

## THIẾT KẾ VECTOR CRISPR/CAS9 MANG gRNA ĐỊNH HƯỚNG ĐỘT BIẾN GEN *SLIAA9* CỦA CÀ CHUA

Bùi Mạnh Minh<sup>1</sup>, Hà Hồng Hạnh<sup>1</sup>, Lê Thị Thu Hiền<sup>1,2</sup>, Huỳnh Thị Thu Huệ<sup>1,2,✉</sup>

<sup>1</sup>Viện Nghiên cứu hệ gen, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

<sup>2</sup>Học viện Khoa học và Công nghệ, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

✉Người chịu trách nhiệm liên lạc. E-mail: hthue@igr.ac.vn

Ngày nhận bài: 24.10.2019

Ngày nhận đăng: 20.11.2019

### TÓM TẮT

Quả cà chua (*Solanum lycopersicum*) là thực phẩm giàu dinh dưỡng chứa nhiều hợp chất thứ cấp rất có lợi cho sức khỏe. Sự tạo thành quả cà chua thông qua thụ tinh được điều khiển bởi hormone thực vật auxin thông qua các protein Aux/IAA9 và ARF8. Việc gây đột biến bất hoạt gen *SLIAA9* mã hóa cho auxin IAA9 sẽ dẫn đến sự phát triển quả cà chua không thông qua thụ tinh hay quả cà chua không hạt. Hiện nay, hệ thống CRISPR/Cas9 ngày càng được sử dụng phổ biến trong chỉnh sửa các gen mong muốn trên đối tượng thực vật. Trong nghiên cứu này, chúng tôi trình bày các kết quả thiết kế đoạn gRNA vào vector mang cấu trúc CRISPR/Cas9 hướng đến gen *SLIAA9* của cà chua đồng thời thử nghiệm khả năng tiếp nhận cấu trúc mang *Cas9* ở cây cà chua chuyển gen từ cấu trúc pRGEB31-IAA9G2. Nghiên cứu đã tạo được 2 chủng vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens* mang các vector pRGEB31-IAA9G2 và pRGEB32-IAA9G2 chứa các cấu trúc biểu hiện hệ CRISPR/Cas9 hướng tới gen *SLIAA9* trên cà chua. Chủng *A. tumefaciens* pRGEB31-IAA9G2 đã được sử dụng để chuyển gen vào cà chua giống Micro-Tom. Kết quả PCR kiểm tra các dòng chuyển gen cho thấy 5/14 cây chuyển gen thế hệ T0 có mặt gen *Cas9* trong hệ gen, như vậy đã có sự tiếp nhận đoạn cấu trúc *Cas9* vào hệ gen cà chua. Việc đánh giá hiệu suất gây đột biến, kiểu đột biến và độ ổn định của các đột biến trên gen đích *SLIAA9* sẽ được tiến hành trên các cây thế hệ sau, khi cây có sự phát triển bình thường về hình thái cũng như có sự phân ly về gen *Cas9* được chuyển vào.

**Từ khóa:** Auxin, cà chua, CRISPR/Cas9, gen *IAA9*

### ĐẶT VẤN ĐỀ

Cà chua (*Solanum lycopersicum*) được biết đến như một trong các loại rau lấy quả được tiêu thụ nhiều nhất trên thế giới. Sản lượng cà chua toàn cầu đã đạt đến hơn 177 triệu tấn vào năm 2016 (<http://www.fao.org/faostat/en/>). Cà chua thuộc họ Cà (Solanaceae), là họ hàng thân thuộc với nhiều cây hoa màu và cây công nghiệp có giá trị như khoai tây (*Solanum tuberosum*), cà tím (*Solanum melongena*), ớt chuông (*Capsicum annuum*) và thuốc lá (*Nicotiana tabacum*). Quả cà chua chín chứa một lượng lớn các chất có giá trị dinh dưỡng như đường, các protein và các hợp chất thứ cấp. Các hợp chất thứ cấp quan trọng

bao gồm saponin ( $\alpha$ -tomatine, tomatidine), carotenoids (lycopen,  $\beta$ -carotene), các flavonoid và các vitamin (Friedman *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2013; Karlova *et al.*, 2014).

Auxin là hormone thực vật quan trọng tham gia điều hòa hầu hết các quá trình sinh trưởng phát triển của thực vật, trong đó có quá trình sinh trưởng của quả. Ở thực vật, auxin được tổng hợp tại các mô phân sinh ngọn và chồi lá, sau đó được vận chuyển đến các phần khác nhau của cây để thực hiện chức năng điều hòa (Leyser, 2006). Cơ chế điều hòa của các gen phản ứng với auxin dựa trên sự phân hủy các protein cảm ứng auxin (Aux/IAA) và giải phóng các yếu tố điều hòa

phiên mã auxin (ARF). Trong số các auxin, ARF8 và IAA9 là 2 protein tham gia vào quá trình điều hòa sự hình thành và phát triển hạt, cụ thể chúng ức chế sự phát triển quả khi không có sự thụ tinh (Wang *et al.*, 2005; Goetz *et al.*, 2006; Goetz *et al.*, 2007; Pandolfini, 2009; Mazzucato *et al.*, 2015).

Trong điều kiện biến đổi khí hậu, tình trạng quả không hạt của cà chua là một đặc điểm quý nhằm tăng năng suất của loại cây trồng này vì sự thụ phấn của cà chua rất nhạy cảm với nhiệt độ cao trung bình hoặc nhiệt độ thấp (Wang *et al.*, 2005; Klap *et al.*, 2017). Phương pháp phổ biến để tạo quả ít/không hạt là xử lý hóa chất auxin, gibberellin và cytokinin hoặc hỗn hợp của các hormone thực vật này ở giai đoạn hoa trước khi thụ phấn. Phương pháp này có thể áp dụng rộng rãi cho các loại hoa quả như nho, cà chua, cà tím (Gillaspy *et al.*, 1993). Tuy nhiên, các phương pháp dùng hóa chất hiện nay không được người tiêu dùng ưa chuộng. Thông qua phương pháp gây đột biến và chọn lọc di truyền truyền thống dòng cà chua (*entire*) đã được chọn lọc với gen *IAA9* bị đột biến, tuy nhiên dòng này mang nhiều đặc điểm hình thái không mong muốn và khả năng hữu thụ thấp (Saito *et al.*, 2011; Mazzucato *et al.*, 2015). Việc bất hoạt gen *IAA9* thông qua phương pháp can thiệp RNA (RNA interfering) cũng dẫn đến một số biểu hiện phát triển bất thường như tạo lá đơn thay vì lá kép, tăng độ dài thân sinh trưởng (hypocotyl), giảm ưu thế ngọn, tuy nhiên các đặc điểm hình thái của quả như màu sắc, độ cứng hay kích thước gần như không thay đổi (Wang *et al.*, 2005). Gần đây, bất hoạt gen *IAA9* của cà chua (*Solyc04g076850* - đoạn trình tự gen *IAA9* trong hệ gen) thông qua phương pháp CRISPR/Cas9 có thể tạo đột biến trên gen và hình thành allele cà chua không hạt (Ueta *et al.*, 2017). Các tính trạng được tạo nên bởi chỉnh sửa các gen *SIIAA9* thông qua kỹ thuật CRISPR/Cas9 đều là các allele lặn và có thể được di truyền cho các thế hệ sau thông qua việc lai tạo với giống truyền thống (Klap *et al.*, 2017; Ueta *et al.*, 2017; Yu *et al.*, 2017).

