

**VIỆN KHOA HỌC NÔNG NGHIỆP VIỆT NAM**  
**VIỆN DI TRUYỀN NÔNG NGHIỆP**

**BÁO CÁO HỘI NGHỊ KHOA HỌC**

**Công nghệ chỉnh sửa hệ gen:**  
**Thành tựu & Triển vọng**

**Báo cáo viên**

**: PGS.TS. Phạm Xuân Hội**

*Hà Nội, 2017*



# Nội dung báo cáo



**1** Giới thiệu công nghệ chỉnh sửa gen

**2** Hệ thống chỉnh sửa gen CRISPR/Cas9

**3** Tiềm năng phát triển công nghệ CRISPR/Cas9





# Nội dung báo cáo



**1** Giới thiệu công nghệ chỉnh sửa gen

**2** Hệ thống chỉnh sửa gen CRISPR/Cas9

**3** Tiềm năng phát triển công nghệ CRISPR/Cas9



# Chỉnh sửa gen vs Chuyển gen

## Chỉnh sửa gen (Genome editing)

Tạo ra những thay đổi trên trình tự gen nội sinh theo cách có chủ đích, tại một vị trí xác định

**Non-GMO**

#

## Chuyển gen (Gene transformation)

Đưa DNA ngoại lai vào hệ gen tế bào chủ theo cách ngẫu nhiên, không có vị trí xác định

**GMO**

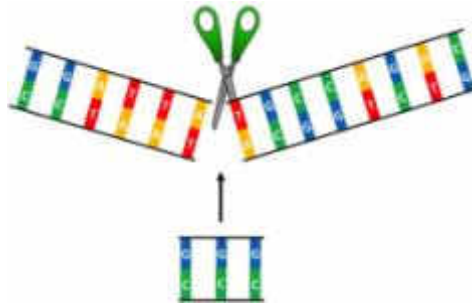
><

# Mục đích chỉnh sửa gen?

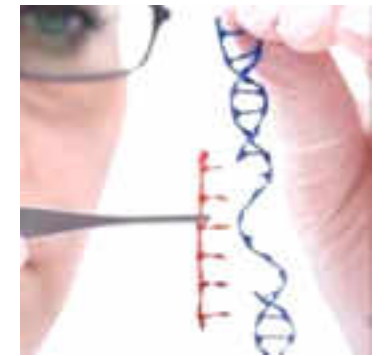
## Tạo đột biến

CTG GAG  
CTAG

**Phá vỡ cấu trúc**



**Chèn thêm**



**Thay thế**

- Kiểm soát biểu hiện gen
- Tạo SNP
- Tạo sản phẩm dung hợp với protein nội sinh

# Lịch sử phát triển

**1989:**

Chỉnh sửa gen bằng **HR**



**1998:**

Phát hiện protein **ZF** nhận biết DNA đặc hiệu



**2009:**

Phát hiện cơ chế hoạt động của **TAL effector**



**2013:**

Công nghệ **CRISPR/Cas** ra đời



**1992:**

Công nghệ **Cre-Lox** ra đời



**2000:**

Phát hiện cơ chế phòng vệ **CRISPR/Cas** ở vi khuẩn



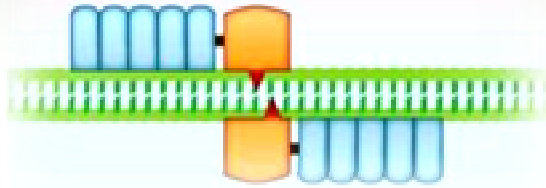
**2011:**

Tạp chí *Nature* bình chọn **TALLEN** là “Phương pháp của năm”

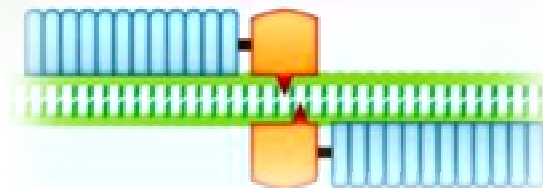


# Bản chất của kỹ thuật chỉnh sửa gen

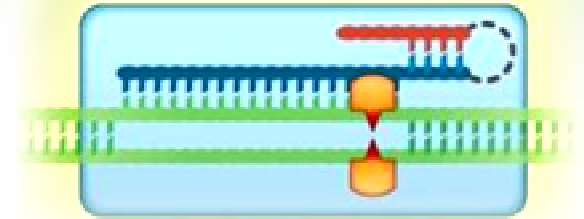
Zinc finger nuclease



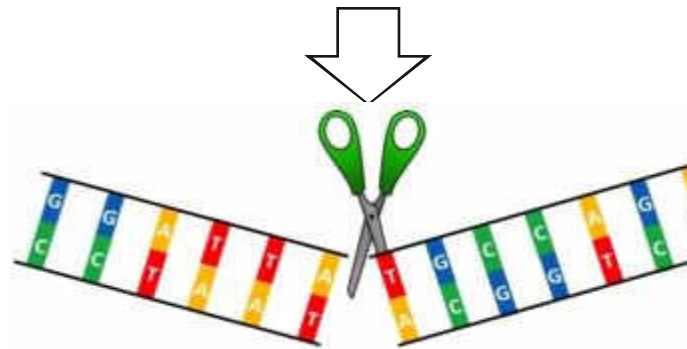
TAL effector nuclease



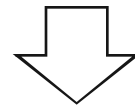
CRISPR-associated nuclease



**1. Nhận biết đặc hiệu trình tự DNA đích**



**2. Cắt DNA sợi đôi**



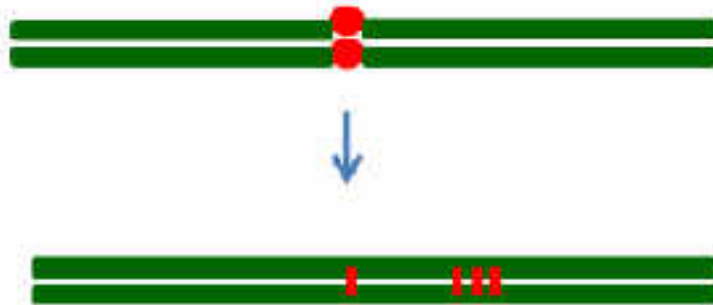
**3. Sửa chữa DNA tạo đột biến**

# Bản chất của kỹ thuật chỉnh sửa gen

## Cắt sợi đôi DNA

Ghép nối không  
tương đồng

NHEJ



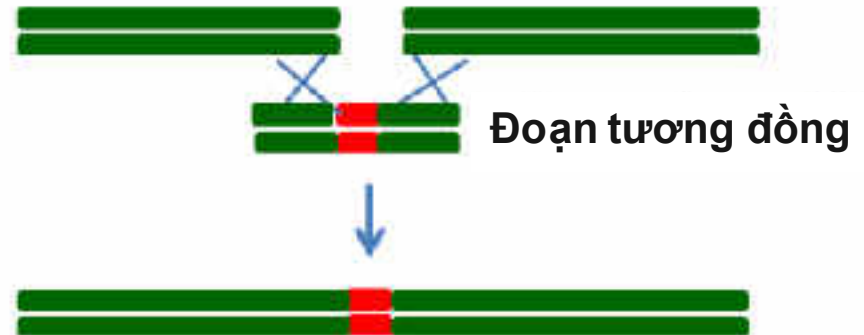
Tạo indel ngẫu nhiên

(Thêm/mất Nu)

