

آنزیم Cas9 نو ترکیب

(ABR S.P.Cas9 nuclease)

پروتئین Cas9 برای انتقال به سلول هدف جهت ویرایش ژنوم از طریق سیستم CRISPR/Cas9

شماره کاتالوگ: Ava2000E, Ava2001E, Ava2002E, Ava2003E

ساخت ایران

این محصول فقط در تحقیقات استفاده شود

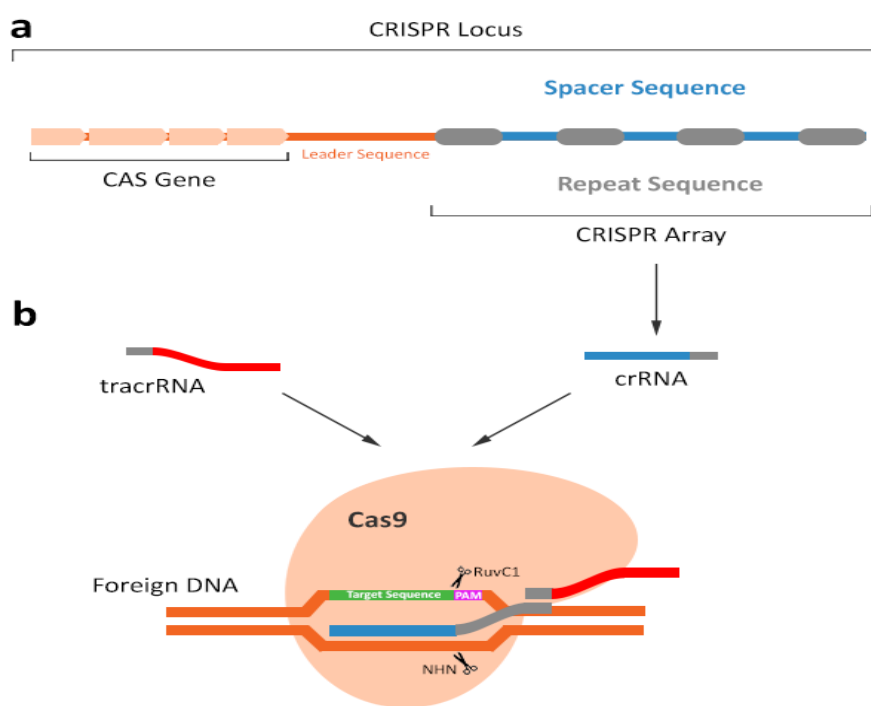
مقدمه ای بر CRISPR/Cas9

توانایی ویرایش دقیق و هدفمند هر نقطه ای از ژنوم موجودات برای سالهای طولانی آرزوی دانشمندان بوده است. و امروزه دانشمندان بیش از گذشته به این هدف نزدیک شده اند. با کشف سیستم CRISPR Cas9 (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat CRISPR Associated Protein 9) ، دانشمندان اکنون قادر به خاموش کردن (knock-out) و وارد کردن (knock-in) هر ژنی در ژنوم می باشند. استفاده خلاقانه از سیستم کریسپر (CRISPR) باکتریایی به منظور برش DNA هدف انقلابی در ویرایش ژنوم سلولهای پستانداران ایجاد کرده است. آنزیم Cas9 متعلق به باکتری Streptococcus pyogenes بیشترین استفاده را در میان دیگر آنزیم های کریسپری داشته است و استفاده از آن به منظور ویرایش ژنوم تنها به آنزیم نوکلئاز Cas9 و RNA راهنما (gRNA) وابسته است. ویرایش ژنوم بر اساس سیستم CRISPR Cas9 یک ابزار کارآمد و با پتانسیل می باشد که پتانسیل کنار زدن و جایگزینی با روشهای قدیمی مانند Zinc Finger و TALEN را دارد.

CRISPR/Cas9 به عنوان یک سیستم ایمنی در باکتری ها و آرکئی ها

برای اولین بار در باکتری ها و آرکئی ها CRISPR Cas9 به عنوان یک سیستم ایمنی میکروبی شناخته شد که توسط این سیستم این موجودات ایمنی اکتسابی را بر علیه ویروسها و پلاسمیدهای مهاجم کسب می کنند. جایگاههای ژنی کریسپر در حدود ۳۰ درصد باکتری های توالی یابی شده و ۹۰ درصد آرکئی های توالی یابی شده مشاهده شده است. و بیش از یک جایگاه در باکتری ها می تواند برای آن وجود داشته باشد. DNA خارجی مهاجم توسط آنزیم های نوکلئازی Cas شکسته می شود و سپس بخشی از آن در جایگاه کریسپری و بین دو توالی تکراری قرار می گیرد (شکل 1a) که در این حالت به آن spacer گفته می شود. توالی های spacer به عنوان الگوهایی به منظور تولید توالی های RNA کوتاه کریسپری (crRNA) مورد استفاده قرار گرفته و کمپلکسی را با مولکول trans-activating- CrRNA (tracrRNA) تشکیل می دهد. این دو توالی به همراه هم به عنوان یک توالی راهنما، پروتئین Cas9 را به سمت DNA مهاجم هدایت می کنند. به محض اتصال پروتئین Cas9 به DNA

