Medical Science Journal of Islamic Azad University Vol. 36, No. 3, Autumn 2026 REVIEW ARTICLE

A review of the application of CRISPR-Cas in microbial biotechnology

***Bahareh Nowruzi*[1], *Hassan Beiranvand*[2], *Armita Biglari*[2]**
[1] *Associate Professor, Department of Biology, SR.C., Islamic Azad University, Tehran, Iran*
[2] *MSc Student, Department of Biology, SR.C., Islamic Azad University, Tehran, Iran*

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2026-10-16]

[DOR: 20.1001.1.10235922.1405.36.3.2.9]
[DOI: 10.66224/iau.36.3.266]

Abstract

Today, the use of CRISPR-Cas systems for genome editing and modification in diverse microbial species is widespread. Originally identified as bacterial defense mechanisms against viral invaders, CRISPR-Cas systems are present across a broad spectrum of microbial taxa, including bacteria and archaea. These systems are categorized into two main classes: Class 1, comprising multi-subunit protein complexes, and Class 2, distinguished by single-unit Cas protein systems such as Cas9. The flexibility of CRISPR-Cas systems stands out as one of their most attractive features. Various genome editing approaches employed by Class 1 and Class 2 systems reflect their high adaptability in defense mechanisms, which confer protection against viral infections. Furthermore, CRISPR-Cas systems contribute to the stability and integrity of bacterial and archaeal genomes. Currently, these systems serve as essential tools in laboratories for functional genomics, precise genome editing, and targeted gene programming. They play a key role in biotechnology, especially in the engineering of microorganisms for environmental remediation and biofuel production. Beyond laboratory applications, CRISPR-based diagnostics enable rapid and accurate detection of infections and genetic variations, thus facilitating early disease diagnosis. Moreover, the development of targeted antimicrobial strategies utilizing CRISPR has found extensive application in combating drug-resistant microorganisms. Collectively, CRISPR-Cas systems have become indispensable tools in microbial genome engineering and in the advancement of innovative diagnostic and therapeutic approaches in medicine. In this review, data were collected and analyzed through a literature search in Springer, ScienceDirect, Scopus, and John Wiley databases from 2018 to 2025, using MeSH-defined keywords related to microbial CRISPR-Cas systems.
Keywords: *CRISPR, Bacterial defense mechanism, Microbial biotechnology, Genome editing.*

Cited as: Nowruzi B, Beiranvand H, Biglari A. A review of the application of CRISPR-Cas in microbial biotechnology. Medical Science Journal of Islamic Azad University, Tehran Medical Branch 2026; 36(3): **266-280.**

Correspondence to: Bahareh Nowruzi
Tel: *+98 9113710956*
E-mail: bahare77biol@gmail.com
ORCID ID: 0000-0001-6656-777X
Received: 22 Sep 2025; **Accepted:** 9 Dec 2025

مجله علوم پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی
دوره ۳۶، شماره ۳، پاییز ۱۴۰۵، صفحات ۲۶۶ تا ۲۸۰

Review Article

مروری بر کاربرد CRISPR-Cas در بیوتکنولوژی میکروبی

بهاره نوروزی[۱]، حسن بیرانوند[۲]، آرمیتا بیگلری[۲]

[۱] دانشیار، گروه زیست‌شناسی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
[۲] دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه زیست‌شناسی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

چکیده

امروزه استفاده از سیستم‌های CRISPR-Cas برای ویرایش و اصلاح ژنوم در گونه‌های مختلف میکروبی به طور گسترده مورد استفاده قرار می‌گیرند. سیستم‌های CRISPR-Cas که ابتدا به‌عنوان مکانیسم دفاعی باکتری‌ها در برابر عوامل مهاجم ویروسی شناسایی شدند، در طیف گسترده‌ای از گونه‌های میکروبی، از جمله باکتری‌ها و آرکئا، وجود دارند. این سیستم‌ها به دو کلاس اصلی تقسیم می‌شوند: کلاس ۱ که شامل مجموعه‌های پروتئینی چندزیرواحدی است، و کلاس ۲ که از طریق سیستم‌های پروتئین Cas تک واحدی مانند (Cas9) متمایز می‌شوند. انعطاف‌پذیری سیستم‌های CRISPR-Cas یکی از جذاب‌ترین ویژگی‌های آنها است. روشهای مختلف ویرایش ژنوم در سیستم‌های کلاس ۱ و ۲ نشان از انعطاف‌پذیری بالای این سیستم‌ها در تنوع مکانیسم‌های دفاعی آنها، که منجر به محافظت در برابر عفونت‌های ویروسی می شوند. علاوه بر آن سیستم‌های CRISPR-Cas در پایداری و یکپارچگی ژنوم باکتری‌ها و آرکئا نقش دارند. این سیستم‌ها اکنون ابزارهای ضروری در آزمایشگاه برای ژنومیک کارکردی، ویرایش دقیق ژنوم و برنامه‌ریزی هدفمند ژن هستند. آنها نقش کلیدی در زیست‌فناوری دارند و در مهندسی میکروارگانیسم‌ها و استفاده از آنها در تصفیه محیط‌زیست و تولید سوخت زیستی نقش ایفا می‌کنند. این سیستم‌ها علاوه بر آزمایشگاه در عرصه پزشکی نیز کاربرد دارند. تشخیص‌های مبتنی بر CRISPR امکان شناسایی سریع و دقیق عفونت‌ها و تغییرات ژنتیکی را فراهم آورده و به تشخیص زودهنگام بیماری‌ها کمک می‌کند. علاوه بر این، توسعه راهکارهای هدفمند ضدمیکروبی با استفاده از CRISPR نیز برای مقابله با میکروارگانیسم‌های مقاوم به دارو کاربرد وسیعی یافته است. در مجموع، سیستم‌های CRISPR-Cas به ابزاری کلیدی در مهندسی ژنوم میکروارگانیسم‌ها و توسعه راهکارهای نوین تشخیصی و درمانی در پزشکی تبدیل شده‌اند. در این مقاله مروری، داده‌ها با جست‌وجو در پایگاه‌های Springer، ScienceDirect، Scopus و John Wiley طی سال‌های ۲۰۱۸ تا ۲۰۲۵ و بر اساس واژه‌های کلیدی تعیین‌شده در سایت MeSH گردآوری و تحلیل شدند.

واژگان کلیدی: *CRISPR، مکانیسم دفاعی باکتریایی، بیوتکنولوژی میکروبی، ویرایش ژنوم .*

مقدمه

مطالعه سیستم‌های CRISPR–Cas از سال ۱۹۸۷ آغاز شد (۱)، هرچند عملکرد بیولوژیک آن در آن زمان شناخته‌شده نبود. در سال ۲۰۰۵، موجیکا و همکارانش نشان دادند که توالی‌های فاصله‌دار (spacer) در آرایه‌های CRISPR منشأ ویروسی یا پلاسمیدی دارند؛ این کشف زمینه‌ساز درک نقش دفاعی این سیستم در ایمنی باکتریایی شد (۲).

Jinek و همکارانش (۲۰۱۲)، CRISPR–Cas را به‌عنوان یک نوکلئاز هدایت‌شونده RNA معرفی کردند که امکان ویرایش هدفمند ژنوم را فراهم می‌سازد (۳). از آن زمان، کاربردهای CRISPRدر حوزه‌های درمانی، کشاورزی و تشخیصی گسترش یافته است؛ از جمله درمان بیماری‌های عصبی، اصلاح ژنوم گیاهان و مداخلات ضدسرطانی (۴). همچنین ابزارهای مبتنی بر CRISPR در توسعه روش‌های تشخیصی و واکنش به همه‌گیری‌های ویروسی، مانند SARS-CoV-2، نقش داشته‌اند

آدرس نویسنده مسئول: تهران، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، گروه زیست‌شناسی، بهاره نوروزی (**email**: bahare77biol@gmail.com)
ORCID ID: 0000-0001-6656-777X
تاریخ دریافت مقاله: ۱۴۰۴/۶/۳۱
تاریخ پذیرش مقاله: ۱۴۰۴/۹/۱۸

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2026-10-16]
[DOR: 20.1001.1.10235922.1405.36.3.2.9]
[DOI: 10.66224/iau.36.3.266]

(۵). باوجود کاربردهای متعدد CRISPR-Cas، در این مقاله مروری صرفا به کاربرد آنها در سیستم‌های میکروبی خواهیم پرداخت.

میکروب‌ها، شامل باکتری‌ها و آرکی‌ها، از دیرباز به دلیل اهمیت آنها در زیست‌شناسی، بوم‌شناسی و پزشکی، موضوع مطالعه علمی بوده‌اند. میکروب‌ها گروهی گسترده و متنوع از موجودات هستند که در اکوسیستم‌های مختلف نقش حیاتی دارند. آنها برای بیوریمدیاسیون، چرخه مواد مغذی و تولید آنزیم‌ها و آنتی‌بیوتیک‌های صنعتی ضروری هستند. علاوه بر این، برخی عفونت‌ها، مانند باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک، تهدید جدی برای سلامت انسان محسوب می‌شوند. درک نحوه عملکرد سیستم‌های CRISPR-Cas این میکروب‌ها از نظر علمی جذاب و از نظر کاربردی مفید است (۶).

سیستم‌های CRISPR-Cas در این میکروب‌ها نقش حیاتی در تعامل با مواد ژنتیکی خارجی و سازگاری محیطی دارند. بنابر این درک و کاربرد این فناوری برای گشودن رازهای ژنتیکی میکروبی و استفاده از پتانسیل CRISPR-Cas ضروری است. توسعه فناوری‌های مبتنی سیستم‌های CRISPR-Cas تحول عظیمی را در زیست‌شناسی مولکولی و ژنتیک ایجاد کرده است. این مکانیسم‌ها که در ابتدا در میکروارگانیسم‌ها شناسایی شدند، توانایی ما را برای کنترل دقیق DNA و بیان ژن به طور چشمگیری تغییر داده‌اند (۷). این مقاله مروری، ضمن بررسی تعاملات پیچیده بین میکروب‌ها و سیستم‌های CRISPR-Cas، به تحلیل نقادانه مطالعات موجود نیز می‌پردازد. بررسی منابع نشان می‌دهد که اگرچه در سال‌های اخیر پیشرفت چشم‌گیری در شناخت مکانیسم‌های مولکولی و کاربردی این سیستم‌ها حاصل شده است، اما شکاف‌های دانشی قابل توجهی همچنان وجود دارد. به‌ویژه، کارایی متفاوت سیستم‌های CRISPR در سویه‌های مختلف میکروبی، اثرات خارج از هدف (off-target effects) و پایداری بیان ژن‌های اصلاح‌شده در شرایط طبیعی کمتر مورد ارزیابی قرار گرفته‌اند. ازاین‌رو، مرور حاضر با هدف شناسایی این خلأهای پژوهشی و مقایسه نتایج مطالعات کلیدی، به تحلیل جامع نقش و چالش‌های CRISPR-Cas در زیست‌فناوری میکروبی می‌پردازد.