-> Knock-out gen

Tái tổ hợp tương  
đồng

HDR



Tạo đột biến có chủ đích

-> Knock-in/out gen

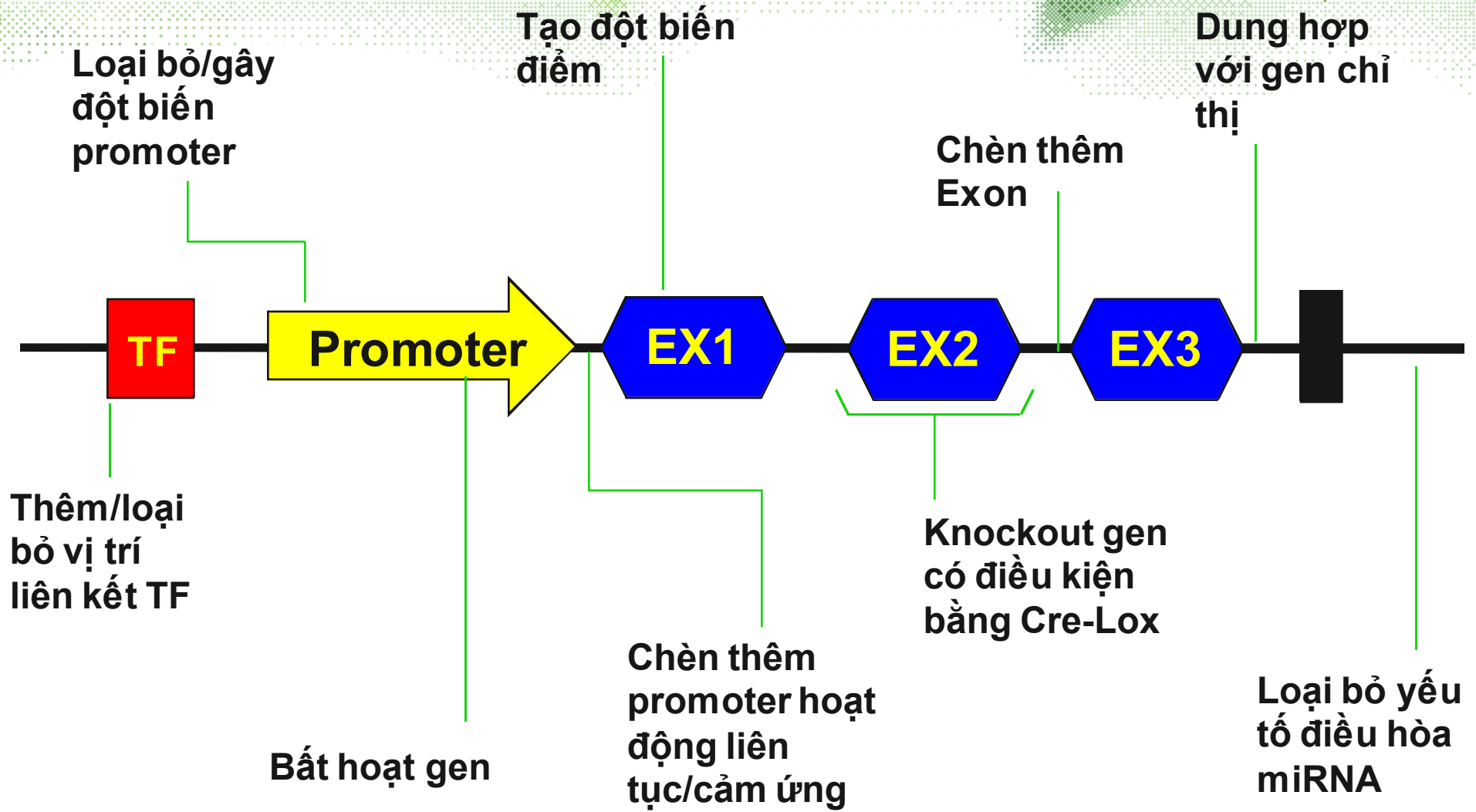
Tạo đột biến đặc hiệu/SNP

Xóa/thêm/dung hợp gen

Nghiên cứu promoter



# Ứng dụng công nghệ chỉnh sửa gen



# Các công nghệ chỉnh sửa gen

gRNA - DNA

CRISPR/Cas9

Mega  
nucleases

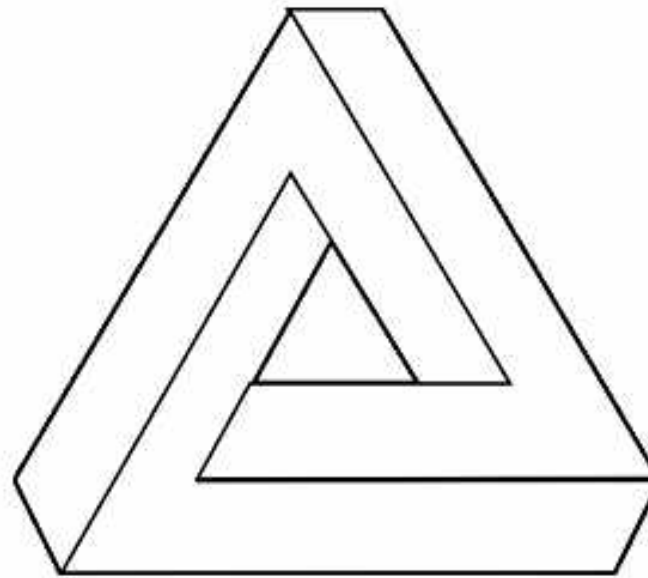
AAV

TALEN

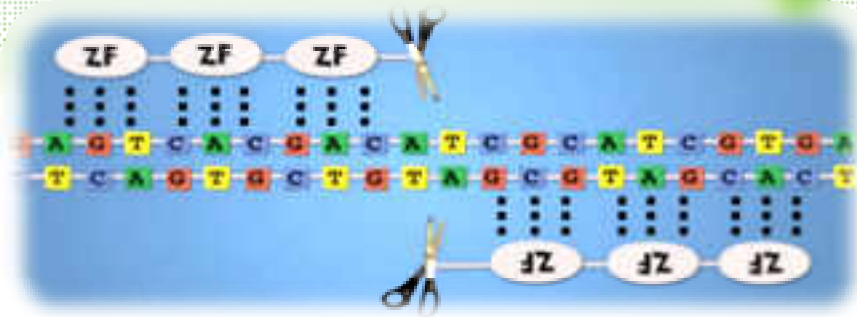
Zinc Finger

Protein - DNA

Protein - DNA



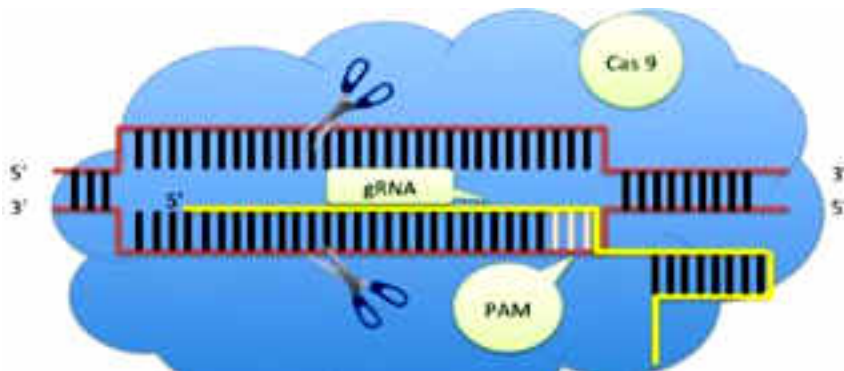
# So sánh 3 công nghệ chỉnh sửa gen



- ZF:**
- Trình tự đích: 18 – 24 Nu
  - 1 domain ZF nhận biết 3 Nu
  - Cắt 1 điểm trên DNA sợi đôi
  - Thiết kế cấu trúc **rất phức tạp**



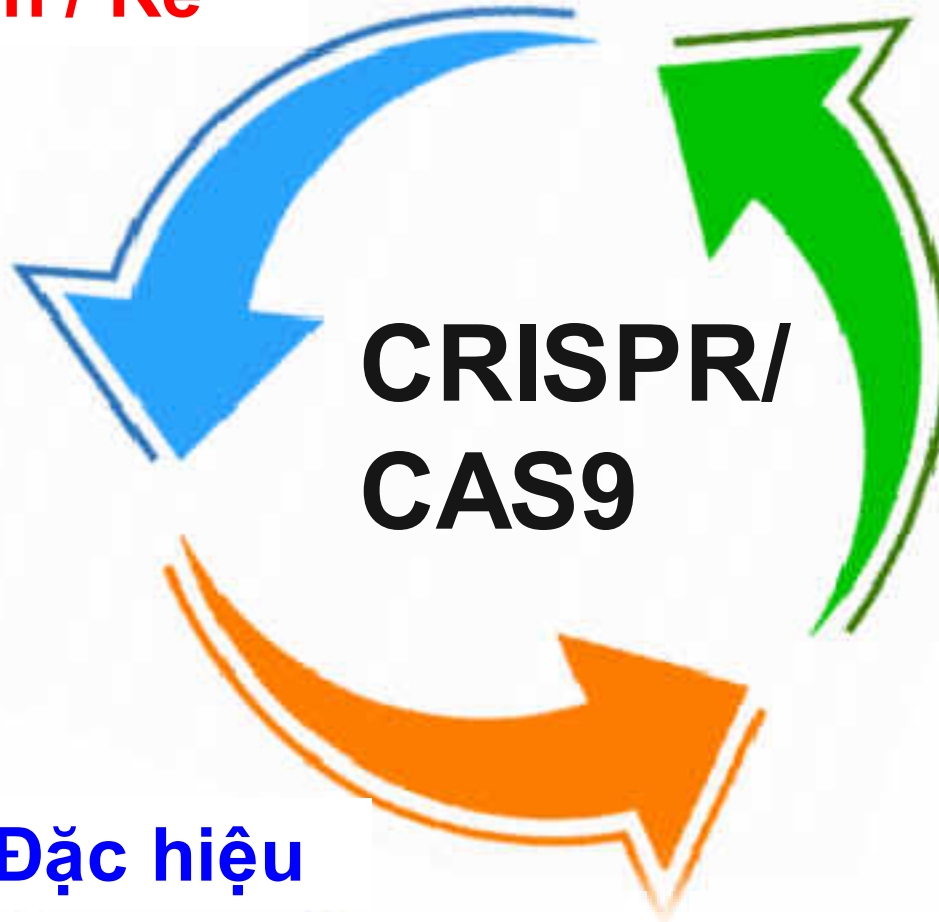
- TALEN:**
- Trình tự đích: 24 – 59 Nu
  - 1 domain TAL nhận biết 1 Nu
  - Cắt 1 điểm trên DNA sợi đôi
  - Thiết kế cấu trúc **phức tạp**



- CRISPR:**
- Trình tự đích: 20 – 22 Nu
  - Liên kết bổ sung giữa gRNA-DNA
  - Có thể cắt đồng thời nhiều vị trí
  - Thiết kế cấu trúc **đơn giản**

# Ưu điểm của công nghệ CRISPR/Cas9

**Nhanh / Rẻ**



**Đơn giản**

**Chính xác / Đặc hiệu**



# Nội dung báo cáo

1 Giới thiệu công nghệ chỉnh sửa gen

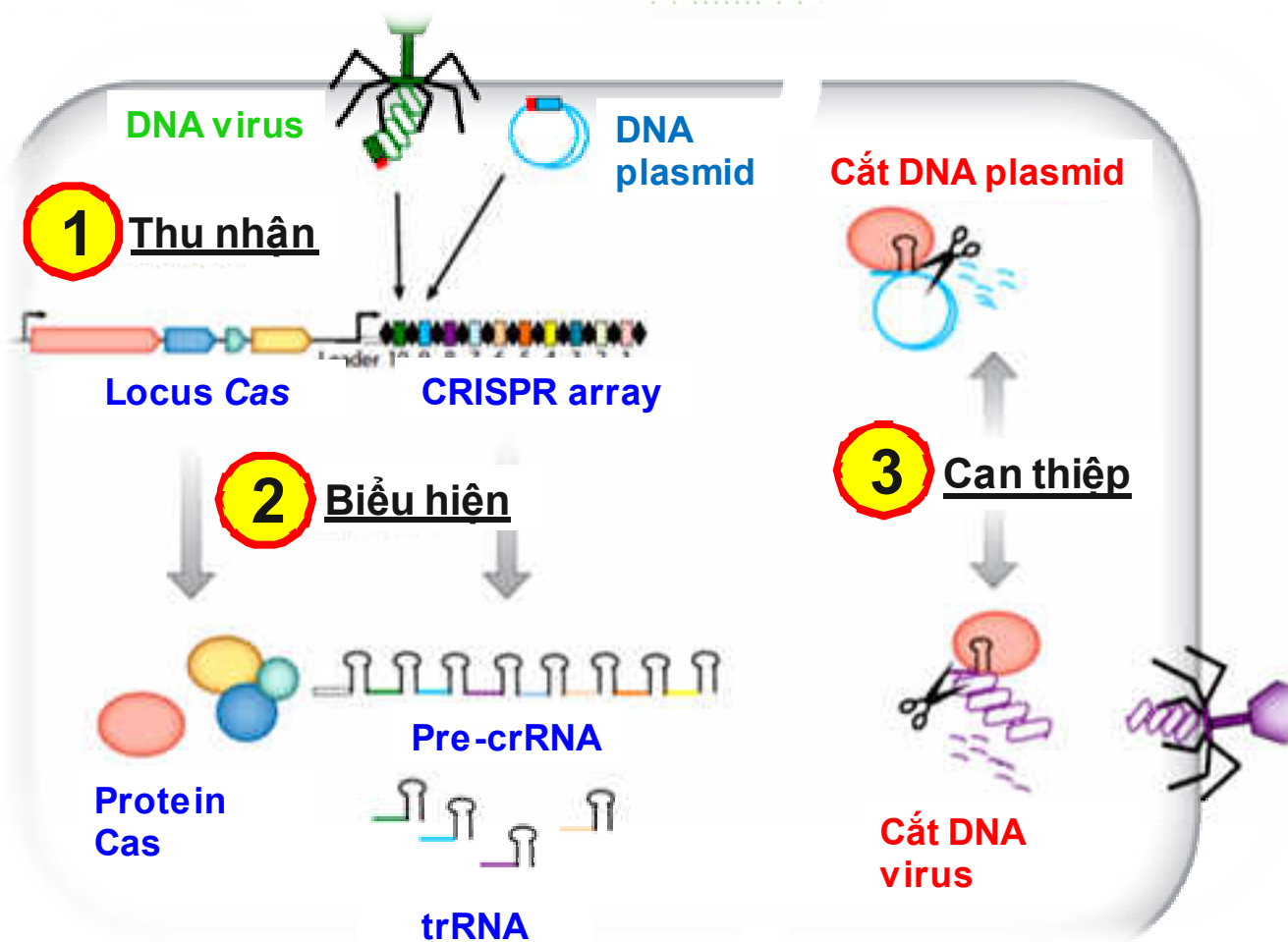
2 **Hệ thống chỉnh sửa gen CRISPR/Cas9**