مهاجم این پروتئین توالی DNA خارجی مکمل crRNA و توالی مقابل آنرا به ترتیب از طریق دومین های نوکلئازی HNH و RuvC1-Like می برد (شکل 1b). از زمان کشف این سیستم ۴۵ خانواده پروتئین Cas مختلف در مقالات و گزارش ها توصیف شده است که هر کدام نقشهای مختلفی در سنتز crRNA، جذب و الحاق توالی های spacer جدید و تجزیه DNA مهاجم دارند. سیستم CRISPR به صورت کلی بر اساس توالی های پروتئینی Cas و ساختار ژنهای تشکیل دهنده آنها به ۲ کلاس و ۶ تیپ دسته تقسیم بندی می شوند. سیستم CRISPR/Cas9 ی که تا کنون به صورت عمومی برای ویرایش ژنوم استفاده شده است نوع II سیستم کریسپری می باشد که برگرفته از باکتری *Streptococcus pyogenes* است.

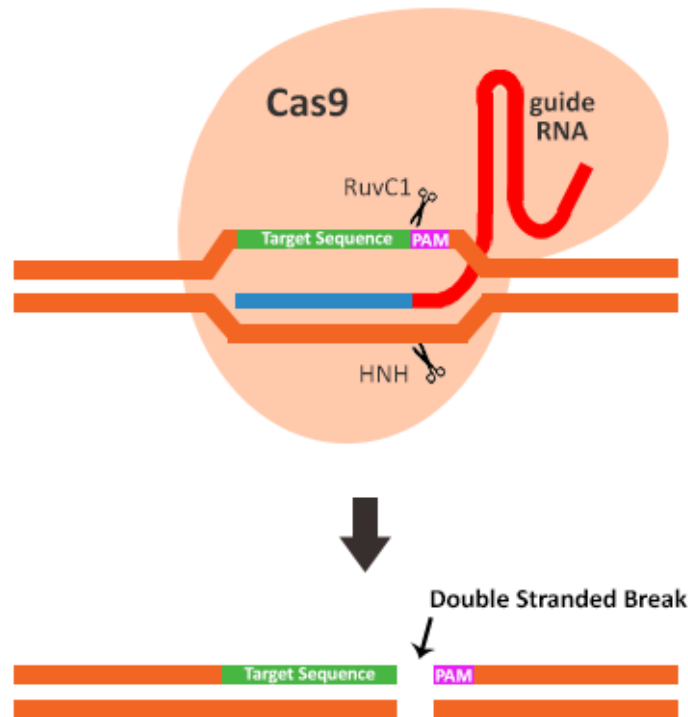


شکل ۱. جایگاه ژنی کریسپری و استفاده آن به عنوان یک سیستم ایمنی اکتسابی. (a) DNA مهاجم توسط محصولات ژنهای Cas شکسته شده و بخش کوچکی از این توالی های کوچک شکسته شده در جایگاههای کریسپری قرار گرفته که به آن توالی های spacer می گویند. توالی های spacer مختلف توسط توالی های تکراری حفظ شده از یکدیگر جدا می شوند. (b) هر زمانی که DNA مهاجم در سلول شناسایی می شود توالی های spacer به شکل crRNA بیان می شوند. این کمپلکس crRNA با

tracrRNA به عنوان راهنما برای اندونوکلئاز Cas عمل کرده که در مجموع موجب شناسایی DNA خارجی و تجزیه آن می گردد.

CRISPR/Cas9 – ابزاری برای ویرایش ژنوم

سیستم مدرن ویرایش ژنوم به صورت هدفمند با استفاده از تکنولوژی CRISPR/Cas9 دو جزء دارد: a) یک اندونوکلئاز b) توالی RNA کوتاه راهنما (شکل ۲). اندونوکلئاز مورد نظر پروتئین اندونوکلئازی Cas9 باکتریایی برگرفته از *Streptococcus pyogenes* می باشد. نوکلئاز Cas9 دو دومین برنده DNA دارد که شامل دومین نوکلئازی HNH و دومین نوکلئازی RuvC1-Like می باشد و منجر به شکستن DNA دو رشته ای به صورت Blunt (Double Strand Breaks (DSB)) می شود. واژه gRNA در این سیستم خاموشی به یک RNA کایمر تک رشته ای مهندسی شده اشاره دارد که هم نقش tracrRNA و هم crRNA باکتریایی را دارد. بیست جفت نوکلئوتید آخر انتهای 5' مربوط به gRNA (homing device) را محقق بر علیه توالی ژنی مورد نظر جهت برش و ویرایش طراحی می کند، این توالی ۲۰ نوکلئوتیدی کمپلکس Cas9/gRNA را به جایگاه ژنی مورد نظر درست در بالادست جایگاه PAM از طریق اتصال RNA-DNA هدایت میکند. توالی PAM در بین استرین های باکتری های مختلف و انواع پروتئین های CRISPR/Cas تفاوت دارد و این توالی برای باکتری *Streptococcus pyogenes* توالی 5'-NGG می باشد و سیستم CRISPR/Cas قابل استفاده موجود به سمت هر توالی DNA با آدرس 5'-N20-NGG هدایت شده و به صورت کاملاً دقیق موجب شکست DNA به صورت blunt می شود. دو رشته DNA بریده شده توسط این سیستم توسط دو مکانیسم ترمیمی که در تمامی انواع ارگانیسم ها یافت می شود و مسیر ترمیمی اتصال انتهاهای غیر همولوگ (non-homologous end-joining (NHEJ)) و مسیر ترمیمی شباهتی (homology-directed repair (HDR)) نام دارند، ترمیم می شود.



