

Thiết kế cấu trúc Polycistronic tRNA-gRNA để ứng dụng công nghệ CRISPR/Cas9 nhằm nghiên cứu chức năng gen một số gen mã hóa motif ankyrin liên quan đến cấu trúc bông lúa

Phạm Tiến Dũng¹, Lê Thị Như^{2,3}, Lê Quang Hòa¹, Stefan Jouannic⁴,
Helene Adam⁴, Phạm Xuân Hội², Phạm Thị Mai², Khổng Ngân Giang^{2*}

¹Viện Công nghệ sinh học và Công nghệ thực phẩm, Trường Đại học Bách khoa Hà Nội

²Phòng thí nghiệm trọng điểm công nghệ tế bào thực vật, Viện Di truyền Nông nghiệp

³Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội

⁴Đại học Montpellier, Pháp

Ngày nhận bài 6/1/2020; ngày chuyển phản biện 16/1/2020; ngày nhận phản biện 3/3/2020; ngày chấp nhận đăng 16/3/2020

Tóm tắt:

Motif ankyrin (ANK) là một trong những motif protein lớn nhất trong giới tự nhiên và có vai trò sinh học đa dạng. Hai gen mã hóa protein miền ankyrin *OsANK1*, *OsANK2* được xác định liên quan đến cấu trúc bông lúa thông qua nghiên cứu liên kết trên toàn hệ gen (GWAS) các tính trạng năng suất trên một quần thể lúa bản địa Việt Nam. Các cấu trúc polycistronic tRNA-gRNA (PTG) cho phép chỉnh sửa gen đa điểm được xây dựng nhằm nghiên cứu chức năng 2 gen *OsANK1* và *OsANK2* bằng công nghệ CRISPR/Cas9. Hai RNA dò (gRNA) được thiết kế để gây đột biến tại 2 điểm trong vùng exon 4 mã hóa motif ANK cho mỗi gen và được đưa vào cấu trúc PTG bằng công nghệ Golden Gate. Ít nhất một cấu trúc PTG đã được xây dựng thành công nhằm chỉnh sửa riêng rẽ từng gen *OsANK1*, *OsANK2* hoặc đồng thời cả 2 gen.

Từ khóa: cấu trúc bông lúa, CRISPR/Cas9, lúa, motif ankyrin, polycistronic tRNA-gRNA.

Chỉ số phân loại: 4.6

Mở đầu

Motif ANK là một trong những motif protein được bảo tồn và phân bố đa dạng nhất trong các loài sinh vật, từ virus đến người [1]. Hầu hết protein ANK chứa 2-6 motif ANK lặp lại, số lần lặp lại lớn nhất được biết đến là 34 [2]. Các protein tín hiệu Swi6/Cdc10 và Notch là các protein ANK đầu tiên được phát hiện từ nấm men và *Drosophila* [3]. Sau đó, những protein này được đặt tên từ việc phát hiện 24 motif ANK trong protein ANK [4].

Ở người và động vật, protein ANK có ý nghĩa quan trọng và vai trò sinh học đa dạng. Chúng tham gia vào kiểm soát con đường sống sót của tế bào, điều hòa phiên mã [5]. Một số protein ANK trực tiếp tham gia vào ngăn ngừa sự phát triển của ung thư [6]. Hơn nữa, protein ANK còn là các thành phần quan trọng của kênh ion và vận chuyển phức hợp tín hiệu trong hệ thống tim mạch [7].

So với rất nhiều công bố về protein ANK được tìm thấy ở người và động vật, chỉ có một số lượng nhỏ protein ANK đã được nghiên cứu chức năng ở thực vật, tuy nhiên cơ chế hoạt động của motif ANK vẫn chưa được làm rõ. Protein có nguồn gốc thực vật đầu tiên được báo cáo là AKR từ

Arabidopsis, đóng vai trò điều hòa trong quá trình biệt hóa tế bào và phát triển của cây [8]. NPR1 mã hóa một loại protein ANK mới, giữ vai trò trung tâm trong hệ thống phòng ngự qua trung gian axit salicylic ở *Arabidopsis* [9]. ANKR2 cũng từ *Arabidopsis* có thể tham gia vào việc điều hòa chuyển hóa chống oxy hóa trong kháng bệnh và phản ứng với stress. Một số protein ANK tham gia vào sự biệt hóa tế bào và sự phát triển của cây [10], hình thành và phát triển rễ, trong khi đó LIANK đóng vai trò quan trọng đối với sự nảy mầm của phấn hoa và phát triển ống phấn ở cây Lily [11]. Một số protein ANK khác liên quan đến các cơ chế phản ứng với stress và kháng bệnh ở *Arabidopsis*, hạt tiêu và cà chua.

