

فناوری کریسپر و ملاحظات ایمنی زیستی

CRISPR and biosafety considerations

عاطفه امینی نیسیانی^۱، عباس سعیدی^{۲*}، مسعود توحیدفر^{۲*}
Atefeh Amini Neisiani¹, Abbas Saidi^{2*}, Masoud Tohidfar^{2*}

۱- دانشجوی دکتری، ۲- استاد، گروه سلولی و بیولوژی مولکولی، دانشکده علوم و فناوری زیستی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران.

1. Ph.D. Student,

2. Professor, Department of Cell & Molecular Biology, Faculty of Life Sciences & Biotechnology, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: Email: *Corresponding Author

m_tohidfar@sbu.ac.ir و abbas.saidi@gmail.com

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۱/۲۱ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۳/۵)

چکیده

واژه‌های کلیدی

کشف و توسعه کریسپر انقلاب بزرگی در مهندسی ژنوم و ژن درمانی ایجاد کرده است. در سطح جهانی فعالیت‌های تحقیقاتی با استفاده از ویرایش ژنوم به طور مداوم در حال گسترش است و استفاده از این فناوری در حوزه کشاورزی و پزشکی در حال توسعه می‌باشد. بازار جهانی فناوری CRISPR در سال ۲۰۲۲ حدود ۳/۴ میلیارد دلار برآورد شد و انتظار می‌رود که با سرعت ۲۲/۳ درصد افزایش یابد و در سال ۲۰۲۷ به ۹/۲ میلیارد دلار برسد. از مزایای این فناوری می‌توان به ویرایش هدفمند ژنتیکی در زمان کوتاه بر خلاف اصلاح سنتی، اشاره کرد. علیرغم مزایای بسیاری که سیستم ویرایش ژنی کریسپر برای درمان بیماری‌ها و سلامت انسان دارد، ملاحظات ایمنی زیستی در رابطه با توسعه و استفاده از این فناوری نیز وجود دارد که شامل وجود ویرایش خارج از هدف، نگرانی در مورد وکتورهای مورد استفاده در این فناوری، روش‌های مختلف انتقال و درایو ژنی است. استفاده از این فناوری در برخی از کشورها مشمول قوانین نظارتی محصولات تراریخته و برخی از کشورهای دیگر این محصولات را جزء محصولات تراریخته محسوب نکرده و همانند محصولات حاصل از اصلاح سنتی از این قوانین نظارتی مستثنی می‌دانند. در این بررسی به قوانین موجود برای استفاده از محصولات حاصل از کریسپر در برخی از کشورهای جهان نیز اشاره شده است.

بازار جهانی کریسپر،
راهکارهای مدیریتی،
قوانین ایمنی زیستی،
مقررات ایمنی زیستی،
ویرایش ژنوم

<https://dorl.net/dor/20.1001.1.25885073.1402.12.1.10.4>

DOR:20.1001.1.25885073.1402.12.1.10.4

Research Article
Genetic Engineering and Biosafety
Journal 2023
Volume 12, Number 1, Pages: 131-144

<http://gebsj.ir/>

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

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

Abstract

With the discovery and development of CRISPR, genome engineering, and gene therapy have been revolutionized. Genome editing research is expanding globally, and this technology is increasingly used in agriculture and medicine. The global CRISPR technology market was estimated to be around \$3.4 billion in 2022 and is expected to grow at a rapid rate of 22.3% to reach \$9.2 billion in 2027. One of the advantages of this technology is that it can perform targeted gene editing in a short time, unlike traditional breeding methods. Despite the many advantages that CRISPR has for treating diseases and improving human health, there are also biosafety concerns associated with the development and use of this technology. Among these concerns are the presence of off-targets, concerns about the appropriate vectors used in this technology, the different transfer methods, and gene drive. The rules for using products from this technology in some countries are the same as the existing regulatory rules for transgenic products. Some other countries do not consider these products as transgenic products and these products are exempt from the regulations, similarly to products derived from traditional breeding. This review also mentions the existing laws for the use of CRISPR products in some countries of the world.

Keywords: Crisper Global Market, Management Strategies, Biosafety rules, Biosafety regulations, Genome editing

مقدمه

در چند سال گذشته، یک فناوری جدید انقلابی به نام CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) شناخته شده است، که به سرعت مهندسی ژنوم را متحول نموده و رویکردی قوی‌تر از فناوری‌های قبلی ارائه کرده است (Doudna et al., 2014; Ashaar-Ghadim et al., 2022). این روش براساس یک سیستم ایمنی تطبیقی موجود در باکتری‌ها و آرکئی‌ها است (Jinek et al., 2012; Nayeri et al., 2018). این میکروارگانیسم‌ها قطعات DNA را که پروتوسپیسر نامیده می‌شوند، از پلاسمیدها و فاژهای مهاجم در ژنوم خود ادغام می‌کنند و پس از حمله بعدی توسط همان مهاجم، از توالی‌های DNA ذخیره‌شده برای شناسایی ژنتیکی و از بین بردن مهاجم استفاده می‌کنند (Jinek et al., 2012). درک دانشمندان از این مکانیسم‌های بیولوژیکی، زیربنایی برای ساخت مجموعه‌ای از ابزارهای مهندسی ژنوم براساس سیستم CRISPR بود (DiCarlo et al., 2013). سیستم رایج CRISPR-Cas9، از آنزیم Cas9 برگرفته از استرپتوکوک پیورزنز (SpCas9) به همراه یک راهنما (gRNA) تشکیل شده است (Shao et al., 2014). راهنما، آنزیم Cas9 را به یک توالی خاصی از DNA هدایت

می‌کند تا ویرایش هدفمند صورت گیرد (Chapman et al., 2017). ویرایش‌ها را می‌توان در ژن‌ها، توالی‌های تنظیمی، مناطق ترجمه نشده یا مناطق بین ژنی انجام داد.

سیستم CRISPR-Cas9 کاربردهای متنوعی در پزشکی، در تحقیقات مربوط به درمان سرطان، عفونت‌های ویروسی، بیماری‌های ژنتیکی و شناسایی عوامل بیماری‌زا (Sharma et al., 2019) و در کشاورزی، برای کنترل تنش‌های زنده و غیر زنده و بهبود محصولات دارد (Eş et al., 2019). به طور کلی از کریسپر می‌توان برای حذف تک نوکلئوتید، حذف، درج و یا حتی تغییر یک ناحیه ژنی استفاده کرد. براساس نوع فرآیند ترمیم، تغییر DNA حاصل به عنوان SDN1، SDN2 و SDN3 طبقه بندی شده‌اند (Podevin et al., 2013). تغییرات SDN1 معمولاً منجر به ایجاد یک یا چند تغییر نوکلئوتیدی از جمله درج و حذف (InDel) و گاهی جابه‌جایی و وارونگی می‌شود. SDN2 متکی به حضور DNA دهنده است که دارای ویرایش‌های خاصی است که می‌تواند برای ایجاد جهش‌های مورد نظر به صورت هدفمند استفاده شود. نوع سوم، SDN3، به حضور DNA دهنده متکی است و منجر به درج هدفمند یک توالی خاص در یک مکان خاص در ژنوم می‌شود.

بازار جهانی فناوری کریسپر

از حدود ۱۸۰۳/۶ میلیون دلار متعلق به بازار کریسپر در سال ۲۰۱۹: به ترتیب سهم شرکت‌های بیوتکنولوژی و داروسازی حدود ۱۴۵۳/۹ میلیون دلار، بخش دانشگاهیان و موسسات تحقیقاتی دولتی ۱۹۳/۳ میلیون دلار و سایر سازمان‌های تحقیقاتی ذینفع حدود ۱۵۶/۴ میلیون دلار بوده است. بازار جهانی کریسپر در سال ۲۰۲۲ در بخش شرکت‌های بیوتکنولوژی و داروسازی به ۲/۶ میلیارد دلار رسیده است و به ۷/۳ میلیارد دلار (با پیش بینی نرخ رشد مرکب سالانه ۲۲/۱٪ در طول سال ۲۰۲۲-۲۰۲۷) در سال ۲۰۲۷ خواهد رسید. پیش بینی می‌شود که تا پایان سال ۲۰۲۷ شرکت‌های بیوتکنولوژی و داروسازی بخش عمده ای از بازار جهانی کریسپر را به خود اختصاص دهند (BCC Research., 2023).

بررسی‌ها نشان می‌دهد از ۱۸۰۳/۶ میلیون دلار بازار کریسپر در سال ۲۰۱۹، ۷۸۲ میلیون دلار از این بازار متعلق به آمریکای شمالی، ۴۵۸/۵ میلیون دلار متعلق به آسیا و اقیانوسیه، ۴۸۸ میلیون دلار متعلق به اروپا و مابقی که حدود ۷۵/۱ میلیون دلار است، مربوط به بازار این فناوری در سایر کشورها می‌باشد. در حال حاضر آمریکای شمالی بیشترین سهم بازار را در اختیار دارد (BCC Research., 2023).

