

HỆ THỐNG CRISPR/Cas9 VÀ MỘT SỐ ỨNG DỤNG THỰC TIỄN*CRISPR/Cas9 SYSTEM AND SOME PRACTICAL APPLICATIONS*

CHÂU TẤN PHÁT(*)

TÓM TẮT: CRISPR/Cas9 là một kỹ thuật mới được phát triển trong thời gian gần đây. Bắt đầu với việc phát hiện ra chuỗi DNA lặp đi lặp lại palindromic bí ẩn ở *E. Coli* vào năm 1987, các nhà khoa học bắt đầu điều tra chức năng của hiện tượng có vẻ kỳ quái này. Từ sự tò mò tự nhiên này đã phát triển một cách hoàn toàn mới để sửa đổi DNA: CRISPR/Cas9. Hệ thống này phát triển như một cơ chế tự bảo vệ đối với vi khuẩn về cơ bản là một cách để tự tiêm phòng chống lại virus và plasmid xâm nhập. Bài viết trình bày những cơ chế cơ bản về cách thức hệ thống CRISPR/Cas9 hoạt động như thế nào, một số khả năng cho phép mà hệ thống CRISPR/Cas9 có thể ứng dụng thực tế (tác động lên các gen ngủ - Knock-out gene, chỉnh sửa gen mà không dùng đến vector DNA, bất hoạt gen một cách tạm thời...) gần như ứng dụng hầu hết trên tất cả các loài sinh vật.

Từ khóa: hệ thống CRISPR/Cas9; *E.Coli*; DNA.

ABSTRACT: CRISPR/Cas9 is a new technique developed in the recent time. Beginning with the discovery of the mysterious palindromic repeating sequence of DNA in *E. Coli* in 1987, scientists began investigating the function of this seemingly outrageous phenomenon. This natural curiosity developed a whole new way to modify DNA: CRISPR/Cas9. The system developed as a self-defense against bacteria is an essential way to self-vaccinate against invading viruses and plasmids. The paper presents the basic mechanisms of how the CRISPR/Cas9 system works and some possibilities that the CRISPR/Cas9 system can apply practically (act on sleeping genes - Knock-out genes, genomic editing without the use of DNA vectors, temporarily inactivating genes...) to almost all species.

Key words: CRISPR/Cas9 system; *E.Coli*; DNA.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Con người là một loài đặc biệt thích nghi, đặc điểm này đã giúp chúng ta phát triển trên khắp hành tinh. Chúng ta đã thích nghi về mặt di truyền và biểu sinh với nhiều vùng khí hậu và môi trường sống khác nhau, những đột biến thích nghi này đã được truyền lại cho các thế hệ tiếp theo. Tuy nhiên, đây không phải là cơ chế duy nhất đóng vai trò chủ đạo; chúng ta cũng đã phát triển bằng cách sửa đổi môi trường xung quanh mình, truyền thông tin này cho thế hệ tiếp theo để nó có thể được xây dựng, tinh chỉnh và cải thiện. Giờ đây, những tiến bộ công nghệ trong kỹ thuật gen có tiềm năng cung cấp

cho chúng ta chìa khóa không chỉ sửa đổi môi trường bên ngoài mà còn tạo ra sự thích nghi di truyền cho chính chúng ta cũng như các loài khác. Bắt đầu với việc phát hiện ra chuỗi DNA lặp đi lặp lại palindromic bí ẩn ở *E. Coli* vào năm 1987, các nhà khoa học bắt đầu điều tra chức năng của hiện tượng có vẻ kỳ quái này. Từ sự tò mò tự nhiên này đã phát triển một cách hoàn toàn mới để sửa đổi DNA: CRISPR/Cas9. Hệ thống này phát triển như một cơ chế tự bảo vệ đối với vi khuẩn về cơ bản là một cách để tự tiêm phòng chống lại virus và plasmid xâm nhập [1, tr.1709-1712]. “Miễn dịch thích ứng” này đã cho phép vi

