

SINH VẬT BÁN TỔNG HỢP: Bước tiến mới trong nghiên cứu y học hiện đại

Chu Đức Hà¹, Nguyễn Thị Minh Nguyệt¹, Lê Hùng Lĩnh¹, Vòng Bình Long²

¹Viện Di truyền Nông nghiệp, Viện Khoa học Nông nghiệp Việt Nam

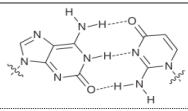
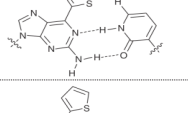
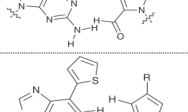
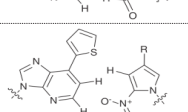
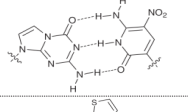
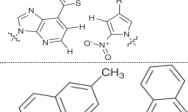
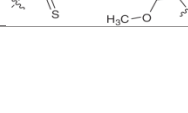

²Khoa Sinh học - Công nghệ sinh học, Trường Đại học Khoa học tự nhiên, Đại học Quốc gia TP Hồ Chí Minh

Mới đây, một dạng sinh vật bán tổng hợp (semisynthetic organism - SSO) với vật chất di truyền chứa 6 loại nucleotide, với 2 nucleotide chứa cặp base nhân tạo (unnatural base pair - UBP) lần đầu tiên được công bố [1, 2]. Về cấu trúc, 2 nucleotide bán tổng hợp này chứa 2 dạng UBP mới, đặt tên là ‘X’ và ‘Y’ không có liên kết với nhau bằng liên kết hydro. Với sự tồn tại của 6 nucleotide đã phá vỡ quy luật tự nhiên về số lượng axit amin có thể được tạo ra [3]. Điều này đặc biệt có ý nghĩa trong việc tổng hợp một số protein hoàn toàn mới cho mục đích điều trị bệnh cũng như tạo ra một dạng sống chưa từng xuất hiện trong lịch sử tiến hóa.

Lịch sử nghiên cứu về UBP

Mặc dù vi khuẩn bán tổng hợp chỉ mới được ghi nhận gần đây, nhưng nghiên cứu phát triển các dạng nucleotide tổng hợp với những UBP đã được tiến hành bởi các nhà hóa học từ hơn 50 năm về trước. Kể từ khi Watson và Crick khám phá ra cấu trúc chuỗi xoắn kép của ADN với sự bắt cặp bổ sung giữa 4 loại nucleotide dựa trên liên kết hydro vào năm 1953, rất nhiều nỗ lực của các nhà khoa học đã được ghi nhận trong việc cố gắng tạo ra dạng UBP trong tự nhiên. Ý tưởng này lần đầu được nhà hóa học Alexander Rich đề xuất với cặp UBP giữa 6-amino-2-ketopurine (isoguanine - isoG) và 2-amino-4-ketopyrimidine (isocytosine - isoC). Năm 1989, nhóm nghiên cứu của Benner đã tổng hợp thành công isoG và isoC, qua đó thử nghiệm tái bản và phiên mã *in vitro* giữa isoG≡isoC, tạo ra một loại axit amin mới

Bảng 1. Một số dạng UBP phổ biến đã được tổng hợp gần đây.

Tên UBP	Cấu trúc	Đặc điểm	Tài liệu tham khảo
isoG-isoC		isoC kém ổn định về mặt hóa học và isoG có thể bị tautome hóa	[6]
s-y		Kém đặc hiệu khi bắt cặp với s trong tái bản và phiên mã	[7]
s-Pa		Tương tác không cần liên kết hydro	[8]
Ds-Pa		Đòi hỏi bổ sung nguyên liệu λ-amidotriphosphates cho PCR	[9]
Ds-Px		Px kém ổn định về mặt hóa học trong điều kiện cơ bản	[10]
P-Z		Khả năng bắt cặp phụ thuộc vào điều kiện pH	[11]
Dss-Px		Px kém ổn định về mặt hóa học trong điều kiện cơ bản	[12]
5SICS-NaM		Bền với nhiệt độ	[2]