3 **Tiềm năng phát triển công nghệ CRISPR/Cas9**



# CRISPR-Cas là gì?

**CRISPR:** Clustered **R**egularly **I**nterspaced **S**hort **P**alindromic **R**epeats  
**Cas protein:** CRISPR - **A**ssociated protein

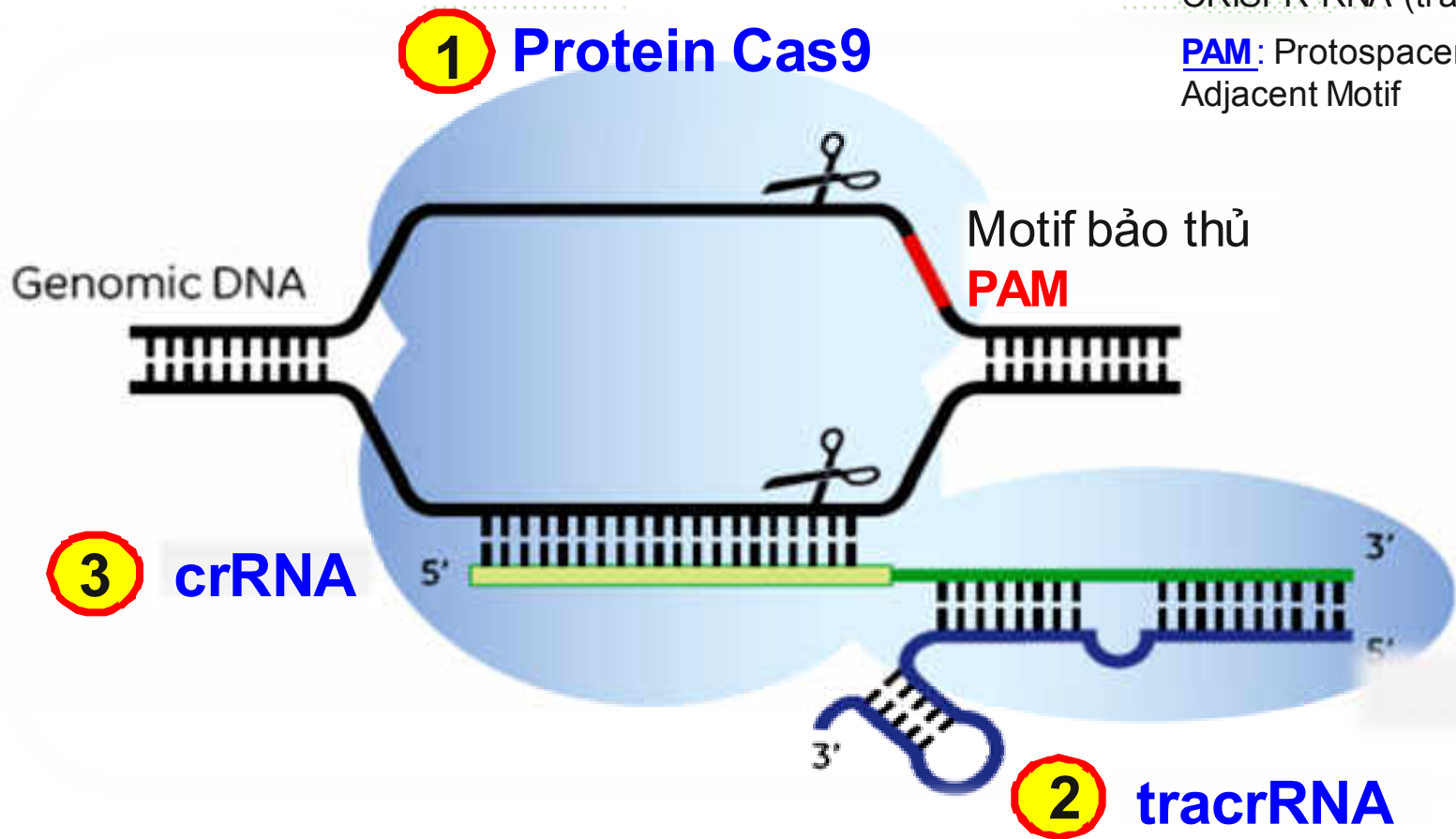


- Cơ chế đáp ứng miễn dịch của vi khuẩn và tảo
- Tiến hoá theo hướng thích nghi bảo vệ tế bào chống lại vật liệu di truyền ngoại lai
- Có một số cơ chế CRISPR khác nhau ở tảo và vi khuẩn
- CRISPR/Cas9 – loại II tạo đột biến đứt gãy DNA sợi đôi trên trình tự đích

# Cơ chế cắt DNA sợi đôi ở vi khuẩn

**tracrRNA**: trans-activating CRISPR RNA (tracrRNA)

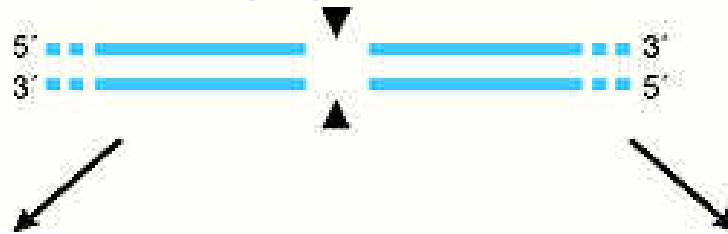
**PAM**: Protospacer Adjacent Motif



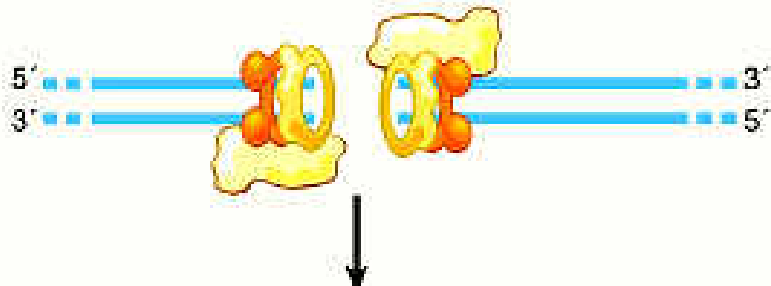
Cấu trúc hệ thống CRISPR-II ở vi khuẩn

# Cơ chế sửa chữa DNA của sinh vật nhân chuẩn

## Đứt gãy sợi đôi

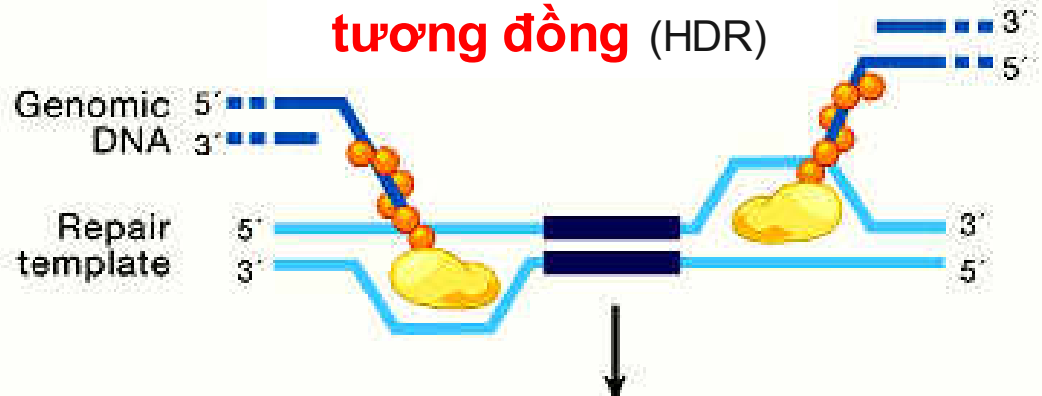


### Ghép nối không tương đồng (NHEJ)



Tạo đột biến (indel)