به طور کلی بازار جهانی فناوری CRISPR در سال ۲۰۲۲ حدود ۳/۴ میلیارد دلار برآورد شد و انتظار می‌رود که به سرعت ۲۲/۳ درصد افزایش یابد و در سال ۲۰۲۷ به ۹/۲ میلیارد دلار برسد. شیوع فزاینده بیماری‌های مزمن، افزایش اختلالات ژنتیکی، افزایش کاربردهای کشف و توسعه دارو و افزایش سرمایه‌گذاری‌های دولتی و خصوصی عامل رشد بازار است. شرکت‌های زیادی در زمینه فناوری کریسپر درحال فعالیت‌اند. از جمله شرکت‌های کلیدی در بازار عبارتند از: CRISPR Therapeutics, Editas, Danaher, Caribou Biosciences Inc., Hera Biolabs, Medicine BCC (Intellia Therapeutics Inc.). (Research., 2023).

ملاحظات ایمینی زیستی محصولات حاصل از کریسپر

ملاحظات ایمینی هنگام طراحی sgRNA علیرغم مزایای بسیاری که سیستم ویرایش ژنی کریسپر برای درمان بیماری‌ها و سلامت انسان دارد، ملاحظات ایمینی زیستی در رابطه با توسعه و استفاده از این فناوری و فناوری تراریخته (Tohidfar et al., 2009; Alavi et al., 2009) وجود دارد. فناوری CRISPR همچنان در حال اصلاح است، اما برای متخصصان ایمینی زیستی مهم است که از پیشرفت‌های علمی در حال وقوع و روش‌هایی که در آن به پیامدهای ایمینی مربوطه پرداخته می‌شود، مطلع باشند.

یک چالش اصلی برای محققان اثرات ویرایش خارج از هدف است. این اثرات را می‌توان به عنوان برش ناخواسته و جهش در مکان‌های ژنومی غیر هدفمند که توالی مشابه اما نه کاملاً یکسان دارند، تعریف کرد (Modrzejewski et al., 2019). ویرایش‌های خارج از هدف، گاهی منجر به اختلال در عملکرد ژن یا بی‌ثباتی ژنومی می‌شود. این مسائل می‌تواند نگرانی‌هایی را برای استفاده از ویرایش ژن در درمان‌های بالینی ایجاد کند، زیرا جهش‌های ناخواسته می‌توانند از طریق تکثیر غیرقابل تنظیم سلول‌های سوماتیک، خطرهایی برای سلامتی ایجاد کنند. ویرایش‌های خارج از هدف ممکن است در برخی موارد به صورت فنوتیپی مشاهده شوند و یا با روش‌های مولکولی شناسایی شوند. جهش‌های خارج از هدف ممکن است به پنج عامل نسبت داده شوند. ۱. تعداد عدم تطابق، ۲. موقعیت عدم تطابق، ۳. محتوای G-C در توالی هدف، ۴. گونه‌های نوکلئاز تغییر یافته و ۵. روش انتقال. امروزه اکثر موجودات دارای ژنوم مرجع جامعی هستند. طراحی اجزای ویرایش ژن و انتخاب مکان‌های هدف منحصر به فرد با استفاده از توالی ژنوم مرجع و الگوریتم‌های بیوانفورماتیک می‌تواند در به حداقل رساندن احتمال وقوع رویدادهای خارج از هدف کمک کند (Young et al., 2019).

علت ایجاد ویرایش‌های خارج از هدف

دلیل اینکه چرا پروتئین Cas9 برخی از ویرایش‌های خارج از هدف را شناسایی و برش می‌دهد و برخی دیگر را برش نمی‌دهد، دقیقاً مشخص نیست. از آنجا که نشان داده شده است که پروتئین Cas9 در مناطق باز کروماتین کارآمدتر است، یکی از عوامل موثر

در نوکلئوتیدها، احتمال ایجاد ویرایش خارج از هدف بیشتر است (Hsu *et al.*, 2013). همچنین زمانی که عدم تطابق به سمت انتهای 5' است، ویرایش خارج از هدف کمتری ایجاد می‌شود. محققان ژنوم را در مکان‌های ویرایش خارج از هدف پیش‌بینی‌شده، توالی‌یابی می‌کنند. با این حال، این احتمال وجود دارد که برخی مکان‌های ویرایش خارج از هدف، پیش‌بینی و شناسایی نشوند. برای کاهش این نگرانی‌ها، محققان تجزیه و تحلیل خود را فقط به مکان‌هایی که توسط مدل‌های محاسباتی پیش‌بینی شده‌اند محدود نمی‌کنند و کل ژنوم را برای رویدادهای ویرایش خارج از هدف تجزیه و تحلیل می‌کنند. نتایج ارائه شده توسط روش‌های مبتنی بر توالی‌یابی نشان می‌دهد که همسانی توالی، به خودی خود، مبنای کافی برای پیش‌بینی مکان‌های ویرایش خارج از هدف نیست (Tycko *et al.*, 2016).

یکی از روش‌های کاهش تغییرات ناخواسته استفاده از gRNA کوتاه شده است. در سال‌های ابتدایی استفاده از فناوری کریسپر، gRNA به طور معمول ۲۰ نوکلئوتید مکمل با یک توالی هدف مورد نظر طراحی می‌شد. دانشمندان این فرضیه را مطرح کردند که برخی از این ۲۰ نوکلئوتید ممکن است غیرضروری باشند و حتی ویژگی CRISPR را مختل کنند. پس از مطالعات بیشتر، محققان دریافتند که تعداد زیادی از عدم تطابق‌ها در سه نوکلئوتید آخر که در طرف مقابل توالی PAM قرار گرفته‌اند رخ می‌دهد (Fu *et al.*, 2013) و کاهش تعداد نوکلئوتیدها در gRNA، کاهش تغییرات ناخواسته را به همراه خواهد داشت و به طور قابل توجهی جهش زایی نامطلوب را کاهش دادند و در عین حال کارایی ویرایش در سایت هدف را حفظ کردند (Fu *et al.*, 2014).

روش دیگر برای کاهش اثرات ناخواسته، ایجاد تغییر در پروتئین Cas9 است. دو دومین در پروتئین Cas9 به نام‌های HNH و RuvC در ایجاد برش DNA نقش دارد. محققان یکی از دو دومین ایجاد کننده برش Cas9 را غیرفعال کرده‌اند که به عنوان نیکاز عمل می‌کند (Ran *et al.*, 2013). نیکاز به جای برش در دو رشته (DSB)، فقط در یک رشته DNA برش ایجاد می‌کند. نیکاز توسط یک gRNA به سمت هدف مورد نظر هدایت می‌شود. با

بر برش Cas9 می‌تواند ساختار کروماتین باشد (Modrzejewski *et al.*, 2020). همچنین در آزمایشات بیوفیزیکی نشان داده‌اند که نه تنها بخش ابتدایی PAM (Protospacer Adjacent Motif) بلکه بخش انتهایی آن نیز می‌تواند به شدت از برش خارج از هدف جلوگیری کند. ساز و کارهای پیشنهادی برای کاهش این پدیده، تغییر تعادل در دومین HNH پروتئین Cas9 به سمت یک حالت غیر فعال است (Modrzejewski *et al.*, 2020; Mitchell 2020). در مقابل، عدم تطابق در موقعیت‌های بالادستی ۱۰-۱۵ sgRNA تقریباً تأثیر منفی بر ایجاد برش نمی‌گذارد، زیرا نه تنها تأثیر قابل توجهی بر پایداری دابلکس RNA:DNA ندارد، بلکه تأثیری بر تغییرات ساختاری HNH نیز ندارند (Modrzejewski *et al.*, 2020). بنابراین عدم تطابق تمامی نواحی sgRNA تأثیر یکسانی بر برش خارج از هدف ندارد.

راهکارهای مدیریتی کاهش ویرایش‌های خارج از هدف

یک راهکار اصلی برای کاهش فعالیت ویرایش خارج از هدف و در نتیجه افزایش اختصاصیت، طراحی هدفمند gRNA است. به طور معمول، چندین gRNA بالقوه می‌توانند ویرایش ژن هدف را انجام دهند، اما هر gRNA احتمال خطر خاص خود را برای ایجاد تغییرات ناخواسته دارد. انتخاب یک مکان هدف منحصربه‌فرد که از نظر ژنتیکی تعداد کمی مکان‌های خارج از هدف مشابه در سرتاسر ژنوم داشته باشد، می‌تواند فعالیت ویرایش خارج از هدف را به حداقل برساند (O'Brien *et al.*, 2014). پیش‌بینی محاسباتی، از همولوژی توالی برای شناسایی فعالیت بالقوه ویرایش خارج از هدف استفاده می‌کند که با ارزیابی تجربی همراه است. ابزارهای مبتنی بر وب برای پیش‌بینی مکان‌های ویرایش خارج از هدف و رتبه‌بندی gRNAها بر این اساس در دسترس هستند، که مبنای کار و روش رتبه‌بندی آنها متفاوت است. برخی از برنامه‌ها gRNAها را تنها بر اساس شباهت توالی بین gRNA و نواحی پیش‌بینی شده ویرایش خارج از هدف رتبه‌بندی می‌کنند. برنامه‌های دیگر عوامل متعددی مانند تعداد و مکان عدم تطابق‌هایی که gRNA با نواحی ویرایش خارج از هدف دارد را در نظر می‌گیرند. اگر یک gRNA بسیار شبیه به یک ناحیه ویرایش خارج از هدف باشد، با کمتر از ۳ عدم تطابق

رویکرد نیکاز جفتی، از دو gRNA استفاده می‌شود: یکی برای هدف قرار دادن یک محل در یک رشته و دیگری برای هدف قرار دادن ناحیه در رشته مقابل. بنابراین در واقع یک DSB در محل مورد نظر اتفاق می‌افتد. با این حال، فراوانی جهش‌های ناخواسته تا حد زیادی کاهش می‌یابد، احتمالاً به این دلیل که هر شکاف تک رشته‌ای که در مکان‌های ناخواسته اتفاق می‌افتد، به سرعت ترمیم می‌شود (Ran et al., 2013).

