Xây dựng quy trình knockout gen *keap1a* bằng kỹ thuật CRISPR-Cas9 trên cá ngựa vằn (*Danio rerio*) tại Việt Nam

Nguyễn Thành Vũ*, Trần Ngọc Uyên, Bùi Thị Thu Vân, Lê Lưu Phương Hạnh, Nguyễn Hoàng Thụy Vy

Phòng Công nghệ Sinh học Thủy sản, Trung tâm Công nghệ Sinh học TP Hồ Chí Minh, phường Trung Mỹ Tây, TP Hồ Chí Minh, Việt Nam

Ngày nhận bài 26/8/2024; ngày chuyển phản biện 30/8/2024; ngày nhận phản biện 22/9/2024; ngày chấp nhận đăng 25/9/2024

Tóm tắt:

Đây là nghiên cứu đầu tiên tại Việt Nam thực hiện quy trình knockout gen *keap1a* ở cá ngựa vằn (*Danio rerio*) bằng kỹ thuật CRISPR-Cas9 nhằm nghiên cứu hệ thống Keap1-Nrf2. Hệ thống này đóng vai trò quan trọng trong bảo vệ tế bào khỏi stress oxy hóa. Cá ngựa vằn có hai paralog *keap1* (*keap1a* và *keap1b*), là mô hình lý tưởng cho nghiên cứu này. Quy trình thực hiện bằng cách thiết kế RNA dẫn đường (gRNA) đặc hiệu nhắm vào *keap1a* và vi tiêm phức hợp gRNA/Cas9 vào phôi cá giai đoạn một tế bào. Kết quả cho thấy, cá knockout *keap1a* phát triển bình thường nhưng có khả năng chống chịu stress oxy hóa tốt hơn khi tiếp xúc H_2O_2, thể hiện qua tỷ lệ sống cao hơn và tăng biểu hiện của các gen đích của Nrf2 (*gstp1* và *prdx1*). Nghiên cứu này không chỉ cung cấp một quy trình knockout gen hiệu quả ở cá ngựa vằn mà còn mở ra những triển vọng mới trong việc sử dụng kỹ thuật CRISPR-Cas9 để nghiên cứu chức năng gen và ứng dụng trong nuôi trồng thủy sản tại Việt Nam, đồng thời mở đường cho các nghiên cứu sâu hơn về vai trò của hệ thống Keap1-Nrf2 trong việc duy trì cân bằng oxy hóa khử và thích nghi với stress môi trường ở cá.

Từ khóa: **cá ngựa vằn, CRISPR-Cas9, *keap1a*, knockout gen, stress oxy hóa.**

Chỉ số phân loại: **1.6, 4.6**

Establishment of a CRISPR-Cas9-mediated *keap1a* knockout protocol in zebrafish (*Danio rerio*) for implementation in Vietnam

Thanh Vu Nguyen*, Ngoc Uyen Tran, Thi Thu Van Bui, Luu Phuong Hanh Le, Hoang Thuy Vy Nguyen

Division of Aquaculture Biotechnology, Biotechnology Centre of Ho Chi Minh City, Trung My Tay Ward, Ho Chi Minh City, Vietnam

Received 26 August 2024; revised 22 September 2024; accepted 25 September 2024

Abstract:

This is the first study in Vietnam to generate Kelch-like ECH-associated protein 1a (*keap1a*) knockout zebrafish (*Danio rerio*) using clustered regularly interspaced short palindromic repeats-CRISPR associated protein 9 (CRISPR-Cas9) technology, aiming to investigate the Keap1-Nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Keap1-Nrf2) system. This system plays a key role in protecting cells against oxidative stress zebrafish, possessing two *keap1* paralogs (*keap1a* and *keap1b*), serve as an ideal model for this investigation. The experimental procedure involved designing a specific guide RNA (gRNA) targeting the *keap1a* gene and microinjecting the gRNA/Cas9 complex into single-cell stage zebrafish embryos. The *keap1a* knockout fish exhibited normal development but demonstrated enhanced resistance to oxidative stress upon hydrogen peroxide (H_2O_2) exposure, as indicated by higher survival rates and elevated expression of Nrf2 target genes (Glutathione S-transferase pi 1, *gstp1* and Peroxiredoxin 1, *prdx1*). This study not only establishes an efficient gene knockout protocol in zebrafish but also opens new avenues for CRISPR-Cas9 applications in gene function research and aquaculture in Vietnam, while facilitating further investigations into the Keap1-Nrf2 system's role in maintaining redox homeostasis and adapting to environmental stress in fish.

Keywords: **CRISPR-Cas9, gene knockout, *keap1a*, oxidative stress, zebrafish.**

Classification numbers: **1.6, 4.6**

*Tác giả liên hệ: Email: nthanhvu.shtp@tphcm.gov.vn

1. Đặt vấn đề

Cá ngựa vằn (*Danio rerio*) với những ưu điểm nổi bật như kích thước nhỏ, thời gian thế hệ ngắn và phôi trong suốt dễ quan sát, đã khẳng định vị thế là một sinh vật mô hình quan trọng trong nghiên cứu sinh học và y học [1, 2]. Loài cá này đã được ứng dụng rộng rãi trong nhiều lĩnh vực, từ sinh học phát triển, di truyền học đến độc chất học, cho phép các nhà khoa học khám phá những cơ chế phức tạp của sự sống và bệnh tật.

Đặc biệt, cá ngựa vằn sở hữu hai loại Keap1 (Kelch-like ECH-associated protein 1) là Keap1a và Keap1b [3-5], mang đến cơ hội độc đáo để nghiên cứu sâu hơn về vai trò của hệ thống Keap1-Nrf2, một hệ thống quan trọng trong việc duy trì cân bằng nội môi oxy hóa của tế bào. Keap1 hoạt động như một cảm biến stress oxy hóa, tương tác với yếu tố phiên mã Nrf2 (Nuclear factor erythroid 2-related factor 2). Trong điều kiện bình thường, Keap1 ức chế Nrf2, ngăn chặn sự biểu hiện của các gen chống oxy hóa. Tuy nhiên, khi tế bào gặp stress oxy hóa, Keap1 giải phóng Nrf2, cho phép Nrf2 di chuyển vào nhân và kích hoạt biểu hiện của các gen bảo vệ tế bào [6]. Sự cân bằng giữa Keap1 và Nrf2 đóng vai trò then chốt trong việc bảo vệ cơ thể chống lại các tác nhân gây hại từ môi trường và quá trình lão hóa [7, 8].

Sự ra đời của công nghệ CRISPR-Cas9 đã tạo nên một cuộc cách mạng trong lĩnh vực chỉnh sửa gen, cung cấp một công cụ mạnh mẽ để tạo ra các đột biến chính xác và hiệu quả trên nhiều sinh vật, bao gồm cả cá ngựa vằn [3, 9]. Hệ thống CRISPR-Cas9 hoạt động dựa trên sự kết hợp giữa RNA hướng dẫn (gRNA) và enzyme Cas9. gRNA dẫn đường cho Cas9 đến vị trí đích trên DNA, nơi Cas9 tạo ra đứt gãy sợi đôi. Tế bào sau đó sẽ sửa chữa đứt gãy này, thường thông qua cơ chế nối các đầu không tương đồng (NHEJ) hoặc tái tổ hợp tương đồng (HDR), dẫn đến việc tạo ra các đột biến khác nhau như: đột biến mất đoạn (một số nucleotide bị mất đi); đột biến thêm đoạn (một số nucleotide được thêm vào); đột biến thay thế (một nucleotide được thay thế bằng một nucleotide khác); sắp xếp lại trình tự (các nucleotide bị sắp xếp lại vị trí) [10]. Tính đơn giản, hiệu quả và khả năng ứng dụng rộng rãi của CRISPR-Cas9 đã nhanh chóng đưa công nghệ này vượt lên trên các phương pháp chỉnh sửa gen trước đây như TALENs (Transcription activator-like effector nucleases) và ZFNs (Zinc finger nucleases) [11].