(3-iodotyrosine). Cặp isoG≡isoC có thể được sử dụng để xác định trình tự ADN mong muốn thông qua kỹ thuật multiplex realtime PCR, tuy nhiên ứng dụng của các UBPs này vẫn rất hạn chế do khả năng khuếch đại [4]. Một dạng UBPs khác cũng được quan tâm là 4-methylbenzimidazole (Z) và 2,4-difluoro-toluene (F). Hai UBPs kỳ nước này có thể liên kết với nhau thông qua bổ sung về mặt hình dạng. Sau này, một số UBPs khác cũng đã được tổng hợp, nhằm tạo ra các axit amin mới cho các mục đích nghiên cứu khác nhau (bảng 1). Trong đó, 5SICS-NaM là cặp UBPs được giới thiệu năm 2009 với rất nhiều ưu điểm nổi trội [5].

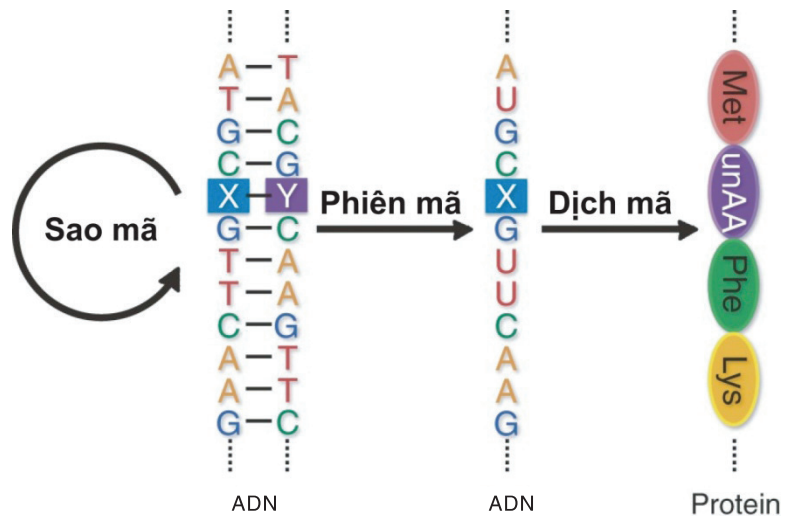
Với những UBPs được tổng hợp ra, mục tiêu của các nhà khoa học là tìm cách đưa UBPs vào trong hệ thống *in vivo*, từ đó kiểm soát được sự nhân rộng mã di truyền mới. Trong giai đoạn trước đây, vấn đề đặt ra là UBPs không thể được tổng hợp theo cơ chế tự nhiên mà phải bổ sung các thành phần để duy trì sự hoạt động của gen nhân tạo trong tế bào. Hơn nữa, các dòng tế bào chứa UBPs thường sinh trưởng rất yếu, trong khi việc bổ sung vật liệu cần thiết để UBPs được tái bản và dịch mã lại gây ra những tác dụng phụ cho tế bào [13]. Như vậy, rõ ràng là cần thiết phải phát triển cho các UBPs một cơ chế tái bản, phiên mã và dịch mã riêng để chúng có thể duy trì qua các thế hệ.

Bước tiến mới trong việc duy trì base nhân tạo ổn định trên sinh vật bản tổng hợp

Cột mốc quan trọng đánh dấu sự tạo ra SSO đầu tiên

là năm 2014, khi vi khuẩn *E. coli* sinh trưởng trong môi trường bổ sung dNaMTP, d5SICSTP và plasmid mã hóa protein vận chuyển nucleotide triphosphate transporter (NTT) từ *Phacodactylum tricorutum* [13]. Như đã đề cập ở trên, dạng SSO này sinh trưởng rất yếu, bởi lẽ các NTT gây ra những tác dụng phụ làm ức chế quá trình sống của SSO, trong khi các enzyme phosphatase trong *E. coli* lại phân giải nguồn dNaMTP và d5SICSTP bổ sung trong môi trường. Hơn nữa, ngay cả khi nuôi trong điều kiện tối ưu, các dạng SSO này cũng không thể duy trì được UBPs ổn định và lâu dài.

