

# CHỈNH SỬA GEN THỤ THỂ CD163 Ở TẾ BÀO NGUYÊN BÀO SỢI CỦA LỢN BẰNG CÔNG NGHỆ CRISPR/CAS9

Nguyễn Văn Ba<sup>1</sup>, Giang Thị Thanh Nhân<sup>1</sup>, Nguyễn Thị Lệ Hương<sup>1</sup>, Phạm Thu Thảo<sup>2</sup>,  
Nguyễn Khánh Vân<sup>1</sup> và Phạm Doãn Lâm<sup>1\*</sup>

Ngày nhận bài báo: 30/11/2022 - Ngày nhận bài phản biện: 20/12/2022

Ngày bài báo được chấp nhận đăng: 30/12/2022

## TÓM TẮT

Thụ thể CD163 đóng vai trò quan trọng trong sinh học của virus gây bệnh tai xanh, tạo điều kiện cho virus xâm nhập và gây nhiễm trùng cho các tế bào đích. Nghiên cứu này được thực hiện với mục đích chỉnh sửa vùng exon7 gen CD163 nhằm gây bất hoạt thụ thể CD163 ở tế bào nguyên bào sợi của lợn từ đó hạn chế khả năng xâm nhập của virus gây bệnh tai xanh. Vector CRISPR pX459 được gắn đoạn gARN đặc hiệu với vùng exon7 của thụ thể CD163 ở lợn và được biến nạp vào vi khuẩn *E. coli*. Vector CRISPR pX459-CD163 đã được nhân dòng và tách chiết thành công có nồng độ cao (1.700 ng/μl) được sử dụng để chuyển vào tế bào nguyên bào sợi lợn. Vector CRISPR pX459-CD163 được chuyển vào tế bào nguyên bào sợi lợn trong môi trường bổ sung 7,5μl Lipofectamine™ 3000, ủ trong 48h. Sử dụng môi trường chứa kháng sinh Puromycin nồng độ 2-10 μg/ml để sàng lọc tế bào được chuyển vector thành công. Kết quả đã tạo ra dòng tế bào nguyên bào sợi lợn được chỉnh sửa vùng exon7 gen CD163 gây biến đổi C thành T và tương ứng acid amine Alanine thành Valine. Kết quả nghiên cứu đã mở ra triển vọng trong việc ứng dụng kết hợp công nghệ CRISPR/CAS9 và nhân bản để tạo lợn kháng virus gây bệnh tai xanh.

**Từ khóa:** *Chỉnh sửa gen, CD163, tế bào nguyên bào sợi, CRISPR/CAS9.*

## ABSTRACT

### Editing CD163 receptor gene in porcine fibroblast by using CRISPR/CAS9 system

The CD163 receptor plays an important role in the biology of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) by allowing the virus to enter and infect target cells. This study was carried out to edit the exon7- CD163 of pig fibroblasts to create a pig resistant to pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus. The CRISPR pX459 vector was attached a gRNA specific to the exon 7 of the CD163 receptor and transformed into *E. coli*. The vector CRISPR pX459-CD163 was successfully cloned and isolated at a high concentration (1,700 ng/μl). The CRISPR pX459-CD163 vector was transfected into porcine fibroblast cells in medium supplemented with 7,5μl Lipofectamine TM 3000 and incubated for 48 hours. Use media containing the antibiotic Puromycin at concentrations from 2 to 10 μg/ml to screen successfully transfected cells. As a result, a porcine fibroblast cell line was edited in exon 7 of the CD163 gene carrying C-to-T nucleotide change, resulting in an Alanine-to-Valine substitution. The research results have opened up the prospect of applying the combination of CRISPR/CAS9 system and cloning to create pigs resistant to pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus.

**Keywords:** *Gene editing, CD163, Pig Fibroblast, CRISPR/CAS9.*

## 1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Protein CD163, một thành viên của siêu họ scavenger receptor cysteine-rich (SRCR), bao gồm một domain nội bào và 9 domain

ngoại bào. Mỗi domain SRCR chứa khoảng 100 amino acid gồm nhiều cysteines giúp tạo thành các liên kết disulfide. Ở người, sự hấp thụ hemoglobin-heme qua trung gian CD163 (SRCR3) bảo vệ tế bào khỏi stress oxy hóa (Schaer và ctv, 2006). CD163 đồng thời đóng vai trò như một thụ thể đối với nhân tố gây hoại tử khối u (tumor necrosis factor TNF :

<sup>1</sup> Phòng Thí nghiệm trọng điểm Công nghệ tế bào động vật - Viện Chăn nuôi

\* Tác giả liên hệ: TS. Phạm Doãn Lâm, Phó Viện trưởng Viện Chăn nuôi. Điện thoại: 0914366975; Email: pdlanvn@yahoo.com.

