Tạp chí Khoa học Nông nghiệp Việt Nam, Tập 24, Số đặc biệt 1, 2026: 62-71 https://doi.org/10.31817/tckhnnvn.2026.24.SP01.07
vie.vjas.vn

ĐÁNH GIÁ HIỆU QUẢ CÁC gRNA TRONG CHỈNH SỬA GEN MYOSTATIN Ở PHÔI BÒ H'MÔNG BẰNG ĐIỆN XUNG CRISPR/CAS9

Nguyễn Đức Trường[1], Nguyễn Văn Thành[1], Bùi Văn Dũng[1], Nguyễn Văn Thanh[2], Nguyễn Hoài Nam[1], Đỗ Thị Kim Lành[1*]

[1]Khoa Thú y, Học viện Nông nghiệp Việt Nam
[2]Viện Công nghệ sinh học, Đại học Lâm nghiệp

[*]Tác giả liên hệ: dtklanh@vnua.edu.vn

Ngày nhận bài: 07.04.2026 Ngày chấp nhận đăng: 11.08.2026

TÓM TẮT

Nghiên cứu được thực hiện nhằm đánh giá và sàng lọc các RNA dẫn đường (gRNA) nhắm mục tiêu gen myostatin (MSTN) phục vụ chỉnh sửa gen ở phôi bò bằng công nghệ CRISPR/Cas9. Hợp tử sau thụ tinh trong ống nghiệm được điện xung với phức hợp ribonucleoprotein (RNP) gồm Cas9 và các gRNA đơn lẻ (gRNA#2, gRNA#4, gRNA#8) hoặc phối hợp hai gRNA (gRNA#8&2, gRNA#8&4). Hiệu quả chỉnh sửa được đánh giá thông qua tỷ lệ phân chia, tỷ lệ hình thành phôi nang và phân tích giải trình tự gen đích MSTN ở phôi nang nhằm xác định tỷ lệ đột biến và tỷ lệ đột biến hai alen. Kết quả cho thấy tỷ lệ phân chia dao động từ 66,5% đến 77,1%, trong đó nhóm gRNA#8&4 có tỷ lệ phân chia thấp hơn có ý nghĩa so với gRNA#2 và gRNA#4 (P <0,05). Tỷ lệ hình thành phôi nang khác biệt rõ rệt giữa các nhóm, cao nhất ở gRNA#4 (36,8%) và thấp nhất ở gRNA#8 (18,1%). Phân tích giải trình tự cho thấy gRNA#4 đạt tỷ lệ đột biến cao nhất (52,2%) và tỷ lệ đột biến hai alen cao nhất (33,3%), trong khi các nhóm phối hợp hai gRNA có hiệu quả chỉnh sửa và tỷ lệ đột biến hai alen thấp. Kết luận, phương pháp điện xung CRISPR/Cas9 dạng RNP trên phôi IVF là khả thi để tạo phôi bò chỉnh sửa gen MSTN, trong đó gRNA#4 là ứng viên tối ưu cho các nghiên cứu và ứng dụng tiếp theo.

Từ khóa: Myostatin (MSTN), chỉnh sửa gen, CRISPR/Cas9, phôi bò, xung điện.

Evaluation of Guide RNA Efficiency for Myostatin Gene Editing in Bovine Embryos Using CRISPR/Cas9 Electroporation

ABSTRACT

This study was conducted to evaluate and screen guide RNAs (gRNAs) targeting the myostatin (MSTN) gene for bovine embryo genome editing using the CRISPR/Cas9 system. In vitro-fertilized zygotes were electroporated with ribonucleoprotein (RNP) complexes consisting of Cas9 protein and either single gRNAs (gRNA#2, gRNA#4, gRNA#8) or dual-gRNA combinations (gRNA#8&2, gRNA#8&4). Editing efficiency was assessed based on cleavage rate, blastocyst formation rate, and sequencing analysis of the MSTN target locus in blastocysts to determine mutation frequency and biallelic mutation rate. The cleavage rates ranged from 66.5% to 77.1%, with the gRNA#8&4 group showing a significantly lower cleavage rate compared with the gRNA#2 and gRNA#4 groups (P <0.05). Blastocyst formation rates differed markedly among groups, with the highest rate observed in the gRNA#4 group (36.8%) and the lowest in the gRNA#8 group (18.1%). Sequencing analysis revealed that gRNA#4 yielded the highest mutation rate (52.2%) and the highest biallelic mutation rate (33.3%), whereas dual-gRNA combinations resulted in lower editing efficiency and biallelic mutation rates. In conclusion, CRISPR/Cas9 RNP electroporation of IVF-derived embryos is a feasible approach for generating MSTN-edited bovine embryos, and gRNA#4 represents the most promising candidate for further studies and applications.

Keywords: Myostatin (MSTN), CRISPR/Cas9, genome editing, bovine embryo, electroporation.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Myostatin (MSTN), còn được gọi là yếu tố biệt hóa tăng trưởng số 8 (growth differentiation factor 8), là một protein thuộc họ siêu yếu tố tăng trưởng biến đổi β (TGF-β), đóng vai trò là

chất điều hòa ngược đối với sự phát triển cơ xương. Các đột biến mất chức năng của gen MSTN đã được chứng minh gây ra kiểu hình "cơ nhân đôi" ở bò Belgian Blue (Grobet & cs., 1997), trong khi bất hoạt MSTN ở chuột làm tăng đáng kể khối lượng cơ thông qua sự gia tăng cả số lượng và kích thước sợi cơ (McPherron & cs., 1997). Các nghiên cứu sau đó tiếp tục khẳng định *MSTN* là gen mục tiêu quan trọng để cải thiện sinh trưởng và năng suất thịt ở vật nuôi (Aiello & cs., 2018). Do vậy, bất hoạt gen MSTN được xem là một hướng tiếp cận đầy tiềm năng trong các chương trình chọn giống vật nuôi bằng công nghệ chỉnh sửa hệ gen (Wang & Petersen, 2022).

