

BÀI TỔNG QUAN

CÔNG NGHỆ CAN THIỆP RNA (RNAi) GÂY BẤT HOẠT GEN VÀ TIỀM NĂNG ỨNG DỤNG TO LỚN

Đỗ Năng Vịnh

Viện Di truyền Nông nghiệp

TÓM TẮT

Công nghệ RNAi gây bất hoạt gen là một công nghệ mạnh mẽ và là cơ chế điều khiển hoạt hóa gen phổ biến ở các cơ thể sống nhân thực. RNAi là quá trình làm câm gen một cách đặc thù, nó chỉ làm bất hoạt một gen (gen đích) có những trình tự tương đồng với các tác nhân gây bất hoạt gen (các sợi RNA ngắn khoảng 21 - 27 nucleotide). RNAi có thể tham gia điều khiển hoạt hóa gen ở giai đoạn phiên mã gen (ngăn cản sinh tổng hợp RNA) hoặc ở giai đoạn sau phiên mã (phân hủy mRNA và làm triệt tiêu sinh tổng hợp protein). Các nhà khoa học đã tạo ra những tiến bộ kỹ thuật đáng kinh ngạc trong việc kiểm soát biểu hiện gen và sinh tổng hợp protein ở nhiều loài sinh vật khác nhau với việc sử dụng công nghệ RNAi dạng kẹp tóc (hairpin RNAi). Những đặc điểm cơ bản của công nghệ RNAi là: có tính đặc thù cao, đẩy sức mạnh và hiệu quả (chỉ cần một vài phân tử dsRNA trong một tế bào là đủ để gây bất hoạt gen), rất nhạy cảm (phản ứng nhanh và mạnh đối với các RNA xâm nhiễm như virus), có thể làm bất hoạt gen ở các giai đoạn phát triển khác nhau của cá thể và ở mức độ nhất định còn có thể truyền từ thế hệ này sang thế hệ khác, từ mô này sang mô khác như kiểu "di căn". Trong khuôn khổ bài báo này, chúng tôi phân tích triển vọng to lớn của công nghệ RNAi trong nghiên cứu cơ bản (xác định chức năng gen trong các chương trình genome) và các ứng dụng khác nhau trong lĩnh vực công nghệ sinh học (kiểm soát bệnh virus, tạo cơ thể sống chuyển gen, sản xuất sinh dược và trị liệu đối với các bệnh hiểm nghèo như ung thư, AIDS...).

Từ khóa: RNA interference, hairpin RNA, dsRNA, siRNA, miRNA, TGS (Transcriptional Gene Silencing), PTGS (Post-Transcriptional Gene Silencing)

MỞ ĐẦU

Công nghệ gây bất hoạt gen (RNA interference - RNAi), là một công nghệ mới mạnh mẽ, chỉ cần một vài phân tử RNA sợi kép (dsRNA) trong một tế bào cũng đủ để phân hủy các mRNA của một gen đặc thù. Kết quả thực nghiệm cho thấy công nghệ RNAi có thể cho phép gây bất hoạt gen một cách hiệu quả ở bất kì cơ thể sống nhân thực nào. Theo một số báo cáo thì công nghệ này có thể có hiệu quả hơn công nghệ gen đối nghĩa (antisense) khoảng 1000 lần (Archana, 2003). Dựa trên các thành tựu của chương trình Genomics, trình tự của hầu hết các gen quan trọng đều có thể được xác định, từ đó người ta có thể thiết kế các dsRNA tương đồng để gây bất hoạt mọi gen đích. Công nghệ RNAi có thể tạo ra cuộc cách mạng trong nghiên cứu y sinh và chữa bệnh. Ý nghĩa khoa học và tiềm năng ứng dụng to lớn của công nghệ RNAi đã được rất nhiều tác giả đề cập, họ gọi đây là "một công nghệ đầy uy lực", "cuộc cách mạng RNAi" (Archana, 2003; Ajit, 2007). Ý nghĩa của phát minh công nghệ RNAi đã được đánh giá cao

thông qua việc trao giải thưởng Nobel cho 2 nhà khoa học Mỹ Fire và Mello hồi tháng 10 năm 2006 do họ đã xuất bản công trình nghiên cứu đột phá về cơ chế gây bất hoạt gen bởi RNAi trên tạp chí Nature năm 1998 (Fire *et al.*, 1998).

PHÁT MINH VAI TRÒ CỦA RNA TRONG ĐIỀU KHIỂN HOẠT HÓA CỦA GEN

Sidney Altman và Thomas Cech được trao giải Nobel năm 1989 do phát hiện ra RNA có khả năng hoạt động như một chất xúc tác (catalyst) và các enzyme có bản chất RNA được gọi các ribozyme. Phát minh này mở ra quan niệm hoàn toàn mới về vai trò của RNA. Quan điểm trước đó cho rằng RNA chỉ đóng vai trò trung gian giữa DNA và protein. Các nghiên cứu sau đó cho thấy RNA có thể tự xúc tác để tự sao chép và tổng hợp các phân tử RNA khác. Khám phá đó đã dẫn đến ý tưởng cho rằng RNA là vật liệu di truyền đầu tiên trên trái đất. Hiện nay khoa học đã khẳng định rằng ribosomal RNA xúc tác tạo liên kết peptide giữa các amino acid trong quá trình dịch mã.

Phát hiện sau đó còn cho thấy RNA không chỉ như chất xúc tác, mà còn đóng vai trò quan trọng hơn nữa trong điều khiển biểu hiện gen.

Một số lượng lớn các phân tử RNA nhỏ không đóng vai trò như mã di truyền mà liên kết với protein để tạo ra các phức hợp gọi là ribonucleoprotein (RNP). Các ribonucleoprotein (RNP) ảnh hưởng trực tiếp lên các quá trình phiên mã (transcription), dịch mã (translation), nhân bản DNA và cấu trúc nhiễm sắc thể (ví dụ gây xoắn sợi nhiễm sắc thể).

Trong những năm đầu của thập kỷ 1980, người ta đã phát hiện thấy các phân tử RNA nhỏ (dài khoảng 100 nucleotide) trong vi khuẩn *Escherichia coli* có thể bám vào các trình tự tương đồng trong mRNA và ức chế dịch mã (Mizuno *et al.*, 1984; Nordstrom, Wagner, 1994). Ngày nay, đã biết khoảng 25 trường hợp trình tự RNA đối nghĩa (antisense RNA) điều tiết quá trình dịch mã trong *E. coli* (Gottesman, 2004). Sự điều hòa quá trình dịch mã bởi antisense RNA cũng xảy ra trong sinh vật nhân chuẩn như đã được minh họa năm 1993 cho thấy vai trò của antisense RNA quy định sự phát triển của tuyến trùng *Caenorhabditis elegans* (Lee *et al.*, 1993; Wightman *et al.*, 1993).

Kết quả nghiên cứu vào những năm 1990 cho thấy rằng một gen được biến nạp vào genome (một gen chuyển) có thể kìm hãm biểu hiện của gen tương tự với nó ở trong cây (gen nội sinh), hoặc nhiều copy khác nhau của một gen chuyển trong cây chuyển gen cũng gây nên sự ức chế biểu hiện gen. Hiện tượng này được gọi là đồng kìm hãm gen (Van der Krol *et al.*, 1990; Napoli *et al.*, 1990). Sự bất hoạt của gen có thể xảy ra ở mức độ phiên mã (transcriptional gene silencing TGS) do methyl hóa các trình tự gen (Matzke *et al.*, 1989; Wassenegger *et al.*, 1994) và hậu phiên mã (post-transcriptional gene silencing PTGS) (Napoli *et al.*, 1990; Van der Krol *et al.*, 1990; Smith *et al.*, 1990; de Carvalho *et al.*, 1992; van Blokland *et al.*, 1994). Hiện tượng bất hoạt gen hậu phiên mã (PTGS) tương tự như ở thực vật cũng được phát hiện ở nấm men *Neurospora carassa*, gọi là *gene quelling* (kìm hãm gen) (Romano, Macino, 1992).

