخاب روش تحویلی که از mRNA در برابر مسیرهای تخریب با واسطه آنزیم محافظت کند، مفید باشد. به تازگی پیشرفت‌هایی در اصلاح شیمیایی mRNA برای تنظیم پایداری و بیان آن‌ها در داخل سلول‌ها صورت گرفته است که توانایی کنترل دقیق بیان پروتئین را پس از تحویل mRNA بهبود بخشیده است (Pardi et al., 2015; Wang et al., 2013; Williams et al., 2010). یکی از ملاحظه‌های منحصر به فرد برای تحویل mRNA، روش تحویل gRNA است. از آن جایی که هر دو mRNA و gRNA به طور معمول مولکول‌های RNA تک رشته‌ای هستند، اغلب وکتور انتقال دهنده یکسانی برای این مولکول‌ها مناسب است. اما با این حال زمان تحویل ممکن است زمان‌بر باشد (Jiang *et al*., 2017). به طور خاص، برای دستیابی به ویرایش ژنوم، gRNA دست نخورده باید همزمان با پروتئین Cas9 عملکردی در سلول وجود داشته باشد، اما مولکول Cas9 mRNA تحویل داده شده ابتدا باید در محل به پروتئین ترجمه شود (شکل ۲). اگر مولکول‌های gRNA و mRNA به طور مشترک تحویل داده شوند، ممکن است تا زمانی که mRNA ترجمه شود، gRNA شروع به تخریب کند. در واقع، نشان داده شده است که تأخیر در تحویل gRNA تا شش ساعت پس از mRNA ممکن است کارایی ویرایش را افزایش دهد (Jiang *et al*., 2017). روش دیگر، اصلاح شیمیایی خود مولکول gRNA می‌باشد که ممکن است پایداری آن را پس از تحویل افزایش دهد (Yin *et al*., 2017). برخی از گروه‌ها از یک روش ترکیبی استفاده کرده‌اند که در آن mRNA کدکننده‌ی پروتئین Cas9 به همراه ژنوم ویروسی که به طور سازنده gRNA را بیان می‌کند، تحویل داده شده است تا از این مشکل زمان‌بندی به‌کلی اجتناب شود (Yin *et al*., 2016).

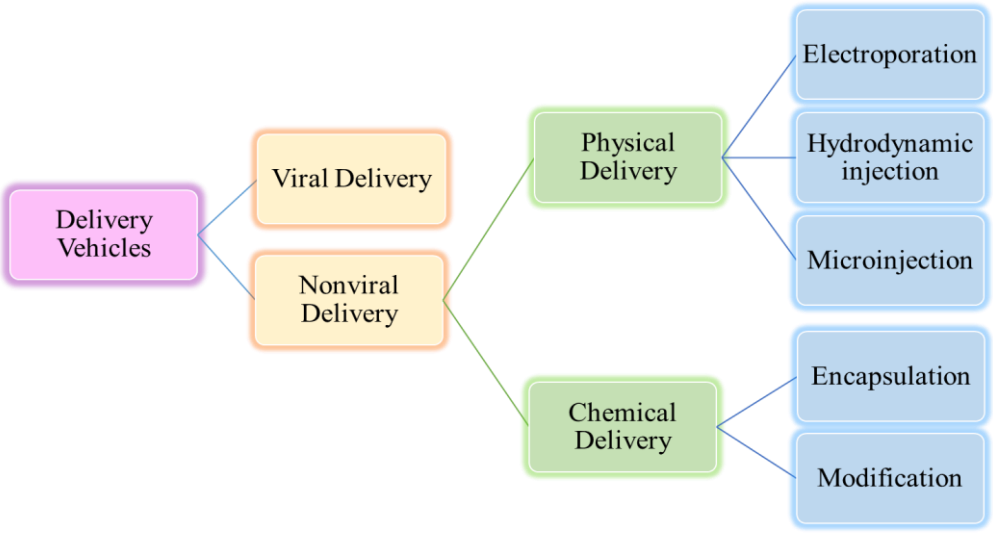
گزینه سوم تحویل Cas9 به شکل پروتئین طبیعی آن است. به دلیل اندازه و بار زیاد پروتئین، این روش اغلب سخت‌ترین روش تحویل است. اما به تازگی تحویل موفقیت آمیز پروتئین Cas9 در شرایط آزمایشگاهی و درون تنی نشان داده شده است (Lee et al., 2017; Wang et al., 2016). این روش گذراترین زمان بیان را ارائه می‌دهد، اما کمترین تأخیر را در فعالیت درمانی دارد. به احتمال زیاد به دلیل این واقعیت است که رونویسی و ترجمه هر دو حذف می‌شوند (Liang *et al*., 2015). اغلب، هر دو پروتئین Cas9 و gRNA در شرایط آزمایشگاهی تولید می‌شوند و سپس در یک کمپلکس RNP ترکیب شده و به صورت یک کمپلکس واحد تحویل داده می‌شوند. همانند تحویل mRNA، به دلیل وجود gRNA در RNP، این روش نیز به مراقبت ویژه برای محافظت از محموله در برابر هر گونه مسیر تخریب احتمالی نیاز دارد. به دست آوردن پروتئین خالص نیز دشوارتر از به دست آوردن پلاسمیدها یا mRNA است، که ممکن است از نظر اقتصادی این رویکرد دارای عیب‌هایی باشد. به طور خاص، تولید باکتریایی پروتئین اغلب منجر به آلودگی قابل توجه اندوتوکسین می‌شود که قبل از استفاده از پروتئین باید حذف شود. در نهایت، معرفی ناگهانی یک پروتئین غیرطبیعی با منشاء باکتریایی به یک پستاندار ممکن است پاسخ‌های ایمنی را تحریک کند یا در صورتی که سطح مقدار به دقت کنترل نشود، مسمومیت ایجاد کند (Glass *et al*., 2018). البته ذکر این نکته اهمیت دارد که شکل-های مختلف تحویل اجزای سیستم کریسپر برای انتقال سایر مواد نیز می‌تواند کاربرد داشته باشد که این مقاله بر شکل‌های تحویل و ابزارهای انتقال دهنده مختلف اجزای سیستم کریسپر برای ویرایش ژن در سلول‌ها تمرکز دارد.