(*) TS. Trường Đại học Văn Lang, phat.ct@vlu.edu.vn, Mã số: TCKH26-03-2021

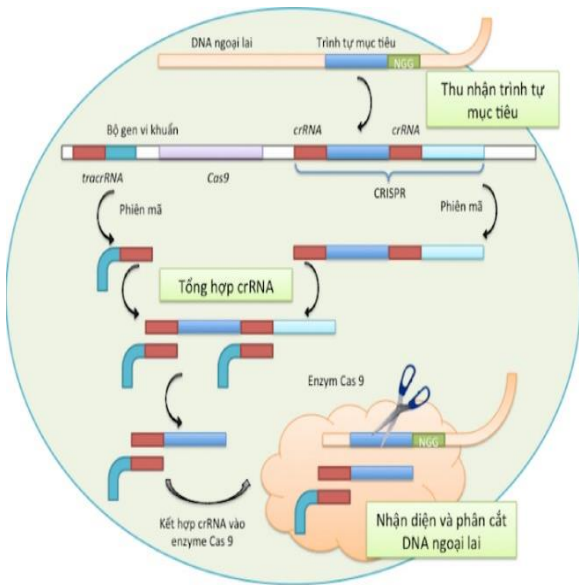
khuẩn và vi khuẩn cổ liên tục trang bị và tự trang bị lại để chống lại những kẻ xâm lược. Tuy nhiên, giờ đây các nhà khoa học đã nắm bắt được bí mật, hệ thống CRISPR/Cas9 đã được trang bị lại thành một công nghệ khả thi hơn trên toàn cầu, theo đó mã di truyền của hầu như bất kỳ loài nào đều có thể được sửa đổi và không chỉ đơn giản là tự bảo vệ. CRISPR/Cas9 đã được vinh danh là quán quân cho “Đột phá của năm” của Tạp chí Science năm 2013, hệ thống CRISPR/Cas9 đang làm một cuộc cách mạng hóa kỹ thuật gen và trang bị cho các nhà khoa học khả năng chỉnh sửa DNA về cơ bản của bất kỳ sinh vật nào. Việc chỉnh sửa gen này có thể mang lại những lợi thế di truyền mà trước đây mất rất nhiều thời gian tiến hóa (và có lẽ là một chút may mắn), các chiến lược lai tạo gen hoặc các công cụ chỉnh sửa bộ gen phức tạp và cồng kềnh hơn có được. Suy đoán về những tiềm năng hiện có về vấn đề này dường như vô hạn tại thời điểm này. Khoa học đã đi đầu trong việc xuất bản một số công trình đột phá khi các nhà khoa học bắt đầu làm sáng tỏ hệ thống CRISPR/Cas9 và phát minh ra những cách mới để sử dụng công cụ này. Hai bài báo đó là công trình nổi tiếng của Feng Zhang và George Church [10, tr.13], đồng thời được công bố và các nghiên cứu đầu tiên cho thấy hệ thống CRISPR/Cas9 có thể thay đổi bộ gen của động vật có vú bao gồm cả con người. Kể từ thời điểm đó, “CRISPR Craze” đã bắt đầu [2, tr.20-24], các nhà khoa học bắt đầu khám phá ngày càng nhiều cách tốt hơn để sử dụng công nghệ này. Các nhà nghiên cứu đã cải tiến từ các nghiên cứu về sự thay đổi DNA riêng lẻ thành các nghiên cứu sử dụng CRISPR/Cas9 như một “*phương pháp sàng lọc hiệu quả, quy mô lớn, mất chức năng ở tế bào động vật có vú*” thay vì sử dụng sàng lọc RNAi [3, tr.9], [4, tr.13]. Người ta hy vọng những nghiên cứu này chỉ là phần nổi của tảng băng chìm cho kỷ nguyên mới của kỹ thuật di truyền chính xác. Việc thao tác và biến đổi DNA bộ

gen từ lâu đã là niềm khao khát của con người. Giấc mơ đó đã gần với hiện thực hơn bao giờ hết khi dự án giải mã bộ gen người hoàn thành năm 2003. Tuy nhiên, làm thế nào để biến đổi, sửa chữa sai hỏng đối với từng gen cụ thể là một thách thức rất lớn đối với các nhà khoa học.