Phân tích sự xâm nhiễm của virus trong cây làm sáng tỏ hơn cơ chế bất hoạt gen sau phiên mã PTGS (Lindbo *et al.*, 1993; Dougherty *et al.*, 1995).

PHÁT MINH CỦA ANDREW FIRE VÀ CRAIG MELLO

Fire và Mello đã xuất bản công trình nghiên cứu

đột phá của họ về cơ chế gây bất hoạt gen bởi các RNA ngắn, sợi kép và đặt tên cho công nghệ mới này là RNA interference (RNAi) trong tạp chí *Nature* năm 1998 (Fire *et al.*, 1998). Bởi vì cả sense và antisense RNA đều có thể gây bất hoạt gen, nên nhóm tác giả này cho rằng cơ chế gây bất hoạt gen sẽ không chỉ là sự bắt cặp của antisense RNA đối với mRNA (như ở vi khuẩn) và họ đã đưa ra khái niệm RNA interference cho một cơ chế chưa được biết đến. Fire và Mello (1998) đã trình bày một số kết luận rút ra từ nghiên cứu như sau:

Chỉ có RNA sợi kép (dsRNA) có khả năng gây bất hoạt gen một cách hiệu quả, RNA sợi đơn (sense hoặc antisense RNA) chỉ có khả năng gây bất hoạt yếu hoặc không có khả năng gây bất hoạt gen.

dsRNA gây bất hoạt một cách rất đặc thù, nó chỉ phân hủy một phân tử mRNA có các trình tự tương đồng với nó, các phân tử mRNA khác không bị ảnh hưởng.

Các sợi dsRNA chỉ có khả năng gây bất hoạt gen khi có trình tự tương đồng với mRNA đã thành thực (mature RNA) (tức là mRNA đã ở ngoài tế bào chất và không còn mang các trình tự intron); Các trình tự RNA tương đồng với intron hoặc promoter đều không có tác dụng. Điều này cho thấy dsRNA gây bất hoạt gen ở giai đoạn sau phiên mã (post-transcriptional gene silencing) và xảy ra ở tế bào chất.

Phân tử mRNA đích biến mất, chứng tỏ nó đã bị phân hủy.

Chỉ cần một vài phân tử dsRNA trong một tế bào là đủ để hoàn thành quá trình phân hủy mRNA. Điều này chứng tỏ dsRNA đã được nhân bản và tác dụng như một tác nhân xúc tác.

Tác động của dsRNA có thể được lan rộng từ mô này sang mô khác và thậm chí được truyền tới các thế hệ sau. Điều này chứng tỏ khả năng lan truyền, "di căn" giữa các tế bào.

Fire và Mello cho rằng có thể giải thích hiện tượng "đồng ức chế - co-suppression" đã được phát hiện ở cây trồng (post-transcriptional gene silencing-PTGS) bằng cơ chế RNAi. Họ đã giả thiết rằng dsRNA có thể được cơ thể sống sử dụng để làm bất hoạt các gen trong các quá trình sinh lý và trao đổi chất. Sau công bố của Fire và Mello (1998), RNA interference (RNAi) đã được giới khoa học và công nghiệp đặc biệt quan tâm và được hiểu là cơ chế làm câm gen (gene silencing) hay gây bất hoạt gen một cách đặc thù bởi RNA ngắn có các trình tự tương

đồng với mRNA. Cũng trong năm 1998, nhóm nghiên cứu của Fire và đồng tác giả (Montgomery *et al.*, 1998) đã chứng minh rằng mRNA là mục tiêu của dsRNA (nhận biết qua sợi tương đồng) và mRNA mục tiêu bị phân hủy trước khi dịch mã (trước khi xảy ra tổng hợp protein - before translation). Trong bài báo, họ đã chỉ ra khả năng RNAi có thể là "một chiến lược" của các sinh vật chống lại virus.

Sau đó, hiện tượng RNAi đã được phát hiện ở nhiều sinh vật khác như ruồi giấm, thực vật và các động vật khác nhau (Tuschl *et al.*, 1999). Hàng loạt các công bố tiếp theo đã chứng minh RNAi là cơ chế điều khiển hoạt hóa gen ở hầu hết các sinh vật nhân chuẩn. RNAi có thể gây knock out (làm mất hoàn toàn biểu hiện của một gen) hoặc knock down (làm giảm hoạt hóa gen tùy trường hợp).

CƠ CHẾ HOẠT ĐỘNG CỦA RNAi

Một sợi RNA kép có chiều dài khoảng vài trăm bp (cặp nucleotide) được cắt bởi enzyme dicer + ATP

↓
Các sợi siRNA kép ngắn (small interfering RNA) có từ 21 - 23 bp

↓
Enzym RNA induced silencing complex (RISC) + ATP mở xoắn siRNA kép. siRNA sợi đơn bám vào mRNA đích có trình tự tương đồng với nó và phân hủy mRNA

↓
RNA dependent RNA polymerase (RdRP)

↓
Nhân siRNA mới
(Theo Hutvagner, Zamore, 2002)

Nghiên cứu hóa sinh RNAi ở ruồi giấm cho thấy RNA sợi kép (dsRNA) đã được phân cắt thành các đoạn dsRNA ngắn gồm 21 - 23 nucleotide (Tuschl *et al.*, 1999). Họ cho rằng các phân tử dsRNA ngắn (siRNA - small interfering RNA) đóng vai trò phân hủy mRNA. Sau đó, nhóm Fire và Mello (Parrish *et al.*, 2000) đã xác minh rằng dsRNA dài đã được cắt thành đoạn RNA ngắn (khoảng 25 nucleotide) và tiếp theo siRNA gây ra sự phân hủy mRNA thông qua việc bắt cặp với mRNA.

Quá trình RNAi bao gồm các bước: RNA sợi kép (dsRNA) bị cắt thành những mảnh nhỏ (siRNA) bởi một endonuclease gọi là dicer. Sau đó, sợi kép ngắn lại được mở xoắn để tạo ra 2 sợi đơn ngắn và một trong 2 sợi đó là sợi antisense (sợi đối nghĩa). Sợi antisense ngắn (siRNA) được nạp vào phức hợp RISC và antisense RNA trong phức hợp RISC này bắt cặp với mRNA bằng liên kết tương đồng giữa các base. Tiếp theo RISC sẽ phân hủy mRNA.

Một số enzyme quan trọng tham gia trong quá trình gây bất hoạt gen

Dicer là một ribonuclease III giống như nuclease, được minh họa là chịu trách nhiệm cho quá trình cắt dsRNA thành các đoạn ngắn RNA (Bernstein *et al.*, 2001).

RISC là một tổ hợp phức tạp chứa ít nhất một protein họ argonaute hoạt động như một endonuclease và có vai trò cắt mRNA. Khả năng tương tác của phức RISC với DNA (gen) hoặc với mRNA phụ thuộc vào sự tương đồng giữa siRNA với DNA (gen) hoặc giữa siRNA với mRNA. Khi tương tác với DNA, RISC methyl hóa DNA và biến đổi histone, dẫn đến ngăn cản khởi động phiên mã. Khi tương tác với mRNA, RISC tạo tín hiệu để RNase phân hủy mRNA.

Enzyme tổng hợp RNA trên khuôn RNA (RNA dependent RNA polymerase-RdRp): trong một số sinh vật, đặc biệt là cây trồng, giun tròn, nấm, một RNA- polymerase phụ thuộc RNA (RNA dependent RNA polymerase (RdRP) đóng vai trò quan trọng trong tạo nên các sợi dsRNA, nhân bản các sợi siRNA hoặc miRNA (Cogoni, Macino, 1999).

RNAi còn tham gia kiểm soát hoạt hóa gen ở giai đoạn phiên mã (TGS - transcriptional gene silencing), các phân tử siRNA ngăn cản phiên mã, khống chế số lượng phân tử mRNA. Cơ chế này xảy ra trong nhân và đích chịu tác động là DNA, gen (Matzke *et al.*, 2004; Huetzel *et al.*, 2007). Một vài enzyme tham gia quá trình này đã được phát hiện:

Enzyme methyl hóa DNA (DNA methyltransferase) gắn nhóm methyl vào cytosine (C) ngăn cản quá trình phiên mã.