ابزارهای انتقال‌دهنده

ابزارهای انتقال‌دهنده، حامل‌هایی هستند که محموله را به هدف مورد نظر می‌رسانند. زمانی که صحبت از برنامه‌های بالینی می‌شود، موضوع انتقال اهمیت بسیاری پیدا می‌کند. Cas9 بعد از

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-29]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1402.12.1.8.2]

معرفی به بدن، باید بتواند به ارگان یا سلول مناسب در بدن منتقل شود و از فضای بینابینی عبور کرده تا به سلول مورد نظر دست یابد. سپس از غشای سلول عبور کرده و به هسته برسد. در همین حین باید از واکنش‌های دفاعی بدن برای حذف و پاکسازی آن جلوگیری شود. انتخاب یک انتقال‌دهنده یا حامل مناسب ممکن است انتقال در هر یک از این مراحل را تسهیل کند. همچنین انتقال از طریق دیواره‌ی عروق و فضای بینابینی، یک جز مهم در انتقال بالینی است که ممکن است تحت تاثیر حامل انتقال دهنده قرار گیرد (Wang et al., 2006). در این مطالعه به بررسی انتقال از طریق غشای سلول، از طریق برخی از ابزارهای انتقال دهنده پرداخته شده است (شکل ۳).



شکل ۳- خلاصه طبقه‌بندی ابزارهای انتقال‌دهنده

Fig 3. Schematic classification of delivery vehicles

انتقال ویروسی

در شرایط آزمایشگاهی، یکی از محبوب‌ترین روش‌ها برای رسیدن به بیان Cas9 در محیط کشت سلول، استفاده از ویروس‌ها می‌باشد. ویروس‌ها به شدت تکامل پیدا کرده‌اند که به سلول‌ها حمله کنند و بیان پروتئین‌های غیربومی را داخل میزبان القا کنند (Naso et al., 2017). بنابراین ویروس توانایی ورود به سلول میزبان و القای بیان تراژن را دارد، ولی دیگر قادر نیست که تکثیر یابد یا به سلول‌های جدید انتشار یابد. معمول‌ترین وکتور ویروسی برای انتقال Cas9، وکتور ویروس وابسته به آدنو (Adeno Associated Virus) می‌باشد (Long *et al.*, 2016; Nelson *et al.*, 2016; Tabebordbar *et al.*, 2016). مشخص شده است که هر کدام از سروتیپ‌های این ویروس کارایی انتقال ترجیحی به زیر مجموعه‌ی خاصی از انواع سلول‌ها نشان می‌دهد. این مسئله به پژوهشگران این اجازه را می‌دهد که سروتیپ مطلوب را انتخاب کنند، تا انتقال هدفمند به ارگان مورد نظر ارتقا یابد (Zincarelli *et al.*, 2008). اگرچه انتقال Cas9 با واسطه این ویروس در شرایط آزمایشگاهی به خوبی عمل می‌کند، ولی نگرانی‌هایی در استفاده‌ی بالینی آن وجود دارد. یک خطر این است که نفوذ تراژن به ژنوم هدف ممکن است ناخواسته بیان یک ژن حیاتی را مختل کند. همچنین یک محدودیت فیزیکی برای مقدار DNA که می‌توان داخل ویروس بسته‌بندی کرد وجود دارد (Naso *et al.*, 2017). حداکثر ظرفیت این ویروس ٤/٧ kb است. بنابراین طراحی یک ویروس برای رمزگذاری چنین ژن بزرگی مانند Cas9 به همراه پیشبر و gRNA چالش برانگیز است. یک راه حل برای این مشکل، بسته‌بندی gRNA و Cas9 در

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-29]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1402.12.1.8.2]

وکتورهای ویروسی جداگانه است. همچنین نسبت به استفاده‌ی معمول یعنی Cas9 استرپتوکوکوس پایوژنز، ارتولوگ‌های کوچکتر Cas9 مانند Cas9 استافیلوکوکوس آرئوس نیز وجود دارند (Ran *et al.*, 2015). این انواع کوچکتر بیشتر قابلیت بسته‌بندی در ذره‌های ویروسی را دارند (Glass *et al.*, 2018).