SRCR1-4 & 6-9), một số tác nhân gây bệnh (virus dịch tả lợn châu Phi; vi khuẩn: SRCR2) và liên kết hồng cầu (SRCR2). Thụ thể CD163 tham gia vào bước cuối cùng của quá trình lây nhiễm PRRS virus. Sự giảm biểu hiện của CD163 ngăn chặn sự lây nhiễm PRRSV trong các tế bào chủ (Patton và ctv, 2009), trong khi đó, sự có mặt của thụ thể CD163 làm nhạy cảm hơn với sự lây nhiễm và sao chép của PRRSV (Calvert và ctv, 2007)

Công nghệ chỉnh sửa gen CRISPR/Cas9 nhằm bất hoạt thụ thể CD163 ở lợn đã được thực hiện ở một số phòng thí nghiệm trên thế giới (Whitworth và ctv, 2014; Ma và ctv, 2017; Burkard và ctv, 2018; Guo và ctv, 2019). Các nhà khoa học đã tiến hành nuôi cấy trong phòng thí nghiệm dòng tế bào nguyên bào sợi lợn được bất hoạt thụ thể CD163, thụ thể đóng vai trò quyết định giúp kháng lại sự lây nhiễm virus gây hội chứng rối loạn sinh sản và hô hấp ở lợn (PRRSV), để từ đó tạo ra được phôi và các cá thể lợn bằng công nghệ nhân bản có khả năng kháng bệnh này (Yang và ctv, 2018; Pan và ctv, 2021). Cho đến nay Việt Nam, chỉnh sửa gen là lĩnh vực mới và chưa có báo cáo nào công bố về việc tạo được tế bào hay phôi lợn chỉnh sửa gen có khả năng kháng bệnh tai xanh. Do đó, việc nghiên cứu ứng dụng thành công kỹ thuật chỉnh sửa gen CRISPR/CAS9 tạo dòng tế bào kháng bệnh tai xanh ở lợn sẽ mở ra hướng nghiên cứu tạo phôi nhân bản và lợn chỉnh sửa gen có khả năng kháng bệnh tai xanh tại Việt Nam.

## 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Vật liệu

Nghiên cứu được thực hiện trên tế bào nguyên bào sợi nuôi cấy được phân lập từ lợn Bản (Sơn La) được chuyển vector CRISPR pX459-CD163 trong môi trường chứa Lipofectamine để chỉnh sửa vùng exon7 của gen thụ thể CD163.

### 2.2. Phương pháp

#### 2.2.1. Tạo và nhân dòng vector CRISPR pX459-CD163

Gắn đoạn ARN dẫn đường (gARN) vào Plasmid CRISPR pX459: Chúng

tôi sử dụng đoạn gARN có trình tự: 5'-GGTCGTGTTGAAGTACAACATGG-3' nhắm tới vùng exon7 của gen CD163 theo Yang và ctv (2018). Đoạn gARN mạch kép được tổng hợp trong phản ứng gồm: 1µl gARN (100 µM); 1µl sợi bổ sung với gARN (100µM); 1µl 10X T4 Ligation Buffer; 6,5µl ddH<sub>2</sub>O; 0,5µl T4 PNK với tổng thể tích phản ứng là 10µl. Chu trình nhiệt được đặt ở 37°C trong 30 phút, kết thúc ở 95°C trong 5 phút và dần hạ nhiệt độ về 25°C với tốc độ 5°C/phút.

Plasmid pX459 được cắt bằng enzyme cắt giới hạn BbsI theo quy trình phản ứng của nhà sản xuất (1µg plasmid; 1µl FastDigest BbsI; 1µl FastAP; 2µl 10X FastDigest Buffer và thêm ddH<sub>2</sub>O đến khi thể tích đạt 20µl). Sau khi cắt, plasmid mạch thẳng được kiểm tra bằng điện di trên gel agarose 1.5% và được tinh sạch bằng QIAquick Gel Extraction Kit (thời gel). Đoạn gARN kép được gắn vào plasmid pX459 theo phản ứng gồm: 50ng plasmid; 1µl gARN đã được tổng hợp; 5µl 2X Quickligation Buffer; 1µl Quick Ligase và thêm ddH<sub>2</sub>O đến tổng thể tích là 11µl. Phản ứng được ủ ở nhiệt độ phòng trong 10 phút để đóng vòng tạo thành vector CRISPR pX459-CD163 hoàn chỉnh.