Công nghệ chỉnh sửa gen CRISPR/Cas9 (clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated protein 9) sử dụng RNA dẫn đường (guide RNA, gRNA) để định hướng enzyme Cas9 đến trình tự DNA đích, tạo đứt gãy mạch kép và kích hoạt cơ chế sửa chữa DNA nội sinh của tế bào (Cong & cs., 2013; Mali & cs., 2013). Nhờ cấu trúc đơn giản, dễ thiết kế và hiệu quả chỉnh sửa cao, CRISPR/Cas9 đã được ứng dụng để chỉnh sửa gen MSTN trên nhiều loài gia súc và động vật thủy sinh, cho thấy tiềm năng lớn trong cải thiện khả năng phát triển cơ và năng suất thịt (Xu & cs., 2020; Proudfoot & cs., 2020; Zheng & cs., 2024). Các nghiên cứu tạo động vật chỉnh sửa gen ở giai đoạn đầu chủ yếu sử dụng kỹ thuật chuyển nhân tế bào soma (SCNT) hoặc vi tiêm (microinjection), nhưng còn hạn chế bởi hiệu quả tạo phôi và tạo con sống còn thấp, quy trình thao tác phức tạp và phụ thuộc nhiều vào kỹ năng của người thực hiện (Booth & cs., 2001; Brophy & cs., 2003; Bosch & cs., 2004). Kỹ thuật xung điện (electroporation) đã được phát triển như một phương pháp thay thế nhằm đưa trực tiếp phức hợp CRISPR/Cas9 dạng ribonucleoprotein (RNP) vào hợp tử mà không cần vi thao tác, qua đó giảm tổn thương cơ học và nâng cao hiệu quả xử lý phôi (Tanihara & cs., 2016; Camargo & cs., 2020). Gần đây, Gim & cs. (2023) đã tạo thành công bò chỉnh sửa đa locus, bao gồm MSTN, bằng phương pháp điện xung trên phôi thụ tinh trong ống nghiệm, cho thấy triển vọng của phương pháp này trong sản xuất động vật chỉnh sửa gen.

Tuy nhiên, hiệu quả chỉnh sửa CRISPR/Cas9 vẫn phụ thuộc đáng kể vào đặc điểm của gRNA, bao gồm trình tự gRNA, hàm lượng GC, cấu trúc bậc hai, khả năng tiếp cận vùng chromatin cũng như nguy cơ tác động ngoài mục tiêu (Doench & cs., 2016). Đối với bò H'Mông, hiện vẫn chưa có nghiên cứu nào đánh giá có hệ thống hiệu quả của các gRNA nhắm mục tiêu gen MSTN kết hợp với phương pháp điện xung trên phôi thụ tinh trong ống nghiệm. Vì vậy, việc đánh giá thực nghiệm các gRNA là cần thiết nhằm lựa chọn được gRNA có hiệu suất chỉnh sửa cao đồng thời ít ảnh hưởng đến khả năng phát triển của phôi.

Nghiên cứu này được thực hiện nhằm đánh giá hiệu quả của các gRNA nhắm mục tiêu gen MSTN ở phôi bò H'Mông bằng phương pháp xung điện phức hợp CRISPR/Cas9 dạng RNP thông qua các chỉ tiêu phát triển phôi (tỷ lệ phân chia, tỷ lệ hình thành phôi nang) và tỷ lệ đột biến và đột biến hai alen. Kết quả nghiên cứu cung cấp cơ sở lựa chọn gRNA phù hợp cho sản xuất phôi và bò chỉnh sửa gen MSTN, góp phần ứng dụng CRISPR/Cas9 trong cải tiến giống vật nuôi ở Việt Nam.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Thu thập tế bào trứng, nuôi thành thục trong ống nghiệm, thụ tinh và nuôi cấy phôi

Các tế bào trứng thu từ buồng trứng bò H'Mông tại một số lò mổ địa phương thuộc tỉnh Hà Giang cũ (nay là tỉnh Tuyên Quang) được nuôi thành thục *in vitro* (IVM - *In Vitro* Maturation) theo Đỗ Thị Kim Lành & cs. (2021). Khoảng 50 phức hợp tế bào trứng và tế bào cumulus (COCs) được nuôi trong 500µl môi trường TCM-199 chứa muối Earle (Invitrogen, Hoa Kỳ) bổ sung 0,6mM cysteine, 0,02 AU/ml hormone kích thích nang trứng (FSH - Follical Stimulating Hormone; Kyoritsuseiyaku, Nhật Bản), 5% huyết thanh thai bê (FBS - Fetal Bovine Serum, Sigma Aldrich, Hoa Kỳ) và 50 µg/ml gentamicin (Sigma Aldrich, Hoa Kỳ)

trong 22 giờ ở 38,5°C,5% CO_2, độ ẩm không khí bão hòa.

Thụ tinh trong ống nghiệm (IVF - *In Vitro* Fertilization) được thực hiện theo Isobe & cs. (2015) với một số điều chỉnh. Sau IVM, COCs được thụ tinh bằng tinh trùng đông lạnh - rã đông của một bò đực H'Mông duy nhất nuôi tại Trung tâm giống gia súc và vật nuôi Phố Bảng, tỉnh Hà Giang cũ Tinh được rã đông ở 37°C, rửa hai lần bằng môi trường thụ tinh bằng ly tâm 630 × g trong 5 phút và pha loãng về nồng độ 4×10^6 tế bào/ml. Hỗn hợp 250µl tinh trùng được bổ sung vào 250µl môi trường chứa 50 trứng đã thành thục để đạt nồng độ cuối 2×10^6 tế bào/ml. Trứng và tinh trùng được đồng ủ trong 6 giờ ở 38,5°C trong tủ ấm không khí bão hòa chứa 5% CO_2.

Sau khi thụ tinh, hợp tử giả định được loại bỏ lớp tế bào cumulus và tinh trùng bám bằng pipet cơ học và nuôi cấy trên lớp đơn tế bào cumulus được chuẩn bị trước theo phương pháp đồng nuôi cấy (co-culture) trong môi trường mSOF bổ sung 4 mg/ml albumin huyết thanh bò (BSA - Bovine Serum Albumin, Sigma Aldrich, Hoa Kỳ) và 50 µg/ml gentamicin ở 38,5°C, 5% CO_2, độ ẩm không khí bão hòa.

Sau 72 giờ, các phôi đã phân chia tiếp tục được nuôi cấy trong mSOF bổ sung 5% FBS thêm 5. Tỷ lệ phôiphân chia và hình thành phôi nang được đánh giá tương ứng sau 72 giờ và 7 ngày nuôi cấy. Ở nhóm đối chứng, các hợp tử được xử lý tương tự nhưng không được đưa qua bước xung điện trước khi nuôi cấy.