### Sửa chữa tái tổ hợp tương đồng (HDR)



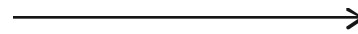
Sửa chữa chính xác



# Hệ thống chỉnh sửa gen CRISPR/Cas9

Hệ thống CRISPR/Cas9  
của vi khuẩn

+



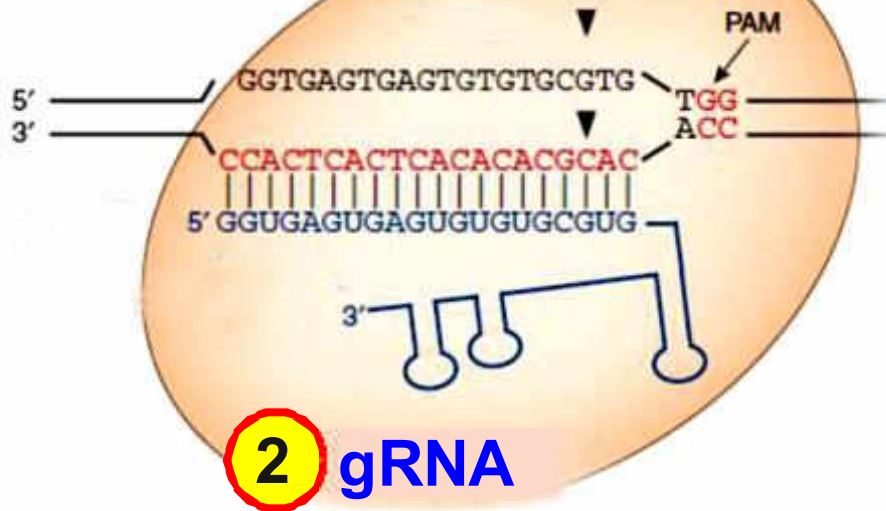
Hệ thống chỉnh  
sửa gen  
CRISPR/Cas9

Bộ máy sửa chữa  
DNA của eukaryota

# Hệ thống chỉnh sửa gen CRISPR/Cas9 ở thực vật



## 1 Protein Cas9



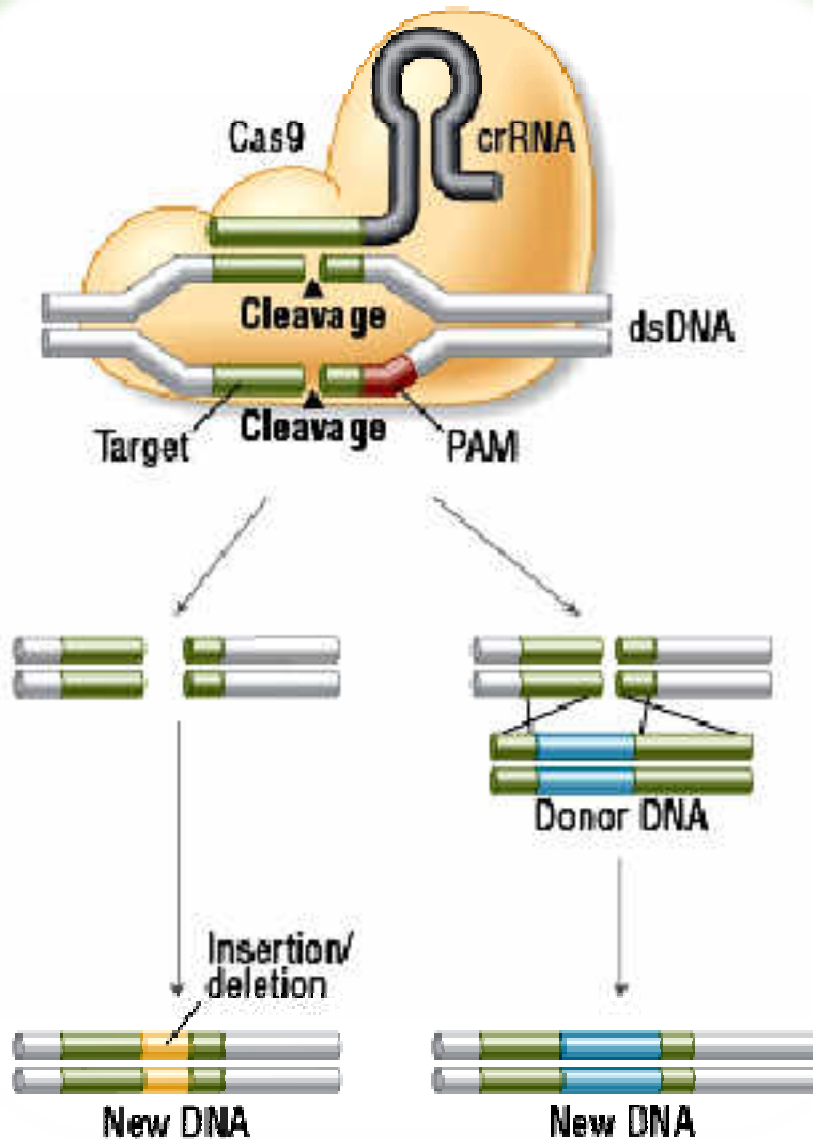
## 2 gRNA



➤ Biểu hiện protein Cas9 của vi khuẩn/nấm men trong tế bào thực vật

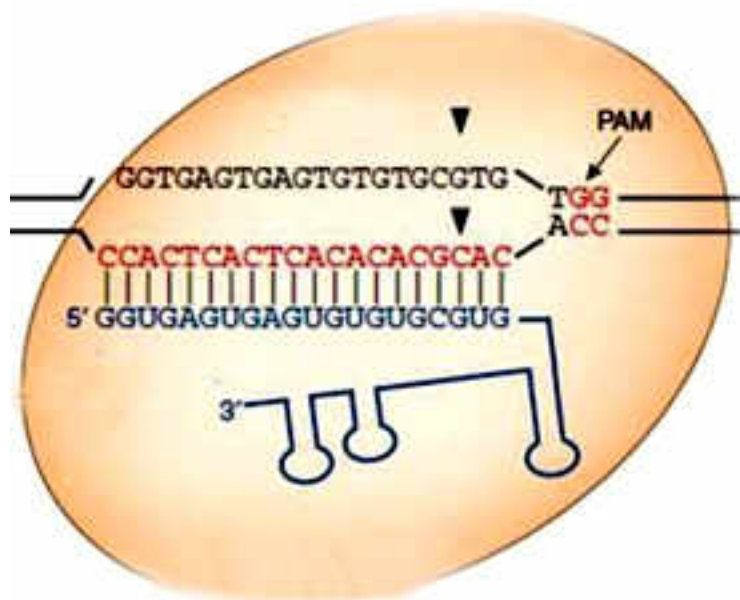
➤ Kết hợp [crRNA + tracrRNA] thành gRNA và biểu hiện trong tế bào thực vật

# Cơ chế hoạt động của hệ thống CRISPR/Cas9



- Thiết kế gRNA bắt cặp trình tự đích (20 Nu) trong hệ gen nằm phía trước motif PAM (NGG/NCC)
- Cas9 cắt DNA sợi đôi trong hệ gen
- DNA bị đứt gãy tại vị trí cặp base thứ 3 phía trước motif PAM (NGG)
- Đột biến đứt gãy DNA được sửa chữa theo cơ chế NHEJ hoặc HDR
  - NHEJ: tạo đột biến ngẫu nhiên
    - Knock-out gen
  - HDR: tạo đột biến chính xác
    - Knock-in/out gen
    - Tạo đột biến đặc hiệu
    - Dung hợp gen

# Các biến thể của hệ thống CRISPR/Cas9



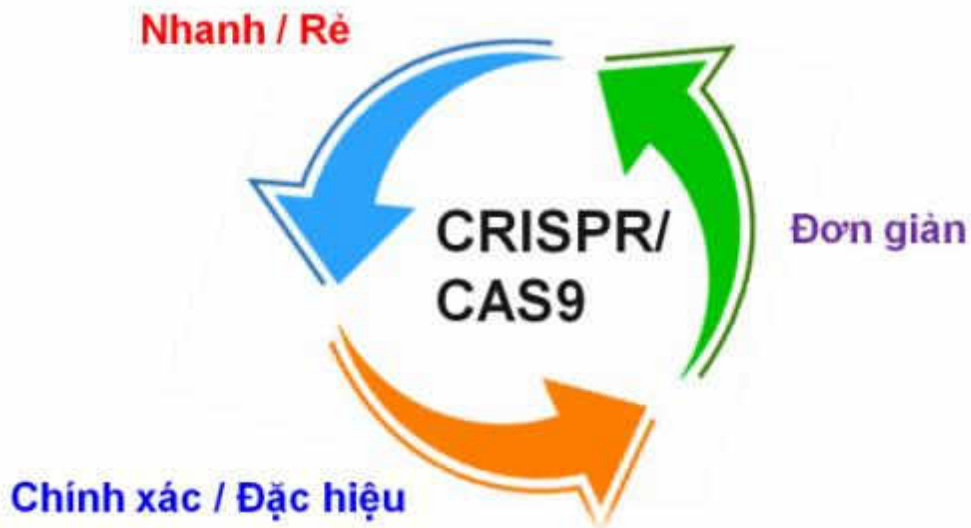
## Cas9 nguyên bản

Nhận biết + cắt DNA sợi đôi

- **Cas9-nickase:** liên kết DNA và cắt DNA trên 1 sợi đơn
- **dCas9:** mất hoạt tính nuclease  
-> liên kết DNA nhưng không cắt DNA
- **dCas9 dung hợp:** domain hoạt hoá phiên mã  
domain ức chế phiên mã  
protein chỉ thị (**marker**)  
FokI nuclease  
...