Enzyme biến đổi các nhóm chức của protein (histone) nằm trong lõi nucleosome. Ví dụ như gắn thêm nhóm methyl hoặc khử nhóm acetyl ở một số amino acid đặc biệt trên protein histone làm thay đổi cấu trúc không gian của sợi nhiễm sắc, làm sợi nhiễm sắc cuộn chặt, ngăn cản phiên mã.

Như vậy, chỉ trong vòng vài năm một lượng thông tin lớn về quá trình RNAi và các enzyme, tổ hợp protein có liên quan đã được tích lũy. Người ta đã chỉ ra rằng ở tế bào của sinh vật nhân thực RNAi là một bộ máy sinh hóa quan trọng đóng vai trò điều hoà hoạt hóa gen và bảo vệ cơ thể (Hannon, 2002; Mello, Conte, 2004; Meister, Tuschl, 2004; Hammond, 2005).

Waterhouse và đồng tác giả (1998) đã phát hiện thấy hiện tượng PTGS ở cây trồng và khả năng kháng virus của chúng được gây ra bởi dsRNA. Hiện tượng bất hoạt gen sau dịch mã trong cây có tương quan với các phân tử RNA nhỏ (mỗi phân tử có chiều dài khoảng 21- 25 nucleotide). Trong quần thể các phân tử RNA nhỏ có cả các trình tự sense và antisense RNA (Hamilton, Baulcombe, 1999).

TÓM TẮT MỘT SỐ ĐẶC TÍNH CỦA CÔNG NGHỆ RNAi

RNA sợi kép là tác nhân gây ra hiện tượng làm bất hoạt gen mạnh hơn là RNA đối nghĩa sợi đơn (single-stranded antisense RNA).

Có tính đặc hiệu rất cao, chỉ làm bất hoạt các mRNA có các trình tự tương đồng.

Có hiệu quả cao và mạnh, chỉ cần một vài phân tử RNA sợi kép là đủ để gây bất hoạt gen của tế bào hoặc virus.

Có thể làm câm gen ở các giai đoạn phát triển khác nhau của cá thể hoặc các bước khác nhau trong quá trình sinh hóa và phân hóa tế bào và mô.

Có thể làm bất hoạt cả nhóm gen

Có thể dịch chuyển từ tế bào này, mô này sang tế bào khác, mô khác trong mỗi cá thể và thậm chí từ thể hệ này sang thể hệ khác

Có thể gây bất hoạt gen ở 2 giai đoạn khác nhau của biểu hiện gen (Giai đoạn phiên mã (TGS) và giai đoạn sau phiên mã (PTGS).

Tầm quan trọng của cơ chế RNAi điều khiển biểu hiện gen và ứng dụng công nghệ RNAi có thể được tổng hợp như sau:

RNAi kìm hãm tổng hợp protein và điều hoà sự phát triển của cơ thể sinh vật

RNA ngắn (short RNA) hay là RNA nhỏ (small RNA) gây bất hoạt gen, viết tắt là siRNA là nhóm các phân tử nucleotide sợi kép có độ dài vào khoảng

21 - 25 nt, đóng vai trò quan trọng trong gây bất hoạt gen, trong đó gồm chức năng phân hủy mRNA, methyl hóa DNA, gây bất hoạt các gen nhảy và gây bất hoạt gen của các virus thâm nhập vào tế bào. Cho đến nay, đa số các siRNA được công bố có nguồn gốc ngoại sinh, tức là có nguồn gốc từ bên ngoài đưa vào tế bào và cơ thể sống qua các con đường khác nhau (bằng tiêm hoặc có nguồn gốc từ các gen RNAi chuyển từ bên ngoài vào cơ thể). SiRNA nội sinh lần đầu tiên được Baulcombe và Hamilton phát hiện là đóng vai trò trong quá trình gây bất hoạt gen sau dịch mã ở thực vật (Hamilton, Baulcombe, 1999). Sau đó, nhóm nghiên cứu của Thomas Tuschl đã công bố phát hiện siRNA gây bất hoạt gen ở động vật (Elbashir *et al.*, 2001). Ngay sau khi phát hiện ra các đoạn RNA ngắn (siRNA) gây ra sự phân hủy mRNA, người ta cũng phát hiện ra một nhóm các RNA ngắn có kích thước tương tự, nhưng là các RNA nội sinh ở tuyến trùng, ruồi giấm, chuột và người. Các phân tử RNA nhỏ, nội sinh này được gọi là microRNA (miRNA) (Lee, Ambros, 2001; Lau *et al.*, 2001; Lagos-Quintana *et al.*, 2001). Thực vật cũng tổng hợp các loại miRNA (Reinhart *et al.*, 2002). Sự khám phá ra miRNA dẫn đến nghiên cứu sâu hơn về bản chất của các phân tử RNA ngắn được tìm thấy ở nhiều loại sinh vật khác. Các phân tử miRNA được tạo thành từ các RNA dạng kẹp tóc theo cơ chế giống như cơ chế RNAi (Murchison, Hannon, 2004; Zamore, Haley, 2005). MiRNA có thể điều khiển sự biểu hiện gen bằng cách bắt cặp với mRNA, dẫn đến sự phân hủy mRNA. Đến nay, đã phát hiện khoảng 500 gen ở người và ở động vật có vú tổng hợp khoảng 500 phân tử miRNA khác nhau có chiều dài khoảng 21 nucleotide và khoảng 30% tổng số gen được điều khiển bởi các phân tử miRNA (miRNAs) (Ajit, 2007). MiRNAs được biết đến với vai trò quan trọng trong suốt quá trình phát triển cá thể của thực vật, tuyến trùng và động vật có vú.

Như vậy, cơ chế điều khiển biểu hiện gen bằng miRNA đã được phát minh như là một hệ điều hành mới, phổ biến, nhạy cảm, đặc thù, chính xác đối với biểu hiện của gen trong các sinh vật nhân thực. Người ta chưa tìm thấy enzyme dicer ở sinh vật tiền nhân, do vậy có thể nói rằng RNAi chỉ có ở sinh vật nhân thực (Morita *et al.*, 2006).

RNAi là cơ chế bảo vệ cơ thể chống lại sự xâm nhiễm của virus

Ở cây trồng các chiến lược phòng chống bệnh virus cơ bản sau đây đang được nghiên cứu sử dụng:

Phòng chống các vector truyền bệnh, chiến lược này có thể phải sử dụng nhiều thuốc bảo vệ thực vật rất tốn kém, gây ô nhiễm môi trường hoặc thông qua sử dụng các gen kháng vector truyền bệnh sẵn có ở cây trồng (ví dụ, như các nguồn gen kháng rầy truyền bệnh lùn lúa cỏ). Tuy vậy, khi dịch bệnh đã bùng phát rất khó kiểm soát.

Tạo các giống kháng bệnh từ các gen kháng virus có sẵn ở cây trồng. Chiến lược này gặp rất nhiều khó khăn do thiếu nguồn gen kháng bệnh. Do vậy, công nghệ tạo giống truyền thống hầu như đang bó tay trong tạo giống cà chua, khoai tây, đu đủ... kháng virus (Sanford, Johnston, 1985).

Sử dụng các gen kháng từ các virus gây bệnh gồm:

a/ Phương pháp sử dụng các gen virus để chuyển vào cây trồng như các gen protein vỏ virus (Sanford, Johnston, 1985; Praveen *et al.*, 2004).

b/ Sử dụng công nghệ gen đối nghĩa (antisense gene) nhằm tạo ra các antisense RNA gây bất hoạt RNA virus (Praveen *et al.*, 2005). Gần đây, các nhà khoa học cho thấy công nghệ RNAi tỏ ra có hiệu quả cao hơn nhiều so với hai phương pháp trên đây (Waterhouse *et al.*, 1998; Waterhouse *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 2000).