2.2. Xung điện tế bào

Trình tự gRNA nhắm mục tiêu gen MSTN được thiết kế bằng CRISPRdirect và được phân tích khả năng off-target trên COSMID. Ba gRNA tiềm năng nhất: gRNA2, gRNA4 và gRNA8 được lựa chọn để đánh giá thực nghiệm. Các gRNA này lần lượt nhận diện các vùng nucleotide 338-360, 324-346 và 314-336 của exon 1 và exon 2 gen MSTN. Thông tin chi tiết về trình tự gRNA, vị trí đích, trình tự PAM và hướng nhận diện được trình bày trong bảng 1.

Phức hợp gRNA được chuẩn bị bằng cách ủ bắt cặp giữa crRNA (Integrated DNA Technologies - IDT; Coralville, IA, Hoa Kỳ) với tracrRNA (IDT) theo hướng dẫn của nhà sản xuất;protein Cas9 tái tổ hợp được mua từ Takara Bio, Inc. (Shiga, Nhật Bản). Xung điện được thực hiện theo Tanihara & cs. (2016) trên điện cực (LF501PT1-20; BEX, Tokyo, Nhật Bản) được kết nối với thiết bị xung điện CUY21EDIT II (BEX). Khoảng 30-40 hợp tử giả định thu nhận 15 giờ sau thụ tinh được rửa bằng dung dịch Opti-MEM I (Invitrogen và sắp xếp thẳng hàng trong khe điện cực chứa 10µl dung dịch đệm duplex (IDT) có bổ sung 100 ng/µl gRNA nhắm mục tiêu gen MSTN và 100 ng/µl protein Cas9. Xung điện được thực hiện ở 20 V/mm, thời gian kéo dài xung điện 1ms và lặp lại 3 lần.

Sau xung điện, các hợp tử được rửa và nuôi cấy trong môi trường nuôi phôi theo mô tả ở trên. Nhóm đối chứng được nuôi cấy trong điều kiện tương tự nhưng không tiến hành xung điện.

2.3. Phân tích đột biến gen MSTN trên phôi nang sau chỉnh sửa CRISPR/Cas9

DNA được tách từ từng phôi nang bằng xử lý nhiệt trong NaOH 50mM, sau đó trung hòa và khuếch đại vùng gen đích của gen MSTN bằng PCR sử dụng enzyme Quick Taq DNA Polymerase (Toyobo, Osaka, Nhật Bản) theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Bảng 1. Lựa chọn gRNA tác động trên gen MSTN ở bò

MSTN	Trình tự (5′-3′)	PAM	Target	Chiều
gRNA#2	ggacggaaacggtcattacc	cca	338-360	R
gRNA#4	cgatgactaccagccagga	cgg	324-346	F
gRNA#8	tggaagacgatgactaccac	cct	314-336	R

Các cặp mồi sử dụng gồm:

- gRNA #2 và #4: mồi xuôi (forward) 5'-CCATGCAAAAACTGCAAATCTC-3' và mồi ngược (reverse) 5'-GCAGCTTTCAGTCTCATT GGTC-3'

- gRNA #8: mồi xuôi (forward) 5'-TGGAGGTGTTCGTTCGTTTTT-3' và mồi ngược (reverse) 5'-TGGGGTAAGGCACCTT TGTC-3'

Sản phẩm PCR được tinh sạch bằng FastGene Gel/PCR Extraction Kit (Nippon Genetics, Tokyo, Nhật Bản) và giải trình tự Sanger sử dụng bộ kit BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit v3.1 (Thermo Fisher Scientific K.K., Tokyo, Nhật Bản) trên hệ thống ABI 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, CA, Hoa Kỳ). Tần suất các đột biến dạng chèn/mất đoạn (insertion/deletion; indel) trong các phôi nang được định lượng bằng công cụ tin sinh học TIDE (Tracking of Indels by DEcomposition; https://tide.deskgen.com/) (Brinkman & cs., 2014). Dựa trên kết quả giải trình tự, phôi nang được phân loại thành kiểu gen hoang dại (wild type), đột biến hai alen (biallelic mutants) hoặc đột biến khảm (mosaic mutants).

2.4. Xử lý số liệu

Tỷ lệ phôi phân chia, hình thành phôi nang và tỷ lệ phôi mang đột biến gen MSTN giữa các nhóm được so sánh bằng phép kiểm định Chi - bình phương (χ^2 test). Các giá trị được trình bày dưới dạng tỷ lệ phần trăm kèm theo số mẫu quan sát (n). Sự khác biệt được xem là có ý nghĩa thống kê khi P <0,05.

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Sự phát triển phôi *in vitro* sau điện xung gRNA/Cas9

Để đánh giá hiệu quả chỉnh sửa gen, hợp tử được điện xung với protein Cas9 kết hợp với từng gRNA riêng lẻ hoặc phối hợp 2 gRNA. Tỷ lệ phân chia và tỷ lệ hình thành phôi nang được sử dụng để đánh giá ảnh hưởng của chỉnh sửa gen lên sự phát triển phôi sớm (Bảng 2).

Tỷ lệ phôi phân chia sau xung điện chỉnh sửa gen *MSTN* giữa các nhóm gRNA dao động từ 66,5% đến 77,1%. Nhóm sử dụng gRNA#4 đạt tỷ lệ phôi phân chia cao nhất (77,1%), không khác biệt so với các nhóm gRNA#2 (75,2%), gRNA#8 (74,0%) và gRNA#8&2 (74,0%) (P >0,05). Tuy nhiên, tỷ lệ phôi phân chia ở nhóm phối hợp hai gRNA#8&4 (66,5%) thấp hơn so với nhóm phôi được xung điện với gRNA#2 và gRNA#4 (P <0,05).

Tỷ lệ hình thành phôi nang có khác biệt rõ rệt giữa các nhóm, dao động từ 18,1% đến 36,8%. Nhóm gRNA#4 cho tỷ lệ phôi nang cao hơn (36,8%; P <0,05) so với tỷ lệ này ở các nhóm phôi sử dụng gRNA#8 (18,1%), gRNA#8&2 (26,4%) và gRNA#8&4 (21,0%). Nhóm gRNA#2 đạt tỷ lệ phôi nang (29,8%) không khác biệt có ý nghĩa thống kê so với nhóm phôi sử dụng gRNA#4.