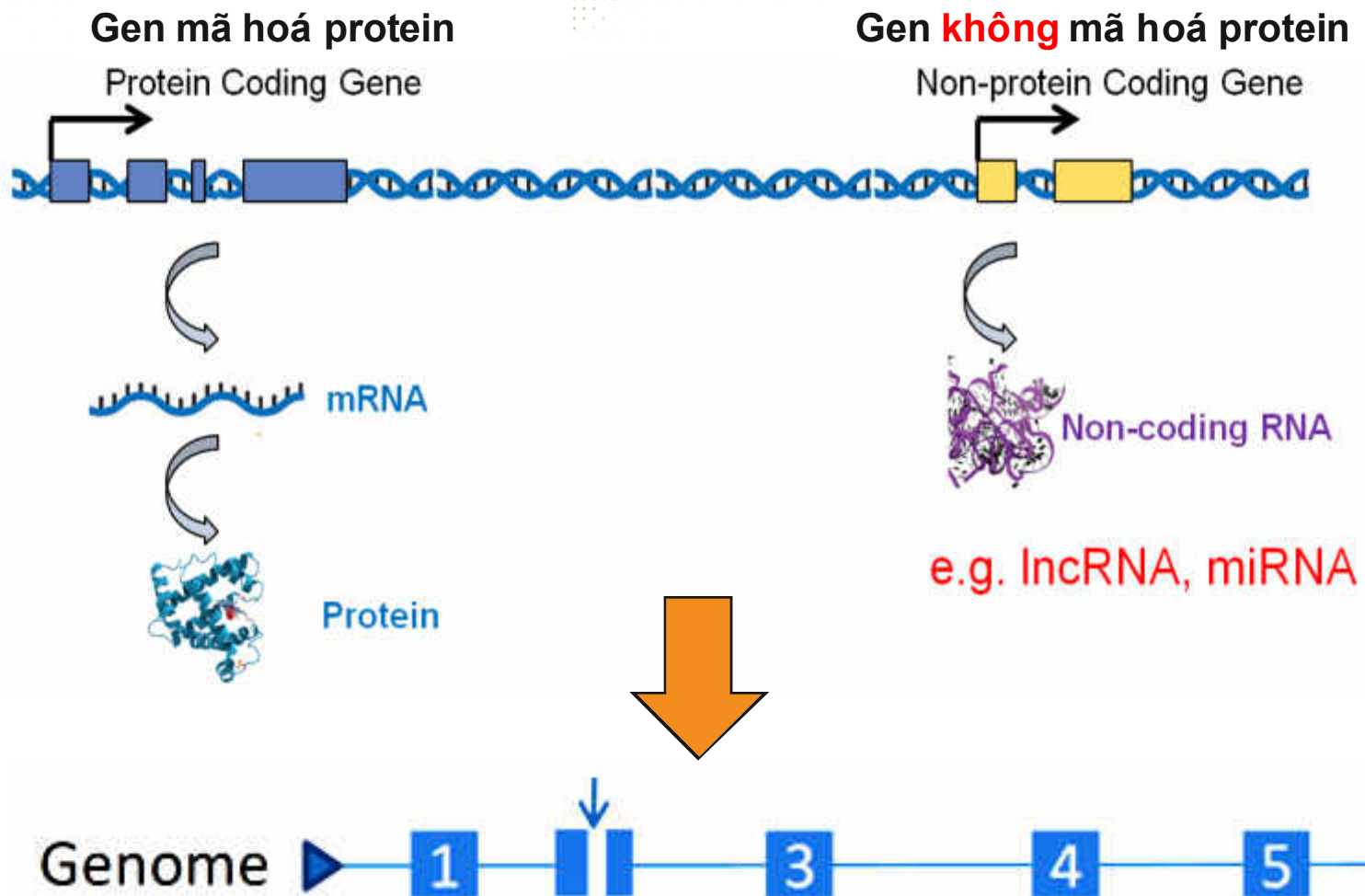
# Ưu điểm của công nghệ CRISPR/Cas9

- Không đòi hỏi các thí nghiệm protein tái tổ hợp phức tạp
- Tính đặc hiệu được quyết định bởi 20 Nu -> tổng hợp đơn giản
- Có thể chỉnh sửa đồng thời nhiều vị trí cùng lúc
- Có thể cắt được DNA bị methyl hoá
- Công nghệ CRISPR có chính sách mở trong giới khoa học



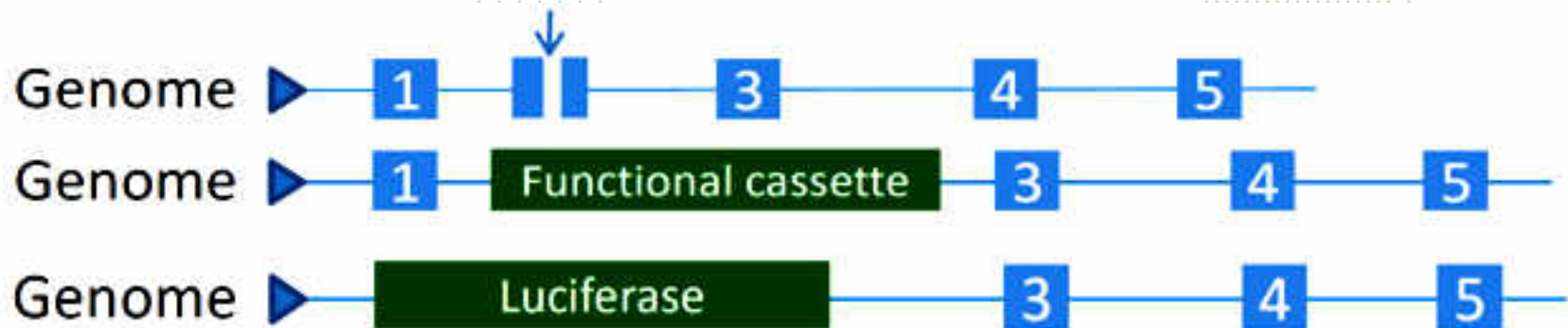
# Ứng dụng hệ thống CRISPR/Cas9

## 1. Bất hoạt gen:



# Ứng dụng hệ thống CRISPR/Cas9

## 2. Knock-out/Knock-in/Dung hợp gen

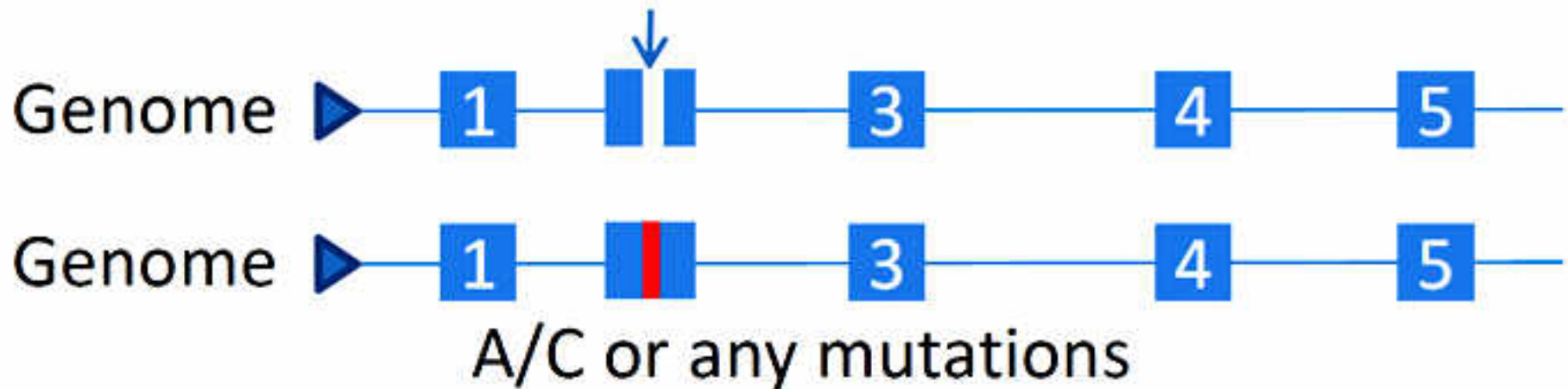


- Nghiên cứu chức năng gen
- Nghiên cứu chức năng promoter

# Ứng dụng hệ thống CRISPR/Cas9

## 3. Tạo đột biến chính xác

- Tạo ra/Sửa chữa SNP
- Xoá/chèn Nu/codon
- Đánh dấu gen nội sinh





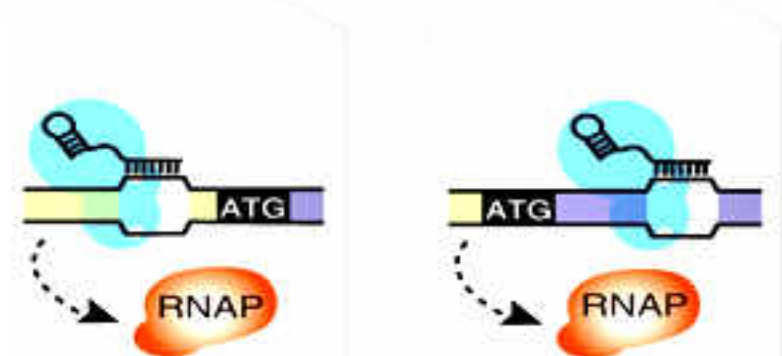
# Ứng dụng hệ thống CRISPR/Cas9

## 4. Kiểm soát biểu hiện gen (sử dụng Cas9 mất hoạt tính nuclease)

- Cản trở quá trình phiên mã:

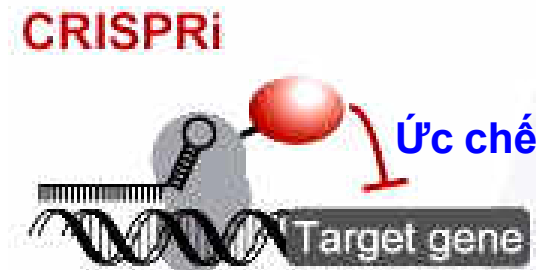
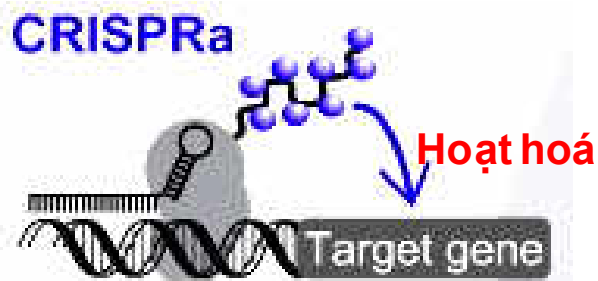


Cản trở quá trình khởi đầu phiên mã



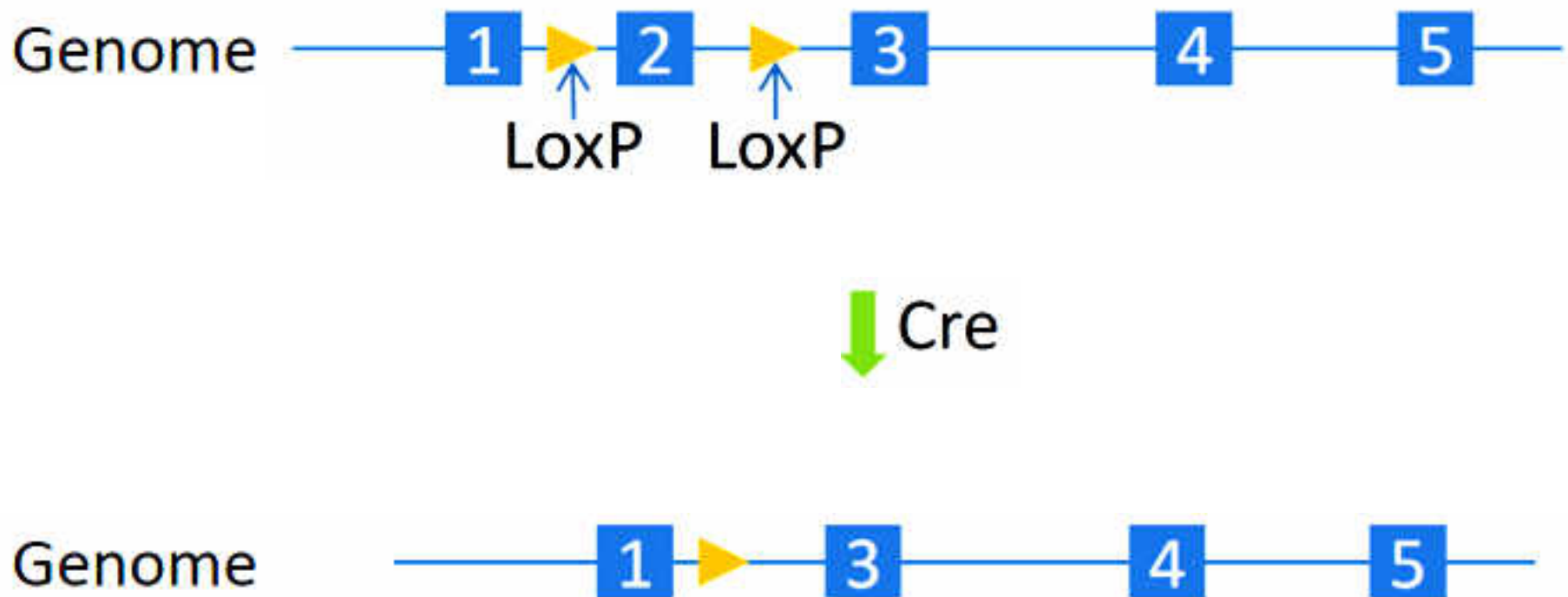
Cản trở quá trình kéo dài chuỗi RNA

- Sử dụng như một nhân tố phiên mã:



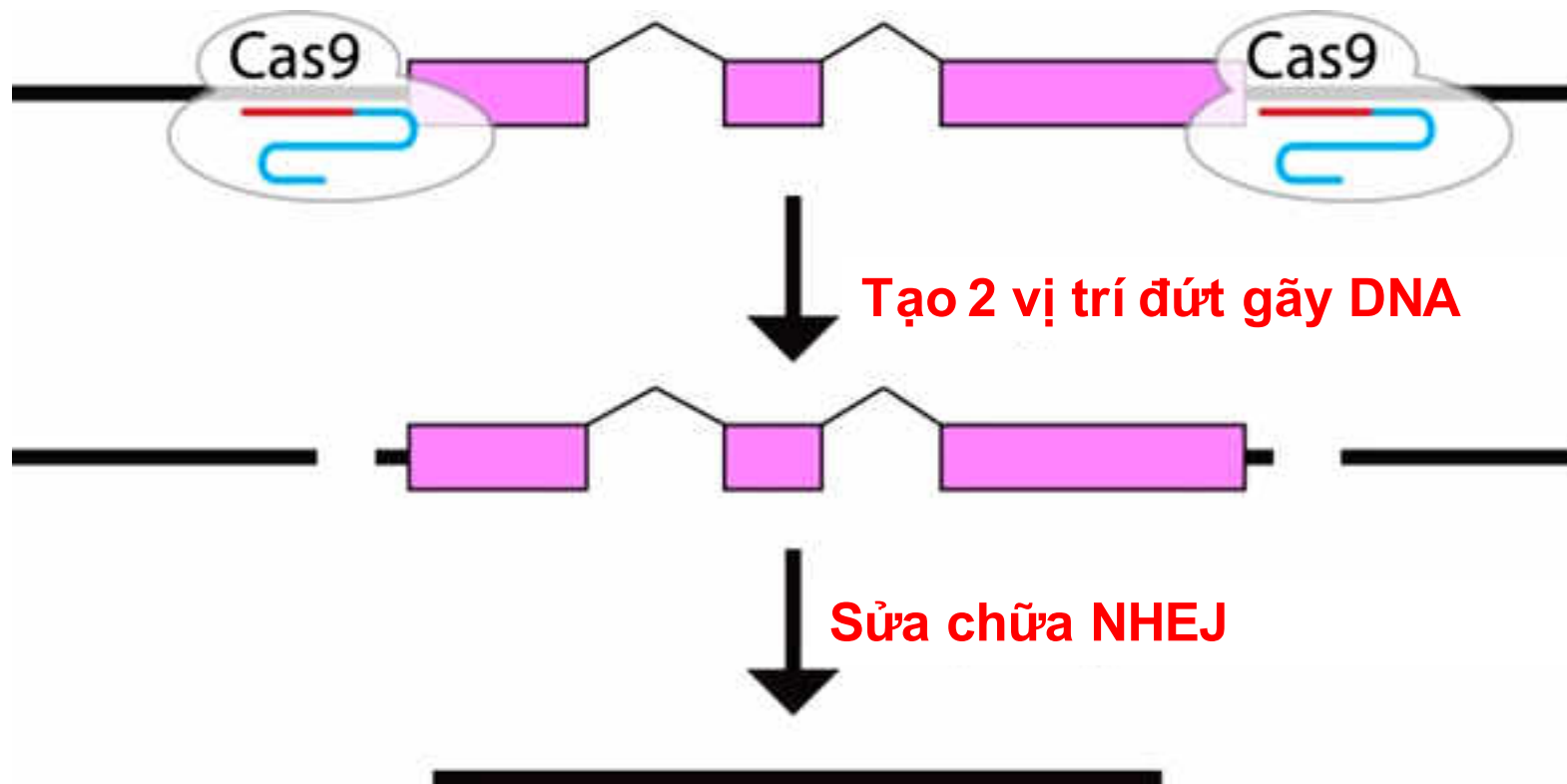
# Ứng dụng hệ thống CRISPR/Cas9

## 5. Knock-out gen có điều kiện (chèn thêm vị trí **LoxP**)



# Ứng dụng hệ thống CRISPR/Cas9

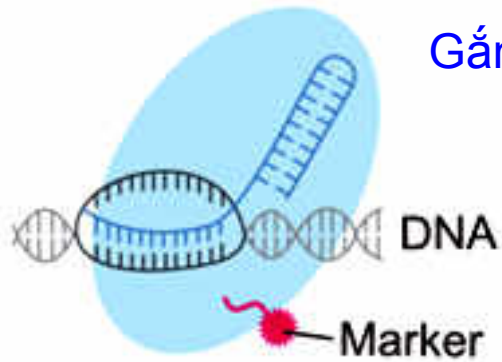
## 6. Cắt bỏ một đoạn NST lớn (sử dụng kết hợp 2 gRNA)



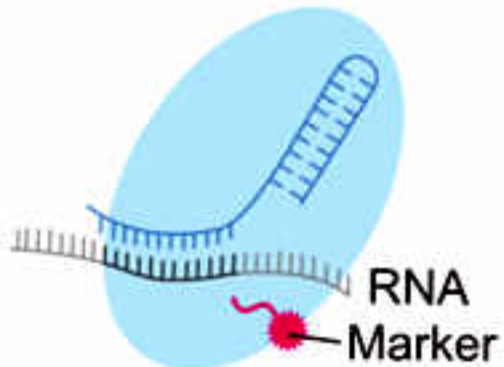


# Ứng dụng hệ thống CRISPR/Cas9

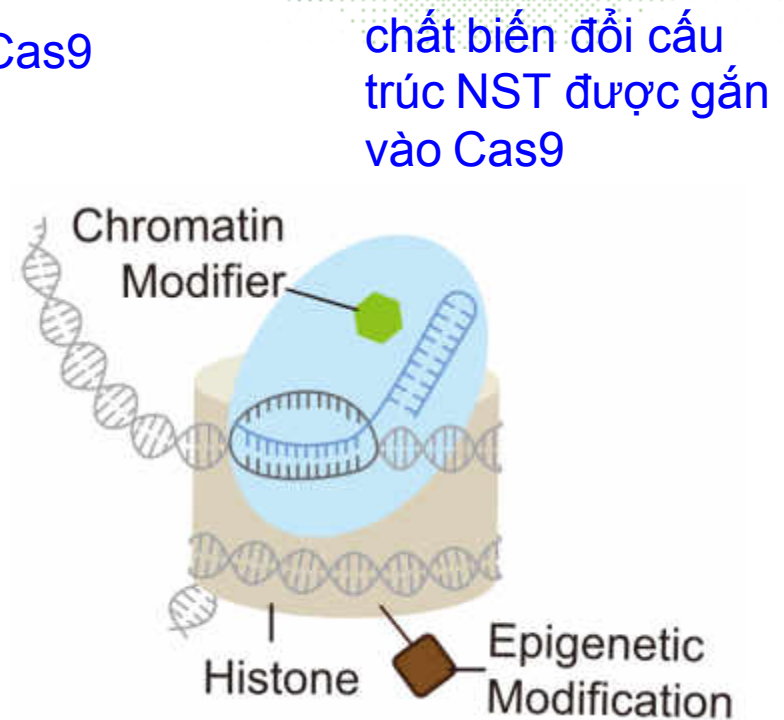
## 9. Một số ứng dụng khác:



**Đánh dấu DNA**



**Đánh dấu RNA**



**Kiểm soát di truyền ngoại gen (epigenetic)**

# Ứng dụng công nghệ CRISPR trong nông nghiệp

## Đột biến gen theo hướng có lợi

(Vd: gen liên quan đến đáp ứng stress, năng suất, chất lượng...)

## Knock-out gen:

(vd: gen bệnh, gen ức chế đáp ứng stress, gen không có lợi cho năng suất...)

## Dung hợp gen

(Vd: gắn gen chỉ thị để nghiên cứu chức năng gen/promoter...)

**CRISPR/  
Cas9**

## Kiểm soát biểu hiện gen đích

(Vd: bất hoạt gen không có lợi, tăng cường biểu hiện gen có lợi...)

## Thay đổi/chỉnh sửa promoter

(Vd: bất hoạt gen không có lợi, tăng cường biểu hiện gen có lợi...)

## Chuyển gen

(Vd: gen liên quan đến tăng cường đáp ứng stress, kháng bệnh, kháng thuốc trừ sâu, năng suất, chất lượng...)



