www.mums.ac.ir
Medical Journal of Mashhad
University of Medical Sciences
Vol. 69, No.7, P: 822-834
Aug 2026

مجله دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی مشهد
سال ۶۹، شماره۶
مهر ۱۴۰۵، صفحه ۸۳۴-۸۲۲

**مقاله مروری**

# توسعه سامانه‌های مبتنی بر CRISPR برای تشخیص زود هنگام سرطان

**تاریخ دریافت: ۱۴۰۵/۰۳/۲۵- تاریخ پذیرش: ۱۴۰۵/۰۶/۲۲**

وحید خلقی اسکوئی ۱*

[۱] *گروه علوم آزمایشگاهی، دانشکده علوم پزشکی سیرجان، سیرجان، ایران*

Email:
vahidkholghioskooei@gmail.com

**خلاصه**

**مقدمه:** تشخیص دیرهنگام بیماری همچنان چالش حیاتی در مدیریت سرطان می باشد، چرا که بیش از نیمی از مبتلایان در مراحل پیشرفته بیماری شناسایی می‌شوند. اگرچه بیوپسی مایع امکان ردیابی غیرتهاجمی زیست‌نشانگرهای توموری را فراهم کرده است، اما غلظت ناچیز این نشانگرها و فراوانی کمتر از ۰/۱٪ آلل‌های جهش‌یافته در مراحل اولیه، بکارگیری ابزارهایی با حساسیت فوق‌العاده را ضروری می‌سازد.در این راستا، سامانه‌های تشخیصی مبتنی بر **CRISPR** به دلیل ویژگی‌هایی چون اختصاصیت بالا، قابلیت ارتقا و ادغام با فناوری های جدید، به ابزارهای قدرتمند در تشخیص سرطان مطرح شده اند. این مقاله مروری، سیر تکامل و توسعه سامانه‌های کلیدی مبتنی بر **CRISPR** را بررسی می‌کند که شامل سامانه‌های بنیادین، استراتژی‌های چندگانه، سنجش‌های فوق‌حساس برای جهش‌های نادر، حسگرهای نانومتری است. علاوه‌بر این، کارایی و ابعاد عملیاتی این سامانه‌ها در شناسایی انواع مختلفی از سرطان‌ها مورد ارزیابی قرار گرفته است. در نهایت، چشم‌انداز آینده به سمت کیت‌های خانگی ارزان‌قیمت و سریع، سامانه‌های چندمنظوره «تشخیص و درمان هم‌زمان»، و تلفیق این فناوری با هوش مصنوعی ترسیم می‌شود، نوآوری‌هایی که می‌توانند مدیریت سرطان را به سوی تشخیصی زودهنگام و درمان‌پذیر سوق دهند.

**کلمات کلیدی: CRISPR-Dx**، تشخیص زودهنگام سرطان، بیوپسی مایع، تشخیص فوق حساس

Doi: 10.22038/mjms.2026.96532.5321

**مقدمه**

سرطان یکی از علل اصلی مرگ و میر در سطح جهان است. طبق گزارش آژانس بین‌المللی تحقیقات سرطان (IARC) در سال ۲۰۲۲ نزدیک به ۲۰ میلیون مورد جدید سرطان و ۹,۷ میلیون مرگ در سراسر جهان رخ داده است(۱). یکی از مشکل اصلی در مدیریت سرطان خصوصا در کشور های کمتر توسعه یافته، تشخیص دیرهنگام بیماری است. در مطالعه بیماران مبتلا به سرطان پستان و سرطان دهان در جمعیت ایرانی بترتیب در ۴۵/۸ و ۷۱,۴ درصد افراد بیماری در مرحله[1] پیشرفته (مرحله ۳ یا بالاتر) تشخیص داده شده‌اند (۲, ۳). لذا نیاز به یک رویکرد تشخیصی غیرتهاجمی و تکرارپذیر وجود دارد که بتواند تومورها را در مراحل اولیه تشخیص دهد و بیوپسی مایع می تواند بعنوان راه حل مناسبی مطرح گردد(۴).

بیوپسی مایع برخلاف بیوپسی بافت سنتی، غیر تهاجمی بوده و به یک نمونه ساده خون، بزاق یا ادرار نیاز دارد و می‌تواند در طول زمان برای بیمار تکرار شود(۴, ۵). بیوپسی مایع، تصویر مولکولی تومورها را در زمان واقعی[2] ثبت می‌کند، تشخیص زودهنگام را قبل از بروز علائم امکان‌پذیر می‌سازد و امکان نظارت بر پاسخ به درمان و شناسایی جهش‌های مقاوم به دارو را فراهم می‌کند(۶-۸). نشانگرهای زیستی اصلی بیوپسی مایع شامل ctDNA[3]، ctRNA[4]، miRNA، tEVs[5] و CTCs[6]ها هستند(۱۱-۹). با وجود مزایای ذکر شده، چالش اصلی بیوپسی مایع غلظت بسیار پایین این نشانگرهای زیستی و فراوانی زیر ۰/۱٪ آلل جهش یافته در سرطان‌های مراحل اولیه است(۱۲, ۱۳). روش‌های تشخیصی سنتی مانند PCR حساسیت و کارایی کافی در این زمینه ندارد(۱۴) و تکنیک‌های پیشرفته مانند ddPCR و NGS حساسیت بهتری ارائه می‌دهند اما گران هستند و به تجهیزات پیشرفته نیاز دارند(۷). در پاسخ به این مشکل سامانه‌های تشخیصی مبتنی بر CRISPR (CRISPR-Dx) یک راه‌حل امیدوارکننده ارائه می دهند زیرا حساسیت اتمولار[7] ($10^{-18}$)، ویژگی تشخیص تغییر تک نوکلئوتیدی و زمان پاسخ سریع (کمتر از ۱ ساعت) را ترکیب می‌کنند(۱۵). این خواص منحصر به فرد، CRISPR-Dx را برای تشخیص زودهنگام سرطان از طریق بیوپسی مایع مناسب می‌کند. سامانه‌های تشخیصی مبتی بر CRISPR اولین بار به نام های SHERLOCK (۱۶) و DETECTR (۱۷)معرفی شد و در ادامه سامانه های مختلفی توسعه داده شده‌اند. در این راستا، مقاله مروری حاضر به تبیین سیر تکامل و توسعه سامانه‌های کلیدی مبتنی بر CRISPR می‌پردازد. علاوه بر این، کارایی عملیاتی این سامانه‌ها در شناسایی انواع مختلف سرطان ارزیابی شده و در ادامه چالش ها و چشم انداز سامانه های CRISPR-Dx بررسی خواهد شد.

## ۲. اصول مولکولی CRISPR Dx

فرآیند تشخیص در سامانه‌های CRISPR Dx شامل مراحل اصلی تشخیص توالی هدف توسط کمپلکس Cas و RNAراهنما ، فعال‌سازی آلوستریک پروتئینCas و برش جانبی مولکول‌های گزارشگر و تولید سیگنال می باشد (۱۸) . قبل از آغاز فرآیند تشخیص در سامانه هایی اولیه با هدف افزایش حد تشخیص ، پیش تکثیر نمونه در دمای ثابت با روش هایی مانند RPA[8] (۱۹) و LAMP[9] (۲۰) انجام می شود که با افزایش حساسیت به سطح اتمولار تشخیص زودهنگام جهش‌های نادر در خون را ممکن می‌سازد (۱۸).