2. NỘI DUNG

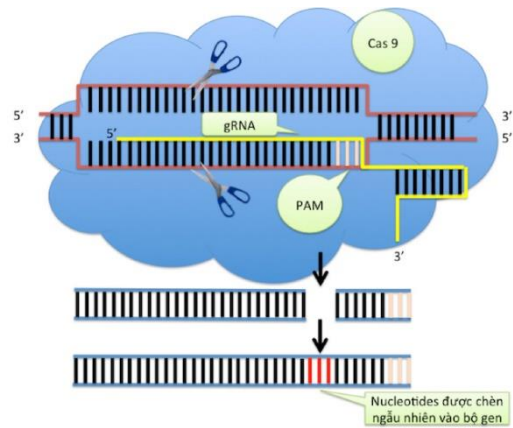
2.1. Giới thiệu về hệ thống CRISPR/Cas9 và cách thức hoạt động của chúng

Trong suốt một thập kỷ qua, các kỹ thuật thao tác DNA bộ gen dựa trên hoạt động của enzyme endonuclease như Zinc Finger Nucleases (ZFNs) và Transcription Activator Like Effector Nuclease (TALEN) được sử dụng rộng rãi [5]. Tuy nhiên, quy trình của các phương pháp này rất phức tạp trong việc thiết kế và đưa vào sử dụng trong thực tế. Tính ứng dụng của các phương pháp này chưa cao, đặc biệt đối với các ứng dụng lâm sàng. Gần đây, nhiều nghiên cứu đã sử dụng thành công kỹ thuật biến đổi DNA bộ gen dựa trên hệ thống CRISPR/Cas [6, tr.440-455], [7, tr.380-384]. Hệ thống này dựa trên cơ chế “miễn dịch” của vi khuẩn chống lại sự xâm nhiễm phân tử DNA ngoại lai từ virus hoặc DNA plasmid [8, tr.2281-2308]. Khác với hệ thống “miễn dịch” dựa trên enzyme cắt giới hạn, hệ thống này dựa trên phân tử RNA để nhận diện và phá hủy DNA ngoại lai. Để bảo vệ vi khuẩn khỏi DNA ngoại lai, vi khuẩn gắn chèn một đoạn ngắn DNA ngoại lai vào DNA bộ gen tại vùng trình tự lặp lại CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat). Vùng trình tự này được phiên mã và được xử lý thành các đoạn RNA ngắn (được gọi là crRNA: CRISPR-derived RNA) các crRNA này sẽ liên kết với endonuclease Cas để nhận diện DNA mục tiêu (thông qua liên kết bổ sung của trình tự crRNA và DNA mục tiêu) và cắt phân tử DNA mục tiêu (thông qua hoạt động endonuclease của Cas) (Hình 1).



Hình 1. Quá trình hoạt động của hệ thống CRISPR/Cas9 ở vi khuẩn chống lại sự xâm nhập của DNA ngoại lai

Từ đó, các nhà khoa học dựa trên cơ sở CRISPR/Cas để thiết kế hệ thống biến đổi DNA bộ gen trên tế bào động vật có vú (bao gồm cả tế bào người). Hệ thống này cơ bản bao gồm hai phần chính là enzyme endonuclease Cas9 và phân tử RNA dẫn đường (gRNA) [9]. Enzyme Cas9 có vai trò phân cắt DNA mục tiêu, trong khi phân tử RNA dẫn đường có vai trò nhận diện DNA mục tiêu chứa trình tự bổ sung với phân tử gRNA. Ngoài ra, trên gRNA còn có sự hiện diện của trình tự PAM (Protospacer-Adjacent Motif). Trình tự PAM có vai trò quan trọng đối với quá trình nhận diện và gắn chuyên biệt của enzyme Cas9 vào trình tự mục tiêu. Đối với enzyme Cas9, trình tự PAM bao gồm 3 nucleotit – NGG, trong đó N là một nucleotit bất kỳ. Bằng việc thiết kế các trình tự gRNA khác nhau (khoảng 20 nucleotit) các nhà khoa học hầu như có thể tác động đến bất kỳ gen nào. Với việc thiết kế đơn giản và hiệu quả cao (chỉ thay đổi trình tự gRNA), kỹ thuật này có thể sử dụng đối với nhiều loại tế bào khác nhau và nhiều gen cùng lúc, CRISPR/Cas9 thực sự là một hệ thống tiềm năng để biến đổi DNA bộ gen (Hình 2).