CRISPR-Cas امکان توسعه درمان‌ها و شیوه‌های درمانی پیشرفته پزشکی را فراهم کرده است. پتانسیل آن برای مقابله با مشکلات ژنتیکی ریشه دار، محققان را به بررسی کاربرد آن در ژن‌درمانی تشویق کرده است. میکروب‌ها نیز در این زمینه نقش دارند، زیرا می‌توانند به‌عنوان مکانیسم‌های انتقال برای هدف قراردادن سلول‌ها یا بافت‌های خاص عمل کنند. در نهایت، درک اثرات محیطی CRISPR-Cas در قلمرو میکروبی اهمیت زیادی دارد تا بتوانیم چالش‌هایی مانند آلودگی و تغییرات اقلیمی، تعاملات میکروارگانیسم‌ها با محیط و سازگاری آن‌ها با شرایط متغیر را بهتر درک کنیم. در ادامه، ابتدا ساختار و اجزای سیستم CRISPR-Cas معرفی می‌شود، سپس انواع و مکانیسم عملکرد آن بررسی شده و در نهایت، کاربردهای بیوتکنولوژیکی و چالش‌های پیش‌رو تحلیل می‌شوند.

در این مطالعه، مقالات مرتبط منتشرشده طی سال‌های ۲۰۱۸ تا ۲۰۲۵ با هدف گردآوری جدیدترین یافته‌ها درباره‌ی کاربرد سامانه‌های CRISPR-Cas در بیوتکنولوژی میکروبی مورد بررسی قرار گرفتند. جست‌وجو در پایگاه‌های اطلاعاتی Springer، ScienceDirect، Scopus و John Wiley انجام شد.

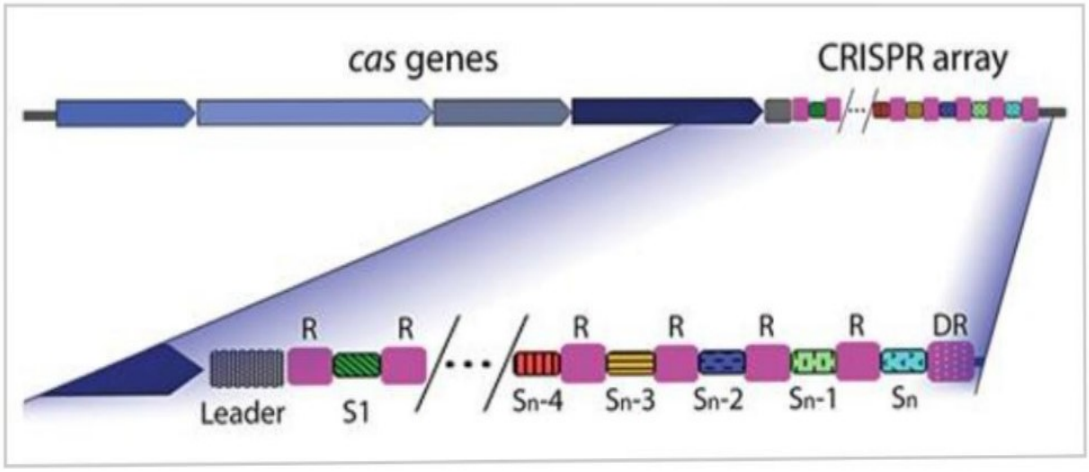
برای انتخاب دقیق منابع، از سایت MeSH جهت تعیین واژه‌های کلیدی مناسب استفاده شد. بر این اساس، ۴۵ مقاله‌ی مروری و پژوهشی جدید که مستقیماً به ساختار، عملکرد یا کاربرد این سامانه‌ها در میکروارگانیسم‌ها پرداخته بودند، انتخاب و تحلیل شدند.

ساختار CRISPR-Cas

ویروس‌ها به عنوان عوامل کلیدی تکامل حیات شناخته می‌شوند، چرا که نقش مهمی در تسهیل تبادل ژنتیکی ایفا می‌کنند. عفونت‌های باکتریوفاژی تأثیر قابل توجهی بر جمعیت باکتری‌ها دارند، به طوری که تخمین زده می‌شود روزانه ۲۰ تا ۴۰ درصد از باکتری‌ها در نتیجه این عفونت‌ها از بین می‌روند (۸). در پاسخ به این فشار تکاملی، باکتری‌ها مکانیسم‌های دفاعی متنوعی را برای شناسایی DNA خارجی و تمایز آن از DNA خودی تکامل داده‌اند .این مکانیسم‌ها پس از کسب DNA خارجی از طریق فرآیندهایی نظیر انتقال، همانندسازی و انتقال افقی ژن (Horizontal gene transfer-HGT) اهمیت فزاینده‌ای یافته‌اند. باکتری‌ها مکانیسم‌های دفاعی مختلفی دارند. در واقع بسیاری از باکتری‌ها و اکثر آرکئاها مکانیسم‌های خود-محافظتی مختلفی را برای مقابله با اسیدهای نوکلئیک مهاجم کسب کرده‌اند. از جمله آنها، سیستم ایمنی CRISPR-Cas از آرایه‌های CRISPR و ژن‌های cas مرتبط تشکیل شده است (۹).

تاکنون این سیستم در بیشتر از ۴۵ درصد باکتری‌ها و بیش از ۸۵ درصد آرکئاها شناسایی شده است. لوکوس‌های CRISPR در جایگاه‌های ژنومی گوناگونی یافت می‌شوند؛ آن‌ها می‌توانند هم در کروموزوم‌ها و هم در پلاسمیدها حضور داشته باشند (۱۰). لوکوس CRISPR-Cas معمولاً از یک اپرون شامل ژن‌های cas و

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2026-10-16]
[DOR: 20.1001.1.10235922.1405.36.3.2.9]
[DOI: 10.66224/iau.36.3.266]



شکل ۱. ساختار سیستم CRISPR-Cas. R تکرار، S اسپیسر، n تعداد کل اسپیسرها در آرایه. یک آرایه CRISPR می‌تواند حداقل از یک اسپیسر تشکیل شده باشد که توسط دو تکرار احاطه شده است. تکرار پایانی آرایه که معمولاً متحمل جهش شده و با سایر تکرارهای حفاظت‌شده متفاوت است، تکرار تحلیل‌رفته (Degenerated repeat–DR) نامیده می‌شود (۱۲).

یک آرایه CRISPR تشکیل شده است. آرایه CRISPR خود متشکل از یک سری توالی‌های تکراری حفاظت‌شده با توالی و طول مشخص (۲۵ تا ۳۵ جفت باز) است که توسط توالی‌های فاصله‌دار با طول‌های متفاوت (۲۶ تا ۷۲ جفت باز) از هم جدا شده‌اند. بسیاری از توالی‌های اسپیسر موجود در آرایه‌های CRISPR شباهت‌هایی به DNAعناصر ژنتیکی خارجی نظیر پلازمیدها و ژنوم‌های ویروسی نشان می‌دهند. این توالی‌های خارجی که اسپیسر ها از آنها مشتق شده اند، پروتواسپیسر (Protospacers) نامیده می‌شوند. پروتواسپیسرها که در طی عفونت‌های قبلی کسب شده‌اند، عناصر مهمی از سیستم ایمنی اکتسابی هستند، آنها موجب می‌شوند تا عفونت‌های بعدی شناسایی و از بین برده شوند (۱۱) (شکل ۱).

اکثر توالی‌های تکراری، ماهیت متقارن معکوس (پالیندرومیک) دارند که امکان تشکیل ساختارهای ثانویه پایدار (مانند ساختارهای سنجاق‌سری) را فراهم می‌سازد. این توالی‌های تکراری حفاظت‌شده، پس از رونویسی، RNAهایی با ساختارهای سنجاق‌سری پایدار تولید می‌کنند. لوکوس‌های CRISPR با حضور توالی‌های تکراری حفاظت‌شده مشخص می‌شوند؛ بااین‌حال، تنوعاتی در طول و توالی تکرارها میان لوکوس‌های مختلف CRISPR وجود دارد. توالی لیدر که یک توالی DNA غنی از آدنین و تیمین است، قبل از اولین تکرار هر آرایه CRISPR قرار دارد. پروتئین‌های Cas، اسپیسرهای جدیدی را که از عناصر ژنتیکی مهاجم (مانند ویروس‌ها و پلازمیدها) مشتق شده‌اند، درون آرایه CRISPR وارد می‌کنند. بنابراین، با بررسی توالی‌های اسپیسر در یک سویه/جدایه باکتریایی خاص، می‌توان تاریخچه مواجهه آن با عوامل مهاجم ژنتیکی را استنباط کرد. هم تعداد کل لوکوس‌های CRISPR و هم طول آنها متغیر هستند. برای مثال، گونه‌ای از آرکئا به نام *Methanocaldococcus* sp. FS406-22 دارای هجده لوکوس CRISPR است. برخی از این لوکوس‌ها ممکن است شامل صدها واحد تکرار-اسپیسر باشند. برخی از کوچک‌ترین ژنوم‌های میکروبی مانند *Nanoarchaeum equitans* چندین لوکوس CRISPR دارند؛ تعداد و طول این لوکوس‌ها با اندازه ژنوم مرتبط نیستند (۱۳).

ژن‌های cas، که معمولاً مجاور آرایه‌های CRISPR قرار دارند، پروتئین‌های کلیدی عملکردی را رمزگذاری می‌کنند. با گسترش توالی‌یابی ژنومی، تنوع ژن‌های cas بسیار افزایش یافته و طبقه‌بندی آن‌ها را پیچیده کرده است. اگرچه در ابتدایی‌ترین مطالعات چند ژن پایه مانند Cas1–Cas4 گزارش شدند، تاکنون بیش از ۹۰ ژن cas شناسایی شده‌اند که در ≈۴۵ خانواده پروتئینی دسته‌بندی می‌شوند. Cas1 و Cas2 به‌عنوان ژن‌های پایه در اغلب لوکوس‌ها شناخته شده‌اند و چندین ژن cas (برای مثال cas1–cas6) فراوانی گسترده‌ای نشان می‌دهند (۱۴).

