



Research Article

Construction and Cloning of CRISPR /Cas9 Target Gene and Confirmation of Cell Line Identity by QF - PCR

Fatemeh Faghihi¹, Jafar Amani^{2*}, Milad Gholami³, Iman Salahshourifar⁴

¹ PhD Student, Department of Biology, SR.C., Islamic Azad University, Tehran, Iran

² Professor, Applied Microbiology Research Center, Biomedicine Technologies Institute, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran

³ Associate Professor, Department of Biochemistry and Genetics, School of Medicine, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran.

⁴ Assistant Professor, Department of Biology, SR.C., Islamic Azad University, Tehran, Iran

* **Corresponding author:** Jafar Amani, Professor, Applied Microbiology Research Center, Biomedicine Technologies Institute, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran. Email: jafar.amani@gmail.com

DOI: [10.66224/jams.29.1.19](https://doi.org/10.66224/jams.29.1.19)

How to Cite this Article:

Faghihi F, Amani J, Gholami M, Salahshourifar I. Construct and Cloning of CRISPR /Cas9 Target Gene and Confirmation of Cell Line Identity by QF - PCR. *J Arak Uni Med Sci.* 2026;**29**(1): 19-25. DOI: [10.66224/jams.29.1.19](https://doi.org/10.66224/jams.29.1.19)

Received: 13.03.2026

Accepted: 30.03.2026

Keywords:

CRISPR /Cas9;
Cloning;
QF-PCR;
CDKL5

© 2024 Arak University of Medical Sciences

Abstract

Introduction: Autism Spectrum Disorder (ASD) and CDKL5 deficiency disorder are among the nervous and developmental disorder with genetic origin that requires accurate molecular models are required to study the mechanisms of disease and develop new treatments. The CRISPR / Cas9 genome editing system is an efficient tool to generate targeted changes in the genome. The aim of this study was to design and construct CRISPR / Cas9 vector carrier sgRNA for CDKL5 gene and to confirm the cloning and identity of the cell line used by molecular methods.

Methods: In this experimental study, at first, specific primers were designed for region in the cdkl5 gene. Oligo nouclotide forward and reverse annealing and cloned in PX458 vector. After transformation of *E. coli* strains DH5, positive colonies were confirmed by PCR and sequencing methods. Also to ensure the identity of the HEK293T cell line, QF - PCR was used to determine the sex and chromosome study.

Results: Colony-PCR results showed the expected band of 230 bp in selected colonies. Sequencing also confirmed insert sgRNA in the vector. The results of QF-PCR demonstrated specific peaks patterns for sex chromosomes that confirmed cell line identity.

Conclusions: The CRISPR / Cas9 target gene expression was successfully performed and molecular approvals were obtained for cloning and analysis of the cell line. This vector is proposed for further studies on gene expression in cellular models.

ساخت و کلونینگ وکتور CRISPR/Cas9 هدفمند ژن CDKL5 و تأیید هویت خط سلولی با روش QF-PCR

فاطمه فقیهی^۱ ID، جعفر امانی هارونی^{۲*} ID، میلاد غلامی^۳ ID، ایمان سلحشوری^۴ ID

^۱ دانشجوی دکتری، گروه زیست‌شناسی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

^۲ انستیتو فناوری‌های پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله، تهران، ایران

^۳ گروه بیوشیمی و ژنتیک، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران

^۴ گروه زیست‌شناسی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

* نویسنده مسئول: جعفر امانی هارونی، انستیتو فناوری‌های پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله، تهران، ایران. ایمیل: jafar.amani@gmail.com

DOI: 10.66224/jams.29.1.19

تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۱۲/۲۲	چکیده
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۵/۰۱/۱۰	مقدمه: اختلال طیف اوتیسم (Autism Spectrum Disorder) ASD و اختلال کمبود CDKL5 از جمله اختلالات عصبی-رشدی با ریشه ژنتیکی هستند که نیازمند مدل‌های دقیق مولکولی برای مطالعه مکانیسم‌های بیماری و توسعه درمان‌های نوین می‌باشند. سیستم ویرایش ژنوم CRISPR/Cas9 ابزاری کارآمد برای ایجاد تغییرات هدفمند در ژنوم است. هدف این مطالعه، طراحی و ساخت وکتور CRISPR/Cas9 حامل sgRNA اختصاصی برای ژن CDKL5 و تأیید کلونینگ و هویت خط سلولی مورد استفاده به کمک روش‌های مولکولی بود.
واژگان کلیدی: CRISPR/Cas9، ژن CDKL5، کلونینگ، QF-PCR، خط سلولی HEK293T	روش کار: در این مطالعه تجربی، ابتدا sgRNA اختصاصی برای ناحیه مورد نظر در ژن CDKL5 طراحی شد. الگوهای Forward و Reverse آنیل شده و در وکتور PX458 کلون شدند. پس از ترانسفورماسیون باکتری <i>E. coli</i> سویه DH5α، کلونی‌های مثبت به روش Colony PCR و توالی‌یابی تأیید شدند. همچنین جهت اطمینان از هویت خط سلولی HEK293T مورد استفاده، آزمون QF-PCR برای تعیین جنسیت و بررسی کروموزومی انجام شد.
تمامی حقوق نشر برای دانشگاه علوم پزشکی اراک محفوظ است.	یافته‌ها: نتایج Colony PCR وجود باند مورد انتظار ۲۳۰ جفت بازی را در کلونی‌های منتخب نشان داد. توالی‌یابی نیز Insert صحیح sgRNA را در وکتور تأیید کرد. نتایج QF-PCR الگوهای پیک‌های مشخص برای کروموزوم‌های جنسی را نشان داد که هویت خط سلولی را تأیید می‌کرد.
	نتیجه‌گیری: ساخت وکتور CRISPR/Cas9 هدفمند ژن CDKL5 با موفقیت انجام شد و تأییدیه‌های مولکولی لازم شامل کلونینگ و بررسی خط سلولی حاصل گردید. این وکتور می‌تواند برای مطالعات بعدی ویرایش ژن در مدل‌های سلولی مورد استفاده قرار گیرد.
	ارجاع: فقیهی فاطمه، امانی هارونی جعفر، غلامی میلاد، سلحشوری فریما. ساخت و کلونینگ وکتور CRISPR/Cas9 هدفمند ژن CDKL5 و تأیید هویت خط سلولی با روش QF-PCR. مجله دانشگاه علوم پزشکی اراک ۱۴۰۵؛ ۲۹ (۱): ۱۹-۲۵.

