



► **NGUYỄN THỊ NHIÊN**

Nguyễn Thị Nhiên tốt nghiệp bác sĩ Thú y, Đại học Nông nghiệp 1 Hà Nội (nay là Học viện Nông nghiệp Việt Nam – VNUA) năm 2012; Thạc sĩ Thú y tại Học Viện Nông nghiệp Việt Nam năm 2016; Tiến sĩ Công nghệ sinh học, Đại học Tokushima, Nhật Bản năm 2020. Từ tháng 01/2013 là giảng viên tại Học viện Nông nghiệp Việt Nam. Năm 2019 là một trong ba đại diện sinh viên Đại học Tokushima tham gia cuộc thi “HIRAKU 3 MT” tổ chức tại Hiroshima, Nhật Bản.

CÔNG NGHỆ GEEP (GENOME EDITING ELECTROPORATION OF CAS9 PROTEIN) CHỈNH SỬA GENOME TRÊN TẾ BÀO ĐỘNG VẬT

Nguyễn Thị Nhiên^{1*}, Takeshige Otoi²,

¹Nghiên cứu sinh tiến sĩ, Đại học Tokushima, Nhật Bản (2017 - 2020) (Email:ntnhiem@vnua.edu.vn)

*Khoa Công nghệ sinh học, Học viện Nông nghiệp Việt Nam, Trâu Quỳ, Gia Lâm, Hà Nội, Việt Nam.

²Khoa Khoa học sinh học và công nghệ sinh học, đại học Tokushima, tỉnh Tokushima 779-3233, Nhật Bản

TÓM TẮT:

Trong những năm gần đây, việc nghiên cứu khoa học và ứng dụng tiến bộ kỹ thuật trong lĩnh vực di truyền học đạt được nhiều thành tựu; trong đó thành tựu quan trọng nhất là việc phát hiện và phát triển thành công một công nghệ mới với tên gọi là phương pháp CRISPR để thực hiện biến đổi di truyền của sinh vật sống một cách nhanh chóng với giá cả hợp lý. Phương pháp CRISPR với bản chất là công nghệ chỉnh sửa bộ genome dựa trên cơ chế hóa học, có ưu điểm là cho phép cắt DNA tại các vị trí được xác định bởi sự nhận dạng trình tự của RNA. Tuy nhiên, nhược điểm của phương pháp CRISPR/Cas9 trong nghiên cứu này là có thể gây ra hiện tượng off-target (cắt nhầm mục tiêu) hoặc đôi khi tạo ra những đột biến không mong muốn. Tại Đại học Tokushima, Nhật Bản chúng tôi đã cải tiến phương pháp CRISPR bằng phương pháp GEEP, theo đó chúng tôi sử dụng xung điện đưa Cas9 và gRNA vào hợp tử của lợn; cải tiến này giúp cho việc chỉnh sửa bộ genome một cách chính xác hơn và hiệu quả cao. Phương pháp GEEP đã mở ra hướng đi mới trong nghiên cứu chỉnh sửa genome ở lợn, có thể thúc đẩy nhanh quá trình tạo ra các thể “khám” trên lợn, phục vụ cho quá trình nghiên cứu cấy ghép tạng trong tương lai.

Từ khóa: chỉnh sửa genome, GEEP, phôi lợn.

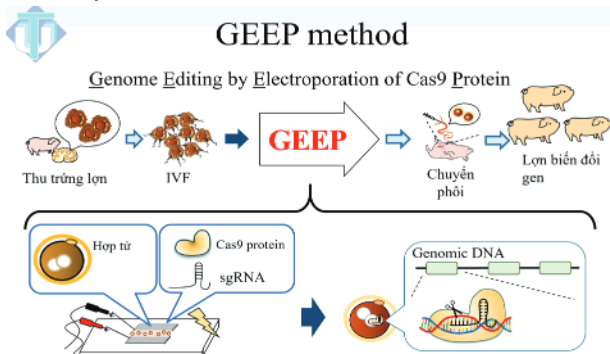
1. GIỚI THIỆU CHUNG

Trong nhiều năm qua, ngành y tế toàn cầu luôn phải đối mặt với việc khan hiếm nguồn tạng do không có đủ người hiến, làm cho hàng triệu bệnh nhân phải chờ đợi để được ghép tạng. Trước thực trạng này, lợn được hy vọng sẽ là nguồn cung cấp tạng chủ yếu để cấy ghép cho người, vì nhiều bộ phận cơ thể của chúng có kích thước, cấu trúc và chức năng rất giống con người như tụy, tim, thận, gan, phổi. Để hiện thực hóa ý tưởng đó, các nhà khoa học trên toàn thế giới luôn nỗ lực tìm kiếm một phương pháp chỉnh sửa genome để tạo ra nguồn tạng lợn tương thích và có thể chống được hiện tượng đào thải mảnh ghép khi ghép cho người. Công nghệ chỉnh sửa genome bằng phương pháp CRISPR/Cas9 được phát triển từ những năm 2010 là một trong những công cụ hữu ích để nghiên cứu tạo ra nguồn tạng lợn phục vụ cho y học và giúp mở ra nhiều