Trong lĩnh vực nuôi trồng thủy sản, CRISPR-Cas9 hứa hẹn mang lại những cải tiến đáng kể về năng suất, chất lượng và khả năng chống chịu bệnh của cá nuôi [12-14]. Nghiên cứu này tập trung vào việc xây dựng quy trình knockout gen *keap1a* trên cá ngựa vằn bằng kỹ thuật CRISPR-Cas9. Việc loại bỏ gen *keap1a* được kỳ vọng sẽ kích hoạt Nrf2 một cách liên tục, từ đó tăng cường khả năng chống chịu stress oxy hóa của cá. Đây là một bước tiến quan trọng trong việc ứng dụng công nghệ CRISPR-Cas9 vào nghiên cứu cơ bản và ứng dụng tại Việt Nam, đặc biệt là trong lĩnh vực nuôi trồng thủy sản, góp phần tạo ra những giống cá mới có khả năng thích nghi tốt hơn với điều kiện môi trường và tăng cường sức khỏe.

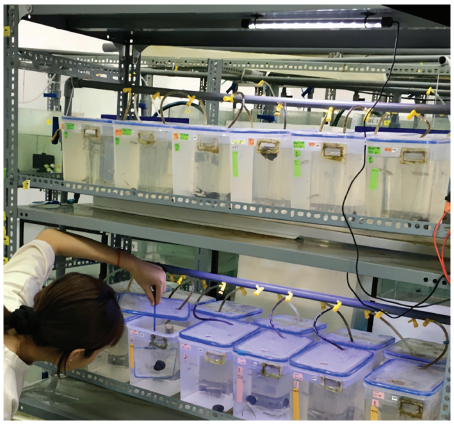
2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu

2.1.1. Đối tượng nghiên cứu

Dòng cá ngựa vằn hoang dại (WT), có nguồn gốc tại phòng thí nghiệm của giáo sư Makoto Kobayashi (Đại học Tsukuba, Nhật Bản), được chăm sóc và nuôi lớn tại Trung tâm Công nghệ Sinh học TP Hồ Chí Minh, Việt Nam. Dòng cá ngựa vằn WT được sử dụng để loại bỏ gen *keap1a* bằng phương pháp CRISPR-Cas9.

Cá ngựa vằn trưởng thành được nuôi trong các bể nhựa thể tích 4-5 lít, tại Phòng Công nghệ Sinh học Thủy sản, Trung tâm Công nghệ Sinh học TP Hồ Chí Minh, Việt Nam (hình 1). Nhiệt độ phòng nuôi cá 26-28^{o}C, mỗi ngày cho ăn 2 lần vào lúc 9 giờ sáng bằng thức ăn bột dành cho cá và 15 giờ chiều bằng ấu trùng Artermia. Hệ thống nước nuôi cá được lọc khử clo và được vệ sinh, thay bông lọc mỗi tuần 1 lần.



Hình 1. Hệ thống nuôi cá ngựa vằn tại Trung tâm Công nghệ Sinh học TP Hồ Chí Minh được thiết lập năm 2022.

2.1.2. Thiết bị và hóa chất

Nghiên cứu này được thực hiện với sự hỗ trợ của các thiết bị chuyên dụng, bao gồm: máy PCR (Bio-Rad, Mỹ), hệ thống Real-time PCR LightCycler 480 II (Roche, Thụy Sĩ), máy giải trình tự gen 3500XL (Applied Biosystems, Mỹ), bể ủ nhiệt, tủ lạnh, tủ mát, hệ thống điện di (Bio-Rad, Mỹ), máy ly tâm lạnh Centrifuge 5424R (Eppendorf, Đức), máy đo quang phổ NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, Mỹ) và cân phân tích.

Đối với quy trình nuôi cá, thức ăn chính là bột thương mại (Inve, Thái Lan) và ấu trùng Artemia (Petrel Brand, Mỹ). Dung dịch methylene blue 0,04% được sử dụng để kiểm soát nấm trong quá trình nuôi.

Trong các phân tích di truyền, các hóa chất cần thiết cho PCR bao gồm: mồi (primers), DreamTaq Green PCR Master Mix, acrylamide gel 30%, 10X TBE, TEMED và APS 10%. Quá trình giải trình tự gen sử dụng ExoSAP-IT, BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit, đệm phản ứng, EDTA, ethanol (100% và 75%) và HiDi-Formamide.

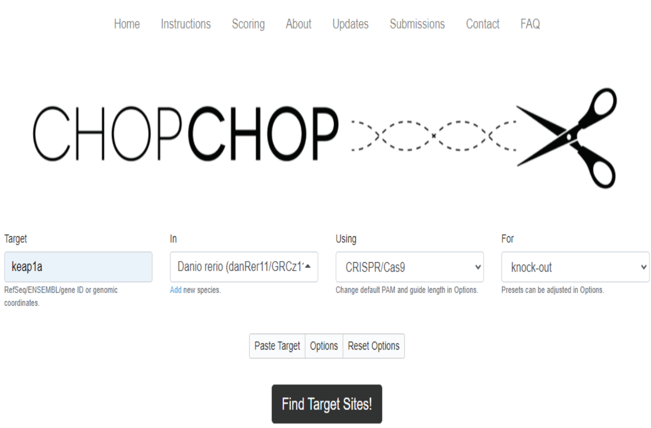
Stress oxy hóa được tạo ra bằng cách sử dụng hydrogen peroxide 35% (Scharlau, Tây Ban Nha). Quá trình tách chiết RNA sử dụng TRIzol™ Reagent Kit (Invitrogen) và chloroform, isopropanol, ethanol 99,8% và nước DEPC. Tổng hợp cDNA được thực hiện với bộ kít SensiFAST™ cDNA Synthesis Kit (Bioline), bao gồm 5x TransAmp Buffer, Reverse Transcriptase và nước không chứa DNase/RNase.

Cuối cùng, Maxima SYBR Green qPCR Master Mix (Thermo Scientific, Mỹ) được sử dụng cho phản ứng Real-time PCR.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1.Thiết kế chuỗi RNA hướng dẫn - guide RNA (gRNA) và mồi cho gen keap1a

Để thiết kế chuỗi RNA hướng dẫn đơn (sgRNA) đặc hiệu cho gen *keap1a*, nghiên cứu sử dụng công cụ trực tuyến ChopChop (http://chopchop.cbu.uib.no). Cụ thể, tên gen *keap1a* được nhập vào mục “Target”, loài “Danio rerio (danRer11/GRCz11)” được chọn ở mục “In”. Các thông số “CRISPR/Cas9” và “knockout” lần lượt được lựa chọn cho mục “Using” và “For”. Sau đó, quá trình tìm kiếm các vị trí mục tiêu gRNA trên gen *keap1a* được khởi động bằng cách nhấn nút “Find Target Sites” (hình 2).