مقدمه

اختلال طیف اوتیسم (Autism Spectrum Disorder) ASD، یک اختلال عصبی-رشدی پیچیده است که با نقص در تعاملات اجتماعی، ارتباطات و رفتارهای تکراری و محدود مشخص می‌شود. مطالعات اپیدمیولوژیک نشان داده‌اند که شیوع ASD در حال افزایش است و در حال حاضر حدود ۱ در ۵۴ کودک در لیالات متحده به این اختلال مبتلا هستند (۱-۳). مطالعات ژنتیکی نشان داده‌اند که جهش‌های متعددی در بروز ASD نقش دارند و شناسایی ژن‌های کاندید برای درک پاتوفیزیولوژی این بیماری ضروری است.

یکی از ژن‌های مهم در این زمینه، ژن CDKL5

(Cyclin-Dependent Kinase-Like 5) است که بر روی کروموزوم Xp22.13 (X) قرار دارد. جهش در این ژن منجر به اختلال کمبود CDKL5 می‌شود که علائمی شبیه به سندرم رت و اوتیسم را ایجاد می‌کند (۴-۶). این ژن شامل ۲۱ اگزون است و پروتئین حاصل از آن شامل ۹۵۹ اسید آمینه می‌باشد. پروتئین CDKL5 در رشد و تکامل مغز، به ویژه در تکامل نورون‌ها و تشکیل سیناپس‌ها نقش حیاتی ایفا می‌کند (۷-۹). CDKL5، یک سرین/ترونین کیناز است که با پروتئین MeCP2 تعامل دارد و در تنظیم بیان ژن‌های مرتبط با رشد عصبی نقش دارد. مطالعات نشان داده‌اند که CDKL5 در هسته و سیتوپلاسم نورون‌ها بیان می‌شود و در فرایندهای مختلفی از جمله تکثیر سلولی، تمایز نورونی و پلاستیسیته سیناپسی

وکتور (pSpCas9(BB)-2A-GFP) PX458 که قبلاً با آنزیم BbsI خطی شده بود، لیگاسیون شد. واکنش لیگاسیون با استفاده از آنزیم T4 DNA Ligase انجام گرفت. این وکتور دارای کاست GFP است که امکان پایش ترانسفکشن را فراهم می‌کند.

ترانسفورماسیون و کلونینگ باکتریایی

محصول لیگاسیون به باکتری E. coli سویه DH5α کامپنت ترانسفورم شد. باکتری‌ها روی پلیت‌های آگار LB حاوی آمپی‌سیلین کشت داده شدند تا کلونی‌های مقاوم رشد کنند. شرایط کشت شامل دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۶-۱۸ ساعت بود.

تأیید کلونی‌ها (Colony PCR)

جهت غربالگری کلونی‌های مثبت، از روش Colony PCR استفاده شد. برای این کار از پرایمرهای اختصاصی وکتور و insert استفاده گردید. شرایط واکنش PCR شامل مرحله دناتوراسیون اولیه، سیکل‌های Touchdown و تکثیر نهایی بود. محصول PCR روی ژل آگارز ۲ درصد الکتروفورز شد. اندازه باند مورد انتظار ۲۳۰ جفت بازی در نظر گرفته شد. توالی پرایمرهای مورد استفاده در جدول ۲ نشان داده شده است.

جدول ۲. توالی پرایمرهای مورد استفاده در Colony PCR

نام پرایمر	توالی	اندازه محصول (bp)
Forward	TACGATACAAGGCTGTAGAG	۲۳۰
R guide	TCTTCATGAAGACAAACTCC	۲۳۰

استخراج پلاسمید و توالی‌یابی

از کلونی‌های مثبت، پلاسمید به روش مینی‌پرو استخراج شد. غلظت و خلوص DNA با دستگاه نانودراپ بررسی گردید. در نهایت، توالی‌یابی سنگر برای اطمینان از صحت Insert sgRNA انجام شد.