Các công trình nghiên cứu công bố năm 1997 cho thấy cây trồng có hàng rào bảo vệ hiệu quả chống lại sự xâm nhiễm của virus dựa trên cơ chế PTGS (Covey *et al.*, 1997; Ratcliff *et al.*, 1997). Bộ máy dsRNAi có thể nhận biết được RNA của virus xâm nhập (hoặc sợi kép RNA bản sao của virus) và ngăn chặn sự xâm nhập của virus bằng cách phân hủy RNA virus. Hệ thống RNAi cũng giữ một vị trí quan trọng tương tự trong hệ thống miễn dịch của động vật có xương sống. Nó nhận biết sự xâm nhập của sinh vật ký sinh, tạo ra các phản ứng gây bất hoạt gen ban đầu và sau đó khuếch đại phản ứng để loại bỏ hoàn toàn các nhân tố bên ngoài xâm nhập.

RNAi bảo đảm sự bền vững của genome thông qua việc làm bất hoạt gen nhảy

Các gen nhảy gây ra rất nhiều các đột biến bất lợi trong cơ thể sống. Nhóm nghiên cứu của Melo và Fire cho rằng trong vùng chứa gen nhảy của genome, cả hai sợi DNA được sao chép, dsRNA được tạo thành và dẫn đến quá trình RNAi loại bỏ những sản phẩm không mong muốn từ gen nhảy. Những phân tử dsRNA ngăn cũng có thể tác động trực tiếp lên sợi nhiễm sắc và ngăn chặn sự dịch mã, đây cũng là một

phương thức khác để làm bất hoạt gen nhảy (Tabara *et al.*, 1999a; 1999b). Plasterk (2002) cho rằng, cơ chế gây bất hoạt gen RNAi tạo nên hệ thống miễn dịch của genome.

RNAi làm tăng độ xoắn (độ đóng đặc) của sợi nhiễm sắc (chromatin) và ngăn chặn quá trình phiên mã (transcription)

Các gen nằm trong vùng heterochromatin (đi nhiễm sắc) của nhiễm sắc thể thường nằm trong trạng thái cuộn chặt, phình ra với mật độ đậm đặc do bị liên kết hoặc phong tỏa bởi các protein thuộc nhóm histone, hoặc các nucleoprotein. Trong trạng thái đó, gen thường im lặng, không biểu hiện (không có khả năng phiên mã) hoặc trạng thái yếu. Gen sẽ chỉ biểu hiện khi thoát khỏi trạng thái này. Nghiên cứu ở thực vật cho thấy đây là hiện tượng bất hoạt gen ở giai đoạn phiên mã (transcriptional gene silencing - TGS). Sau khi phát hiện ra RNAi, người ta thấy rằng bất hoạt gen ở giai đoạn phiên mã cũng xảy ra theo cơ chế tương tự như RNAi (Mette *et al.*, 2000; Sijen *et al.*, 2001; Huettel *et al.*, 2007). Sau đó được biết ở nấm *Schizosaccharomyces pombe* (Hall *et al.*, 2002; Volpe *et al.*, 2002), ở ruồi giấm và động vật có xương sống đều có các cơ chế tương tự RNAi với sự tham gia của các RNA sợi kép ngăn để giữ cho vùng đi nhiễm sắc thể đóng đặc và ngăn chặn quá trình dịch mã. Hiện nay, cơ chế phân tử của quá trình ức chế gen ở mức dịch mã chưa hoàn toàn sáng tỏ. Nhưng vai trò của những biến đổi ở histone, vai trò của protein đặc thù bám dính nhiễm sắc thể (HPI) và sự methyl hóa DNA đều đóng những vai trò quan trọng trong điều khiển gen (Sharp, 2006).

RNAi là công nghệ mạnh mẽ để gây bất hoạt gen một cách đặc hiệu

Công nghệ RNAi ngay lập tức được hàng loạt các công ty và phòng thí nghiệm sử dụng vào các mục đích nghiên cứu chức năng gen. Hiện nay, trên cơ sở các trình tự gen đã có sẵn, các công ty đã thiết kế hàng loạt các gen RNAi có khả năng gây bất hoạt (làm câm) bất kỳ gen đích nào và thông qua đó xác định được chức năng của gen đặc thù. Đây là một phương pháp mới hiệu quả nhất trong các chương trình nghiên cứu hệ gen học chức năng (Functional Genomics) (Dorsett, Tuschl, 2004; Sharp, 2006).

Khả năng RNAi ứng dụng trong y học

RNAi có thể gây bất hoạt một gen đặc thù (gen

đích) bằng nhiều cách khác nhau:

- Bằng tiêm dsRNA vào động vật (Fire *et al.*, 1998)
- Qua đường ruột bằng cách cho tuyến trùng ăn chủng *E. coli* đã được chuyển gen có khả năng sản sinh dsRNA (Timmons, Fire, 1998).
- Bằng gây sốc giun tròn trong dung dịch có chứa dsRNAi (Tabara *et al.*, 1998).
- Bằng chuyển gen RNAi có khả năng sản sinh dsRNA vào tế bào động vật, từ đó dsRNA sẽ được sản sinh ra trong cơ thể để gây bất hoạt gen đích (Tavernarakis *et al.*, 2000).

Từ những kết quả trên các nhà khoa học cho rằng RNAi có thể sử dụng như một phương pháp trị liệu (như được chất đưa từ bên ngoài vào cơ thể hoặc là liệu pháp di truyền - bằng phương pháp chuyển gen vào cơ thể).

Ngay sau các công bố trên, đã xảy ra bùng nổ nghiên cứu ứng dụng công nghệ RNAi trong y học (Dorsett, Tuschl, 2004; Hannon, Rose, 2004; Soutschek *et al.*, 2004). Nhờ vậy, đã xác định RNAi là một quá trình đặc biệt và đã được kiểm chứng để làm ngừng biểu hiện của bất kỳ gen nào ở bất cứ tế bào nào trong tất cả các cơ thể đa bào. Công nghệ này có nhiều triển vọng ứng dụng quan trọng, đặc biệt là chống lại nhiều bệnh nan y một cách hiệu quả như bệnh ung thư và các bệnh lây nhiễm do virus như suy giảm miễn dịch do virus HIV (Hironori *et al.*, 2004).

Các nhà khoa học thuộc Hiệp hội ung thư Mỹ cho biết miRNA đóng vai trò đặc biệt quan trọng trong phát triển bệnh ung thư (<http://www.aacr.org/home/public-media/for-the-media/fact-sheets/cancer-concepts/rnai.aspx>). Các báo cáo khoa học của Học viện Massachusetts (MIT) và Đại học Harvard năm 2005 cho biết, các miRNA đóng vai trò quyết định đối với sinh trưởng, sinh sản và phân hóa tế bào ở người. Khi có những thay đổi trong sinh tổng hợp miRNA sẽ dẫn đến các bệnh ung thư khác nhau. Họ cho biết có thể dễ dàng phân biệt tế bào ung thư với tế bào lành và phân biệt được các bệnh ung thư khác nhau thông qua sự khác biệt giữa các miRNA. Hiện nay, đã tìm thấy trên 200 các miRNA khác nhau ở các bệnh ung thư khác nhau. Khả năng điều trị bệnh ung thư bằng công nghệ RNAi là rất lớn (<http://www.news.harvard.edu/gazett/2005/>). Trường Đại học Purdue đã thiết kế các hạt nano (phải có kích thước nhỏ hơn 100 nm để lọt qua màng tế bào) mang các đoạn RNA ngắn nhằm đưa RNAi vào tế bào ung

thư với mục đích làm bất hoạt các gen gây u bướu (oncogenes).