Bảng 2. Ảnh hưởng của gRNA đến khả năng phát triển của phôi bò sau xung điện chỉnh sửa gen

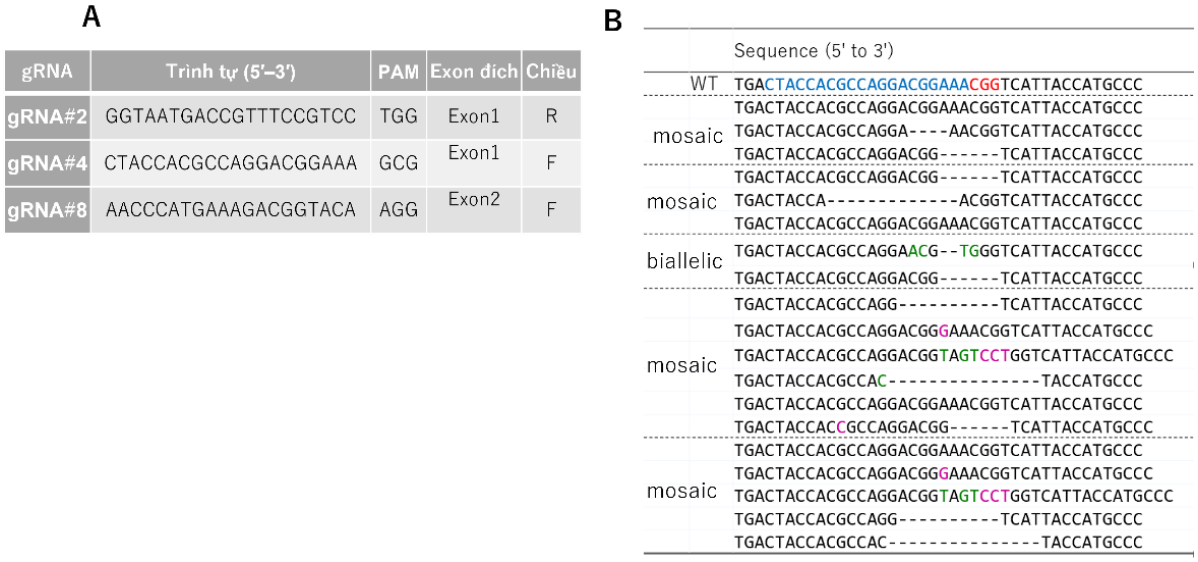
gRNA	Tỷ lệ phôi phân chia (%)	Tỷ lệ phôi nang (%)
gRNA#2	75,2(364/484)^{a}	29,8 (144/484)^{ab}
gRNA#4	77,1 (356/462)^{a}	36,8 (170/462)^{a}
gRNA#8	74,0 (355/480)^{ab}	18,1 (87/480)^{d}
gRNA#8&2	74,0 (342/462)^{ab}	26,4 (122/462)^{bc}
gRNA#8&4	66,5 (266/400)^{b}	21,0 (84/400)^{cd}

Các giá trị mang các ký tự khác nhau trong cùng một cột thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê (P <0,05).

Bảng 3. Tỷ lệ phôi mang gen MSTN đột biến

gRNA	Số phôi giải trình tự (n)	Số phôi có đột biến (n)	Tỷ lệ đột biến (%)	Số phôi đột biến 2 alen (n)	Tỷ lệ đột biến 2 alen (%)
gRNA#2	90 (30 × 3)	43	47,7[a]	12	13,3[b]
gRNA#4	90 (30 × 3)	47	52,2[a]	30	33,3[a]
gRNA#8	75 (25 × 3)	33	44,0[a]	9	12,0[b]
gRNA#8&2	96 (32 x 3)	24	25,0[b]	0	0[c]
gRNA#8&4	87 (29 x 3)	15	17,2[b]	3	3,4[bc]

Ghi chú: Các giá trị mang các ký tự khác nhau trong cùng một cột thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê (P <0,05).



Hình 1. A: Trình tự gRNA có đích tác động trên gen MSTN;
B: Mẫu chỉnh sửa gen MSTN từ phôi bò sau xung điện CRISPR/Cas với gRNA:
(chữ màu xanh là trình tự đích, đỏ là trình tự PAM, xanh lá cây là nucleotit bị thay thế, tím là nucleotit được thêm vào, --- là nucleotit bị xóa)

3.2. Kết quả phân tích đột biến gen MSTN trên phôi nang sau chỉnh sửa CRISPR/Cas9

Phân tích trình tự vùng đích gen MSTN trên từng phôi nang (Hình 1B, Bảng 3) cho thấy tỷ lệ đột biến khác nhau giữa các gRNA. Tỷ lệ cao nhất ở nhóm gRNA#4 (52,2%), tiếp theo là gRNA#2 (47,7%) và gRNA#8 (44,0%). Các gRNA đơn lẻ cho hiệu quả chỉnh sửa gen cao hơn đáng kể so với các nhóm phôi được xung điện phối hợp 2 gRNA (P <0,05), trong đó gRNA#8&4 và gRNA#8&2 có tỷ lệ chỉnh sửa gen lần lượt là 17,2% và 25,0%. Tỷ lệ đột biến 2 alen cao nhất ở nhóm gRNA#4 (33,3%) cao hơn các nhóm phôi còn lại (P <0,05); tỷ lệ này đặc biệt thấp ở nhóm 2 gRNA (gRNA#8&4: 3,4%) hoặc không có (gRNA#8&2).