کشت سلول و آزمون QF-PCR

خط سلولی HEK293T در محیط DMEM حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاو (FBS) کشت داده شد. جهت تأیید هویت خط سلولی و تعیین جنسیت کروموزومی، از روش PCR فلورسنت کمی (QF-PCR) استفاده شد. DNA، ژنومی از سلول‌ها استخراج شده و با استفاده از مارکرهای اختصاصی کروموزوم‌های جنسی تحت واکنش PCR قرار گرفت. محصولات با استفاده از Genetic Analyzer بررسی شدند. این روش به دلیل دقت بالا در تشخیص ناهنجاری‌های کروموزومی و تعیین جنسیت انتخاب شد.

یافته‌ها

نتایج Colony PCR

پس از کشت باکتری‌های ترانسفورم شده، چندین کلونی انتخاب و مورد بررسی قرار گرفتند. واکنش Colony PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی انجام شد. همانطور که در شکل ۱ مشاهده می‌شود، باند مورد انتظار با اندازه ۲۳۰ جفت بازی (bp) در نمونه‌های کلونی مثبت مشاهده گردید. این باند نشان‌دهنده وجود insert sgRNA در وکتور PX458 است. نمونه کنترل منفی فاقد این باند بود. وجود این باند تأیید اولیه بر موفقیت آمیز بودن مرحله لیگاسیون و ترانسفورماسیون بود.

مشارکت دارد (۱۰-۱۲). جهش‌های این ژن اغلب به صورت de novo می‌دهند و الگوی توارث غالب وابسته به X دارند (۱۳-۱۵).

در سال‌های اخیر، فناوری ویرایش ژنوم CRISPR/Cas9 انقلابی در مهندسی ژنتیک ایجاد کرده است. این سیستم متشکل از آنزیم اندونوکلاز Cas9 و یک RNA راهنما (gRNA) است که می‌تواند توالی خاصی از DNA را شناسایی و برش دهد (۱۶-۱۸). سیستم CRISPR/Cas9 از سیستم ایمنی باکتری‌ها الهام گرفته شده است که در آن باکتری‌ها از این سیستم برای دفاع در برابر فاژها استفاده می‌کنند (۱۹-۲۱).

مکانیسم عمل CRISPR/Cas9 به این صورت است که gRNA به توالی هدف در DNA متصل می‌شود و آنزیم Cas9 یک شکست دو رشته‌ای (DSB) در DNA ایجاد می‌کند. سلول سپس از طریق دو مکانیسم اصلی این شکست را ترمیم می‌کند:

۱- اتصال انتهای غیر همولوگ (NHEJ): این مکانیسم سریع اما مستعد خطا است و می‌تواند منجر به Insertion یا Indel حذف شود که باعث تغییر چهارچوب خوانش ژن و غیرفعال‌سازی ژن می‌گردد.

۲- ترمیم هدایت شده با همولوژی (HDR): این مکانیسم دقیق‌تر است و در حضور یک الگوی DNA donor، امکان Insertion یا اصلاح دقیق توالی را فراهم می‌کند (۲۲-۲۵).

با توجه به پتانسیل بالای این فناوری در درمان بیماری‌های ژنتیکی، هدف این مطالعه، طراحی و ساخت وکتور CRISPR/Cas9 برای هدف قرار دادن ژن CDKL5 بود.

همچنین به منظور اطمینان از صحت آزمایش‌های Downstream، تأیید هویت خط سلولی مورد استفاده با روش QF-PCR در دستور کار قرار گرفت. آلودگی خطوط سلولی یا جابجایی آن‌ها می‌تواند منجر به نتایج نادرست در پژوهش‌های Biomedical شود، لذا تأیید هویت ژنتیکی پیش از آزمایش‌های ویرایش ژن امری حیاتی است.