یک استراتژی که توسط دانشمندان برای ویرایش دقیق ژنوم با کاهش اثرات ناخواسته توسعه یافته، شامل ترکیب dCas9 (Nuclease-deactivated Cas9) با یک آنزیم خاص است که می‌تواند جهش‌های نقطه‌ای را بدون معرفی به عنوان DSB‌ها اصلاح و یا ایجاد کند. هنگامی که در دومین‌های HNH و RuvC آنزیم Cas9 که مربوط به ایجاد برش در دورشته DNA هستند، جهش ایجاد شود، آنزیم dCas9 ایجاد می‌شود که توانایی ایجاد برش رشته DNA را ندارد و تنها عمل شناسایی را انجام می‌دهد. در نتیجه از تشکیل InDel که اغلب به دنبال یک DSB رخ می‌دهد، اجتناب می‌کند. با توسعه بیشتر، این رویکرد تغییرات ژنومی ناخواسته کاهش می‌یابد (Guilinger et al., 2014). به عنوان مثال استفاده از dCas9 ادغام شده با آنزیم سیتیدین دامیناز و یا آدنوزین دامیناز، به همراه gRNA می‌تواند در مکان هدف بدون ایجاد شکست dsDNA نوکلئوتیدها را به یکدیگر تبدیل کند. این استراتژی برای ایجاد موثر جهش نقطه‌ای در گیاهانی مانند: گندم، ذرت و برنج استفاده شده است (Zong et al., 2017).

وکتور مورد استفاده

استفاده از وسایل و تجهیزات مناسب در هر فناوری، بخش مهمی از آن فناوری است. یکی از مهم‌ترین وسایل و تجهیزات استفاده شده در سیستم کریسپر وکتور است. از میان وکتورهای موجود، وکتورهای ویروسی بیشترین استفاده را در فناوری کریسپر دارند. احتمال خطر استفاده از وکتورهای ویروسی متفاوت است. اگر به هر دلیلی فعال شوند، می‌توانند بیماری‌زایی ایجاد کنند. هر کدام براساس احتمال خطر استفاده در سطوح ایمینی متفاوتی دسته‌بندی می‌شوند که مهم‌ترین آنها به شرح زیر است:

وکتورهای لنتی ویروس: از ویروس عامل بیماری ایدز اشتقاق یافته و در فناوری کریسپر، از لنتی ویروس معمولاً برای آزمایش‌هایی با هدف ناک اوت کردن و یا سرکوب هدفمند یک یا چند ژن، استفاده می‌شود. جدیدترین سیستم‌های لنتی ویروس ژن‌های ضروری را در ۳ پلاسمید تقسیم می‌کنند، بنابراین احتمال تولید ذرات ویروسی زنده در سلول‌ها را کاهش می‌دهند (Xu et al., 2019). به عنوان یک رتروویروس، در ژنوم میزبان ادغام می‌شود و می‌تواند به عنوان یک وکتور انتقال با هدف تقویت ژن در سلول‌های در حال تقسیم باشد. با این حال، برای انتقال CRISPR/Cas9، ادغام ژنوم میزبان می‌تواند منجر به جهش‌زایی درج ناخواسته یا ویرایش خارج از هدف شود (Kotterman et al., 2019; Xu et al., 2015). یک لنتی ویروس غیر یکپارچه برای جلوگیری از ادغام ناخواسته مهندسی شده است. در این ناقل‌ها، جهش‌های انتخابی در ناحیه کدکننده ایتگرز القا شدند تا فعالیت‌های ایتگرز را بدون تأثیر بر رونویسی معکوس و انتقال کمپلکس پیش‌ادغام‌کننده به درون هسته حذف کنند (Xu et al., 2019). در این وکتور به علت حذف تعداد زیادی از پروتئین‌های عامل ایجاد بیماری و سازمان دهی و تنظیم آن از طریق پلازمیدهای گوناگون احتمال به وجود آمدن ویروس با قابلیت تکثیر و بیماری‌زایی کاهش یافته است. ناقل‌های لنتی ویروسی در سطح ایمینی دو دسته بندی می‌شوند (Zetsche et al., 2016).

وکتورهای رتروویروسی: این حامل‌های ویروسی براساس نوع سلولی که آلوده می‌کنند، در سطوح ایمینی متفاوتی دسته بندی می‌شوند. سطح ایمینی برای حامل‌هایی که سلول‌های انسانی را آلوده می‌کنند، دو و سایر حامل‌ها، بسته به ژن‌های هدف یک در نظر گرفته می‌شود (Zetsche et al., 2016).

وکتورهای ویروسی وابسته به آدنو (AAV): از SaCas9 به همراه یک حامل ویروسی AAV برای ویرایش ژنی در شرایط *in vivo* می‌توان به طور گسترده استفاده کرد. اگرچه دسته‌های زیادی از ناقل‌های ویروسی وجود دارد، ویروس‌های مرتبط با آدنو تا حد زیادی برای ویرایش ژنوم CRISPR استفاده شده‌اند. زیرا فقط در دوزهای بالا یک سمیت خفیف در مدل‌های حیوانی ایجاد می‌کنند. کانکامترهای AAV می‌توانند بیان پایداری را ارائه دهند،

آنها در ارتباط است، دارد. در پژوهشی دیگر بعد از انتقال پروتئین Cas9 به موش یک پاسخ ایمنی القا شد. این دسته پژوهش‌ها اثبات می‌کند که انسان مدت‌ها قبل از ظهور سیستم CRISPR/ Cas9 در معرض پروتئین Cas9 قرار گرفته است. اگرچه این نتیجه‌گیری، خطرات احتمالی مرتبط با CRISPR باطل نمی‌کند، اما مطمئناً نگرانی ما را کمتر و به ما در مورد این فناوری اطمینان بیشتری می‌دهد (Deb et al., 2022). با این حال می‌توان با استفاده روش‌هایی اقدام به حذف Cas9 پس از چند نسل از موجود اصلاح شده کرد.

ملاحظات ژن درایو (محرک ژنی): درایو ژنی مبتنی بر کریسپر Cas9 شامل ژن رمز کننده پروتئین Cas9 و یک sgRNA است. اگر کاست آن روی یک کروموزوم قرار گیرد، فعالیت Cas9 می‌تواند سبب کپی شدن درایو ژنی به کروموزوم دیگر شود و در نتیجه میزان وراثت پذیری آن را افزایش داده و به سرعت در جمعیت گسترش یابد (Khan et al., 2018). در واقع، درایو ژن نوعی از روش‌های مهندسی ژنتیک است که مجموعه خاصی از ژن‌ها را در یک جمعیت منتشر می‌کند و به اصلاح ژن‌ها می‌پردازد، به طوری که دیگر از قوانین وراثت مندلی پیروی نکنند و به این ترتیب ژن‌ها به سرعت در میان یک جمعیت گسترش یافته است (Esvelt et al., 2014). برای ایجاد محرک ژنی به واسطه کریسپر، کافی است که یک ژن اندونوکلاز در جایگاه برش خودش قرار گیرد (Burt et al., 2003). تمامی نتایج اندونوکلاز مورد نظر را به ارث می‌برند. در فناوری کریسپر انتقال یک کاست ژنی شامل Cas9، sgRNA و توالی همولوگ مناسب به موجود مورد نظر، محرک ژنی مبتنی بر sgRNA را ایجاد می‌کند. در موجودات هتروزیگوت، پس از ایجاد برش در کروموزوم وحشی توسط اندونوکلاز، ژن موجود روی کروموزوم همولوگ خود را به عنوان یک الگو برای ترمیم استفاده می‌کند و به این ترتیب هموزیگوت ایجاد می‌شود. حتی در صورتی که هیچ توالی همولوگی در دسترس سلول نباشد همچنان محرک ژنی اتفاق خواهد افتاد. برای جلوگیری از ایجاد محرک ژنی عدم استفاده از یک وکتور برای انتقال همزمان ژن کد کننده Cas9 و sgRNA و استفاده از وکتورهای مجزا همانند راهبرد تقسیم اجزای حامل ویروسی در چندین پلازمید برای انتقال این دو

زیرا آنها به مدت طولانی در سلول‌های غیرقابل تقسیم وجود دارند (Xu et al., 2019). ایمنی زایی در برابر کسپید AAV یکی از چالش‌های مرتبط با ایمنی برای این سیستم ناقل است. از آنجایی که AAV بدون پوشش است و دارای پوسته پروتئینی است، برای سلول‌های ایمنی میزبان بسیار آسان است که علیه آن آنتی بادی تولید کنند. در حال حاضر، پوشش پروتئین کسپید AAV را می‌توان از طریق تغییر محل آنتی ژن یا کسپید کایمیریک AAV برای کاهش میل اتصال به آنتی بادی‌های AAV، بهینه سازی و مهندسی کرد که از پاسخ ایمنی میزبان فرار کند. وکتورهای ویروسی وابسته به آدنو همانندسازی ناقصی دارند و قابلیت تکثیر ندارند از این رو سطح ایمنی آن‌ها اگر اثرات بالقوه‌ای مانند آپوپتیک (مرگ برنامه ریزی شده سلول)، موتاژن یا توکسیک نداشته باشد، یک در نظر گرفته شده است. اما در صورتی که برای انتقال سازه مورد نظر از طریق AAV، یک ویروس کمکی به جای پلاسمید کمکی استفاده شود، سطح ایمنی دو در نظر گرفته می‌شود (Zetsche et al., 2016).