شکل ۲. بیست جفت نوکلئوتید آخر gRNA به عنوان یک عامل شناسایی کننده توالی DNA هدف به کار رفته و اندونوکلاز Cas9 را به توالی هدف هدایت می کند سپس دو دومین برنده Cas9 موجب شکست در دو رشته DNA در ناحیه ۳ جفت باز بالا دست توالی PAM می شوند سپس DSB ایجاد شده یا توسط مسیر خطا دار NHEJ ترمیم شده یا توسط مسیر استفاده از الگوی همولوگ (HDR) برای ترمیم خواهد شد.

مسیر ترمیمی اتصال انتهای غیر همولوگ (Non-Homologous End-Joining (NHEJ))

مسیر ترمیمی NHEJ در یوکاریوتها یک مکانیسم ترمیمی خطا دار می باشد که به منظور ترمیم شکست DNA، در صورت فقدان الگوی ترمیمی مناسب استفاده می شود. مسیر NHEJ در جهت اتصال دو رشته برش خورده به صورت blunt به همدیگر به کار گرفته می شود اما در طول این پروسه اغلب موتاسیون های حذف یا اضافه (InDels) در جایگاه DSB رخ می دهد که موجب تغییر در فریم یا ایجاد کدون ختم در بدنه ژن شده و موجب تغییر دائمی در Open Reading frame می شود (شکل ۳). اگرچه خروجی InDels ایجاد شده در نتیجه NHEJ

کاملاً تصادفی می باشد اما دانشمندان می توانند این اطمینان را بدهند که بیشترین احتمال مختل شدن ژن زمانی می باشد که gRNA بر علیه انتهای N ژن هدف طراحی شود. این موضوع به محقق این اطمینان را می دهد که فریم شیفت موجب ایجاد یه پروتئین نیمه فعال نمی شود همچنین توصیه می شود که gRNA بر علیه اولین یا دومین اگزون ژن هدف طراحی شود تا تغییر در فریم شیفت به صورت کامل صورت گیرد.

شکل ۳. مکانیسم مسیر ترمیمی اتصال انتهای

غیر همولوگ (Non-Homologous End-)

Joining (NHEJ)) به منظور اتصال انتهای

ناشی از DSB به همدیگر بدون استفاده از الگوی

همولوگ می باشد. این فرآیند خطا دار بوده و حذف

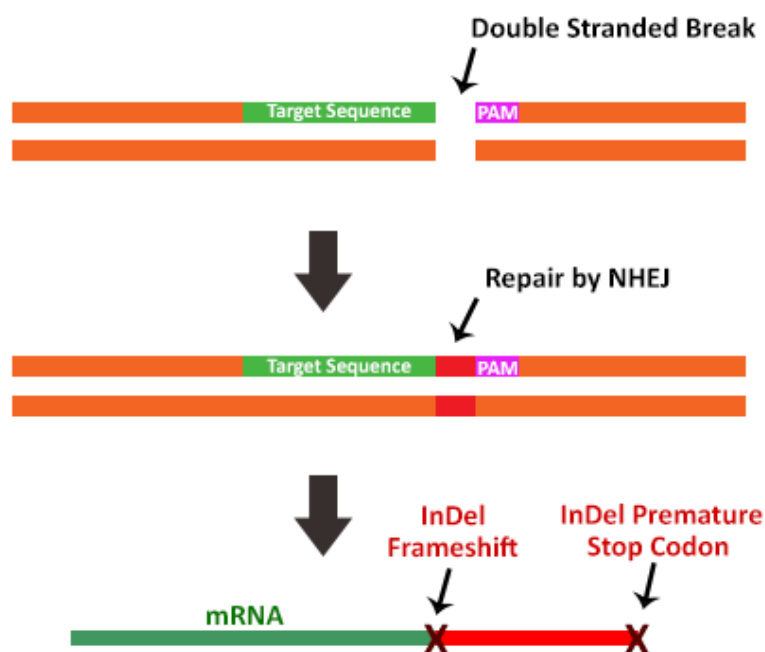
یا اضافه شدن تعداد کمی نوکلئوتید در این فرآیند

اجتناب ناپذیر است. در نتیجه NHEJ موجب

ایجاد موتاسیون حذف یا اضافه (InDels) شده

که می تواند الگوی خوانش را تغییر داده یا موجب

ایجاد کدون ختم در درون ژن شود.