مجموعه‌های لوکوس‌های CRISPR با پروتئین‌های Cas (CRISPR-associated proteins) تعامل دارند. این پروتئین‌ها بر اساس طبقه‌بندی‌های اولیه، نام‌گذاری‌های گوناگونی داشتند؛ به عنوان مثال، در *اشریشیا کلی*، این سیستم Cse1 (CRISPR System *Escherichia coli* gene 1) نام‌گذاری شد. زیرمجموعه‌های دیگر پروتئین‌های Cas بر اساس ارگانیسم‌های میزبان نیز شناسایی شدند که شامل Aeropyrum (Csa)، Desulfovibrio (Csd)، Haloarcula (Csh)، Mycobacterium

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2026-10-16]
[DOR: 20.1001.1.10235922.1405.36.3.2.9]
[DOI: 10.66224/iau.36.3.266]

جدول ۱. شش نوع سیستم CRISPR-Cas (۱۲)

Class	Type	Spacer acquisition	Pre-crRNA processing	crRNP	Signature protein	Ref
1	I	Cas1, Cas2, Cas4	Cas6(Cas5d for I-C)	Cascade		(18)
	III	Cas1, Cas2, RT	Cas6/Rnase E/ Rnase H	Csm/Cmr		(17)
	IV	Unknown	Csf5	Csf	Csf1	(18)
2	II	Cas1, Cas2, Cas4/Csn2	Rnase III, Cas9	Cas9	Cas9	(19)
	V	Cas1, Cas2, Cas4	Cas12	Cas12	Cas12	(20)
	VI	Cas1, Cas2	Cas13	Cas13	Cas13	(21)

(Csm)، Neisseria (Csn)، Thermotoga (Cst)، و Yersinia (Csy) بودند. بر اساس پیشنهاد طرح طبقه‌بندی جدید که مبتنی بر روابط تکاملی میان پروتئین‌های حفاظت‌شده و عملگر cas است، سیستم CRISPR-Cas به دو ماژول اصلی سازماندهی می‌شوند. ۱- ماژول سازگاری (Adaptation Module): این ماژول برای مرحله اکتساب اسپیسر ضروری است و عمدتاً نیازمند پروتئین‌های Cas1 و Cas2 است. ۲- ماژول اثرگذار (Effector Module): این ماژول مسئول پردازش رونوشت‌های اولیه (CRISPR (pre-crRNA)، فرایند تداخل (Interference) و در نهایت تخریب اسیدهای نوکلئیک خارجی (مانند DNA یا RNA ویروسی) است (۱۵).

همچنین، پروتئین‌های Cascade که برای پردازش crRNA ضروری هستند، در زیرمجموعه‌های مختلف CRISPR تفاوت‌هایی نشان می‌دهند؛ به طوری که برخی زیرمجموعه‌ها به چندین پروتئین برای این فرایند نیاز دارند، در حالی که برخی دیگر تنها از یک پروتئین چندکاره استفاده می‌کنند. بخش اعظم مجموعه‌های پروتئینی سیستم CRISPR-Cas در کلاس ۱ یافت می‌شوند. در این کلاس، ریبونوکلئوپروتئین‌هایی با مجموعه‌های اثرگذار از نظر فیلوژنتیکی مشابه در انواع I و III شناسایی شده‌اند. در مقابل، در سیستم کلاس ۲ که در انواع II، V و VI مشاهده می‌شود، تنها یک پروتئین مداخله‌گر وجود دارد. لازم به ذکر است که پردازش پیش-crRNA ظاهراً شامل چندین پروتئین دیگر است که حداقل یک موتیف شناسایی RNA با عملکرد نامشخص (RAMP) دارند (۱۶).

انواع و طبقه‌بندی سیستم‌های CRISPR-Cas

باتوجه‌به اینکه اغلب پروکاریوت‌ها از طریق انتقال افقی ژن (HGT)، لوکوس های متعدد CRISPR را کسب کرده‌اند و سیستم‌های CRISPR-Cas نیز تنوع بسیار بالایی از پروتئین‌های Cas را به نمایش می گذارند، طبقه‌بندی ساده این سیستم‌های ایمنی دشوار است. بااین‌حال، سیستم‌های CRISPR-Cas تاکنون در دو کلاس اصلی و شش نوع، که هر کدام شامل چندین زیرمجموعه هستند، طبقه‌بندی شده‌اند. این طبقه‌بندی بر اساس معماری منحصربه‌فرد ماژول‌های اثرگذار انجام می‌گیرد:

- کلاس ۱: شامل انواع I، III و IV است. در این کلاس، مجموعه‌های اثرگذار crRNA چندواحدی هستند، به این معنی که چندین پروتئین با هم برای انجام وظایف اثرگذار عمل می‌کنند.
- کلاس ۲: شامل انواع II، V و VI است. در سیستم‌های این کلاس، یک پروتئین واحد (مانند Cas9) تمام وظایف مجموعه اثرگذار را بر عهده دارد (جدول ۱).

ماژول‌های بیان، تداخل و سازگاری در سیستم‌های CRISPR-Cas تفاوت‌های قابل توجهی با یکدیگر دارند. اگرچه بیشتر پروکاریوت‌ها تنها یک نوع سیستم CRISPR-Cas را دارا هستند، اما تنوع‌هایی نیز در این زمینه مشاهده می‌شود. جالب توجه است که سیستم‌های CRISPR-Cas کلاس ۱ به عنوان سیستم‌های تکاملی اجدادی در نظر گرفته می‌شوند (۱۷).

سیستم‌های کلاس ۲ CRISPR–Cas در نتیجه‌ی ظهور عناصر قابل‌انتقال رمزگذارنده‌ی نوکلئازهای متمایز از سیستم‌های کلاس ۱ منشأ گرفته‌اند و امروزه به‌عنوان ابزارهای توانمند ویرایش ژنوم شناخته می‌شوند. در میان این سامانه‌ها، پروتئین Cas3 به‌عنوان عنصر مشترک در تمامی سیستم‌های نوع I حضور دارد و نقش کلیدی در عملکرد آن‌ها ایفا می‌کند. سیستم‌های نوع I بر اساس تفاوت در تعداد و تنوع ژن‌های *cas* به شش زیرکلاس (I-A تا I-F) تقسیم می‌شوند. در تمامی این زیرکلاس‌ها، ژن‌های *cas1*، *cas2* و *cas3* در قالب مجموعه‌ای شبه‌آبشاری (Cascade complex) کدگذاری می‌شوند که وظیفه‌ی شناسایی هدف، اکتساب اسپیسر (spacer acquisition) و پردازشcrRNA را بر عهده دارد. سیستم‌های نوع I-A دارای مجموعه‌ی آبشار اختصاصی حاوی Cas3 هستند که کارکردی کلیدی در مرحله‌ی مداخله (interference) دارند (۱۸-۲۱).

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2026-10-16]
[DOR: 20.1001.1.10235922.1405.36.3.2.9]
[DOI: 10.66224/iau.36.3.266]

سیستم‌های CRISPR-Cas نوع II پروتئین‌های Cas1، Cas2، Cas9 و در برخی موارد Csn2 یا Cas4 را کدگذاری می‌کنند. Cas9 به عنوان یک پروتئین کلیدی در این سیستم، نقش حیاتی در برش DNA هدف و پردازش crRNAدارد. این نوع به سه زیرگروهII-A ، II-B و II-C تقسیم می‌شود که در زیرگروه II-C ژن‌های *Csn2* و *Cas4* حضور ندارند (۱۸).

در سیستم‌های نوع III، پروتئین Cas10 نقش مرکزی دارد. بیشتر پروتئین‌های Cas در این سیستم‌ها به‌صورت مجموعه‌های آبشارمانند سازمان یافته‌اند، مانند مجموعه Csmدر نوع III-A و Cmr در نوع III-B. تفاوت کلیدی سیستم‌های CRISPR–Cas در نوع اسید نوکلئیک هدف آن‌هاست؛ در حالی‌که سیستم‌های نوع I و II به‌طور اختصاصی DNA را هدف قرار می‌دهند، نوع III قادر به شناسایی و برش هر دو مولکول DNA و RNA است. سیستم‌های نوع I و III در باکتری‌ها و آرکئا مشاهده می‌شوند، اما نوع II تنها در باکتری‌ها وجود دارد.

سیستم‌های نوع III در باکتری‌ها و آرکئا حضور دارند و از چندین زیرواحد کوچک Cas11 (Csm2 یا Cmr5) و پروتئین Cas7 تشکیل شده‌اند. این مجموعه با برخورداری از سه فعالیت نوکلئازی متمایز (برش اختصاصی DNA/RNA، برش غیراختصاصی ssDNA و عملکردهای تنظیمی دیگر)، توان دفاعی دوگانه‌ای در برابر مهاجمان ژنتیکی ایجاد می‌کند. پس از برش RNA هدف، پروتئین Cas7 به‌عنوان سوئیچ مولکولی عمل کرده و فعالیتDNase پروتئین Cas10 را تنظیم می‌کند. بر اساس گزارش‌ها، این سامانه قابلیت سازگاری با جهش‌های ناحیه پروتواسپیسر را دارد و از فرار ژنتیکی فاژها جلوگیری می‌کند (۲۲). افزون بر این، مطالعهZhou و همکاران (۲۰۱۸) ساختار و عملکرد این سامانه را تشریح کرده و نشان داده است که ویژگی‌های منحصربه‌فرد آن زمینه‌ساز کاربردهای گسترده‌ای در زیست‌فناوری از جمله خاموش‌سازی ژن (gene silencing)، ویرایش ژنوم و مهندسی ژنتیک است (۲۳) (جدول ۲).

مکانیسم عمل سیستم CRISPR-Cas

فرایند دفاعی سیستم CRISPR-Cas در پروکاریوت‌ها از سه مرحله اصلی تشکیل شده است: سازگاری (Adaptation)، بیان (Expression) و مداخله (Interference). مرحله سازگاری تنها زمانی فعال می‌شود مرحله سازگاری هنگامی فعال می‌شود که سلول با DNA خارجی (مثلاً فاژ یا پلاسمید) مواجه شود و طی آن پروتواسپِیسرها انتخاب و به آرایه CRISPR افزوده می‌شوند. مراحل بیان و مداخله هر بار که عامل مهاجم حاضر باشد رخ می‌دهند؛ در مرحله مداخله، crRNA همراه با مجموعه Cas هدف را از طریق تطابق با پروتواسپِیسر شناسایی کرده و تخریب می‌نماید. توالی‌های PAM و موتیف‌های مجاور پروتواسپِیسر در تشخیص صحیح نقش حیاتی دارند. این مرحله توسط پروتئین‌های ترمیم سلولی که آرایه CRISPR را بازسازی می‌کنند، انجام می‌شود. لازم به ذکر است که

جدول ۲. مقایسه اجمالی انواع سیستم‌های CRISPR-Cas از نظر ترکیب پروتئینی، نوع مولکول هدف، و ویژگی‌های کلیدی.