یکی دیگر از ملاحظات که در فناوری کریسپر وجود دارد، Cas9 است. آنجایی که اجزای CRISPR از باکتری‌ها مشتق شده‌اند، سیستم ایمنی میزبان می‌تواند به آنها واکنش نشان دهد. در نتیجه، یکی از چالش برانگیزترین جنبه‌های کارآزمایی بالینی، ایمنی زایی اختصاصی پروتئین Cas9 است. با این حال، همه ناقل‌های ویروسی می‌توانند ایمنی اختصاصی Cas9 داشته باشند (Hakim et al., 2021). طی پژوهشی توالی اسید آمینه Cas9 از باکتری *S. pyogenes* با پروتئین‌های باکتریایی که انسان در محیط در معرض آنها قرار دارد، مقایسه شد. نتایج این پژوهش نشان داده که توالی اسید آمینه پروتئین Cas9 بیش از ۸۰ درصد با باکتری‌های معمولی و بیماری‌زا مانند استرپتوکوکوس دیسگالاکتیه، کلبسیلا پنومونیا، استافیلوکوکوس اورئوس و استافیلوکوکوس کانیس شباهت دارد و ۲۳ تا ۵۸ درصد شباهت با باکتری‌های پروبیوتیک مانند استرپتوکوکوس ترموفیلوس و ۳۵ درصد شباهت با لاکتوباسیلوس پلانتروم که در محصولات تخمیری مانند ماست و پنیر وجود دارد (El-Mounadi et al., 2020; Khemariya et al., 2016;). نتایج نشان می‌دهد توالی اسید آمینه Cas9 (Behera et al., 2018). قرابت زیادی با توالی موجود در باکتری‌هایی که انسان روزانه با

موجودات ویرایش شده را محدود می کنند یا موجودات مهندسی شده را شکننده تر و از بین رفتن آن را آسان تر کند.

۶) طراحی محرک معکوس (Reversal drives) تا تغییراتی که به واسطه محرک ژنی پیشین ایجاد شده است را به حالت اولیه باز گرداند. به صورتی که تغییرات ژنتیکی که قبلاً انجام شده است را ریشه کن کند و موجود را به حالت اولیه باز گرداند (Burt., 2003). برای این کار می توان از طریق طراحی رونوشت مکمل درایو ژن پیشین عمل کرد اما در صورتی که محرک معکوس توانایی ترمیم توالی را به صورت دقیق نداشت، می توان توالی کد کننده پروتئین اصلی را از طریق یک راهکار کد گذاری دوباره بازیابی کرد (Oye et al., 2014).

برای تمام پژوهش های مربوط به ژن درایو در آزمایشگاه، باید حداقل از دو راهکار محصور کردن موجودات برای به حداقل رساندن احتمال خطر تغییر جمعیت های وحشی استفاده شود. استفاده تنها از یک روش در صورتی توجیه پذیر است که مراجع ذیصلاح ایمنی زیستی تشخیص دهند که احتمال رهاسازی را تا حد قابل قبولی کاهش می دهد. از آنجا که پیشرفت علم به حمایت ملی متکی است، انتشار تصادفی یک ژن درایو هزینه گزافی برای جامعه علمی خواهد داشت و بی اعتمادی به دانشمندان برای پیشبرد و توسعه فناوری های جدید را به همراه دارد (Esvelt et al., 2014).

روش های تشخیص محصولات حاصل از کریسپر

استفاده موفقیت آمیز از CRISPR در طیف گسترده ای از کاربردها، توجه جهانی را در توسعه، سرمایه گذاری و تجاری سازی محصولات ویرایش ژن به خود جلب کرده است (Brinegar et al., 2017). هنگامی که محصولات ویرایش ژنومی شده به عنوان محصولات تجاری به کار گرفته می شوند، نیاز به ردیابی محصولات و تایید محصول خواهد بود. روش مورد نیاز برای تشخیص ویرایش بسته به این که آیا ویرایش می تواند مستقیماً مشخص شود یا نیاز به یک ژن نشانگر انتخابی است، متفاوت است. روش های متفاوتی برای دستیابی به این اهداف وجود دارد، اما روش ها اغلب بر اطلاعات حاصل توالی ها و ژنوم متکی هستند. برای به دست آوردن کارآمدترین سیستم، مهم است که

فاکتور موثر خواهد بود (Esvelt et al., 2014) و به این ترتیب احتمال قرار گیری دو قطعه روی یک کاست بسیار کاهش می یابد و به این ترتیب می توان پس از چندین نسل Cas9 را از سیستم حذف کرد (DiCarlo et al., 2015). یکی از بهترین روش ها، نگه داشتن ژن رمز کننده Cas9 به صورت اپی زومال (بدون درج در کروموزوم) و یا در لوکوس کروموزومی ایمن AAVS1 است که از این طریق می توان از گسترش آن تا هر زمانی که نیاز باشد جلوگیری کرده و ویرایش ژنی را تحت کنترل در آورد (DiCarlo et al., 2015).

راهکارهایی در زمینه مدیریت احتمال خطرهای محرک ژنی، در بهبود شرایط ایمنی مفید خواهد بود. از جمله راهکارهای مدیریتی عبارتند از:

۱) استفاده از روش هایی که تنها موجودات تراریخته را تحت تاثیر قرار دهد و بر موجودات وحشی بی اثر است. به عنوان مثال می توان از ژن رمز کننده Cas9 و sgRNA ای استفاده کرد که یک توالی سنتتیک را هدف قرار می دهد (Esvelt et al., 2014).

۲) انجام آزمایش در منطقه جغرافیایی که شرایط اقلیمی برای زندگی موجودات وحشی مورد نظر مناسب نباشد. در نتیجه موجودات رها شده نتوانند جفت خود را پیدا کرده و تولید مثل کنند.

۳) آزمایش روی موجوداتی انجام شود که تولید مثل غیر جنسی دارد یا به هر دلیلی نمی توانند با تیپ وحشی خود، تولید مثل کنند. به عنوان مثال رده دروزوفیلا ملانوگاستر که اتوزوم ترکیبی دارد در صورت آمیزش با تیپ وحشی این موجود به طور کامل نابارور است (Fitz-Earle et al., 1973).

۴) ایجاد مانع بین موجودات مورد نظر و محیط بیرون است که بسته به موجود، روش محصور کردن متفاوت است. این محصور ماندن تا زمانی که موجود زنده است و فعالیت تولید مثلی دارد، ادامه یابد.

۵) استفاده از ژن های خود محدود شونده (self-limiting gene) یا ژن های پایان دهنده (gene terminator) است که طول عمر

می‌توان از این روش استفاده کرد. روش CAPS به این صورت است که ابتدا قطعه مورد هدف پروتئین Cas9 با استفاده از PCR تکثیر می‌شود. سپس محصول حاصل از PCR با یک یا چند آنزیم محدود کننده برش داده می‌شود و در نهایت الکتروفورز انجام می‌گردد تا براساس مقایسه باندهای موجود در نمونه حاصل از کریسپر و نمونه شاهد تغییر ایجاد شده، تشخیص داده شود.

تکنیک TaqMan و KASP (Kompetitive Allele Specific PCR): تکنیک TaqMan به طور گسترده ای جهت تشخیص مکان‌های چند شکلی شناخته شده و خاص آل در یک ژنوم به خصوص برای شناسایی SNP، درج‌ها/حذف‌های کوچک (INDEL) و انواع حضور یا عدم حضور یک قطعه با اطمینان بالایی استفاده می‌شود. با این حال، TaqMan گران است و از نظر طراحی سنسجش انعطاف پذیری کمتری دارد. تکنیک KASP به عنوان جایگزینی برای TaqMan با هدف کاهش هزینه و بهبود کارایی تشخیص‌توسعه داده شد و اکنون به یک فناوری معیار جهانی تبدیل شده است. KASP یک تکنیک تشخیصی مبتنی بر فلورسانس از واکنش زنجیره ای پلیمراس است (Ayalew et al., 2019).