Lúa (*Oryza sativa* L.) là một trong những cây trồng quan trọng nhất, cung cấp lương thực cho hơn 50% dân số thế giới và là cây mô hình cho các nghiên cứu về biểu hiện và chức năng gen. Mặc dù một số lượng lớn gen mã hóa protein miền ankyrin đã được xác định ở lúa nhưng mới chỉ có 2 protein ANK được nghiên cứu chức năng ở lúa. XB25 là một protein liên kết có khả năng tương tác với miền xuyên màng của protein XA21, cần thiết để duy trì khả năng kháng vi khuẩn *Xanthomonas oryzae*, tác nhân

*Tác giả liên hệ: Email: ngangiang.khong2010@gmail.com

Construction of Polycistronic tRNA-gRNA structures to study the function of some genes encoding ankyrin motif, related to rice panicle architecture, by using CRISPR/Cas9 technology

Tien Dung Pham¹, Thi Nhu Le^{2,3}, Quang Hoa Le¹, Stefan Jouannic⁴, Helene Adam⁴, Xuan Hoi Pham², Thi Mai Pham², Ngan Giang Khong^{2*}

¹School of Biotechnology and Food Technology, Hanoi University of Science and Technology

²National Key Laboratory of Plant Cell Biotechnology, Agricultural Genetics Institute

³University of Science, Vietnam National University, Hanoi

⁴University of Montpellier, France

Received 6 January 2020; accepted 16 March 2020

Abstract:

The ankyrin repeat is one of the most common protein sequence motifs and has been detected in organisms ranging from viruses to human. Two genes *OsANK1* and *OsANK2* were determined implicated in rice panicle architecture through a GWAS analysis using a Vietnamese landrace panel of rice. The polycistronic tRNA-gRNA (PTG) structures that allow gene editing at multiple sites, were built to characterize the function of *OsANK1* and *OsANK2*, by using CRISPR/Cas9 technology. Two guide RNAs (gRNAs) were designed to cause gene mutation in the exon 4 region encoding ANK motif for each gene and were inserted into PTG structure using Golden Gate technology. At least one PTG structure was successfully obtained to edit *OsANK1* and *OsANK2* separately or together.

Keywords: ankyrin motif, CRISPR/Cas9, polycistronic tRNA-gRNA, rice, rice panicle architecture.

Classification number: 4.6

gây ra bệnh bạc lá ở lúa [12]. Protein thứ hai là OsCBT hoạt động như một yếu tố điều hòa tăng cường phiên mã [13]. Ngoài ra, gen *OsPIANK1* được biết đến liên quan tới việc điều chỉnh đáp ứng kháng bệnh đạo ôn [14]. Cùng với sự phát triển của khoa học và công nghệ, sự ra đời của các thể hệ giải trình tự mới trong những năm gần đây đã tạo điều kiện cho hàng loạt các dự án giải trình tự các giống lúa khác nhau trên thế giới, cung cấp cơ hội tuyệt vời cho các phân tích trên toàn hệ gen. Bằng cách phân tích các bộ dữ liệu ở lúa, Huang và cs (2009) [11] đã xác định được 175 gen *OsANK* dựa vào thành phần miền protein. Kết quả phân tích GWAS các tính trạng năng suất của một tập đoàn lúa bản địa Việt Nam đã xác định được một số QTLs liên quan đến sự phân nhánh của bông và số hoa trên bông. Trong đó đáng chú ý là QTL9 liên kết với cả 2 tính trạng quan trọng quyết định trực tiếp đến năng suất lúa: số gié thứ cấp/bông và số hoa/bông [15]. 11 gen tiềm năng được xác định bằng phân tích tin sinh, sử dụng các dữ liệu phiên mã có sẵn (<http://qtaro.abr.affrc.go.jp/>, <http://ricexpro.dna.affrc.go.jp/field-development.php?featurenum=16794>) và các dữ liệu RNA-seq của Trung tâm Nghiên cứu phát triển Pháp. Trong số đó, duy nhất gen *SPOTTED LEAF 11 (SL11)* đã được xác định chức năng liên quan đến điều chỉnh việc nở hoa ở lúa, thông qua tương tác với gen *SPIN1*. Ngoài ra, có 5 gen mã hóa protein miền ANK, một gen mã hóa Cytokinin-O-glucosyltransferase biểu hiện mạnh ở rễ và lá, 1 gen liên quan đến độ xòe của lá và 3 gen mã hóa protein miền TPR (tetratricopeptide repeat) nhưng chưa biết chức năng. Phân tích biểu hiện 11 gen này ở 2 nhóm lúa có cấu trúc bông tương phản (bông to và bông nhỏ) cho thấy 2 gen mã hóa protein miền ankyrin (đặt tên là *OsANK1* và *OsANK2*) có biểu hiện trái ngược nhau, gen *OsANK1* biểu hiện mạnh hơn ở nhóm lúa có cấu trúc bông to, ngược lại gen *OsANK2* biểu hiện cao hơn ở nhóm lúa bông nhỏ. Bên cạnh đó, sử dụng kỹ thuật Gene Capture kết hợp với giải trình tự vùng QTL9 ở 2 nhóm lúa đã xác định được một số SNPs ở 2 gen (kết quả chưa công bố). Giả thiết đặt ra là gen *OsANK1* và *OsANK2* có thể liên quan đến cấu trúc bông lúa, trong đó gen *OsANK1* đóng vai trò như một yếu tố làm tăng cường khả năng phân nhánh của bông, còn gen *OsANK2* có tác động ngược lại (gây ức chế quá trình này).