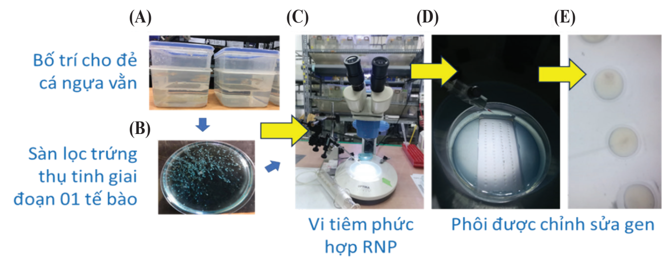
Hình 2. Trang web (http://chopchop.cbu.uib.no) hỗ trợ thiết kế vị trí các chuỗi RNA hướng dẫn (gRNA) của gen *keap1a* ở cá ngựa vằn.

Hiệu quả của việc knockout gen *keap1a* sau vi tiêm được đánh giá thông qua phương pháp phân tích kiểu gen (sử dụng kỹ thuật PCR và giải trình tự Sanger) để xác nhận sự thay đổi trình tự DNA tại vị trí gen *keap1a* ở cá thể biến đổi gen. Phân tích kiểu gen của cá thể F0 và F1 cho phép xác định tỷ lệ cá mang đột biến và mức độ thành công của quá trình knockout gen *keap1a*.

2.2.2.Loại bỏ gen bằng công nghệ CRISPR-Cas9 thông qua phương pháp vi tiêm

Để tiến hành knockout gen *keap1a*, dòng cá ngựa vằn WT được sử dụng để cho sinh sản tạo phôi trứng, sẵn sàng để thực hiện knockout gen *keap1a*. Cá ngựa vằn bố mẹ được nuôi trong điều kiện ổn định, hằng ngày được cho ăn với ấu trùng Artermia và thức ăn công nghiệp. Khi cá đạt độ tuổi trưởng thành, có thể tiến hành cho cá bắt đầu sinh sản. Cá đực và cái được nuôi riêng trong cùng hệ thống (hình 1).

Cá đực được chọn theo tiêu chuẩn mình thuôn, bơi nhanh và cá cái có bụng cong, ăn khỏe - giữa chúng có kích thước tương đồng. Trước ngày cho đẻ 1 ngày, tiến hành ghép cá đực và cái theo tỷ lệ 3 cái:2 đực trong bể cho đẻ được thiết kế có lớp lưới inox ngăn bên dưới để trứng rơi xuống, mà tránh cá bố mẹ ăn trứng (hình 3A).



Hình 3. Cho sinh sản cá ngựa vằn phục vụ vi tiêm knockout gen. (A) Cá ngựa vằn bố mẹ được nuôi trong bể để sinh sản; **(B)** Trứng đã thụ tinh được thu thập và sàng lọc để chọn những trứng ở giai đoạn một tế bào; **(C)** Phức hợp sgRNA/Cas9 được vi tiêm vào trứng đã thụ tinh; **(D)** Phôi biến đổi gen được phát triển từ trứng đã vi tiêm; **(E)** Hình ảnh phóng lớn vị trí vi tiêm vào phôi của hình.

Để tạo phức hợp ribonucleoprotein (RNP) cho vi tiêm CRISPR-Cas9, 10 nmol sgRNA *keap1a* 100 base đã được chuẩn hóa bằng cách thêm 100 µl dung dịch đệm duplex không chứa nuclease (IDT) để đạt nồng độ cuối cùng là 100 µM. Đồng thời, Alt-R S.p HiFi Cas9 Nuclease V3 (100 µg) được pha loãng trong dung dịch đệm protein Cas9 (20 mM HEPES; 150 mM KCl, pH 7,5) để đạt nồng độ làm việc 0,5 µg/µl. Sau đó, 3 µl sgRNA *keap1a* đã được trộn với 3 µl Cas9 đã pha loãng và ủ ở 37°C trong 10 phút để tạo phức hợp RNP [3]. Cuối cùng, mẫu được làm nguội đến nhiệt độ phòng trước khi tiến hành vi tiêm.

Quy trình vi tiêm được tiến hành theo mô tả của V.T. Nguyen và cs (2022a) [15] và V.N.H. Thuy và cs (2021) [16], cụ thể, phôi cá ngựa vằn giai đoạn một tế bào (hình 3B) được tiêm vào noãn hoàng với thể tích bằng 1/10 thể tích của phôi (hình 3C và 3D). Sau khi vi tiêm, trứng không thụ tinh hoặc chết được đếm và loại bỏ.

2.2.3. Xác định hiệu quả knockout gen keap1a và sàng lọc dòng cá ổn định

Để đánh giá hiệu quả knockout gen *keap1a* ở thế hệ F0, 15 cá bột (4-5 ngày sau khi thụ tinh - dpf) được chọn ngẫu nhiên để phân tích PCR. Cặp mồi Keap1a.hma.f1/r1 được thiết kế dựa trên các vị trí sgRNA *keap1a* đề xuất bởi ChopChop (bảng 1) để khuếch đại vùng đích trên gen *keap1a*. Sản phẩm PCR được phân tích trên gel acrylamide 4,5% để phát hiện sự hiện diện của các đoạn DNA dị hợp tử (heteroduplex), cho biết sự thành công của quá trình chỉnh sửa gen.

Bảng 1. Trình tự các cặp mồi (Oligonucleotide).

Gen	Mục đích	Tên mồi	Trình tự mồi	Kích thước (bp)	Nguồn
keap1a	Giải trình tự	Keap1a-seq-f1	5’ - TTTCAACAATGCCAACCTGG	508	Thiết kế trong nghiên cứu này
		Keap1a-seq-r1	5’ - GCCTCTCCATTGAATCTGTGTT		
	Xác định hiệu quả knockout gen	Keap1a-hma-f1	5’ - TTGTGCCTGTATTTCTTCATGG	204	
		Keap1a-hma-r1	5’ - AACCGTGTAATCCAAGTAACCG		
ef1α	Chạy Realtime-qPCR	*ef1α-qpcr-f1*	5’ - CGTGGTAATGTGGCTGGAGA	66	[8]
		ef1α-qpcr-r1	5’ - CTGAGCGTTGAAGTTGGCAG		
gstp1		*gstp1-qpcr-f1*	5’ - CAACGCCATGCTGAGACATC	104	
		gstp1-qpcr-r1	5’- GAAGATCTTCAACGCCGTCG		
prdx1		*prdx1-qpcr-f1*	5’- GTCCCACTGAGATCATCGCC	135	[17]
		prdx1-qpcr-r1	5’- AACCACCTTGTTTTCGGGGT		

Cá F0 mang đột biến được nuôi đến giai đoạn trưởng thành (khoảng 3 tháng) và sau đó lai với cá hoang dại để tạo ra thế hệ F1. Ấu trùng F1 (hoặc F2) ở giai đoạn 4-5 dpf cũng được phân tích PCR tương tự như F0 để xác định các cá thể mang đột biến ổn định. Nếu xuất hiện band heteroduplex, các mẫu này được giải trình tự Sanger sử dụng mồi Keap1a-seq-f1/r1 được thiết kế bởi phần mềm SnapGene 7.1.0 (bảng 1) để xác định chính xác loại đột biến (thêm hoặc mất nucleotide) trên gen *keap1a*.