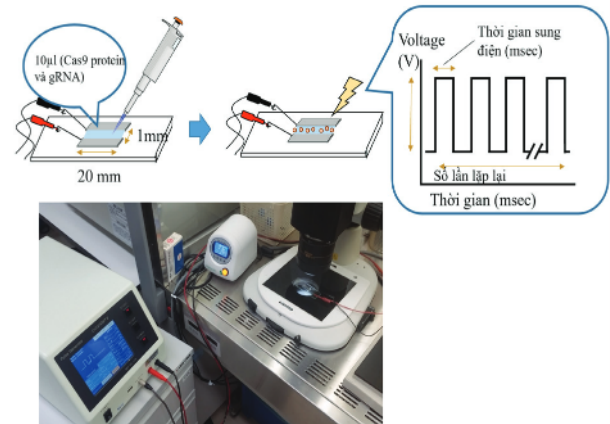
hy vọng sống hơn cho những bệnh nhân trong tương lai. Phương pháp CRISPR/Cas9 gồm có 2 thành phần chính là enzyme Cas9 nuclease và RNA hướng dẫn. Nhờ đoạn trình tự bổ sung của RNA hướng dẫn tới trình tự đích mà phức hợp này có thể tìm thấy vị trí cần chỉnh sửa trên hệ gene. Khi phức hợp enzyme Cas9 nuclease và RNA hướng dẫn bám vào trình tự đích, enzyme Cas9 nuclease sẽ cắt đoạn DNA trên cả 2 chuỗi. Khi cả 2 chuỗi DNA bị cắt đứt, tế bào sẽ sửa chữa bằng cách chèn hoặc xóa thêm các nucleotide. Do đó, phương pháp CRISPR cực kỳ hữu ích để phá vỡ gene (chèn hoặc xóa) trên đoạn DNA lớn. Tuy nhiên, rất khó sử dụng phương pháp CRISPR tiêu chuẩn này để thực hiện các chỉnh sửa tinh vi hơn, chẳng hạn như thay đổi base T thành base A và dễ gây ra các đột biến điểm Indels. Điều này có thể gây ra những đột biến không mong muốn, thậm chí nguy hiểm. Do vậy, phương pháp GEEP ra đời với hy vọng sẽ khắc phục được những nhược điểm của phương pháp CRISPR tiêu chuẩn.

Genome Editing Electroporation of cas9 Protein – GEEP

Phương pháp GEEP được mô phỏng thông qua sơ đồ 1 sau đây:



Sơ đồ 1: Sơ đồ mô phỏng phương pháp GEEP chỉnh sửa genome trên hợp tử lợn [1]



Hình 1: Hình ảnh hệ thống xung điện tạo hợp tử biến đổi gen

Để tiến hành phương pháp GEEP, chúng tôi thiết kế sgRNA nhắm mục tiêu vào những đoạn genome mong muốn chỉnh sửa; sau đó dùng hệ thống xung điện (hình 1) để đưa Cas9 protein và sgRNA vào hợp tử lợn. Những

hợp tử sau khi được chỉnh sửa genome sẽ được chuyển vào lợn mẹ mang thai. Những cá thể lợn con sinh ra sẽ được đánh giá mức độ chỉnh sửa genome thành công hay không trước khi tiến hành các bước tiếp theo.