# Nội dung báo cáo



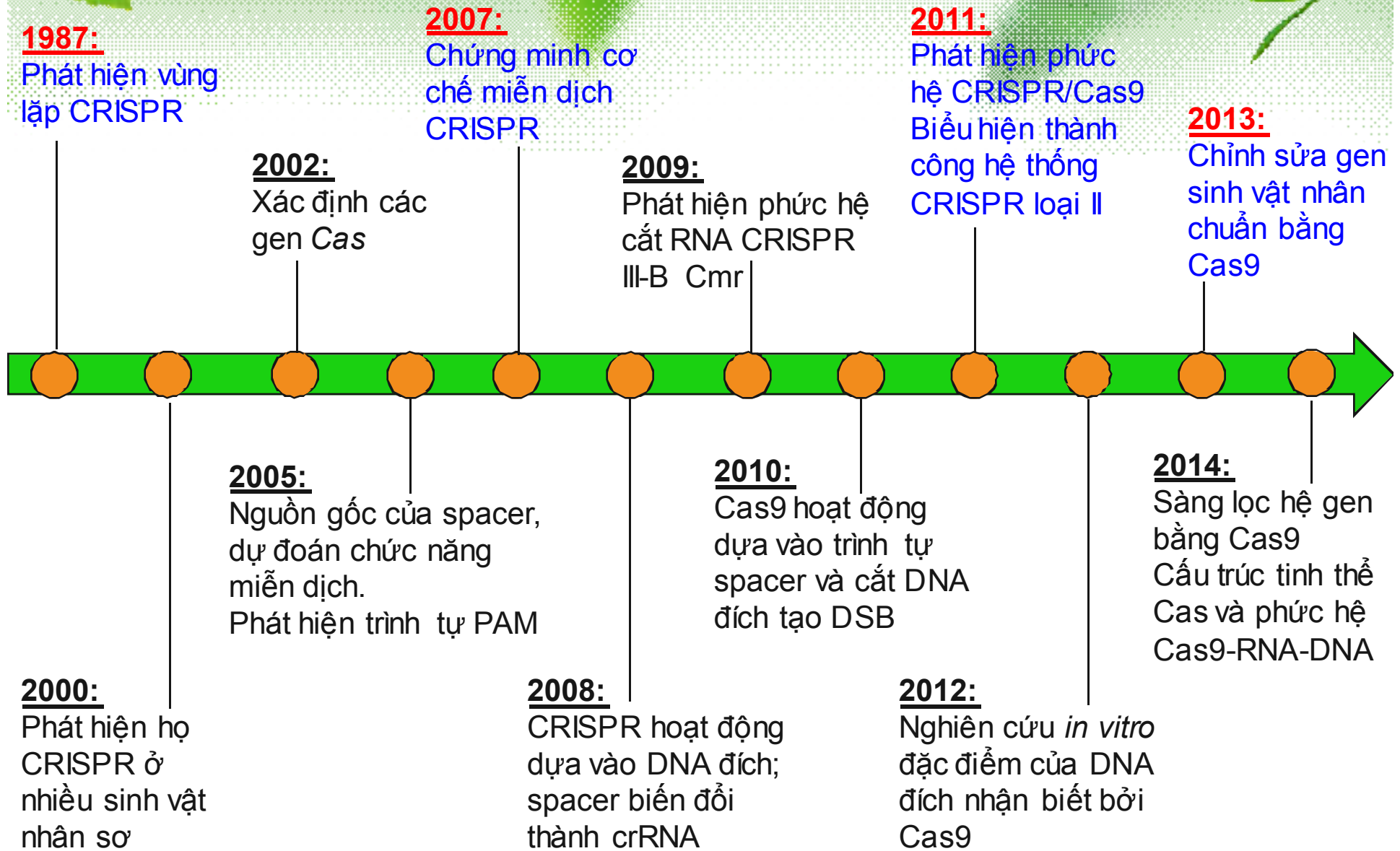
1 Giới thiệu công nghệ chỉnh sửa gen

2 Hệ thống chỉnh sửa gen CRISPR/Cas9

3 Tiềm năng phát triển công nghệ CRISPR/Cas9

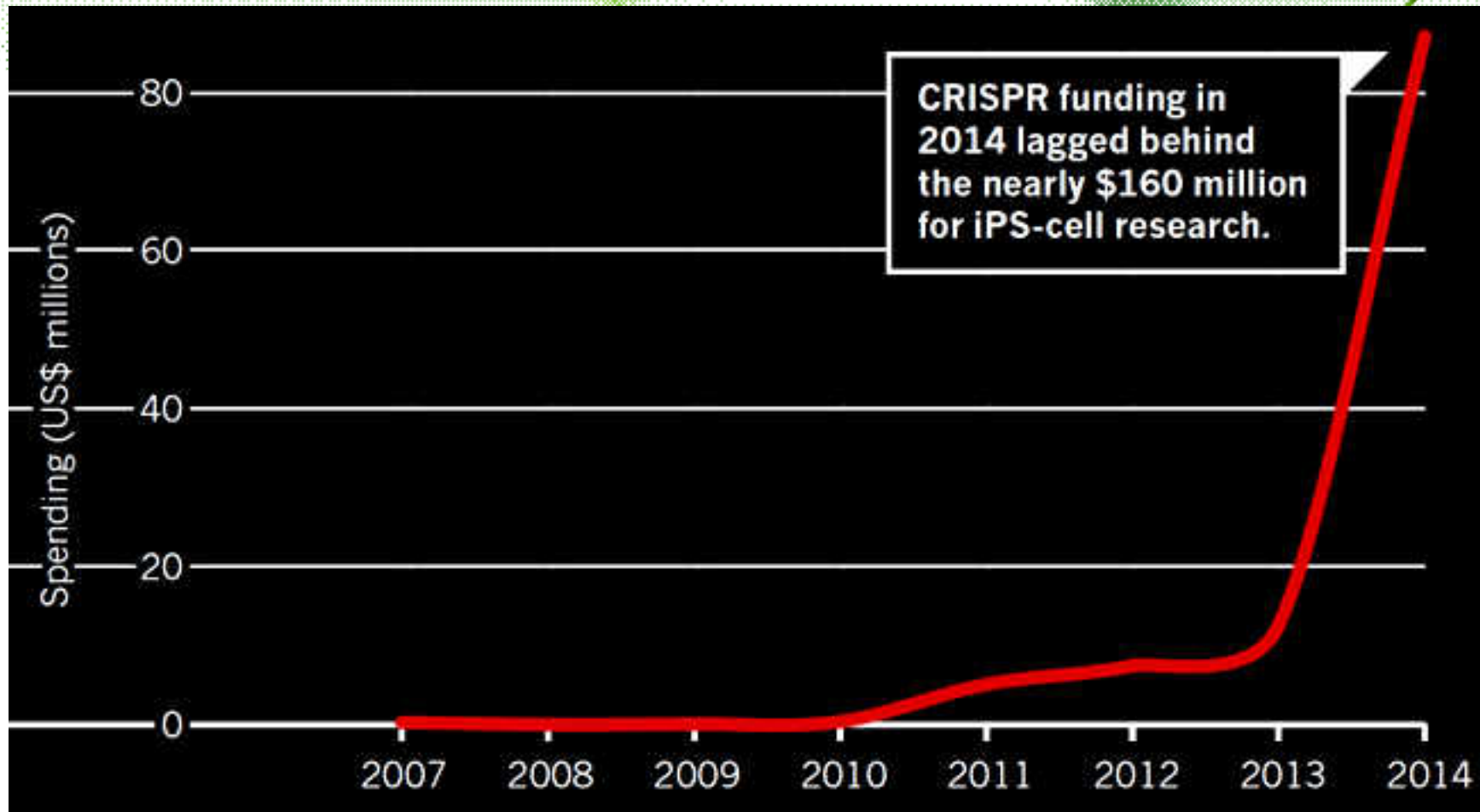


# Lịch sử phát triển công nghệ CRISPR/Cas9

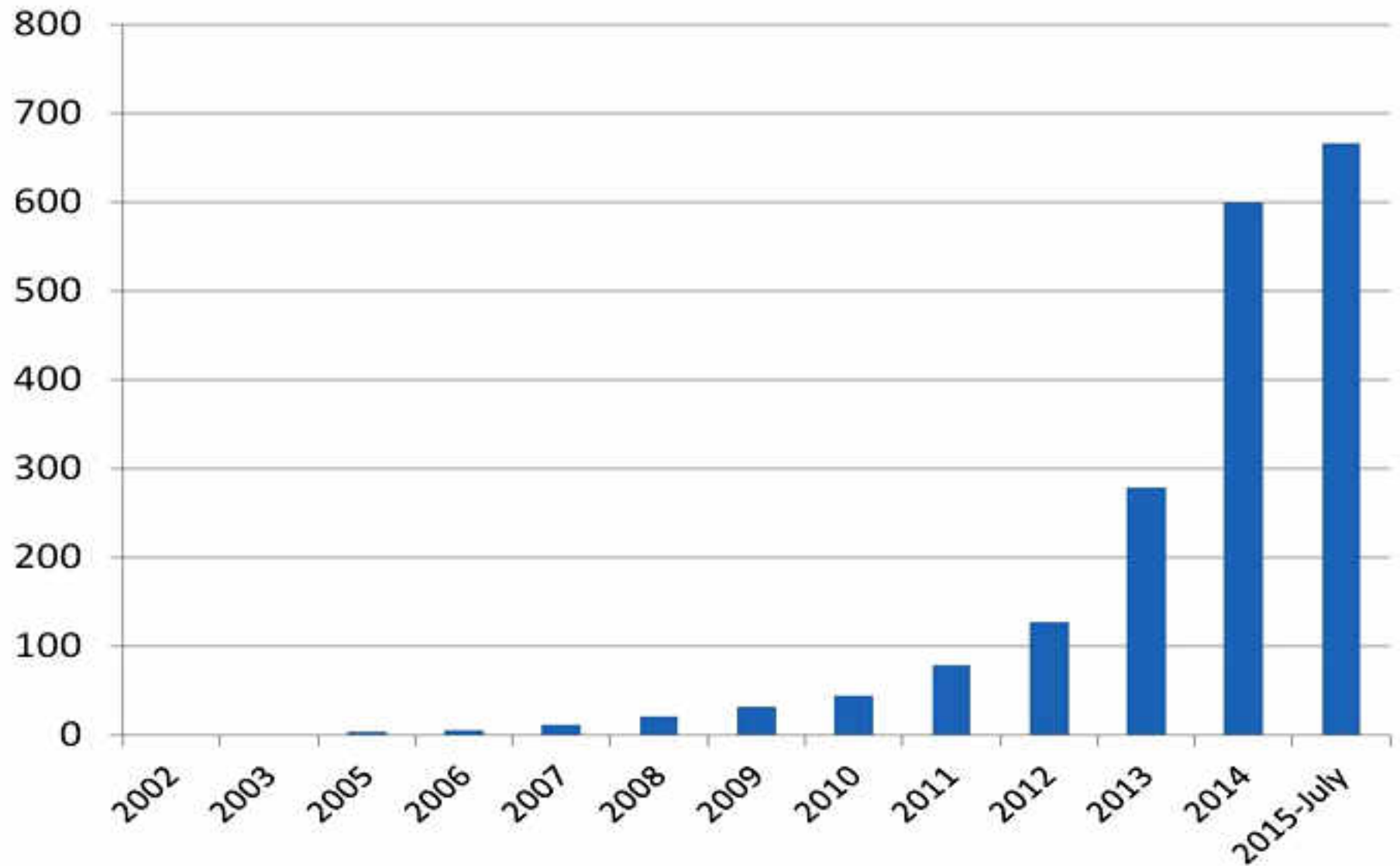




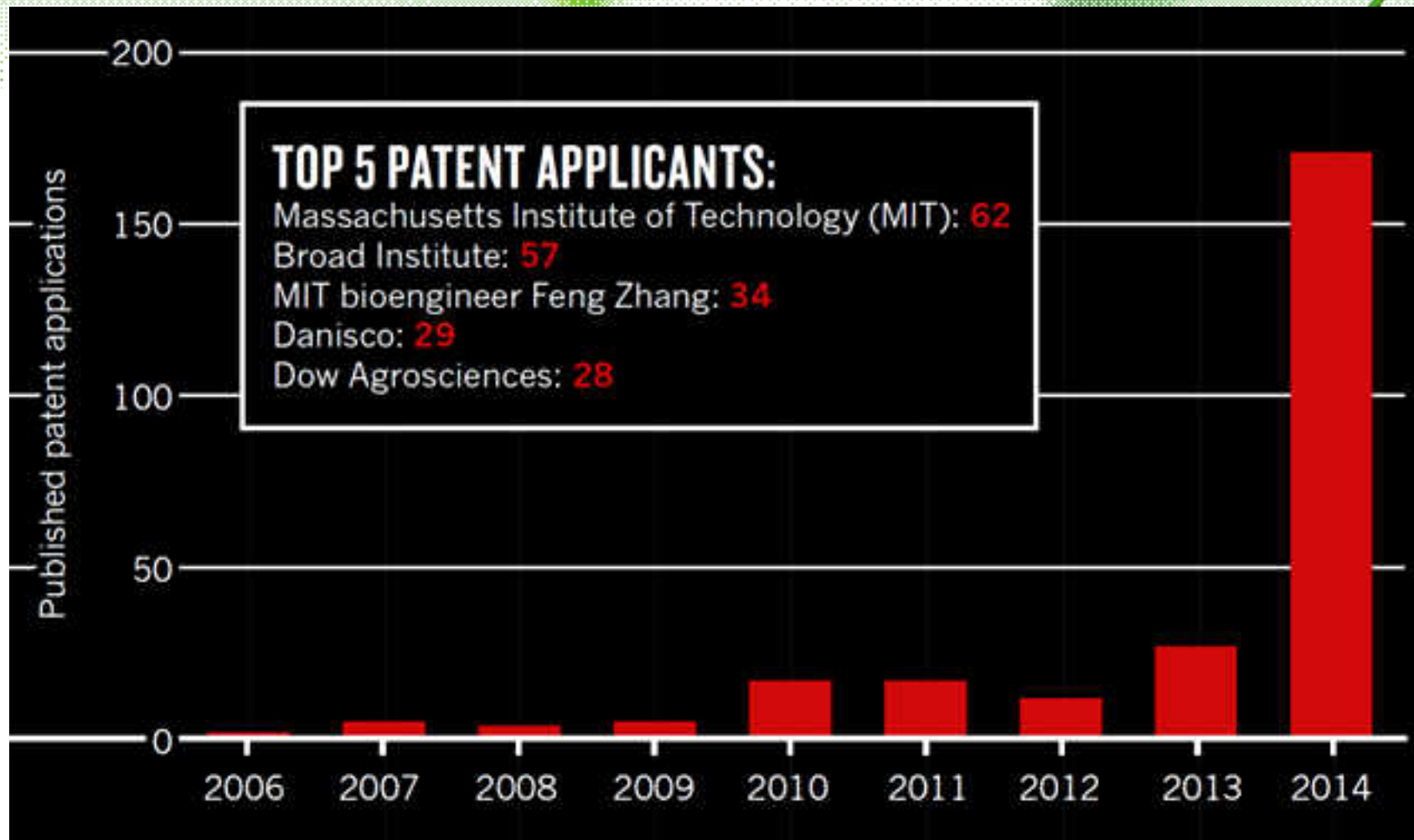
# Kinh phí nghiên cứu CRISPR/Cas9



# Các công bố liên quan đến CRISPR/Cas9



# Bản quyền liên quan đến công nghệ CRISPR/Cas9



# Bản quyền liên quan đến công nghệ CRISPR

Countries	
Name	No
PCT	140
United States	71
China	29
European Patent Office	9
Russian Federation	8
Canada	6
Japan	4
Portugal	1
Mexico	1
Spain	1
EAPO	1

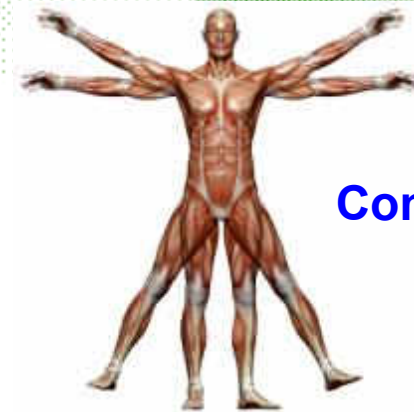
Main Applicant	
Name	No
THE BROAD INSTITUTE, INC.	14
SANGAMO BIOSCIENCES, INC.	11
CELLECTIS	11
THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA	9
PRESIDENT AND FELLOWS OF HARVARD COLLEGE	9
THE BROAD INSTITUTE INC.	8
Sangamo BioSciences, Inc.	7
The Broad Institute, Inc.	6
DOW AGROSCIENCES LLC	6
DANISCO	6

Main Inventor	
Name	No
ZHANG, Feng	18
Zhang Feng	11
ZHANG Feng	6
Barrangou Rodolphe	6
HORVATH PHILIPPE	5
GREGORY, Philip D.	4
DUCHATEAU, Philippe	4
Cost Gregory J.	4
CHURCH, George M.	4
BARRANGOU RODOLPHE	3

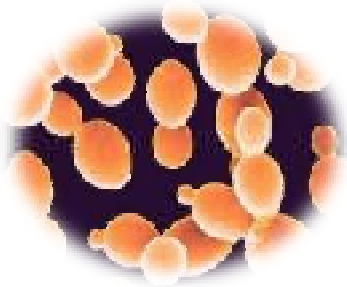
# Các sinh vật đã áp dụng công nghệ CRISPR/Cas9



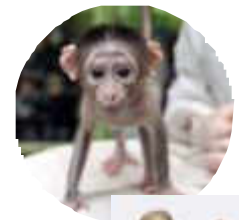
Vi khuẩn



Con người



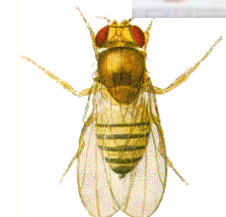
Nấm men



Động vật



Thực vật



# Nghiên cứu CRISPR/Cas9 trên thực vật

Loài	Gen đích
<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>AtPDS3, AtFLS2, AtRACK1b, AtRACK1, GFP, CHL1, CHL2, TT4i, BRI1, JAZ1, YFP</i>
<i>Nicotiana benthamiana</i>	<i>NbPDS3, NbPDS, Nbpds, NbPDS, GFP</i>
<i>Oryza sativa</i>	<i>OsPDS, OsBADH2, Os02g23823, OsMPK2, OsSWEET11, OsSWEET14, OsMYB1, ROC5, SPP, YSA, OsMPK5, CAO1, LAZY1</i>
<i>Triticum aestivum</i>	<i>TaMLO, Tainox, TaPDS, TaMLO-A1</i>
<i>Sorghum bicolor</i>	<i>DsRED2</i>