PCR دیجیتال: فناوری PCR دیجیتال یک تکنولوژی با دقت و حساسیت بالا برای تشخیص مقدار DNA می‌باشد. فناوری دیجیتال PCR (dPCR) از لحاظ مواد اولیه موردنیاز برای انجام واکنش و مراحل تکثیر مانند Real time PCR است. با این تفاوت که می‌تواند اطلاعاتی از میزان قطعی نوکلئیک‌اسیدهای موجود در نمونه بدون نیاز به منحنی‌های استاندارد و رفرنس‌ها به دست آورد. حساسیت این روش به حدی است که می‌تواند برای سنسجش جهش، تشخیص ایندل (۱ تا ۵۰ جفت باز) و حذف‌های بزرگ (>۳۰۰ جفت باز) مورد استفاده قرار گیرد. برای غربالگری با کارایی بالا، تنوع تعداد کپی و جهش‌های ناشی از ویرایش ژن نیز مناسب است (Shillito et al., 2021).

طراحی کاوشگر: کاوشگرها قطعاتی از جنس DNA یا RNA هستند که معمولاً بین ۱۰۰ تا ۱۰۰۰ نوکلئوتید طول دارند. پروب‌ها معمولاً با ترکیباتی رادیواکتیو یا غیر رادیواکتیو نشاندار می‌شوند. در انتهای زنجیره بلند پروب تک رشته ای فلوروکروم یا

موفقیت یا عدم موفقیت یک روش ویرایش ژنومی در سریع ترین زمان ممکن مشخص شود. سهولت تشخیص ویرایش ژنوم به نوع ویرایش انجام شده بستگی دارد. برای اثبات گیاهان ویرایش شده، می‌توان از روش‌های تشخیصی زیر استفاده کرد:

سنسجش ایمنی (Immunoassay): در صورتی که ویرایش ژنومی منجر به ایجاد یک پروتئین جدید و یا تغییر محسوس در پروتئین شود، شناسایی محصول ویرایش شده از طریق سنسجش ایمنی امکان پذیر می‌باشد. اما اکثر ویرایش‌های ژنومی شامل تغییراتی در پروتئین نمی‌شود، بلکه نتیجه حذف یا اضافه شدن توالی در یک ژن هدف است که بر سطح بیان پروتئین، اما نه ساختار آن تاثیر می‌گذارد. این باعث می‌شود که ویرایش‌های کوچک یک ژن با روش‌های ایمنی سنسجی قابل تشخیص نباشد. بنابراین تشخیص یک صفت اصلاح شده ژنومی تقریباً در هر مورد نیاز به بررسی تغییر DNA دارد.

PCR: یک انتخاب مناسب و کم هزینه برای تشخیص طیف گسترده ای از اندازه‌های درج و حذف است. بسته به اندازه ویرایش، محصول PCR ممکن است بروی ژل پلی آکرل آمید یا آگارز (چند جفت باز تا کیلوباز) الکتروفورز شود. PCR معمولی با کمک تکثیر، DNA را روی ژل الکتروفورز قابل رویت و تشخیص براساس اندازه قطعه را ممکن کرده است. توالی یابی سانگر یک آمپلیکون حاصل از PCR همراه با آغازگر می‌تواند برای روشن کردن مناطق نامشخص در مجاورت InDel استفاده شود. دو نوع PCR، qPCR و PCR نقطه پایانی به طور گسترده برای تشخیص SNPs، InDels استفاده می‌شود (Lomov et al., 2019). درج‌ها به طور معمول از طریق ترمیم همولوژی (HR) با استفاده از قطعاتی در Doner DNA ایجاد می‌شوند. برای تشخیص آن‌ها می‌توان از طراحی آغازگر و انجام PCR استفاده کرد تشخیص درج‌های بزرگ نسبت به درج‌های کوچک با روش PCR آسان تر و با اطمینان بیشتری همراه است (Shillito et al., 2021).

توالی‌های چند شکلی حاصل از برش محصول PCR (Cleaved Amplified Polymorphic Sequence): جهت تشخیص تغییر تک نوکلئوتیدی ایجاد شده در محصولات حاصل از کریسپر

DNA (2009; Duensing *et al.*, 2018). ویرایش ژن، به تغییرات اشاره دارد که شبیه به تغییراتی است که به طور بالقوه و طبیعی (مانند حذف، جایگزینی و درج نوکلئوتیدها) توسط اصلاح سنتی گیاهان ایجاد می‌شود (Surridge, 2018). اساس قوانین گسترش و تجارت بین المللی موجودات اصلاح ژنتیکی شده در پروتکل ایمنی زیستی کارتاها ایجاد شده است. با این حال، تولید، مصرف و قوانین گیاهان اصلاح ژنتیکی شده از الگوهای متفاوتی پیروی می‌کنند. در حالی که برخی کشورها مصرف آن را رد و تولید را ممنوع می‌کنند، برخی دیگر آنها را کشت و مصرف می‌کنند (Garcia Ruiz *et al.*, 2018).

ایجاد دستور العمل برای گیاهان ویرایش شده در کشورهای مختلف متفاوت است و معمولاً بر دو چارچوب استوار است. برخی از کشورها مبتنی بر روش هستند، در حالی که برخی دیگر مبتنی بر محصول، و بر اساس اقدام به قانون گذاری در رابطه با مصرف این محصولات نموده‌اند (Eckerstorfer *et al.*, 2019; Van Vu *et al.*, 2019). در حالی که برخی کشورها مقررات ایمنی زیستی را برای گیاهان ویرایش شده ژنوم ایجاد کرده‌اند، اکثر کشورها هنوز قانون مشخصی برای استفاده از محصولات وضع نکرده‌اند (Eckerstorfer *et al.*, 2019). به همین دلیل به بررسی قوانین موجود در کشورهای مختلف می‌پردازیم:

وزارت کشاورزی ایالات متحده چنین بیان کرده است که ویرایش ژنوم در برخی موارد معادل اصلاح معمولی است و تا زمانی که هیچ DNA خارجی (ترانس ژن) در طول ویرایش به محصول مورد نظر وارد نشود شامل ضوابط ایمنی زیستی نیستند و نیازی به بررسی در چارچوب نظارتی آمریکا ندارد (Waltz, 2016).

در اسرائیل (رژیم اشغال گر) در طی بیانیه ای گیاهان اصلاح شده با ویرایش ژنوم، مشمول قانون گیاهان و ارگانسیم‌های اصلاح شده ژنتیکی نیستند و به عنوان GMO در نظر گرفته نمی‌شوند. کمیته ملی گیاهان تراریخته بیان کرده گیاهان ویرایش شده ژنومی تحت مقررات زمانی که فقط حذف‌های کوچک یا ویرایش‌های توالی اتفاق می‌افتد، مشمول قانون نظارتی نیستند. در سال ۲۰۱۹، وزارت کشاورزی اسرائیل برنامه‌هایی را برای سرمایه‌گذاری حدود ۱۷ میلیون دلار جهت ایجاد یک مرکز ملی ویرایش ژنوم

یک ترکیب رادیواکتیو وجود دارد. هنگامی که به توالی مکمل خود روی الگوی DNA متصل شود، فلوروکروم آزاد کرده و فلورسانس را منتشر می‌کند که توسط ردیاب اندازه گیری می‌شود. بنابراین میزان فلورسانس ساطع شده با هیبریداسیون پروب تناسب مستقیم دارد. به طور مستقیم می‌تواند جهت شناسایی جهش‌ها و تغییر تعداد کپی‌ها بر روی کروموزوم استفاده شود. کاوشگرها برای تشخیص وجود یا عدم وجود توالی هدف در یک نمونه از طریق ایجاد یا عدم ایجاد هیبریداسیون، استفاده می‌شود. با استفاده از روش هیبریداسیون مبتنی بر کاوشگر، تعداد تغییرات کپی بزرگتر مانند وارونگی، تکثیر بزرگتر، درج یا حذف نیز قابل بررسی می‌باشد.

توالی یابی: توالی یابی یک ابزار قدرتمند برای تشخیص تغییرات DNA است. استفاده از روش توالی یابی برای تشخیص ویرایش‌های ژنومی در مقایسه با روش‌های مبتنی بر PCR هزینه بالاتری دارد. بنابراین، یک رویکرد توالی‌یابی هدفمند معمولاً زمانی استفاده می‌شود که تشخیص از طریق PCR به دلیل محدودیت‌های فنی و یا در موارد تحلیل توان عملیاتی بالا امکان‌پذیر نباشد (Shillito *et al.*, 2021).