انتقال غیر ویروسی

چندین روش انتقال Cas9 (بصورت mRNA، DNA و یا پروتئین) از سدهای سلولی وجود دارد که از اجزای ویروسی استفاده نمی‌کنند (Sun *et al.*, 2017). روش‌های انتقال غیرویروسی شامل روش‌های فیزیکی برای تخریب سدهای سلولی، تغییرهای شیمیایی که انتقال محموله را با نفوذ به سدهای سلولی ارتقا می‌بخشد و روش کپسوله‌سازی فیزیکی محموله داخل مولکول حامل هستند (Wang et al., 2017). انتقال غیرویروسی دارای تعدادی مزیت‌های مهم است. عامل محدود کننده‌ی اندازه‌ی فیزیکی ذره‌های ویروسی به طور کامل حذف می‌شود. خطر خطاهای درج یا جا دادن که ممکن است در انتقال ویروسی ژن رخ دهد به شدت کاهش می‌یابد. در نهایت وکتورهای انتقال دهنده‌ی غیرویروسی ممکن است به پژوهشگر این اجازه را بدهند که مقادیر، مدت زمان و اختصاصیت انتقال را دقیق‌تر کنترل کنند. همچنین اغلب رویکردهای انتقال غیرویروسی می‌توانند به طریقی ترکیب شوند که از مزیت‌های چند الگوی مختلف تحویل بهره‌مند شوند (Glass *et al.*, 2018).

انتقال فیزیکی

انتقال فیزیکی یک روش انتقال است، که اغلب در شرایط آزمایشگاه برای پروتئین Cas9 به کار گرفته شده و به طور موقت موانع فیزیکی که مانع از رسیدن محموله به مقصد می‌شود را مختل می‌کند. چنین اختلالی با قرار دادن سلول‌ها در برابر نیروهای فیزیکی خفیف برای باز کردن موقت منافذ غشای سلول مطرح شده است. در این روش باید مراقبت شود تا از آسیب‌های دائم به غشا جلوگیری شود. زمانی که این اختلال‌های فیزیکی به طور صحیح انجام شوند، اغلب در محیط آزمایشگاهی موفقیت آمیز خواهد بود (Glass *et al.*, 2018).

الکتروپوراسیون (Electroporation)، از روش‌های انتقال فیزیکی، یک روش است که میدان الکتریکی قوی را به غشای سلول وارد می‌کند. میدان الکتریکی به طور موقت غشا را دوباره سازماندهی کرده و آن را متخلخل‌تر و غیر انتخابی می‌کند. افزایش نفوذپذیری اجازه می‌دهد مولکول‌های زیستی بزرگ، که ممکن است توسط غشا پذیرفته نشوند، از غشا عبور کنند. این فرآیند به طور موفقیت آمیز برای انتقال RNA، DNA و RNP در شرایط آزمایشگاهی در لاین‌های سلولی به کار رفته است (Hashimoto *et al.*, 2015; Kim *et al.*, 2014; Nelson *et al.*, 2016). با وجود این که این رویکرد در شرایط زنده در زیگوت نشان داده شده است، ولی برای استفاده‌های درمانی در بیماران مناسب نیست. حتی در محیط کشت بعضی از انواع سلول‌ها که به طور طبیعی به ایمپالس‌های الکتریکی پاسخ می‌دهند، مانند ماهیچه و اعصاب، ممکن است با افزایش ولتاژهای سطح سلول که الکتروپوراسیون تولید می‌کند، تحت تاثیر منفی قرار گیرند. میدان الکتریکی باید به خوبی تنظیم شود، در غیر این صورت ممکن است تغییرهای غیرقابل برگشت در فیزیولوژی غشا ایجاد شود که زنده‌مانی سلول را در طولانی مدت تهدید می‌کند (Glass *et al.*, 2018).

تزریق هیدرودینامیکی، به عنوان یک روش دیگر انتقال فیزیکی، می‌تواند ماکرومولکول‌های بزرگ را در شرایط زنده منتقل کند که این کار با تزریق محلول مایع از راه وریدی در حجم و فشار بسیار زیاد انجام می‌شود. این افزایش ناگهانی در حجم باعث ایجاد موقت منافذ در دیواره‌ی عروق می‌شود که به محموله‌ی ماکرومولکول‌های بزرگ اجازه رسیدن به بافت هدف را می‌دهد. این روش به طور معمول با سایر روش‌ها ترکیب می‌شود و اگرچه در توزیع محموله‌های قابل انتقال به بافت‌ها در شرایط زنده برتری دارد، ولی روشی برای دور زدن غشاهای سلولی نمی‌باشد. در تزریق هیدرودینامیکی از طریق سیاهرگ دمی در موش، پلاسمید حامل Cas9 و gRNA، به‌صورت موفقیت‌آمیزی به داخل بافت‌های قلب، ریه‌ها، کبد و کلیه منتقل شده است (Bonamassa *et al.*, 2011; Kamimura *et al.*, 2015; Yin *et*

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-29]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1402.12.1.8.2]

al., 2014). در حال حاضر استفاده از این روش در مدل‌های حیوان‌های کوچک محدود شده است، زیرا حجم لازم برای شروع تزریق (حدود ۱۰ درصد وزن بدن موش) زیاد است. از این رو، روش مناسبی برای کاربردهای انسانی نیست. پژوهش‌ها برای بهینه‌سازی این روش جهت استفاده در حیوان‌های بزرگتر و انسان همچنان ادامه دارد (Glass *et al*., 2018).