Trong suốt một thập kỷ qua, hệ thống CRISPR/Cas9 đã được sử dụng để chỉnh sửa gen

trên nhiều đối tượng sinh vật (Jiang *et al.*, 2013; Platt *et al.*, 2014; Xue *et al.*, 2014). Hệ thống được xây dựng dựa trên cơ chế “miễn dịch” của vi khuẩn chống lại sự xâm nhiễm của phân tử DNA ngoại lai từ virus hoặc DNA plasmid (Doudna, Charpentier, 2014). Enzyme Cas9, một endonuclease được phân lập từ *Streptococcus pyrogenes*, sẽ kết hợp với một phân tử RNA dẫn đường (gRNA) và phá hủy DNA ngoại lai (Cong *et al.*, 2013). Để thao tác trên các đối tượng thực vật, gen mã hóa Cas9 và gRNA đã được cải biến để phù hợp biểu hiện trong tế bào thực vật (Pan *et al.*, 2016). Hệ thống CRISPR/Cas9 cho phép các nhà khoa học thiết kế các gRNA phù hợp với vị trí đích, từ đó định hướng enzyme Cas9 tạo điểm cắt ở vị trí đặc hiệu trên gen. Công nghệ chỉnh sửa gen nhờ hệ thống CRISPR/Cas9 đã được nhiều nhóm nghiên cứu ứng dụng tạo giống cây trồng mới như lúa, ngô, khoai tây, cà chua (Shan *et al.*, 2013; Doudna, Charpentier, 2014; Xie *et al.*, 2014; Pan *et al.*, 2016; Char *et al.*, 2017). Việc chuyển hệ thống CRISPR/Cas9 vào cây có thể sử dụng phương pháp bắn gen hoặc thông qua vi khuẩn *A. tumefaciens* - hệ chuyển gen phổ biến và thuận lợi khi đánh giá ở những thế hệ sau (Pan *et al.*, 2016; Char *et al.*, 2017). Công nghệ CRISPR/Cas9 tạo nên những giống cây trồng có đặc điểm mới nhờ chỉnh sửa gen hoặc bất hoạt gen mà không chuyển thêm gen ngoại lai vào hệ gen nên cây trồng được tạo ra nhờ công nghệ này được coi là cây có đột biến hướng đích, không phải cây trồng biến đổi gen (GMOs) (Doudna, Charpentier, 2014).

Trong những thử nghiệm chỉnh sửa hệ gen sử dụng kỹ thuật CRISPR/Cas9 trên đối tượng thực vật, cấu trúc biểu hiện Cas9 đã có nhiều điểm thay đổi để phù hợp với mục đích và đối tượng thí nghiệm khác nhau. Cụ thể, trình tự sgRNA có kích thước khoảng 98 nucleotide thường được biểu hiện dưới sự điều khiển của U3 hoặc U6 RNA promoter (Jiang *et al.*, 2013). Cả cấu trúc biểu hiện sgRNA thường có kích thước nhỏ (300-600 bp) (Bryksin, Matsumura, 2013; Kadkhodaei *et al.*, 2016). Các cấu trúc này có thể được gắn trực tiếp vào vùng T-DNA vector chuyển gen thông qua các kỹ thuật Golden Gate hoặc kỹ thuật PCR Gibson (Shan *et al.*, 2013;

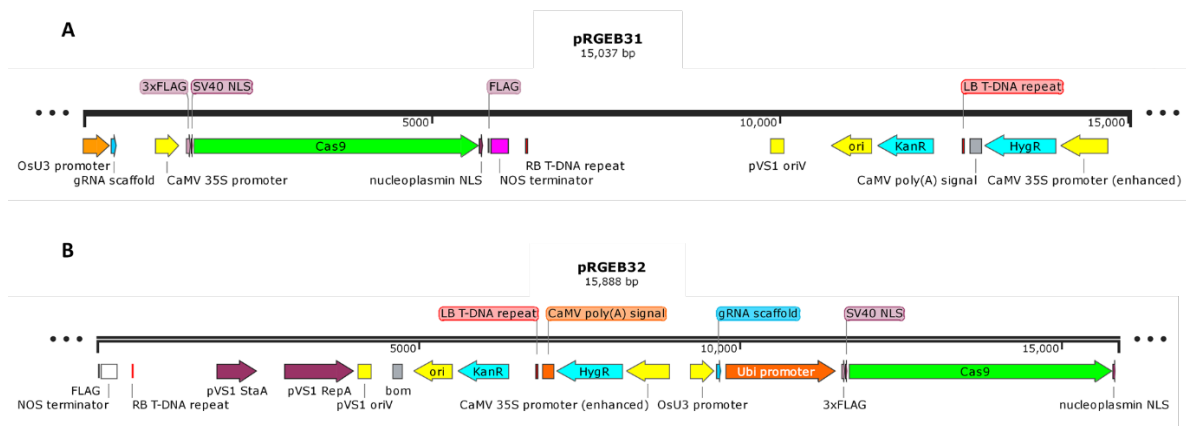
Fan *et al.*, 2015). Protein Cas9 được mã hóa bởi đoạn DNA có kích thước 4107 bp. Để biểu hiện trên tế bào nhân chuẩn, đoạn mã hóa này được nối với 2 tín hiệu biểu hiện nhân NLS (nuclear localization signal). Nhằm tăng hiệu suất biểu hiện trên thực vật, các mã bộ ba trên gen Cas9 có nguồn gốc từ vi khuẩn *S. pyrogenes* đã được sửa đổi để tối ưu biểu hiện trên thực vật *Arabidopsis* và lúa gạo (Jiang *et al.*, 2013; Shan *et al.*, 2013; Xie, Yang, 2013; Ma *et al.*, 2015). Để biểu hiện trên lúa gạo, đầu 5' của gen Cas9 đã được thay đổi để tăng hàm lượng GC lên (Ma *et al.*, 2015). Trình tự mã hóa gen Cas9 thường được biểu hiện dưới những promoter mạnh như CaMV35S hoặc Ubiquitin từ ngô có thể nâng cao hiệu suất chỉnh sửa của protein Cas9 (Brooks *et al.*, 2014). Sau đó, cả cấu trúc biểu hiện sgRNA và Cas9 được kết hợp lại trên T-DNA và được đưa vào tế bào thực vật thông qua *A. tumefaciens* (Jiang *et al.*, 2013; Shan *et al.*, 2013; Brooks *et al.*, 2014; Fan *et al.*, 2015; Ma *et al.*, 2015). Hiệu suất gây đột biến mục tiêu đích được ước lượng khoảng 3-8% (Xie, Yang, 2013).