### ۲. ۱. تشخیص هدف

هسته هر سامانه CRISPR-Dx پروتئین Cas و RNA راهنما ( sgRNA یا crRNA ) است. RNA راهنما دارای یک توالی

[1] Stage
[2] Real Time
[3] Circulating tumor DNA
[4] Circulating tumor RNA
[5] *Tumor cell-derived extracellular vesicles*
[6] Circulating tumour cells
[7] Attomolar
[8] *Recombinase Polymerase Amplification*
[9] Loop-Mediated Isothermal Amplification

فاصله‌دهنده[1] متغیر بوده و به گونه‌ای طراحی می شود که مکمل توالی اسید نوکلئیک هدف (DNA یا RNA) باشد، و اختصاصیت[2] تشخیصی سامانه را تعیین می‌کند(۲۰, ۲۱). Cas12a و Cas9 به یک توالی کوتاه PAM[3] در مجاورت توالی DNA هدف جهت شناسایی نیاز دارند که شامل توالی NGG برای Cas9 و TTTV برای Cas12a می باشد(۱۸،۲۲). در مقابل، آنزیم هایی مثل Cas13a بدون نیاز به PAM، RNA تک رشته‌ای را شناسایی می کند(۲۳).

## ۲. ۲ .فعال‌سازی پروتئین Cas و تولید سیگنال

پروتئینCas پس از اتصال به توالی هدف، دستخوش تغییرات ساختاری می‌شود، جایگاه‌های فعال آشکار شده و فعالیت آنزیمی را آغاز می کند(24). این بازآرایی ساختاری، برش هماهنگ DNAدو رشته‌ای را تنها زمانی تضمین می‌کند که هم PAM و هم جفت شدن کامل توالی هدف با توالی ناحیه فاصله دهنده برآورده شوند که در نتیجه فعالیت خارج از هدف به حداقل می رسد(۲۵). در آنزیم هایی مانند Cas12 وCas13 ، بازآرایی آلوستریک، یک رفتار آنزیمی متمایز به نام برش جانبی[4] را فعال می‌کند(۱۷). این پروتئین‌ها پس از اتصال به هدف خاص خود، دچار یک تغییر ساختاری می‌شوند و با برش جانبی، باعث تخریب اسیدهای نوکلئیک تک رشته‌ای مجاور (ssDNA برای Cas12 و ssRNAبرای Cas13) می شوند. این فرآیند به طور گسترده در سامانه‌های CRISPR-Dx برای برش مولکول‌های گزارشگر و تولید سیگنال‌های تشخیصی قابل تشخیص مورد استفاده قرار می‌گیرد(۱۵, ۱۷). مولکول‌های گزارشگر فلورسنت معمولا شامل رشته‌های کوتاهی از DNA یا RNA با یک برچسب فلورسنت (فلوروفور[5]) در یک انتها و یک خاموش‌کننده[6] در انتهای دیگر می باشد(۲۶). هنگام شکافت مولکول‌های گزارشگر ، فلوروفور و خاموش‌کننده از هم جدا می‌شوند و یک سیگنال فلورسنت قابل اندازه‌گیری تولید می‌شود(۱۵).

[1] Spacer
[2] Specifity
[3] Protospacer Adjacent Motif
[4] Collateral Cleavage
[5] Fluorophore
[6] Quencher

## ۳. سامانه‌های آغازین

### ۳. ۱. SHERLOCK

سامانه‌ی SHERLOCK نخستین پلتفرم تشخیصیِ معرفی‌شده CRISPR-Dxاست. این سیستم از آنزیم Cas13a برای شناسایی توالی‌های RNA با تفکیک‌پذیری در سطح تک نوکلئوتید استفاده می‌کند. فرآیند تشخیص در این سامانه شامل سه مرحله‌ی اصلی است: ۱) تکثیر هم‌دمای نمونه به روشRT-RPA ، ۲) رونویسی مجدد توسط T7 برای تبدیل DNA تکثیرشده به RNA، و ۳) شناسایی توالی هدف توسط کمپلکس-Cas13a crRNAکه در نهایت منجر به فعال‌سازی فعالیت برش جانبی غیر اختصاصی و تجزیه‌ی گزارشگرهای فلورسنت می‌گردد(۱۶).

SHERLOCK می‌تواند با استفاده ازcrRNA های مهندسی‌شده انواع تغییرات تک‌نوکلئوتیدی(SNV) را تشخیص دهد(۲۷). همچنین SHERLOCK با امکان خوانش جریان جانبی[7] منطبق شده است، که آن را برای استفاده در محل مراقبت[8](POC) مناسب می‌سازد(۲۸). از نظر بالینی، این سامانه با حساسیت و اختصاصیت ۱۰۰٪ برای تشخیص رونوشت‌های ادغام‌شده[9](PML::RARA، BCR::ABL1 ) در لوسمی‌ها (۲۹, ۳۰) و همچنین جهش‌های EGFR در ctDNA بیماران مبتلا به NSCLC (۳۱) و جهش‌های KRAS در سرطان پانکراس (۳۲) استفاده شده است . در کل این روش سریع (۱ تا ۲ ساعت) با تجهیزات سبک، امکان استفاده در مناطق محروم را دارد(۳۰).

### ۳. ۲. DETECTR

DETECTR سامانه تشخیصی است که از Cas12a برای تشخیص توالی‌های DNA با حساسیت اتمولار استفاده می‌کند(۱۷). برخلاف SHERLOCK، DETECTR نیازی به مرحله رونویسی ندارد و این امر تشخیص DNA را ساده‌تر و سریع‌تر می‌کند (۱۷). DETECTR با حد تشخیص حدود 10 aM می‌تواند انواع تک نوکلئوتیدی را با crRNA های اختصاصی تشخیص دهد(۳۳, ۳۴) .این روش برای تشخیص جهش KRAS G12Dدر سرطان کولورکتال (۳۵) ، جهش عامل مقاومت

[7] Lateral-Flow Readout
[8] Point-Of-Care (POC)
[9] Fusion Transcripts

درمانی T790M در ژن EGFR در سرطان ریه(۳۶) و جهش V600E در ژن BRAF(۳۷) به کار گرفته شده است .

### ۳. ۳. LEOPARD

سیستم تشخیصی LEOPARD مبتنی بر Cas9 بوده و تشخیص مستقیم RNA را از طریق یک tracrRNA تغییریافته انجام می‌دهد. در این روش، tracrRNA به‌گونه‌ای طراحی می‌شود که مکمل یک RNA هدف خاص باشد. با حضور RNA هدف، tracrRNA به آن متصل شده و کمپلکسی بازتولید می‌کند که ساختار طبیعی tracrRNA:crRNA را شبیه‌سازی کرده و موجب فعال‌سازی Cas9 می‌شود. در نهایت، Cas9 فعال‌شده یک DNA سنتزی حاوی توالی PAM را برش می‌دهد که این برش با روش‌هایی مانند الکتروفورز یا دستگاه Bioanalyzer ارزیابی می‌گردد. (۳۸). از مزایای سیستم LEOPARD می‌توان به امکان تشخیص هم‌زمان چندین RNA (چندگانه)، عدم نیاز به توالی PAM در هدف، حذف مرحله‌ی رونویسی معکوس و همچنین قابلیت استفاده در نقاط ارائه خدمات درمانی اشاره کرد. (۳۸). اگرچه کارایی LEOPARD در تشخیص RNA ویروسی بررسی و مشخص شده است ، این روش پتانسیل و قابلیت های بالایی در بررسی پروفایل بیانی و تشخیص جهش ژن های کلیدی در نمونه بیوپسی مایع بیماران سرطانی دارد.