4. THẢO LUẬN

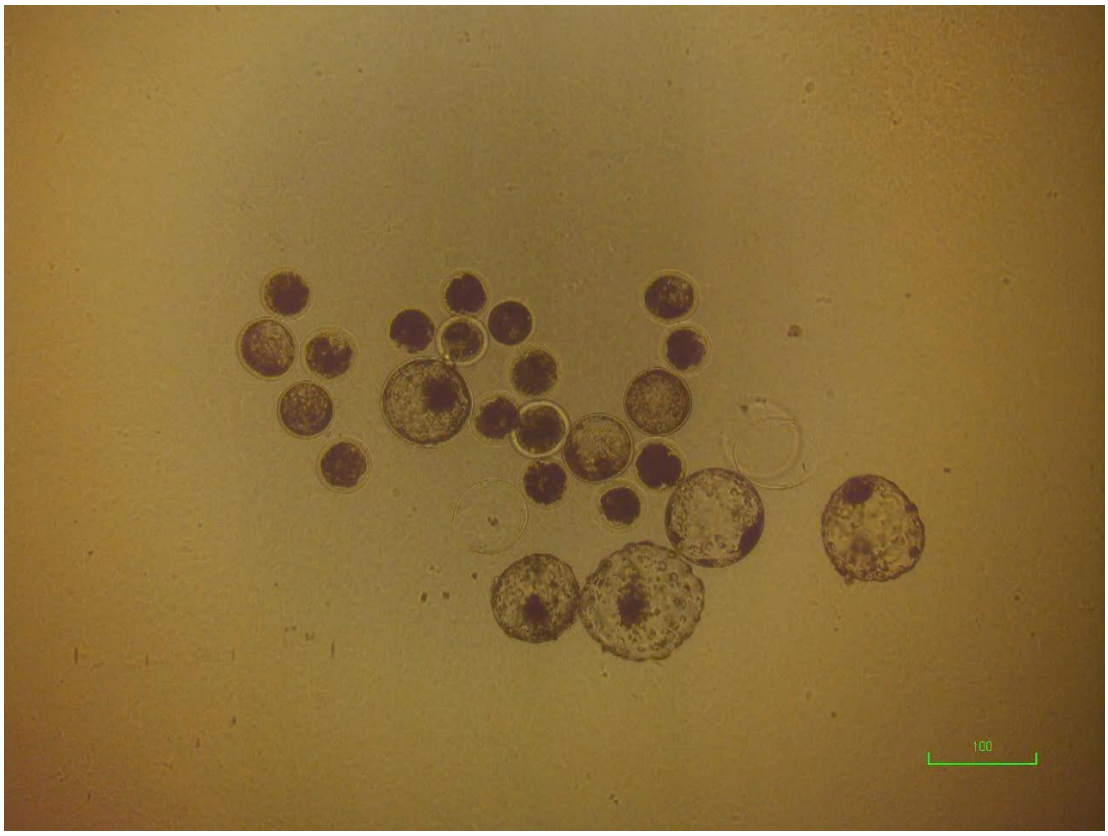
Kết quả nghiên cứu cho thấy trình tự gRNA có ảnh hưởng đáng kể đến cả khả năng phát triển của phôi và hiệu quả chỉnh sửa gen MSTN trên phôi bò H'Mông. Trong số các gRNA được khảo sát, gRNA#4 cho tỷ lệ hình thành phôi nang, tỷ lệ đột biến và tỷ lệ đột biến hai alen cao nhất, trong khi việc phối hợp hai gRNA làm giảm khả năng phát triển của phôi và hiệu quả chỉnh sửa. Kết quả này cho thấy vai trò quan trọng của việc lựa chọn gRNA trong chỉnh sửa gen bằng phương pháp xung điện.

MSTN là gen mục tiêu qunа trọng trong chọn giống vật nuôi do vai trò điều hòa âm tính đối với sự phát triển cơ xương và khả năng cải thiện năng suất thịt sau khi bị bất hoạt (Aiello & cs., 2018; Wang & Petersen, 2022). Theo hiểu biết của chúng tôi, đây là nghiên cứu đầu tiên tại Việt Nam đánh giá có hệ thống hiệu quả của nhiều gRNA nhắm mục tiêu gen MSTN trên phôi bò H'Mông bằng điện xung phức hợp CRISPR/Cas9 dạng RNP. Kết quả nghiên cứu cung cấp cơ sở ban đầu cho việc phát triển và ứng dụng công nghệ chỉnh sửa gen trên bò H'Mông và các giống bò bản địa Việt Nam.

Hiệu quả chỉnh sửa khác nhau giữa các gRNA cho thấy việc thiết kế và lựa chọn gRNA là một trong những yếu tố quan trọng đối với hệ thống CRISPR/Cas9. Mặc dù được thiết kế theo các tiêu chí tin sinh học tương tự, tỷ lệ đột biến thu được dao động từ 17,2% đến 52,2%, trong đó gRNA#4 cho tỷ lệ đột biến và đột biến hai alen cao nhất. Kết quả này phù hợp với nhiều nghiên cứu trước đây, cho thấy các gRNA khác nhau cùng nhắm một gen mục tiêu vẫn có thể tạo ra hiệu quả chỉnh sửa rất khác nhau do khác biệt về trình tự đích (Hsu & cs., 2013; Doench & cs., 2016). Trong hệ thống CRISPR/Cas9, gRNA đóng vai trò định hướng enzyme Cas9 đến vị trí liền kề PAM để tạo ra đứt gãy kép và kích hoạt các cơ chế sửa chữa DNA nội sinh của tế bào, chủ yếu thông qua con đường nối đầu không tương đồng (non-homologous end joining, NHEJ) (Jinek & cs., 2012; Cong & cs., 2013), tạo các đột biến chèn hoặc mất đoạn từ đó làm bất hoạt gen đích. Trong nghiên cứu này, các gRNA nhắm mục tiêu exon 1 và exon 2 của gen MSTN, là vùng mã hóa nằm ở đầu khung đọc mở. Các đột biến tại khu vực này có khả năng cao làm gián đoạn quá trình dịch mã hoặc tạo protein mất chức năng (McPherron & cs., 1997; Aiello & cs., 2018). Bên cạnh đó, hiệu quả chỉnh sửa giữa các gRNA còn phụ thuộc vào vị trí đích, thành phần nucleotide của gRNA, hàm lượng GC, cấu trúc bậc hai và khả năng tiếp cận DNA mục tiêu của phức hợp Cas9-gRNA (Doench & cs., 2016; Tycko & cs., 2019). Các gRNA được sử dụng trong nghiên cứu này đều được lựa chọn dựa trên dự đoán tin sinh học nhằm giảm thiểu số lượng vị trí tương đồng ngoài mục tiêu trên hệ gen bò. Việc hạn chế các tác động ngoài mục tiêu không chỉ góp phần nâng cao độ tin cậy của kết quả chỉnh sửa mà còn có ý nghĩa quan trọng đối với các ứng dụng tạo phôi và tạo động vật chỉnh sửa gen phục vụ chọn giống trong tương lai (Hsu & cs., 2013; Tsai & cs., 2015). Mặc dù các gRNA đều được sàng lọc bằng các công cụ tin sinh học nhằm giảm nguy cơ tác động ngoài mục tiêu, hiệu quả vượt trội của gRNA#4 cho thấy các dự đoán tin sinh học chỉ đóng vai trò định hướng, đánh giá thực nghiệm là cần thiết để lựa chọn gRNA tối ưu.