روش کار

طراحی sgRNA و الیگوها

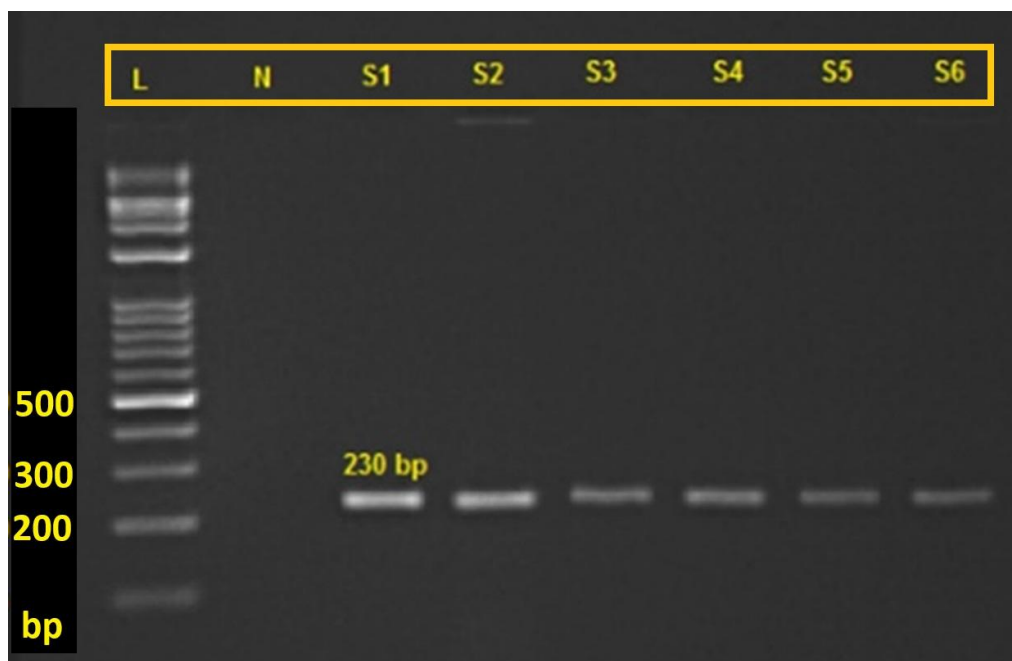
برای هدف قرار دادن ژن CDKL5، توالی sgRNA با استفاده از ابزار آنلاین Synthego طراحی شد. معیارهای انتخاب شامل وجود توالی PAM (NGG) در نزدیکی سایت هدف، کمترین میزان اثرات off-target (کمتر از ۵ درصد) و کارایی برش بالا (بیشتر از ۹۰ درصد) بود. الیگوهای Forward و Reverse حاوی توالی sgRNA به همراه Overhang‌های سازگار با آنزیم برشی BbsI سنتز شدند (جدول ۱).

جدول ۱. توالی الیگوهای طراحی شده برای ساخت وکتور CRISPR

نام الیگو	توالی (۵' به ۳')
Forward oligo	CACCGGAGTTTGTCTTCATGAAGA
Reverse oligo	AAACTCTTCATGAAGACAAACTCC

آنیلینگ و لیگاسیون

الیگوهای Forward و Reverse با غلظت نهایی ۱۰۰ میکرومولار در بافر آنیلینگ مخلوط شده و تحت سیکل‌های حرارتی خاصی قرار گرفتند تا ساختار دو رشته‌ای تشکیل شود. سپس محصول آنیل شده در



شکل ۱. نتیجه الکتروفورز ژل آگارز مربوط به Colony PCR. توضیح شکل: Lاین نشان دهنده مارکر اندازه، N این کنترل منفی و Lاین های S نمونه های کلونی مثبت با باند ۲۳۰ جفت بازی می باشند.

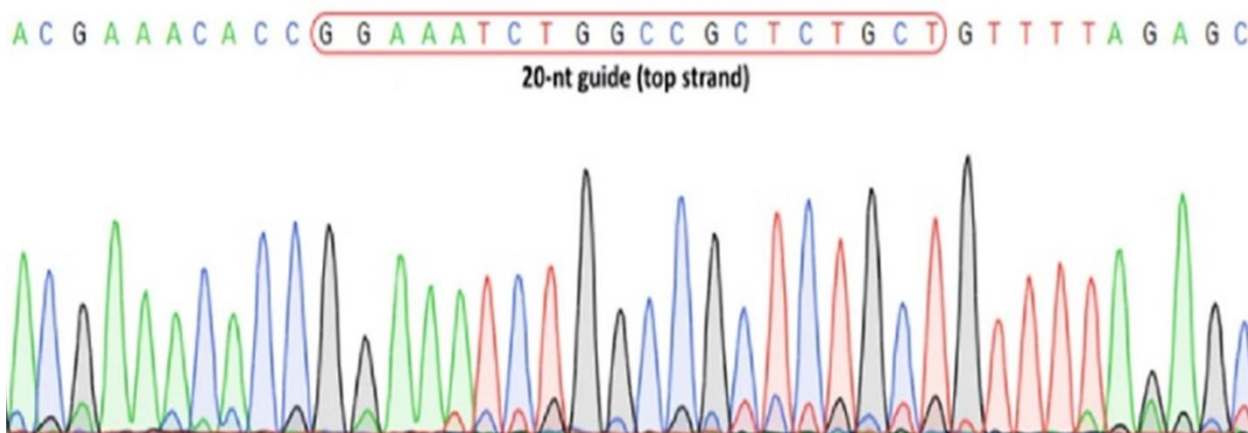
تأیید توالی یابی

محصولات PCR مثبت جهت توالی یابی ارسال شدند. نتایج توالی یابی نشان داد که توالی sgrRNA طراحی شده به درستی و بدون هیچگونه جهش ناخواسته ای در ناحیه هدف وکتور PX458 قرار گرفته است. توالی به دست آمده با توالی مرجع sgrRNA مطابقت کامل داشت که موفقیت آمیز بودن مرحله کلونینگ را تأیید می کند. عدم وجود جهش در ناحیه guideRNA برای عملکرد صحیح سیستم CRISPR/Cas9 ضروری است. در شکل ۲ کروماتوگرام حاصل از توالی یابی نمایش داده شده است که توالی sgrRNA در وکتور را تأیید می کند.