Hình 2. Cơ chế hoạt động của hệ thống CRISPR/Cas9 trong trường hợp gây biến đổi trình tự gen

2.2 Tiềm năng ứng dụng của hệ thống CRISPR/Cas9

Trình tự CRISPR lần đầu tiên được tìm ra vào năm 1987 do các nghiên cứu của Yoshizumi trong nghiên cứu chức năng đặc biệt của chúng trong hệ miễn dịch của vi khuẩn trong những năm gần đây. Vào năm 2012, hai nhóm nghiên cứu độc lập của Tiến sĩ Emmanuelle Charpentier tại Trường Đại học Umea và Tiến sĩ Jennifer Doudna tại Trường Đại học California, Berkeley đã cùng khám phá ra cơ chế hoạt động của enzyme CAS và CRISPR. Tiến sĩ Craig Mello (người được trao giải thưởng Nobel về Sinh lý học và Y học năm 2006 về công trình nghiên cứu RNAi (RNA interference) đã có những lời bình luận về tương lai hứa hẹn của phương pháp này như sau: “*CRISPR/Cas có ý nghĩa vô cùng to lớn, khả năng của nó vô cùng mạnh mẽ, bởi vì chúng ta về cơ bản có thể thay đổi bộ gen theo bất cứ điều gì chúng ta muốn*”. Mello nhấn mạnh rằng, phương pháp này có thể được sử dụng rộng rãi từ các ứng dụng cho nông nghiệp đến các ứng dụng liệu pháp gen trong điều trị các bệnh lý trên người. Phương pháp này thật sự là một thành công của nghiên cứu khoa học cơ bản và đây cũng là một đột phá to lớn có tác động mạnh mẽ đối với di truyền học phân tử. Kỹ thuật này mạnh đến mức nào? Khả năng kỹ thuật bộ gen chính xác đi kèm với tiềm năng tăng cường sản xuất thực phẩm, khám phá y học và các giải pháp năng

lượng có thể kể đến hiện nay. Các nghiên cứu trong nhiều năm qua đã cho thấy nhiều hứa hẹn trong việc thay đổi khả năng chống nhiễm trùng và bệnh tật của cây trồng, thúc đẩy việc khám phá thuốc, điều chỉnh nguồn nhiên liệu/năng lượng và thậm chí làm sáng tỏ nhiều đóng góp di truyền cơ bản của các bệnh ở người từ bệnh tim đến bệnh tâm thần. Crispr-Cas 9 cho phép các nhà nghiên cứu thực hiện các công việc sau:

1) Gene Knock-out: Sự im lặng của gen bởi CRISPR bắt đầu bằng việc sử dụng một RNA dẫn đường duy nhất (sgRNA-single guide RNA) đến gen đích và bắt đầu làm đứt gãy sợi kép bằng cách sử dụng endonuclease Cas9. Những điểm đứt gãy sau đó được sửa chữa bằng cơ chế sửa chữa DNA nội sinh (NHEJ-the non-homologous endjoining) [13, tr.819-823].

2) Chỉnh sửa gen không cần DNA (DNA-Free Gene Editing): CRISPR có thể sử dụng để chỉnh sửa gen mà không cần sử dụng vector DNA, chỉ yêu cầu các thành phần RNA hoặc protein. Hệ thống chỉnh sửa gen không có DNA có thể là một lựa chọn tốt để tránh khả năng bị thay đổi gen không mong muốn do plasmid tích hợp DNA tại vị trí cắt hoặc tích hợp vector ngẫu nhiên [13, tr.819-823].

3) Chèn gen hoặc “Knock-in”: Sự đứt gãy sợi kép DNA do CRISPR gây ra cũng có thể được sử dụng để tạo ra một gen “kích hoạt” bằng cách khai thác sửa chữa theo hướng tương đồng với tế bào. Sự chèn chính xác của một nguồn DNA khuôn mẫu có thể làm thay đổi vùng mã hóa của gen. Các nghiên cứu trước đây đã chứng minh rằng DNA sợi đơn có thể được sử dụng để tạo các đoạn chèn chính xác bằng hệ thống CRISPR/Cas9 [22].