نوع سیستم	مولکول هدف	پروتئین (Cas) کلیدی	ویژگی برجسته	مزایا	محدودیت‌ها	منبع
CRISPR-Cas9 (Type II)	DNA	Cas9	شایع‌ترین و پرکاربردترین سیستم ویرایش ژن	کارایی بالا، دقت مناسب، کاربرد گسترده در باکتری‌ها و یوکاریوت‌ها	احتمال اثرات خارج از هدف، خاص PAM نیاز به	(۳)
CRISPR-Cas12a (Cpf1, Type V)	DNA	Cas12a	تک‌جهتی و DNA برش ایجاد انتهای چسبنده	کوتاه‌تر، ایجاد gRNA نیاز به برش تمیزتر	کمتر مطالعه شده در باکتری‌های گرم مثبت	(۲۴)
CRISPR-Cas13 (Type VI)	RNA	Cas13a, Cas13b	توانایی هدف‌گیری RNA	مفید برای خاموش‌سازی ژن و تشخیص مولکولی	محدودیت در ویرایش ژنوم، پایداری کمتر در محیط‌های طبیعی	(۲۵)
CRISPR-Cas3 (Type I)	DNA	Cas3	فعالیت نوکلئازی قوی با برش طولانی	توانایی حذف قطعات بزرگ DNA	دشواری کنترل دقیق بر محل برش	(۱۸)
CRISPR-Cas10 (Type III)	DNAو RNA	Cas10	عملکرد ترکیبی DNA/RNA-targeting	مناسب برای دفاع در برابر ویروس‌ها و فاژها	پیچیدگی عملکرد و نیاز به پروتئین‌های متعدد	(۲۲)

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2026-10-16]
[DOR: 20.1001.1.10235922.1405.36.3.2.9]
[DOI: 10.66224/iau.36.3.266]

ترانس‌کریپتاز معکوس، که عمدتاً به پروتئین Cas1 همراه است، امکان اکتساب اسپیسر از RNA (رونوشت‌های ژنوم DNA یک عنصر ژنتیکی متحرک از طریق رونویسی معکوس) را فراهم می‌کند. اکثر سیستم‌های CRISPR-Cas دارای طول اسپیسرهای بسیار ثابت و اختصاصی برای خود سیستم هستند، تنها استثنای قابل توجه در این زمینه سیستم CRISPR نوع III است که طول اسپیسرهای متغیری را نشان می‌دهد (۲۶).

برای جلوگیری از هم‌ترازی (Alignment) نادرست در محل اتصال هدف crRNA، توالی PAM (Protospacer Adjacent Motif) که در پایین‌دست سوبسترای پیش‌اسپیسر قرار دارد، ادغام اسپیسرهای جدید را در آرایه CRISPR امکان‌پذیر می‌سازد. کمپلکس Cas1-Cas2 نقش اصلی را در واسطه‌گری این مکانیسم ایفا می‌کند. در این فرآیند، آرایه CRISPR در محل اتصال پیش‌رونده-تکرار (Leader-Repeat Junction) برش خورده و اسپیسر ورودی توسط پروتئین Cas1 بین رشته‌های تکرار الحاق می‌شود. این فرآیند نیک‌زنی (Nicking) و اتصال (Ligation) هماهنگ، شباهت زیادی به یک واکنش معمول اینتگراز (Integrase) دارد (۲۷). این شباهت با فعالیت اینتگرازی پیش‌بینی‌شده برای پروتئین Cas1 همخوانی دارد. پس از بارگذاری اسپیسر جدید، کمپلکس Cas1–Cas2 دو فرآیند برش-اتصال را کاتالیز می‌کند: برش اول در انتهای پیش‌رونده (Leader End) اولین تکرار و برش دوم در انتهای تکرارِ اسپیسر رخ می‌دهد. علاوه بر این، پروتئین‌های غیر-Cas دخیل در ترمیم DNA نیز برای فرآیند اکتساب اسپیسر ضروری هستند. این پروتئین‌ها از طریق تعامل Cas1 با اجزای کلیدی سیستم ترمیم، مانند RecB، RecC وRuvB، به این فرآیند کمک می‌کنند (۲۸).

اسپیسر پس از ورود، به پیش-crRNA (pre-crRNA) که پیش‌ساز RNA کریسپر است، رونویسی می‌شود. در مرحله دوم، این پیش-crRNA به crRNA بالغ (Mature crRNA) پردازش می‌گردد. تصور بر این است که توالی اسپیسر بیان‌شده‌ای که crRNA ارائه می‌دهد، پروتواسپیسر هدف خاص را شناسایی کرده و مجموعه Cas را به سمت آن هدایت می‌کند. پردازش پیش-crRNA در مرحله بیان توسط مجموعه‌ای اختصاصی از پروتئین‌های Cas، یک نوکلئاز پردازشی خاص (مانند Cas6)، یک پروتئین Cas بزرگ منفرد، یا یک RNase خارجی به crRNA بالغ انجام می‌شود (۲۹).

در مرحله سوم، یعنی مداخله (Interference)، اسید نوکلئیک خارجی توسط crRNAو پروتئین‌های Cas شناسایی و حذف می‌شود. مجموعه crRNA-Casپروتواسپیسر مکمل خود را یافته و باعث تخریب هدف توسط برخی نوکلئازهای Cas می‌گردد. در صورتی که تطابقی بین DNAخارجی و اسپیسر CRISPRوجود نداشته باشد، رونوشت اسپیسر قادر به خنثی‌سازی توالی DNAنخواهد بود. از سوی دیگر، این عدم تطابق می‌تواند منجر به تکثیر فاژ درون سلول و در نهایت لیز باکتری و مرگ آن شود (۳۰).

تنظیم بیان ژن و دفاع ضد-CRISPR (Anti-CRISPR)

باکتری‌های بیماری‌زا در طول چرخه عفونت خود با تنش‌های گوناگون و حضور عناصر DNA خارجی مواجه می‌شوند، بنابراین انتظار می‌رود که به مکانیسم‌های دفاعی مؤثری نظیر CRISPR-Cas متکی باشند. سیستم CRISPR-Cas تولید ژن‌های ویرولانس را تنظیم کرده و به عنوان یک پاسخ تنشی منحصر به فرد توسط عوامل بیماری‌زا عمل می‌کند. اکثر باکتری‌های مسئول عفونت‌های بیمارستانی قادر به تشکیل بیوفیلم هستند، که این توانایی برای ویرولانس و مقاومت دارویی آن‌ها حیاتی است. سویه‌های CRISPR-Cas مثبت در باکتری‌هایی نظیر *Pseudomonas aeruginosa* و *Enterococcus faecalis* ظرفیت بالایی برای تشکیل بیوفیلم از خود نشان داده‌اند (۳۱).

در برخی باکتری‌ها، از جمله *Serratia marcescens*، *P. aeruginosa* و *Clostridium difficile*، حسگری حد نصاب (Quorum Sensing) می‌تواند بیان ژن‌های CRISPR-Cas را تحریک کند. مطالعات بر روی *Acinetobacter baumannii* نیز نشان داده‌اند که برخی ژن‌های دخیل در توسعه بیوفیلم تقریباً به طور انحصاری در سویه‌های غنی از سیستم‌های CRISPR-Casیافت می‌شوند. در *Streptococcus mutans*، حذف ژن *cas3* بر تشکیل بیوفیلم تأثیر می‌گذارد. همچنین، *P. aeruginosa* از ژن *cas3* برای افزایش تولید پروتئین‌های ویرولانس استفاده می‌کند تا از شناسایی توسط سیستم ایمنی میزبان فرار کند. علاوه بر این، ژن *cas2* برای عفونت درون‌سلولی در *Legionella pneumophila* ضروری است. با این حال، نقش پیچیده سیستم‌های CRISPR-Cas در ویرولانس عوامل بیماری‌زای مهم هنوز به طور کامل شناخته شده نیست. با وجود ارتباط مثبتی که بین حضور ژن‌های *cas* و افزایش فاکتورهای ویرولانس مشاهده شده، فعالیت

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2026-10-16]
[DOR: 20.1001.1.10235922.1405.36.3.2.9]
[DOI: 10.66224/iau.36.3.266]

CRISPR-Casنه ضروری و نه کافی برای افزایش ویرولانس است (۳۲).

همواره بین باکتریوفاژها و باکتری‌ها یک نبرد تکاملی در جریان است. فاژها به طور مداوم استراتژی‌های جدیدی را برای فرار یا غلبه بر مکانیسم‌های دفاعی باکتری‌ها توسعه می‌دهند، در حالی که باکتری‌ها نیز به نوبه خود راه‌های جدیدی برای بقا پیدا می‌کنند. دفاع باکتری‌ها در برابر باکتریوفاژها شامل دو دسته اصلی است:

۱. **ایمنی ذاتی:** این نوع ایمنی به طور طبیعی در تمام باکتری‌ها وجود دارد و یک خط دفاعی عمومی را فراهم می‌کند.

۲. **ایمنی اکتسابی:** این نوع ایمنی توسط سیستم تطبیق‌پذیر CRISPR-Cas ایجاد می‌شود که دفاعی هدفمند و حافظه‌محور را ارائه می‌دهد.

با وجود اینکه سیستم CRISPR-Cas به طور قابل توجهی احتمال تهاجم فاژ را کاهش می‌دهد، اما ایمنی ذاتی به تنهایی چندان مؤثر نیست. در نتیجه، فاژها نیز در پاسخ به این سیستم‌های دفاعی، مکانیسم‌هایی را برای مقابله با آن‌ها تکامل داده‌اند. یکی از مهم‌ترین این مکانیسم‌ها، کدگذاری پروتئین‌هایی به نام پروتئین‌های ضد-CRISPR (Anti- CRISPR Proteins - Acr) است که قادرند سیستم CRISPR-Cas را غیرفعال کنند.

ژن‌های پروتئین‌های ضد-CRISPR (Acr) برای اولین بار در فاژهایی کشف شدند که باکتری *P. aeruginosa* را آلوده می‌کنند؛ باکتری‌ای که مجهز به سیستم CRISPR نوع I-F است. تاکنون، پروتئین‌هایی شناسایی شده‌اند که قادر به غیرفعال‌سازی انواع مختلف سیستم‌های CRISPR شامل I-C، I-D، I-E، I-F، II-A، II-C، V-A و VI-B هستند (۳۳).