Cấu trúc bông lúa là một tính trạng nông học phức tạp được quy định bởi nhiều gen. Để xác định chức năng của hai gen *OsANK1* và *OsANK2* liên quan đến cấu trúc bông lúa, cách tiếp cận hiệu quả nhất là tiến hành bất hoạt riêng rẽ và đồng thời cả hai gen. CRISPR/Cas9 là công cụ chỉnh sửa gen tiên bộ nhất ở thực vật hiện nay, cho phép bất hoạt đồng thời nhiều gen [16, 17]. Đã có nhiều nghiên cứu sử dụng công nghệ CRISPR/Cas9 để bất hoạt các gen không mong muốn nhằm tạo giống lúa mới năng suất cao. Để chỉnh sửa nhiều gen, Xie và cs (2015) [17] đã xây dựng các cấu trúc PTG chứa các đoạn lặp tRNA-gRNA scaffold để tạo đồng

thời nhiều sgRNA ở lúa. Sau khi các cấu trúc này được phiên mã trong tế bào thực vật, hệ thống tRNA-processing RNases nội sinh sẽ nhận biết thành phần tRNA và cắt chính xác, giải phóng các sgRNA. Kết quả thử nghiệm cho thấy, phương pháp này cho phép bất hoạt đồng thời 4 gen với hiệu suất chỉnh sửa trên cả hai alen từ 57% trở lên. Trong nghiên cứu này, các cấu trúc PTG đã được xây dựng nhằm ứng dụng công nghệ CRISPR/Cas9 để nghiên cứu chức năng của hai gen *OsANK1* và *OsANK2*. Hai gRNA được thiết kế để gây đột biến tại 2 điểm trong vùng exon 4 mã hóa motif ANK của mỗi gen. Các cấu trúc PTG được xây dựng thành công để bất hoạt 2 gen *OsANK1*, *OsANK2* riêng rẽ hoặc đồng thời cả 2 gen.

Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

Vật liệu

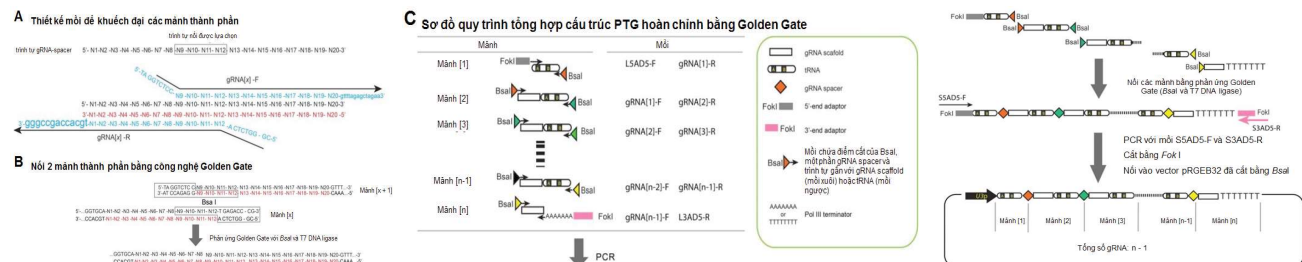
Oligonucleotide có nguồn gốc từ Công ty Macrogen (Hàn Quốc). Plasmid pGTR được sử dụng làm ADN khuôn cho các phản ứng PCR khuếch đại các mảnh thành phần, plasmid pRGE32 được sử dụng làm vector biểu hiện đồng thời Cas9 và cấu trúc PTG [16]. Các hóa chất khác có nguồn gốc từ QIAGEN, NEB và Thermo Scientific.