## ٤. سامانه‌های تشخیصی Split-Guide CRISPR

### ٤. ١. Dual-guide CRISPR–Cas13

تشخیص SNV ها در RNA با Cas13 به دلیل میزان بالای تحمل عدم تطابق[1] ، چالش برانگیز است و منجر به اثرات خارج از هدف[2] و مثبت کاذب می‌شود. برای حل این مشکل در این سامانه ، sgRNA[3]، به دو RNA تقسیم می‌شود: یک dcrRNA متغیر که به هدف متصل می‌شود و یک dtracrRNA ثابت که با Cas13a تعامل دارد. این دو قطعه تنها در صورت تطابق کامل با توالی هدف، یک کمپلکس عملکردی تشکیل می‌دهند. آزمایش‌های عدم تطابق نشان داد که عدم تطابق تک نوکلئوتیدی، میزان فلورسانس را ۸۰ تا ۸۵ درصد کاهش می‌دهد، که نشان دهنده پتانسیل این سامانه در تشخیص دقیق تر جهش‌های تک نوکلئوتیدی در توالی هدف RNAمی باشد (۳۹). در بررسی های تکمیلی، این سامانه با موفقیت جهش‌های G12D و G12C ژن KRAS را در رده‌های سلولی مختلف سرطان پانکراس تشخیص داد، در حالی که عملکرد سیستم مرسوم[4] Cas13 در تمایز توالی جهش‌یافته از توالی نرمال با خطا همراه بود(۳۹).

### ۲. ٤. DTR[5]

سیستم DTR یک سامانه مبتنی بر Cas12a است که برای تشخیص همزمان اهداف DNA و RNA طراحی شده است. این سیستم از دو قطعه crRNA شکافته شده و دو پروتئین Cas12a استفاده می‌کند ؛ به‌طوری‌که تنها در صورت حضور هم‌زمان هر دو توالی هدف، کمپلکس فعال تشکیل می‌شود. با شناسایی اهداف مربوطه (شامل RNA، DNA تک‌رشته‌ای یا دورشته‌ای و هیبریدهای DNA/RNA) توسط crRNAها، دو پروتئین Cas12a به صورت مشترک یک کمپلکس عملکردی تشکیل داده و فعالیت برشِ جانبی را فعال می‌سازند.(۴۰). سیستم DTR برای شناسایی دو miRNA مرتبط با کارسینوم سلول سنگفرشی دهان[6] ( miR-155 و miR-let-7a) در نمونه‌های تومور ۷ بیمار و ۳ فرد سالم به کار گرفته شد و با موفقیت تمام بیماران سرطانی را از افراد سالم تشخیص داد که نشان دهنده حساسیت، ویژگی و قابلیت چندگانه بالای آن می باشد(۴۰).

## ۵. سامانه های مستقل از PAM

نیاز به یک توالی PAM خاص (مثال توالی TTTV برای Cas12a) با کاهش طیف توالی‌های قابل هدف‌گیری منجر به محدود شدن کاربرد سامانه های CRISPR-Dx برای بسیاری از

[1] Mismatch Tolerance
[2] Off-Target
[3] Single-guide RNAs
[4] conventional
[5] Double-Target Responsive
[6] Oral Squamous Cell Carcinoma

جایگاه‌های ژنومی می شود. برای رفع این محدودیت، چندین سامانه نوآورانه مستقل از PAM توسعه داده شده‌اند.

### ۱. ۵. PUMA

PUMA یک سامانه تشخیصی مستقل از PAM است که از یک tracrRNA تغییر یافته برای فعال کردن Cas12a جهت شناسایی اهداف RNA بدون نیاز به وجود PAM استفاده می‌کند. در این سیستم، tracrRNA تغییر یافته برای اتصال مستقیم به RNA هدف طراحی شده است. با اتصال tracrRNA به RNA هدف، کمپلکس حاصل مانند crRNA طبیعی Cas12 را برای برش یک مولکول DNA که به‌طور جداگانه تهیه شده و حاوی توالی PAM لازم است، هدایت می‌کند که نتیجه برش جانبی گزارشگرهای ssDNA خواهد بود. با حذف الزام وجود PAM ، PUMA امکان شناسایی هر توالی RNA را بدون محدودیت‌های PAM فراهم می‌کند. این سامانه با موفقیت برای تشخیص جهش G12D در ژن KRAS در سلول‌های سرطانی پانکراس به کار رفته است(۴۱).

### ۲. ۵. TRACER

سیستم TRACER وابستگی CRISPR-Cas12a به PAM را بدون دستکاری Cas12a یا crRNA برطرف می‌کند. مبنای این روش، تبدیل DNA دورشته‌ایِ به حالت تک‌رشته‌ای پیش از سنجش است؛ چرا که آنزیم Cas12a مولکول‌های ssDNA را بدون نیاز به حضور PAM و با کارایی بالا برش می‌زند. در این فرایند، نمونه‌ی DNA ابتدا با استفاده از حرارت یا NaOH دناتوره و تک‌رشته‌ای می‌شود؛ سپس ssDNA به‌دست‌آمده توسط crRNA شناسایی می شود. TRACER قادر به تشخیص توالی تا غلظت 0.5 aM می باشد و می‌تواند آلل جهش‌یافته را تا فراوانی ۰/۱٪ را در نمونه‌های هتروزیگوت شناسایی کند(۴۲).کارایی تشخیصی TRACER با استفاده از نمونه‌های توموری سرطان پستان و ریه بررسی شده است. در سرطان پستان، با حساسیت، اختصاصیت ۱۰۰٪ تمام نمونه‌های حامل جهش Y537S در ژن ESR1شناسایی شد و در سرطان ریه سلول غیرکوچک (NSCLC)، جهش Y537S در ژن EGFR را با حساسیت ۹۱/۷٪، اختصاصیت ۱۰۰٪ و دقت کلی ۹۶/۷٪ تشخیص داد. در هیچ یک از آزمایش‌ها هیچ نتیجه مثبت کاذبی مشاهده نشد که نشان‌دهنده و قابلیت اطمینان این سامانه برای تشخیص جهش در نمونه‌های بالینی سرطان است (۴۲).

## ٦ . سامانه‌های فوق حساس برای جهش‌های ctDNA و پایش درون‌تنی

تشخیص جهش های ctDNA در مراحل اولیه سرطان و یا پایش حداقل بیماری باقیمانده (MRD) نیاز به حساسیت فوق‌العاده‌ای دارد، زیرا آلل‌های جهش‌یافته اغلب در فرکانس‌های بسیار کمتر از ۰,۱٪ وجود دارند(۱۳). سامانه‌های شرح داده شده در زیر به طور خاص در پاسخ به این چالش از طریق تشخیص جهش نادر فوق حساس یا تصویربرداری مستقیم درون‌تنی تومور طراحی شده‌اند.

### ۱ .٦. SPEAR

سامانه SPEAR یک روش تشخیصی تک‌مرحله‌ای بر پایه سیستم CRISPRاست که کارایی تکثیر هم‌دمای NEAR را با قابلیت‌های Cas12b ادغام کرده تا امکان تشخیص فوق‌حساس و سریع واریانت های تک نوکلئوتیدی(SNV) فراهم شود. این روش امکان تشخیص جهش‌های ژنی را در حد تشخیص ۰,۱٪ فراوانی آلل تغییر یافته(VAF[1]) حتی در حضور پس‌زمینه قوی توالی سالم دارد(۴۳). SPEAR در بررسی نمونه های خون ، نتایج را در ۳۰ دقیقه ارائه می دهد و پتانسیل بالایی برای تشخیص در زمان واقعی و غربالگری سرطان در محل مراقبت نشان می‌دهد(۴۳).کاربرد بالینی SPEAR مستقیماً از طریق تشخیص جهش‌های ژن KRAS در نمونه‌های بیماران مبتلا به سرطان پانکراس و جهش‌های ژن FLT3 در لوسمی میلوئیدی حاد بررسی و تایید شده است .همچنین، ارزیابی SPEAR روی ۱۰۷ نمونه خون، تطابق بالایی با نتیجه تعیین توالی نشان داد که قابلیت آن را در تشخیص جهش در محل مراقبت تأیید می‌کند(۴۳).