*Biến nạp plasmid CRISPR pX459-CD163 vào vi khuẩn E. coli:* Dùng 1 ống tế bào One Shot Stbl3 *E. coli* được giải đông từ -80°C trên đá trong vòng 10 phút. Sau đó, thêm vào ống 5µl chứa 100 ng plasmid, trộn đều ống bằng cách búng nhẹ 5 lần. Đặt ống trên đá trong 30 phút, tiếp theo thực hiện sốc nhiệt ở 42°C trong vòng 45 giây và đặt lại ống trên đá trong vòng 2 phút. Thêm vào ống 250µl dung dịch SOC đã được ủ ấm về nhiệt độ phòng và đặt ống vào tủ ủ 37°C trong 60 phút, lắc với tốc độ 250rpm. Nuôi cấy vi khuẩn *E. coli* sau khi được biến nạp trên thạch LB agar và chọn lọc *E. coli* mang vector CRISPR pX459-CD163 bằng cách nuôi trong môi trường Agar có kháng sinh Ampicilin nồng độ 100 µg/ml.

*Tách chiết vector từ vi khuẩn E. coli:* 50ml dung dịch nuôi cấy vi khuẩn *E. coli* mang vector CRISPR pX459-CD163 sẽ được sử dụng để tách chiết plasmid theo kit Qiagen Plasmid

Midi Kit. Giải trình tự toàn bộ Vector CRISPR pX459-CD163 để kiểm tra lại trình tự và vị trí đột biến nhằm đảm bảo gARN được chèn đúng vị trí trên plasmid pX459.

### 2.2.2. Chuyển vector CRISPR pX459-CD163 vào tế bào nguyên bào sợi lợn

#### *Phân lập và nuôi cấy tế bào nguyên bào sợi lợn*

Nguyên bào sợi lợn được phân lập từ mô tai, sau đó được cấy chuyển và nuôi trong các đĩa Ø 3,5cm bằng môi trường nuôi tế bào (DMEM có bổ sung 10% huyết thanh thai bê và kháng sinh) đến khi nguyên bào sợi phủ kín khoảng 80-90% thì tiến hành chuyển vector CRISPR pX459-CD163 vào tế bào.

#### *Chuyển vector CRISPR pX459-CD163 vào tế bào nguyên bào sợi*

Nuôi tế bào đến khi mật độ tế bào trên đĩa 6 giếng đạt khoảng 80% thì thực hiện chuyển vector CRISPR pX459-CD163 vào trong tế bào bằng cách sử dụng Lipofectamine™ 3000 (Thermo). Với mỗi đĩa tế bào (Ø 3,5cm), chuẩn bị ống dung dịch Lipofectamine™ 3000 với hàm lượng từ 3,75µl đến 9,38µl, lần lượt thêm vào từng ống 125µl dung dịch Opti-MEM. Đồng thời chuẩn bị ống chứa 10µl plasmid CRISPR pX459-CD163 (nồng độ 10 µg/µl) và 5µl P3000 Reagent trong 125µl dung dịch Opti-MEM. Sau đó trộn đều 2 ống dung dịch trên rồi ủ ở nhiệt độ phòng trong 15 phút. Chia 250µl dung dịch hỗn hợp này vào từng đĩa tế bào nuôi cấy, lắc nhẹ đĩa và ủ ở 37°C trong khoảng 1-2 ngày.

#### *Sàng lọc các tế bào biến nạp thành công bằng nuôi trong môi trường có kháng sinh puromycin*

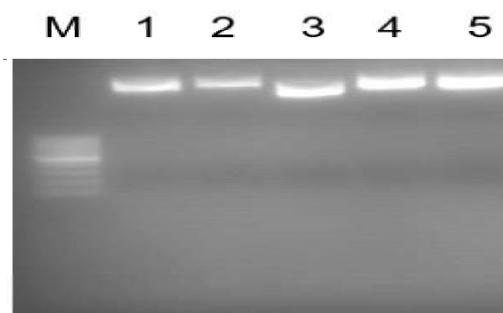
Sau 2 ngày, thay môi trường cho từng đĩa tế bào nuôi cấy và tiến hành chọn lọc tế bào đã được chuyển vector CRISPR pX459-CD163 thành công bằng nuôi trong môi trường có kháng sinh puromycin. Nồng độ puromycin được sử dụng trong khoảng 2-10 µg/ml được ủ trong vòng 2 ngày để đảm bảo các tế bào không được biến nạp vector sẽ chết. Sau đó thay môi trường chứa kháng sinh bằng môi trường nuôi bình thường để tiếp tục nuôi các tế bào đã được biến nạp vector.