Khi các tế bào chứa cả DNA gốc và DNA đã chỉnh sửa được nhân lên, các sợi đơn của hai loại DNA này có thể kết hợp với nhau tạo thành phân tử DNA lai ghép (heteroduplex). Khi chạy điện di, các phân tử DNA lai ghép này tạo ra các băng sáng đặc trưng, khác với băng sáng của DNA gốc và DNA đã chỉnh sửa hoàn toàn. Bên cạnh đó, băng heteroduplex chạy chậm hơn so với băng homoduplex cùng kích thước do sự tồn tại của các loop [18]. Ý nghĩa của vạch heteroduplex: Xác định hiệu quả chỉnh sửa gen (sự xuất hiện của vạch heteroduplex cho thấy hệ thống CRISPR/Cas9 đã hoạt động và tạo ra những thay đổi trên genome); Đánh giá tỷ lệ chỉnh sửa (bằng cách so sánh cường độ của các băng sáng, chúng ta có thể ước tính tỷ lệ tế bào đã bị chỉnh sửa) và phân tích loại đột biến (phân tích thêm về kích thước và vị trí của vạch heteroduplex có thể giúp xác định loại đột biến đã xảy ra).

2.2.4. Quy trình giải trình tự Sanger

Tinh sạch mẫu và chuẩn bị cho giải trình tự: Sản phẩm PCR thu được sau khi khuếch đại vùng đích trên gen *keap1a* bằng cặp mồi Keap1a.seq.f1/r1 đã được tinh sạch để loại bỏ các thành phần không mong muốn trước khi giải trình tự. 5 µl sản phẩm PCR được trộn với 2 µl hỗn hợp ExoSAP-IT và ủ lần lượt ở 37°C trong 15 phút và 80°C trong 15 phút. Mẫu sau đó được bảo quản ở 4°C hoặc -20°C cho đến khi giải trình tự.

Tiếp theo, sản phẩm PCR đã tinh sạch được chuẩn bị cho giải trình tự bằng phản ứng chuỗi với thuốc nhuộm huỳnh quang (BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit). Hỗn hợp phản ứng bao gồm 0,5 µl BigDye terminator, 1,5 µl buffer BigDye, 1 µl mồi giải trình tự (1,6 µM Keap1a.seq.f1), 4 µl nước và 3 µl sản phẩm PCR đã tinh sạch [3].

Quy trình giải trình tự Sanger: Phản ứng chuỗi được thực hiện trong một chu trình nhiệt trên máy PCR với các bước: biến tính ban đầu ở 96°C trong 3 phút, sau đó 25 chu kỳ gồm biến tính ở 96°C trong 10 giây, gắn mồi ở 50°C trong 5 giây và kéo dài ở 60°C trong 4 phút. Cuối cùng là bước kéo dài cuối ở 60°C trong 7 phút và bảo quản ở 4°C. Sản phẩm sau phản ứng chuỗi được tinh sạch bằng phương pháp kết tủa ethanol/EDTA để loại bỏ các thuốc nhuộm huỳnh quang dư thừa. Cuối cùng, mẫu được hòa tan trong 15 µl formamide và phân tích trên máy giải trình tự gen 3500 XL (Applied Biosystems) tại Trung tâm Công nghệ Sinh học TP Hồ Chí Minh, Việt Nam.

2.2.5. Xác định kiểu gen

Để xác định kiểu gen của cá F1 Keap1 knockout, DNA tổng số được chiết xuất từ vây đuôi cá trưởng thành. Vây đuôi được cắt và ủ trong dung dịch TNEST (10 mM Tris-HCl pH 8,2; 10 mM EDTA pH 8,0; 200 mM NaCl, 0,1% sodium dodecyl sulfate và 400 µg/ml proteinase K) ở 55°C trong ít nhất 4 giờ để phân giải mô và giải phóng DNA. DNA sau đó được pha loãng và sử dụng làm khuôn cho phản ứng PCR với cặp mồi đặc hiệu cho gen *keap1a* (bảng 1). Sản phẩm PCR được phân tích trên gel polyacrylamide 4,5% để xác định kiểu gen của cá.

Cắt vây đuôi cá và tách chiết DNA: Cá F1 Keap1 knockout được gây mê nhẹ bằng benzocaine. Một phần nhỏ vây đuôi được cắt bằng nhíp và chuyển ngay vào ống eppendorf chứa sẵn 40 µl dung dịch TNEST. Mẫu được ủ ở 55°C trong ít nhất 4 giờ để phân giải mô và giải phóng DNA. Sau đó, DNA được pha loãng 1/10 để sử dụng cho PCR.

Phản ứng PCR và phân tích kết quả: Phản ứng PCR được thực hiện với hỗn hợp gồm 1,6 µl nước; 0,1 µl mồi xuôi (10 µM Keap1a.hma.f1); 0,1 µl mồi ngược (10 µM Keap1a.hma.r1); 2,2 µl DreamTaq Green PCR Master Mix và 1 µl DNA mẫu đã pha loãng. Chu trình nhiệt gồm các bước: biến tính ban đầu ở 95°C trong 2 phút, 35 chu kỳ gồm biến tính ở 95°C trong 10 giây, gắn mồi ở 60°C trong 30 giây và kéo dài ở 72°C trong 30 giây, sau đó kéo dài cuối cùng ở 72°C trong 5 phút và bảo quản ở 4°C.

Sản phẩm PCR được phân tích trên gel polyacrylamide 4,5% được đổ từ hỗn hợp gồm 5,625 ml nước, 0,875 ml 30% acrylamide, 0,4 ml 10X TBE, 5 µl TEMED và 150 µl 10% APS. Gel được nhuộm ethidium bromide và quan sát dưới ánh sáng UV. Sự hiện diện của các đoạn DNA dị hợp tử (heteroduplex) cho biết sự thành công của quá trình chỉnh sửa gen *keap1a*.

2.2.6. Đánh giá tỷ lệ sống

Để đánh giá vai trò của *keap1a* trong đáp ứng stress oxy hóa, chúng tôi đã thực hiện thử nghiệm tỷ lệ sống trên cá ngựa vằn hoang dại (WT) và cá knockout *keap1a* là anh chị em ruột, cùng một lứa, chỉ khác nhau về kiểu gen *keap1a*. Cả hai nhóm cá WT và cá knockout *keap1a* giai đoạn 4 dpf sau đó được phơi nhiễm với 3 mM H_2O_2 [19, 20]. Tỷ lệ sống của các nhóm được theo dõi và so sánh trong vòng 48 giờ. Việc sử dụng cá anh chị em ruột cho phép chúng tôi loại bỏ các yếu tố gây nhiễu kết quả có thể phát sinh từ sự khác biệt về di truyền hoặc môi trường giữa các nhóm cá. Dự kiến cá knockout *keap1a* thể hiện khả năng sống sót cao hơn khi tiếp xúc với H_2O_2 do sự hoạt hóa của Nrf2.

2.2.7. Đánh giá mức độ biểu hiện gen mục tiêu của Nrf2 (gstp1 và prdx1) bằng phương pháp Real-time PCR

RNA tổng số được tách chiết từ 15 phôi thử nghiệm sử dụng TRIzol™ Reagent Kit (Invitrogen). Sau đó, 300 ng RNA được sử dụng để tổng hợp cDNA với bộ kít SensiFAST™ cDNA Synthesis Kit (Bioline). Mức độ biểu hiện của các gen mục tiêu Glutathione S-transferase Pi 1 (*gstp1*) và peroxiredoxin 1 (*prdx1*) được phân tích bằng phương pháp Real-time PCR trên hệ thống LightCycler® 96 System (Roche Life Science) sử dụng Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2X) (ThermoFisher). Gen nội *ef1α* được sử dụng để chuẩn hóa biểu hiện gen. Trình tự các cặp mồi được sử dụng cho phản ứng Real-time PCR bao gồm: *ef1α*, *gstp1* và *prdx1* (bảng 1).