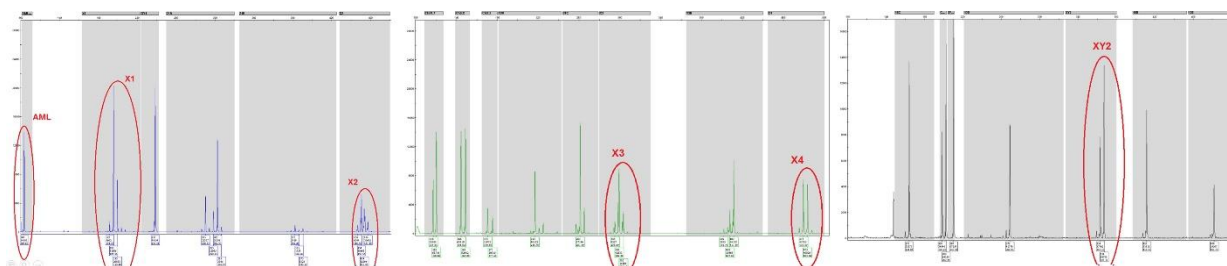
نتایج آزمون QF-PCR

به منظور اطمینان از هویت خط سلولی HEK293T مورد

استفاده در آزمایش های ترانسفکشن، آزمون QF-PCR انجام شد. این آزمون با استفاده از مارک های میکروساتلایت اختصاصی کروموزوم های X و Y انجام گرفت. نتایج آنالیز با دستگاه Genetic Analyzer نشان دهنده وجود پیک های مشخص برای کروموزوم های جنسی بود. در نمونه های مورد بررسی، الگوهای پیک مربوط به کروموزوم X و Y به وضوح مشاهده شد که نشان دهنده مشخصه های ژنتیکی خط سلولی مورد استفاده است. این تأییدیه برای اطمینان از صحت مدل سلولی قبل از انجام آزمایش های ویرایش ژن ضروری بود. نمودارهای حاصل از Fragment Analysis در شکل ۳ نمایش داده شده است که پیک های فلورسنت را در کانال های مختلف نشان می دهد.



شکل ۲. نتیجه توالی یابی سنگر از پلاسمید کلون شده. توضیح شکل: کروماتوگرام توالی یابی region مربوط به sgrRNA را نشان می دهد که تطابق کامل با توالی طراحی شده دارد.



شکل ۳. نتایج آنالیز Fragment مربوط به آزمون QF-PCR. توضیح شکل: نمودارها نشان دهنده پیک‌های اختصاصی برای مارکرهای کروموزومی در نمونه‌های سلولی هستند که هویت خط سلولی HEK293T را تأیید می‌کنند.

بحث

از جمله رویکردهای درمانی نوین و مناسب که می‌تواند به طور مستقیم برخی جهش‌ها را تصحیح کند، تکنیک CRISPR می‌باشد. با گسترش این تکنیک و افزایش اطلاعات در مورد آن، امکان دست‌ورزی یک یا چند ژن فراهم شده است در نتیجه از این سیستم می‌توان برای مطالعه عملکرد ژن‌ها و جهش‌های ژنی در سلول‌های مغزی نیز به مانند سایر سلول‌ها استفاده کرد.

در این مطالعه، موفق به ساخت و کلونینگ وکتور CRISPR/Cas9 حامل sgrRNA اختصاصی ژن CDKL5 شدیم. ژن CDKL5 به دلیل نقش حیاتی در رشد عصبی و ارتباط آن با اختلالات طیف اوتیسم و صرع، هدف مناسبی برای مطالعات ویرایش ژن محسوب می‌شود (۱-۳). جهش در ژن CDKL5، که یک سرین/ترئونین کیناز را کد می‌کند، باعث یک انسفالوپاتی نادر می‌شود که با صرع زودرس و ناتوانی ذهنی شدید مشخص می‌شود، به نام اختلال کمبود CDKL5. مطالعات *in vivo* و *in vitro* در مدل‌های موش کمبود Cdkl5، نقش CDKL5 را در رشد مغز و به‌ویژه در مورفوزن و اتصال سیناپسی نورون‌های هیپوکامپ و قشر مغز برجسته کرده‌اند. جالب توجه است که کمبود Cdkl5 در موش‌ها آسیب‌پذیری در نورون‌های هیپوکامپ را نسبت به استرس تحریک‌کننده افزایش می‌دهد. با این حال، مکانیسمی که توسط آن CDKL5 بقای نورون‌ها را کنترل می‌کند، هنوز درک نشده است.