Trong nghiên cứu này, chúng tôi thiết kế gRNA hướng đến chỉnh sửa gen *SIIAA9* trên cây cà chua và tạo chủng *A. tumefaciens* chứa cấu trúc biểu hiện gRNA đã thiết kế cùng hệ thống CRISPR/Cas9. Phương pháp thiết kế các gRNA trong vector mang cấu trúc biểu hiện CRISPR/Cas9 có thể tiếp tục được khai thác để chỉnh sửa các gen mục tiêu ở nhiều cây trồng có giá trị trong tương lai.

## NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

### Nguyên liệu

Plasmid pRGE31 và pRGE32 được cung cấp bởi Công ty Addgene (MA, Hoa Kỳ) (Hình 1). Các đoạn oligonucleotide được cung cấp bởi Công ty IDT (Illinois, Hoa Kỳ) (Bảng 1). Các chủng vi khuẩn *Escherichia coli* DH10B, *A. tumefaciens* EHA do Phòng Đa dạng sinh học hệ gen lưu trữ. Giống cà chua Micro-Tom được cung cấp bởi Viện Nghiên cứu rau quả.



**Hình 1.** Sơ đồ giản lược cấu trúc vector pRGE31 (A) và pRGE32 (B) có chứa T-DNA biểu hiện hệ thống CRISPR/Cas9 trên thực vật.

### Phương pháp

Các bước tạo vector chứa hệ thống CRISPR/Cas9 hướng đến gen *IAA9* của cà chua

(*SIIAA9*) được thực hiện theo Xie và đồng tác giả (2014) với một vài cải biến nhỏ cho phù hợp với điều kiện phòng thí nghiệm.

**Bảng 1.** Trình tự các môi được sử dụng trong nghiên cứu.

Tên trình tự	Trình tự (5'-3')	Gen đích
IAA9-G2-F	GGCAGGGTCTATCTGATTGTTTCGT	Trình tự spacer cho gRNA cho exon 1 gen <i>SIIAA9</i>
IAA9-G2-R	AAACACGAACAATCAGATAGACCC	
IAA9-E1-R	ACACCGGAATTCGACAGAAA	Khuếch đại exon 1 gen <i>SIIAA9</i>
IAA9-E1-F	TGAAATGAGCTGTGCAGGAT	
IAA9-G2-F	GGCAGGGTCTATCTGATTGTTTCGT	Đoạn gRNA chèn
OsU3-R1	CTGGAGATTATTGCTCGGGTAGA	
Cas9-F	TCCTGGAAAAGATGGACGGC	Sàng lọc đoạn mang gen <i>Cas9</i>
Cas9-R	ATCCGCTCGATGAAGCTCTG	

#### Xác định trình tự exon 1 của gen *SIIAA9*

Exon 1 của gen *SIIAA9* được khuếch đại sử dụng các cặp môi IAA9-E1-(F-R) tương ứng (Bảng 1) với nhiệt độ gắn môi 54°C. Thể tích mỗi phản ứng được đưa về 20 µL theo đúng tỷ lệ của nhà sản xuất chứa 8,1 µL H<sub>2</sub>O, 10 µL DreamTaq Master Mix 2x (Thermo Fisher Scientific, MA, Hoa Kỳ), 0,4 µL mỗi 10 µM mỗi loại và 0,5 µL khuôn DNA tổng số của cây cà chua Micro-Tom. Phản ứng bao gồm 35 chu kỳ khuếch đại với nhiệt độ gắn môi 54°C trong 25 s và kéo dài chuỗi 30 s. Sản phẩm PCR tinh sạch được điện di trên gel 1% với marker phù hợp (Hình 2A). Sản phẩm PCR tinh sạch được xác định trình tự bằng máy giải trình tự ABI 3500 (Thermo Fisher Scientific, MA, Hoa Kỳ). Kết quả xác định trình tự được so sánh với trình tự exon 1 của gen *SIIAA9* có mã số Solyc04g076850 trên Ngân hàng dữ liệu Sol Genomic.

#### Thiết kế trình tự gRNA đặc hiệu cho gen *SIIAA9* (*Solyc04g076850*)

Trình tự gRNA-spacer được thiết kế theo web tool CRISPR-P ver.2.0 (<http://crispr.hzau.edu.cn/cgi-bin/CRISPR2/CRISPR>) với thông tin đầu vào là trình tự exon 1 của gen *SIIAA9* (*Solyc04g076850*). Trình tự gRNA được lựa chọn với tiêu chí có chỉ số on-target cao, chỉ số off-target thấp và không có bắt cặp nhầm với vị trí có CDS của gen khác. Sau khi đã lựa chọn được những đoạn DNA mục tiêu đích, những đầu nối thích hợp sẽ được gắn thêm vào đầu 5' của những đoạn môi tương ứng. Cụ thể đoạn môi

xuôi của gRNA sẽ được gắn thêm trình tự 5'-GGCA-3' hoặc 5'-GGC-3' trong khi đoạn môi ngược sẽ được gắn thêm trình tự 5'-AAAC-3' trong trường hợp môi không bắt đầu với nucleotide A.

#### Phản ứng cắt-nối đưa gRNA vào vector biểu hiện

Với 1 µL của mỗi môi xuôi và ngược (nồng độ 100 µM) của gRNA2 cho gen *SIIAA9* được trộn với nhau trong 48 µL H<sub>2</sub>O. Phản ứng bắt cặp được diễn ra 5 min ở 95°C và làm lạnh ngay trên đá 20 min.

Với 1 µL của mỗi phản ứng bắt cặp bổ sung của gRNA2 được trộn với 100 ng của mỗi vector pRGEB31 và pRGEB32 đã được cắt mở vòng. Hỗn hợp được bổ sung thêm 3 µL đệm T4 Ligase 10x, 3 µL BSA 1mg/mL, 0,5 µL BsaI (Thermo Scientific), 1 µL T4 ligase và bổ sung thêm nước đến 30 µL. Phản ứng cắt-nối được tiến hành bắt đầu bằng 37 °C trong 5 min, sau đó là 40 chu kỳ (20°C 5 min, 37°C 5 min). Phản ứng kết thúc với 50°C 10 min và 80°C 10 min và bảo quản ở 16 °C.