#### *Giải trình tự vùng gen CD163*

Từ các mẫu thể bào sau khi được tiến hành chuyển vector CRISPR pX459-CD163 thành công tiến hành giải trình tự vùng gen CD163 để xác định kết quả chỉnh sửa. Tách chiết ADN từ tế bào nuôi cấy bằng bộ kit tách ADN của hãng Qiagen. Nhân đoạn gen CD163 bằng phản ứng PCR với cặp mồi trình tự mỗi xuôi 5'-GAATTGTCTC CAGGGAAGGA-3' và mỗi ngược 5'-AGCCCAGATCTGTCCACTTC-3' (Yang và ctv, 2018). Phản ứng PCR được thực hiện với tổng thể tích 25µl gồm 2,5µl đệm PCR 10X; 2,5µl dNTPs 2mM; 2,5µl MgCl<sub>2</sub>; 1µl mỗi xuôi và 1µl mỗi ngược 10pM; 0,3µl Taq polymerase (1 IU/µl), 1µl ADN nồng độ 30-50ng, nước tinh sạch khử trùng được thêm vào cho đủ 25µl. Chu trình nhiệt như sau: 94°C trong 10 phút, tiếp theo 35 chu kỳ ở 94°C trong 45 giây, 63°C trong 40 giây, 72°C trong 45 giây và 72°C trong 5 phút. Sau đó hạ xuống 4°C trong 15 phút hoặc để qua đêm. Sản phẩm của phản ứng PCR được tiến hành tinh sạch bằng bộ kit tinh sạch của hãng Invitrogen. Sản phẩm PCR được làm sạch được sử dụng là nguyên liệu cho phản ứng sequencing. Quá trình giải trình tự được tiến hành trên máy AB-3130 của hãng AB (Applied Biosystem) để kiểm tra kết quả chỉnh sửa gen.

## 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### 3.1. Tạo vector CRISPR pX459-CD163



**Hình 1. Ảnh điện di vector CRISPR pX459 sau khi cắt bằng enzyme cắt giới hạn BbsI**

M: Marker ADN ladder 100bp plus; 1, 2: vector pX330 (8484bp); 3: vector PGKpuro (5048bp); 4, 5: vector pX459 (9174bp)

## DI TRUYỀN - GIỐNG VẬT NUÔI

Vector CRISPR pX459 được cắt mở vòng bằng enzyme cắt giới hạn *BbsI* để tạo cầu nối cho gRNA gắn và điện di trên gel agarose 1.5% (Hình 1) sau đó vector CRISPR pX459 mở vòng được tinh sạch từ băng điện di bằng QIAquick Gel Extraction Kit. Thực hiện phản ứng để gắn gARN vào vector và biến nạp vào vi khuẩn *E. coli*

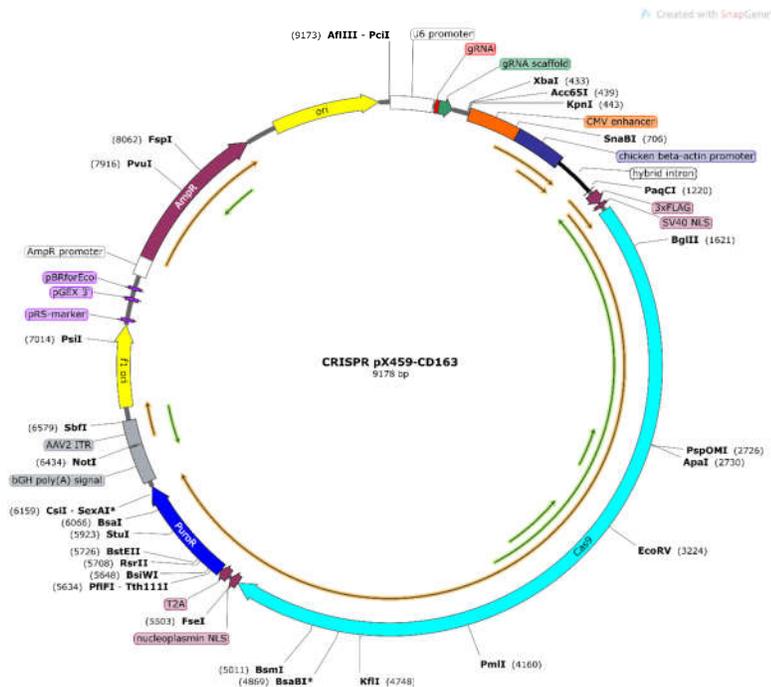
Vector CRISPR pX459-CD163 sau khi chuyển vào vi khuẩn *E. coli* được sàng lọc trên