vào *E. coli* C41. Kết quả cho thấy biểu hiện của *PtNTT2*(66-575) giảm xuống, làm giảm độc tính cho SSO, tuy nhiên điều này cũng đồng nghĩa với việc giảm khả năng hấp thụ nguyên liệu cho việc tổng hợp UBPs trong tế bào. Tiếp theo, biểu hiện của *PtNTT2*(66-575) ở *E. coli* BL21 với các promoter P_{lacI} , P_{blac} và P_{lac} từ plasmid pSC, P_{bla} , P_{lac} , P_{lacUV5} , P_{H207} , P_{λ} , P_{tac} và P_{N25} từ locus *lacZYA*. Trong đó, dòng *E. coli* chứa *PtNTT2*(66-575) với promoter P_{lacUV5} được xác định có mức độ sinh trưởng mạnh, lượng $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-dATP}$ hấp thụ nhiều hơn. Trong quá trình nghiên cứu, các nhà khoa học đã thay đổi cấu trúc 5SICS, tạo thành



Hình 1. Khả năng lưu trữ thông tin di truyền mang base nhân tạo của SSO.

Kế thừa các kết quả thu được trước đó, nhóm nghiên cứu của Zhang đã cải biến lại NTT, sử dụng một dạng UBPs tối ưu hơn để hình thành một dạng SSO có khả năng lưu trữ thông tin di truyền với 6 ký tự ổn định hơn [2]. Đầu tiên, phân tử NTT cải biến bằng cách loại bỏ trình tự axit amin từ 1 đến 65, *PtNTT2*(66-575) được đưa

TPT3 - tên đầy đủ là [(2-deoxy-β-D-erythropentofuranosyl)-thieno[3,4]pyridine-2-thione]. Gần đây, TPT3 đã được phân tích hoạt tính quang hóa học [14]. Cặp UBPs mới, NaM-TPT3 có thể đạt hiệu quả tái bản cao hơn NaM-5SICS trong điều kiện *in vitro*. So sánh trên 2 môi trường

bổ sung dNaMTP/d5SICSTP và dNaMTP-dTPT3TP, lượng UBP duy trì dNaM-dTPT3 cao hơn hẳn so với dNaM-d5SICS, chúng tỏ NaM-TPT3 cũng tỏ ra hiệu quả hơn ở SSO so với NaM-5SICS [2]. Cuối cùng, nhóm nghiên cứu tiếp tục sử dụng công nghệ CRISPR-Cas9 [15] như một phản ứng miễn dịch tự nhiên của vi khuẩn để xem xét lượng tế bào SSO chứa ADN mang UBP. Kết quả cho thấy, các tế bào SSO có thể giữ được dNaM-dTPT3 trong ít nhất 60 lần phân bào. Điều này đã mở ra giả thuyết vững chắc rằng UBP có thể được lưu trữ vô hạn trong SSO, từ đó có thể biểu hiện ra các phân tử protein mong muốn. Đây được xem là một trong những bước tiến rất quan trọng trong việc tạo ra một dạng sống với vật chất di truyền hoàn toàn nhân tạo.

Định hướng trong tương lai

Mặc dù những nghiên cứu này mới chỉ khởi đầu trên các tế bào SSO đơn lẻ, nhưng đầy hứa hẹn cho bước đưa UBP vào dạng cơ thể sinh vật phức tạp hơn. Ngày nay, các UBP mặc dù vẫn chưa thực sự hoàn thiện nhưng có lẽ sẽ được áp dụng rất phổ biến trong y học điều trị. Một khi làm chủ được kỹ thuật để tái bản, phiên mã, dịch mã một cách hoàn chỉnh cho UBP trong tế bào, SSO có thể sinh tổng hợp được các phân tử protein với thành phần axit amin mới mã hóa bởi UBP. Mặt khác, một số UBP cũng có thể được sử dụng trong phát hiện ADN mong muốn, phục vụ cho công tác kiểm định và chẩn đoán [16]. Với những UBP như hiện nay, số lượng axit amin được dịch mã có thể lên đến 172. Đây rõ ràng là một tương lai

rất tươi sáng cho việc tổng hợp các hợp chất phức tạp dùng trong y học. Gần đây, các phương pháp chẩn đoán và phát hiện cũng đã bắt đầu ứng dụng UBP. Cụ thể, một số dạng UBP, như Px và isoG có thể mang chất nhuộm được tích hợp vào nhóm chức của phân tử cần xác định. Bên cạnh đó, Dss-Px có khả năng gắn huỳnh quang cũng được sử dụng trong các hệ thống hình ảnh và chẩn đoán.