#### Biến nạp plasmid vào tế bào khả biến *E. coli* /*A. tumefaciens* bằng phương pháp xung điện

Tổng 5 µL của mỗi phản ứng cắt-nối được biến nạp vào 45 µL tế bào khả biến *E. coli* DH10B hoặc *A. tumefaciens* bằng phương pháp xung điện với điều kiện 2,5 kv, 25 µF và 200Ω bằng cuvet 0,2 cm. Sau khi xung điện bổ sung 950 µL LB lỏng và nuôi phục hồi 1 giờ ở 37°C. Tất cả tế bào được cấy trải trên môi trường thạch LB có bổ sung Kanamycin 50 µg/µL và nuôi qua đêm ở 37°C.

#### Phản ứng PCR kiểm tra sự có mặt của đoạn chèn

Đoạn gen chứa cấu trúc đoạn gRNA2 chèn vào vector được khuếch đại lên bằng mỗi OsU3-R1 và IAA9G2-F trên 2 vector pRGEB31 và pRGEB32 (Ký hiệu lần lượt là pRGEB31-IAA9G2 và pRGEB32- IAA9G2). Trong tổng thể tích phản ứng là 20  $\mu$ L bao gồm 8.1  $\mu$ L H<sub>2</sub>O, 10  $\mu$ L DreamTaq Master Mix 2x (Thermo Fisher Scientific, MA, Hoa Kỳ), 0.4  $\mu$ L mỗi 10  $\mu$ M mỗi loại và 0.5  $\mu$ L khuôn DNA plasmid. Chu kỳ nhiệt bao gồm 1 bước biến tính 95°C trong 5 min, tiếp theo là 32 chu kỳ (95°C, 30 s; 60°C 25 s; 72°C, 30 s). Phản ứng kết thúc được bảo quản ở 16°C. Tổng 5  $\mu$ L của các phản ứng PCR được điện di trên gel agarose 1% để kiểm tra sự có mặt của đoạn cấu trúc.

#### Chuyển gen vào cây cà chua thông qua vi khuẩn *A. tumefaciens* và tái sinh cây

Hạt cà chua được khử trùng bề mặt lần lượt bằng cồn 70° và Sodium hypochlorite 2.5%, rửa sạch bằng nước cất khử trùng và đem gieo trên môi trường Murashige và Skoog (MS) đặc có bổ sung succrose 3% và agar (8 g/L). Sau 14 ngày, các lá mầm cà chua đạt đến kích thước tối thiểu 0,5 cm được dùng làm nguyên liệu cho việc chuyển gen.

Vi khuẩn *A. tumefaciens* được nuôi phục hồi qua đêm trong môi trường LB lỏng có bổ sung kháng sinh kanamycin 50  $\mu$ g/mL. Tiến hành pha loãng dịch khuẩn trong môi trường MS 0.5X lỏng đến OD<sub>600</sub> khoảng 0.2 - 0.4 có thể tiến hành chuyển gen. Các lá mầm được cắt 2 đầu và thân mầm được cắt thành các mảnh nhỏ dài 0,5 cm trên đĩa petri khử trùng và tiến hành lây nhiễm với dịch khuẩn pha loãng bổ sung acetosyringone (AS) 0.1 mg/L trong vòng 20 phút. Các mảnh lá sau lây nhiễm được đưa lên môi trường đồng nuôi cây MS đặc bổ sung AS 0,1 mg/L, NAA 1 mg/L, succrose 3% không kháng sinh và đặt trong tối 48 giờ ở nhiệt độ phòng. Các mảnh lá được đặt lên môi trường tái sinh ngọn MS có bổ sung succrose 3%, MS vitamin, nước dừa (v/v=1:10), zeatin 2 mg/L, IAA 0,1 mg/L, cefotaxime 400 mg/L và kanamycin 50 mg/L. Mẫu được chuyển sang môi trường nuôi cây mới 2 tuần/ lần cho đến khi xuất hiện các chồi ngọn.

Khi ngọn dài khoảng 3-4 cm, các ngọn được cắt và chuyển sang môi trường sinh rễ MS có bổ sung succrose 3% (30 g/L), MS vitamin và IAA (1 mg/L). Cây con sẽ được chuyển sang môi trường bầu hun sau khi mọc rễ.

#### Phản ứng PCR kiểm tra sự có mặt của gen *Cas9*

Đoạn gen chứa cấu trúc *Cas9* chèn vào hệ gen thực vật được khuếch đại bằng mỗi Cas9F và Cas9-R sử dụng khuôn là DNA tổng số của cây cà chua. Trong tổng thể tích phản ứng là 20  $\mu$ L bao gồm 8.1  $\mu$ L H<sub>2</sub>O, 10  $\mu$ L DreamTaq Master Mix 2x (Thermo Fisher Scientific, MA, Hoa Kỳ), 0.4  $\mu$ L mỗi 10  $\mu$ M mỗi loại và 0.5  $\mu$ L khuôn DNA plasmid. Chu kỳ nhiệt bao gồm 1 bước biến tính 95°C trong 5 min, tiếp theo là 32 chu kỳ (95°C, 30s; 55°C 25s; 72°C, 30s). Phản ứng kết thúc được bảo quản ở 16°C. Tổng 5  $\mu$ L của các phản ứng PCR được điện di trên gel agarose 1% để kiểm tra sự có mặt của đoạn cấu trúc với kích thước dự kiến là 350 bp.

## KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

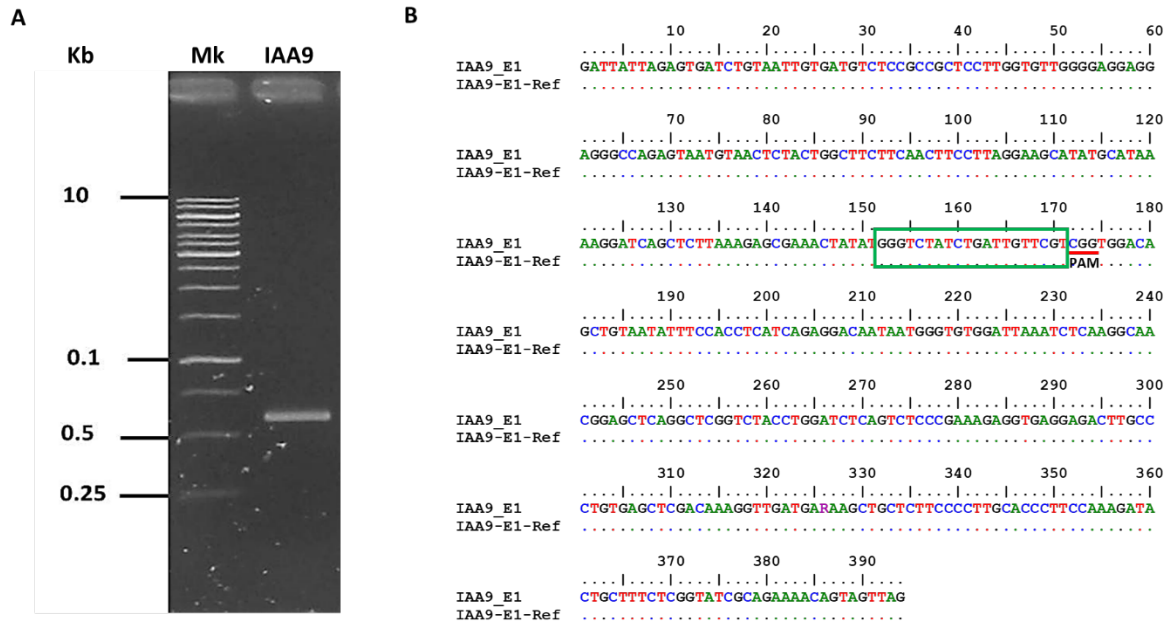
### Phân lập và thiết kế trình tự gRNA hướng đến exon 1 của gen *SIIA9* trên cây cà chua Micro-Tom

Toàn bộ đoạn exon 1 của gen *SIIA9* trên cây cà chua Micro-Tom được nhân lên bởi các cặp mỗi tương ứng (Bảng 1) với nhiệt độ gắn mỗi là 60°C. Sản phẩm PCR có kích thước thiết kế 560 bp được giải trình tự và so sánh với trình tự exon 1 của gen *SIIA9* trên Ngân hàng dữ liệu Sol Genomic với số hiệu tham chiếu Solyc04g076850.2 (Hình 2). Kết quả cho thấy hai trình tự exon 1 có độ tương đồng cao (99%) và có thể sử dụng trình tự exon 1 đã phân lập được để thiết kế trình tự spacer của gRNA dùng cho hệ thống CRISPR/Cas9 hướng đến *SIIA9* của cà chua.

Trình tự spacer của gRNA được thiết kế theo web tool CRISPR-P ver.2.0 (<http://crispr.hzau.edu.cn/cgi-bin/CRISPR2/CRISPR>). Vị trí được thiết kế nằm trên đoạn sense của exon1 của gen *SIIA9* là 5'-GGGTCTATCTGATTGTTTCGT (CGG) - 3' với chỉ số on-target: 0.6688 và không có CDS off-target trong hệ gen cà chua Micro-Tom (Hình 2B). Do trình tự này được bắt đầu

bằng nucleotide G nên sẽ được nối với các adapter 5'-GGCA-3' trên đoạn oligonucleotide mỗi xuôi

(SIIAA9G2-F) và 5'-AAAC-3' trên đoạn oligonucleotide mỗi ngược.



**Hình 2.** Kết quả phân lập, giải trình tự và thiết kế đoạn spacer cho gRNA hướng đến gen *SIIAA9*. (A) Kết quả tinh sạch sản phẩm PCR có kích thước 560 bp chứa exon 1 của cây cà chua Micro- Tom. (B) Kết quả so sánh trình tự với trình tự exon 1 tham chiếu (Solyc04g076850.2) và kết quả thiết kế đoạn spacer cho gRNA hướng đến exon 1 của gen *SIIAA9*; PAM: Protospacer Adjacent Motif được đánh dấu đỏ; trình tự spacer đã thiết kế được đánh dấu trong ô vuông xanh lá cây.

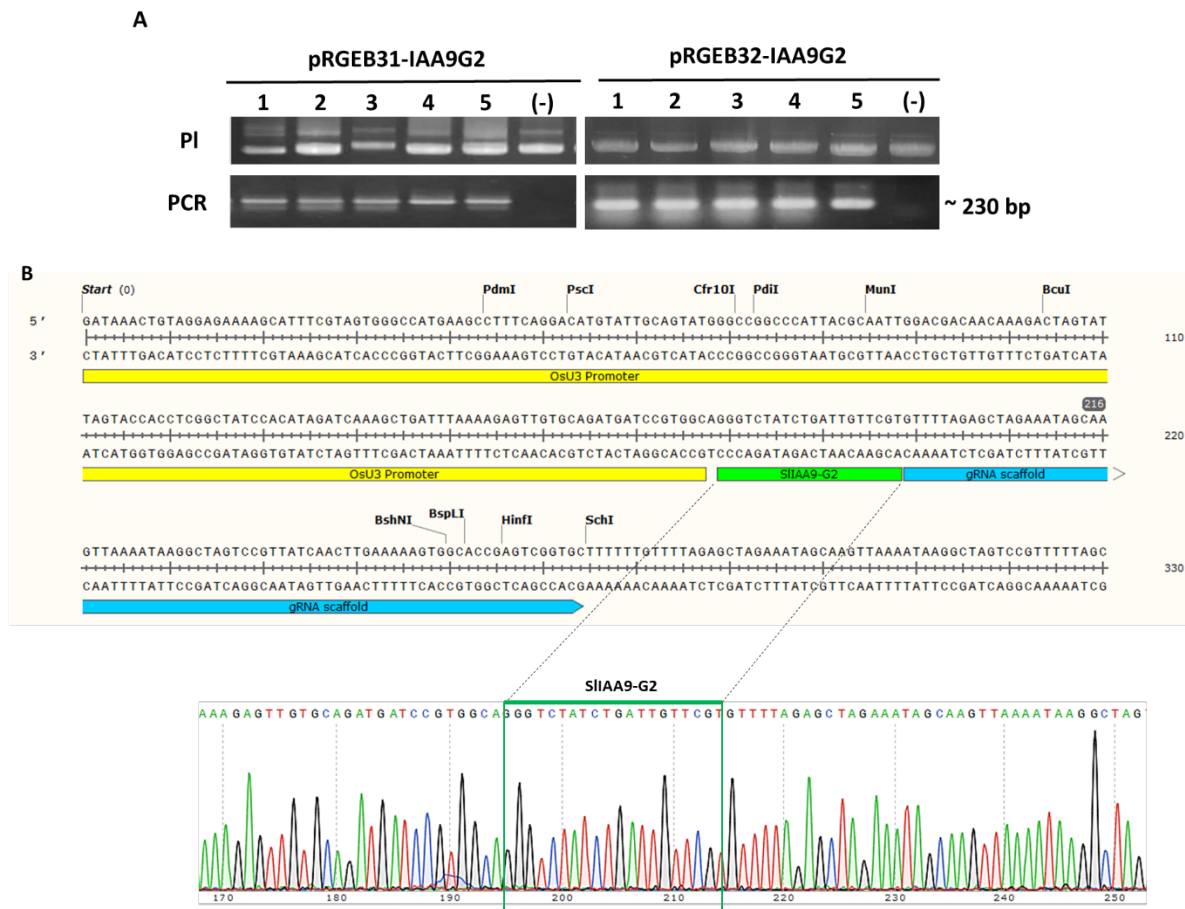
**Tạo các chủng *E. coli* mang vector pRGEB31-IAA9G2 và pRGEB32- IAA9G2**