Phương pháp

Thiết kế gRNA: các trình tự gRNA spacer được thiết kế bằng phần mềm CRISPRdirect (<http://crispr.dbcls.jp/>) bằng cách nhập dữ liệu của vùng gen *OsANK1* và *OsANK2* của giống lúa Nipponbare. Số hiệu GenBank của 2 vùng gen *OsANK1* và *OsANK2* lần lượt là: AP014958.1: 17203282-17202908 và AP014958.1: 17333775-17333401. Để xem xét khả năng cắt không đặc hiệu (off-target) của gRNA spacer đối với thể gen của giống lúa Nipponbare, thông số “Specificity check” được lựa chọn là: Rice (*Oryza sativa* ssp. japonica) genome, Os-Nipponbare-Reference-IRGSP-1.0 (Oct, 2011). Các trình tự gRNA spacer có chỉ số off-target thấp nhất được lựa chọn.

Thiết kế môi: các môi được thiết kế để nối các mảnh tạo cấu trúc gRNA bằng công nghệ Golden Gate theo nghiên cứu của Xie và cs (2015) [17].

Tổng hợp PTG bằng Golden Gate:



Hình 1. Nguyên tắc tạo cấu trúc PTG bằng Golden Gate [16].

Nguyên tắc của phương pháp Golden Gate tổng hợp PTG được trình bày trong hình 1. (A) Cách thiết kế môi đặc hiệu cho mỗi gRNA spacer với 4 bp gối lên nhau trong phản ứng nối Golden Gate. Hai môi thành phần tạo một gRNA spacer gối lên nhau dựa vào 4 nucleotide liên tiếp bất kỳ trong vùng spacer. (B) Nguyên tắc tạo một cấu trúc gRNA spacer hoàn chỉnh bằng Golden Gate. Sau khi các mảnh thành phần được khuếch đại bằng PCR và cắt bằng *BsaI*, đầu dính dài 4 nucleotide được tạo thành giúp nối 2 mảnh thành phần để tạo thành một cấu trúc gRNA hoàn chỉnh. Trình tự ADN trong hộp thể hiện điểm cắt của *BsaI*. (C) Sơ đồ quy trình tổng hợp cấu trúc PTG hoàn chỉnh bằng Golden Gate. Một cấu trúc PTG với (n-1) gRNA được chia thành n mảnh thành phần. Mỗi mảnh thành phần được khuếch đại bằng môi đặc hiệu chứa điểm cắt của *BsaI*, ngoại trừ 2 vùng đầu và cuối của một cấu trúc sử dụng môi chứa điểm cắt của *FokI* (L5AD5-F và L3AD5-R). Những mảnh PCR này được nối với nhau bằng Golden Gate để tạo ra PTG hoàn chỉnh. Sản phẩm của phản ứng tiếp tục được khuếch đại bằng môi S5AD5-F và S3AD5-R. Sau khi được cắt bằng *FokI*, sản phẩm PCR được chèn vào vector pRGE32 đã được cắt mở vòng bằng *BsaI* để tạo cấu trúc PTG hoàn chỉnh.

PCR khuếch đại các mảnh thành phần: trong nghiên cứu này, mỗi gen được chỉnh sửa bằng hai gRNA tại hai vị trí lân cận nhau.

Các mảnh tạo cấu trúc gRNA bất hoạt gen *OsANK1* (ANK-1), *OsANK1* (ANK-2) và bất hoạt đồng thời gen *OsANK1* và *OsANK2* [ANK(1+2)] được khuếch đại bằng phản ứng PCR sử dụng Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (Thermo Scientific) với cặp môi tương ứng (bảng 1). Thành phần phản ứng PCR có thể tích 50 μ l, bao gồm 10 μ l 5X Phusion HF Buffer; 1 μ l 10 mM dNTPs; 2,5 μ l 10 μ M mỗi xuôi; 2,5 μ l 10 μ M mỗi ngược; 0,5 μ l Phusion High-Fidelity DNA Polymerase và 0,1 ng plasmid pGTR. Sau đó, phản ứng được thực hiện với chương trình nhiệt: 98°C, 2 phút; 35 chu kỳ (98°C, 10 giây; 50°C, 20 giây; 72°C, 20 giây); 72°C, 2 phút 30 giây.

Các mảnh P1, P2 và P3 được sử dụng để tạo cấu trúc ANK-1, các mảnh P4, P5 và P6 được sử dụng để tạo cấu trúc ANK-2, các mảnh P1, P2, P5, P6 và P7 được sử dụng để tạo cấu trúc ANK(1+2).

Bảng 1. Các mảnh PCR thành phần cần tổng hợp với cặp mồi tương ứng.