مسیر ترمیمی شباهتی ((homology-directed repair (HDR))

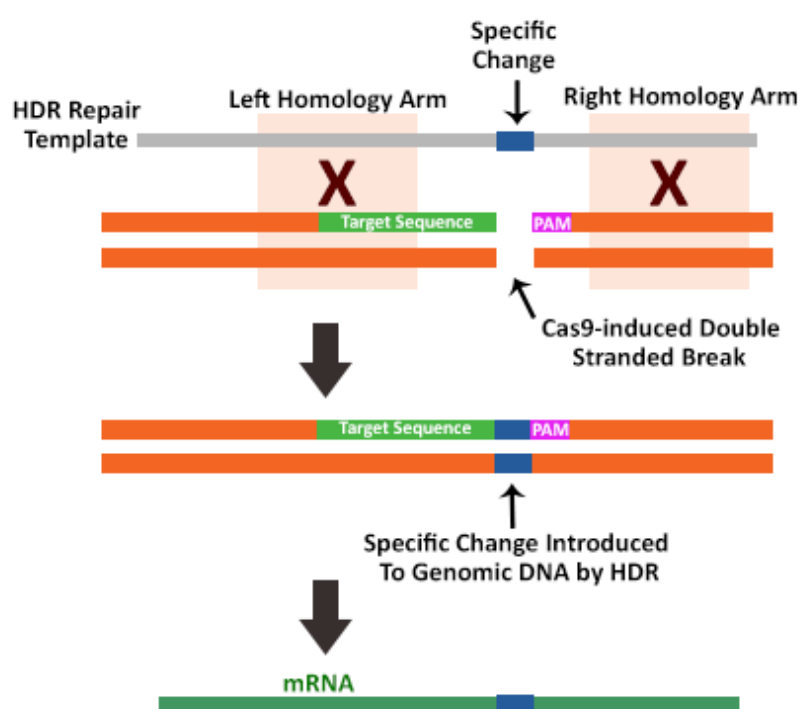
علاوه بر روش NHEJ سلولها قادر به استفاده از یک مکانیسم ترمیمی بسیار دقیق تر با نام ترمیم شباهتی

(homology-directed repair) هستند. از این مکانیسم ترمیمی می توان به منظور وارد کردن یک تغییر

نوکلئوتیدی خاص در DNA ژنومی استفاده کرد. DNA الگوی مورد استفاده در ترمیم که دارای همولوژی بسیار

بالا با بالادست و پایین دست مکان ژنی مورد نظر جهت ترمیم است به همراه Cas9 و gRNA مورد نظر به سلول

هدف وارد می شود. در صورت وجود این الگوی مناسب، مکانیسم کم خطای HDR با انجام نوترکیبی می تواند تغییرات دلخواه را در ناحیه شکسته شده توسط Cas9 ایجاد کند. وقتی الگوی ترمیمی را طراحی می کنید بایستی مطمئن شوید که توالی DNA و یا ssODN خارجی دقیقا بعد از توالی PAM نباشد یا توالی PAM جدا شده و یا در آن موتاسیون ایجاد شود. رعایت کردن این موارد از تجزیه الگوی ترمیمی با سیستم CRISPR/Cas9 مشابه جلوگیری می شود.



شکل ۴. در حضور الگوی ترمیمی مناسب با داشتن بازوهای همولوگ مستقیما بالادست و پایین دست DNA دورشته ای شکسته شده نوترکیبی بر اساس مکانیسم ترمیمی شباهت اتفاق می افتد. بنابراین تغییرات دقیق مانند حذف و اضافه در هر نقطه ای از ژنوم امکان پذیر است.

CRISPR Cas9 - Protospacer Adjacent Motif

سیستم CRISPR/Cas9 می تواند برای هدف گیری هر ناحیه ای از ژنوم از طریق طراحی gRNA مطلوب به کار رود. اما اختصاصیت این سیستم وابسته به توالی به نام (PAM) Protospacer adjacent motif که درست قبل از توالی هدف قرار گرفته است بستگی دارد. در سیستم ایمنی باکتریایی و آرکئی دومین شناسایی کننده ناحیه PAM در Cas9 احتمالاً به عنوان وسیله ای برای شناسایی DNA خودی و مهاجم به کار رفته و مانع از این میشود که CRISPR ژنوم باکتری یا آرکئی را مورد هدف قرار دهد.



شکل ۵. موفقیت ویرایش ژنوم با استفاده از CRISPR/Cas9 به توالی gRNA و همچنین توالی PAM بستگی دارد و فقط توالی هدفی که فوراً بعد از توالی PAM آمده باشد برای ویرایش ژنوم هدف قرار داده می شود.