2. MỘT SỐ THÀNH TỰU CỦA CÔNG NGHỆ CHỈNH SỬA GENOME THEO PHƯƠNG PHÁP GEEP VÀ MỘT SỐ LỢU Ý

Công nghệ chỉnh sửa genome để tạo ra động vật biến đổi genome được nghiên cứu và phát triển nhanh chóng tại Nhật Bản, trong đó có phòng thí nghiệm đặc biệt tại Khoa Khoa học sinh học và công nghệ sinh học của trường Đại học Tokushima Nhật Bản. Nhiều công trình nghiên cứu chỉnh sửa genome trên lợn, bò và một số loài động vật khác đã được công bố, bao gồm: Lợn đột biến TP53 được thiết kế để có khả năng kháng bệnh ung thư [2] [3]. Lợn đột biến CD163, một thụ thể dung hợp giả định đối với virus gây hội chứng rối loạn sinh sản và hô hấp ở lợn, được thiết kế để có khả năng chống lại các bệnh truyền nhiễm do virus [4] [5]. Lợn loại MSTN được thiết kế để tăng khối lượng thịt cơ xương tế bào [6]. Lợn thiếu genome GGTA1 là yếu tố chính gây đào thải mảnh ghép cấp tính khi ghép tạng lợn [7]. Lợn chỉnh sửa genome PDX-1 (pancreas duodenum homeobox 1), một genome rất quan trọng cho sự phát triển tuyến tụy trong thời kỳ bào thai và sự gián đoạn đơn alen của nó làm suy yếu việc tiết insulin [8] [9].

Phân tích tiêu bản vi thể về kết quả của chỉnh sửa MSTN (Hình 3).

Bên cạnh những thành tựu đạt được, phương pháp GEEP đòi hỏi các nhà khoa học phải tiến hành thử nghiệm và xác định điều kiện xung điện phù hợp cho từng đối tượng nghiên cứu. (Một thí nghiệm đã được nhóm nghiên cứu của chúng tôi tiến hành cho thấy, hợp tử lợn nhạy cảm hơn với xung điện so với hợp tử của chuột)

3. PHÒNG THÍ NGHIỆM NGHIÊN CỨU CHỈNH SỬA GENOME TRÊN TẾ BÀO ĐỘNG VẬT TẠI TRƯỜNG ĐẠI HỌC TOKUSHIMA, NHẬT BẢN

Phòng thí nghiệm hỗ trợ sinh sản thuộc Viện nghiên cứu Đổi mới sinh học của Đại học Tokushima, Nhật Bản

Website: <https://www.birc.tokushima-u.ac.jp/>

Giáo sư chủ nhiệm:

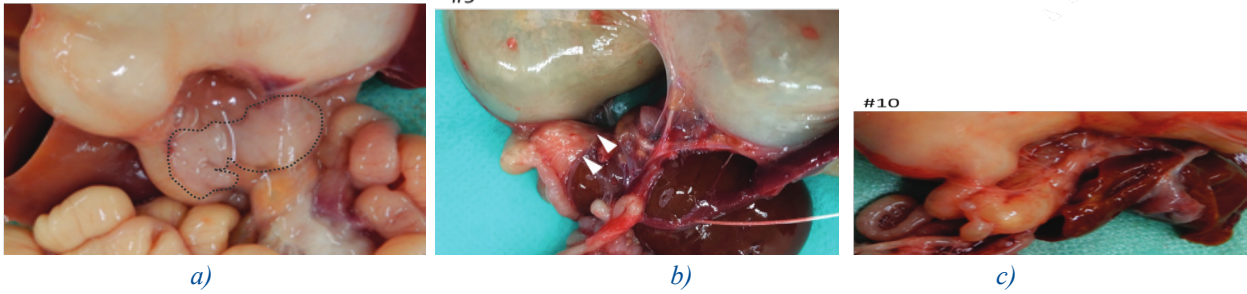
Takeshige Otoi; Otoi@tokushima-u.ac.jp

Địa chỉ: 2272-2 Ishii, Myozai, Tokushima 779-3233, Nhật Bản.

Viện nghiên cứu Đổi mới sinh học của Đại học Tokushima được thành lập với mục đích tạo ra các ngành công nghiệp sinh học mới bằng cách tập trung nghiên cứu đổi mới mở liên quan đến sinh vật sống và các ngành công nghiệp chính trong khu vực. Viện nghiên cứu có nhiều trụ sở, trụ sở chính đặt tại Ishii, Myozai, Tokushima. Tại Viện nghiên cứu có nhiều đơn vị chức



WT



Hình 2: Tạo lợn biến đổi genome PDX-1, a) là lợn đối chứng (vị trí tuyến tụy được đánh dấu) ; b), và c) là lợn biến đổi genome PDX-1 (không còn tuyến tụy) [8]

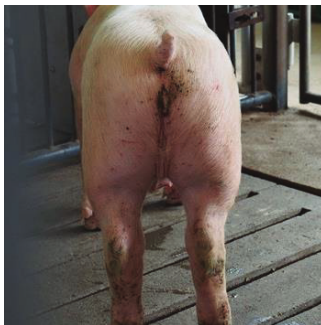
Bảng 1: Một số kết quả chỉnh sửa genome bằng phương pháp GEEP