قوانین ایمنی زیستی کریسپر در ایران و جهان

در کشورهای مختلف برای ضابطه‌مند کردن و رفع ابهام محصولات ویرایش ژنتیکی شده به وسیله فناوری کریسپر، مراجع قانون گذار باید تعریف دقیقی از اصطلاح ویرایش ژن ارائه دهند و قانون‌هایی را مربوط به این فناوری خاص و مجزا از تراریختگی تصویب کنند. نبود یک تعریف مشخص در مستندات جهانی از اصطلاح ویرایش ژن و وجود تفاسیر و برداشت‌های متفاوت از اصطلاح ویرایش ژنی و تراریختگی سبب ایجاد ابهام در رویه‌های قضایی یا اثرات متفاوت یا حتی متناقض در این ساختار حقوقی می‌شود. بنابراین در بحث ایمنی زیستی ضابطه مند کردن فناوری ویرایش ژن، نیازمند وضع و اعمال قوانین متفاوتی از موجود زنده تغییر شکل یافته ژنتیکی براساس مفاد دستورالعمل کارتاها می‌باشد (Parvin *et al.*, 2017).

اصطلاح تراریخته به گیاهانی اطلاق می‌شود که ژنوم آنها به گونه‌ای تغییر یافته که به طور طبیعی رخ نمی‌دهد (Alavi *et al.*,

اعلام کرد. اسرائیل به شدت تحقیق و توسعه محصولات کشاورزی جدید و نوآورانه را در زمینه‌های گیاهی و دامی ترویج می‌کند (Minister of Agriculture and Rural Development., 2019).

کانادا به اصول علمی مندرج در چارچوب مقررات داخلی خود برای گیاهان با صفات جدید که پیش‌تر وضع کرده، متعهد باقی مانده است. طبق دستورالعمل این کشور همه محصولات گیاهی، چه از طریق بیوتکنولوژی (به عنوان مثال، تراریخت یا ویرایش ژنوم) یا اصلاح متعارف از جمله جهش زایی کلاسیک به دست آمده باشند، تحت نظارت یکسانی در چارچوب نظارتی برای گیاهان با صفات جدید قرار دارند و از نظر آلرژی‌زایی، سمیت و تأثیرات روی محیط زیست و ارگانیسم‌های غیرهدف مورد بررسی قرار می‌گیرند. در صورتی که برای سلامت انسان و محیط زیست خطری نداشته باشد، مجوز تولید و مصرف می‌یابد (Smyth., 2017). با توجه به اینکه بیش از ۱۰۰ گیاه تغییر ژنتیکی شده در سال ۲۰۱۶ به وسیله سازمان بازرسی غذا مورد تایید قرار گرفت، بنابراین به نظر می‌رسد احتمال تایید فراورده‌های ویرایش شده از طریق کریسپر بسیار بالا باشد (Parvin et al., 2017).

در آرژانتین دستورالعمل نظارتی همسو با پروتکل کارتاها برای ایمنی زیستی توسعه یافته است و بر ارزیابی مورد به مورد تکیه دارد. بسته به ارزیابی‌های مربوطه با شاخص‌های ایمنی زیستی، سلامت غذایی و تاثیر تجاری سازی محصول نو ترکیب بر تجارت و اقتصاد این کشور متفاوت است. اگر از یک فناوری تراریخته در توسعه یک محصول استفاده شود که در آن، محصول نهایی عاری از تراریختگی باشد، آنگاه این محصول را می‌توان به عنوان غیرتراریخته طبقه بندی کرد. شیلی و برزیل از قوانین وضع شده در آرژانتین پیروی کردند. هر دو محصولات ویرایش شده ژنی را به صورت موردی بررسی می‌کنند و در صورت عدم درج ژن اضافه، آنها را از مقررات معاف می‌کنند (Duensing et al., 2018).

کشورهای اتحادیه اروپا از نظر سیاسی با محصولات اصلاح شده ژنتیکی مخالف هستند. دیوان دادگستری اتحادیه اروپا در طی حکمی اعلام کرد که محصولات ویرایش ژنی شده باید همانند

موجودات تراریخته مشمول مقررات سختگیرانه ای باشند و تنها تکنیک‌های جهش‌زایی که به طور معمول در تعدادی از برنامه‌ها استفاده می‌شوند و دارای سابقه ایمنی طولانی هستند، از این قاعده مستثنی اند (Waltz, 2016b; El-Mounadi et al., 2020).

بر اساس حکم دادگاه عالی فرانسه علاوه بر ویرایش ژنوم، ارگانیسم‌هایی که از طریق «جهش‌زایی آزمایشگاهی» (کلاسیک) به دست می‌آیند، مشمول مقررات نظارتی GMO هستند. کشت یا تجارت چنین گونه‌هایی تنها در صورتی ممکن است که طبق مقررات GMO تأیید شده باشد (Bartsch et al., 2020).

در استرالیا، قانون فناوری ژن (GT Act) تصریح می‌کند که GMO موجودی است که توسط تکنیک‌های تغییر دهنده ژن یا سایر مواد ژنتیکی، تولید می‌شود. در سال ۲۰۱۹، طی اصلاحیه ای ارگانیسم‌های ویرایش شده از طریق CRISPR-Cas9 را از سایر محصولات تغییر ژنی یافته تفکیک کردند (Mallapaty., 2019).

در نیوزلند، قوانینی برای واردات، توسعه، آزمایش مزرع‌ای روی محصولات اصلاح ژنتیکی شده (GMOs) تنظیم شده است. این کشور سخت‌ترین و جامع‌ترین قانون را برای موجودات اصلاح ژنتیکی شده دارد. در نتیجه، هیچ گونه محصول تجاری GMO در کشور کشت نمی‌شود و گوشت و هیچ محصول تراریخته‌ای در این کشور به فروش نمی‌رسد. علاوه بر این، مواد غذایی فرآوری شده که حاوی مواد تراریخته وارداتی هستند از نظر ایمنی آزمایش می‌شوند و باید برچسب گذاری شوند. در سال ۲۰۱۶، قانون با ماده‌ای اصلاح شد که بیان می‌کرد که اصلاح گیاهان فناوری ویرایش ژنوم مشمول مقررات مشابه محصولات اصلاح ژنتیکی شده (GMOs) است (Shimatani et al., 2017).

چین با تمرکز بر بهبود صفات بازار محور، به طور گسترده در تحقیقات ویرایش ژنوم سرمایه گذاری می‌کند و در پژوهش‌های استفاده از فناوری ویرایش ژنوم یک کشور پیشرو است. تعداد زیاد تحقیقات منتشر شده از محصولات حاصل از ویرایش ژنوم در آزمایشات مزرعه ای در این کشور، سهولت آزمایش محصولات ویرایش شده ژنومی را در شرایط مزرعه و تمایل دولت چین برای ترویج ویرایش ژنوم را ثابت می‌کند. بحث در مورد تجزیه و تحلیل ریسک محصولات مشتق شده از ویرایش

رها سازی و تولید موجودات تراریخته تهیه و به موسسات و معاونت‌های ذی ربط ابلاغ شد و در همین سال قانون برچسب گذاری محصولات تراریخت تصویب شد. بررسی محصولات تغییر ژنتیکی شده براساس پروتکل کارتاها بسته به نوع محصول متفاوت است. براساس قانون ایمنی زیستی، سه دستگاه، وزارت بهداشت درمان و آموزش پزشکی، سازمان محیط زیست و جهاد کشاورزی موظف به بررسی محصول تغییر ژنتیکی شده از جهت عدم تاثیر سوء بر سلامتی انسان و محیط زیست هستند تا مجوز تولید و مصرف این محصولات را صادر نمایند. اما در رابطه با محصولات حاصل از فناوری کریسپر هنوز خلا قانونی وجود دارد (Pouresmaeili et al., 2017; Shooshtari and Ghareyazie., 2021).

نتیجه گیری

ویرایش ژنوم از طریق کریسپر می‌تواند برای ایجاد تغییرات هدفمند در DNA گیاه، از جهش‌های کوچک گرفته تا بازآرایی‌های ژنتیکی بزرگ‌تر (مانند وارونگی‌ها) و درج‌ها استفاده شود. در مقایسه با رویکردهای سنتی جهش زایی تصادفی و انتخاب گونه‌های مفید با دقت بالاتر و زمان کمتر همراه است. در حالی که ویرایش ژنوم می‌تواند هم برای تحقیقات و هم برای توسعه محصول تجاری مورد استفاده قرار گیرد، محیط نظارتی و همچنین پذیرش اجتماعی می‌تواند عوامل محدود کننده ای برای کاربرد گسترده این فناوری باشد. به همین دلیل لازم است تا پژوهشگران همه جوانب ایمنی را در هنگام کار با این تکنیک در نظر گیرند. تلاش برای به حداکثر رساندن کارایی و ویژگی ویرایش ژنومی CRISPR نیز برای محافظت از سلامت انسان و محیط زیست ضروری است و به بشریت اجازه می‌دهد از مزایای بسیاری که این فناوری دارد، به طور کامل استفاده کند.

ژنوم از سال‌ها پیش در چین آغاز شده است اما مقررات رسمی هنوز صادر نشده است با توجه به سرمایه گذاری قوی کشور چین در ویرایش ژنوم، انتظار می‌رود در سال‌های آینده سیاست سازگار با ویرایش ژنوم توسط دولت چین منتشر شود. علاوه بر این، چین قبلاً با خرید Syngenta از طریق شرکت دولتی ChemChina، راه را برای انتشار واریته‌های ویرایش‌شده ژنوم هموار کرده است (Menz et al., 2020; Cohen., 2019).