4) Gen im lặng tạm thời (Transient Gene Silencing): Bằng cách sửa đổi protein Cas9 để nó không thể cắt DNA; CRISPR có thể làm im lặng gen tạm thời hoặc ức chế phiên mã cũng có thể được thực hiện. Cas9 được sửa đổi, định hướng bởi một RNA dẫn đường nhắm vào vùng

khởi động của gen và làm giảm hoạt động phiên mã và biểu hiện gen [13, tr. 819-823].

2.3 Một số ứng dụng của CRISPR/Cas9 trong thực tiễn

Trên thực vật, Xindi Li [11, tr.1-12] tập trung vào việc nhân giống cây cà chua với sự tích lũy lycopene, tập trung về mặt tác động tích cực của trái cây đối với thị giác và chức năng liên quan. Trong nghiên cứu này họ đã sử dụng chiến lược hai chiều: thúc đẩy sinh tổng hợp lycopene và ức chế sự chuyển đổi từ lycopene thành caroten a và b. Sự tích tụ lycopene được thúc đẩy bằng cách hạ gục (Knock-out) một số gen liên kết với con đường chuyển hóa carotenoid. Cuối cùng, năm gen được chọn để chỉnh sửa bộ gen bằng hệ thống CRISPR/Cas9 sử dụng vi khuẩn *Agrobacterium* chuyển đổi qua trung gian *tumefaciens*. Kết quả cho thấy CRISPR/Cas9 là một công nghệ chỉnh sửa bộ gen cho phép gây đột biến mục tiêu hiệu quả cao trong nhiều gen mục tiêu. Đáng ngạc nhiên, hàm lượng lycopene trong quả cà chua được chỉnh sửa bộ gen đã tăng lên khoảng 5,1 lần. Đồng hợp tử đột biến được di truyền ổn định cho các thế hệ tiếp theo. Tóm lại, hệ thống CRISPR/Cas9 có thể được sử dụng để cải thiện đáng kể hàm lượng lycopene trong quả cà chua với những ưu điểm như hiệu quả cao, hiếm gặp đột biến và di truyền ổn định.

Magdalena Klimek-Chodacka [12, tr.575-586] báo cáo việc áp dụng hệ thống CRISPR/Cas9 để gây đột biến gen có mục tiêu khoa học: ghép kênh các vector CRISPR/Cas9 biểu hiện hai RNA dẫn đường (sgRNA) nhằm mục tiêu đến gen flavanone-3-hydroxylase (F3H) của cà rốt. Cách tiếp cận này cho phép so sánh nhanh chóng và trực quan ba gen Cas9 được tối ưu hóa codon và cho thấy rằng gen chính trong việc tạo ra đột biến F3H là gen *AteCas9* được tối ưu hóa codon của *Arabidopsis* với độ chính xác 90%. Việc loại bỏ gen F3H dẫn đến sự đổi màu của calli. Kết quả nhiều đột biến là các Indel nhỏ, nhưng sự mất đoạn nhiễm sắc thể dài 116–119 nucleotide cũng được tạo ra đồng thời

sự phân cắt qua trung gian của hai sgRNA. Kết quả chứng minh sự gây đột biến gen hướng vào vị trí mục tiêu ở cà rốt với CRISPR/Cas9 và tính hữu ích của mô hình nuôi cấy mô sẹo để xác nhận hệ thống chỉnh sửa bộ gen. Bộ gen của cà rốt đã được giải trình tự gần đây, nghiên cứu đã làm sáng tỏ ứng dụng đầy hứa hẹn của các công cụ chỉnh sửa bộ gen để thúc đẩy cơ bản và nghiên cứu dịch chuyển trong cây rau quan trọng này.