اخیراً، مشخص شده است که برخی باکتریوفاژها ممکن است ساختاری شبیه به نوکلئاز ایجاد کنند. این ویژگی به آن‌ها کمک می‌کند تا از شناسایی توسط سیستم‌های CRISPR-Casهدف‌گیرنده DNAفرار کنند، اما در عین حال آن‌ها را در برابر سیستم‌های CRISPR-Cas هدف‌گیرنده RNA آسیب‌پذیر می‌سازد. تمرکز عمده تحقیقات اخیر بر یافتن پروتئین‌هایی است که می‌توانند مکانیسم ویرایش ژنوم CRISPR-Cas9 را غیرفعال کنند. هدف اصلی این تحقیقات، کشف روش‌هایی برای خاموش کردن کنترل‌شده سیستم CRISPR-Cas9است. این ضرورت از آنجا ناشی می‌شود که هرچند CRISPR-Cas9قدرتمندترین ابزار شناخته‌شده برای ویرایش ژن است، فعالیت غیرانتخابی یا خارج از هدف آن در طول زمان می‌تواند موجب نگرانی‌هایی شود که نیاز به کنترل دقیق‌تری دارد. (۳۳).

کاربرد های سیستم CRISPR-Cas

کاربردهای بیوتکنولوژیکی

در سال‌های اخیر، دامنه پژوهش‌های مربوط به کاربردهای سیستم CRISPR-Cas از سطح آزمایشگاهی فراتر رفته و به حوزه‌های کلینیکی و صنعتی نیز گسترش یافته است. با این حال، مرور مطالعات مختلف نشان می‌دهد که بسیاری از پژوهش‌ها تنها بر قابلیت حذف یا سرکوب ژن‌های بیماری‌زا تمرکز دارند و کمتر به پیامدهای اکولوژیکی، پایداری ژنتیکی و خطر انتقال افقی ژن‌های اصلاح‌شده پرداخته‌اند. به عنوان مثال، در حالی که نتایج Gomaa و همکاران (۲۰۱۴) نشان‌دهنده حذف موفق *E. coli* با CRISPR-Cas9 است (۳۴)، مطالعات بعدی مانند Kiga و همکاران (۲۰۲۰) اثربخشی متفاوتی را در باکتری‌های گرم مثبت گزارش کرده‌اند. بنابراین، تحلیل مقایسه‌ای این مطالعات بیانگر ضرورت استانداردسازی روش‌ها و ارزیابی جامع‌تر اثرات جانبی در گونه‌های میکروبی گوناگون است (۳۵). محققان پیش از این دریافته بودند که هدف قراردادن خود سیستم CRISPR باعث کشتن باکتری‌ها می‌شود. پس از بررسی سیستم های CRISPR در موجودات مختلف، کشف کردند که "هدف گیری خودی (Self-targeting)" در ~18 درصد از تمامی گونه های دارای CRISPR اتفاق می افتد. بر اساس این یافته، پیشنهاد شد که با مهندسی لوکوس‌های CRISPR (نواحی کروموزومی مرتبط با سیستم CRISPR) برای هدف قرار دادن مناطق کروموزومی مرتبط با بیماری‌زایی یا مقاومت آنتی‌بیوتیکی، می‌توان از سیستم‌های CRISPR-Cas برای مبارزه با عفونت‌های باکتریایی بهره برد (۳۶). که این امر خود موجب حذف سویه‌های باکتری خاص از جمعیت‌های مخلوط می شود و محققان توانستند سویه‌های *Escherichia coli* را از جمعیت مخلوط جدا کنند و این امر افق‌های جدیدی را برای توسعه آنتی‌بیوتیک‌های "هوشمند" گشود که قادر به تمایز میان میکروب‌های مفید و مضر هستند. ساختارهای CRISPR-Cas3 و CRISPR-Cas9 می‌توانند به گونه‌ای مهندسی شوند که ژن‌های خاص مرتبط با ویرولانس (حدت بیماری‌زایی) را هدف قرار دهند و قابلیت مبارزه با ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی را داشته باشند. علاوه بر این کپسیدهای آنتی‌باکتریال مبتنی بر CRISPR-Cas13a، قادر به شناسایی و

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2026-10-16]
[DOR: 20.1001.1.10235922.1405.36.3.2.9]
[DOI: 10.66224/iau.36.3.266]

نابودی ژن‌های مقاومت آنتی‌میکروبی هستند و می‌توانند به‌عنوان ابزارهای تشخیصی و درمانی استفاده شوند. محققان بر این باورند که این فناوری می‌تواند به تغییر جوامع میکروبی، از جمله میکروبیوم انسان مرتبط با بیماری‌های مختلف، کمک کند. تکنیک ویرایش ژنوم قابل‌برنامه‌ریزی با RNA، مبتنی بر اندونوکلئاز Cas9 که توسط Jinek و همکاران (2012) معرفی شد، به سرعت مورد پذیرش گسترده قرار گرفت (۳).

در مجموع سیستم‌های CRISPR-Cas به طور مؤثری در هدف قرار دادن و حذف میکروارگانیسم‌های مضر عمل کرده اند. موفقیت در جداسازی سویه‌های باکتریایی منفرد از جمعیت‌های مخلوط *E. coli*، راه را برای توسعه آنتی‌بیوتیک‌های هوشمند هموار ساخت. این آنتی‌بیوتیک‌ها قادر خواهند بود میان میکروب‌های مفید و مضر تمایز قائل شده و از بروز مقاومت آنتی‌بیوتیکی جلوگیری کنند. همانطور که Gomaa و همکاران در سال 2014 نشان دادند، سازه‌های CRISPR-Cas3و CRISPR-Cas9 ابزارهای قدرتمندی در این زمینه محسوب می‌شوند. این سیستم‌ها را می‌توان به گونه‌ای مهندسی کرد که ژن‌های خاص بیماری‌زایی را هدف قرار داده و عفونت‌ها را مهار کنند، یا با هدف قرار دادن ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی، با مقاومت دارویی مبارزه کنند (۳۴).

با این حال، لازم به ذکر است که هرچند این رویکرد برای هدف قرار دادن ژن‌های موجود در کروموزوم باکتری‌ها به خوبی عمل می‌کند، اما در حال حاضر برای ژن‌های بیماری‌زایی که بر روی پلاسمیدها کدگذاری شده‌اند، مناسب نیست. تحقیقات در این زمینه همچنان در حال پیشرفت است تا بر این چالش‌ها نیز غلبه شود. اخیراً، نوکلئوکپسیدهای ضدباکتریایی مبتنی بر CRISPR-Cas13a توسعه یافته اند که قابلیت شناسایی و تخریب ژن‌های مقاومت ضدمیکروبی را در میکروب‌های مقاوم دارند. سازه‌هایی به نام Capsida، که از قراردادن سیستم CRISPR-Cas13 قابل برنامه‌ریزی *Leptotrichia shahii* درون یک کپسید باکتریوفاژ ایجاد شده‌اند، توانایی RNase وابسته به توالی هدف را از خود نشان داده‌اند. به گفته kiga و همکاران ۲۰۲۰ این سیستم ها نه تنها به عنوان ابزارهای تشخیصی برای شناسایی ژن‌های مقاومت باکتریایی پیشنهاد شده‌اند، بلکه پتانسیل بالایی به عنوان داروهای درمانی علیه بیماری‌های باکتریایی نیز دارند. یکی از جذاب‌ترین جنبه‌های این سیستم‌های CRISPR-Cas اصلاح‌شده، توانایی آن‌ها در تمایز قائل شدن بین باکتری‌های بیماری‌زا و باکتری‌های همزیست است. این فناوری ممکن است به ما کمک کند تا جوامع میکروبی، از جمله میکروبیوم انسانی که با بسیاری از بیماری‌ها مرتبط است، را به دقت تنظیم و تعدیل کنیم (۳۵).

با این حال، باگذشت زمان و تحت فشار انتخابی ناشی از استفاده گسترده از CRISPR به‌عنوان عوامل ضدمیکروبی، احتمال ظهور مقاومت نیز وجود دارد. این مقاومت می‌تواند به دلیل ژن‌های ضد-CRISPR (Acr) باشد که پیش‌تر مورد بحث قرار گرفت. پیشرفت در فناوری ویرایش ژن، امکان هدف قراردادن دقیق و متنوع نقاط مختلف ژن‌های مرتبط با بیماری‌زایی را فراهم کرده است. به عنوان مثال، Gong وهمکاران (2018) نشان دادند که تغییر دقیق در ژن گلوکوزید ترانسفراز منجر به کاهش تولید اگزوپلی‌ساکارید و در نتیجه، تضعیف ظرفیت تشکیل بیوفیلم در باکتری *S. Mutans* (عامل اصلی پوسیدگی دندان) شد. این مثال و موارد مشابه نشان می‌دهند که می‌توان ضدمیکروب‌هایی با دامنه عملکردی بسیار خاص را با استفاده از فناوری CRISPR-Cas طراحی و توسعه داد (۳۷). مطالعات اخیر نشان داده‌اند که تحویل مؤثر نوکلئازهای راهنمای RNA یعنی سیستم‌های (CRISPR-Cas) که مناطق خاصی از DNA را هدف قرار می‌دهند، می‌تواند بقای مدل عفونت *Galleria mellonella* را افزایش دهد. این یافته‌ها، پتانسیل CRISPR را در مبارزه با عفونت‌ها برجسته می‌سازند (۳۸).