در هند کلیه فرآیند نظارتی برای تحقیق، توسعه فناوری‌های جدید از جمله فناوری ویرایش ژن تابع قوانین موجود برای محصولات اصلاح ژنتیکی شده GMOs که پیش‌تر ایجاد شده است، می‌باشد. اداره استاندارد و ایمنی مواد غذایی این کشور، غذای مهندسی یا اصلاح ژنتیکی شده را به‌عنوان "هر ماده یا مواد غذایی تشکیل شده از ارگانیسم‌های دستکاری ژنتیکی شده که از طریق بیوتکنولوژی مدرن به دست می‌آید، یا مواد غذایی تولید شده توسط ارگانیسم‌های اصلاح ژنتیکی شده از طریق بیوتکنولوژی مدرن" تعریف می‌کند (Friedrichs et al., 2019).

طبق قوانین کشور ژاپن، غذاهای حاصل از فناوری‌های ویرایش ژنوم که حاوی ژن یا قطعاتی از ژن‌های خارجی نیستند، GMO محسوب نمی‌شوند و طبق سیاست‌های ایمنی زیستی این کشور، جهش‌های خارج از هدف در غذاهای مهندسی ژنتیکی نباید نگران کننده باشد، زیرا می‌توانند در مکان‌های متعددی در ژنوم محصولات تولید شده توسط اصلاح سنتی نیز مشاهده شوند (South et al., 2019).

ملحق شدن ایران به پروتکل ایمنی زیستی کارتاها در سال ۱۳۸۲ به تصویب مجلس شورای اسلامی رسید. حدود چهار سال بعد قانون ملی ایمنی زیستی که شامل شرایط بررسی و صدور مجوز محصولات تغییر ژنتیکی شده بود، به تصویب رسید. در سال ۱۳۹۴، شیوه نامه ای درخصوص صدور مجوز واردات، صادرات،

منابع

Alavi, S., Tohidfar, M., & Ghasemzade, S. (2009). An overview of the potential risk assessment of transgenic products.

Journal of Biosafety, 2, 59-80. (In Farsi with English abstract)

- Ashaar-Ghadim, E., Pazhouhandeh, M., & Ahmadabadi, M. (2022). Potato Genome Editing Using CRISPR Technologies. *Genetic Engineering and Biosafety Journal*, 11(2), 266-274. (In Farsi with English abstract)
- Ayalew, H., Tsang, P. W., Chu, C., Wang, J., Liu, S., Chen, C., & Ma, X. F. (2019). Comparison of TaqMan, KASP and rhAmp SNP genotyping platforms in hexaploid wheat. *PLoS one*, 14(5), 1-9. doi: 10.1371/journal.pone.0217222
- Bartsch, D., Ehlers, U., Hartung, F., Kahrmann, J., Leggewie, G., Sprink, T., & Wilhelm, R. (2020). Questions regarding the implementation of EU mutagenesis ruling in France. *Frontiers in Plant Science*, 11, 1-4. doi: 10.3389/fpls.2020.584485
- BCC Research. (2023). BCC Research Report overview. CRISPR Technology: Global Markets. Available at <https://www.bccresearch.com/market-research/healthcare/crispr-gene-editing-market-report.html>.
- Behera, S. S., Ray, R. C., & Zdolec, N. (2018). *Lactobacillus plantarum* with functional properties: an approach to increase safety and shelf-life of fermented foods. *BioMed Research International*, 2018, 1-18. doi: 10.1155/2018/9361614
- Brinegar, K. K., Yetisen, A., Choi, S., Vallillo, E., Ruiz-Esparza, G. U., Prabhakar, A. M., & Yun, S. H. (2017). The commercialization of genome-editing technologies. *Critical Reviews in Biotechnology*, 37(7), 924-932. doi: 10.1080/07388551.2016.1271768
- Burt, A. (2003). Site-specific selfish genes as tools for the control and genetic engineering of natural populations. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 270(1518), 921-928. doi: 10.1186/s13071-018-3209-6
- Chapman, J. E., Gillum, D., & Kiani, S. (2017). Approaches to reduce CRISPR off-target effects for safer genome editing. *Applied Biosafety*, 22(1), 7-13. doi: 10.1177/1535676017694148
- Cohen, J. (2019). To feed its 1.4 billion, China bets big on genome editing of crops. *Science*. Available at <https://www.science.org/content/article/feed-its-14-billion-china-bets-big-genome-editing-crops>.
- Deb, S., Choudhury, A., Kharbyngar, B., & Satyawada, R. R. (2022). Applications of CRISPR/Cas9 technology for modification of the plant genome. *Genetica*, 150, 1-12. doi: 10.1007/s10709-021-00146-2
- DiCarlo, J. E., Chavez, A., Dietz, S. L., Esvelt, K. M., & Church, G. M. (2015). Safeguarding CRISPR-Cas9 gene drives in yeast. *Nature Biotechnology*, 33(12), 1250-1255. doi: 10.1038/nbt.3412
- DiCarlo, J. E., Norville, J. E., Mali, P., Rios, X., Aach, J., & Church, G. M. (2013). Genome engineering in *Saccharomyces cerevisiae* using CRISPR-Cas systems. *Nucleic Acids Research*, 41(7), 4336-4343. doi: 10.1093/nar/gkt135
- Doudna, J. A., & Charpentier, E. (2014). The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science*, 346(6213), 1-9. doi: 10.1126/science.1258096
- Duensing, N., Sprink, T., Parrott, W. A., Fedorova, M., Lema, M. A., Wolt, J. D., & Bartsch, D. (2018). Novel features and considerations for ERA and regulation of crops produced by genome editing. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 6(79), 1-16. doi: 10.3389/fbioe.2018.00079
- Eckerstorfer, M. F., Engelhard, M., Heissenberger, A., Simon, S., & Teichmann, H. (2019). Plants developed by new genetic modification techniques- comparison of existing regulatory frameworks in the EU and non-EU countries. *Front Bioen Biotechnol*, 7(26), 1-16. doi: 10.3389/fbioe.2019.00026
- El-Mounadi, K., Morales-Floriano, M. L., & Garcia-Ruiz, H. (2020). Principles, applications, and biosafety of plant genome editing using CRISPR-Cas9. *Frontiers in Plant Science*, 11(56), 1-16. doi: 10.3389/fpls.2020.00056
- Eş, I., Gavahian, M., Marti-Quijal, F. J., Lorenzo, J. M., Khaneghah, A. M., Tsatsanis, C., & Barba, F. J. (2019). The application of the CRISPR-Cas9 genome editing machinery in food and agricultural science: Current status, future perspectives, and associated challenges. *Biotechnology Advances*, 37(3), 410-421. doi: 10.1016/j.biotechadv.2019.02.006
- Esvelt, K. M., Smidler, A. L., Catteruccia, F., & Church, G. M. (2014). Concerning RNA-guided gene drives for the alteration of wild populations. *Elife*, 3(e03401), 1-21. doi: 10.7554/eLife.03401
- Fitz-Earle, M., Holm, D. G., & Suzuki, D. T. (1973). Genetic control of insect populations: I. Cage studies of chromosome replacement by compound autosomes in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 74(3), 461-475. doi: 10.1093/genetics/74.3.461
- Friedrichs, S., Takasu, Y., Kearns, P., Dagallier, B., Oshima, R., & Schofield, J. (2019). Meeting report of the OECD conference on "genome editing: applications in agriculture-implications for health, environment and regulation". *Transgenic*, 28, 419-463. doi: 10.1007/s11248-019-00154-1
- Fu, Y., Foden, J. A., Khayter, C., Maeder, M. L., Reyon, D., Joung, J. K., & Sander, J. D. (2013). High-frequency off-target mutagenesis induced by CRISPR-Cas nucleases in human cells. *Nat Biotechnol*, 31(9), 822-826. doi: 10.1038/nbt.2623
- Fu, Y., Sander, J. D., Reyon, D., Cascio, V. M., & Joung, J. K. (2014). Improving CRISPR-Cas nuclease specificity using truncated guide RNAs. *Nature Biotechnology*, 32(3), 279-284. doi: 10.1038/nbt.2808
- Guilinger, J. P., Thompson, D. B., & Liu, D. R. (2014). Fusion of catalytically inactive Cas9 to FokI nuclease improves the specificity of genome modification. *Nature Biotechnology*, 32(6), 577-582. doi: 10.1038/nbt.2909
- Hakim, C. H., Kumar, S. R., Pérez-López, D. O., Wasala, N. B., Zhang, D., Yue, Y., Teixeira, J., Pan, X., Zhang, K., Million, E. D., & Nelson, C. E. (2021). Cas9-specific Immune Responses Compromise Local and Systemic AAV CRISPR Therapy in Multiple Dystrophic Canine Models. *Nature Communications*, 12(1), 6769-6812. doi: 10.1038/s41467-021-26830-7
- Hsu, P. D., Scott, D. A., Weinstein, J. A., Ran, F., Konermann, S., Agarwala, V., Zhang, F. (2013). DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases. *Nature Biotechnology*, 31(9), 827-832. doi: 10.1038/nbt.2647
- Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J. A., Charpentier, E. (2012). A programmable dual-RNA-guided

- DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*, 337(6096), 816-821. doi: **10.1126/science.1225829**
- Khan, F. A., Pandupuspitasari, N. S., ChunJie, H., Ahmad, H. I., Wang, K., Ahmad, M. J., & Zhang, S. (2018). Applications of CRISPR/Cas9 in reproductive biology. *Current Issues in Molecular Biology*, 26(1), 93-102. doi: **10.21775/cimb.026.093**
- Khemariya, P., Singh, S., Jaiswal, N., & Chaurasia, S. N. (2016). Isolation and identification of *Lactobacillus plantarum* from vegetable samples. *Food Biotechnology*, 30(1), 49-62. doi: **10.1080/08905436.2015.1132428**
- Kotterman, M. A., Chalberg, T. W., & Schaffer, D. V. (2015). Viral vectors for gene therapy: translational and clinical outlook. *Annual Review of Biomedical Engineering*, 17, 63-89. doi: **10.1146/annurev-bioeng-071813-104938**
- Lomov, N. A., Viushkov, V. S., Petrenko, A. P., Syrkin, M. S., & Rubtsov, M. A. (2019). Methods of evaluating the efficiency of CRISPR/Cas genome editing. *Molecular Biology*, 53, 862-875. doi: **10.1134/S0026893319060116**
- Mallapaty, S. (2019). Australian gene-editing rules adopt 'middle ground'. *Nature*. Available at <https://www.nature.com/articles/d41586-019-01282-8>.
- Menz, J., Modrzejewski, D., Hartung, F., Wilhelm, R., & Sprink, T. (2020). Genome edited crops touch the market: a view on the global development and regulatory environment. *Frontiers in Plant Science*, 11(586027), 1-17. doi: **10.3389/fpls.2020.586027**
- Mitchell, B. P., Hsu, R. V., Medrano, M. A., Zewde, N. T., Narkhede, Y. B., & Palermo, G. (2020). Spontaneous embedding of DNA mismatches within the RNA: DNA hybrid of CRISPR-Cas9. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 7(39), 1-9. doi: **10.3389/fmolb.2020.00039**
- Modrzejewski, D., Hartung, F., Lehnert, H., Sprink, T., Kohl, C., Keilwagen, J., & Wilhelm, R. (2020). Which factors affect the occurrence of off-target effects caused by the use of CRISPR/Cas: a systematic review in plants. *Frontiers in Plant Science*, 11(574959), 1-23. doi: **10.3389/fpls.2020.574959**
- Modrzejewski, D., Hartung, F., Sprink, T., Krause, D., Kohl, C., & Wilhelm, R. (2019). What is the available evidence for the range of applications of genome-editing as a new tool for plant trait modification and the potential occurrence of associated off-target effects: a systematic map. *Environmental Evidence*, 8(27), 1-33. doi: **10.1186/s13750-019-0171-5**
- Nayeri, S., Tohidfar, M., & Saidi, A. (2018). CRISPR/Cas9 system as an efficient genome editing tool in developing GM crops: a review. *Cellular and Molecular Research*, 31(4), 542-556. (In Farsi with English abstract).
- O'Brien, A., & Bailey, T. L. (2014). GT-Scan: identifying unique genomic targets. *Bioinformatics*, 30(18), 2673-2675. doi: **10.1093/bioinformatics/btu354**
- Oye, K. A., Esvelt, K., Appleton, E., Catteruccia, F., Church, G., Kuiken, T., Collins, J. P. (2014). Regulating gene drives. *Science*, 345(6197), 626-628. doi: **10.1126/science.1254287**
- Parvin, M. R., & Seyedin, A. (2017). CRISPR-Cas9 gene-editing technology from intellectual property and biosafety law perspective. *Medical Law Journal*, 11(42), 191-228. (In Farsi with English abstract).
- Pouresmaeili, A., Vaezi Kakhki, M., & Bameri, E. (2017). A comparative study of the consumers rights of GM crops in Iran and European union. *Bioethics*, 7(24), 99-114. (In Farsi with English abstract).
- Ran, F. A., Hsu, P. D., Lin, C. Y., Gootenberg, J. S., Konermann, S., Trevino, A. E., & Zhang F. (2013). Double nicking by RNA-guided CRISPR Cas9 for enhanced genome editing specificity. *Cell*, 154(6), 1380-1389. doi: **10.1016/j.cell.2013.08.021**
- Ran, F. A., Hsu, P. D., Wright, J., Agarwala, V., Scott, D. A., & Zhang, F. (2013). Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nature Protocols*, 8(11), 2281-2308. doi: **10.1038/nprot.2013.143**
- Shao, Y., Guan, Y., Wang, L., Qiu, Z., Liu, M., Chen, Y., Wu, L., Li, Y., Ma, X., Liu, M., & Li, D. (2014). CRISPR/Cas-mediated genome editing in the rat via direct injection of one-cell embryos. *Nature Protocols*, 9(10), 2493-2512. doi: **10.1038/nprot.2014.171**
- Sharma, G., Sharma, A. R., Bhattacharya, M., Lee, S. S., & Chakraborty, C. (2021). CRISPR-Cas9: a preclinical and clinical perspective for the treatment of human diseases. *Molecular Therapy*, 29(2), 571-586. doi: **10.1016/j.ymthe.2020.09.028**
- Shillito, R. D., Whitt, S., Ross, M., Ghavami, F., De Vleeschauwer, D., D'Halluin, K., & Meulewaeter, F. (2021). Detection of genome edits in plants-from editing to seed. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*, 57, 595-608. doi: **10.1007/s11627-021-10214-z**
- Shimatani, Z., Kashojiya, S., Takayama, M., Terada, R., Arazoe, T., & Ishii, H. (2017). Targeted base editing in rice and tomato using a CRISPR-Cas9 cytidine deaminase fusion. *Nature Biotechnology*, 35(5), 441-443. doi: **10.1038/nbt.3833**
- Shooshtari, A., & Ghareyazie, B. (2021). Evaluation of performance of competent national authorities in the implementation of the National biosafety law (Agriculture, Iran). *Genetic Engineering and Biosafety Journal*, 10(1), 143-156. (In Farsi with English abstract).
- Smyth SJ. (2017). Canadian regulatory perspectives on genome engineered crops. *GM crops and food*, 8(1), 35-43. doi: **10.1080/21645698.2016.1257468**
- South, P. F., Cavanagh, A. P., Liu, H. W., Ort, D. R. (2019). Synthetic glycolate metabolism pathways stimulate crop growth and productivity in the field. *Science*, 363(6422), 1-9. doi: **10.1126/science.aat9077**
- Surridge, C. (2018). A crispr definition of genetic modification. *Nature Plants*, 4, 233. doi: **10.1038/s41477-018-0158-1**
- Timmins, L. M., Burr, A. M., Carroll, K., Keefe, R., Teryek, M., Cantolupo, L. J., & Parekkadan, B. (2021). Selecting a cell engineering methodology during cell therapy product development. *Cell Transplantation*, 30, 1-17. doi: **10.1177/09636897211003022**
- Tohidfar, M., Maleki, N., & Abedini, R. (2009). Possible environmental risks of transgenic plants and resistance management. *Biosafety*, 22-43. (In Farsi with English abstract).
- Tycko, J., Myer, V. E., & Hsu, P. D. (2016). Methods for optimizing CRISPR-Cas9 genome editing specificity.

- Molecular Cell, 63(3), 355-370. doi: **10.1016/j.molcel.2016.07.004**
- Van Vu, T., Sung, Y. W., Kim, J., Doan, D. T. H., Tran, M. T., & Kim, J. Y. (2019). Challenges and perspectives in homology-directed gene targeting in monocot plants. *Rice*, 12(1), 1-29. doi: **10.1186/s12284-019-0355-1**
- Waltz, E. (2016a). CRISPR-edited crops free to enter market, skip regulation. *Nature Biotechnology*, 34(6), 582-583. doi: **10.1038/nbt0616-582**
- Waltz, E. (2016b). Gene-edited CRISPR mushroom escapes US regulation. *Nature*, 532(7599), 293. doi: **10.1038/nature.2016.19754**
- Xu, C. L., Ruan, M. Z., Mahajan, V. B., & Tsang, S. H. (2019). Viral delivery systems for CRISPR. *Viruses*, 11(28), 1-12. doi: **10.3390/v11010028**
- Zetsche, B. (2016). CPF1: a Cas9 homolog(Cont'd) CRISPR 101: A Desktop Resource, 28, 131-142
- Zong, Y., Wang, Y., Li, C., Zhang, R., Chen, K., Ran, Y., & Gao, C. (2017). Precise base editing in rice, wheat and maize with a Cas9-cytidine deaminase fusion. *Nature Biotechnology*, 35(5), 438-440. doi: **10.1038/nbt.3811**