Gen *gstp1* và *prdx1* được lựa chọn làm gen mục tiêu do chúng là các gen đáp ứng trực tiếp với hoạt động của Nrf2, không chịu ảnh hưởng bởi các yếu tố điều hòa khác [19-23]. Gen nội *ef1α* được sử dụng để chuẩn hóa biểu hiện gen do có mức biểu hiện ổn định trong nhiều loại tế bào và mô, không bị ảnh hưởng bởi các yếu tố ngoại cảnh [19, 20].

Mức độ biểu hiện gen *gstp1* và *prdx1* ở ấu trùng cá ngựa vằn knockout *keap1a* khi được xử lý hóa chất gây stress oxy hóa, hóa chất gây stress mạng lưới nội chất, và không xử lý hóa chất được so sánh với ấu trùng cá ngựa vằn hoang dại. Phương pháp định lượng tương đối $2^{-\Delta\Delta Ct}$ được sử dụng để phân tích dữ liệu.

2.2.8. Phân tích thống kê

Tất cả dữ liệu được phân tích dưới dạng trung bình ±SE. Phương pháp thống kê với Student's t-test được sử dụng để tính *P*-value. Thử nghiệm tỷ lệ sống được phân tích theo phương pháp đường cong Kaplan-Meier, sử dụng phần mềm GraphPad Prism 9.4.0 (GraphPad software Inc, LLC, San Diego CA, Mỹ). Dữ liệu tỷ lệ sống được so sánh bằng cách dùng phương pháp kiểm tra log-rank test. *P*-value≤0,05 được xem xét là có ý nghĩa thống kê. Phân tích dữ liệu mức độ biểu hiện gen sử dụng phương pháp định lượng tương đối $2^{-\Delta\Delta Ct}$. So sánh biểu hiện mức độ gen được thực hiện bằng cách sử dụng two-tailed Student's t-test và Tukey's test. Mỗi thí nghiệm được lặp lại 3 lần.

3. Kết quả

3.1. Thiết kế mồi và gRNA cho gen keap1a

Vị trí gRNA mục tiêu của *keap1a* ở cá ngựa vằn là 5'-TGAGGATTTCTCCGCCATCGTGG-3' (trình tự PAM được gạch chân) (hình 4A). Cặp mồi *keap1a*.hma.f1; *keap1a*.hma.r1 được thiết kế theo đề xuất của trang web: http://chopchop.cbu.uib.no, với nhiệt độ nóng chảy mồi (Tm) là 60°C (hình 4B, bảng 1).

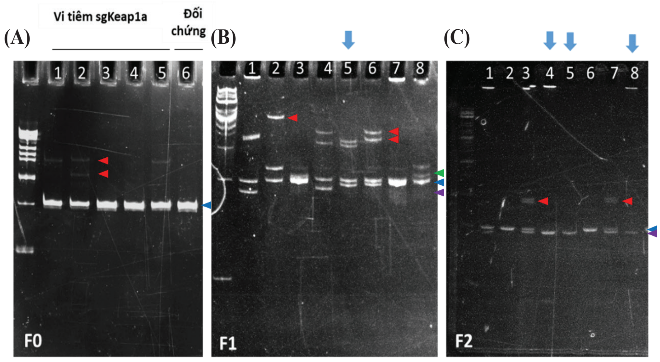
Hình 4. Thiết kế gRNA *keap1a* và cặp mồi xác định hiệu quả knockout gen. **(A)** Vị trí gRNA *keap1a* cá ngựa vằn được thiết kế từ http://chopchop.cbu.uib.no. Rank: 9 với trình tự mục tiêu được lựa chọn (trình tự PAM được gạch chân); **(B)** Cặp mồi thiết kế sẵn có sau khi thiết kế gRNA *keap1a*.

Trình tự gRNA mục tiêu của *keap1a* ở cá ngựa vằn sau đó được gửi đến công ty Integrated DNA Technologies, Inc để tổng hợp RNA dẫn đường đơn (sgRNA) *keap1a*. Alt-R S.p HiFi Cas9 Nuclease V3 được mua từ Công ty Integrated DNA Technologies, Inc (hình 5).

Hình 5. Alt-R S.p HiFi Cas9 Nuclease V3 và sgRNA của *keap1a* cá ngựa vằn được tổng hợp từ Công ty Integrated DNA Technologies, Inc để tổng hợp.

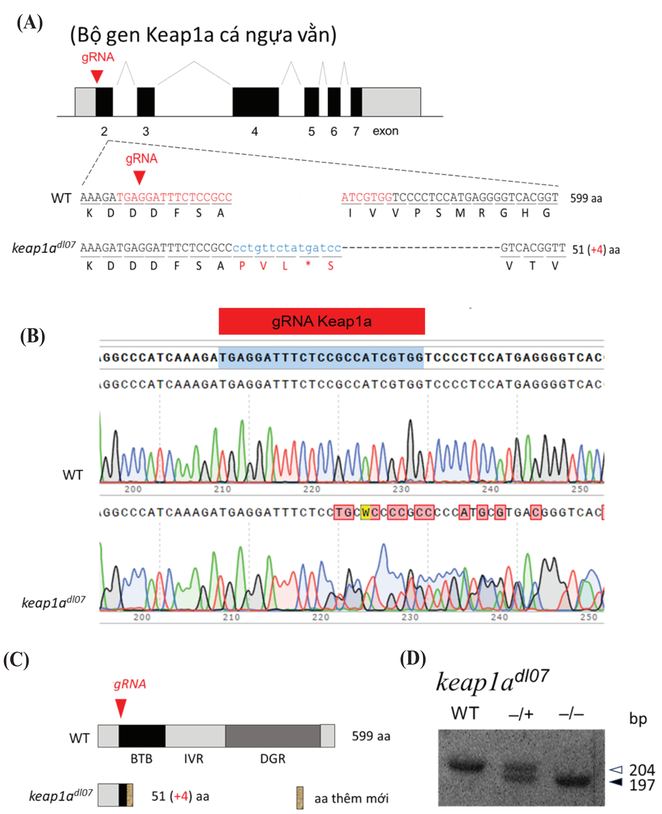
3.2. Tạo dòng cá ngựa vằn knockout gen keap1

Việc vi tiêm sgRNA *keap1a* cùng với Cas9 protein vào phôi 1 tế bào cá ngựa vằn đã được thực hiện, trong đó 250 phôi trứng được tiêm và 52 con cá sống sót sau đó. Hiệu quả vi tiêm được đánh giá sau 4-7 ngày (hình 6A) cho thấy sự thành công ở các giếng số 1, 2 và 5. Ấu trùng cá sau vi tiêm được nuôi đến giai đoạn trưởng thành và lai với cá hoang dã (WT) để tạo ra đàn cá F1. Cá mang kiểu gen từ giếng số 2 (hình 6A) được lai với cá WT, tạo ra các kiểu gen khác nhau ở đàn cá F1 (hình 6B).



Hình 6. Hiệu quả knockout gen được kiểm tra qua các thế hệ. (A) Hiệu quả vi tiêm sau 4 ngày vi tiêm; **(B)** Hiệu quả knockout gen và lựa chọn dòng cá được knockout của cá ở thế hệ F1; **(C)** Lựa chọn các dòng cá ổn định knockout gen ở thế hệ F2. Các dấu mũi tên màu đỏ là các band heteroduplex. Dấu mũi tên màu xanh dương là vạch DNA gốc (hoang dại); Dấu mũi tên xanh lá cây và tím là các vạch DNA đã bị chỉnh sửa lần lượt thêm hoặc mất một số nucleotide [18].