Đây được xem là một bước tiến lớn cho loài người trong việc tạo ra một dạng sống mới chưa từng xuất hiện trong lịch sử sinh giới. Một số ý kiến cho rằng đây có thể là một khám phá làm đảo lộn tự nhiên. Tuy nhiên, có một số điều cần phải nắm bắt một cách rõ ràng. Đó là các SSO vẫn chưa thể sống một cách độc lập mà chúng vẫn phải được cung cấp nguồn nguyên liệu cần thiết cho các quá trình liên quan đến UBP. Bên cạnh đó, nếu ngừng cung cấp dNaMTP, d5SICSTP và NTT, NaM và 5SICS sẽ biết mất khỏi genome qua một vài lần tái bản của vật chất di truyền ✎

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1] Y. Zhang, et al. (2017), "A semi-synthetic organism that stores and retrieves increased genetic information", *Nature*, **551**, pp.644-647.

[2] Y. Zhang, B.M. Lamb, A.W. Feldman, A.X. Zhou, T. Laverne, L. Li, F.E. Romesberg (2017), "A semisynthetic organism engineered for the stable expansion of the genetic alphabet", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **114**, pp.1317.

[3] D.A. Malyshev, F.E. Romesberg (2015), "The expanded genetic alphabet", *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **54**, pp.11930-11944.

[4] I. Hirao, M. Kimoto (2012), "Unnatural base pair systems toward the expansion of the genetic alphabet in the central dogma", *Proc. Jpn. Acad. Ser. B Phys. Biol. Sci.*, **88**,

pp.345-367.

[5] D.A. Malyshev, et al. (2009), "PCR with an expanded genetic alphabet", *J. Am. Chem. Soc.*, **131**, pp.14620-14621.

[6] C. Switzer, S.E. Moroney, S.A. Benner (1989), "Enzymatic incorporation of a new base pair into DNA and RNA", *J. Am. Chem. Soc.*, **111**, pp.8322-8323.

[7] T. Ohtsuki, et al. (2001), "Unnatural base pairs for specific transcription", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, pp.4922-4925.

[8] Y. Hikida, et al. (2010), "Site-specific fluorescent probing of RNA molecules by unnatural base-pair transcription for local structural conformation analysis", *Nat. Protoc.*, **5**, pp.1312-1323.

[9] I. Hirao, et al. (2006), "An unnatural hydrophobic base pair system: Site-specific incorporation of nucleotide analogs into DNA and RNA", *Nat. Methods*, **3**, pp.729-735.

[10] M. Kimoto, et al. (2009), "An unnatural base pair system for efficient PCR amplification and functionalization of DNA molecules", *Nucleic Acids Res.*, **37**, pp.e14.

[11] Z. Yang, et al. (2007), "Enzymatic incorporation of a third nucleobase pair", *Nucleic Acids. Res.*, **35**, pp.4238-4249.

[12] M. Kimoto, T. Mitsui, S. Yokoyama, I. Hirao (2010), "A unique fluorescent base analogue for the expansion of the genetic alphabet", *J. Am. Chem. Soc.*, **132**, pp.4988-4989.

[13] D.A. Malyshev, et al. (2014), "A semi-synthetic organism with an expanded genetic alphabet", *Nature*, **509**, pp.385-388.

[14] B. Ashwood, S. Jockusch, C.E. Crespo Hernandez (2017), "Photochemical reactivity of dTPT3: A crucial nucleobase derivative in the development of semisynthetic organisms", *J. Phys. Chem. Lett.*, **8**, pp.2387-2392.

[15] F.A. Ran, et al. (2013), "Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system", *Nat. Protoc.*, **8**, pp.2281-2308.

[16] M. Kimoto, et al. (2011), "Unnatural base pair systems for sensing and diagnostic applications", *Expert Rev. Mol. Diagn.*, **11**, pp.321-331.