Công ty Benitec Ltd. (BLT) là công ty đầu tiên sử dụng RNAi trong các tế bào người và đã được cấp các bản quyền công nghệ tại Mỹ và Anh có giá trị từ năm 1998. Đó là một kỹ thuật có tính cách mạng để làm ngừng biểu hiện gen ở bất kỳ tế bào nào thông qua RNAi. Bản quyền 6,573,099 tại Mỹ là “Các gen cấu trúc trong quá trình làm ngừng hay giảm biểu hiện của gen đích” và bản quyền số 2353282 tại Anh được đăng ký tên là “Điều khiển biểu hiện gen”. Hai bằng chứng nhận này là những công bố mới nhất trên thế giới về tác động của RNAi trong tế bào người.

Ứng dụng RNAi trong lĩnh vực nông nghiệp

CSIRO, Úc là một trong các trung tâm nghiên cứu ứng dụng công nghệ RNAi số một trên thế giới trong 10 năm qua và đã đăng kí ít nhất 9 phát minh trong lĩnh vực này. CSIRO đã đăng kí bản quyền công nghệ RNA kẹp tóc ở Úc, Trung Quốc, New Zealand (No. 760041). CSIRO đã phát minh RNA kẹp tóc ở thực vật - một công nghệ đầy sức mạnh cho tạo giống cây trồng mới. Đặc biệt, họ đã phát hiện rằng nếu phân công đơn sợi (không có cặp đôi) trong cấu trúc của RNA kẹp tóc có nguồn gốc là một intron thì hiệu quả gây bất hoạt gen sẽ cao hơn rất nhiều (Smith *et al.*, 2000; Wang, Waterhouse, 2002; Wesley *et al.*, 2001). Công nghệ RNA kẹp tóc của CSIRO là một công nghệ hiệu quả nhất để gây bất hoạt gen ở thực vật và hiện đang được ứng dụng ở động vật. CSIRO đã thiết kế hàng loạt các vector chuyển gen gọi là RNAi vector có khả năng gây bất hoạt rất nhiều gen khác nhau (Helliwell, Waterhouse, 2003; Helliwell, Waterhouse, 2005). Công nghệ RNA kẹp tóc có thể sử dụng để tạo các giống cây trồng chuyển gen với các tính trạng mong muốn mà các công nghệ khác bất lực. Họ đã ứng dụng công nghệ để tạo hạt cây có dầu với thành phần dầu béo tốt hơn cho con người và cải thiện tính chất tinh bột ở lúa mì. Họ đã tạo được giống cho hạt có hàm lượng dầu béo oleic cao và làm mất các acid béo giàu cholesterol. Một giống có hàm lượng dầu béo stearate cao giúp tạo ra dầu béo margarine với chất lượng dinh dưỡng tốt hơn (Liu *et al.*, 2002). Việc cải thiện tính chất tinh bột ở cây hòa thảo có thể mang lại lợi ích cho sức khỏe thông qua việc làm giảm bệnh đái đường type 2.

CSIRO dẫn đầu việc ứng dụng RNAi trong tạo giống kháng bệnh virus ở thực vật (Waterhouse *et*

al., 1998; Waterhouse *et al.*, 1999; Waterhouse *et al.*, 2001). Họ đã tạo được giống lúa mạch có khả năng miễn dịch đối với bệnh virus gây vàng lụi ở lúa mạch và các loài thuộc họ hòa thảo như lúa (Barley Yellow Dwarf Virus - BYDV) (Wang *et al.*, 2000).

Tiến sĩ Van Hulten ở CSIRO cho biết, hàng năm bệnh đốm trắng ở tôm gây tổn thất khoảng 1 tỷ đô la cho công nghiệp nuôi tôm toàn cầu. Công nghệ RNAi là một trong các cơ chế tự bảo vệ của tế bào chống lại các virus. Khi tế bào phát hiện một sợi RNA kép, nó sẽ sản sinh ra một loại enzyme gọi là dicer để cắt đứt sợi RNA kép đó, do vậy tiêu diệt virus thâm nhập. Nhóm của Hulten đã xác định được gen chịu trách nhiệm tổng hợp enzyme dicer ở tôm. Nhờ đó họ cho rằng tôm cũng có cơ chế bảo vệ nhờ RNAi. Tiến sĩ Tim Doran thuộc CSIRO cho biết họ đang sử dụng công nghệ RNAi để xử lý nhiều loại bệnh khác nhau ở vật nuôi trong đó có bệnh cúm gà là một bệnh đang lây lan mạnh ở châu Á và bệnh Marek ở gia cầm. Bệnh Marek là bệnh gây ra bởi một loại virus tấn công hệ miễn dịch ở gà (tương tự virus HIV ở người), làm cho gà dễ nhiễm các bệnh dịch khác. Bệnh này làm tổn thất khoảng 2,0 tỷ đô la cho ngành gia cầm toàn cầu. Tiến sĩ Jef Hammond thuộc CSIRO đang nghiên cứu kỹ thuật RNAi để kiểm soát bệnh lở mồm long móng (Marvin, Teresa de los Santos, 2005). Người ta hy vọng RNAi có thể sử dụng cho nhiều loài động vật để kiểm soát các bệnh virus khác nhau. Xử lý bằng RNAi có thể làm ngừng quá trình sinh sản của virus ở bất kỳ động vật nào, làm giảm sự lây truyền của nó.

Hiện RNAi là một công nghệ chủ lực trong chiến lược công nghệ sinh học của CSIRO. CSIRO đang phát triển các sản phẩm RNAi cho bảo vệ thực vật, vật nuôi, thủy sản và phát triển các ngành công nghiệp dược và công nghệ sinh học.

Các nhà khoa học Brazil gần đây đã công bố tạo được giống đậu (*Phaseolus vulgaris* L.) kháng được bệnh xoắn lá do virus *Bean golden mosaic virus* (BGMV) gây ra bằng chuyển gen RNAi gây bất hoạt gen AC1 của virus này (Bonfim *et al.*, 2007). Virus này cùng nhóm với virus gây bệnh xoắn lá cà chua, tác hại nghiêm trọng đối với sản xuất.

Nhóm nghiên cứu của Keerti Rathore thuộc Viện Nghiên cứu Genomics và Công nghệ sinh học cây trồng thuộc Đại học Texas đã sử dụng kỹ thuật RNAi để loại trừ độc tố ở hạt bông (Gonesan *et al.*, 2006). Họ đã thiết kế gen tổng hợp RNA sợi kép có khả năng gây bất hoạt gen có vai trò quyết định đối với sinh tổng hợp độc tố gossypol ở hạt bông.

Họ đã sử dụng một promoter đặc thù mô hạt ở cây bông. Do vậy, gen RNAi chỉ gây bất hoạt sinh tổng hợp gossypol ở hạt. Vì thế, độc tố này vẫn được tổng hợp bình thường ở các mô khác của cây bông. Gossypol thông thường được tổng hợp ở bất kỳ mô nào của cây và chất này có chức năng bảo vệ cây chống lại côn trùng, nấm, khuẩn gây bệnh. Đây là một ví dụ về lợi ích của công nghệ RNAi có khả năng làm cải thiện chất lượng thức ăn, hoặc làm cho một loại hạt hoặc cây độc trở nên ăn được thông qua gây bất hoạt các gen tạo độc tố. Cây bông chuyển gen RNAi hầu như không có gossypol trong hạt, trong khi hàm lượng chất này giữ nguyên ở các bộ phận khác của cây. Gossypol là một độc tố đối với gan và tim người và các động vật khác, trong đó có gà. Nếu nuôi gà bằng hạt bông trong một tuần gà sẽ chết. Hạt bông về tiềm năng sẽ rất bổ dưỡng nếu loại trừ được độc tố: 22 - 23% hạt là protein chất lượng cao. Người ta tính rằng với sản lượng bông sản xuất như hiện nay, hàng năm hạt bông (44 triệu tấn) có thể cung ứng đủ lượng protein cho 500,0 triệu người (9,4 triệu tấn protein, 50 g/người ngày). (<http://www.sciencenews.org/articles/20061125/fob1.asp>). Bông chỉ là một loại cây, trong khi có rất nhiều loại cây khác có hạt không thể ăn được do có chứa độc tố. Bằng kỹ thuật RNAi có thể làm cho chúng ăn được. Công nghệ RNAi có ưu việt hơn hẳn so với đột biến. Năm 1954, bằng phương pháp đột biến người ta cũng đã tạo được giống bông mất khả năng tổng hợp gossypol. Tuy vậy, chất độc này cũng đã biến mất ở các bộ phận khác của cây, do đó làm cho cây bông đột biến bị sâu bệnh tấn công. Trong khi công nghệ RNAi với promoter có tính đặc thù mô cao, nó chỉ gây bất hoạt gen tổng hợp gossypol ở trong hạt, trong khi gen này vẫn hoạt động bình thường ở các bộ phận khác của cây bông (Gonesan *et al.*, 2006). Công trình của nhóm Keerti Rathore đã gây một tiếng vang chấn động trên diễn đàn khoa học về ứng dụng của công nghệ RNAi.