Giải trình tự các dòng cá F1 này cho thấy các đột biến khác nhau. Giếng 1, 2 và 4 có 15 nucleotide bị chèn hoặc xóa, trong khi giếng 3 và 7 có các nucleotide bị đột biến khác. Giếng 8 có 2 nucleotide bị xóa, giếng 5 có cả chèn 15 nucleotide và xóa 22 nucleotide, dẫn đến kết quả cuối cùng là xóa 7 nucleotide (hình 6B).



Hình 7. (A) Biểu đồ mô tả về gen *keap1a* của cá ngựa vằn, gRNA mục tiêu nằm ở exon 2, dãy đột biến do Cas9/sgRNA gây ra và dãy axit amin dự đoán từ dãy gen *keap1a* được knockout. WT: cá hoang dã; *keap1a*$^{-/-}$: cá knockout gen đồng hợp tử; **(B)** Phân tích giải trình tự gen cá knockout gen *keap1a*; **(C)** Kết quả gen *keap1a* knockout còn có 51 amino acid (aa); **(D)** Kết quả điện di dòng cá knockout gen *keap1a* có 7 bp bị xóa (*keap1a*^{dl07}).

Phân tích chi tiết hơn về dòng cá có 7 nucleotide bị xóa (đặt tên là *keap1a*^{dl07}) cho thấy cấu trúc protein *Keap1a* bị thay đổi đáng kể. Thay vì 599 amino acid ban đầu, protein *Keap1a* ở cá knockout chỉ còn 51 amino acid (hình 7A). Trình tự DNA của *keap1a*^{dl07} cũng được xác định (hình 7B). Đột biến mất 7 nucleotide ở cá knockout dẫn đến sự thay đổi khung đọc mở (frameshift), làm xuất hiện codon stop sớm, kết thúc quá trình dịch mã. Do đó, protein *Keap1a* ở cá knockout bị cắt ngắn đáng kể, chỉ còn 51 amino acid (hình 7C).

Để xác nhận knockout thành công, cá *keap1a*$^{dl07/+}$ dị hợp tử được lai với nhau, tạo ra đàn cá F2 mang các kiểu gen WT, *keap1a*$^{dl07/+}$ dị hợp tử và *keap1a*$^{dl07/dl07}$ đồng hợp tử (hình 6C). Điện di (hình 6C và 7D) cho thấy band WT có kích thước 204 bp, trong khi cá knockout *keap1a* đồng hợp tử có kích thước 197 bp, chứng tỏ knockout gen *keap1a* đã thành công.

3.3. Đánh giá chức năng sinh lý của dòng cá knockout gen keap1a

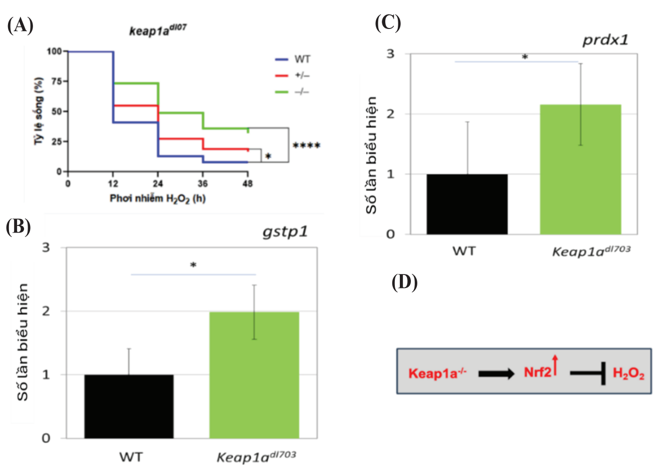
Sau khi xác định thành công việc knockout gen *keap1a*, dòng cá *keap1a*^{dl07} được nuôi đến 3 tháng tuổi. Kiểu hình của cá đồng hợp tử knockout không cho thấy sự khác biệt đáng kể so với cá hoang dã (hình 8A). Điều này trái ngược với quan sát ở chuột knockout, thường chết sau 15 ngày tuổi [21]. Cá ngựa vằn knockout gen *keap1a* tiếp tục phát triển bình thường và các cá tái tạo từ dòng dị hợp tử *keap1a*$^{dl07/+}$ tuân theo định luật Mendel, không có bất thường trong quá trình phát triển và sinh sản (hình 8B).

(A)

(B)

Dòng cá knockout thế hệ F2	Kiểu gen		
	WT	+/–	–/–
keap1a^{dl07} (n = 47)	21.3%	61.7%	17.0%

Hình 8. Knockout *keap1a* không ảnh hưởng đến sự sinh trưởng và phát triển của cá ngựa vằn. (A) Cá ngựa vằn được knockout *keap1a*^{dl07} sống sót tương tự như cá hoang dại (WT) ở thế hệ F2. Hình cá ở giai đoạn 3 tháng tuổi; **(B)** Cá thế hệ F2 sinh sản và phát triển bình thường theo định luật Mendel sau khi cho lai 2 dòng dị hợp tử của mỗi dòng cá *keap1a*$^{dl07/+}$ với nhau.



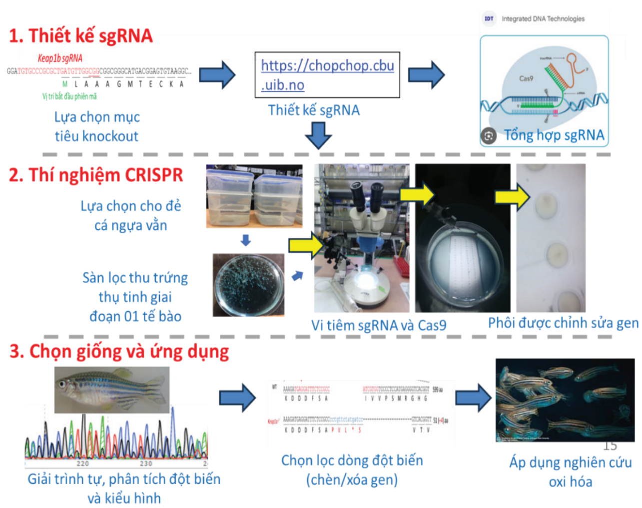
Hình 9. Dòng cá *keap1a*^{dl07} tăng khả năng kháng oxy hóa và biểu hiện gen mục tiêu của Nrf2. (A) Biểu đồ đánh giá tỷ lệ sống khi phơi nhiễm với dòng cá ngựa vằn *keap1a*^{dl07}; **(B)** Biểu hiện gen mục tiêu của Nrf2 với gen *gstp1* và **(C)** *prdx1*; **(D)** Mô tả dòng cá *keap1a*^{dl07} tăng cường hoạt hóa Nrf2 để kháng oxy hóa.

Để đánh giá khả năng sống sót của cá knockout khi tiếp xúc với stress oxy hóa, đàn cá F2 được nuôi lớn và thử nghiệm. Kết quả cho thấy, cá đồng hợp tử knockout có tỷ lệ sống cao hơn cá dị hợp tử và cá hoang dã khi tiếp xúc với H_2O_2 (hình 9A). Điều này có thể liên quan đến việc hoạt hóa gen mục tiêu của Nrf2 (hình 9B và 9C), giúp cá chống lại stress oxy hóa (hình 9D).

Nghiên cứu này chứng minh rằng, việc knockout gen *keap1a* làm tăng khả năng sinh lý của cá ngựa vằn khi đối mặt với stress oxy hóa, mở ra hướng nghiên cứu mới về vai trò của gen này trong đáp ứng oxy hóa.