Sản phẩm của phản ứng lai giữa vector mở vòng và đoạn gRNA2 được biến nạp vào tế bào *E. coli* khả biến chủng DH10b và cấy trên môi trường bổ sung kháng sinh kanamycin 50 mg/ $\mu$ L. Năm khuẩn lạc thuộc mỗi cấu trúc được tách plasmid và dùng làm khuôn cho phản ứng PCR kiểm tra sự có mặt của đoạn spacer đã thiết kế. Sử dụng cặp mồi OsU3-R1 và IAA9G2-F cho phản ứng PCR đều cho kết quả dương tính ở các plasmid tái tổ hợp thuộc cả hệ vector pRGEB31 và hệ vector pRGEB32 được kiểm tra, kích thước sản phẩm khoảng 230 bp đúng với thiết kế (Hình 3A). Tiếp theo, các trình tự đoạn chèn trên T-DNA này được giải trình tự theo phương pháp Sanger trên máy ABI 3500. Kết quả cho thấy các spacer đã được chèn đúng vị trí liền kề promoter OsU3 và liền trước đoạn cuộn gấp của gRNA

(RNA scaffold) và không có sự biến đổi nucleotide, như vậy cấu trúc RNA spacer-scaffold sẽ được biểu hiện dưới sự điều khiển của promoter OsU3 là promoter chuyên dùng để biểu hiện RNA (Hình 3B).

**Tạo các chủng *A. tumefaciens* mang vector pRGEB31- IAA9G2 và pRGEB32- IAA9G2**

Các plasmid tái tổ hợp với gRNA2 tiếp tục được chuyển vào tế bào *A. tumefaciens* khả biến chủng EHA105. Các khuẩn lạc *A. tumefaciens* được nuôi cấy và tách plasmid, làm khuôn DNA cho phản ứng PCR kiểm tra sự có mặt của đoạn spacer bằng cặp mồi OsU3-R1 và IAA9G2-F. Kết quả cho thấy các khuẩn lạc được kiểm tra đều cho phản ứng dương tính, với kích thước đoạn nhân lên đúng theo thiết kế 230 bp (Hình 4). Các dòng vi khuẩn này đã được nuôi cấy, lưu giữ phục vụ các nghiên cứu chuyển gen tiếp theo.



**Hình 3.** Tạo các chủng *E. coli* mang vector pRGE31- IAA9G2 và pRGE32- IAA9G2. **(A)** Kết quả sàng lọc các khuẩn lạc *E. coli* mang plasmid pRGE31-IAA9G2 và pRGE32-IAA9G2; **PI**: kết quả tách plasmid ; **PCR**: kết quả điện di sản phẩm PCR kiểm tra sự có mặt của gRNA trên plasmid có sản phẩm kích thước 230 bp; **1-5**: kết quả PCR của các khuẩn lạc tương ứng; đối chứng âm (-) được dùng là vector pRGE31 và pRGE32 gốc không chứa đoạn spacer chèn. **(B)** Vị trí đoạn chèn spacer và kết quả giải trình tự của đoạn T-DNA mang đoạn spacer trên plasmid pRGE32-IAA9G2.

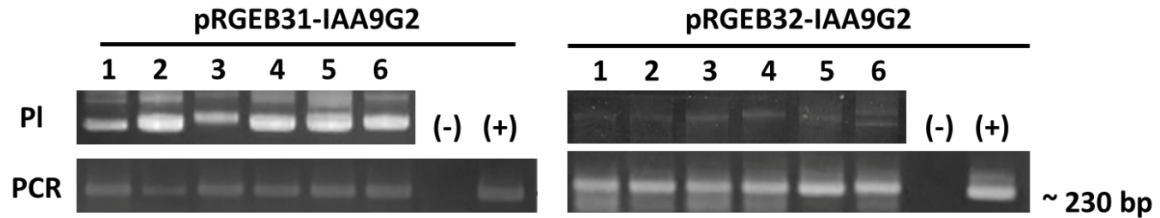
### Thử nghiệm chuyển gen vào cây cà chua sử dụng chủng *A. tumefaciens* chứa vector pRGE31-IAA9G2

Chúng tôi tiến hành chuyển gen của chủng *A. tumefaciens* chứa vector pRGE31-IAA9G2 vào cây cà chua. Các mảnh lá mầm cà chua được đồng nuôi cấy với chủng *A. tumefaciens* mang vector pRGE31-IAA9G2 và tái sinh thành cây theo quy trình như đã mô tả. DNA tổng số đã được tách từ lá của 14 cây chuyển gen để đánh giá khả năng chuyển T-DNA mang cấu trúc CRISPR-Cas9 và RNA spacer-scaffold vào cây cà chua. Sự có mặt của gen *Cas9* trong hệ gen

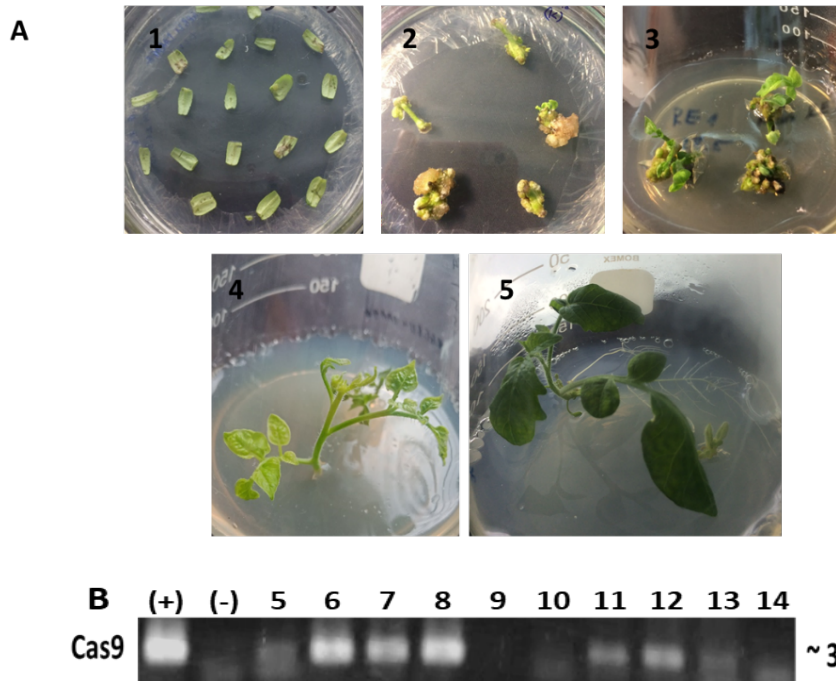
cây cà chua chuyển gen được kiểm tra thông qua phản ứng PCR sử dụng mỗi Cas9-F và Cas9-R dự kiến để khuếch đại đoạn có kích thước khoảng 350 bp. Kết quả điện di sản phẩm PCR trên gel agarose cho thấy, 5 mẫu DNA từ lá cây cà chua chuyển gen số 6, 7, 8, 11, 12 cho kết quả dương tính (Hình 5B). Kết quả này cho thấy đã có 5 cây cà chua mang cấu trúc T-DNA chứa gen *Cas9*. Trong 14 cây cà chua tái sinh sau chuyển gen đã được kiểm tra bằng PCR, 5 cây đã cho kết quả dương tính với PCR khuếch đại đoạn *Cas9* chứng tỏ bước đầu đã chuyển được cấu trúc CRISPR-Cas9 vào các cây cà chua tái sinh thế hệ T0. Hiệu suất gây đột biến, kiểu đột biến và độ ổn định của