KẾT LUẬN

Phát minh RNAi - một cơ chế điều khiển hoạt hóa gen mới, đầy sức mạnh, mang tính đặc thù cao và tính phổ biến rộng ở sinh vật nhân thực (eucaryote). RNAi được xem là một phát minh quan trọng nhất của các khoa học về sự sống trong thời gian gần đây. RNAi có thể làm ngừng hoàn toàn (knock out) hoặc làm giảm (knock down) biểu hiện của gen đặc thù. Hoạt động của cơ chế RNAi làm cho cơ thể phân hóa và phát triển bình thường, có

al., 1998; Waterhouse *et al.*, 1999; Waterhouse *et al.*, 2001). Họ đã tạo được giống lúa mạch có khả năng miễn dịch đối với bệnh virus gây vàng lụi ở lúa mạch và các loài thuộc họ hòa thảo như lúa (Barley Yellow Dwarf Virus - BYDV) (Wang *et al.*, 2000).

Tiến sĩ Van Hulten ở CSIRO cho biết, hàng năm bệnh đốm trắng ở tôm gây tổn thất khoảng 1 tỷ đô la cho công nghiệp nuôi tôm toàn cầu. Công nghệ RNAi là một trong các cơ chế tự bảo vệ của tế bào chống lại các virus. Khi tế bào phát hiện một sợi RNA kép, nó sẽ sản sinh ra một loại enzyme gọi là dicer để cắt đứt sợi RNA kép đó, do vậy tiêu diệt virut thâm nhập. Nhóm của Hulten đã xác định được gen chịu trách nhiệm tổng hợp enzyme dicer ở tôm. Nhờ đó họ cho rằng tôm cũng có cơ chế bảo vệ nhờ RNAi. Tiến sĩ Tim Doran thuộc CSIRO cho biết họ đang sử dụng công nghệ RNAi để xử lý nhiều loại bệnh khác nhau ở vật nuôi trong đó có bệnh cúm gà là một bệnh đang lây lan mạnh ở châu Á và bệnh Marek ở gia cầm. Bệnh Marek là bệnh gây ra bởi một loại virus tấn công hệ miễn dịch ở gà (tương tự virus HIV ở người), làm cho gà dễ nhiễm các bệnh dịch khác. Bệnh này làm tổn thất khoảng 2,0 tỷ đô la cho ngành gia cầm toàn cầu. Tiến sĩ Jef Hammond thuộc CSIRO đang nghiên cứu kỹ thuật RNAi để kiểm soát bệnh lở mồm long móng (Marvin, Teresa de los Santos, 2005). Người ta hy vọng RNAi có thể sử dụng cho nhiều loài động vật để kiểm soát các bệnh virus khác nhau. Xử lý bằng RNAi có thể làm ngừng quá trình sinh sản của virus ở bất kỳ động vật nào, làm giảm sự lây truyền của nó.

Hiện RNAi là một công nghệ chủ lực trong chiến lược công nghệ sinh học của CSIRO. CSIRO đang phát triển các sản phẩm RNAi cho bảo vệ thực vật, vật nuôi, thủy sản và phát triển các ngành công nghiệp dược và công nghệ sinh học.

Các nhà khoa học Brazil gần đây đã công bố tạo được giống đậu (*Phaseolus vulgaris* L.) kháng được bệnh xoắn lá do virus *Bean golden mosaic virus* (BGMV) gây ra bằng chuyển gen RNAi gây bất hoạt gen AC1 của virus này (Bonfim *et al.*, 2007). Virus này cùng nhóm với virus gây bệnh xoắn lá cà chua, tác hại nghiêm trọng đối với sản xuất.

Nhóm nghiên cứu của Keerti Rathore thuộc Viện Nghiên cứu Genomics và Công nghệ sinh học cây trồng thuộc Đại học Texas đã sử dụng kỹ thuật RNAi để loại trừ độc tố ở hạt bông (Gonesan *et al.*, 2006). Họ đã thiết kế gen tổng hợp RNA sợi kép có khả năng gây bất hoạt gen có vai trò quyết định đối với sinh tổng hợp độc tố gossypol ở hạt bông.

Họ đã sử dụng một promoter đặc thù mô hạt ở cây bông. Do vậy, gen RNAi chỉ gây bất hoạt sinh tổng hợp gossypol ở hạt. Vì thế, độc tố này vẫn được tổng hợp bình thường ở các mô khác của cây bông. Gossypol thông thường được tổng hợp ở bất kỳ mô nào của cây và chất này có chức năng bảo vệ cây chống lại côn trùng, nấm, khuẩn gây bệnh. Đây là một ví dụ về lợi ích của công nghệ RNAi có khả năng làm cải thiện chất lượng thức ăn, hoặc làm cho một loại hạt hoặc cây độc trở nên ăn được thông qua gây bất hoạt các gen tạo độc tố. Cây bông chuyển gen RNAi hầu như không có gossypol trong hạt, trong khi hàm lượng chất này giữ nguyên ở các bộ phận khác của cây. Gossypol là một độc tố đối với gan và tim người và các động vật khác, trong đó có gà. Nếu nuôi gà bằng hạt bông trong một tuần gà sẽ chết. Hạt bông về tiềm năng sẽ rất bổ dưỡng nếu loại trừ được độc tố: 22 - 23% hạt là protein chất lượng cao. Người ta tính rằng với sản lượng bông sản xuất như hiện nay, hàng năm hạt bông (44 triệu tấn) có thể cung ứng đủ lượng protein cho 500,0 triệu người (9,4 triệu tấn protein, 50 g/người ngày). (<http://www.sciencenews.org/articles/20061125/fob1.asp>). Bông chỉ là một loại cây, trong khi có rất nhiều loại cây khác có hạt không thể ăn được do có chứa độc tố. Bằng kỹ thuật RNAi có thể làm cho chúng ăn được. Công nghệ RNAi có ưu việt hơn hẳn so với đột biến. Năm 1954, bằng phương pháp đột biến người ta cũng đã tạo được giống bông mất khả năng tổng hợp gossypol. Tuy vậy, chất độc này cũng đã biến mất ở các bộ phận khác của cây, do đó làm cho cây bông đột biến bị sâu bệnh tấn công. Trong khi công nghệ RNAi với promoter có tính đặc thù mô cao, nó chỉ gây bất hoạt gen tổng hợp gossypol ở trong hạt, trong khi gen này vẫn hoạt động bình thường ở các bộ phận khác của cây bông (Gonesan *et al.*, 2006). Công trình của nhóm Keerti Rathore đã gây một tiếng vang chấn động trên diễn đàn khoa học về ứng dụng của công nghệ RNAi.

KẾT LUẬN

Phát minh RNAi - một cơ chế điều khiển hoạt hóa gen mới, đầy sức mạnh, mang tính đặc thù cao và tính phổ biến rộng ở sinh vật nhân thực (eucaryote). RNAi được xem là một phát minh quan trọng nhất của các khoa học về sự sống trong thời gian gần đây. RNAi có thể làm ngừng hoàn toàn (knock out) hoặc làm giảm (knock down) biểu hiện của gen đặc thù. Hoạt động của cơ chế RNAi làm cho cơ thể phân hóa và phát triển bình thường, có

khả năng miễn dịch đối với các tác nhân gây bệnh nhất là virus. Các bất thường trong hệ thống miRNA sẽ dẫn đến bệnh lý như các bệnh ung thư...