4. Bàn luận

Nghiên cứu này đã thành công trong việc sử dụng công nghệ CRISPR-Cas9 để tạo ra dòng cá ngựa vằn knockout gen *keap1a* (hình 10). Quy trình bao gồm các bước chính: thiết kế gRNA, tổng hợp gRNA và Cas9 mRNA, vi tiêm vào phôi cá ngựa vằn một tế bào, nuôi phôi và cuối cùng là xác định kiểu gen của cá thể biến đổi gen. Mỗi bước trong quy trình đều được tối ưu hóa để đạt hiệu quả cao nhất. Ví dụ, chúng tôi đã lựa chọn gRNA có hiệu suất cắt cao và sử dụng kỹ thuật vi tiêm chính xác để đảm bảo đưa thành công phức hợp CRISPR/Cas9 vào phôi. Sử dụng kỹ thuật vi tiêm phức hợp ribonucleoprotein (RNP) vào phôi cá một tế bào, một kỹ thuật đã được chứng minh là có hiệu quả cao trong việc tạo đột biến gen mục tiêu ở cá ngựa vằn và các loài khác [22-25].



Hình 10. Quy trình knockout gen *keap1a* ở cá ngựa vằn.

Các thông số đánh giá và hiệu quả cho thấy, quy trình được đánh giá thông qua tỷ lệ phôi biến đổi gen thành công và tỷ lệ cá thể mang đột biến ở gen đích. Kết quả cho thấy, chúng tôi đã đạt được tỷ lệ phôi biến đổi gen lên đến 80% và tỷ lệ cá thể F0 mang đột biến là 50% (hình 6A). Đây là những con số đáng khích lệ, chứng tỏ quy trình knockout gen *keap1a* của chúng tôi có tính khả thi và hiệu quả. Ngoài ra, chúng tôi cũng đã phân tích trình tự gen của các cá thể biến đổi gen để xác nhận sự xuất hiện của đột biến trên gen *keap1a*. Kết quả giải trình tự cho thấy, đột biến đã xảy ra đúng vị trí đích trên gen (hình 7B), chứng tỏ tính đặc hiệu cao của hệ thống CRISPR/Cas9.

Một điểm đáng chú ý là cá ngựa vằn knockout *keap1a* trong nghiên cứu này không hề biểu hiện bất kỳ dấu hiệu bất thường hoặc tử vong nào, ngay cả khi chúng mang đột biến đồng hợp tử. Điều này khác biệt hoàn toàn so với những gì đã được quan sát ở chuột knockout *keap1*, thường chết sau 15 ngày tuổi [21]. Sự khác biệt này có thể xuất phát từ sự khác nhau về cấu trúc và chức năng của hệ thống Keap1-Nrf2 giữa các loài, hoặc do cá ngựa vằn có các cơ chế bù trừ khác giúp duy trì cân bằng oxy hóa ngay cả khi *keap1a* bị bất hoạt.

Một kết quả quan trọng khác của nghiên cứu là cá ngựa vằn knockout *keap1a* cho thấy khả năng chống chịu stress oxy hóa tốt hơn so với cá hoang dã. Điều này củng cố giả thuyết rằng việc loại bỏ *keap1a* sẽ dẫn đến sự hoạt hóa liên tục của Nrf2 [26], từ đó kích hoạt các gen chống oxy hóa và bảo vệ tế bào khỏi stress oxy hóa [8]. Kết quả này mở ra tiềm năng ứng dụng công nghệ CRISPR-Cas9 để tạo ra các dòng cá nuôi có khả năng chống chịu stress oxy hóa cao hơn, qua đó nâng cao năng suất và chất lượng cho ngành nuôi trồng thủy sản.

Tuy nhiên, cần lưu ý rằng nghiên cứu này mới chỉ tập trung vào việc đánh giá khả năng chống chịu stress oxy hóa cấp tính ở cá knockout *keap1a*. Cần có thêm các nghiên cứu sâu hơn để xem xét ảnh hưởng lâu dài của việc knockout *keap1a* đến sức khỏe, sự tăng trưởng và khả năng sinh sản của cá, để có thể đánh giá toàn diện tiềm năng ứng dụng của công nghệ này trong nuôi trồng thủy sản. Bên cạnh đó, việc nghiên cứu chi tiết các cơ chế phân tử liên quan đến sự hoạt hóa Nrf2 và biểu hiện của các gen chống oxy hóa ở cá knockout *keap1a* cũng sẽ cung cấp những hiểu biết sâu sắc hơn về vai trò của hệ thống Keap1-Nrf2 trong việc duy trì cân bằng oxy hóa và đáp ứng với stress oxy hóa ở cá.

Những kết quả này cho thấy, quy trình knockout gen *keap1a* mà chúng tôi phát triển có thể được áp dụng để nghiên cứu chức năng của gen này trong các nghiên cứu tiếp theo. Hơn nữa, quy trình này cũng có thể được điều chỉnh và sử dụng để knockout các gen khác trên cá ngựa vằn, mở ra nhiều cơ hội nghiên cứu mới trong lĩnh vực sinh học phát triển và y sinh học. Trong tương lai, chúng tôi sẽ tiếp tục cải tiến quy trình này để nâng cao hiệu quả biến đổi gen và giảm thiểu các tác động không mong muốn. Đồng thời, chúng tôi cũng sẽ sử dụng các cá thể cá ngựa vằn knockout *keap1a* để nghiên cứu vai trò của gen này trong các quá trình sinh lý và bệnh lý khác nhau.

Tóm lại, nghiên cứu này đã thành công trong việc sử dụng công nghệ CRISPR-Cas9 để tạo ra dòng cá ngựa vằn knockout *keap1a* (hình 10) và chứng minh khả năng chống chịu stress oxy hóa cao hơn của chúng. Đây là một bước tiến quan trọng, mở ra cánh cửa cho việc ứng dụng công nghệ CRISPR-Cas9 vào nghiên cứu cơ bản và ứng dụng tại Việt Nam, đặc biệt là trong lĩnh vực nuôi trồng thủy sản. Mặc dù vậy, các nghiên cứu sâu hơn về ảnh hưởng của việc knockout *keap1a* đến cá ngựa vằn vẫn là cần thiết để khai thác hết tiềm năng của công nghệ này, mở ra những hướng nghiên cứu và ứng dụng mới trong tương lai.

5. Kết luận

Nghiên cứu này đã thành công thiết lập quy trình knockout gen *keap1a* trên cá ngựa vằn sử dụng công nghệ CRISPR-Cas9, đánh dấu một bước tiến quan trọng trong việc ứng dụng công nghệ chỉnh sửa gen tại Việt Nam. Cá ngựa vằn knockout *keap1a* không chỉ phát triển và sinh sản bình thường mà còn thể hiện khả năng chống chịu stress oxy hóa vượt trội, mở ra tiềm năng ứng dụng to lớn trong việc tạo ra các dòng cá nuôi có khả năng chống chịu stress và nâng cao chất lượng sản phẩm trong ngành nuôi trồng thủy sản. Nghiên cứu này không chỉ cung cấp một công cụ mạnh mẽ cho nghiên cứu chức năng gen mà còn đặt nền tảng cho việc phát triển các ứng dụng công nghệ sinh học tiên tiến trong tương lai. Tuy nhiên, cần tiếp tục nghiên cứu sâu hơn để đánh giá toàn diện ảnh hưởng của việc knockout *keap1a* cũng như khai thác tối đa tiềm năng của công nghệ CRISPR-Cas9 trong lĩnh vực nuôi trồng thủy sản.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu được tài trợ bởi Quỹ Phát triển Khoa học và Công nghệ Quốc gia (NAFOSTED) qua đề tài mã số 108.06-2020.19. Các tác giả trân trọng cảm ơn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1] S. Scholz, S. Fischer, U. Gündel, et al. (2008), "The zebrafish embryo model in environmental risk assessment - applications beyond acute toxicity testing", *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.*, **15(5)**, pp.394-404, DOI: 10.1007/s11356-008-0018-z.