### ۲ .٦. TIDE-Cas14a

در سامانه TIDE-Cas14a، روش تکثیر هم‌دمای RPA با آنزیم Cas14a که صرفاً توسط ssDNA فعال می‌شود ادغام شده است.

[1] Variant Allele Frequency

همچنین با به‌کارگیری اگزونوکلئاز T7 جهت تبدیل قطعات تکثیرشده‌ی دورشته‌ای به DNA تک‌رشته‌ای، کل این فرآیند در دمای ثابت ۳۷ درجه سانتی‌گراد انجام شده و نیاز به چرخه‌های حرارتی برطرف می‌گردد. به‌منظور کمی‌سازی مطلق جهش‌های نادر، این سیستم با یک تراشه میکروفلوئیدیک دیجیتال حاوی ۱۰۰،۰۰۰ میکروچاهک یکپارچه شده است. این بخش‌بندی ، کمی‌سازی دقیق را از طریق انجام واکنش‌های مستقل در قطره‌هایی با حجم نانولیتر امکان‌پذیر می‌سازد.(12). استفاده از TIDE-Cas14a در مطالعه ۳۲ نمونه بیمار سرطان پستان نشان داد که با حساسیت و اختصاصیت ۱۰۰٪ جهش H1047R را در ژن PIK3CAتشخیص می دهد. همچنین این سامانه، با بررسی ctDNA دو بیمار stage IA که توسط PCR دیجیتال قطره‌ای[1] (ddPCR) منفی گزارش شده بود، شناسایی کرد. این امر، توانایی آن را در شناسایی جهش‌های بسیار نادر در مراحل اولیه سرطان، برجسته می‌کند. TIDE-Cas14a با استفاده از تراشه میکروفلوئیدیک دیجیتال به حد تشخیص به VAF 0.001٪ و بدون تراشه به VAF 0.01٪ دست یافته است.(۱۲)

### ۶.۳. MUTE-Seq

MUTE-Seq یک رویکرد مبتنی بر غنی‌سازی توالی جهش یافته است که از CRISPR مهندسی‌شده FnCas9-AF2، برای حذف انتخابی توالی‌های سالم از نمونه، قبل از توالی‌یابی استفاده می‌کند. FnCas9-AF2با دقت بالا، عدم تطابق تک‌بازی در توالی هدف با crRNA را با خطای نزدیک به صفر تشخیص می‌دهد و امکان برش اختصاصی توالی سالم کاملاً منطبق را فراهم می‌کند، در حالی که DNA جهش‌یافته را دست‌نخورده باقی می‌گذارد(۴۴). بنابراین MUTE-Seq با حذف انتخابی DNA سالم، DNA تومور در گردش را غنی می‌کند و سیگنال‌های مربوطه را ده‌ها برابر افزایش می‌دهد. کارایی این روش در سرطان‌های ریه NSCLC و پانکراس در بیماران Stage I از نظر، تطابق پلاسما-بافت برای جهش در ژن EGFR و KRAS ارزیابی شد که تطابق ۱۰۰٪ بافت-پلاسما نشان داد. MUTE-Seq با حد تشخیص 0.005% VAF دست می‌یافته که بهتر از توالی‌یابی بسیار عمیق و پرهزینه است. بنابراین، MUTE-Seq ابزاری مقرون‌به‌صرفه برای ردیابی MRD، تشخیص زودهنگام سرطان‌های و نظارت بر جهش‌های مقاوم به درمان ارائه می‌دهد(۴۴).

### ۶.۴. CasUber

CasUber یک نانوحسگر مبتنی بر Cas12a است که برای نظارت بر تومور داخل بدن از طریق یک آزمایش ادرار ساده طراحی شده است. در مطالعات انجام شده بر روی موش، این نانوحسگر به صورت سیستمیک تزریق شده و به طور انتخابی سلول‌های تومور را با استفاده از لیگاندهایی مانند آپتامرهای ضد HER2 هدف قرار می‌دهد. کمپلکس Cas12a/sgRNA پس از ورود به میتوکندری سلول‌های تومور SNV مختص تومور را در ژنوم میتوکندری شناسایی می کند [۶۸]. پس از شناسایی، Cas12a فعال شده و با برش جانبی یک گزارشگر فلورسنت از پیش بارگذاری شده منجر به رها سازی یک فلوروفور کوچک می شود. این فلوروفوراز طریق کلیه دفع شده و در ادرار تجمع می‌یابدو در آنجا اندازه‌گیری می شود.از آنجا که هر سلول تومور حاوی هزاران نسخه از mtDNA است، CasUber می تواند راه حل مناسبی برای غلظت خیلی کم ctDNA در گردش خون باشد بصورتی که CasUber تشخیص ضایعات توموری بسیار کوچک به اندازه حدود ۱ میلی‌متر مکعب را امکان‌پذیر کرد و ندول‌های تومور ریه را زودتر از تصویربرداری بیولومینسانس در یک مدل موش شناسایی کرد. این نانوحسگر قابل پاکسازی کلیوی، یک استراتژی غیرتهاجمی، حساس را برای تشخیص جهش درجا[2] ارائه می‌دهد و مکمل قدرتمندی برای رویکردهای بیوپسی مایع مرسوم برای غربالگری زودهنگام سرطان و نظارت بر پیشرفت تومور است.

## ۷ .سامانه‌های مبتنی بر آنزیم‌های نوظهور (CNC و Cas10)

### ۷.۱. CNC

Cas7-11 یک CRISPR type III-E است(۴۵) که با پروتئاز شبه کاسپاز Csx29، کمپلکس بنام Craspase را تشکیل دهد. پس از

[1] Droplet Digital PCR

[2] In situ

شناسایی RNA هدف، Csx29 فعال شده، سوبستراهای پروتئینی (مانند Csx30) را برش می‌دهد و یک آبشار پروتئازی را آغاز می‌کند(۴۶). برای استفاده از این قابلیت منحصر به فرد در تشخیص، سامانه CNC[1] با ترکیب Craspase با NanoLock که یک گزارشگر زیست‌تابی[2] بسیار حساس است توسعه داده شد. در این سامانه با شناسایی توالی هدف و فعال شدن Craspase، پروتئین Csx30 متصل به NanoLock توسط Csx29 برش داده می شود. این برش، یک سیگنال زیست‌تابی را ایجاد می‌کند که می‌تواند تنها در ۱۰ دقیقه شناسایی شود. این سامانه قادر به شناسایی RNA هدف تا غلظت 250 fM بدون نیاز به پیش تکثیر نمونه می باشد(۴۷). با توجه به اینکه این روش بر فعالیت پروتئازی (برش پروتئین) به جای برش اسید نوکلئیک متکی است، CNC این قابلیت را دارد که علاوه بر تشخیص اهداف RNA برای تشخیص پپتیدها یا پروتئین‌ها ارتقاء یابد.

### ۷.۲. Cas10-GFET Biosensor

دراین سامانه با بکارگیری CRISPR-Cas10 در کنار ترانزیستور اثر میدانی گرافن[3] (GFET) ، تشخیص RNA در سطح اتمولار و بدون نیاز به پیش تکثیر نمونه با تبدیل ردگیری RNA به یک سیگنال الکترونیکی انجام می شود. مکانیسم تشخیص بر کمپلکس CRISPR-Cas10 dCsm3 تغییر یافته متکی است. یک جهش کلیدی در زیر واحد Csm3 از تخریب RNA هدف پس از تشخیص جلوگیری می‌کند و منجر به حفظ فعالیت برش ssDNA بصورت پیوسته می شود. رشته های ssDNA گزارشگرهای هستند که بر روی کانال GFET بی‌حرکت هستند. همانطور که Cas10 فعال، این گزارشگرها را می‌شکنند، چگالی بار روی سطح گرافن تغییر می‌کند و این تغییر توسط GFET به یک سیگنال الکتریکی قابل اندازه‌گیری تبدیل می‌شود(۴۸).کارکرد تشخیصی این سیستم با بررسی miRNA-155 بعنوان نشانگر زیستی در سرطان سینه ارزیابی شده که با موفقیت بیماران سرطان سینه را از افراد سالم از طریق نمونه‌های سواب گلو و سرم بدون نیاز به استخراج، خالص‌سازی یا تکثیر اسید نوکلئیک تشخیص داده است. این سامانه با حد تشخیص 214 aM برای RNAهای با طول متوسط و 427 aM برای miRNAها عملکرد خوبی را در شناسایی RNAs نشان می دهد. از آنجا که خوانش کاملاً الکترونیکی است، دستگاه می‌تواند کوچک شده و با لوازم الکترونیکی قابل حمل برای کاربردهای مراقبت در محل ادغام شود. (۴۸).