با پیشرفت در فناوری ویرایش ژنوم، شاهد توسعه سیستم‌های ویرایش پایه جدید و بهبود تکنیک CRISPR-Cas9 هستیم. این نوآوری‌ها امکان می‌دهند که یک ژن هدف، تنها با تغییر یک باز (باز سیتی‌دین) توسط ویرایشگر پایه غیرفعال شود که این تغییر منجر به ایجاد یک کدون توقف زودهنگام در توالی ژن و در نتیجه، از کار افتادن پروتئین مربوطه می‌شود. اصلاح ژنتیکی با کارایی بالا در گونه‌های مختلف باکتری، به ویژه *سودوموناس*، به طور قابل توجهی مطالعات در زمینه‌های گوناگون از جمله فیزیولوژی باکتریایی، کشف اهداف درمانی جدید و مهندسی متابولیک را تسریع بخشیده است. این پیشرفت‌ها، مسیرهای جدیدی را برای تحقیقات و کاربردهای بیوتکنولوژیکی باز می‌کنند. علاوه بر قابلیت‌های ویرایش ژنوم، سیستم CRISPR امکان سرکوب انتخابی بیان ژن را در سلول‌های پروکاریوتی و یوکاریوتی فراهم آورده است. این رویکرد که با عنوان CRISPRi (CRISPR interference) شناخته می‌شود، نوعی اختلال ژنتیکی است. به عنوان مثال، با سرکوب ژن *luxS* که آنزیم سنتتاز را در مراحل اولیه تشکیل بیوفیلم کد می‌کند، تکنیک CRISPRi توانست از تشکیل بیوفیلم باکتریایی در *E. coli* جلوگیری کند. کشف

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2026-10-16]
[DOR: 20.1001.1.10235922.1405.36.3.2.9]
[DOI: 10.66224/iau.36.3.266]

دستورالعمل‌هایی برای تحویل هدفمند سرکوب‌کننده‌های رونویسی (CRISPRi) و فعال‌کننده‌ها (CRISPR activation ((CRISPRa) به ژن‌های بومی، با استفاده از Cas9 دارای کمبود اندونوکلئاز (یعنی Cas9 که توانایی برش DNA را از دست داده است)، افق‌های جدیدی را در این زمینه گشود. این پیشرفت، امکان دستکاری دقیق‌تر و کنترل‌شده‌تر بیان ژن را فراهم می‌کند (۳۹).

فن‌آوری‌های CRISPR-Cas یک جایگزین جذاب برای ضد میکروب‌های قابل برنامه‌ریزی و توالی خاص ارائه می‌دهند. این سیستم‌ها با موفقیت برای هدف قرار دادن عوامل حدت (فاکتورهای ویرولانس) و ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی در باکتری‌ها مورد استفاده مجدد قرار گرفته‌اند (۴۰). در سلول‌های یوکاریوتی، پدیده خودهدف‌گیری با استفاده از فناوری‌های مبتنی بر CRISPR بیشتر به سمت ویرایش ژنوم سوق یافته است. تنظیم هدفمند ژن به طور فزاینده‌ای برای تأثیرگذاری بر بیان ژن در سلول‌های انسانی به منظور پزشکی ترمیمی، بازبرنامه‌ریزی ژنتیکی، و درمان سلولی و ژنی استفاده می‌شود. این کاربردها، پتانسیل عظیم CRISPR را در پزشکی و بیوتکنولوژی نشان می‌دهند. علاوه بر کاربرد در عفونت‌های باکتریایی، پیشنهاد شده است که سیستم CRISPR-Cas می‌تواند در درمان عفونت‌های ویروسی نیز مورد استفاده قرار گیرد. در همین راستا، CRISPR-Cas9 برای هدف قرار دادن ویروس‌های DNA انسانی طراحی شده است؛ از جمله ویروس‌هایی نظیر هپاتیت B (HBV)، پاپیلوما ویروس انسانی (HPV) و ویروس اپشتین بار (EBV).

با این حال، CRISPR-Cas9 در درمان عفونت‌های ناشی از رتروویروس‌ها ناکارآمد است. دلیل این امر این است که Cas9 قادر به تعامل مستقیم با RNA نیست. با توجه به همه‌گیری کووید-19 که توسط رتروویروس SARS-CoV-2 ایجاد شد، تحقیقات گسترده‌ای در زمینه CRISPR بر توسعه سیستمی متمرکز شده است که بتواند RNA را برای درمان این نوع بیماری‌ها هدف قرار دهد. بر اساس تحقیقات اخیر، پروتئین‌های Cas13، شامل Cas13d و Cas13a، می‌توانند RNAرا هدف قرار دهند. این پروتئین‌ها نه تنها تأثیری بر رونوشت‌های RNA انسانی ندارند، بلکه از نظر بیولوژیکی نیز بی‌ضرر در نظر گرفته می‌شوند. این ویژگی‌ها، Cas13 را به ابزاری امیدبخش برای مبارزه با عفونت‌های ویروسی RNA تبدیل کرده است. با توجه به شیوع بیماری کووید-19، اهمیت سیستم‌های CRISPR-Cas در مقابله با ویروس‌ها بیش از پیش مورد توجه قرار گرفته است. Abbott و همکاران (2020) ادعا کرده‌اند که روشی را طراحی کرده‌اند که قادر است بیش از ۹۰ درصد از کروناویروس‌ها را هدف قرار دهد. نکته حائز اهمیت این است که این روش به راحتی می‌تواند به سویه‌های جدیدی که در آینده ممکن است منجر به همه‌گیری شوند، تعمیم یابد. با در نظر گرفتن این همه‌گیری و نیاز به نظارت بر بیماری، این مورد به عنوان یکی دیگر از کاربردهای بالقوه و مهم سیستم‌های CRISPR-Cas مطرح می‌شود (۴۱).

در کنار سایر ویروس‌های RNA، چندین روش تشخیصی برای SARS-CoV-2 در جدیدترین انتشارات تحقیقاتی پیشنهاد شده است (۴۲). ازجمله این روشها، SHERLOCK (Specific High-sensitivity Enzymatic Reporter unlocking) است که مخفف "آزادسازی گزارشگر آنزیمی با حساسیت ویژه" است که توسط Kellner و همکاران در سال 2019 توسعه یافت. این ابزارها نشان‌دهنده پتانسیل CRISPR در تشخیص سریع و دقیق پاتوژن‌ها هستند (۴۳).

کاربردهای زیست‌پزشکی CRISPR-Cas و ویرایش ژنوم میکروبی در سلامت انسان

استفاده نوآورانه از روش‌های ویرایش ژنوم میکروبی و سیستم‌های CRISPR-Cas پیشرفت چشمگیری در تحقیقات زیست‌پزشکی ایجاد کرده است. این فناوری‌ها گزینه‌های متعددی را برای مقابله با چالش های گوناگون سلامت انسان فراهم می کنند. حوزه ویرایش ژنوم با ظهور سیستم‌های CRISPR-Cas، دستخوش یک تحول پارادایمی شده است. سیستم CRISPR-Cas9 که با کار پیشگامانه Charpentier و Doudnaدر سال 2014 عملی شد، اکنون امکان اصلاحات دقیق DNA را فراهم می‌کند (۴۴). این فناوری نوآورانه، که توسط توالی‌های RNA راهنما قابل برنامه‌ریزی و تغییر است، ابزاری انعطاف‌پذیر را در اختیار دانشمندان قرار می‌دهد تا مناطق خاصی از ژنوم را دستکاری کنند. این قابلیت، پتانسیل تصحیح نقص‌های ژنتیکی مسبب طیف گسترده‌ای از بیماری‌ها را در بر دارد. محققان نشان داده‌اند که با استفاده از نوکلئاز هدایت‌شونده توسطRNA ، امکان ویرایش دقیق DNA وجود دارد که می‌تواند به پیشرفت‌های قابل توجهی در حوزه سلامت انسان منجر شود.

در زمینه توسعه دارو، نیاز مبرمی به آنتی‌بیوتیک‌ها و داروهای ضدویروسی نوآورانه وجود دارد تا با باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک و تهدیدات ویروسی جدید مقابله شود. Heler و همکاران (2017) تأکید کردند که سیستم‌های CRISPR-Cas روزنه امیدی در این راستا ارائه می‌دهند. محققان به بررسی

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2026-10-16]
[DOR: 20.1001.1.10235922.1405.36.3.2.9]
[DOI: 10.66224/iau.36.3.266]

پتانسیل این سیستم‌ها در توسعه آنتی‌بیوتیک‌های جدید پرداخته‌اند که بتوانند به طور مؤثر با مقاومت آنتی‌بیوتیکی مبارزه کنند (۴۵).

کاربردهای CRISPR-Cas فراتر از توسعه دارو بوده و می‌تواند به برخی از فوری‌ترین مسائل بهداشت عمومی رسیدگی کند. در این زمینه، سیستم‌های CRISPR-Cas برای تولید و ارزیابی مجموعه‌داده‌های عظیمی ضروری هستند که فرآیندهای پیچیده زیربنایی طیف متنوعی از اختلالات پزشکی را روشن می‌کنند. ترکیب فناوری‌های مختلفی مانند ترانسکریپتومیک، پروتئومیک و ژنومیک با CRISPR، درک جامع‌تری از بیماری‌ها را امکان‌پذیر می‌سازد و به تسریع در ایجاد درمان‌های هدفمند کمک می‌کند.

کاربردهای سیستم CRISPR/Cas در میکروجلبک‌ها

سیستم CRISPR/Cas به طور گسترده‌ای برای اصلاح مسیرهای متابولیکی میکروجلبک‌ها به کار گرفته شده است. هدف اصلی این ویرایش ژنوم، بهبود فرآیندهای متابولیکی در میکروجلبک‌ها و در نتیجه، افزایش تولید متابولیت‌های خاص است. سیستم ویرایش ژنتیکی مبتنی بر CRISPR/Cas با موفقیت برای اصلاح مسیرهای متابولیکی در میکروجلبک یوکاریوتی مدل *Chlamydomonas* sp. و همچنین سیانوباکتری‌های پروکاریوتی توسعه یافته است (۴۶).

دست‌کاری شار کربن (Manipulating carbon flux) با استفاده از سیستم CRISPR/Cas رویکردی بسیار امیدبخش، برای افزایش سنتز محصولات شیمیایی ارزشمند است. به عنوان نمونه، لی و همکاران از CRISPR/Cas9 برای ویرایش ژنوم در سیانوباکتری *Synechococcus elongates* استفاده کردند. هدف آنها دستیابی به یک نتیجه دوگانه شامل حذف ژن *glgc* و اضافه‌کردن ژن‌های *gltA/ppc* بود. این دست‌کاری ژنتیکی باعث شد که شار کربن به سمت تولید سوکسینات هدایت شود، که در نهایت منجر به بهبود 11 برابری در تولید سوکسینات شد. این نمونه به وضوح نشان می‌دهد که چگونه CRISPR/Casمی‌تواند برای بهینه‌سازی مسیرهای بیوشیمیایی و افزایش تولید بیومس در میکروجلبک‌ها به کار رود (۲۴). محققان از CRISPRi برای سرکوب چندین ژن در سیانوباکتری مدل *Synechocystis* sp. استفاده کردند. هدف اولیه آن‌ها سرکوب بیان ژن‌های *phaE* و *phaC* (کدکننده سنتتاز پلی‌هیدروکسی‌آلکانوات یا PHA) بود تا از این طریق تولید لیپید را افزایش دهند. همچنین، آن‌ها قصد داشتند چهار ژن کدکننده آلدهید ردوکتاز و دهیدروژناز بالقوه را با استفاده از CRISPRi سرکوب کنند تا تولید آلکان را بهبود بخشند. محققان گزارش دادند که این سیستم سرکوب چندگانه، با موفقیت توانست بیان ژن‌های هدف را به میزان ۵۰ تا ۹۵ درصد کاهش دهد. در همین راستا، ترن و همکاران (2025) نیز برای اولین بار سرکوب ژن *PEPC1* را در میکروجلبک مدل *Chlamydomonas reinhardtii* با استفاده از سیستم CRISPRi با موفقیت انجام دادند. این مطالعات، پتانسیل بالای CRISPRi را در مهندسی متابولیک میکروجلبک‌ها و سیانوباکتری‌ها برای تولید ترکیبات با ارزش نشان می‌دهد (۴۷).