CRISPR đã được sử dụng để chỉnh sửa bộ gen của cây lúa. Nhóm nghiên cứu của Ying Wang [14, tr.1333-1343] từ Syngenta Biotechnology Trung Quốc đã thiết kế một số CRISPR –sgRNAs và xóa thành công đoạn gen (DEP1 - the dense and erect panicle 1) ở dòng lúa Indica IR58025B. Cải tiến ở các đặc điểm liên quan đến năng suất chẳng hạn như độ dày bông và độ cứng cây và giảm chiều cao cây và các tính trạng này được quan sát thấy ở cây đột biến khi được tạo ra.

Một nhóm các nhà nghiên cứu khác từ Học viện Khoa học Nông nghiệp Trung Quốc do Yupeng Cai [15] làm trưởng nhóm cũng sử dụng Hệ thống CRISPR/Cas9 để tạo đột biến trên gen *GmFT2a* (một gen tác động đến con đường ra hoa quang kỳ của đậu tương). Các cây đậu tương phát triển ra hoa muộn dẫn đến tăng kích thước sinh dưỡng. Đột biến cũng được phát hiện là di truyền ổn định ở thế hệ sau.

Các nhà nghiên cứu từ phòng thí nghiệm trọng điểm Bắc Kinh về cải tiến mầm rau do Shouwei Tian [16, tr. 399–406] dẫn đầu đã sử dụng CRISPR/Cas9 vào gen mục tiêu *CIPDS* (The Phytoene Desaturase in Watermelon) để đạt được kiểu hình bạch tạng. Đã chỉnh sửa tất cả bộ gen dưa hấu chứa các đột biến trong *CIPDS* và cho thấy đầy đủ kiểu hình khảm bạch tạng. Bài viết này là một bằng chứng về khái niệm sử dụng hệ thống CRISPR/Cas9 trong dưa hấu.

Các nhà nghiên cứu từ Học viện Khoa học Nông nghiệp Trung Quốc và Trung tâm Quốc gia về cải tiến giống cây có múi và Đại học Tây

Nam [17, tr.1509-1519] cũng đã phát triển giống cây có múi kháng bệnh hại trên họ cam quýt nguyên nhân do *Xanthomonas citri* subsp. Thông qua CRISPR/Cas9 chúng tôi đã hướng đến vùng trình tự khởi động của gen *CsLOB1*, vùng trình tự promoter này là nguyên nhân thúc đẩy sự phát triển của bệnh trên cây có múi. Các dòng phát triển sau chọn tạo cho thấy khả năng chống chịu cao đối với nấm bệnh trên cây có múi so với các loại hoang dã.

Phòng thí nghiệm Cold Spring Harbor cùng với một số tổ chức nghiên cứu khác [18, tr.162-168] cũng đã sử dụng CRISPR/Cas9 để tạo đột biến trong việc ức chế quá trình ra hoa (*SP5G-self-pruning5G*) trong cà chua để điều khiển phản ứng quang kỳ. Các đột biến do CRISPR/Cas9 gây ra làm gia tăng tốc độ ra hoa và tăng cường sinh trưởng của cà chua trên đồng ruộng dẫn đến ra hoa và thu hoạch sớm.

Trên động vật, CRISPR/Cas9 cũng đã cho phép tạo ra các động vật phù hợp với mô hình bệnh tật ở người. Nhóm nghiên cứu Yuyu Niu đến từ Phòng thí nghiệm Vân Nam [19, tr.836-843] về nghiên cứu y sinh linh trưởng đã áp dụng CRISPR/Cas9 thông qua liên kết Cas9-mARN và sgRNAs vào phôi ở giai đoạn một tế bào. Nhóm đã tổng hợp thành công CRISPR-edited cynomolgus monkeys đối với chứng rối loạn não mà không thể nghiên cứu đầy đủ trên chuột.

Các nhà nghiên cứu từ Đại học California [20, tr.1526-1533] cũng đã sử dụng CRISPR cho các nghiên cứu trong liệu pháp gen. Sử dụng hệ thống CRISPR/Cas9 trong việc sửa chữa các đột biến liên quan đến bệnh di truyền (β -thalassemia) bằng cách tạo ra các tế bào gốc đa năng cảm ứng (iPSCs) từ bệnh nhân β -thalassemia. Nhóm nghiên cứu đã sử dụng CRISPR/Cas9 để sửa các đột biến hemoglobin beta (HBB) ở người trên các bệnh nhân iPSCs, kết quả cho thấy trong các iPSC được sửa gen đã có sự phục hồi sự biểu hiện gen *HBB* và có thể sử dụng làm liệu pháp gen.