توالی مورد شناسایی PAM که توسط آنزیم Cas9 شناسایی می شود بر اساس گونه و نوع باکتری که آنزیم نوکلئاز Cas9 از آن مشتق شده است متفاوت می باشد. آنزیم نوکلئازی Cas9 باکتری *Streptococcus pyogenes* که جزء تیپ II کریسپری می باشد بیش از همه به منظور ویرایش ژنوم استفاده شده است. این نوکلئاز خاص توالی 5'-NGG را روی DNA و در قسمت انتهای 3' توالی gRNA شناسایی می کند. دیگر آنزیم های تجاری Cas9 موجود توالی های PAM دیگری را شناسایی می کنند (جدول ۱).

جدول ۱. توالی های PAM گونه های مختلف و زیر شاخه های نوکلئازهای Cas

Species	Subtype	PAM Sequence
<i>S. pyogenes</i>	II	5'-NGG
<i>S. solfataricus</i>	I-A1	5'-CCN
<i>S. solfataricus</i>	I-A2	5'-TCN
<i>H. walsbyi</i>	I-B	5'-TTC
<i>E. coli</i>	I-E	5'-AWG
<i>E. coli</i>	I-F	5'-CC
<i>P. aeruginosa</i>	I-F	5'-CC
<i>S. Thermophilus</i>	II-A	5'-NNAGAA
<i>S. agalactiae</i>	II-A	5'-NGG

موتاسیون های غیر هدف CRISPR/Cas9

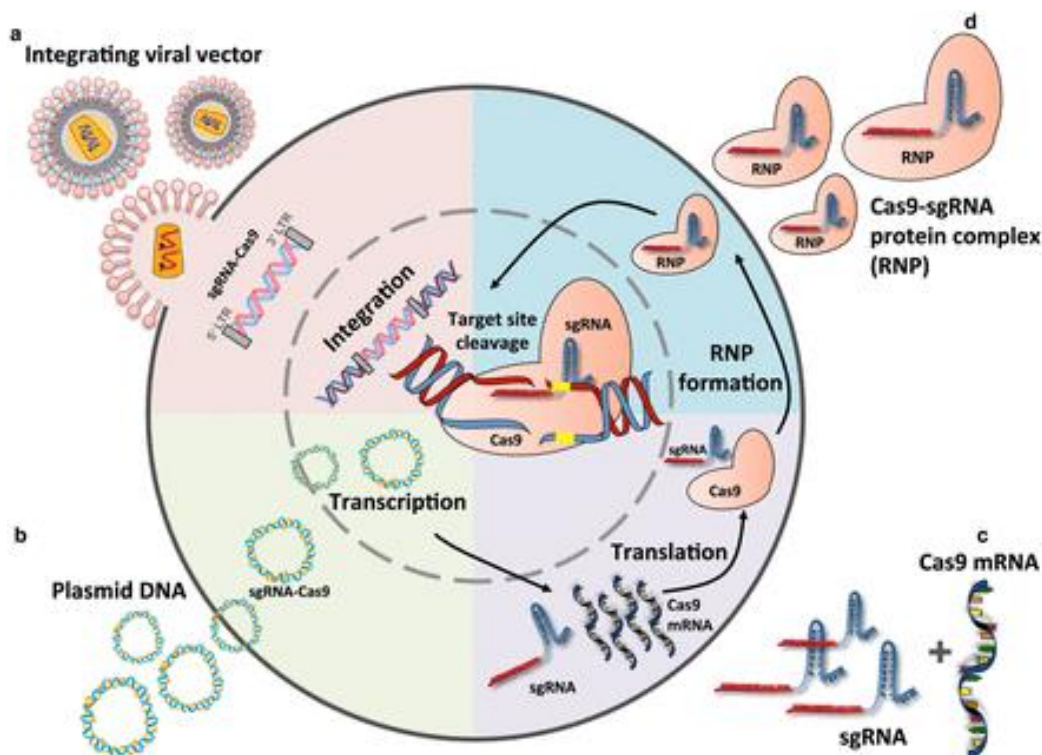
یکی از نکات بسیار مهمی که در استفاده از سیستم CRISPR/Cas9 در ویرایش ژنوم بایستی مد نظر قرار گیرد آگاهی از وقوع برش های غیر هدفمند توسط این سیستم می باشد. وقوع برش های غیر هدفمند منجر به موتاسیون های حذف و اضافه (InDels) در جایگاه غیر هدف در ژنوم شده و در نتیجه فنوتیپ ناخواسته را ایجاد می کند. مطالعات بسیاری این موضوع را گزارش کرده اند که عموماً عدم اتصال (mismatches) مربوط به انتهای 5' مولکول gRNA عموماً رخ می دهد اما پیش بینی اینکه این عدم جفت شدن در انتهای 5' مولکول gRNA به چه میزان اثرات غیرهدف (off-targets effect) دارد مشکل است. در کل اثرات غیر هدفمند ایجاد شده توسط سیستم CRISPR/Cas9 از نظر تعداد متفاوت می باشد و پیش بینی آن چالش انگیز می باشد.