Mảnh PCR	Mồi xuôi	Mồi ngược	Ký hiệu	Kích thước sản phẩm PCR (bp)
P1	L5AD5-F	ANK1a-R	L5AD-ANK1a	140
P2	ANK1a-F	ANK1b-R	ANK1a-ANK1b	190
P3	ANK1b-F	L3AD5-R	ANK1b-L3AD	120
P4	L5AD5-F	ANK2c-R	L5AD-ANK2c	140
P5	ANK2c-F	ANK2d-R	ANK2c-ANK2d	190
P6	ANK2d-F	L3AD5-R	ANK2d-L3AD	120
P7	ANK1b-F	ANK2c-R	ANK1b-ANK2c	190

Tổng hợp các cấu trúc PTG bằng Golden Gate: sản phẩm PCR các mảnh thành phần tiếp tục được tinh sạch bằng QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN) trước khi được đưa vào phản ứng Golden Gate. Thành phần phản ứng 20 µl bao gồm: 10 µl 2X T7 DNA Ligase Buffer (132 mM Tris-HCl, 20 mM MgCl₂, 2 mM ATP, 2 mM DTT, 15% PEG 6000, pH 7,6); 2 µl Bovine Serum Albumin (1 mg/ml); 0,5 µl *Bsa*I (10 U/µl); 0,5 µl T7 DNA ligase (3000 U/µl) 25 ng mỗi mảnh PCR thành phần. Sau đó, phản ứng được thực hiện với chương trình nhiệt: 50 chu kỳ (37°C, 5 phút và 20°C, 10 phút); và sau đó giữ tại 20°C trong 1 giờ. Sản phẩm của phản ứng Golden Gate được pha loãng 10 lần trong H₂O để làm khuôn cho phản ứng PCR khuếch đại toàn bộ cấu trúc với cặp mồi S5AD5-F và S3AD5-R. Phản ứng PCR có thể tích 50 µl bao gồm: 10 µl 5X Phusion HF Buffer; 1 µl 10 mM dNTPs; 2,5 µl 10 µM mỗi xuôi; 2,5 µl 10 µM mỗi ngược; 0,5 µl Phusion High-Fidelity DNA Polymerase; và 2 µl sản phẩm pha loãng của phản ứng GG. Sau đó, phản ứng được thực hiện với chương trình nhiệt: 98°C, 2 phút; 35 chu kỳ (98°C, 10 giây; 60°C, 20 giây; 72°C, 20 giây); 72°C, 2 phút 30 giây.

Sản phẩm PCR khuếch đại toàn bộ cấu trúc được tinh sạch bằng QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN) trước khi được cắt bằng *Fok*I (Thermo Scientific). Sản phẩm cắt được điện di trên gel agarose 1% để tinh sạch trên gel bằng QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN) trước khi được nối với vector pRGE32 đã được cắt bằng *Bsa*I, enzyme T4 ADN ligase (Thermo Scientific). Sản phẩm nối sau đó được biến nạp vào tế bào khả biến *E. coli* DH10b (Thermo Scientific) bằng phương pháp sốc nhiệt trước khi được trải trên đĩa thạch LB có bổ sung kháng sinh kanamycin. Sau khi nuôi qua đêm, các dòng tế bào mọc trên đĩa được sàng lọc bằng kỹ thuật PCR khuẩn lạc với cặp mồi S5AD5-F và S3AD5-R. Các dòng tế bào cho kết quả sàng lọc PCR dương tính được nuôi trong môi trường LB lỏng có bổ sung kháng sinh kanamycin qua đêm để tách chiết lấy plasmid bằng QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN).

Giải trình tự gen: các dòng plasmid sau đó được gửi đi giải trình tự tại Công ty 1st Base Malaysia để kiểm tra tính chính xác của cấu trúc.

Kết quả

Thiết kế gRNA spacer

Để ứng dụng công nghệ CRISPR/Cas9 chỉnh sửa và nghiên cứu chức năng của gen, gRNA spacer được lựa chọn cần hạn chế tối đa khả năng phức hợp Cas9-gRNA off-target. Kết quả cho thấy, dựa vào chỉ số 20mer + PAM được trình bày ở bảng 2 và 3, các trình tự gRNA spacer thu được đều chỉ bắt cặp đặc hiệu (on-target) đúng một trình tự trên thể gen của Nipponbare. Tuy nhiên, dựa vào chỉ số 12mer + PAM, vẫn có khả năng off-target xảy ra. Chỉ số này càng lớn thì khả năng off-target càng cao. Do vậy, hai trình tự gRNA spacer đối với mỗi gen có chỉ số 12mer + PAM thấp nhất đã được lựa chọn: GCCACTGATTTATGCAGTTCTGG và CCTCTCCATTTAGCAGTTGAACA đối với *OsANK-1*, GTGGACACAGTCGAAACCGTGG và TGGTGCTATGAAGATTTTATTGG đối với *OsANK-2*.

Bảng 2. Thiết kế gRNA spacer bắt hoạt ANK-1.