Hiện nay, người ta đã chứng minh được rằng với các siRNA và các RNAi gen, con người có thể can thiệp vào hoạt hóa của các gen quan trọng như:

- Gây bất hoạt các gen âm tính (không có lợi cho con người) như các gen sinh độc tố, sinh chất gây béo phì, sinh ung thư, ... các gen của virus hoặc các ký sinh gây bệnh.

- Làm tăng cường hoạt hóa của các gen hữu ích (tổng hợp các hoạt chất mong muốn) thông qua gây bất hoạt các gen ở các nhánh sinh hóa có cùng tiền chất (như đã tạo được giống cho hạt có hàm lượng dầu béo oleic cao bằng cách làm mất các acid béo giàu cholesterol).

- Can thiệp RNAi còn là phương pháp trị liệu bằng sinh dược (biopharmaceuticals) hoặc là một liệu pháp di truyền (thông qua chuyển gen).

Việc tạo ra RNAi là hoàn toàn có thể chủ động được theo sơ đồ sau: Xác định trình tự của gen đích (gen cần phải làm bất hoạt); thiết kế các vectors mang gen RNAi tương ứng; chuyển gen vào cơ thể sống; cơ thể sản sinh dsRNAi gây bất hoạt các gen của chính cơ thể sống đó/ hoặc các gen của virus gây bệnh hoặc để sản xuất ra các siRNA trị liệu.

Ngoài ra, công nghệ RNAi với khả năng gây bất hoạt gen đang được sử dụng như một công cụ chủ yếu để xác định chức năng của gen trong các chương trình hệ gen học chức năng (Functional Genomics).

REFERENCES

Archana T (2003) RNA interference revolution. www.ejb.org/content/vol16/issue1/full/1.

Ajit K (2007) Silent defense: Micro-RNA directed defense against HIV-1 replication. *Retrovirology* 4: 26-30.

Bernstein E, Caudy AA, Hammond SM, Hannon GJ (2001) Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* 409: 363-366.

Cogoni C, Macino G (1999) Gene silencing in *Neurospora crassa* requires a protein homologous to RNA-dependent RNA polymerase. *Nature* 399: 166-169.

Covey S, Al-Kaff N, Longara A, Turner D (1997) Plants combat infection by gene silencing. *Nature* 385: 781-782.

de Carvalho F, Gheyson G, Kushnir S, van Montagu M, Inzo D (1992) Suppression of beta-1,3-glucanase transgene expression in homozygous plants. *EMBO J* 11: 2595-2602.318.

Dorsett Y, Tuschl T (2004) siRNAs: Applications in functional genomics and potential as therapeutics. *Nature Rev* 3: 318-329.

Dougherty WG, Parks TD (1995) Transgenes and suppression: telling us something new. *Curr Opin Cell Biol* 7: 399-405.

Elbashir S, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschl T (2001) Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 411: 494-498.

Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC (1998) Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391: 806-811.

Ganesan S, LeAnne MC, Lorraine P, Robert DS, Keerti SR (2006) Engineering cottonseed for use in human nutrition by tissue-specific reduction of toxic gossypol. *Proc Nat Acad Sci USA* 103(48): 18054-18059.

Gottesman S (2004) The small RNA regulators of *Escherichia coli*: Roles and mechanisms. *Ann Rev Microbiol* 58: 303-328.

Hall IM, Shankaranarayana GD, Noma K, Ayoub N, Cohen A, Grewal SI (2002) Establishment and maintenance of a heterochromatic domain. *Science* 297: 2232-2237.

Hamilton AJ, Baulcombe DC (1999) A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science* 286: 950-952.

Hammond SM (2005) Dicing and slicing. The core machinery of the RNA interference pathway. *FEBS Lett* 579: 5822-5829.

Hanley-Bowdoin L, Settlage SB, Orozco BM, Nagar S, Robertson D (1999) Geminiviruses: models for plant DNA replication, transcription and cell cycle regulation. *Crit Rev Plant Sci* 18: 71-106.

Hannon GJ (2002) RNA interference. *Nature* 418: 244-251.

Hannon GJ, Rose JJ (2004) Unlocking the potential of the human genome with RNA interference. *Nature* 431: 371-378.

Helliwell C, Waterhouse P (2005) Constructs and methods for hairpin RNA-mediated gene silencing in plants. In: *Methods in Enzymology*, Volume 392, RNA Interference, Engelke DR, Rossi J (eds): 24-35

- Helliwell C, Waterhouse P (2003) Constructs and methods for high-throughput gene silencing in plants. *Methods* 30: 289-295.
- Hironori N, Tamako I, Hiroyuki M, Takashi O, Mari K, Takao M (2004) Expression of small hairpin RNA by lentivirus-based vector confers efficient and stable gene-suppression of HIV-1 on human cells including primary non-dividing cells. *Microb Infect* 6: 76-85.
- Huetzel B, Kanno T, Daxinger L, Bucher E, van der Winden J, Matzke AJM, Matzke MA (2007) RNA-directed DNA methylation mediated by DRD1 and Pol IVb: a versatile pathway for transcriptional gene silencing in plants. *Biochim Biophys Acta* 1769: 358-374.
- Kenny B, Josias CF, Elsa OPLN, Erica AM, Francisco JLA (2007) RNAi-Mediated Resistance to Bean golden mosaic virus in Genetically Engineered Common Bean (*Phaseolus vulgaris*). In: "Molecular Plant - Microbe Interactions", Ed. Jonathan Walton, Aps Press 20(6): 717-726.
- Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W, Tuschl T (2001) Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science* 294: 853-858.
- Lau NC, Lim LP, Weinstein EG, Bartel DP (2001) An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 294: 858-862.
- Lee RC, Ambros V (2001) An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 294: 862-864.
- Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V (1993) The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 75: 843-854.
- Lindbo J, Silva-Rosales L, Proebsting W, Dougherty W (1993) Induction of a highly specific antiviral state in transgenic plants: Implications for regulation of gene expression and virus resistance. *Plant Cell* 5: 1749-1759.
- Liu Q, Singh SP, Green AG (2002) High-stearic and high-oleic cotton seed oils produced by hairpin RNA-mediated post-transcriptional gene silencing. *Plant Physiol* 129: 1732-1743.
- Marvin JG, Teresa de los Santos (2005) Rapid control of foot-and-mouth disease outbreaks: is RNAi a possible solution. *Trends Immunol* 26: 65-68.
- Matzke M, Aufsatz W, Kanno T, Daxinger L, Papp I, Mette MF, Matzke AJ (2004) Genetic analysis of RNA-mediated transcriptional gene silencing. *Biochim Biophys Acta* 1677(1-3): 129-141.
- Matzke M, Primig M, Trnovsky J, Matzke A (1989) Reversible methylation and inactivation of marker genes in sequentially transformed plants. *EMBO J* 8: 643-649.
- Meister G, Tuschl T (2004) Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. *Nature* 431: 343-349.
- Mello CC, Conte JD (2004) Revealing the world of RNA interference. *Nature* 431: 338-342.
- Mette MF, Aufsatz W, van der Winden J, Matzke M, Matzke A (2000) Transcriptional gene silencing and promoter methylation triggered by double stranded RNA. *EMBO J* 19: 5194-5201.
- Mizuno T, Chou MY, Inouye M (1984) A unique mechanism regulating gene expression: Translational inhibition by a complementary RNA transcript (micRNA). *Proc Natl Acad Sci USA* 81: 1966-1970.
- Montgomery MK, Xu S, Fire A (1998) RNA as target of double-stranded RNA-mediated genetic interference in *Caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 15502-15507.
- Murchison EP, Hannon GJ (2004) miRNAs on the move: miRNA biogenesis and the RNAi machinery. *Curr Opin Cell Biol* 16: 223-229.
- Napoli C, Lemieux C, Jorgensen R (1990) Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into petunia results in reversible co-suppression of homologous genes *in trans*. *Plant Cell* 2: 279-289.
- Nordstrum K, Wagner EG (1994) Kinetic aspects of control of plasmid replication by antisense RNA. *Trends Biochem Sci* 19: 294-300.
- Morita T, Mochizuki Y, Aiba H (2006) Translational repression is sufficient for gene silencing by bacterial small noncoding RNAs in the absence of mRNA destruction". *Proc Natl Acad Sci USA* 103(13): 4858-4863.
- Park YD, Moscone EA, Iglesias VA, Vaucheret H, Matzke AJM and Matzke MA (1996) Gene silencing mediated by promoter homology occurs at the level of transcription and results in meiotically heritable alterations in methylation and gene activity. *Plant J* 9: 183-194.
- Parrish S, Fleenor J, Xu S, Mello C, Fire A (2000) Functional anatomy of a dsRNA trigger: Differential requirements for the two trigger strands in RNA interference. *Mol Cell* 6: 1077-1087.
- Plasterk RHA (2002) RNA Silencing: The Genome's Immune System. *Science* 296: 1263-1265.