روش‌های فیزیکی انتقال نیاز به تکیه کردن به دستکاری نیروها و میدان الکتریکی برای ایجاد اختلال در غشای سلولی ندارند. به عنوان مثال، میکرواینجکشن (Microinjection) از سوزن‌های در مقیاس میکرون برای سوراخ کردن غشای سلولی استفاده کرده و محموله را مستقیم تزریق می‌کند. توسعه پیپت‌های میکروسکوپی، میکرواینجکشن را به عنوان امکانی برای انتقال انواع گسترده‌ای از ماکرومولکول‌ها، شامل اجزای کریسپر، برای هدف قرار دادن سلول قرار داده است. این رویکرد برای انتقال Cas9 به شکل RNA، DNA و RNP و همچنین انتقال مستقیم gRNA استفاده شده است (Crispo *et al*., 2015; Friedland *et al*., 2013; Tang *et al*., 2017). میکرواینجکشن می‌تواند محموله را به داخل سیتوپلاسم، یا در بعضی موارد به داخل پیش هسته‌ی تخم بارور منتقل کند (Li et al., 2013). میکرواینجکشن دارای کارایی بالا و دوز دقیق کنترل شده است و انتقال محموله به طور دقیق به مکان مورد نظر را تضمین می‌کند. نکته منفی این روش این است که هر کدام از سلول‌های بافت هدف باید جداگانه به صورت دستی تزریق شوند و این برای حالت‌های با ظرفیت بالا بسیار غیرعملی است، چه برسد به این که یک طرح بالینی یا درمانی باشد. ترمیم جهش‌های نقطه‌ای در جنین‌های تک سلولی انسانی با واسطه Cas9، از طریق میکرواینجکشن نشان داده شده است (Tang *et al*., 2017).

انتقال شیمیایی

اگرچه رویکردهای فیزیکی به طور معمول در شرایط آزمایشگاهی بسیار موفق هستند، اما به طور کلی مقیاس خوبی ندارند و بنابراین برای انتقال در شرایط زنده یا برنامه‌های با ظرفیت بالا در آزمایشگاه کاربرد کمتری دارد. در روش‌های انتقال شیمیایی، به جای القای تغییر در سلول هدف، خود محموله قابل انتقال می‌تواند تغییر یابد. رویکردهای انتقال شیمیایی، از فرمولاسیون مولکول‌های مکمل استفاده کرده که به Cas9 برای دور زدن موانع سلولی و همچنین محافظت از آن در برابر مسیرهای تخریب کمک می‌کند. انتقال یا تحویل شیمیایی به دو شکل اصلی وجود دارد: روش کپسوله‌سازی ماده انتقال‌پذیر در یک ماده شیمیایی دیگر و روش تغییر شیمیایی مستقیم خود ماده‌ی انتقال‌پذیر. انتقال شیمیایی به خصوص برای برنامه‌های در شرایط زنده امیدوارکننده است. زیرا تعداد زیادی روش‌های استفاده از انتقال شیمیایی برای انتقال هدفمند به یک نوع بافت خاص وجود دارد (Glass *et al*., 2018).

انتقال توسط کپسوله‌سازی (Encapsulation)

حامل‌های بر پایه لیپید یک ابزار محبوب و کارآمد برای انتقال اجزا کریسپر به شکل mRNA، DNA و RNP است. یک محموله ممکن است با مخلوط کردن ساده داخل نانو ذره لیپیدی کپسوله شود یا با آن کمپلکس شود (Glass *et al*., 2018). معرف ترانسفکشن تجاری لیپیدی لیپوفکتامین، یک وسیله‌ی انتقال به اثبات رسیده برای اسیدهای نوکلئیک و پروتئین‌های ویرایش ژن است (Li et al., 2017; Norouzi-Barough et al., 2018; Zuris et al., 2015). اگر چه لیپوفکتامین نسبت به روش انتقال فیزیکی با الکتروپوراسیون می‌تواند کارایی کمتری داشته باشد ولی نشان داده شده است که استفاده‌ی همزمان از دو روش الکتروپوراسیون و روش انتقال شیمیایی با لیپوفکتامین به صورت ترانسفکشن دوگانه، می‌تواند کارایی برش ژن را افزایش دهد و تشخیص نوارهای برش را تسهیل کند (Alambeladi et al., 2021). در واقع لیپیدهای کاتیونی به ویژه در تشکیل یک کمپلکس از محموله‌های با بار منفی مانند DNA یا mRNA موثر هستند. کپسوله‌سازی یا تشکیل کمپلکس با یک حامل لیپیدی می‌تواند محموله را از تخریب آنزیمی یا پاسخ‌های ایمنی محافظت کند. نانو ذره‌های لیپیدی می‌توانند به وسیله‌ی بخش‌های هدفمند فعالی اصلاح شوند تا انتقال نانو ذره‌ها به بافت خاص ارتقا یابد (Glass *et al*., 2018).