TT	Vị trí bắt cặp trên thể gen Nipponbare chr2	Trình tự gRNA spacer	Khả năng bắt cặp với các trình tự trên thể gen Nipponbare	
			20mer + PAM	12mer + PAM
1	17203075 - 17203053	CCTCTCCATTTAGCA GTTGAACA	1	3
2	17203175 - 17203153	GCCACTGATTTATGC AGTTCTGG	1	3
3	17203216 - 17203194	CCCTGATTGTTTT TTTCAAT	1	15
4	17202959 - 17202937	CCTGCAATAATGA AAGTTCGA	1	9
5	17202985 - 17202963	TATATTATTGTTT TAGTTGG	1	7
6	17203279 - 17203257	CCTATCTTTTGTTT TGGATAAG	1	18

Ghi chú: trình tự PAM được gạch chân. 20mer + PAM: khả năng gRNA spacer bắt cặp 20 nucleotide liên tiếp với trình tự PAM (NGG) trên thể gen của giống lúa Nipponbare. 12mer + PAM: khả năng gRNA spacer bắt cặp 12 nucleotide liên tiếp với trình tự PAM (NGG) trên thể gen của giống lúa Nipponbare.

Bảng 3. Thiết kế gRNA spacer bắt hoạt ANK-2.

TT	Vị trí bắt cặp trên thể gen Nipponbare chr2	Trình tự gRNA spacer	Khả năng bắt cặp với các trình tự trên thể gen Nipponbare	
			20mer + PAM	12mer + PAM
1	17333593 - 17333571	GTGGACACAGTCGA AACCGTGG	1	2
2	17313923 - 17313901	TGGTGCTATGAAGATT TATGG	1	7
3	17333637 - 17333659	GGCTTTCTGTTTGT TTTCAGG	1	13
4	17333701 - 17333679	CCCCCGCCCAAAAA AAAGGGAA	1	14
5	17333694 - 17333672	CCAAAAAAGGGGA AAAAAAC	1	37
6	17333704 - 17333682	CCCCCGCCCAAAA AAAAAAGG	1	13

Thiết kế môi để tạo cấu trúc gRNA

Sau khi xác định được trình tự gRNA spacer, trình tự môi sử dụng để tạo cấu trúc PTG được thiết kế tương tự như nghiên cứu của Xie và cs (2015) [17]. Trình tự các môi được trình bày ở bảng 4.

Bảng 4. Các môi sử dụng để tạo cấu trúc PTG.

Tên môi	Trình tự (5'-3')
ANK1a-F	TA GGTCTCC <u>GA</u> TTTATGCAGTTC gttttagagctagaa
ANK1a-R	AT GGTCTCA <u>AAT</u> CAGTGGC tgcaccagccgggaa
ANK1b-F	TA GGTCTCC <u>CT</u> GCTAAATGGAG gttttagagctagaa
ANK1b-R	AT GGTCTCA <u>GC</u> AGTTGAACA tgcaccagccgggaa
ANK2c-F	TA GGTCTCC <u>AC</u> AGTCGCAACCG gttttagagctagaa
ANK2c-R	AT GGTCTCA <u>CT</u> GTGTCAC tgcaccagccgggaa
ANK2d-F	TA GGTCTCC <u>TAT</u> GAAGATTTAT gttttagagctagaa
ANK2d-R	AT GGTCTCA <u>CAT</u> AGACCA tgcaccagccgggaa
L5AD5-F	CG GGTCTC A GGCA GGATG GGCAGTCTG GGCA ACAAAGCACCAGTGG
L3AD5-R	TA GGTCTC C AAAC GGATG AGCGACAGC AAAC AAAAAAGCAACCGACTCG
S5AD5-F	CG GGTCTC A GGCA GGATG GGCAGTCTG GGCA
S3AD5-R	TA GGTCTC C AAAC GGATG AGCGACAGC AAAC

Gạch chân: trình tự nối giữa các mảnh ADN thành phần.

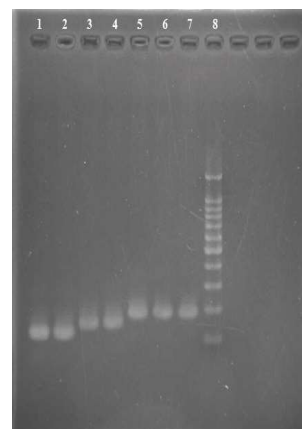
PCR khuếch đại các mảnh thành phần để tạo các cấu trúc gRNA

Trong nghiên cứu này, các mảnh thành phần để tạo các cấu trúc gRNA được khuếch đại bằng phản ứng PCR với khuôn ADN là plasmid pGTR và các môi tương ứng (bảng 1 và 4). Kết quả hình 2 cho thấy, các sản phẩm PCR đều cho kết quả phù hợp với tính toán lý thuyết là: 120 bp đối với môi ANK1b-F, L3AD5-R (P3), ANK2d-F và L3AD5-R (P6); 140 bp đối với môi L5AD5-F, ANK1a-R (P1), L5AD5-F và ANK2c-R (P4); 190 bp đối với môi ANK1a-F, ANK1b-R (P2), ANK2c-F, ANK2d-R (P5), ANK1b-F và ANK2c-R (P7).