[2] K.I. Adamson, E. Sheridan, A.J. Grierson (2008), "Use of zebrafish models to investigate rare human disease", *J. Med. Genet.*, **55(10)**, pp.641-654, DOI: 10.1136/jmedgenet-2018-105358.

[3] V.T. Nguyen, L. Bian, J. Tamaoki, et al. (2020), "Generation and characterisation of *keap1a*- and *keap1b*-knockout zebrafish", *Redox Biol.*, **36**, DOI: 10.1016/j.redox.2020.101667.

[4] L. Li, M. Kobayashi, H. Kaneko, et al. (2008), "Molecular evolution of Keap1: Two Keap1 molecules with distinctive intervening region structures are conserved among fish", *Journal of Biological Chemistry*, **283(6)**, pp.3248-3255, DOI: 10.1074/jbc.M708702200.

[5] V.T. Nguyen, L. Bian, J. Tamaoki, et al. (2023), "Genetic hyperactivation of Nrf2 causes larval lethality in *Keap1a* and *Keap1b*-double-knockout zebrafish", *Redox Biol.*, **62**, DOI: 10.1016/j.redox.2023.102673.

[6] T. Suzuki, J. Takahashi, M. Yamamoto (2023), "Molecular basis of the KEAP1-NRF2 signaling pathway", *Mol. Cells*, **46(3)**, pp.133-141, DOI: 10.14348/molcells.2023.0028.

[7] K. Mukaigasa, T. Tsujita, V.T. Nguyen, et al. (2018), "Nrf2 activation attenuates genetic endoplasmic reticulum stress induced by a mutation in the phosphomannomutase 2 gene in zebrafish", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **115(11)**, pp.2758-2763, DOI: 10.1073/pnas.1714056115.

[8] V.T. Nguyen, Y. Fuse, J. Tamaoki, et al. (2016), "Conservation of the Nrf2-mediated gene regulation of proteasome subunits and glucose metabolism in zebrafish", *Oxid. Med. Cell Longev.*, **2016(1)**, pp.1-10, DOI: 10.1155/2016/5720574.

[9] S. Ota, Y. Hisano, Y. Ikawa, et al. (2014), "Multiple genome modifications by the CRISPR/Cas9 system in zebrafish", *Genes to Cells*, **19(7)**, pp.555-564, DOI: 10.1111/gtc.12154.

[10] A. Hruscha, P. Krawitz, A. Rechenberg, et al. (2013), "Efficient CRISPR/Cas9 genome editing with low off-target effects in zebrafish", *Development*, **140(24)**, pp.4982-4987, DOI: 10.1242/dev.099085.

[11] M. Jinek, K. Chylinski, I. Fonfara, et al. (2012), "A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity", *Science*, **6096(337)**, pp.816-821, DOI: 10.1126/science.1225829.

[12] M. Zhu, S.L. Sumana, M.M. Abdullateef, et al. (2024), "CRISPR/Cas9 technology for enhancing desirable traits of fish species in aquaculture", *Int. J. Mol. Sci.*, **25(17)**, DOI: 10.3390/ijms25179299.

[13] S. Roy, V. Kumar, B.K. Behera, et al. (2022), "CRISPR/Cas genome editing - can it become a game changer in future fisheries sector?", *Front. Mar. Sci.*, **9**, DOI: 10.3389/fmars.2022.924475.

[14] Z. Yang, G. Fu, M. Lee, et al. (2024), "Genes for editing to improve economic traits in aquaculture fish species", *Aquac. Fish.*, **10(1)**, DOI: 10.1016/j.aaf.2024.05.005.

[15] V.T. Nguyen, B.H. Loc, V.N.H. Thuy, et al. (2022a), "Expression of red fluorescent protein (RFP) in transgenic angelfish (*Pterophyllum scalare* Schultze, 1823)", *J. Fish. Environ.*, **46(3)**, pp.72-83.

[16] V.N.H. Thuy, T.M.N. Thanh, B.N. Quoc, et al. (2021), "Generation of transgenic medaka *Oryzias curvinotus* (Nichols & Pope, 1927) carrying a cyan fluorescent protein gene driven by alpha actin promoter", *Asian Fish. Sci.*, **34(1)**, pp.56-62, DOI: 10.33997/j.afs.2021.34.1.006.

[17] V.T. Nguyen, T.T.T. Nguyen, N.P. Phi, et al. (2022b), "Keap1/Nrf2-independent antioxidative activity of *Phyllanthus amarus* extract in zebrafish", *Vietnam Journal of Biotechnology*, **20(4)**, pp.653-661, DOI: 10.15625/1811-4989/17475.

[18] D. Bhattacharya, E.G.V. Meir (2019), "A simple genotyping method to detect small CRISPR-Cas9 induced indels by agarose gel electrophoresis", *Sci. Rep.*, **9(1)**, DOI: 10.1038/s41598-019-39950-4.

[19] V.T. Nguyen, V.T.M. Thao, L.L.P. Hanh, et al. (2024), "Exploring the phytochemical diversity and antioxidant potential of the Vietnamese *Smilax glabra* Roxb: Insights from *UPLC-QTOF-MS/MS* and zebrafish model studies", *Appl. Biochem. Biotechnol.*, pp.1-18, DOI: 10.1007/s12010-024-04930-6.

[20] Y. Fuse, V.T. Nguyen, M. Kobayashi (2016), "Nrf2-dependent protection against acute sodium arsenite toxicity in zebrafish", *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **305**, pp.136-142, DOI: 10.1016/j.taap.2016.06.012.

[21] N. Wakabayashi, K. Itoh, J. Wakabayashi, et al. (2023), "Keap1-null mutation leads to postnatal lethality due to constitutive Nrf2 activation", *Nat. Genet.*, **35(3)**, pp.238-245, DOI: 10.1038/ng1248.

[22] S. Lebedeva, A.M.J. Domingues, F. Butter, et al. (2017), "Characterization of genetic loss-of-function of Fus in zebrafish", *RNA Biol.*, **14(1)**, pp.29-35, DOI: 10.1080/15476286.2016.1256532.

[23] H. Kotani, K. Taimatsu, R. Ohga, et al. (2015), "Efficient multiple genome modifications induced by the crRNAs, tracrRNA and Cas9 protein complex in zebrafish", *PLOS ONE*, **10(5)**, DOI: 10.1371/journal.pone.0128319.

[24] A. Rossi, Z. Kontarakis, C. Gerri, et al. (2015), "Genetic compensation induced by deleterious mutations but not gene knockdowns", *Nature*, **7564(524)**, pp.230-233, DOI: 10.1038/nature14580.

[25] M. Ohama, Y. Washio, K. Kishimoto, et al. (2020), "Growth performance of myostatin knockout red sea bream *Pagrus major* juveniles produced by genome editing with CRISPR/Cas9", *Aquaculture*, **529**, DOI: 10.1016/j.aquaculture.2020.735672.

[26] L. Bian, V.T. Nguyen, J. Tamaoki, et al. (2023), "Genetic hyperactivation of Nrf2 causes larval lethality in *Keap1a* and *Keap1b*-double-knockout zebrafish", *Redox. Biol.*, **62**, DOI: 10.1016/j.redox.2023.102673.