مطالعات نشان داده‌اند که در سویه‌هایی با بیان کاهش‌یافته ژن *PEPC1*، تراکم بیومس و نرخ تجمع لیپید به‌طور قابل‌توجهی افزایش می‌یابد. این مشاهده، اهمیت ویرایش و سرکوب هدفمند ژن‌ها را در بهینه‌سازی مسیرهای متابولیکی و افزایش تولید ترکیبات زیستی ارزشمند برجسته می‌کند. شواهد اخیر همچنین کارایی بالای سامانه CRISPR interference (CRISPRi) را به‌عنوان ابزاری دقیق و انعطاف‌پذیر برای مهندسی متابولیکی در میکروجلبک‌ها و سیانوباکتری‌ها تأیید کرده‌اند، به‌ویژه در بهبود بازده تولید متابولیت‌ها و تنظیم مسیرهای زیستی کلیدی (۴۸).

مرور پژوهش‌های اخیر درباره کاربرد CRISPR/Cas در میکروجلبک‌ها نشان می‌دهد که گرچه موفقیت‌های قابل توجهی در بهینه‌سازی مسیرهای متابولیکی حاصل شده است، اما کارایی پایین نوترکیبی همولوگ و احتمال بروز جهش‌های ناخواسته، چالش‌های مهمی محسوب می‌شوند. به عنوان مثال، در حالی که لی و همکاران (۲۰۱۹) بهبود ۱۱ برابری در سنتز سوکسینات گزارش کردند، مطالعات هوانگ و همکاران (۲۰۱۶) و گوردون و همکاران (۲۰۱۶) نشان دادند که بازده نهایی به‌شدت وابسته به نوع میزبان و شرایط بیان ژن است. این تضاد نتایج بیانگر نیاز به بررسی سیستماتیک‌تر تأثیر پارامترهای ژنتیکی و محیطی در ویرایش‌های میکروجلبکی است (۲۴, ۴۹, ۵۰). افزون بر این، داده‌های مقایسه‌ای کافی برای تعیین کارایی نسبی Cas9 در برابرCas12a در این موجودات هنوز منتشر نشده است، که خود یک شکاف دانشی مهم در حوزه مهندسی متابولیک به شمار می‌رود.

با این حال، محققان دیگر گزارش کرده‌اند که می‌توان کارایی نوترکیبی همولوگ در میکروجلبک‌ها را با هدف قرار دادن پروتئین‌های دخیل در ترمیم DNAمانند Ku70، Ku80،

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2026-10-16]
[DOR: 20.1001.1.10235922.1405.36.3.2.9]
[DOI: 10.66224/iau.36.3.266]

جدول ۳. نمونه‌هایی از کاربردهای سامانه‌های CRISPR-Cas در گونه‌های میکروبی مختلف همراه با مزایا و محدودیت‌ها

گونه میکروبی	نوع سیستم استفاده‌شده	هدف/کاربرد اصلی	مزایا	محدودیت‌ها	منبع
Escherichia coli	Cas9	حذف ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی	سرعت بالا و کنترل دقیق	اثرات خارج از هدف محتمل	(۵۲)
Streptomyces coelicolor	Cas12a	بهبود تولید آنتی‌بیوتیک	برش دقیق‌تر DNA	پایداری کمتر پلاسمیدها	(۵۳)
Bacillus subtilis	Cas9	ویرایش مسیرهای متابولیکی	نرخ بالای موفقیت	نیاز به PAM خاص	(۵۴)
Synechocystis sp.	Cas12a	افزایش تولید بیومس و لیپید	تطبیق‌پذیری بالا در محیط نوری	بازده پایین انتقال DNA	(۵۵)
Lactobacillus plantarum	Cas9	حذف ژن‌های ویرولانس	ایمنی در صنایع غذایی	محدودیت در تعداد سایت‌های هدف	(۵۶)

DNA لیگاز IVو سایر ژن‌های مرتبط افزایش داد. سیستم CRISPR-Cas، علاوه بر سیستم CRISPRi، در ترکیب با فعال‌کننده‌های رونویسی مانند VP64، به طور مؤثری برای فعال‌سازی بیان ژن در سلول‌های انسانی و *Saccharomyces cerevisiae* استفاده شده است. با وجود مسائل فنی حل‌نشده موجود، سیستم CRISPR/Cas در مقایسه با سایر فناوری‌ها، مزایای بی‌نظیر و چشم‌اندازهای بسیار امیدوارکننده‌ای را ارائه می‌دهد (۵۱). این سیستم همچنان در حال تکامل است و انتظار می‌رود که بر محدودیت‌های فعلی غلبه کند (جدول ۳).

نتیجه‌گیری کلی

فناوری CRISPR-Cas طی یک دهه گذشته به یکی از انقلابی‌ترین ابزارهای زیست‌فناوری تبدیل شده است و توانسته کاربردهای گسترده‌ای از مهندسی متابولیک تا توسعه آنتی‌میکروب‌های هدفمند را ممکن سازد. با این حال، مرور مطالعات موجود نشان می‌دهد که استفاده از این سامانه‌ها در میکروارگانیسم‌ها هنوز با چالش‌های فنی و زیستی متعددی روبه‌رو است. در حالی‌که پیشرفت‌های چشمگیری در طراحی و کارایی نوکلئازهای Cas9، Cas12a و Cas13 حاصل شده، کنترل اثرات خارج از هدف(off-target effects) ، بهینه‌سازی سیستم‌های تحویل (delivery systems) و حفظ پایداری بیان ژن‌های اصلاح‌شده در محیط‌های طبیعی همچنان از مسائل حل‌نشده محسوب می‌شوند. افزون بر این، تنوع ژنتیکی در سویه‌های میکروبی باعث می‌شود که کارایی CRISPR-Cas در هر گونه متفاوت باشد، و این امر نیازمند استانداردسازی پروتکل‌ها و طراحی مقایسه‌ای دقیق بین گونه‌هاست.

از منظر آینده‌پژوهی، سه محور عمده باید در پژوهش‌های آتی مورد توجه قرار گیرد:

۱- توسعه سامانه‌های چندکاره (Multiplex CRISPR system) و دقیق‌تر مانند CasX، CasΦ و سیستم‌های فصلی با قابلیت هدف‌گیری هم‌زمان چند ژن، که بتوانند مسیرهای متابولیکی پیچیده را در میکروب‌ها به صورت شبکه‌ای تنظیم کنند؛

۲- بهبود سامانه‌های تحویل زیستی (bio-delivery) از طریق نانوحامل‌ها و فاژهای مهندسی‌شده، به‌ویژه برای گونه‌های غیرمدل و سخت‌تغذیه؛

۳- ارزیابی ریسک زیست‌محیطی و اخلاقی استفاده از CRISPRدر میکروارگانیسم‌های آزادزی، به‌ویژه در زمینه احتمال انتقال افقی ژن‌های اصلاح‌شده.

در مجموع، آینده کاربرد CRISPR-Cas در بیوتکنولوژی میکروبی در گرو ترکیب دانش ژنومیک، مدل‌سازی زیستی و ابزارهای هوش مصنوعی برای پیش‌بینی دقیق برهم‌کنش‌های ژنی و بهینه‌سازی عملکرد این سیستم‌هاست. انتظار می‌رود با هم‌گرایی این حوزه‌ها، CRISPR-Cas به یکی از ارکان اصلی مهندسی زیستی نسل آینده تبدیل شود و نقش تعیین‌کننده‌ای در تولیدات زیستی پایدار، درمان‌های نوین و کنترل بیماری‌های عفونی ایفا کند.

REFERENCES

1.Ishino Y, Shinagawa H, Makino K, Amemura M, Nakata A. Nucleotide sequence of the iap gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in Escherichia coli, and identification of the gene product. J Bacteriol 1987;169:5429-33.

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2026-10-16]
[DOR: 20.1001.1.10235922.1405.36.3.2.9]
[DOI: 10.66224/iau.36.3.266]

2.Mojica FJ, Díez-Villaseñor Cs, García-Martínez J, Soria E. Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements. J Mol Evol 2005;60:174-82.

3.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;337:816-21.

4.Molla KA, Karmakar S, Islam MT. Wide horizons of CRISPR-Cas-derived technologies for basic biology, agriculture, and medicine. In: Islam MT, Bhowmik PK, Molla KA, eds. CRISPR-Cas methods. Humana New York, NY: Springer; 2020. p. 1-23.

5.Kaushik S. Editorial: Reviews in antibiotic resistance and new antimicrobial drugs. Front Cell Infect Microbiol 2024;14:1434140.

6.Nguyen TM, Zhang Y, Pandolfi PP. Virus against virus: a potential treatment for 2019-nCov (SARS-CoV-2) and other RNA viruses. Cell Res 2020;30:189-90.

7.Ding W, Zhang Y, Shi S. Development and application of CRISPR/Cas in microbial biotechnology. Front Bioeng Biotechnol 2020;8:711.

8.Hampton HG, Watson BN, Fineran PC. The arms race between bacteria and their phage foes. Nature 2020;577:327-36.

9.Watson BN, Staals RH, Fineran PC. CRISPR-Cas-mediated phage resistance enhances horizontal gene transfer by transduction. MBio 2018;9:e02406-17.

10.Nidhi S, Anand U, Oleksak P, Tripathi P, Lal JA, Thomas G, et al. Novel CRISPR–Cas systems: an updated review of the current achievements, applications, and future research perspectives. Int J Mol Sci 2021;22:3327.

11.Bourgeois J, Lazinski DW, Camilli A. Identification of spacer and protospacer sequence requirements in the Vibrio cholerae type IE CRISPR/Cas system. mSphere 2020;5:e00813-20.

12.Sabri S, Mustofa MK, Fouad M, Mukherjee S, Fakruddin M, Shishir MA. Comprehensive Analysis of CRISPR-Cas Systems in Microbial and Their Multifaceted Applications. Microbial Bioactives 2024;7:1-11.