Sau đó các mảnh PCR thành phần được trộn với nhau để tạo cấu trúc gRNA trong phản ứng Golden Gate sử dụng *Bsa*I và T7 ADN ligase.

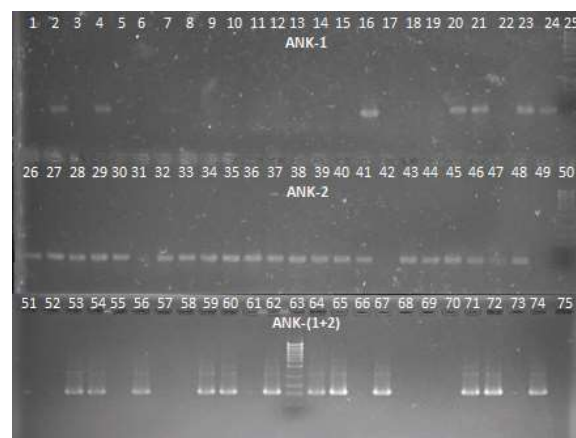
Sàng lọc các cấu trúc PTG bất hoạt ANK-1, ANK-2 và ANK-(1+2)

Cấu trúc ANK-1 được sàng lọc bằng cặp môi ANK1a-F và ANK1b-R cho sản phẩm PCR có kích thước lý thuyết là 200 bp. Cấu trúc ANK-2 được sàng lọc bằng cặp môi ANK2c-F và ANK2d-R với sản phẩm PCR 200 bp. Cấu



Hình 2. Kết quả PCR khuếch đại các mảnh thành phần tạo cấu trúc PTG bất hoạt ANK-1, ANK-2 và bất hoạt đồng thời ANK-1 và ANK-2. 1: sản phẩm PCR với môi ANK1b-F và L3AD5-R (P3); 2: sản phẩm PCR với môi ANK2d-F và L3AD5-R (P6); 3: sản phẩm PCR với môi L5AD5-F và ANK1a-R (P1); 4: sản phẩm PCR với môi L5AD5-F và ANK2c-R (P4); 5: sản phẩm PCR với môi ANK1a-F và ANK1b-R (P2); 6: sản phẩm PCR với môi ANK2c-F và ANK2d-R (P5); 7: sản phẩm PCR với môi ANK1b-F và ANK2c-R (P7); 8: SiZer™-100 ADN Marker Solution (Intron).

trúc ANK(1+2) được sàng lọc bằng cặp môi ANK1a-F và ANK2d-R với sản phẩm PCR 550 bp. Kết quả (hình 3) cho thấy, 6/22 dòng cho kết quả dương tính với cấu trúc ANK-1, 20/22 dòng cho kết quả dương tính với cấu trúc ANK-2, 12/23 dòng cho kết quả dương tính với cấu trúc ANK(1+2).



Hình 3. Kết quả sàng lọc các dòng E. coli mang cấu trúc PTG bất hoạt ANK-1, ANK-2 và bất hoạt đồng thời ANK-1 và ANK-2 bằng kỹ thuật PCR khuẩn lạc sử dụng lần lượt các cặp môi ANK1a-F*ANK1b-R, ANK2c-F*ANK2d-R và ANK1a-F*ANK2d-R. 1-24: sàng lọc cấu trúc ANK-1, trong đó: 1 là âm tính, 24 là dương tính; 26-49: sàng lọc cấu trúc ANK-2, trong đó: 49 là âm tính, 26 là dương tính; 51-75: sàng lọc cấu trúc ANK-(1+2), trong đó: 51 là mẫu âm tính, 25, 50, 63: HighRanger 1 kb ADN Ladder (Norgen).

Các dòng tế bào *E. coli* cho kết quả PCR khuôn lạc dương tính được nuôi cấy để tách chiết plasmid.

Kết quả giải trình tự các dòng plasmid mang cấu trúc gRNA

Các dòng plasmid được xác định trình tự theo cả hai chiều. Kết quả giải trình tự gen (bảng 5) cho thấy, toàn bộ các cấu trúc đều có ít nhất một dòng plasmid cho kết quả như mong đợi.