môi trường chứa kháng sinh Ampicilin nồng độ 100 µg/ml. Sử dụng dung dịch 50ml *E. coli* nuôi cấy này để tách chiết đã thu được vector CRISPR pX459-CD163 nồng độ cao ~1700 ng/µl với độ tinh sạch cao ~1.8. Tiến hành giải trình tự ADN toàn bộ vector CRISPR pX459 (đối chứng) và vector CRISPR pX459-CD163 sau khi gắn đoạn gARN, kết quả cho thấy đoạn gRNA được gắn vào đúng vị trí cắt enzyme *BbsI* trên vector CRISPR pX459 (Hình 2 và 3).



Hình 2. gRNA được gắn vào đúng vị trí cắt enzyme *BbsI* trên vector CRISPR pX459

Trình tự đánh dấu đỏ là trình tự gRNA



Hình 3. Cấu trúc hoàn chỉnh vector CRISPR pX459-CD163

### 3.2. Chuyển vector CRISPR pX459-CD163 vào tế bào nguyên bào sợi

Nguyên bào sợi lợn được phân lập từ mô tai lợn Bản Sơn La sau 4 đợt phân lập được lưu giữ trong 200 cộng rạ ở môi trường ni to lỏng. Sau đó tế bào nguyên bào sợi được giải đông và cấy chuyển trong 10 đợt để chuẩn hóa quá trình chuyển vector CRISPR pX459-CD163. Lô thí nghiệm sử dụng 24 đĩa tế bào nguyên bào sợi tương ứng với 4 hàm lượng Lipofectamine từ 3,75 $\mu$ l đến 9,38 $\mu$ l; mỗi lô 6 đĩa tế bào để chuẩn hóa hàm lượng Lipofectamine. Sau 24h quan sát và kiểm tra trên kính hiển vi cho thấy các lô tế bào ở nồng độ Lipofectamin 3,75-7,5 $\mu$ l vẫn còn một số tế bào sống. Còn lô nuôi ở hàm lượng Lipofectamine 9,38 $\mu$ l không quan sát thấy tế bào sống (tế bào chết nổi lên trên bề mặt đĩa nuôi). Lô đối chứng không bổ sung Lipofectamine tế bào phát triển bình thường. Sau khi loại bỏ lô đĩa tế bào ở nồng độ Lipofectamine 9,38 $\mu$ l, còn lại 18 đĩa lô thí nghiệm chia tiếp làm 6 lô thí nghiệm để sàng lọc tế bào được chuyển thành công vector CRISPR pX459-CD163 bằng kháng sinh Puromycin nồng độ 2-12  $\mu$ g/ml. Sau 48h quan sát trên kính hiển vi cho thấy với nồng độ kháng sinh Puromycin 2-8  $\mu$ g/ml vẫn còn nhiều tế bào sống. Ở nồng độ kháng sinh Puromycin 10  $\mu$ g/ml còn rất ít tế bào sống, ở nồng độ kháng sinh Puromycin 12  $\mu$ g/ml không quan sát thấy tế bào sống. Lô thí nghiệm với tế bào không chuyển vector bổ sung kháng sinh Puromycine ở nồng độ 2  $\mu$ g/ml thì tế bào đều bị chết hết. Như vậy, hàm lượng Lipofectamine phù hợp để chuyển vector CRISPR pX459-CD163 vào nguyên bào sợi ở nghiên cứu này là 3,75-7,5 $\mu$ l trong 4ml thể tích đĩa nuôi tế bào, đồng thời phù hợp với khuyến cáo của hãng sản xuất. Nồng độ kháng sinh Puromycin phù hợp để sàng lọc các tế bào được chuyển vector thành công là 2-10  $\mu$ g/ml.