Loại gene chỉnh sửa	Số lợn nhận phôi chuyển	Số lợn mang thai	Số lợn sảy thai	Số lợn mang thai đến khi sinh	Số lợn con sinh ra	Số mutant lợn con (%)
MSTN [6] (Liên quan đến phát triển cơ) ¹	2	1 (50%)	0	1 (50%)	10	9 (90%)
TP53 [2] (Liên quan đến sinh ung thư)	2	2 (100%)	0	2 (100%)	11	8 (72.7%)
CD163 [4] (receptor của PRRS virus)	2	1 (50%)	0	1 (50%)	8	1 (12.5%)

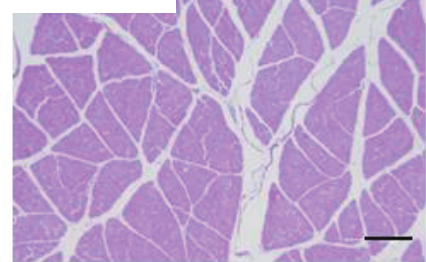
năng chuyên nghiên cứu về các lĩnh vực như sản xuất côn trùng, sản xuất thịt, hỗ trợ sinh sản,... trong đó nghiên cứu về hỗ trợ sinh sản đang là một lĩnh vực mũi nhọn. Ngoài việc nghiên cứu chỉnh sửa genome trên động vật, Trung

tâm còn thành lập một phòng thí nghiệm đào tạo y tế thực hành; theo đó các bác sĩ được thực hành trên những động vật đã được chỉnh sửa genome với các thiết bị y tế được trang bị như các dụng cụ phẫu thuật cơ bản, hệ thống đèn

thuần chủng

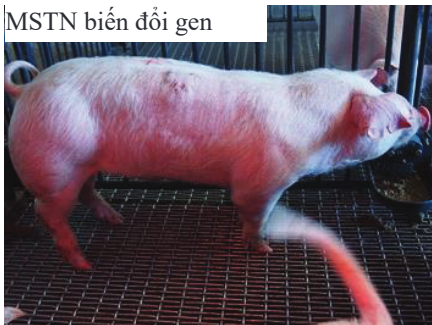


Cơ mông

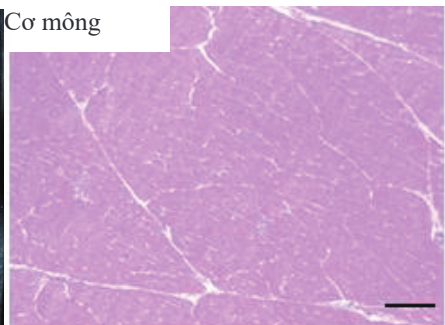


-GCTCGCTGTTCTCATTTCAGATCCACGGGGA-

MSTN biến đổi gen

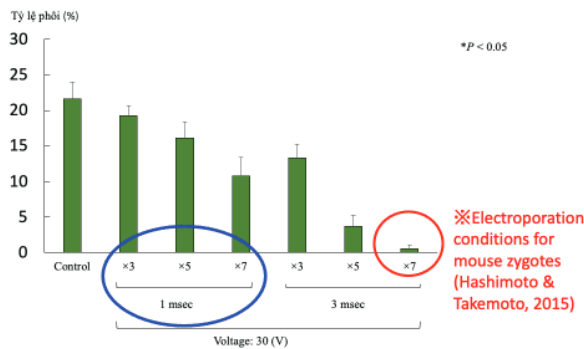


Cơ mông



-GCTCGCTGTTCTCATTTCAGATCCACGGGGA-
-GCTCGCTGTTCTCATTTCAGAGAACCCACGGGGA-

Hình 3. Phân tích tiêu bản vi thể về kết quả của chỉnh sửa MSTN



mỏ, hệ thống nội soi, chụp X-quang CT và thiết bị chụp X-quang phẫu thuật (C-arm)... nhằm nâng cao tay nghề, thực hành lâm sàng, thử nghiệm thuốc.