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-29]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1402.12.1.8.2]

کپسوله‌سازی پروتئین Cas9 و RNA یا DNA داخل حامل‌های پلیمری یکی دیگر از رویکردهای متداول است که با توجه به انواع وسیع پلیمرهای موجود، در ترانسفکشن زیستی مورد استفاده قرار می‌گیرد. حامل‌های پروتئینی ممکن است از مونومرهای طبیعی، اغلب قندهایی مانند چیتوزان یا از مونومرهای شیمیایی سنتتیک پلی‌کاپرولاکتون یا کوپلیمرهای پلی‌لاکتیک/ اسیدگلیکولیک ساخته شوند (Tong *et al*., 2009). کپسوله‌سازی پلیمری مانند کپسوله‌سازی لیپیدی می‌تواند محموله را از مسیرهای تخریب در شرایط زنده محافظت و مخفی کند. این روش ممکن است با بخش‌های هدفمند فعال که به خصوص به گیرنده‌های سطح سلول هدف متصل می‌شوند، بهبود یابد. این امر اختصاصی بودن انتقال را ارتقا می‌بخشد (Glass *et al*., 2018).

انتقال با تغییر ماده انتقال پذیر (Modification)

پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک می‌توانند برای ارتقای انتقال بدون نیاز به کپسوله‌سازی، به طور مستقیم دچار تغییر یا اصلاح شوند. یک روش معمول برای این روش انتقال، استفاده از پپتیدهای نفوذپذیر به سلول است (Guo *et al*., 2016). این توالی‌های کوتاه پپتیدی می‌توانند از طریق نفوذ مستقیم، انتقال با واسطه اندوسیتوز یا با تشکیل میسل‌ها از غشای سلول عبور کنند. اتصال پروتئین Cas9 و gRNA به این پپتیدها، به عنوان ابزاری برای انتقال پروتئین معرفی شده است (Ramakrishna *et al*., 2014; Staahl *et al*., 2017). اگر چه این روش، مشکل عبور از غشای سلولی را حل کرده است، ولی محافظت در مقابل تخریب توسط پروتئازها را تامین نمی‌کند، در حالی که در کپسوله‌سازی چنین امکانی فراهم است. همچنین این پپتیدها قادر به هدف‌گیری خاص سلول نیستند. بنابراین استفاده موفقیت‌آمیز از این پپتیدها ممکن است نیاز به ترکیب با روش کپسوله‌سازی یا سایر روش‌های انتقال دارد (Glass *et al*., 2018).

نتیجه گیری

استفاده کاربردی از سیستم کریسپر به عنوان فناوری دستکاری ژنتیکی همانند سایر فناوری‌ها نیاز به ارتقا و افزایش قدرت اجرایی آن با بررسی روش‌های مختلف می‌باشد. قدرت فناوری کریسپر به انتقال آنزیم Cas و gRNA به سلول‌های هدف بستگی دارد. برای انتقال به سلول‌های خاص باید رویکرد مناسب انتخاب شود. این رویکردهای تحویل برای برنامه‌های پیچیده‌تر کریسپر بیشتر اهمیت می‌یابد، زیرا در این برنامه‌ها نیاز به انتقال همزمان چندین عامل وجود دارد. کشف و اجرای انتقال دهنده‌ها و مواد جدیدی که می‌توانند به طور مداوم بازده بیشتر، ویژگی بالاتر و سمیت کمتر داشته باشند، نتایج تحویل کریسپر را ارتقا می‌بخشند. در این مطالعه خصوصیت‌های هر یک از روش‌های تحویل و ابزارهای انتقال دهنده سیستم کریسپر، به عنوان تکنولوژی دستکاری‌های ژنتیکی، شرح داده شد. هر چند این روش‌ها می‌تواند برای انتقال سایر مواد به داخل سایر سلول‌ها نیز کاربرد داشته باشد، این مطالعه با تمرکز بر انتقال اجزای سیستم کریسپر برای ویرایش ژن با تاکید بر سلول‌های انسانی بررسی شد. روش‌ها و ابزارهای مختلف انتقال دهنده‌ی سیستم کریسپر هر کدام دارای عیب‌ها و مزیت‌هایی هستند، بنابراین لازم است موثرترین روش انتقال با توجه به امکانات موجود در آزمایشگاه، شکل مورد استفاده اجزای سیستم کریسپر، نوع سلول و برنامه درمانی انتخاب شود تا سیستم کریسپر برای ویرایش ژن کارآمد باشد و بتواند به بهترین نتیجه دست یابد.