Loi و همکاران، برای بررسی بیشتر عملکرد CDKL5 و تشریح مکانیسم‌های مولکولی زیربنای بقای عصبی، یک مدل عصبی انسانی کمبود CDKL5 را با استفاده از ویرایش ژنوم با واسطه CRISPR/Cas9 ایجاد کردند. آن‌ها نشان دادند که حذف CDKL5 در سلول‌های SH-SY5Y نوروبلاستوم انسانی نه تنها بلوغ نورون‌ها را مختل می‌کند، بلکه تکثیر و بقای سلول را با تغییرات در مسیرهای سیگنال‌دهی AKT و ERK و افزایش پروتئین BAX پروآپتوز و نشانگرهای زیستی مرتبط با آسیب DNA کاهش می‌دهد. علاوه بر این، سلول‌های دارای کمبود CDKL5 به استرس مرتبط با آسیب DNA حساس بودند، کانون‌های آسیب DNA بیشتری را جمع‌آوری کردند (γ H2AX مثبت) و نسبت به گروه شاهد بیشتر مستعد مرگ سلولی بودند. نکته مهم، افزایش مرگ سلولی ناشی از اسید کاینیک در نورون‌های هیپوکامپ موش‌های Cdkl5 KO با افزایش رنگ‌آمیزی γ H2AX مرتبط است. نتایج نشان می‌دهد که قبلاً نقش ناشناخته CDKL5 در پاسخ آسیب DNA را نشان می‌دهد که می‌تواند زمینه‌ساز عملکرد پیش‌بقای CDKL5 باشد (۲۷).

اساس فرایند مهندسی هدف‌دار ژنوم بر اندونوکلازهای مهندسی شده استوار است. این اندونوکلازهای مهندسی شده، توانایی ویرایش دقیق ژنوم در طیف وسیعی از گونه‌ها را دارد. در سال‌های اخیر تکنولوژی‌های ویرایش ژنوم مانند نوکلئازهای انگشت روی (ZFN)، نوکلئازهای افکتور شبه فعال‌کننده رونویسی (TALEN) و نوکلئازهای هدایت‌شده با میانجی‌گری RNA (CRISPR/Cas) به وجود آمده‌اند. عملکرد دو سیستم ویرایش ZFN و TALEN بر اساس اتصال دومین کاتالیتیکی نوکلئازها به پروتئین‌های متصل به DNA برای القای شکستگی‌های دو رشته‌ای در جایگاه مشخصی از ژنوم است. حال آن‌که در سیستم CRISPR/Cas پروتئین Cas9 نوکلئازی است که توسط یک RNA راهنما (gRNA) که با DNA هدف جفت می‌شود به توالی مورد نظر ژنوم فراخوانده می‌شود و سپس DNA توسط زیر واحدهای آنزیم برش می‌خورد. طراحی آسان تر gRNAها نسبت به پروتئین برای هدف قرار دادن DNA، تنوع بالاتر الگوی برش توسط Cas9، اختصاصیت بیشتر و توانایی هدف قرار دادن چندین لوکوس به‌طور هم‌زمان با طراحی چندین gRNA مختلف ازجمله مزیت‌ها و برتری استفاده از سیستم CRISPR/Cas نسبت به دو سیستم TALEN و ZFN هست. همانند ZFN و TALEN، آنزیم Cas9 ویرایش ژنوم را با ایجاد برش‌های دو رشته‌ای در جایگاه اختصاصی از پیش تعیین شده ژنوم القا می‌کند (۲۶).

در این مطالعه وکتور مورد استفاده، وکتور بیانی px458 و آنزیم برش دهنده Bbs1(BpiI) بود که یک آنزیم اندونوکلازی محدودکننده با جایگاه‌های شناسایی کننده GAAGACNN ∇ است. وکتور px458 با طول 9288 bp دارای پروموتور U6 وابسته به آنزیم RNA polymerase III، آنزیم بهینه‌شده انسانی Cas9 و همچنین دارای مارکر انتخابی Green Fluorescent Protein است که امکان پایش ترانسفکشن را نیز فراهم می‌کند، هرچند در این مرحله تمرکز بر تأیید کلونینگ بود (۴-۶).

نتایج Colony PCR با مشاهده باند ۲۳۰ جفت بازی، اولین سطح تأیید برای ورود insert به وکتور بود. این اندازه با توجه به فاصله پرایمرهای طراحی شده روی وکتور و طول insert مورد انتظار، صحیح تشخیص داده شد. تأیید نهایی با توالی‌یابی انجام شد که خطاهای احتمالی در مرحله آنیلینگ یا لیگاسیون را رد کرد (۷-۹).

Quantitative fluorescent PCR که به اختصار QF-PCR نامیده می‌شود، در پی اختراع PCR در سال ۱۹۹۳ به دنیا معرفی گردید. با توجه به اینکه با این روش بشر می‌توانست اختلالات مربوط به

یکی از چالش‌های اصلی در ویرایش ژنوم، اثرات off-target است. در این مطالعه با استفاده از ابزارهای بیوانفورماتیکی، sgRNAهایی با کمترین احتمال اثرات off-target انتخاب شدند. همچنین تأیید توالی‌یابی اطمینان داد که هیچ جهش ناخواسته‌ای در ناحیه guide رخ نداده است (۲۲-۲۷).

نتیجه‌گیری

ساخت وکتور CRISPR/Cas9 هدفمند ژن CDKL5 با موفقیت انجام شد و صحت آن به روش‌های Colony PCR و توالی‌یابی تأیید گردید. همچنین هویت خط سلولی HEK293T با استفاده از آزمون QF-PCR مورد تأیید قرار گرفت. این وکتور آماده استفاده برای مراحل بعدی ترانسفکشن و بررسی اثرات ویرایش ژن بر بیان و عملکرد پروتئین CDKL5 می‌باشد. پیشنهاد می‌شود در مطالعات آتی، کارایی این وکتور در اصلاح جهش‌های خاص بیماری‌زا در مدل‌های سلولی بیماران مورد ارزیابی قرار گیرد.