Việc phối hợp hai gRNA không làm tăng mà còn làm giảm tỷ lệ hình thành phôi nang và hiệu quả tạo đột biến gen MSTN so với sử dụng một gRNA. Hiện tượng này có thể liên quan đến việc tạo đồng thời nhiều đứt gãy mạch kép DNA, làm tăng gánh nặng sửa chữa DNA và ảnh hưởng đến tính toàn vẹn của hệ gen. Tổn thương DNA vượt mức có thể kích hoạt kiểm soát chu kỳ tế bào và apoptosis liên quan đến vai trò của p53, dẫn đến giảm khả năng phát triển của phôi (Le & cs., 2021; Lin & cs., 2021). Ngoài ra, sự cạnh tranh giữa nhiều sự kiện sửa chữa DNA xảy ra đồng thời cũng có thể làm giảm hiệu quả tạo đột biến tại từng vị trí đích, góp phần giải thích tỷ lệ đột biến thấp hơn ở các nhóm sử dụng hai gRNA.

Trong số các gRNA khảo sát, gRNA#4 cho tỷ lệ hình thành phôi nang, tỷ lệ đột biến và tỷ lệ đột biến hai alen cao nhất. Điều này cho thấy gRNA#4 không chỉ có hiệu quả chỉnh sửa cao mà còn ít ảnh hưởng đến khả năng phát triển của phôi. Các kết quả này phù hợp với những nghiên cứu trước đây cho thấy hiệu quả của gRNA chịu ảnh hưởng bởi nhiều yếu tố phụ thuộc vào trình tự, bao gồm hàm lượng GC, cấu trúc bậc hai, mức độ tiếp cận của chromatin và vị trí tương đối so với các yếu tố điều hòa trong locus đích (Tanihara & cs., 2018; Tanihara & cs., 2019; Fischer & cs., 2020). Vị trí đích của gRNA#4 tại exon 1 của gen MSTN có thể thuận lợi cho hoạt động của Cas9, đồng thời vẫn đảm bảo khả năng phát triển của phôi (Xue & cs., 2014; Crispo & cs., 2015; Tanihara & cs., 2018) cho thấy gRNA này là ứng viên phù hợp cho các nghiên cứu tiếp theo.



Hình 2. Phôi nang ngày 7 sau xung điện chỉnh sửa gen MSTN

Trong nghiên cứu này, phương pháp xung điện được sử dụng để đưa phức hợp CRISPR/Cas9 vào hợp tử và tạo đột biến gen MSTN với hiệu quả cao trong khi vẫn duy trì khả năng phát triển của phôi đến giai đoạn phôi nang. So với phương pháp vi tiêm truyền thống, kỹ thuật xung điện cho phép xử lý đồng thời số lượng lớn phôi với yêu cầu kỹ thuật thấp hơn, đồng thời giảm sai khác của quá trình chỉnh sửa gen (Nishio & cs., 2018; Hirata & cs., 2019; Miao & cs., 2019). Tỷ lệ phôi nang sau xung điện dao động từ 21,0% đến 36,8%, tương đương với các nghiên cứu gần đây sử dụng phương pháp điện xung để chỉnh sửa gen trên phôi bò (Camargo & cs., 2020; Miskel & cs., 2022), cho thấy quy trình xung điện được áp dụng không gây ảnh hưởng nghiêm trọng đến khả năng phát triển của hợp tử. Việc sử dụng phức hợp CRISPR/Cas9 dạng RNP thay vì plasmid DNA hoặc Cas9 mRNA giúp rút ngắn thời gian tồn tại của nuclease trong tế bào, qua đó giảm nguy cơ chỉnh sửa ngoài mục tiêu và hạn chế hiện tượng khảm (Chen & cs., 2016; Hashimoto & cs., 2016; Ryu & cs., 2018; Navarro-Serna & cs., 2020). Những ưu điểm này cho thấy xung điện CRISPR/Cas9 là cách tiếp cận phù hợp cho chỉnh sửa gen MSTN trên phôi bò H'Mông.

Kết quả nghiên cứu cũng ghi nhận rằng các phôi bò mang đột biến gen *MSTN* vẫn phát triển đến giai đoạn phôi nang, cho thấy chỉnh sửa gen MSTN không ảnh hưởng đến sự phát triển phôi sớm ở bò. Khả năng phát triển đến giai đoạn phôi nang của phôi chỉnh sửa MSTN là điều kiện tiên quyết cho việc chuyển phôi và tạo ra các cá thể vật nuôi chỉnh sửa gen, qua đó khẳng định tính khả thi của việc nhắm mục tiêu gen MSTN ở bò (Gim & cs., 2023). Do đó, phương pháp điện xung phức hợp CRISPR/Cas9 dạng RNP không chỉ bảo đảm khả năng phát triển của phôi mà còn cho phép sàng lọc gRNA một cách hiệu quả, tạo cơ sở cho triển khai sản xuất phôi và tạo bò H'Mông chỉnh sửa gen MSTN trên quy mô lớn.

5. KẾT LUẬN

Nghiên cứu đánh giá hiệu quả các gRNA trong chỉnh sửa gen MSTN ở phôi bò H'Mông bằng phương pháp xung điện CRISPR/Cas9 dạng RNP cho thấy gRNA#4 cho hiệu quả tối ưu với tỷ lệ phôi nang, tỷ lệ đột biến và tỷ lệ đột biến hai alen cao nhất. Ngược lại, phối hợp hai gRNA làm giảm hiệu quả chỉnh sửa và khả năng phát triển phôi, cho thấy chiến lược sử dụng nhiều gRNA cần được cân nhắc trong chỉnh sửa gen trên phôi bò. Kết quả nghiên cứu góp phần lựa chọn được gRNA tối ưu phục vụ tạo phôi bò H'Mông chỉnh sửa gen MSTN, đồng thời cung cấp cơ sở thực nghiệm cho việc phát triển và ứng dụng công nghệ chỉnh sửa gen trên giống bò bản địa ở Việt Nam.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được thực hiện với sự hỗ trợ kinh phí từ đề tài độc lập cấp Nhà nước "Nghiên cứu cải tạo bò vàng Việt Nam theo hướng chuyên thịt bằng công nghệ chỉnh sửa gen CRISPR/Cas9", mã số ĐTĐL.CN-21/20.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Aiello D., Patel K. & Lasagna E. (2018). The myostatin gene: An overview of mechanisms of action and its relevance to livestock animals. Animal Genetics. 49(6): 505-519.