منابع

Alambeladi, S. A., Hosseiny, S. E., Jafarinia, M., & Dianatpour, M. (2021). Use of dual-transfection for programmed death cell protein 1 disruption mediated by CRISPR-Cas9 in human peripheral blood mononuclear cells. Iranian Journal of Basic Medical Sciences, 24(1), 44. doi: 10.22038/ijbms.2020.48566.11146

Ashaar-Ghadim, E., Pazhouhandeh, M., & Ahmadabadi, M. (2022). Potato Genome Editing Using CRISPR Technologies. Genetic Engineering and Biosafety Journal, 11(2), 266–274. dor: 20.1001.1.25885073.1401.11.2.13.2

Bonamassa, B., Hai, L., & Liu, D. (2011). Hydrodynamic gene delivery and its applications in pharmaceutical research. Pharmaceutical Research, 28(4), 694–701. Springer. doi: 10.1007/s11095-010-0338-9

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

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-29]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1402.12.1.8.2]

microinjection into zygotes. PloS One, 10(8), e0136690. doi: 10.1371/journal.pone.0136690

Friedland, A. E., Tzur, Y. B., Esvelt, K. M., Colaiácovo, M. P., Church, G. M., & Calarco, J. A. (2013). Heritable genome editing in C. elegans via a CRISPR-Cas9 system. Nature Methods, 10(8), 741–743. doi: 10.1038/nmeth.2532

Glass, Z., Lee, M., Li, Y., & Xu, Q. (2018). Engineering the Delivery System for CRISPR-Based Genome Editing. Trends in Biotechnology, 36(2), 173–185. Elsevier Ltd. doi: 10.1016/j.tibtech.2017.11.006

Guo, Z., Peng, H., Kang, J., & Sun, D. (2016). Cell-penetrating peptides: Possible transduction mechanisms and therapeutic applications. Biomedical Reports, 4(5), 528–534. doi: 10.3892/br.2016.639

Hashemabadi, M., Sasan, H., Amandadi, M., Esmaeilzadeh-Salestani, K., Esmaeili-Mahani, S., & Ravan, H. (2023). CRISPR/Cas9-Mediated Disruption of ZNF543 Gene: An Approach Toward Discovering Its Relation to TRIM28 Gene in Parkinson's Disease. Molecular Biotechnology, 65(2), 243–251. doi: 10.1007/S12033-022-00494-0

Hashimoto, M., & Takemoto, T. (2015). Electroporation enables the efficient mRNA delivery into the mouse zygotes and facilitates CRISPR/Cas9-based genome editing. Scientific Reports, 5(1), 1–8. doi: 10.1038/srep11315

Hughes, T. S., Langer, S. J., Virtanen, S. I., Chavez, R. A., Watkins, L. R., Milligan, E. D., & Leinwand, L. A. (2009). Immunogenicity of intrathecal plasmid gene delivery: cytokine release and effects on transgene expression. The Journal of Gene Medicine, 11(9), 782–790. doi: 10.1002/jgm.1364

Jiang, C., Mei, M., Li, B., Zhu, X., Zu, W., Tian, Y., Wang, Q., Guo, Y., Dong, Y., & Tan, X. (2017). A non-viral CRISPR/Cas9 delivery system for therapeutically targeting HBV DNA and pcsk9 in vivo. Cell Research, 27(3), 440–443. doi: 10.1038/cr.2017.16

Jinek, M., Jiang, F., Taylor, D. W., Sternberg, S. H., Kaya, E., Ma, E., Anders, C., Hauer, M., Zhou, K., Lin, S., Kaplan, M., Iavarone, A. T., Charpentier, E., Nogales, E., & Doudna, J. A. (2014). Structures of Cas9 endonucleases reveal RNA-mediated conformational activation. Science, 343(6176). doi: 10.1126/science.1247997

Kamimura, K., Yokoo, T., Abe, H., Kobayashi, Y., Ogawa, K., Shinagawa, Y., Inoue, R., & Terai, S. (2015). Image-guided hydrodynamic gene delivery: Current status and future directions. Pharmaceutics, 7(3), 213–223. doi: 10.3390/pharmaceutics7030213

Kim, S., Kim, D., Cho, S. W., Kim, J., & Kim, J. S. (2014). Highly efficient RNA-guided genome editing in human cells via delivery of purified Cas9 ribonucleoproteins. Genome Research, 24(6), 1012–1019. doi: 10.1101/gr.171322.113

Lee, K., Conboy, M., Park, H. M., Jiang, F., Kim, H. J., Dewitt, M. A., Mackley, V. A., Chang, K., Rao, A., Skinner, C., Shobha, T., Mehdipour, M., Liu, H., Huang, W. C., Lan, F., Bray, N. L., Li, S., Corn, J. E., Kataoka, K., … Murthy, N. (2017). Nanoparticle delivery of Cas9 ribonucleoprotein and donor DNA in vivo induces homology-directed DNA repair. Nature Biomedical Engineering, 1(11), 889–901. doi: 10.1038/s41551-017-0137-2

Li, B., Zhao, W., Luo, X., Zhang, X., Li, C., Zeng, C., & Dong, Y. (2017). Engineering CRISPR-Cpf1 crRNAs and mRNAs to maximize genome editing efficiency. Nature Biomedical Engineering, 1(5), 1–10. doi: 10.1038/s41551-017-0066