13.Guzmán NM, Esquerra-Ruvira B, Mojica FJ. Digging into the lesser-known aspects of CRISPR biology. Int Microbiol 2021;24:473-98.

14.Kansal R. The CRISPR-Cas system and clinical applications of CRISPR-based gene editing in hematology with a focus on inherited germline predisposition to hematologic malignancies. Genes 2024;15:863.

15.Tong Y, Jørgensen TS, Whitford CM, Weber T, Lee SY. A versatile genetic engineering toolkit for E. coli based on CRISPR-prime editing. Nat Commun 2021;12:5206.

16.Newsom S, Parameshwaran HP, Martin L, Rajan R. The CRISPR-Cas mechanism for adaptive immunity and alternate bacterial functions fuels diverse biotechnologies. Front Cell Infect Microbiol 2021;10:619763.

17.Wang LW, Trudeau SJ, Wang C, Gerdt C, Jiang S, Zhao B, et al. Modulating Gene Expression in Epstein-Barr Virus (EBV)-Positive B Cell Lines with CRISPRa and CRISPRi. Curr Protoc Mol Biol 2018;121: 31.13.1-31.13.18.

18.Hidalgo-Cantabrana C, Barrangou R. Characterization and applications of Type I CRISPR-Cas systems. Biochem Soc Trans 2020;48:15-23.

19.Cardi T, Murovec J, Bakhsh A, Boniecka J, Bruegmann T, Bull SE, et al. CRISPR/Cas-mediated plant genome editing: outstanding challenges a decade after implementation. Trends Plant Sci 2023;28:1144-65.

20.Lee H, Dhingra Y, Sashital DG. The Cas4-Cas1-Cas2 complex mediates precise prespacer processing during CRISPR adaptation. Elife 2019;8:e44248.

21.Kannan S, Altae-Tran H, Jin X, Madigan VJ, Oshiro R, Makarova KS, et al. Compact RNA editors with small Cas13 proteins. Nat Biotechnol 2022;40:194-97.

22.Kolesnik MV, Fedorova I, Karneyeva KA, Artamonova DN, Severinov KV. Type III CRISPR-Cas systems: deciphering the most complex prokaryotic immune system. Biochemistry (Mosc) 2021;86:1301-14.

23.Zhu S, Yung BC, Chandra S, Niu G, Antaris AL, Chen X. Near-infrared-II (NIR-II) bioimaging via off-peak NIR-I fluorescence emission. Theranostics 2018;8:4141.

24.Li Y, Li S, Wang J, Liu G. CRISPR/Cas systems towards next-generation biosensing. Trends Biotechnol 2019;37:730-43.

25.Kordyś M, Sen R, Warkocki Z. Applications of the versatile CRISPR-Cas13 RNA targeting system. Wiley Interdiscip Rev RNA. 2022;13:e1694.

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2026-10-16]
[DOR: 20.1001.1.10235922.1405.36.3.2.9]
[DOI: 10.66224/iau.36.3.266]

26.Pawluk A, Davidson AR, Maxwell KL. Anti-CRISPR: discovery, mechanism and function. Nat Rev Microbiol 2018;16:12-17.

27.Drabavicius G, Sinkunas T, Silanskas A, Gasiunas G, Venclovas Č, Siksnys V. DnaQ exonuclease-like domain of Cas2 promotes spacer integration in a type I-E CRISPR-Cas system. EMBO Rep 2018;19:e45543.

28.Bharathkumar N, Sunil A, Meera P, Aksah S, Kannan M, Saravanan KM, et al. CRISPR/Cas-based modifications for therapeutic applications: a review. Mol Biotechnol 2022;64:355-72.

29.Demir Ö, Erbaş O. Discovery and applications of CRISPR-Cas9 gene editing technology. Journal of Experimental and Basic Medical Sciences 2023;8:56-67.

30.Camara-Wilpert S, Mayo-Muñoz D, Russel J, Fagerlund RD, Madsen JS, Fineran PC, et al. Bacteriophages suppress CRISPR–Cas immunity using RNA-based anti-CRISPRs. Nature 2023;623:601-7.

31.Mlaga KD, Garcia V, Colson P, Ruimy R, Rolain J-M, Diene SM. Extensive comparative genomic analysis of Enterococcus faecalis and Enterococcus faecium reveals a direct association between the absence of CRISPR–Cas systems, the presence of anti-endonuclease (ardA) and the acquisition of vancomycin resistance in E. faecium. Microorganisms 2021;9:1118.

32.Joseph CE, Jain A, Yaqub MO, Edison LK. CRISPR-Cas Systems: Bridging Bacterial Immunity and Host Interactions. Appl Microbiol 2025;5:118.

33.Malone LM, Warring SL, Jackson SA, Warnecke C, Gardner PP, Gumy LF, et al. A jumbo phage that forms a nucleus-like structure evades CRISPR–Cas DNA targeting but is vulnerable to type III RNA-based immunity. Nat Microbiol 2020;5:48-55.

34.Gomaa AA, Klumpe HE, Luo ML, Selle K, Barrangou R, Beisel CL. Programmable removal of bacterial strains by use of genome-targeting CRISPR-Cas systems. MBio 2014;5:e00928-13.

35.Kiga K, Tan X-E, Ibarra-Chávez R, Watanabe S, Aiba Y, Sato'o Y, et al. Development of CRISPR-Cas13a-based antimicrobials capable of sequence-specific killing of target bacteria. Nat Commun 2020;11:2934.

36.Sheng H, Wu S, Xue Y, Zhao W, Caplan AB, Hovde CJ, et al. Engineering conjugative CRISPR-Cas9 systems for the targeted control of enteric pathogens and antibiotic resistance. PLoS One 2023;18:e0291520.

37.Yang J, Meng X, Pan J, Jiang N, Zhou C, Wu Z, et al. CRISPR/Cas9-mediated noncoding RNA editing in human cancers. RNA Biol 2018;15:35-43.

38.Dinh H, Semenec L, Kumar SS, Short FL, Cain AK. Microbiology's next top model: Galleria in the molecular age. Pathog Dis 2021;79:ftab006.

39.Dimitri A, Herbst F, Fraietta JA. Engineering the next-generation of CAR T-cells with CRISPR-Cas9 gene editing. Mol Cancer 2022;21:78.

40.Mayorga-Ramos A, Zúñiga-Miranda J, Carrera-Pacheco SE, Barba-Ostria C, Guamán LP. CRISPR-Cas-based antimicrobials: design, challenges, and bacterial mechanisms of resistance. ACS Infect Dis 2023;9:1283-302.

41.Abbott TR, Dhamdhere G, Liu Y, Lin X, Goudy L, Zeng L, et al. Development of CRISPR as an antiviral strategy to combat SARS-CoV-2 and influenza. Cell 2020;181:865-76.

42.Curti L, Pereyra-Bonnet F, Gimenez C. An ultrasensitive, rapid, and portable coronavirus SARS-CoV-2 sequence detection method based on CRISPR-Cas12. BioRxiv 2020;2020.

43.Kellner MJ, Koob JG, Gootenberg JS, Abudayyeh OO, Zhang F. SHERLOCK: nucleic acid detection with CRISPR nucleases. Nat Protoc 2019;14:2986-3012.

44.Doudna JA, Charpentier E. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. Science 2014;346:1258096.

45.Heler R, Wright AV, Vucelja M, Bikard D, Doudna JA, Marraffini LA. Mutations in Cas9 enhance the rate of acquisition of viral spacer sequences during the CRISPR-Cas immune response. Mol Cell 2017;65:168-75.

46.Dhokane D, Shaikh A, Yadav A, Giri N, Bandyopadhyay A, Dasgupta S, et al. CRISPR-based bioengineering in microalgae for production of industrially important biomolecules. Front Bioeng Biotechnol 2023;11:1267826.

47.Tran Q-G, Le TT, Choi D-Y, Cho D-H, Yun J-H, Choi HI, et al. Progress and challenges in CRISPR/Cas applications in microalgae. J Microbiol 2025;63:e2501028.

48.Dong Z, Chen L, Wang Y, Sun T, Zhang W. Current advances in CRISPR-Cas-mediated gene editing and regulation in cyanobacteria. Blue Biotechnology 2024;1:9.

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2026-10-16]
[DOR: 20.1001.1.10235922.1405.36.3.2.9]
[DOI: 10.66224/iau.36.3.266]

49.Huang C-H, Shen CR, Li H, Sung L-Y, Wu M-Y, Hu Y-C. CRISPR interference (CRISPRi) for gene regulation and succinate production in cyanobacterium S. elongatus PCC 7942. Microb Cell Fact 2016;15:196.

50.Gordon GC, Korosh TC, Cameron JC, Markley AL, Begemann MB, Pfleger BF. CRISPR interference as a titratable, trans-acting regulatory tool for metabolic engineering in the cyanobacterium Synechococcus sp. strain PCC 7002. Metab Eng 2016;38:170-9.

51.Zhang Y-T, Jiang J-Y, Shi T-Q, Sun X-M, Zhao Q-Y, Huang H, et al. Application of the CRISPR/Cas system for genome editing in microalgae. Appl Microbiol Biotechnol 2019;103:3239-48.

52.Ahmed MM, Kayode HH, Okesanya OJ, Ukoaka BM, Eshun G, Mourid MR, et al. CRISPR-Cas systems in the fight against antimicrobial resistance: current status, potentials, and future directions. Infect Drug Resist 2024:5229-45.

53.Karthik L, Arivarasan VK, Vignesh MR, Anitha P. CRISPR ERA: Current Applications and Future Perspectives on Actinobacteria. In: Karthik L, ed. Actinobacteria. Singapore: Springer; 2022.

54.Xia Y, Sun L, Liang Z, Guo Y, Li J, Tang D, et al. The construction of a PAM-less base editing toolbox in Bacillus subtilis and its application in metabolic engineering. Chemical Engineering Journal 2023;469:143865.

55.Du W, Meister LL, van Grinsven T, Branco dos Santos F. Efficient Multiplex Genome Editing of the Cyanobacterium Synechocystis sp. PCC6803 via CRISPR-Cas12a. Biotechnol Bioeng 2025;122:736-43.

56.Mu Y, Zhang C, Li T, Jin F-J, Sung Y-J, Oh H-M, et al. Development and applications of CRISPR/Cas9-based genome editing in Lactobacillus. Int J Mol Sci 2022;23:12852.

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2026-10-16]

[DOR: 20.1001.1.10235922.1405.36.3.2.9]

[DOI: 10.66224/iau.36.3.266]