## ۸. سامانه‌های تشخیص نشانگر زیستی پروتئین

### ۸.۱ COCAS[4]

در این سیستم، تشخیص یک هدف پروتئینی با بکارگیری Cas12a انجام می‌شود. این سامانه از یک نانوماده به نام چارچوب آلی کووالانسی[5](COFs ) استفاده می‌کند که دو جزء بارگذاری شده دارد: آپتامرها که به طور خاص به پروتئین‌های هدف متصل می‌شوند و رشته‌های فعال‌کننده متعدد DNA. هنگامی که آپتامر به پروتئین هدف خود متصل می‌شود، رشته‌های فعال‌کننده آزاد می‌شوند. این رشته‌های DNA آزاد شده CRISPR-Cas12a را فعال می‌کنند که گزارشگرهای فلورسنت را تجزیه کرده و یک سیگنال نوری قابل اندازه‌گیری تولید می‌کند. از آنجایی که یک مولکول پروتئین می‌تواند رشته‌های فعال‌کننده زیادی را آزاد کند و یک Cas12a فعال شده می‌تواند گزارشگرهای زیادی را تجزیه کند، سیگنال به میزان زیادی تقویت می‌شود. از COCAS برای تشخیص نشانگرهای زیستی سرطان تخمدان CA125 و HE4 استفاده شده است که با حد تشخیص **0.001 U/mL** برای CA125 و **0.2 pg/mL** برای HE4 قادر به شناسایی این دو پروتئین بود(۴۹).

### ۸.۲. PLACS[6]

PLACS یک آپتاسنسور[7] مبتنی بر Cas12a برای تشخیص پروتئین است که از طریق تغییر رنگ قابل مشاهده امکان استفاده در محل مراقبت را بدون نیاز به خوانش الکترونیکی فراهم می‌کند. در این روش، آپتامر به‌گونه‌ای طراحی می‌شود که قابلیت

---

[1] Craspase – NanoLock–Csx30(CNC)
[2] Bioluminescence
[3] Graphene Field-Effect Transistor
[4] **Covalent Organic Framework-CRISPR Assay**
[5] Covalent Organic Frameworks
[6] CRISPR-Liquid Crystal Sensors
[7] Aptasensor

اتصال رقابتی به پروتئین هدف یا توالی crRNA را داشته باشد. در غیاب پروتئین هدف، آپتامر با crRNA هیبرید شده و Cas12a را فعال می‌کند؛ سپس Cas12a فعال‌شده، رشته‌های ssDNA روی سطح حسگر را برش می‌دهد. قطعات کوتاه ssDNA باقی مانده باعث می‌شوند کریستال‌های مایع به صورت عمودی تراز شوند و یک پس‌زمینه تاریک ایجاد کنند.هنگامی که هدف وجود دارد آپتامر با پروتئین هدف کمپلکسی تشکیل می‌دهد و از هیبرید شدن آپتامر با crRNA جلوگیری می شود، در نتیجه سیستم Cas12a-crRNAغیرفعال می‌ماند و نمی‌تواند ssDNA را روی سامانه حسگر برش دهد. در ادامه ssDNA دست نخورده جهت هوموتروپیک کریستال‌های مایع را مختل می‌کند و باعث می‌شود که آنها به طور تصادفی در یک راستا قرار گیرند. این امر دید قطبی سامانه حسگر را از تاریک به رنگی تغییر می‌دهد که نشان‌دهنده مثبت بودن آزمایش است. از این روش برای اندازه گیری میزان آنتی‌ژن اختصاصی پروستات (PSA) با هدف غربالگری سرطان پروستات در مراحل اولیه استفاده شد که با حد تشخیص $0.28\ ag\ mL^{-1}$قادر به اندازه گیری PSA می باشد(۵۰).

## ۹ .چالش‌های فنی، بالینی و چشم اندازه آینده

با وجود پیشرفت‌های چشمگیر، چندین چالش کلیدی همچنان مانع از پذیرش گسترده‌ی سامانه‌های CRISPR-Dx برای تشخیص زودهنگام سرطان می‌شود. یکی از اصلی‌ترین موانع، عدم وجود پروتکل‌های استاندارد و بین‌المللی برای استخراج cfDNA، طراحی crRNA، تنظیم شرایط واکنش و تحلیل داده‌ها است(۵۱-۵۳). علاوه بر این، دستیابی به دقت تک‌نوکلئوتیدی غالباً نیازمند بهینه‌سازی‌های تجربیِ زمان‌بر بوده و رویکردهای فعلی فاقد دستورالعمل‌های مورد توافق جامع هستند(۵۴). کالیبراسیون صحیح سیگنال‌ها بسیار مهم است، اما بسیاری از مطالعات داده‌های کافی برای تأیید سازگاری نتایج ارائه نمی‌دهند(۵۵).

فراهم ساختن زنجیره سرد بار قابل توجهی را تحمیل می‌کند، زیرا بسیاری از معرف‌ها نیاز به ذخیره‌سازی دقیق در دمای پایین دارند که باعث افزایش هزینه‌ها و پیچیدگی های عملیاتی استفاده در محیط‌های کم برخوردار می‌شود(۵۶). همچنین در گردش‌های کاری دو مرحله‌ای، نیاز به باز کردن لوله‌های واکنش پس از پیش‌تکثیر، خطر آلودگی آئروسل و نتایج مثبت کاذب را ایجاد می‌کند(۵۷). علاوه بر این چارچوب های تشخیص مبتنی بر CRISPRهنوز در حال تکامل است و فراهم ساختن الزامات FDAهمچنان چالش بزرگ است و نیاز به هماهنگی بین‌المللی برای تسریع استفاده بالینی از سامانه‌های جدید می باشد(58, 59).

حوزه تشخیص مبتنی بر CRISPR با سرعت بی‌سابقه‌ای در حال پیشرفت است و انتظار تغییرات هیجان‌انگیز در روند تشخیص سرطان وجود دارد. در آینده انتظار می رود، نوارها یا تراشه‌های یکبار مصرف CRISPR-Dx برای استفاده خانگی در دسترس قرار گیرند و با ردگیری نشانگرهای زیستی در بیوپسی‌های مایع، نیاز به تکنیک‌های تهاجمی کاهش یابد(۶۰). این کیت‌ها با تلفیق معرف‌های لیوفیلیزه، سیستم‌های خوانش جریان جانبی و آنالیز تصویری بر پایه گوشی‌های هوشمند، امکان خودآزمایی و تشخیص زودهنگام علائم سرطان را برای افراد فراهم خواهند ساخت. از دیگر رویکردهای هیجان‌انگیز در این حوزه، توسعه سامانه‌های است که ابتدا جهش سرطانی را تشخیص داده و سپس با همان سیستم CRISPR آن را درمان می‌کنند(۶۱). چنین سیستم‌های «تشخیص و تخریب» مرز میان تشخیص و درمان را کم‌رنگ ساخته و یک الگوی جدید وقدرتمند را ارائه می‌دهند که می‌تواند اساساً نحوه مدیریت سرطان را تغییر دهد. همچنین ورود سامانه های فوق حساس مانند MUTE-Seq با حد تشخیص 0.005% VAF می تواند باعث تحول در پایش **MRD** گردد(۴۴). با افزایش دسترسی به سامانه های CRISPR، پایش روتین MRD می‌تواند به یک روش استاندارد تبدیل شود و امکان مداخله زودهنگام و درمان کمکی شخصی‌سازی‌شده فراهم شود. علاوه بر این، از سامانه های CRISPR-Dx می توان برای تعیین دقیق میزان **متیلاسیون** DNA در نمونه های تیمار شده با بی‌سولفیت استفاده کرد(۶۲) لذا از این سامانه ها می تواند در ارزیابی متیلاسیون نابجای ژن های سرکوبگر توموری در بیوپسی مایع نیز بکار رود (۶۲).