<i>Marchantia olynmorpha L.</i>	<i>MpARF1</i>
<i>Citrus sinensis</i>	<i>CsPDS</i>

# Tiềm năng ứng dụng công nghệ CRISPR/Cas9

**Liệu pháp gen điều trị bệnh ở người**

**Sàng lọc đích tác động của thuốc**

**Khoa học nông nghiệp**

*(vd: cải tạo giống cây trồng, vật nuôi...)*

**Kiểm soát vector hệ sinh thái**

*(vd: kiểm soát sự phát triển của muỗi...)*



**Sinh học tổng hợp**

*(vd: cải biến các con đường sinh tổng hợp...)*

**Phá vỡ hệ gen virus, hệ gen của mầm bệnh**

**Xác định RNA đích theo lập trình**

# Định hướng nghiên cứu ứng dụng công nghệ CRISPR/Cas9 của Bộ môn BHPT - Viện DTNN



**Chỉnh sửa gen  
CRISPR/Cas9**

**Tăng năng suất  
cây lúa**

**Cải thiện chất  
lượng hạt gạo**

**Tăng khả năng  
kháng bệnh**

**Tạo giống kháng  
thuốc diệt cỏ**

**Tăng sức chống  
chịu stress**



# Định hướng nghiên cứu ứng dụng công nghệ CRISPR/Cas9 của Bộ môn BHPT - Viện DTNN

## ➤ Tăng năng suất lúa:

- *OsTB1*: điều hòa âm tính số nhánh trên cây
- *OsDP1*: điều hòa âm tính chiều cao và số nhánh trên bông
- *OsGS3*: điều hòa âm tính kích thước hạt

## ➤ Cải thiện chất lượng gạo:

- *OsBADH2*: quy định mùi thơm ở lúa

## ➤ Tăng khả năng kháng bệnh:

- *OsSWEET14*, *OsSWEET11*, ...: liên quan đến tính miễn cảm với vi khuẩn bạc lá

## ➤ Tạo giống kháng thuốc diệt cỏ:

- *OsASL1*, *OsASL2* (mã hóa Acetolactate Synthase) -> đột biến thay thế axit amin W548L và S627I
- *OsEPSPS* (mã hóa 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase) -> đột biến thay thế axit amin T169I, P173S, G168A, T169I và P173S

## ➤ Tăng khả năng chống chịu stress

- Cải biến các con đường sinh tổng hợp chất hòa tan, hooc môn tham gia đáp ứng chống chịu stress hạn, mặn, lạnh, nhiệt độ cao...
- Thay thế promoter của các gen đáp ứng stress -> kiểm soát biểu hiện gen

# KẾT LUẬN

Hệ thống  
CRISPR/Cas9

Công nghệ  
đột phá của  
thế kỉ 21

*“thay đổi bộ gen  
theo bất cứ điều gì  
chúng ta muốn”*

(TS. Craig Mello – Giải Nobel 2006  
về công nghệ iRNA)

***Thanks for listening***