تشکر و قدردانی

پژوهش حاضر بخشی از پایان‌نامه دکتری با کد مصوب ۱۶۲۸۸۳۷۷۲ دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات می‌باشد.

سهم نویسندگان

تمامی نویسندگان در تمامی قسمت‌های مقاله نقش داشتند.

تضاد منافع

نویسندگان تصدیق می‌کنند که هیچ تضاد منافی وجود ندارد.

References

- Lord C, Elsabbagh M, Baird G, Veenstra-Vanderweele J. Autism spectrum disorder. The Lancet. 2018;392(10146):508-20. [pmid: 30078460](#) [doi: 10.1016/S0140-6736\(18\)31129-2](#)
- Faja S, Dawson G. Autism spectrum disorder. In: Beauchaine TP, Hinshaw SP, editors. Child and Adolescent Psychopathology. 3rd ed. New York: Guilford Press; 2018. [doi:10.1002/9781394258932.ch22](#)
- Lord C, Brugha TS, Charman T, Cusack J, Dumas G, Frazier T, et al. Autism spectrum disorder. Nat Rev Dis Primers. 2020;6(1):5. [pmid: 3194916](#) [doi: 10.1038/s41572-019-0138-4](#)
- Grove J, Ripke S, Als TD, Mattheisen M, Walters RK, Won H, et al. Identification of common genetic risk variants for autism spectrum disorder. Nat Genet. 2019; 51(3):431-44. [pmid: 30804558](#) [doi: 10.1038/s41588-019-0344-8](#)
- Campisi L, Imran N, Nazeer A, Skokauskas N, Waqar Azeem M. Autism spectrum disorder. Br Med Bull. 2018; 127(1):91-100. [pmid: 30215678](#) [doi: 10.1093/bmb/ldy026](#)
- Hirota T, King BH. Autism spectrum disorder: A review. JAMA. 2023;329(2):157-68. [pmid: 36625807](#) [doi: 10.1001/jama.2022.23661](#)
- Ramaswami G, Geschwind DH. Genetics of autism spectrum disorder. Handb Clin Neurol. 2018; 147:321-29. [pmid: 29325621](#) [doi: 10.1016/B978-0-444-63233-3.00021-X](#)
- Goldstein S, Ozonoff S. Assessment of autism spectrum disorder. New York: The Guilford Press; 2018.
- Woodbury-Smith M, Scherer SW. Progress in the genetics of autism spectrum disorder. Dev Med Child Neurol. 2018;60(5):445-51. [pmid: 29574884](#) [doi: 10.1111/dmcn.13717](#)
- Zwaigenbaum L, Penner M. Autism spectrum disorder: advances in diagnosis and evaluation. BMJ. 2018;361:k1674. [pmid: 29784657](#) [doi: 10.1136/bmj.k1674](#)
- Guang S, Pang N, Deng X, Yang L, He F, Wue L, et al. Synaptopathology involved in autism spectrum disorder. Front Cell Neurosci. 2018;12:470. [pmid: 30627085](#) [doi: 10.3389/fncel.2018.00470](#)
- Hodges H, Fealko C, Soares N. Autism spectrum disorder: definition, epidemiology, causes, and clinical evaluation. Transl Pediatr. 2020;9(Suppl 1):S55-S65. [pmid: 32206584](#) [doi: 10.21037/tp.2019.09.09](#)
- Masi A, DeMayo MM, Glozier N, Guastella AJ. An overview of autism spectrum disorder, heterogeneity and treatment options. Neurosci Bull. 2017;33(2):183-93. [pmid: 28213805](#) [doi: 10.1007/s12264-017-0100-y](#)
- Rylaarsdam L, Guemez-Gamboa A. Genetic causes and modifiers of autism spectrum disorder. Front Cell Neurosci. 2019;13:385. [pmid: 31481879](#) [doi: 10.3389/fncel.2019.00385](#)
- Havdahl A, Niarchou M, Starnawska A, Uddin M, van der Merwe C, Warrier V. Genetic contributions to autism

کروموزوم‌های جنسی را با دقت بالا ردیابی نماید، در نتیجه QF-PCR به سرعت در زمینه تحقیقات ژنتیکی گسترش یافت و در سال ۲۰۰۱ در کلینیک‌های مربوطه به کار گرفته شد. در هر کروموزوم، توالی‌های تکرارشونده‌ای وجود دارد که تفاوت در تعداد این توالی‌های تکرارشونده، باعث می‌شود طول آن‌ها در کروموزوم‌های مختلف تفاوت داشته و در نتیجه همین موضوع، منجر به تمایز میان افراد خواهد شد. با کمک QF-PCR از طریق تکثیر توالی‌های تکرارشونده، می‌توان تعداد این کروموزوم‌ها را تعیین نمود. در QF-PCR از پرایمرهای فلورسنت و PCR استفاده می‌شود. بخش دیگری از نتایج این مطالعه مربوط به تأیید خط سلولی با روش QF-PCR بود.