**هوش مصنوعی**(AI) نیز به سرعت در حال تبدیل شدن به محرک اصلی تشخیص‌های مبتنی بر CISPR است(۶۳) .

ابزارهایی مانندEasyDesign و DeepCRISPR قادر به طراحی crRNAهایی با حداقل فعالیت خارج از هدف و حداکثر تمایز انواع تک نوکلئوتیدی طراحی است(۶۴, ۶۵) و BADGERS با اعمال تغییرات هدفمند توالی در crRNA، قدرت تمایز SNPs را ۲-۳ افزایش داده است(۶۶).همچنین مدل‌های AI به طور فزاینده‌ای برای تفسیر سیگنال خوانش‌های فلورسانس یا الکتروشیمیایی CRISPR-Dx استفاده می شوند بصورتی که با تفسیر سریع و خودکار تصاویر گرفته شده توسط گوشی‌های هوشمند به دقت[1] ۹۶,۵٪ دست یافته‌اند (۶۶, ۶۷). علاوه بر این، هوش مصنوعی با تحلیل هم‌زمان و **یکپارچه‌سازی نتایج چندین زیست‌نشانگر** (شامل **متیلاسیون** و جهش‌های ctDNA، پنل‌های miRNA و نشانگرهای پروتئینی) قادر به پیش‌بینی نوع سرطان، مرحله‌ی بیماری (Stage) و میزان پاسخ به درمان است. از این رو، هم‌افزایی هوش مصنوعی با سامانه‌های CRISPR-Dx، شرایط را برای تشخیص زودهنگام، مدیریت جامع بیماری و پایش MRD در طول فرآیند درمان تسهیل خواهد کرد(۶۸).

**جدول ۱.** مقایسه سامانه های تشخیصی مبتنی بر CRISPR

| سامانه | Cas Protein | وابستگی به PAM | نوع هدف | گزارشگر | حد تشخیص (LOD) | نمونه سرطان استفاده شده |
|---|---|---|---|---|---|---|
| SHERLOCK | Cas13a | مستقل | RNA | fluorescent ssRNA | ≤10 aM | انواع لوسمی، سرطان پانکراس، NSCLC |
| DETECTR | Cas12a | وابسته | DNA | fluorescent ssDNA | 10 aM | سرطان کولورکتال، سرطان ریه، ملانوما |
| LEOPARD | Cas9 | مستقل | RNA | DNA cleavage | ≤10 aM | Viral RNA |
| Dual-guide CRISPR–Cas13 | Cas13a | مستقل | RNA | fluorescent ssRNA | 0.5 copies/µl | سرطان پانکراس، Viral RNA |
| DTR | Cas12a | وابسته | DNA/RNA | fluorescent ssDNA | 78 fM | با کارسینوم سلول سنگفرشی دهان |
| PUMA | Cas12a | مستقل | RNA | fluorescent ssDNA | 100 pM | سرطانی پانکراس |
| TRACER | Cas12a | مستقل | DNA | fluorescent ssDNA | 0.5 aM | سرطان پستان، سرطان ریه |
| SPEAR | Cas12b | وابسته | DNA | fluorescent ssDNA | 1 copy per reaction | سرطان پانکراس، لوسمی میلوئیدی حاد |
| TIDE-Cas14a | Cas14a | مستقل | DNA | fluorescent ssDNA | 0.001 % VAF | سرطان پستان |
| MUTE-Seq | FnCas9-AF2 | وابسته | DNA | Sequencing | 0.005 % VAF | سرطان پانکراس، NSCLC |
| CasUber | Cas12a | وابسته | mtDNA | fluorescent ssDNA | 1 mm³ tumour | سرطان ریه |
| CNC | Cas7-11 | مستقل | RNA | Bioluminescence (NanoLock) | 250 fM | – |
| Cas10-GFET Biosensor | Cas10 | مستقل | RNA | Electronic (GFET) | 214 aM | سرطان پستان |
| COCAS | Cas12a | وابسته | پروتئین | fluorophore-quencher reporter | 0.001 U/mL | سرطان تخمدان |
| PLACS | Cas12a | وابسته | پروتئین | Liquid crystal | 0.28 ag/mL | سرطان پروستات |

[1] Accuracy

**ملاحظات اخلاقی:**

پروپوزال این مطالعه با کد اخلاق IR.SIRUMS.REC.1405.011 توسط دانشکده علوم پزشکی سیرجان تایید شده است.

## References


.۱ Bray F, Laversanne M, Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. CA Cancer J Clin. 2024;74(3):229–63.

.۲ Foroozani E, Ghiasvand R, Mohammadianpanah M, Afrashteh S, Bastam D, Kashefi F, et al. Determinants of delay in diagnosis and end stage at presentation among breast cancer patients in Iran: a multi-center study. Sci Rep. 2020;10(1):21477.

.۳ Esmaelbeigi F, Hadji M, Harirchi I, Omranipour R, vand Rajabpour M, Zendehdel K. Factors affecting professional delay in diagnosis and treatment of oral cancer in Iran. Arch Iran Med. 2014;17(4):253–7.

.۴ Crowley E, Di Nicolantonio F, Loupakis F, Bardelli A. Liquid biopsy: monitoring cancer-genetics in the blood. Nat Rev Clin Oncol. 2013;10(8):472–84.

.۵ Heitzer E, Haque IS, Roberts CES, Speicher MR. Current and future perspectives of liquid biopsies in genomics-driven oncology. Nat Rev Genet. 2019;20(2):71–88.

.۶ De Rubis G, Rajeev Krishnan S, Bebawy M. Liquid Biopsies in Cancer Diagnosis, Monitoring, and Prognosis. Trends Pharmacol Sci. 2019;40(3):172–86.

.۷ Siravegna G, Marsoni S, Siena S, Bardelli A. Integrating liquid biopsies into the management of cancer. Nat Rev Clin Oncol. 20.۴۸–۵۳۱:(۹)۱۴;۱۷

.۸ Yazarlou F, Mowla SJ, Kholghi Oskooei V, Motevaseli E, Tooli LF, Afsharpad M, et al. Urine exosome gene expression of cancer-testis antigens for prediction of bladder carcinoma. Cancer Management and Research. 2018:5373–81.

.۹ Kalluri R, LeBleu VS. The biology, function, and biomedical applications of exosomes. Science. 2020;367(6478).

.۱۰ Mirtavoos-Mahyari H, Khosravi A, Motevaseli E, Esfahani-Monfared Z, Seifi S, Kholghi Oskooei V, et al. Circulating free DNA concentration as a marker of disease recurrence and metastatic potential in lung cancer. Clinical and translational medicine. 2019;8(1):e14.

.۱۱ Nekoohesh L, Modarressi MH, Mowla M, Saffari M, Kholghi Oskooei V. Expression profile of miRNAs in urine samples of bladder cancer patients. Biomarkers in medicine. 2018;12(12):1311–21.