### 3.3. Giải trình tự vùng gen CD163

Mẫu tế bào nuôi cấy sau khi chuyển vector CRISPR PX459-CD163 bằng Lipofectamine và sàng lọc bằng môi trường chứa kháng sinh Puromycin được tách chiết ADN và nhân vùng gen CD163, sản phẩm có độ dài khoảng 380bp (Hình 4). Sản phẩm PCR từ các mẫu tế

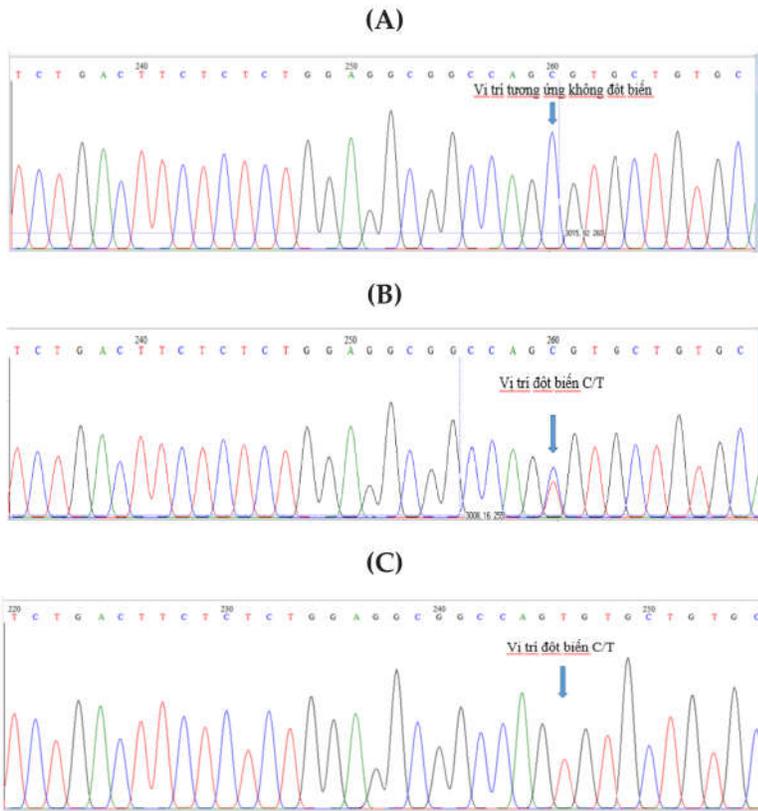
bào sau đó được tiến hành giải trình tự.



Hình 4. Kết quả PCR nhân vùng gen CD163 từ các mẫu tế bào sau khi chuyển vector CRISPR PX 459-CD163

M: marker ADN ladder 100bp plus 1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11 là mẫu PCR

Kết quả giải trình tự vùng gen CD163 từ 18 đĩa tế bào nuôi cấy sau khi chuyển thành công vector CRISPR PX 459 -CD163 ở các nồng độ Lipofectamine 3,75; 5,62 và 7,50 $\mu$ l và sàng lọc trong môi trường kháng sinh Puromycin nồng độ 2-10  $\mu$ g/ml, cùng với 2 đĩa tế bào đối chứng (không bổ sung Lipofectamine và Puromycin) cho thấy chỉ ở đĩa tế bào với hàm lượng Lipofectamine 7,5 $\mu$ l và Puromycin nồng độ 10  $\mu$ g/ml có hiện tượng chỉnh sửa gen tại vị trí 250 vùng exon7 biến đổi C thành T. Sau đó, tiếp tục thử nghiệm lô 6 đĩa tế bào nguyên bào sợi ở nồng độ Lipofectamine 7,5 trong thời gian 48h và sàng lọc bằng Puromycin nồng độ 10  $\mu$ g/ml. Kết quả chỉ có 3 đĩa tế bào còn sống sau 2 ngày bổ sung Puromycin. Nhật riêng tế bào sống từ mỗi đĩa này để nuôi tạo 12 dòng ở đĩa 96 giếng (đường kính 1cm). Sau 15 ngày nuôi, chỉ thu được 3 giếng có tế bào phát triển gần 80% (có nguồn gốc từ đĩa số 6), tiến hành phân lập dòng tế bào này và nuôi tiếp 9 đĩa Ø 3,5cm ở thể hệ tiếp theo bằng môi trường nuôi bình thường. Sử dụng 3 đĩa để giải trình tự trình tự vùng gen CDC163. Kết quả cũng cho thấy tương tự đã xuất hiện đột biến ở vùng exon7 tại vị trí 250 biến đổi C thành T (thay đổi axit amin Alanine thành Valine) (Hình 5). Trình tự vùng CD163 từ các mẫu tế bào cũng được so sánh với trình tự trên ngân hàng gen NCBI (DQ067278.1) cho thấy vùng được giải có chứa một phần in tron 6 và một phần exon7 (Hình 6).