các đột biến trên gen đích *SIIAA9* sẽ được đánh giá trên các cây T1 đến T2, khi cây có sự phát

triển bình thường về hình thái cũng như sẽ có sự phân ly về gen *Cas9* được chuyển vào.



**Hình 4.** Kết quả sàng lọc các khuẩn lạc *A. tumefaciens* mang plasmid pRGEB31-IAA9G2 và pRGEB32-IAA9G2; **PI:** kết quả tách plasmid ; **PCR:** kết quả điện di sản phẩm PCR kiểm tra sự có mặt của gRNA trên plasmid có sản phẩm kích thước 230 bp; **1-6:** kết quả PCR của các khuẩn lạc tương ứng; đối chứng âm (-) được dùng là plasmid pRGEB31 và pRGEB32 gốc không chứa đoạn spacer chèn; đối chứng (+) là các plasmid dùng để biến nạp



**Hình 5.** Kết quả tái sinh cà chua và sàng lọc cà chua tái sinh mang gen *Cas9*. **(A)** Kết quả tái sinh cây cà chua; 1. Các lá mầm trên môi trường đồng nuôi cấy, 2-4: các mô tái sinh trên môi trường tái sinh ngọn, 5: mô tái sinh trên môi trường sinh rễ. **(B)** Kết quả sàng lọc sự có mặt của gen *Cas9* trong DNA tổng số từ các mẫu cây tái sinh; (+) là phản ứng có khuôn là plasmid pRGEB31-IAA9G2, (-) là phản ứng từ DNA tổng số của cây cà chua không chuyển gen; 5-14 là số thứ tự của các mẫu DNA tương ứng.

Như vậy, trong nghiên cứu này, chúng tôi đã thiết kế và chèn được đoạn spacer đặc hiệu cho gen *SIIAA9* của cà chua vào 2 vector pRGEB31 và pRGEB32 đúng vị trí dưới sự điều khiển của promoter OsU3 để biểu hiện thành gRNA. Trong các vector đó, *Cas9* sẽ được điều khiển bởi

CaMV35S promoter trên T-DNA của plasmid pRGEB31-IAA9G2 và bởi Ubiquitin promoter trên T-DNA của pRGEB32-IAA9G2. Việc sử dụng 2 loại vector khác nhau về promoter điều khiển gen *Cas9* nhằm tạo những cấu trúc khác nhau để thử nghiệm xem cấu trúc nào hoạt động



hiệu quả trên cây cà chua. Các vector tái tổ hợp này đã được biến nạp vào chủng *A. tumefaciens* khả biến EHA105 phục vụ cho các thí nghiệm chuyển gen vào cây cà chua.

**Lời cảm ơn:** Công trình được hoàn thành với sự hỗ trợ kinh phí từ đề tài cấp cơ sở của Viện Nghiên cứu hệ gen.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

Brooks C, Nekrasov V, Lippman ZB, Van EJ (2014) Efficient gene editing in Tomato in the first generation using the clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated 9 System. *Plant Physiol* 166(3): 1292.

Bryksin A, Matsumura I (2013) *Overlap extension PCR cloning*, Humana Press, Totowa, NJ.

Char SN, Neelakandan AK, Nahampun H, Frame B, Main M, Spalding MH, Becraft PW, Meyers BC, Walbot V, Wang K, Yang B (2017) An *Agrobacterium*-delivered CRISPR/Cas9 system for high-frequency targeted mutagenesis in maize. *Plant Biotechnol J* 15(2): 257-268.

Cong L, Ran FA, Cox D, Lin S, Barretto R, Habib N, Hsu PD, Wu X, Jiang W, Marraffini LA, Zhang F (2013) Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science* 339(6121): 819.

Doudna JA, Charpentier E (2014) Genome editing. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science* 346(6213): 1258096.

Fan D, Liu T, Li C, Jiao B, Li S, Hou Y, Luo K (2015) Efficient CRISPR/Cas9-mediated targeted mutagenesis in populus in the first generation. *Scientific Reports* 5: 12217-12217.

Friedman M, Levin CE, Lee SU, Kim HJ, Lee IS, Byun JO, Kozukue N (2009) Tomatine-containing green tomato extracts inhibit growth of human breast, colon, liver, and stomach cancer cells. *J. Agric. Food Chem* 57(13): 5727-5733.

Gillaspy G, Ben-David H, Gruissem W (1993) Fruits: A developmental perspective. *Plant Cell* 5(10): 1439-1451.

Goetz M, Hooper LC, Johnson SD, Rodrigues JC, Vivian SA, Koltunow AM (2007) Expression of aberrant forms of Auxin response factor 8 stimulates parthenocarpy in *Arabidopsis* and tomato. *Plant Physiol* 145(2): 351-366.

Goetz M, Vivian SA, Johnson SD, Koltunow AM (2006) Auxin response factor 8 is a negative regulator of fruit initiation in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 18(8): 1873-1886.

Jiang W, Zhou H, Bi H, Fromm M, Yang B, Weeks DP (2013) Demonstration of CRISPR/Cas9/sgRNA-mediated targeted gene modification in *Arabidopsis*, tobacco, sorghum and rice. *Nucleic Acids Res* 41(20): e188-e188.

Kadkhodaei S, Memari HR, Abbasiliasi S, Rezaei MA, Movahedi A, Shun TJ, Ariff AB (2016) Multiple overlap extension PCR (MOE-PCR): an effective technical shortcut to high throughput synthetic biology. *RSC Advances* 6(71): 66682-66694.