.۱۲ Yu Y, Jin M, Yuan W, Gong Y, Li S, Qin X, et al. Engineered crRNA Drives RPA-T7-CRISPR/Cas14a Cascade for Ultrasensitive Detection of ctDNA PIK3CA H1047R. Adv Sci (Weinh). 2025;12(44):e07126.

.۱۳ Arisi MF, Dotan E, Fernandez SV. Circulating Tumor DNA in Precision Oncology and Its Applications in Colorectal Cancer. Int J Mol Sci. 2022;23(8).

.۱۴ Mishra S, Jeon J, Kang JK, Song SH, Kim TY, Ban C, et al. Direct Detection of Low Abundance Genes of Single Point Mutation. Nano Lett. 2021;21(21):9061–8.

.۱۵ Kaminski MM, Abudayyeh OO, Gootenberg JS, Zhang F, Collins JJ. CRISPR-based diagnostics. Nat Biomed Eng. 2021;5(7):643–56.

.۱۶ Myhrvold C, Freije CA, Gootenberg JS, Abudayyeh OO, Metsky HC, Durbin AF, et al. Field-deployable viral diagnostics using CRISPR-Cas13. Science. 2018;360(6387):444–8.

.۱۷ Chen JS, Ma E, Harrington LB, Da Costa M, Tian X, Palefsky JM, et al. CRISPR-Cas12a target binding unleashes indiscriminate single-stranded DNase activity. Science. 2018;360(6387):436–9.

.۱۸ Son H. Harnessing CRISPR/Cas Systems for DNA and RNA Detection: Principles, Techniques, and Challenges. Biosensors (Basel). 2024;14(10).

.۱۹ Piepenburg O, Williams CH, Stemple DL, Armes NA. DNA detection using recombination proteins. PLoS Biol. 2006;4(7):e204.

.۲۰ Gootenberg JS, Abudayyeh OO, Lee JW, Essletzbichler P, Dy AJ, Joung J, et al. Nucleic acid detection with CRISPR-Cas13a/C2c2. Science. 2017;356(6336):438–42.

.۲۱ Zetsche B, Gootenberg JS, Abudayyeh OO, Slaymaker IM ,Makarova KS, Essletzbichler P, et al. Cpf1 is a single RNA-guided endonuclease of a class 2 CRISPR-Cas system. Cell. 2015;163(3):759–71.

.۲۲ Leenay RT, Beisel CL. Deciphering, Communicating, and Engineering the CRISPR PAM. J Mol Biol. 2017;429(2):177–91.

.۲۳ Liu L, Li X, Ma J, Li Z, You L, Wang J, et al. The Molecular Architecture for RNA-Guided RNA Cleavage by Cas13a. Cell. 2017;170(4):714–26 e10.

.۲۴ Nishimasu H, Ran FA, Hsu PD, Konermann S, Shehata SI, Dohmae N, et al. Crystal structure of Cas9 in complex with guide RNA and target DNA. Cell. 2014;156(5):935–49.
.۲۵ Sternberg SH, Redding S, Jinek M, Greene EC, Doudna JA. DNA interrogation by the CRISPR RNA-guided endonuclease Cas9. Nature. 2014;507(7490):62–7.
.۲۶ Sahel DK, Giriprasad G, Jatyan R, Guha S, Korde A, Mittal A, et al. Next-generation CRISPR/Cas-based ultrasensitive diagnostic tools: current progress and prospects. RSC Adv. 2024;14(44):32411–35.
.۲۷ Ma H, Tian Y, Kong D, Guo M, Dai C, Wang Q, et al. One-base-mismatch CRISPR-based transistors for single nucleotide resolution assay. Biosens Bioelectron. 2024;262:116548.
.۲۸ de Puig H, Lee RA, Najjar D, Tan X, Soeknsen LR, Angenent-Mari NM, et al. Minimally instrumented SHERLOCK (miSHERLOCK) for CRISPR-based point-of-care diagnosis of SARS-CoV-2 and emerging variants. Sci Adv. 2021;7(32).
.۲۹ Vedula RS, Karp HQ, Koob J, Lim F, Garcia JS, Winer ES, et al. CRISPR-based rapid molecular diagnostic tests for fusion-driven leukemias. Blood. 2024;144(12):1290–9.
.۳۰ Bonadies N. SHERLOCK unmasks fusion-driven leukemias. Blood. 2024;144(12):1241–3.
.۳۱ Wang L, Wen X, Yang Y, Hu Z, Jiang J, Duan L, et al. CRISPR/Cas13a-based supersensitive circulating tumor DNA assay for detecting EGFR mutations in plasma. Commun Biol. 2024;7(1):657.
.۳۲ Amintas S, Cullot G, Boubaddi M, Rebillard J, Karembe L, Turcq B, et al. Integrating allele-specific PCR with CRISPR-Cas13a for sensitive KRAS mutation detection in pancreatic cancer. J Biol Eng. 2024;18(1):53.
.۳۳ Cao G, Chen X, Deng Y, Nie F, Liu Y, Wang G, et al. Single-nucleotide variant of PIK3CA (H1047R) gene assay by CRISPR/Cas12a combined with rolling circle amplification. Anal Chim Acta. 2021;1182:338943.
.۳۴ Krysler AR, Cromwell CR, Tu T, Jovel J, Hubbard BP. Guide RNAs containing universal bases enable Cas9/Cas12a recognition of polymorphic sequences. Nat Commun. 2022;13(1):1617.
.۳۵ Zhou H, Tsou JH, Leng Q, Jiang F. Sensitive Detection of KRAS Mutations by Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats. Diagnostics (Basel). 2021;11(1).
.۳۶ Tsou JH, Leng Q, Jiang F. A CRISPR Test for Rapidly and Sensitively Detecting Circulating EGFR Mutations. Diagnostics (Basel). 2020;10(2).
.۳۷ Etemadzadeh A, Salehipour P, Motlagh FM, Khalifeh M, Asadbeigi A, Tabrizi M, et al. An Optimized CRISPR/Cas12a Assay to Facilitate the BRAF V600E Mutation Detection. J Clin Lab Anal. 2024;38(21):e25101.
.۳۸ Jiao C, Sharma S, Dugar G, Peeck NL, Bischler T, Wimmer F, et al. Noncanonical crRNAs derived from host transcripts enable multiplexable RNA detection by Cas9. Science. 2021;372(6545):941–8.
.۳۹ Aguilar-Gonzalez A, Martos-Jamai I, Ramos-Hernandez I, Molina-Estevez FJ, Villao NV, Puig-Serra P, et al. A novel Dual-guide CRISPR-Cas13 strategy improves specificity for single-nucleotide variant detection. Nucleic Acids Res.(۵)۵۴;۲۰۲۶ .
.۴۰ Jiang Q, Jin S, Qin Z, Zhang J, He R, Chen Z, et al. CRISPR/Cas12a DTR system: a topology-guided Cas12a assay for specific dual detection of RNA and DNA targets. Nucleic Acids Res. 2025;53(17).
.۴۱ Jiao C, Peeck NL, Yu J, Ghaem Maghami M ,Kono S, Collias D, et al. TracrRNA reprogramming enables direct PAM-independent detection of RNA with diverse DNA-targeting Cas12 nucleases. Nat Commun. 2024;15(1):5909.
.۴۲ Ai J, Deng J, Hu J, Pu X, Yuan T, Teng Y, et al. PAM-Independent CRISPR-Cas12a System for Specific Assays of Single Nucleotide Variants. JACS Au. 2025;5(3):1392–401.
.۴۳ Bai L, Pang Y, Wang T, Wang S, Guo K, Xuan T, et al. SPEAR: CRISPR-mediated ultrasensitive, specific and rapid one-pot detection strategy for cancer-related SNPs. Theranostics. 2025;15(8):3275–88.
.۴۴ Ye S, Kim JS, Kim M, Kim KY, Won YH, Park T, et al. MUTE-Seq: An Ultrasensitive Method for Detecting Low-Frequency Mutations in cfDNA With Engineered Advanced-Fidelity FnCas9. Adv Mater. 2025;37(47):e05208.
.۴۵ Kato K, Okazaki S, Schmitt-Ulms C, Jiang K, Zhou W, Ishikawa J, et al. RNA-triggered protein cleavage and cell growth arrest by the type III-E CRISPR nuclease-protease. Science. 2022;378(6622):882–9.
.۴۶ Wang X, Yu G, Wen Y, An Q, Li X, Liao F, et al. Target RNA-guided protease activity in type III-E CRISPR-Cas system. Nucleic Acids Res. 2022;50(22):12913–23.
.۴۷ Xiao Y, Chen J, Hou X, Wang H, Zhang K, Xu S, et al. A NanoLock-enabled, Craspase-based strategy for highly sensitive RNA detection. Nucleic Acids Res..(۱۷)۵۳;۲۰۲۵
.۴۸ Sun M, Yu Z, Wang S, Qiu J, Huang Y, Chen X, et al. Universal Amplification-Free RNA Detection by Integrating CRISPR-Cas10 with Aptameric Graphene Field-Effect Transistor. Nanomicro Lett. 2025;17(1):242.
.۴۹ Wang Y, Long W, He B, Xiong M ,Li J, Gao Y. A dual-signal amplification strategy combining DNA-functionalized covalent organic frameworks and CRISPR-Cas12a for early detection of ovarian cancer biomarkers. Chinese Chemical Letters. 2025:112061.
.۵۰ Khoshbin Z, Sameiyan E, Alizadeh F, Ramezani M, Alibolandi M, Abnous K, et al. A CRISPR/Cas12a-powered liquid crystal aptasensor for point-of-care detection of prostate-specific antigen for early-stage cancer diagnosis. Biosens Bioelectron. 2025;287:117651.