Hình 5. Kết quả giải trình tự vùng gen CD163

Exon7. 4596690_15	5	15	25	35	45	55
Exon7. 4596690_15	65	75	85	95	105	115
Exon7. 4596690_15	125	135	145	155	165	175
Exon7. 4596690_15	185	195	205	215	225	235
Exon7. 4596690_15	245	255	265	275	285	295
Exon7. 4596690_15	305	315	325	335	345	355
Exon7. 4596690_15	365	375	385	395	405	415
Exon7. 4596690_15	425	435				

Hình 6. So sánh trình tự vùng gen CD163 từ các mẫu tế bào với trình tự tham chiếu từ ngân hàng gen DQ067278.1 (dấu mũi tên là vị trí đột biến C/T)

Vector CRISPR pX459 được sử dụng nhiều trong các nghiên cứu CRISPR/Cas9 bởi tính ưu việt chứa đựng tất cả các thành phần chỉnh sửa gen CRISPR/Cas9, chỉ thị chọn lọc kháng Puro-mycin và phù hợp để thực hiện chuyển vào các tế bào khác nhau (Kato-Inui và ctv, 2018). Trong nghiên cứu này, vùng exon7 của gen thụ thể CD163 được chúng tôi chỉnh sửa thành công gây biến đổi C thành T (thay đổi Alanine thành Valin). Nhiều báo cáo đã chỉ ra rằng, việc bị knock-out vùng exon7 của gen thụ thể CD163 giúp kháng lại sự lây nhiễm của virus động lực cao gây hội chứng rối loạn sinh sản và hô hấp ở lợn mà không gây ra tác dụng phụ hay làm ảnh hưởng đến chức năng sinh học khác của thụ thể CD163 (Whitworth và ctv, 2016; Yang và ctv, 2018; Wang và ctv, 2019). Trong nghiên cứu này, vector CRISPR pX459-CD163 được tổng hợp, tách dòng và tách chiết thành công, đã được sử dụng để chuyển vào tế bào nguyên bào sợi lợn, tạo ra những tế bào nguyên bào sợi biến đổi vùng exon7 của gen thụ thể CD163 có khả năng kháng lại virus gây bệnh tai xanh ở lợn. Kết quả của nghiên cứu là tiền đề nhằm tạo ra những phôi và cá thể lợn khỏe mạnh được chỉnh sửa gen có khả năng kháng lại virus gây bệnh tai xanh, từ đó giúp cải thiện, nâng cao hiệu suất và hiệu quả chăn nuôi lợn.

#### 4. KẾT LUẬN

Đã tạo thành công vector CRISPR pX459 chứa đoạn gRNA nhắm đến vùng exon7 của gen thụ thể CD163 và chuyển thành công vào tế bào nguyên bào sợi lợn để tạo được tế bào đột biến vùng exon7 gây bất hoạt thụ thể CD163 nhằm kháng virus gây bệnh tai xanh..