سلولی HEK293T یکی از رایج‌ترین خطوط سلولی برای تولید پروتئین و مطالعات ویرایش ژن است. اطمینان از هویت ژنتیکی و عدم آلودگی یا جابجایی خطوط سلولی از اهمیت بالایی برخوردار است. از سلول‌های HEK293T، که حاوی ۳-۴ نسخه از ژن CDKL5 است استفاده کردیم (۱۰-۱۲). روش QF-PCR به عنوان یک روش سریع و دقیق برای تعیین جنسیت و بررسی ناهنجاری‌های کروموزومی شناخته می‌شود. نتایج به دست آمده در این مطالعه هویت خط سلولی را تأیید کرد که پیش‌نیاز مهمی برای تفسیر صحیح نتایج آزمایش‌های بعدی ویرایش ژن است (۱۳-۱۵).

مقایسه با مطالعات مشابه نشان داد که کارایی کلونینگ در سیستم CRISPR/Cas9 بسته به طراحی sgRNA و شرایط لیگاسیون متغیر است. در این مطالعه، بهینه‌سازی شرایط آنیلینگ و استفاده از آنزیم‌های با کارایی بالا منجر به موفقیت در کلونینگ شد (۱۶-۱۸). همچنین استفاده از QF-PCR به عنوان یک کنترل کیفی برای خط سلولی، نقطه قوت این مطالعه در بخش متدولوژی محسوب می‌شود. مطالعات پیشین نیز بر اهمیت تأیید هویت سلولی قبل از آزمایش‌های ژنتیکی تأکید داشته‌اند (۱۹-۲۱).

- spectrum disorder. *Psychol Med*. 2021;51(13):2260-73. **pmid:** 33634770 **doi:** 10.1017/S0033291721000192
16. Manoli DS, State MW. Autism spectrum disorder genetics and the search for pathological mechanisms. *Am J Psychiatry*. 2021;178(1):30-8. **pmid:** 33384012 **doi:** 10.1176/appi.ajp.2020.20111608
 17. Genovese A, Butler MG. Clinical assessment, genetics, and treatment approaches in autism spectrum disorder (ASD). *Int J Mol Sci*. 2020;21(13):4726. **pmid:** 32630718 **doi:** 10.3390/ijms21134726
 18. Yoon SH, Choi J, Lee WJ, Do JT. Genetic and epigenetic etiology underlying autism spectrum disorder. *J Clin Med*. 2020;9(4):966. **pmid:** 32244359 **doi:** 10.3390/jcm9040966
 19. Tang S, Terzic B, Wang I-TJ, Sarmiento N, Sizov K, Cui Y, et al. Altered NMDAR signaling underlies autistic-like features in mouse models of CDKL5 deficiency disorder. *Nat Commun*. 2019;10(1):265. **pmid:** 31201320 **doi:** 10.1038/s41467-019-10689-w
 20. Erdogan M, Gumus H, Oztop DB, Balta B, Korkmaz Bayram K, Dündar M. Investigation of CDKL5 gene mutations in autistic patients accompanied with intractable seizures. *Cumhuriyet Med J*. 2020;44(2):165-71. **doi:** 10.7197/cmj.1121531
 21. Lyst MJ, Bird A. Rett syndrome: a complex disorder with simple roots. *Nat Rev Genet*. 2015;16(5):261-75. **pmid:** 25732612 **doi:** 10.1038/nrg3897
 22. Liyanage VR, Rastegar M. Rett syndrome and MeCP2. *Neuromolecular Med*. 2016;16(2):231-64. **pmid:** 24615633 **doi:** 10.1007/s12017-014-8295-9
 23. Tokaji N, Ito H, Kohmoto T, et al. A rare male patient with classic Rett syndrome caused by MeCP2 mutation. *Am J Med Genet A*. 2018;176(3):699-702. **pmid:** 29341476 **doi:** 10.1002/ajmg.a.38595
 24. Cobolli Gigli C, Scaramuzza L, De Simone M, Rossi RL, Pozzi D, Pagani M, et al. Lack of Methyl-CpG Binding Protein 2 (MeCP2) Affects Cell Fate Refinement During Embryonic Cortical Development. *Cereb Cortex*. 2018;28(5):1846-56. **pmid:** 29351579 **doi:** 10.1093/cercor/bhx360
 25. Leonard H, Downs J, Benke TA, Swanson L, Olson H, Demarest S. CDKL5 deficiency disorder: clinical features, diagnosis, and management. *Lancet Neurol*. 2022;21(6):563-76. **pmid:** 35483386 **doi:** 10.1016/S1474-4422(22)00035-7
 26. Ran FA, Hsu PD, Wright J, Agarwala V, Scott DA, Zhang F. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nat Protoc*. 2013;8(11):2281-308. **pmid:** 24157548 **doi:** 10.1038/nprot.2013.143
 27. Loi M, Trazzi S, Fuchs C, Galvani G, Medici G, Gennaccaro L, et al. Increased DNA damage and apoptosis in CDKL5-deficient neurons. *Mol Neurobiol*. 2020;57(5):2244-62. **pmid:** 32002787 **doi:** 10.1007/s12035-020-01884-8