Booth P.J., Tan S., Reipurth R., Holm P. & Callesen H. (2001). Simplification of bovine somatic cell nuclear transfer by application of a zona-free manipulation technique. Cloning and Stem Cells. 3(3): 139-150.

Bosch P., Hodges C.A. & Stice S.L. (2004). Generation of transgenic livestock by somatic cell nuclear transfer. Biotecnología Aplicada. 21(3): 128-136.

Brinkman E.K., Chen T., Amendola M. & van Steensel B. (2014). Easy quantitative assessment of genome editing by sequence trace decomposition. Nucleic Acids Research. 42(22): e168. https://doi.org/10.1093/nar/gku936.

Brophy B., Smolenski G., Wheeler T., Wells D., L'Huillier P. & Laible G. (2003). Cloned transgenic cattle produce milk with higher levels of β-casein and κ-casein. Nature Biotechnology. 21(2): 157-162.

Camargo L.S.A., Owen J.R., Van Eenennaam A.L. & Ross P.J. (2020). Efficient one-step knockout by electroporation of ribonucleoproteins into zona-intact bovine embryos. Frontiers in Genetics. 11: 570069. doi.org/10.3389/fgene.2020.570069.

Chen S., Lee B., Lee A.Y.F., Modzelewski A.J. & He L. (2016). Highly efficient mouse genome editing by CRISPR ribonucleoprotein electroporation of zygotes. Journal of Biological Chemistry. 291(28): 14457-14467. doi.org/10.1074/jbc.M116.733154.

Cong L., Ran F.A., Cox D., Lin S., Barretto R., Habib N., Hsu P.D., Wu X., Jiang W., Marraffini L.A. & Zhang F. (2013). Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. Science. 339(6121): 819-823.

Crispo M., Mulet A.P., Tesson L., Barrera N., Cuadro F., dos Santos-Neto P.C., Nguyen T.H., Crénéguy A., Brusselle L., Anegon I. & Menchaca A. (2015). Efficient generation of myostatin knock-out sheep using CRISPR/Cas9 technology and microinjection into zygotes. PLoS ONE. 10(8): e0136690. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0136690

Đỗ Thị Kim Lành, Nguyễn Thị Ngọc Anh, Hoàng Thị Kim Chi, Nguyễn Thị Hồng Nhung, Nguyễn Bá Trường, Sử Thanh Long & Nguyễn Văn Thành. (2021). Nghiên cứu nâng cao hiệu quả tạo phôi bò bằng thụ tinh trong ống nghiệm. Tạp chí Khoa học Nông nghiệp Việt Nam. 19(1): 25-32.

Doench J.G., Fusi N., Sullender M., Hegde M., Vaimberg E.W., Donovan K.F., Smith I., Tothova Z., Wilen C., Orchard R., Virgin H.W., Listgarten J. & Root D.E. (2016). Optimized sgRNA design to maximize activity and minimize off-target effects of CRISPR-Cas9. Nature Biotechnology. 34(2): 184-191. https://doi.org/10.1038/nbt.3437

Fischer K., Rieblinger B., Hein R., Sfriso R., Zuber J., Fischer A., Klinger B., Liang W., Flisikowski K., Kurome M., Zakhartchenko V., Kessler B., Wolf E., Rieben R., Schwinzer R., Kind A. & Schnieke A. (2020). Viable pigs after simultaneous inactivation of porcine MHC class I and three xenoreactive antigen genes GGTA1, CMAH and B4GALNT2. Xenotransplantation. 27(1): e12560. https://doi.org/10.1111/xen.12560

Gim G.M., Eom K.H., Kwon D.H., Jung D.J., Kim D.H., Yi J.K., Ha J.J., Lee J.H., Lee S.B., Son W.J., Yum S.Y., Lee W.W. & Jang G. (2023). Generation of double knockout cattle via CRISPR-Cas9 ribonucleoprotein (RNP) electroporation. Journal of Animal Science and Biotechnology. 14(1): 103. doi.org/10.1186/s40104-023-00902-8

Grobet L., Royo Martin L.J., Poncelet D., Pirottin D., Brouwers B., Riquet J., Schoeberlein A., Dunner S., Ménissier F., Massabanda J., Fries R., Hanset R. & Georges M. (1997). A deletion in the bovine

myostatin gene causes the double-muscled phenotype in cattle. Nature Genetics. 17(1): 71-74. https://doi.org/10.1038/ng0997-71.

Hashimoto M., Yamashita Y. & Takemoto T. (2016). Electroporation of Cas9 protein/sgRNA into early pronuclear zygotes generates non-mosaic mutants in the mouse. Developmental Biology. 418(1): 1-9. https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2016.07.017

Hirata M., Tanihara F., Wittayarat M., Hirano T., Nguyen N.T., Le Q.A., Namula Z., Nii M. & Otoi T. (2019). Genome mutation after introduction of the gene editing by electroporation of Cas9 protein (GEEP) system in matured oocytes and putative zygotes. *In Vitro* Cellular & Developmental Biology - Animal. 55(4): 237-242. https://doi.org/10.1007/s11626-019-00338-3

Hsu P.D., Scott D.A., Weinstein J.A., Ran F.A., Konermann S., Agarwala V., Li Y., Fine E. J., Wu X., Shalem O., Cradick T.J., Marraffini L.A., Bao G. & Zhang F. (2013). DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases. Nature Biotechnology. 31(9): 827-832. https://doi.org/10.1038/nbt.2647

Isobe T., Ikebata Y., Do L.T.K., Tanihara F., Taniguchi M. & Otoi T. (2015). Sericin effect on single-embryo culture. Animal Science Journal. 86: 661-665. https://doi.org/10.1111/asj.12341

Jinek M., Chylinski K., Fonfara I., Hauer M., Doudna J.A. & Charpentier E. (2012). A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. Science. 337(6096): 816-821. https://doi.org/10.1126/science.1225829

Kambadur R., Sharma M., Smith T.P. & Bass J.J. (1997). Mutations in myostatin (GDF8) in double-muscled Belgian Blue and Piedmontese cattle. Genome Research. 7(9): 910-916. https://doi.org/10.1101/gr.7.9.910