Bảng 5. Kết quả giải trình tự các dòng plasmid mang cấu trúc PTG bất hoạt ANK-1, ANK-2 và bất hoạt đồng thời ANK-1 và ANK-2.

Cấu trúc	Số lượng dòng gửi đi giải trình tự	Kết quả giải trình tự
ANK-1	3	3/3 dòng trình tự đúng với thiết kế
ANK-2	3	2/3 dòng trình tự đúng với thiết kế
ANK-(1+2)	5	1/5 dòng trình tự đúng với thiết kế

Kết luận

Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã xây dựng thành công các cấu trúc PTG bất hoạt riêng rẽ *OsANK1*, *OsANK2* và đồng thời cả hai gen. Hiện nay, các cấu trúc này đã được biến nạp vào giống lúa Kitaaké và các công việc đặc tính hóa các dòng lúa đột biến đang được tiến hành để xác định chức năng của hai gen này.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được tài trợ bởi Quỹ Phát triển khoa học và công nghệ quốc gia (NAFOSTED) thông qua đề tài mã số 106-NN.02-2016.60. Các tác giả xin chân thành cảm ơn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] S.G. Sedgwick, et al. (1999), "The ankyrin repeat: a diversity of interactions on a common structural framework", *Trends Biochem. Sci.*, **24**(8), pp.311-316.
- [2] H.G. Elmendorf, et al. (2005), "Examination of a novel head-stalk protein family in *Giardia lamblia* characterised by the pairing of ankyrin repeats and coiled-coil domains", *Int. J. Parasitol.*, **35**(9), pp.1001-1011.
- [3] L. Breeden, et al. (1987), "Similarity between cell-cycle genes of budding yeast and fission yeast and the Notch gene of *Drosophila*", *Nature*, **329**(6140), pp.651-654.
- [4] S.E. Lux, et al. (1990), "Hereditary spherocytosis associated with deletion of human erythrocyte ankyrin gene on chromosome 8",

Nature, **345**(6277), pp.736-739.

- [5] Y. Chinenov, et al. (1998), "Identification of redox-sensitive cysteines in GA-binding protein- α that regulate DNA binding and heterodimerization", *J. Biol. Chem.*, **273**(11), pp.6203-6209.
- [6] P.M. Neilsen, et al. (2008), "Identification of ANKRD11 as a p53 coactivator", *J. Cell Sci.*, **121**(21), pp.3541-3552.
- [7] S.M. Hashemi, et al. (2009), "Cardiac ankyrins in health and disease", *J. Mol. Cell Cardiol.*, **47**(2), pp.203-209.
- [8] H. Zhang, et al. (1992), "Expression of antisense or sense RNA of an ankyrin repeat-containing gene blocks chloroplast differentiation in arabidopsis", *Plant Cell*, **4**(12), pp.1575-1588.
- [9] H. Cao, et al. (1997), "The Arabidopsis NPR1 gene that controls systemic acquired resistance encodes a novel protein containing ankyrin repeats", *Cell*, **88**(1), pp.57-63.
- [10] S. Albert, et al. (1999), "The EMB 506 gene encodes a novel ankyrin repeat containing protein that is essential for the normal development of Arabidopsis embryos", *Plant*, **17**(2), pp.169-179.
- [11] J. Huang, et al. (2009), "The ankyrin repeat gene family in rice: genome-wide identification, classification and expression profiling", *Plant Mol. Biol.*, **71**(3), pp.207-226.
- [12] Y.S. Wang, et al. (2006), "Rice XA21 binding protein 3 is a ubiquitin ligase required for full Xa21-mediated disease resistance", *Plant Cell*, **18**(12), pp.3635-3646.
- [13] M.S. Choi, et al. (2005), "Isolation of a calmodulin-binding transcription factor from rice (*Oryza sativa* L.)", *J. Biol. Chem.*, **280**(49), pp.40820-40831.
- [14] X. Zhang, et al. (2010), "Molecular characterization of rice OsBIANK1, encoding a plasma membrane-anchored ankyrin repeat protein, and its inducible expression in defense responses", *Mol. Biol. Rep.*, **37**(2), pp.653-660.
- [15] K.N. Ta, et al. (2018), "A genome-wide association study using a Vietnamese landrace panel of rice (*Oryza sativa*) reveals new QTLs controlling panicle morphological traits", *BMC Plant Biology*, **18**(1), p.282.
- [16] X. Ma, et al. (2015), "A Robust CRISPR/Cas9 System for Convenient, High-Efficiency Multiplex Genome Editing in Monocot and Dicot Plants", *Mol. Plant*, **8**(8), pp.1274-1284.
- [17] K. Xie, et al. (2015), "Boosting CRISPR/Cas9 multiplex editing capability with the endogenous tRNA-processing system", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **112**(11), pp.3570-3575.