Các nhà khoa học Hoa Kỳ cũng đang nghiên cứu việc sử dụng CRISPR để điều trị cho người bị nhiễm virus gây suy giảm miễn dịch (HIV) [21]. Họ đã sử dụng CRISPR để chỉnh sửa bộ gen HIV từ tế bào miễn dịch (tế bào T) từ một bệnh nhân HIV. Các nhà khoa học phát hiện ra rằng, CRISPR có thể khiến vi rút HIV bị đột biến. Tuy nhiên, vẫn cần nhiều nghiên cứu hơn trước khi CRISPR có thể được sử dụng để điều trị HIV.

3. KẾT LUẬN

CRISPR đã đóng góp một phần rất lớn vào sự gia tăng các nghiên cứu chỉnh sửa bộ gen trong những năm gần đây. CRISPR/Cas9 có các ứng dụng rộng rãi trong cải tiến động thực vật, cũng như trong lĩnh vực y tế. CRISPR/Cas9 là một kỹ thuật tương đối mới với nhiều khám phá và cải tiến cho việc sử dụng hiệu quả trong các ứng dụng rộng hơn đang trong quá trình phát triển.

Trên thực vật, CRISPR/Cas9 nghiên cứu trên những loại cây trồng quan trọng trong nông nghiệp (lúa, đậu nành, dưa hấu, cây trồng họ cam quýt, cà chua...) đã áp dụng thành công từ hệ thống này trên thế giới trong việc cải thiện tính trạng về năng suất, cấu trúc thực vật, tính thẩm mỹ của cây và khả năng kháng bệnh trên cây trồng. Trên động vật, CRISPR/Cas9 cho phép tạo ra các động vật phù hợp mô hình bệnh tật trên người, liệu pháp gen, nghiên cứu sử dụng CRISPR/Cas9 trong việc điều trị cho những bệnh nhân bị nhiễm HIV. Hệ thống CRISPR/Cas9 đã đóng góp một phần rất lớn vào sự gia tăng các nghiên cứu chỉnh sửa bộ gen trong những năm gần đây. Hệ thống có các ứng dụng rộng rãi trong cải tiến động thực vật, cũng như trong lĩnh vực y tế. Là một kỹ thuật tương đối mới, nhiều tiềm năng ứng dụng và đổi mới giúp cho việc sử dụng hiệu quả hơn trong quá trình triển khai.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Rodolphe Barrangou, Christophe Fremaux, H el ene Deveau, Melissa Richards, Patrick Boyaval, Sylvain Moineau, Dennis A. Romero, Philippe Horvath (2007), *CRISPR Provides Acquired Resistance Against Viruses in Prokaryotes*, Science (315) (5819), DOI: 10.1126/science.1138140.
- [2] Le Cong, F. Ann Ran, David Cox, Shuailiang Lin, Robert Barretto, Naomi Habi, Patrick D. Hsu, Xuebing Wu, Wenyan Jiang, Luciano A. Marraffini, Feng Zhang (2013), *Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems*, Science/AAAS.
- [3] Tim Wang, Jenny J. Wei, David M. Sabatini, Eric S. Lander (2013), *Genetic screens in human cells using the CRISPR-Cas9 system*, Science/AAAS.
- [4] Ophir Shalem, Neville E. Sanjana, Ella Hartenian, Xi Shi, David A. Scott, Tarjei S. Mikkelsen, Dirk Heck, Benjamin L. Ebert, David E. Root, John G. Doench, Feng Zhang (2013), *Genome-scale CRISPR-Cas9 knockout screening in human cells*, Science/AAAS.
- [5] Doudna J.A. & Charpentier E. (2014), *Genome editing: The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9*, Science 346 (6213):1258096.
- [6] Platt R.J., et al. (2014), *CRISPR-Cas9 knock-in mice for genome editing and cancer modeling*, Cell 159(2).
- [7] Xue W., et al. (2014), *CRISPR-mediated direct mutation of cancer genes in the mouse liver*, Nature 514(7522).
- [8] Ran F.A., et al. (2013), *Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system*, Nature protocols 8(11).
- [9] Palca J. (2014), *A CRISPR Way To Fix Faulty Genes*, National Public Radio.