.۵۱ Zhao G, Li J, Fu S, Wang A, Meng X, Dong H, et al. CRISPR-Based Versatile Strategies for Nucleic Acid Analysis and Disease Diagnosis: Mechanisms, Modalities, and Translational Horizons. TrAC Trends in Analytical Chemistry. 2025:118639.
.۵۲ Devonshire A, Jones G, Gonzalez AF, Kofanova O, Trouet J, Pinzani P, et al. Interlaboratory evaluation of quality control methods for circulating cell-free DNA extraction. N Biotechnol. 2023;78:13–21.
.۵۳ Sandberg F, Kueng N, Largiader CR, Amstutz U. Evaluation of variability in cell-free DNA extraction efficiency from plasma and urine and spike-in normalization. Sci Rep. 2025;15(1):22999.
.۵۴ Kohabir KAV, Sistermans EA, Wolthuis RMF. Recent advances in CRISPR-based single-nucleotide fidelity diagnostics. Commun Med (Lond). 2025;5(1):252.
.۵۵ Avaro AS, Santiago JG. Engineering guidelines for CRISPR diagnostics. Chemical Communications. 2025;61(95):18756–72.
.۵۶ Zhou J, Zhang N, Ren Y-j, Ren X-m, Wang X, Gou X-c, et al. Challenges and strategies for CRISPR-Cas molecular diagnostics from mechanism to Clinical Translation. Sensors and Actuators Reports. 2026:100437.
.۵۷ Xie Y, Jiang K, Zhang Y, Cao L, Guo X, Shi J, et al. Enhanced Two-Step LAMP-CRISPR Assay with an Engineered Zst Polymerase for Contamination-Free and Ultrasensitive DNA Detection. Analytical Chemistry. 2024;96(38):15493–502.
.۵۸ van Dongen JE, Segerink LI. Building the future of clinical diagnostics: an analysis of potential benefits and current barriers in CRISPR/Cas diagnostics. ACS synthetic biology. 2025;14(2):323–31.
.۵۹ Ghouneimy A, Mahas A, Marsic T, Aman R, Mahfouz M. CRISPR-Based Diagnostics: Challenges and Potential Solutions toward Point-of-Care Applications. ACS Synth Biol. 2023;12(1):1–16.
.۶۰ Slattery JR, Naung NY, Kalinna BH, Pal M. CRISPR-Powered Liquid Biopsies in Cancer Diagnostics. Cells. 2025;14(19).
.۶۱ Yang Q, Dong MJ, Xu J, Xing Y, Wang Y, Yang J, et al. CRISPR/RNA Aptamer System Activated by an AND Logic Gate for Biomarker-Driven Theranostics. J Am Chem Soc. 2025;147(1):169–80.
.۶۲ Li L, Li S, Wu N, Wu J, Wang G, Zhao G, et al. HOLMESv2: A CRISPR-Cas12b-Assisted Platform for Nucleic Acid Detection and DNA Methylation Quantitation. ACS Synth Biol. 2019;8(10):2228–37.
.۶۳ Li Q, Lin X. AI-Enhanced CRISPR Diagnostics: From gRNA Design to Cas Protein Engineering and Signal Analytics. TrAC Trends in Analytical Chemistry. 2026:118704.
.۶۴ Chuai G, Ma H, Yan J, Chen M, Hong N, Xue D, et al. DeepCRISPR: optimized CRISPR guide RNA design by deep learning. Genome Biol. 2018;19(1):80.
.۶۵ Huang B, Guo L, Yin H, Wu Y, Zeng Z, Xu S, et al. Deep learning enhancing guide RNA design for CRISPR/Cas12a-based diagnostics. Imeta. 2024;3(4):e214.
.۶۶ Walflor HSM, Medeiros LCS. Machine Learning for CRISPR-Based Diagnostics. Int J Mol Sci. 2026;27(12).
.۶۷ Xue M, Gonzalez DH, Osikpa E ,Gao X, Lillehoj PB. Rapid and automated interpretation of CRISPR-Cas13-based lateral flow assay test results using machine learning. Sens Diagn. 2025;4(2):171–81.
.۶۸ Wang X, Xiong D, Cui S, Duan B, Ding G, Huang Y, et al. Artificial intelligence-enabled multi-omics biomarkers for immune checkpoint blockade: mechanisms, predictive modeling, and clinical translation. Front Immunol. 2026;17:1732079.

*Review article*

# Development of CRISPR-Based Systems for Early Cancer Detection

Received: 15/06/2026 - Accepted: 13/09/2026

Vahid Kholghi Oskooei[1*]

[1]*Department of Laboratory Sciences, Sirjan School of Medical Sciences, Sirjan, Iran*

Email:
vahidkholghioskooei@gmail.com

**Abstract**

Late-stage diagnosis remains a critical challenge in cancer management, as more than half of patients are identified at advanced stages of the disease. Although liquid biopsy has enabled non-invasive tracking of tumor biomarkers, the minuscule concentration of these biomarkers and the less than 1% frequency of mutant alleles in the early stages necessitate the deployment of tools with ultra-high sensitivity. In this regard, CRISPR-based diagnostic systems have emerged as powerful tool platforms in cancer detection due to features such as high specificity, scalability, and compatibility for integration with new technologies. This review article explores the evolution and development of key CRISPR-based platforms, including foundational systems, multiplexing strategies, ultra-sensitive assays for rare mutations, and nanometer-scale sensors. Furthermore, the efficiency and operational capabilities of these systems in identifying various types of cancer are evaluated. Finally, future perspectives are outlined toward low-cost, rapid home-testing kits, theranostic “detect-and-treat” systems platforms and the integration of this technology with artificial intelligence — innovations that could shift cancer management toward early and treatable detection.

**Keywords:** CRISPR-Dx, Early cancer detection, liquid biopsy, Ultra-sensitive detection