Li, D., Qiu, Z., Shao, Y., Chen, Y., Guan, Y., Liu, M., Li, Y., Gao, N., Wang, L., Lu, X., Zhao, Y., & Liu, M. (2013). Heritable gene targeting in the mouse and rat using a CRISPR-Cas system. Nature Biotechnology, 31(8), 681–683. Nature Publishing Group. doi: 10.1038/nbt.2661

Liang, X., Potter, J., Kumar, S., Zou, Y., Quintanilla, R., Sridharan, M., Carte, J., Chen, W., Roark, N., Ranganathan, S., Ravinder, N., & Chesnut, J. D. (2015). Rapid and highly efficient mammalian cell engineering via Cas9 protein transfection. Journal of Biotechnology, 208, 44–53. doi: 10.1016/j.jbiotec.2015.04.024

Long, C., Amoasii, L., Mireault, A. A., McAnally, J. R., Li, H., Sanchez-Ortiz, E., Bhattacharyya, S., Shelton, J. M., Bassel-Duby, R., & Olson, E. N. (2016). Postnatal genome editing partially restores dystrophin expression in a mouse model of muscular dystrophy. Science, 351(6271), 400–403. doi: 10.1126/science.aad5725

Mohammadinejad, R., Sassan, H., Pardakhty, A., Hashemabadi, M., Ashrafizadeh, M., Dehshahri, A., & Mandegary, A. (2020). ZEB1 and ZEB2 gene editing mediated by CRISPR/Cas9 in A549 cell line. Bratislava Medical Journal, 121(1), 31–36. doi: 10.4149/bll_2020_005

Mohammadinejad, R., Dadashzadeh, A., Moghassemi, S., Ashrafizadeh, M., Dehshahri, A., Pardakhty, A., Sassan, H., Sohrevardi, S. M., & Mandegary, A. (2019). Shedding light on gene therapy: Carbon dots for the minimally invasive image-guided delivery of plasmids and noncoding RNAs - A review. Journal of Advanced Research, 18, 81–93. doi: 10.1016/j.jare.2019.01.004

Naso, M. F., Tomkowicz, B., Perry, W. L., & Strohl, W. R. (2017). Adeno-Associated Virus (AAV) as a Vector for Gene Therapy. BioDrugs, 31(4), 317–334. Springer International Publishing. doi: 10.1007/s40259-017-0234-5

Nelson, C. E., Hakim, C. H., Ousterout, D. G., Thakore, P. I., Moreb, E. A., Castellanos Rivera, R. M., Madhavan, S., Pan, X., Ran, F. A., Yan, W. X., Asokan, A., Zhang, F., Duan, D., & Gersbach, C. A. (2016). In vivo genome editing improves muscle function in a mouse model of Duchenne muscular dystrophy. Science, 351(6271), 403–407. doi: 10.1126/science.aad5143

Norouzi-Barough, L., Sarookhani, M., Salehi, R., Sharifi, M., & Moghbelinejad, S. (2018). CRISPR/Cas9, a new approach to successful knockdown of ABCB1/P-glycoprotein and reversal of chemosensitivity in human epithelial ovarian cancer cell line. Iranian Journal of Basic Medical Sciences, 21(2), 181–187. doi: 10.22038/ijbms.2017.25145.6230

Pardi, N., Tuyishime, S., Muramatsu, H., Kariko, K., Mui, B. L., Tam, Y. K., Madden, T. D., Hope, M. J., & Weissman, D. (2015). Expression kinetics of nucleoside-modified mRNA delivered in lipid nanoparticles to mice by various routes. Journal of Controlled Release, 217, 345–351. doi: 10.1016/j.jconrel.2015.08.007

Ramakrishna, S., Kwaku Dad, A. B., Beloor, J., Gopalappa, R., Lee, S. K., & Kim, H. (2014). Gene disruption by cell-penetrating peptide-mediated delivery of Cas9 protein and guide RNA. Genome Research, 24(6), 1020–1027. doi: 10.1101/gr.171264.113

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-29]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1402.12.1.8.2]

Ran, F. A., Cong, L., Yan, W. X., Scott, D. A., Gootenberg, J. S., Kriz, A. J., Zetsche, B., Shalem, O., Wu, X., Makarova, K. S., Koonin, E. V., Sharp, P. A., & Zhang, F. (2015). In vivo genome editing using Staphylococcus aureus Cas9. Nature, 520(7546), 186–191. doi: 10.1038/nature14299

Staahl, B. T., Benekareddy, M., Coulon-Bainier, C., Banfal, A. A., Floor, S. N., Sabo, J. K., Urnes, C., Munares, G. A., Ghosh, A., & Doudna, J. A. (2017). Efficient genome editing in the mouse brain by local delivery of engineered Cas9 ribonucleoprotein complexes. Nature Biotechnology, 35(5), 431–434. doi: 10.1038/nbt.3806

Sun, W., & Gu, Z. (2017). Tailoring non-viral delivery vehicles for transporting genome-editing tools. Science China Materials, 60(6), 511–515. doi: 10.17615/0j3q-6x09