4. NHỮNG TRIỂN VỌNG CỦA NGHIÊN CỨU BIẾN ĐỔI GENOME TẠI VIỆT NAM

Ở Việt Nam, công nghệ chỉnh sửa genome sử dụng phương pháp CRISPR và phương pháp GEEP đang được một số cơ quan nghiên cứu tiếp cận, ứng dụng triển khai vào thực tiễn và bước đầu mang lại kết quả khả quan. Đây mạnh hướng nghiên cứu ứng dụng công nghệ chỉnh sửa genome theo các phương pháp này, chúng ta có thể tạo ra những giống cây trồng có sức chống chịu cao đối với dịch bệnh và các điều kiện bất lợi, thích ứng với môi trường khắc nghiệt; hoặc cũng có thể ứng dụng để tạo ra các giống vật nuôi như giống bò vàng bản địa có hệ cơ phát triển, có khối lượng và tỷ lệ thịt xẻ tăng nhưng không làm mất đi tính ưu việt của giống bò này (tính mắn đẻ, khả năng chống chịu tốt với bệnh tật và điều kiện bất lợi của thời tiết, chăn nuôi dễ dàng...), đồng thời giúp giảm đáng kể chi phí nhập khẩu giống mới và góp phần bảo tồn giống động vật bản địa.

Công nghệ chỉnh sửa genome còn là công cụ cho phép các nhà nghiên cứu kiểm soát gen biểu hiện trên thực vật, động vật và cả con người. Nhưng bên cạnh đó, phương pháp CRISPR có thể gây ra các đột biến ngoài mục tiêu, dẫn đến tình trạng mất ổn định gen.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1] Maki Hirata, Fuminori Tanihara, Manita Wittayarat, Takayuki Hirano, Nhien Thi Nguyen, Quynh Anh Le, Zhao Namula, Masahiro Nii and Takeshige Otoi. Genome mutation after introduction of the gene editing by electroporation of Cas9 protein (GEEP) system in matured oo-

cytes and putative zygotes. *In Vitro Cellular & Developmental Biotechnology - Animal*, 55 (4): 237–242, April, 2019.

- [2] Tanihara, F., Hirata, M., Nguyen, T.N., Le A.Q, Hirano, T., Takemoto, T., Nakai, M., Fuchimoto, D. and Otoi T. Generation of a TP53-modified porcine cancer model by CRISPR/Cas9-mediated gene modification in porcine zygotes via electroporation. *PLOS ONE*, 13(10): e0206360, 2018
- [3] Tanihara, F., Hirata, M., Nguyen, T.N., Le A.Q, Hirano, T., Takemoto, T., Nakai, M., Fuchimoto, D. and Otoi T. Generation of a TP53-modified porcine cancer model by CRISPR/Cas9-mediated gene modification in porcine zygotes via electroporation. *PLOS ONE*, 13(10): e0206360, 2018
- [4] Fuminori Tanihara, Maki Hirata, Nhien Thi Nguyen, Quynh Anh Le, Manita Wittayarat, Mokhammad Fahrudin, Takayuki Hirano and Takeshige Otoi. Generation of CD163-edited pig via electroporation of the CRISPR/Cas9 system into porcine in vitro-fertilized zygotes. *Animal Biotechnology*, DOI: 10.1080/10495398.2019.1668801, Sept., 2019.
- [5] Tanihara, F., Hirata, M., Nguyen, T.N., Le A.Q., Hirano, T. and Otoi T. Generation of CD163-edited pig via electroporation of the CRISPR/Cas9 system into porcine in vitro-fertilized zygotes. *Anim. Biotechnol*, 32, 147-154, 2021.
- [6] Quynh A Le, Maki Hirata, Nhien T Nguyen, Koki Takebayashi, Manita Wittayarat, Yoko Sato, Zhao Namula, Masahiro Nii, Fuminori Tanihara, Takeshige Otoi. Effects of electroporation treatment using different concentrations of Cas9 protein with gRNA targeting Myostatin (MSTN) genes on the development and gene editing of porcine zygotes. *Animal Science Journal*, 91 (1): e13386, Jan., 2020
- [7] Fuminori Tanihara, Maki Hirata, Nhien Thi Nguyen, Osamu Sawamoto, Takeshi Kikuchi, Masako Doi, Takeshige Otoi. Efficient generation of GGTA1-deficient pigs by electroporation of the CRISPR/Cas9 system into in vitro-fertilized zygotes. *BMC Biotechnology* 20 (1), Aug., 2020.
- [8] Fuminori Tanihara, Maki Hirata, Nhien Thi Nguyen, Quynh Anh Le, Takayuki Hirano, Takeshige Otoi. Generation of viable PDX1 gene-edited founder pigs as providers of nonmosaics. *Molecular Reproduction and Development*, 87 (4): 471-481, April, 2020
- [9] Tanihara, F., Hirata, M., Nguyen, T.N., Le A.Q, Hirano, T., Takemoto, T., Nakai, M., Fuchimoto, D. and Otoi T. Generation of PDX-1 mutant porcine blastocysts by introducing CRISPR/Cas9-system into porcine zygotes via electroporation. *Animal Science Journal*, 90 (1): 55-61, January, 2019.