به منظور کاهش اثرات غیر هدفمند ذکر شده چندین روش توسط محققان گزارش شده است منجمله اینکه امکان وقوع کاهش اثرات غیرهدفمند با رعایت یکسری نکات در طراحی gRNA بر علیه ژن هدف امکان پذیر است. روش دیگری که معمولاً استفاده می شود استفاده از انواع دیگر اندونوکلاز Cas9 می باشد که در یکی از دومین های برنده آنزیمی نقص دارد و یکی از دومین های آن عمل نمی کند (به این نوع آنزیم Cas9 Nickase گفته

می شود). راه حل دیگر کاهش طول ۲۰ نوکلئوتید مکمل ژن هدف موجود در gRNA می باشد، این gRNA کوتاه شده (tru-gRNAs) در هدایت آنزیم Cas9 به ژن هدف مانند gRNA با طول کامل عمل می کند، tru-gRNAs خاصیت جهش زایی کمتری در نواحی غیرهدف دارد و نسبت به جفت شدنهای تکی یا دوتایی بیشتر حساس می باشد.

مزیت سیستم انتقالی ریبونوکلئوپروتئینی در ویرایش ژنوم با تکنولوژی کریسپر

آنزیم نوکلئازی Cas9 و gRNA جهت ویرایش ژنوم به شکل ناقل های ویروسی، پلاسمید ، RNA کد کننده Cas9 و یا پروتئین Cas9 در ترکیب با gRNA به صورت ریبونوکلئوپروتئین (Ribonucleoprotein (RNP)) قابل انتقال به سلول هدف می باشد (شکل ۶).



شکل ۶. روشهای انتقال سیستم کریسپری به سلول هدف. (a) ناقل های ویروسی (b) پلاسمید (c) RNA کد کننده Cas9 و gRNA (d) کمپلکس پروتئین Cas9 و gRNA

به عنوان یک قانون کلی روشهایی که میزان آنزیم Cas9 و gRNA به میزان زیاد و مدت زمان طولانی در سلول هدف وجود داشته باشد منجر به رخدادهای برش ناخواسته اثرات اهداف خاموش (OTEs) بیشتری خواهد شد. در روشهایی که از کمپلکس ریبونوکلوپروتئین (RNP) بدین صورت استفاده می شود که ابتدا کمپلکس بین پروتئین نوترکیب Cas9 و gRNA در لوله آزمایش تشکیل شده و این کمپلکس مستقیماً در سلول رهاسازی می شود نسبت به روشهای انتقالی دیگر سیستم کریسپر مانند روشهای برپایه DNA و حتی RNA ، ترجیح استفاده بیشتری دارد. وقتی از روشهای انتقالی با سیستم RNP استفاده می شود مقدار زیادی سیستم کریسپری هدفمند آماده ویرایش ژنوم در ابتدای امر به سلول وارد و به صورت سریع هم کاهش پیدا می کند و این استراتژی روشن شدن و خاموشی سریع ، منجر به ویرایش ژنوم با بالاترین کارایی و با حداقل میزان OTEs می شود. انتقال به صورت RNP همچنین روشی است که کمترین پاسخ ایمنی ذاتی درون سلولی را نسبت به روشهای انتقالی مبتنی بر اسید نوکلئیک مانند DNA و RNA در سلولهای بنیادی انسانی که بسیار حساس به این نوع روشها می باشند به همراه دارد.

اطلاعات محصول

آنزیم Cas9 شرکت آوان زیست کاوش (ABR S.P.Cas9 nuclease) با منشا ژنی و برگرفته از ژنوم باکتری *Streptococcus pyogenes* بوده و صورت نوترکیب در باکتری *E.coli* توسط شرکت آوان زیست کاوش تولید و خالص شده است. این آنزیم حاوی سیگنال انتقال پروتئین به هسته (NLS) بوده و به منظور ویرایش ژنوم با تکنولوژی CRISPR/Cas9 طراحی و تولید شده است.