- Praveen S, Dasgupta A, Varma A (2004) Phylogenetic Analysis and Homologies of the Replicase of Tomato Leaf Curl Geminiviruses: Implications for Obtaining Pathogen Derived Resistance. *Vir Gene* 28(1): 197-201.
- Praveen S, Mishra AK, Dasgupta A (2005) Antisense suppression of replicase gene expression recovers tomato plants from leaf curl infection. *Plant Sci* 168: 1011-1014.
- Ratcliff F, Harrison B, Baulcombe D (1997) A similarity between viral defence and gene silencing in plants. *Science* 276: 1558-1560.
- Reinhart BJ, Weinstein EG, Rhodes MW, Bartel B, Bartel DP (2002) MicroRNAs in plants. *Genes & Dev* 16: 1616-1626.
- Romano N, Macino G (1992) Quelling: Transient inactivation of gene expression in *Neurospora crassa* by transformation with homologous sequences. *Mol Microbiol* 6: 3343-3353.
- Sanford JC, Johnston SA (1985) The concept of parasite-derived resistance - deriving resistance genes from the parasite's own genome. *J Theor Biol* 113: 395-405.
- Sharp PA (2006) The Biology of Short RNAs. In: *RNA World*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Sijen T, Vijn I, Rebocho A, van Blokland R, Roelofs D (2001) Transcriptional and posttranscriptional gene silencing are mechanistically related. *Curr Biol* 11: 436-440.
- Smith CJS, Watson CF, Bird CR, Ray JSW, Grierson D (1990) Expression of a truncated tomato polygalacturonase gene inhibits expression of the endogenous gene in transgenic plants. *Mol Gen Genet* 224: 447-481.
- Smith NA, Singh SP, Wang MB, Stoutjesdijk P, Green A, Waterhouse PM (2000) Total silencing by intron-spliced hairpin RNAs. *Nature* 407: 319-320.
- Soutschek J (2004) Therapeutic silencing of an endogenous gene by systematic administration of modified siRNAs. *Nature* 432: 173-178.
- Tabara H, Grishok A, Mello CC (1998) RNAi in *C. elegans*: Soaking in the genome sequence. *Science* 282: 430-431
- Tabara H, Sarkissian M, Kelly WG, Fleenor J, Grishok A, Timmons L, Fire A, Mello CC (1999a) Mut-7 of *C. elegans*, required for transposon silencing and RNA interference, is a homolog of Werner syndrome helicase and RNase D. *Cell* 99: 133-141.
- Tabara H, Sarkissian M, Kelly WG, Fleenor J, Grishok A, Timmons L, Fire A, Mello CC (1999b) The rde-1 gene, RNA interference and transposon silencing in *C. elegans*. *Cell* 99: 123-132.
- Tavernarakis N, Wang SL, Doroskov M, Ryazonov A, Driscoll M (2000) Heritable and inducible genetic interference by double stranded RNA encoded by transgenes. *Nat Genet* 24: 180-183.
- Timmons L, Fire A (1998) Specific interference by ingested dsRNA. *Nature* 395: 854.
- Tuschl T, Zamore PD, Lehmann R, Bartel DP, Sharp PA (1999) Targeted mRNA degradation by double-stranded RNA in vitro. *Genes & Dev* 13: 3191-3197.
- van Blokland K, van der Geest N, Mol J, Kooter J (1994) Transgene-mediated suppression of chalcone synthase expression in *Petunia hybrida* results from an increase in RNA turnover. *Plant J* 6: 861-877.
- van der Krol A, Mur LBM, Mol JNM, Stuitje AR (1990) Flavonoid genes in petunia: Addition of a limited number of gene copies may lead to a suppression of gene expression. *Plant Cell* 2: 291-299.
- Volpe TA, Kidner C, Hall IM, Teng G, Grewal SI, Martienssen RA (2002) Regulation of heterochromatic silencing and histone H3 lysine-9 methylation by RNAi. *Science* 297: 1833-1837.
- Wang MB, Waterhouse PM (2000) High-efficiency silencing of a β -glucuronidase gene in rice is correlated with repetitive transgene structure but independent of DNA methylation. *Plant Mol Biol* 43: 67-82.
- Wang, MB, Waterhouse PM (2002) Application of gene silencing in plants. *Curr Opin Plant Biol* 5: 146-150.
- Wassenegger M, Heimes S, Riedel L, Songer H (1994) RNA-directed de novo methylation of genomic sequences in plants. *Cell* 76: 567-576.
- Waterhouse PM, Smith NA, Wang MB (1999) Virus resistance and gene silencing: killing the messenger. *Trends Plant Sci* 4: 452-457.
- Waterhouse PM, Wang MB, Lough T (2001) Gene silencing as an adaptive defence against viruses. *Nature* 411: 834-842.
- Waterhouse, PM, Graham, MW, Wang, MB (1998) Virus resistance and gene silencing in plants can be induced by simultaneous expression of sense and antisense RNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 13959-13964.
- Wesley SV, Helliwell C, Wang MB, Waterhouse P (2004) Posttranscriptional Gene Silencing in Plants.

Chapter 7, in *RNA Interference*, Jonatha M Gott, ed, Humana Press New Jersey USA.

lin-14 by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell* 75: 855-862.

Wightman B, Ha I, Ruvkun G (1993) Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene

Zamore PD, Haley B (2005) Ribo-genome: The Big World of Small RNAs. *Science* 309: 1519-1524.

THE RNAi GENE SILENCING TECHNOLOGY AND ITS GREAT POTENTIAL FOR APPLICATIONS

Do Nang Vinh*

Institute of Agricultural Genetics

SUMMARY

RNA interference (RNAi) is powerful technology for gene silencing and wide-spread mechanism of gene regulation in Eucaryotes. RNAi gene silencing is a sequence specific transcriptional gene regulation (preventing the RNA synthesis) and post transcriptional RNA degradation (degrading mRNA and preventing protein synthesis), in which double stranded RNA is the interfering agent. Scientists have made striking progress in blocking gene expression and protein synthesis by using double stranded hairpin RNA in different living forms. The main features of RNAi are characterized as follows: High degree of specific, highly potent and effective (only a few dsRNA molecules per cell are required for effective interference), very sensitive (actively and quick response to intervening RNA like virus genes), silencing can be introduced at different developmental stages and may pass through generations. The great perspectives of RNAi technology for basic researches (identifying gene function) and for different aspects of applications (virus disease control, development of transgenic organisms, biopharmaceuticals and therapies for dangerous diseases like cancers, AIDS, *etc.*) have been analysed.

Keywords: *RNA interference, hairpin RNA, dsRNA, siRNA, miRNA, TGS (Transcriptional Gene Silencing), PTGS (Post- Transcriptional Gene Silencing)*

* Author for correspondence: Tel: 84-4-7544711; Fax: 84-4-7543196; E-mail: donangvinh@netnam.vn