Le Q.A., Tanihara F., Wittayarat M., Namula Z., Sato Y., Lin Q., Takebayashi K., Hirata M. & Otoi T. (2021). Comparison of the effects of introducing the CRISPR/Cas9 system by microinjection and electroporation into porcine embryos at different stages. BMC Research Notes. 14: 7. https://doi.org/10.1186/s13104-020-05412-8

Lin J.C. & Van Eenennaam A.L. (2021). Electroporation-mediated genome editing of livestock zygotes. Frontiers in Genetics. 12: 648482. doi.org/10.3389/fgene.2021.648482

Mali P., Yang L., Esvelt K.M., Aach J., Guell M., DiCarlo J. E., Norville J.E. & Church G.M. (2013). RNA-guided human genome engineering via Cas9. Science. 339(6121): 823-826. https://doi.org/10.1126/science.1232033

McPherron A.C. & Lee S.J. (1997). Double muscling in cattle due to mutations in the myostatin gene. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United STates of America. 94(23): 12457-12461. doi.org/10.1073/pnas.94.23.12457

McPherron A.C., Lawler A.M. & Lee S.J. (1997). Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF-β superfamily member. Nature. 387(6628): 83-90. doi.org/10.1038/387083a0

Miao D., Giassetti M.I., Ciccarelli M., Lopez-Biladeau B. & Oatley J.M. (2019). Simplified pipelines for genetic engineering of mammalian embryos by CRISPR-Cas9 electroporation. Biology of Reproduction. 101(1): 177-187. https://doi.org/10.1093/biolre/ioz075

Miskel D., Poirier M., Beunink L., Rings F., Held E., Tholen E., Tesfaye D., Schellander K., Salilew-Wondim D., Blaschka C., Große-Brinkhaus C., Brenig B. & Hoelker M. (2022). The cell cycle stage of bovine zygotes electroporated with CRISPR/Cas9-RNP affects frequency of loss-of-heterozygosity editing events. Scientific Reports. 12: 10793. doi.org/10.1038/s41598-022-14699-5

Navarro-Serna S., Vilarino M., Park I., Gadea J. & Ross P.J. (2020). Livestock gene editing by one-step embryo manipulation. Journal of Equine Veterinary Science. 89: 103025. https://doi.org/10.1016/j.jevs.2020.103025

Nishio K., Tanihara F., Nguyen T.-V., Kunihara T., Nii M., Hirata M., Takemoto T. & Otoi T. (2018). Effects of voltage strength during electroporation on the development and quality of in vitro-produced porcine embryos. Reproduction in Domestic Animals. 53(2): 313-318. https://doi.org/10.1111/rda.13106

Proudfoot C., McFarlane G., Whitelaw B. & Lillico S. (2020). Livestock breeding for the twenty-first century: The promise of the editing revolution. Frontiers of Agricultural Science and Engineering. https://doi.org/10.15302/J-FASE-2019304

Ryu J., Prather R.S. & Lee K. (2018). Use of gene-editing technology to introduce targeted modifications in pigs. Journal of Animal Science and Biotechnology. 9: 5. https://doi.org/10.1186/s40104-017-0228-7

Tanihara F., Takemoto T., Kitagawa E., Rao S., Do L.T.K., Onishi A., Yamashita Y., Kosugi C., Suzuki H., Sembon S., Suzuki S., Nakai M., Hashimoto M., Yasue A., Matsuhisa M., Noji S., Fujimura T., Fuchimoto D.-I. & Otoi T. (2016). Somatic cell reprogramming-free generation of genetically modified pigs. Science Advances. 2(9): e1600803. https://doi.org/10.1126/sciadv.1600803

Tanihara F., Hirata M., Nguyen N.T., Le Q.A., Hirano T. & Otoi T. (2019). Effects of concentration of CRISPR/Cas9 components on genetic mosaicism in cytoplasmic microinjected porcine embryos.

Journal of Reproduction and Development. 65(3): 209-214. https://doi.org/10.1262/jrd.2018-116

Tanihara F., Hirata M., Nguyen N. T., Le Q. A., Hirano T., Takemoto T., Nakai M., Fuchimoto D.-I. & Otoi T. (2018). Generation of a TP53-modified porcine cancer model by CRISPR/Cas9-mediated gene modification in porcine zygotes via electroporation. PLoS ONE. 13(10): e0206360. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0206360

Tsai S.Q., Zheng Z., Nguyen N. T., Liebers M., Topkar V.V., Thapar V., Wyvekens N., Khayter C., Iafrate A.J., Le L.P., Aryee M.J. & Joung J.K. (2015). GUIDE-seq enables genome-wide profiling of off-target cleavage by CRISPR-Cas nucleases. Nature Biotechnology. 33(2): 187-197. https://doi.org/10.1038/nbt.3117

Tycko J., Myer V.E. & Hsu P.D. (2016). Methods for optimizing CRISPR-Cas9 genome editing specificity. Molecular Cell. 63(3): 355-370. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.07.004

Wang X. & Petersen B. (2022). More abundant and healthier meat: Will the MSTN editing epitome empower the commercialization of gene editing in livestock? Science China Life Sciences. 65(2): 448-450. doi.org/10.1007/s11427-021-1980-4

Xu K., Han C.X., Zhou H., Ding J.M., Xu Z., Yang L.Y., He C., Akinyemi F., Zheng Y.M., Qin C., Luo H.X. & Meng H. (2020). Effective MSTN gene knockout by AdV-delivered CRISPR/Cas9 in postnatal chick leg muscle. International Journal of Molecular Sciences. 21(7): 2584. https://doi.org/10.3390/ijms21072584

Xue W., Chen S., Yin H., Tammela T., Papagiannakopoulos T., Joshi N.S., Cai W., Yang G., Bronson R., Crowley D.G., Zhang F., Anderson D.G., Sharp P.A. & Jacks T. (2014). CRISPR-mediated direct mutation of cancer genes in the mouse liver. Nature. 514(7522): 380-384. https://doi.org/10.1038/nature13589

Zheng J., Liu S., Jiang W., Li F., Chi M., Cheng S. & Liu Y. (2024). CRISPR/Cas9-mediated mutation of Mstn confers growth performance in Culter alburnus juveniles. Aquaculture and Fisheries. 9(6): 900-907. doi.org/10.1016/j.aaf.2023.04.008.