Karlova R, Chapman N, David K, Angenent GC, Seymour GB, de Maagd RA (2014) Transcriptional control of fleshy fruit development and ripening. *J Exp Bot* 65(16): 4527-4541.

Klap C, Yeshayahou E, Bolger AM, Arazi T, Gupta SK, Shabtai S, Usadel B, Salts Y, Barg R (2017) Tomato facultative parthenocarpy results from SIAGAMOUS-LIKE 6 loss of function. *Plant Biotechnol J* 15(5): 634-647.

Lee ST, Wong PF, He H, Hooper JD, Mustafa MR (2013) Alpha-tomatine attenuation of in vivo growth of subcutaneous and orthotopic xenograft tumors of human prostate carcinoma PC-3 cells is accompanied by inactivation of nuclear factor-kappa B signaling. *PLoS one* 8(2): e57708.

Leyser O (2006) Dynamic integration of auxin transport and signalling. *Curr. Biol* 16(11): R424-433.

Ma X, Zhang Q, Zhu Q, Liu W, Chen Y, Qiu R, Wang B, Yang Z, Li H, Lin Y, Xie Y, Shen R, Chen S, Wang Z, Chen Y, Guo J, Chen L, Zhao X, Dong Z, Liu YG (2015) A robust CRISPR/Cas9 system for convenient, high-efficiency multiplex genome editing in monocot and dicot plants. *Mol. Plant* 8(8): 1274-1284.

Mazzucato A, Cellini F, Bouzayen M, Zouine M, Mila I, Minoia S, Petrosza A, Picarella ME, Ruiu F, Carriero F (2015) A TILLING allele of the tomato Aux/IAA9 gene offers new insights into fruit set mechanisms and perspectives for breeding seedless tomatoes. *Mol. Breed* 35(1): 22.

Pan C, Ye L, Qin L, Liu X, He Y, Wang J, Chen L, Lu G (2016) CRISPR/Cas9-mediated efficient and heritable targeted mutagenesis in tomato plants in the first and later generations. *Sci Rep* 6: 24765.

- Pandolfini T (2009) Seedless fruit production by hormonal regulation of fruit set. *Nutrients* 1(2): 168-177.
- Platt RJ, Chen S, Zhou Y, Yim MJ, Swiech L, Kempton HR, Dahlman JE, Parnas O, Eisenhaure TM, Jovanovic M, Graham DB, Jhunjhunwala S, Heidenreich M, Xavier RJ, Langer R, Anderson DG, Hacohen N, Regev A, Feng G, Sharp PA, Zhang F (2014) CRISPR/Cas9 knock in mice for genome editing and cancer modeling. *Cell* 159(2): 440-455.
- Saito T, Ariizumi T, Okabe Y, Asamizu E, Hiwasa TK, Fukuda N, Mizoguchi T, Yamazaki Y, Aoki K, Ezura H (2011) TOMATOMA: a novel tomato mutant database distributing Micro-Tom mutant collections. *Plant Cell Physiol* 52(2): 283-296.
- Shan Q, Wang Y, Li J, Zhang Y, Chen K, Liang Z, Zhang K, Liu J, Xi JJ, Qiu J-L, Gao C (2013) Targeted genome modification of crop plants using a CRISPR-Cas system. *Nat. Biotechnol* 31: 686.
- Ueta R, Abe C, Watanabe T, Sugano SS, Ishihara R, Ezura H, Osakabe Y, Osakabe K (2017) Rapid breeding of parthenocarpic tomato plants using CRISPR/Cas9. *Sci Rep* 7(1): 507.
- Wang H, Jones B, Li Z, Frasse P, Delalande C, Regad F, Chaabouni S, Latche A, Pech JC, Bouzayen M (2005) The tomato Aux/IAA transcription factor IAA9 is involved in fruit development and leaf morphogenesis. *Plant Cell* 17(10): 2676-2692.
- Xie K, Minkenberg B, Yang Y (2014) Targeted gene mutation in rice using a CRISPR/Cas9 system. *Bio-Protocol* 4(17): e1225.
- Xie K, Yang Y (2013) RNA-guided genome editing in plants using a CRISPR/Cas system. *Mol. Plant* 6(6): 1975-1983.
- Xue W, Chen S, Yin H, Tammela T, Papagiannakopoulos T, Joshi NS, Cai W, Yang G, Bronson R, Crowley DG, Zhang F, Anderson DG, Sharp PA, Jacks T (2014) CRISPR-mediated direct mutation of cancer genes in the mouse liver. *Nature* 514: 380.
- Yu X, Chen G, Guo X, Lu Y, Zhang J, Hu J, Tian S, Hu Z (2017) Silencing SIAGL6, a tomato AGAMOUS-LIKE6 lineage gene, generates fused sepal and green petal. *Plant Cell Rep* 36(6): 959-969.

## CONSTRUCTION OF CRISPR/CAS9 EXPRESSION VECTORS HARBOURING gRNA TARGETED ON *SIIAA9* GENE OF TOMATO

Bui Manh Minh<sup>1</sup>, Ha Hong Hanh<sup>1</sup>, Le Thi Thu Hien<sup>1,2</sup>, Huynh Thi Thu Hue<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>*Institute of Genome Research, Vietnam Academy of Science and Technology*

<sup>2</sup>*Graduate University of Science and Technology, Vietnam Academy of Science and Technology*

### SUMMARY

Tomato (*Solanum lycopersicum*) is a nutritious fruit containing many secondary compounds with health benefits. The formation of tomato fruit through fertilization is controlled by auxin through Aux/IAA9 and ARF8 proteins. The mutated *SIIAA9* gene leads to the parthenocarpic development of fruit or seedless tomato fruit. Nowadays, the CRISPR/Cas9 genome editing system is becoming increasingly popular in modifying desired genes on plant objects. In this study, gRNAs which target on tomato *SIIAA9* gene were designed and inserted into CRISPR/Cas9 vectors. In addition, two strains of *A. tumefaciens* harboring pRGEB31-IAA9G2 and pRGEB32-IAA9G2 vectors carrying CRISPR/Cas9 expression system towards *SIIAA9* gene in tomato were successfully created. The strain of *A. tumefaciens* harboring pRGEB31- IAA9G2 plasmid was used to develop transgenic tomato plants from Micro-Tom variety. PCR test showed that 5/14 plants had the presence of *Cas9* gene in T0 plants. The transgenic plants have a normal morphology in comparison with the controls. The evaluation of mutant efficiency, type, and stability of mutations on the *SIIAA9* will be conducted on next-generation plants when the mutations are stable and segregated into descendents.

**Keywords:** *auxin, CRISPR/Cas9, IAA9, tomato*