- [10] Ophir Shalem, Neville E. Sanjana, Ella Hartenian, Xi Shi, David A. Scott, Tarjei S. Mikkelsen, Dirk Heck, Benjamin L. Ebert, David E. Root, John G. Doench, Feng Zhang (2013), *Genome-scale CRISPR-Cas9 knockout screening in human cells*, Science/AAAS.
- [11] Li X., Wang Y., Chen S., Tian H., Fu D., Zhu B., Luo Y. and Zhu H. (2018), *Lycopene Is Enriched in Tomato Fruit by CRISPR/Cas9-Mediated Multiplex Genome Editing*, Front. Plant Sci.(9)(559), Doi: 10.3389/fpls.2018.00559.
- [12] Magdalena Klimek-Chodacka, Tomasz Oleszkiewicz, Levi G. Lowder, Yiping Qi, Rafal Baranski (2018), *Efficient CRISPR/Cas9-based genome editing in carrot cells*, Plant Cell Reports (2018) 37.
- [13] 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)
- [14] Wang, Y., Gieng, L., Yuan, M., Wei, J., Jin C., Li, M., Yu K., Zhang Y., Jin, H., Wang, E., Chai, Z., Fu, X., Li, X. (2017), *Deletion of a target gene in Indica rice via CRISPR/Cas9*, Plant Cell Reports 36 (8)
- [15] Cai, Y., Chen, L., Liu, X., Guo, C., Sun, S., Wu, C., Jiang, B., Han, T. and Hou, W. (2017), *CRISPR/Cas9-mediated targeted mutagenesis of GmFT2a delays flowering time in soya bean*, Plant Biotechnology Journal.
- [16] Tian, S., Jiang, L., Gao, Q., Zhang, J., Zong, M., Zhang, H., Ren, Y., Guo, S., Gong, G., Liu, F., Xu, Y. (2016), *Efficient CRISPR/Cas9-based gene knockout in watermelon*, Plant Cell Reports 36 (3).
- [17] Peng, A., Chen, S., Lei, T., Xu, L., He, Y., Wu, L., Yao, L. and Zou, X. (2017), *Engineering cankerresistant plants through CRISPR/Cas9-targeted editing of the susceptibility gene CsLOB1 promoter in citrus*. Plant Biotechnology Journal (15). Doi: 10.1111/pbi.12733
- [18] Soyk, S., Müller, N.A., Park, S.J., Schmalenbach, I., Jiang, K., Hayama, R., Zhang, L., Van Eck, J., Jiménez-Gómez, J.M., and Lippman, Z.B. (2017), *Variation in the flowering gene SELF PRUNING 5Gpromotes day-neutrality and early yield in tomato*, Nature Genetics 49 (1).
- [19] Niu Y., Shen B., Cui Y., Chen Y., Wang J., Wang L., Kang Y., Zhao X., Si W., Li W., Xiang AP., Zhou J., Guo X., Bi Y., Si C., Hu B., Dong G., Wang H., Zhou Z., Li T., Tan T., Pu X., Wang F., Ji S., Zhou Q., Huang X., Ji W., Sha J. (2014), *Generation of gene-modified cynomolgus monkey via Cas9/RNA-mediated gene targeting in one-cell embryos*, Cell 156 (4).
- [20] Xie F., Ye L., Chang J.C., Beyer A.I., Wang J., Muench M.O. and Kan Y.W. (2014), *Seamless gene correction of beta-thalassemia mutations in patient-specific iPSCs using CRISPR/Cas9 and piggyback*, Genome Research 24 (9).
- [21] Ekaterina Pak (2015), *CRISPR: A game-changing genetic engineering technique*, Harvard University.
- [22] Dhramacon (2016), *Gene editing*, <http://dhramacon.gelifesciences.com/applications/gene-editing>

Ngày nhận bài: 17-01-2021. Ngày biên tập xong: 03-3-2021. Duyệt đăng: 25-3-2021