Sử dụng kết quả nghiên cứu này để tạo phôi và lợn nhân bản có khả năng kháng virus gây bệnh tai xanh.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Burkard C., Opriessnig T., Mileham A.J., Stadejek T., Ait-Ali T., Lilloco S.G., Whitelaw C.B.A. and Archibald A.L. (2018). Pigs lacking the scavenger receptor cysteine-rich domain 5 of CD163 are resistant to porcine reproductive and respiratory syndrome virus 1 infection. *J. Virol.*, **13**(2): e1006206. doi: 10.1371/journal.ppat.1006206.
- Calvert J.G., Slade D.E., Shields S.L., Jolie R., Mannan R.M., Ankenbauer R.G. and Welch S.K.W. (2007). CD163 expression confers susceptibility to porcine reproductive and respiratory syndrome viruses. *J. Virol.*, **81**: 7371-79.
- Guo C., Wang M., Zhu Z., He S., Liu H., Liu X., Shi X., Tang T., Yu P. and Zeng J. (2019). Highly efficient generation of pigs harboring a partial deletion of the CD163 SRCR5 domain, which are fully resistant to porcine reproductive and respiratory syndrome virus 2 infection. *Front. Immunol.* **10**: 1846.
- Kato-Inui T., Takahashi G., Hsu S. and Miyaoka Y. (2018). Clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR)/CRISPR-associated protein 9 with improved proof-reading enhances homology-directed repair. *Nucleic Acids Res.* **46**: 4677-4688. <https://doi.org/10.1093/nar/gky264>.
- Ma H., Jiang L., Qiao S., Zhi Y., Chen X.X., Yang Y., Huang X., Huang M., Li R. and Zhang G.P. (2017). The crystal structure of the fifth scavenger receptor cysteine-rich domain of porcine CD163 reveals an important residue involved in porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection. *J. Virol.*, **91**(3): e01897-16. doi: 10.1128/JVI.01897-16.
- Pan J., Lin Z., Wen J., Guo J., Wu X., Liu Y., Lai W., Liang Q., Xie Y. and Chen Y. (2021). Application of the Modified Cytosine Base-Editing in the Cultured Cells of Bama Minipig.
- Patton J.B., Rowland R.R., Yoo D. and Chang K.O. (2009). Modulation of CD163 receptor expression and replication of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in porcine macrophages. *Virus Res.*, **140**: 161-71.
- Schaer D.J., Christian A.S., Paul W.B., Robert A.B., Gabriele S., Abdu I.A. and Andreas S. (2006). CD163 is the macrophage scavenger receptor for native and chemically modified hemoglobins in the absence of haptoglobin. *Blood*, **107**(1): 373-80.
- Wang H., Shen L., Chen J., Liu X., Tan T., Hu Y., Bai X., Li Y., Tian K. and Li N. (2019). Deletion of CD163 exon 7 confers resistance to highly pathogenic porcine reproductive and respiratory viruses on pigs. *Int. J. Biol. Sci.*, **15**: 1993.
- Whitworth K.M., Lee K., Benne J.A., Beaton B.P., Spate L.D., Murphy S.L., Samuel M.S., Mao J., O'Gorman C., Walters E.M., Murphy C.N., Driver J., Mileham A., McLaren D., Wells K.D. and Prather R.S. (2014). Use of the CRISPR/Cas9 System to Produce Genetically Engineered Pigs from In Vitro-Derived Oocytes and Embryos. *Biol. Rep.*, **91**. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.114.121723>.
- Whitworth K.M., Rowland R.R., Ewen C.L., Tribble B.R., Kerrigan M.A., Cino-Ozuna A.G., Samuel M.S., Lightner J.E., McLaren D.G. and Mileham A.J. (2016). Gene-edited pigs are protected from porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Nat. Biotechnol.*, **34**: 20-22.
- Yang H., Zhang J., Zhang X., Shi J., Pan Y., Zhou R., Li G., Li Z., Cai G. and Wu Z. (2018). CD163 knockout pigs are fully resistant to highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Antiviral Res.*, **151**: 63-70.

## ẢNH HƯỞNG GIAI ĐOẠN BỔ SUNG YẾU TỐ TĂNG TRƯỞNG NỘI MAO MẠCH TRONG MÔI TRƯỜNG NUÔI THÀNH THỰC TẾ BÀO TRỨNG ĐẾN SỰ THÀNH THỰC NHÂN VÀ PHÁT TRIỂN CỦA PHÔI ĐƠN TÍNH Ở HEO THU TỬ NANG NOÃN NHỎ

Nguyễn Thanh Ngân<sup>1</sup> và Nguyễn Ngọc Tấn<sup>1\*</sup>

Ngày nhận bài báo: 10/10/2022 - Ngày nhận bài phản biện: 20/10/2022

Ngày bài báo được chấp nhận đăng: 12/11/2022

<sup>1</sup> Trường Đại học Nông Lâm Tp. Hồ Chí Minh

\* Tác giả liên hệ: TS. Nguyễn Ngọc Tấn, Giảng viên chính. Khoa Khoa học Sinh học - Trường ĐH Nông Lâm Tp. Hồ Chí Minh; Điện thoại: 0948 993 338; Email: nntan@hcmuaf.edu.vn.