اجزای کیت و نحوه نگهداری

آنزیم	شماره کاتالوگ	مقادیر	غلظت	شرایط نگهداری
آنزیم Cas9 نوترکیب (ABR S.P.Cas9 nuclease)	Ava2000E	۲۵ میکرولیتر (25 µL)	1 µg/µL (25 µg)	منفی ۲۰ درجه (-20°C)
	Ava2001E	۵۰ میکرولیتر (50 µL)	1 µg/µL (50 µg)	منفی ۲۰ درجه (-20°C)
	Ava2002E	۱۰۰ میکرولیتر (100 µL)	1 µg/µL (100 µg)	منفی ۲۰ درجه (-20°C)
	Ava2003E	۵۰۰ میکرولیتر (500 µL)	1 µg/µL (500 µg)	منفی ۲۰ درجه (-20°C)

مواد و کیتها و وسایل مورد نیاز جهت ویرایش ژنوم با استفاده از آنزیم Cas9 نو ترکیب شرکت آوان

زیست کاوش

به منظور تست فعالیت آنزیم Cas9 و صحت gRNA سنتز شده بر علیه ژن هدف قبل از انتقال سیستم کریسپری به صورت RNP، می توان DNA مربوط به ژن هدف را در لوله آزمایش با آنزیم Cas9 و gRNA برید و نتایج را بر روی ژل الکتروفورز بررسی کرد. جهت ساخت بافرهای مورد نیاز جهت به هم پیوستن Cas9 و gRNA و سپس برش DNA هدف (assembly buffer&digestion buffer) به صفحه ۱۱ از مقاله Karvelis و همکاران مراجعه شود.

به منظور ویرایش ژنوم با سیستم انتقالی ریبونوکلئوپروتئین (آنزیم Cas9 و مولکول gRNA) یک محقق بایستی آنزیم Cas9، DNA الگوی مولکول gRNA بر علیه ژن هدف، کیت ساخت و خالص سازی مولکول gRNA، کیت انتقال سیستم ریبونوکلئوپروتئین و یا دستگاه الکتروپوریشن را تهیه کند. به منظور ساخت DNA الگوی مولکول gRNA بر علیه ژن هدف و همچنین ساخت و خالص سازی مولکول gRNA کیتهای متعددی وجود دارد برای مثال کیت GeneArt™ Precision gRNA Synthesis Kit مربوط به شرکت invitrogene و یا کیت EnGen™ sgRNA Synthesis Kit, S. pyogenes مربوط به شرکت NEB که محققان میتوانند از شرکت ندای فن در ایران این دو کیت را تهیه کنند. به منظور انتقال سیستم ریبونوکلئوپروتئین بر پایه لیپوفکتامین پیشنهاد می شود که از کیت Lipofectamine™ CRISPRMAX شرکت invitrogene استفاده گردد، همچنین در صورت استفاده از دستگاه الکتروپوریشن به منظور انتقال سیستم ریبونوکلئوپروتئین، اگر دستگاه موجود در آزمایشگاه شما از نوع Neon™ Transfection System مربوط به شرکت Thermo Fisher Scientific باشد، صفحه ۱۴ از کاتالوگ GeneArt™ Platinum™ Cas9 Nuclease مربوط به شرکت invitrogene مطالعه گردد و اگر دستگاه موجود در آزمایشگاه شما مربوط به شرکت BioRad باشد به مقاله S. E. Tröder و همکاران مراجعه شود.

جهت مکاتبه و سوالات بیشتر در خصوص آنزیم و پرتکل ها به آدرس زیر مراجعه شود:

طراح، تولید کننده و مسئول کنترل کیفی آنزیم Cas9 شرکت آوان زیست کاوش : سید حسین موسوی

تلفن: ۰۹۱۲۴۲۳۹۴۶۲

آدرس ایمیل: mousavi_1887@yahoo.com

References:

1. Cas9–crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria. **Gasiunas, Giedrius, et al.** s.l. : PNAS, September 4, 2012, Vol. 109, pp. E2579-E2586.
2. The CRISPRdb database and tools to display CRISPRs and to generate dictionaries of spacers and repeats. **Grissa, Ibtissem, Vergnaud, Gilles and Pourcel, Christine.** s.l. : BMC Bioinformatics, May 23, 2007, Vol. 8, p. 172.
3. CRISPR/Cas9 for genome editing: progress, implications and challenges. **Zhang, Feng, Wen, Yan and Guo, Xiong.** 1, s.l. : Human Molecular Genetics, March 17, 2014, Vol. 23.
4. A Guild of 45 CRISPR-Associated (Cas) Protein Families and Multiple CRISPR/Cas Subtypes Exist in Prokaryotic Genomes. **Haft, Daniel H, et al.** 6, November 11, 2005, PLoS Computational Biology, Vol. 1, pp. 474-483.
5. Evolution and classification of the CRISPR–Cas systems. **Makarova, Kira S, et al.** s.l. : Nature Reviews Microbiology, Jun 2011, Vol. 9, pp. 467-477.
6. A Programmable Dual-RNA–Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity. **Jinek, Martin, et al.** 6096, Jun 28, 2012, Science, Vol. 337, pp. 816-821.
7. CRISPR-Cas system for editing, regulation and targeting genomes. **Sander, Jeffry D and Joung, J Keith.** 4, s.l. : Nature Biotechnology, March 2, 2014, Vol. 32.
8. Donor DNA Utilization During Gene Targeting with Zinc-Finger Nucleases. **Beurner, Kelly J, et al.** 4, s.l. : Genes Genomes Genetics, March 11, 2013, Vol. 3, pp. 657-664.
9. RNA-guided editing of bacterial genomes using CRISPR-Cas systems. **Jiang, Wenyan, et al.** s.l. : Nature Biotechnology, January 29, 2013, Vol. 31, pp. 233-239.
10. Multiplex Genome Engineering Using CRISPR/Cas Systems. **Cong, Le, et al.** 6121, s.l. : Science, January 3, 2013, Vol. 339, pp. 819-823.
11. Interference by clustered regularly interspaced short palindromic repeat (CRISPR) RNA is governed by a seed sequence. **Semenova, Ekaterina, et al.** 25, s.l. : PNAS, Jun 21, 2011, Vol. 108, pp. 10098-10103.
12. RNA-guided complex from a bacterial immune system enhances target recognition through seed sequence interactions. **Wiedenheft, Blake, et al.** 25, s.l. : PNAS, June 21, 2011, Vol. 108.
13. High-frequency off-target mutagenesis induced by CRISPR-Cas nucleases in human cells. **Fu, Yanfang, et al.** s.l. : Nature Biotechnology, June 23, 2013, Vol. 31, pp. 822-826.
14. Improving CRISPR-Cas nuclease specificity using truncated guide RNAs. **Fu, Yanfang, et al.** s.l. : Nature Biotechnology, January 26, 2014, Vol. 32, pp. 279-287.
15. CRISPR RNA–guided activation of endogenous human genes. **Maeder, Morgan, et al.** s.l. : Nature Methods, July 25, 2013, Vol. 10, pp. 977-979.
16. RNA-guided gene activation by CRISPR-Cas9–based transcription factors. **Perez-Pinera, Pablo, et al.** s.l. : Nature Methods, July 25, 2013, Vol. 10, pp. 973-976.
17. CRISPR-Mediated Modular RNA-Guided Regulation of Transcription in Eukaryotes. **Gilbert, Luke A, et al.** 2, s.l. : Cell, July 11, 2013, Vol. 154, pp. 442-451.
18. Locus-specific editing of histone modifications at endogenous enhancers. **Mendenhall, Eric M, et al.** s.l. : Nature Biotechnology, September 08, 2013, Vol. 31, pp. 1133-1136.

19. Dynamic Imaging of Genomic Loci in Living Human Cells by an Optimized CRISPR/Cas System. **Chen, Baohui, et al.** 7, s.l. : Cell, December 19, 2013, Vol. 155, pp. 1479-1491.
20. ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering. **Gaj, Thomas, Gersbach, Charles A and Barbas III, Carlos F.** 7, s.l. : Cell, July 2013, Vol. 31, pp. 397-406.
21. A Programmable Dual-RNA–Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity. **Jinek, Martin, et al.** s.l. : Science, June 28, 2012, Vol. 17, pp. 816-821.
22. Genome engineering in *Saccharomyces cerevisiae* using CRISPR-Cas systems. **DiCarlo, James E, et al.** s.l. : Nucleic Acids Research, April 12, 2013, Vol. 10, pp. 1-8.
23. Multiplex and homologous recombination–mediated genome editing in *Arabidopsis* and *Nicotiana benthamiana* using guide RNA and Cas9. **Li, Jian-Feng, et al.** s.l. : Nature Biotechnology, August 08, 2013, Vol. 31, pp. 688-691.
24. Efficient genome editing in zebrafish using a CRISPR-Cas system. **Hwang, Woong Y, et al.** s.l. : Nature Biotechnology, January 29, 2013, Vol. 31, pp. 227-229.
25. Highly Efficient Genome Modifications Mediated by CRISPR/Cas9 in *Drosophila*. **Yu, Zhongsheng, et al.** s.l. : Genetics, July 5, 2013, Vol. Early Online.
26. Heritable genome editing in *C. elegans* via a CRISPR-Cas9 system. **Friedland, Ari E, et al.** s.l. : Nature Methods, June 30, 2013, Vol. 10, pp. 741-743.>
27. One-Step Generation of Mice Carrying Mutations in Multiple Genes by CRISPR/Cas-Mediated
28. Genome Engineering. **wang, Haoyi, et al.** 4, s.l. : Cell, May 9, 2013, Vol. 153, pp. 910-918.
29. Harnessing the CRISPR/Cas9 system to disrupt latent HIV-1 provirus. **Ebina, Hirotaka, et al.** s.l. : Scientific Reports, August 26, 2013, Vol. 3, p. 2510.
30. Protospacer Recognition Motifs - Mixed Identities and Functional Diversity. 5, s.l. : RNA Biology, May 2013, Vol. 10, pp. 891-899.
31. An optimized electroporation approach for efficient CRISPR/Cas9 genome editing in murine zygotes, **S. E. Tröder et al.**:PLOS ONE, May 2018, Vol. 13, pp1-14.
32. Rapid characterization of CRISPR-Cas9 protospacer adjacent motif sequence elements, T. Karvelis et al.,: Genome Biology., 16 (2015), p. 253.