Tabebordbar, M., Zhu, K., Cheng, J. K. W., Chew, W. L., Widrick, J. J., Yan, W. X., Maesner, C., Wu, E. Y., Xiao, R., Ran, F. A., Cong, L., Zhang, F., Vandenberghe, L. H., Church, G. M., & Wagers, A. J. (2016). In vivo gene editing in dystrophic mouse muscle and muscle stem cells. Science, 351(6271), 407–411. doi: 10.1126/science.aad5177

Tang, L., Zeng, Y., Du, H., Gong, M., Peng, J., Zhang, B., Lei, M., Zhao, F., Wang, W., Li, X., & Liu, J. (2017). CRISPR/Cas9-mediated gene editing in human zygotes using Cas9 protein. Molecular Genetics and Genomics, 292(3), 525–533. doi: 10.1007/s00438-017-1299-z

Tong, R., Christian, D. A., Tang, L., Cabral, H., Baker, J. R., Kataoka, K., Discher, D. E., & Cheng, J. (2009). Nanopolymeric therapeutics. MRS Bulletin, 34(6), 422–431. doi: 10.1557/mrs2009.118

Tu, Z., Yang, W., Yan, S., Guo, X., & Li, X. J. (2015). CRISPR/Cas9: a powerful genetic engineering tool for establishing large animal models of neurodegenerative diseases. Molecular Neurodegeneration, 10(1), 1–8. doi: 10.1186/s13024-015-0031-x

Wang, M., Glass, Z. A., & Xu, Q. (2017). Non-viral delivery of genome-editing nucleases for gene therapy. Gene Therapy, 24(3), 144–150. Nature Publishing Group. doi: 10.1038/gt.2016.72

Wang, M., Zuris, J. A., Meng, F., Rees, H., Sun, S., Deng, P., Han, Y., Gao, X., Pouli, D., Wu, Q., Georgakoudi, I., Liu, D. R., & Xu, Q. (2016). Efficient delivery of genome-editing proteins using bioreducible lipid nanoparticles. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 113(11), 2868–2873. doi: 10.1073/pnas.1520244113

Wang, Y., & Yuan, F. (2006). Delivery of viral vectors to tumor cells: Extracellular transport, systemic distribution, and strategies for improvement. Annals of Biomedical Engineering, 34(1), 114–127. doi: 10.1007/s10439-005-9007-2

Wang, Y., Su, H. H., Yang, Y., Hu, Y., Zhang, L., Blancafort, P., & Huang, L. (2013). Systemic Delivery of Modified mRNA Encoding Herpes Simplex Virus 1 Thymidine Kinase for Targeted Cancer Gene Therapy. Molecular Therapy, 21(2), 358–367. doi: 10.1038/mt.2012.250

Williams, D. J., Puhl, H. L., & Ikeda, S. R. (2010). A simple, highly efficient method for heterologous expression in mammalian primary neurons using cationic lipid-mediated mRNA transfection. Frontiers in Neuroscience, 4, 181. doi: 10.3389/fnins.2010.00181

Yin, H., Song, C. Q., Dorkin, J. R., Zhu, L. J., Li, Y., Wu, Q., Park, A., Yang, J., Suresh, S., Bizhanova, A., Gupta, A., Bolukbasi, M. F., Walsh, S., Bogorad, R. L., Gao, G., Weng, Z., Dong, Y., Koteliansky, V., Wolfe, S. A., … Anderson, D. G. (2016). Therapeutic genome editing by combined viral and non-viral delivery of CRISPR system components in vivo. Nature Biotechnology, 34(3), 328–333. doi: 10.1038/nbt.3471

Yin, H., Song, C. Q., Suresh, S., Wu, Q., Walsh, S., Rhym, L. H., Mintzer, E., Bolukbasi, M. F., Zhu, L. J., Kauffman, K., Mou, H., Oberholzer, A., Ding, J., Kwan, S. Y., Bogorad, R. L., Zatsepin, T., Koteliansky, V., Wolfe, S. A., Xue, W., … Anderson, D. G. (2017). Structure-guided chemical modification of guide RNA enables potent non-viral in vivo genome editing. Nature Biotechnology, 35(12), 1179–1187. doi: 10.1038/nbt.4005

Yin, H., Xue, W., Chen, S., Bogorad, R. L., Benedetti, E., Grompe, M., Koteliansky, V., Sharp, P. A., Jacks, T., & Anderson, D. G. (2014). Genome editing with Cas9 in adult mice corrects a disease mutation and phenotype. Nature Biotechnology, 32(6), 551–553. doi: 10.1038/nbt.2884

Zincarelli, C., Soltys, S., Rengo, G., & Rabinowitz, J. E. (2008). Analysis of AAV serotypes 1-9 mediated gene expression and tropism in mice after systemic injection. Molecular Therapy, 16(6), 1073–1080. doi: 10.1038/mt.2008.76

Zuris, J. A., Thompson, D. B., Shu, Y., Guilinger, J. P., Bessen, J. L., Hu, J. H., Maeder, M. L., Joung, J. K., Chen, Z. Y., & Liu, D. R. (2015). Cationic lipid-mediated delivery of proteins enables efficient protein-based genome editing in vitro and in vivo. Nature Biotechnology, 33(1), 73–80. doi: 10.1038/nbt.3081

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-29]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1402.12.1.8.2]