

Hoàng Thị Huệ, Lê Tuấn Nghĩa, Hoàng Tuyết Minh, Nguyễn Thị An Trang, Lê Hoàng Anh, Phạm Thị Thùy Dương, Chu Thị Mây, 2017. Đánh giá một số chỉ tiêu chất lượng của hai giống lúa màu: Khẩu cảm trắng và lúa Bát. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Nông nghiệp Việt Nam*, số 8, tr. 36-40.

Đào Minh Sô, 2011. Ảnh hưởng của phân khoáng và phân bón lá đến năng suất lúa cạn tại Ea Súp, Đắk Lắk. *Tạp chí Nông nghiệp và PTNN*, kỳ 1 - tháng 6/2011, tr. 15-21.

IRRI, 2002. *Standard Evaluation System (SES) for Rice*. IRRI, Los Baños, Philippines.

## Effects of sowing time, transplanting density and fertilizer dose on the growth and yield of local rice variety Khau dac na

Hoang Thi Hue, Hoang Thi Thu Thuy, La Tuan Nghia

### Abstract

Khau dac na is a local glutinous rice variety which has been being grown in Tuong Duong district, Nghe An province for long time. Study on sowing time, transplanting density and fertilizer dose aims to increase the yield of Khau dac na rice variety. Khau dac na is a photosensitive variety and suitable sowing time is from 10 – 22 June and transplanting time is from 4 – 14 July (22 days of seedlings). The appropriate transplanting density is 40 hills/m<sup>2</sup>. The fertilizer dose: 01 tons of microbial organic fertilizer + 80 N + 90 kg P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> + 80 kg K<sub>2</sub>O is most suitable for the variety.

**Keywords:** Khau dac na rice variety, sowing and transplanting time, transplanting density, fertilizer dose, yield

Ngày nhận bài: 03/12/2020  
Ngày phản biện: 11/12/2020

Người phản biện: TS. Trần Danh Sửu  
Ngày duyệt đăng: 22/12/2020

## THIẾT KẾ VECTOR CHỈNH SỬA GEN *IPA1* LIÊN QUAN ĐẾN TÍNH TRẠNG NĂNG SUẤT CỦA GIỐNG LÚA CHẤT LƯỢNG J02

Phùng Thị Thu Hương<sup>1</sup>, Phạm Thu Hằng<sup>1</sup>, Cao Lệ Quyên<sup>1</sup>, Phạm Xuân Hội<sup>1</sup>, Nguyễn Duy Phương<sup>1</sup>

### TÓM TẮT

Với mục đích tạo tiền đề cho các nghiên cứu tiếp theo về cải tiến năng suất của giống lúa J02 chất lượng cao, công trình nghiên cứu đã tập trung vào việc phân lập, giải trình tự vùng mã hóa exon III của *IPA1-J02* liên quan đến các tính trạng năng suất ở giống lúa J02, thiết kế trình tự crRNA chỉnh sửa *IPA1-J02* và thiết kế T-DNA mang cấu trúc biểu hiện sgRNA chỉnh sửa *IPA1-J02*. Kết quả đã đưa được cấu trúc biểu hiện sgRNA mang 2 trình tự crRNA nhận biết 2 vị trí khác nhau trên exon III của *IPA1-J02* vào vector nhị phân pCas9. Vector pCas9/gRNA-*IPA1* đã được kiểm tra bằng phương pháp PCR và cắt enzyme giới hạn để phục vụ nghiên cứu tăng năng suất cho giống lúa chất lượng cao J02 bằng công nghệ chỉnh sửa hệ gen.

**Từ khóa:** Chỉnh sửa gen, năng suất, CRISPR/CAS9, *IPA1*, đột biến

### ĐẶT VẤN ĐỀ

Cây lúa (*Oryza sativa* L.) là một trong những cây lương thực được tiêu thụ rộng rãi nhất trên toàn thế giới. Vai trò quan trọng của lúa gạo đối với kinh tế và xã hội đã thúc đẩy các nhà nghiên cứu phát triển các giống lúa mới với các đặc tính nông học được cải thiện, như khả năng chống chịu stress sinh học/phi sinh học, kháng thuốc diệt cỏ hoặc nâng cao năng suất và giá trị dinh dưỡng. Việc phát triển giống lúa có cấu trúc thân cây lý tưởng được cho là một

phương án tiềm năng góp phần nâng cao năng suất lúa so với các giống năng suất hiện nay (Fan *et al.*, 2006; Mao *et al.*, 2010).

Gen *IPA1* được xác định là một QTL quan trọng quy định kiến trúc thân cũng như năng suất cây lúa. *IPA1* mã hóa cho protein OsSPL14 (SOUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE 14) và được điều tiết bởi miRNA OsmiR156. Đột biến điểm xuất hiện trên *IPA1* tại vị trí tương tác giữa OsSPL14 với OsmiR156 ở giống Taichung Native 1 (*Indica*) và

<sup>1</sup> Viện Di truyền Nông nghiệp

Aikawa, Shaoniejing (*Japonica*) có thể tạo ra dòng lúa “lý tưởng” hơn với kiểu hình giảm số nhánh, tăng tính kháng (increased lodging resistance), thân dày và cứng cáp, tăng năng suất (Jiao *et al.*, 2010; Miura *et al.*, 2010). Trong nghiên cứu của Li và cộng tác viên (2016), gen *IPA1* của giống lúa Zhonghua 11 đã được gây đột biến bằng hệ thống CRISPR/Cas9 tại vị trí nằm trên exon III, gần vị trí mã hóa axit amin tương tác với OsmiR156 (vị trí 854 đến 876). Các dòng lúa chuyển gen mang nhiều dạng đột biến khác nhau tại vị trí mục tiêu và có năng suất được cải thiện rõ rệt (Li *et al.*, 2016). Những kết quả trên cho thấy, vùng exon III của gen *IPA1* có thể là một mục tiêu quan trọng để điều chỉnh cấu trúc thân cây lúa, giúp tăng năng suất hạt.

Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành phân lập và phân tích một đoạn trình tự gen *IPA1* của lúa J02 (gọi tắt là *IPA1-J02*) nhằm thiết kế CRISPR/Cas9 gây đột biến chính xác trên gen *IPA1*, tạo tiền đề cho nghiên cứu ứng dụng công nghệ CRISPR/Cas9 để cải tiến năng suất của các giống lúa chất lượng cao và thích nghi tốt với điều kiện môi trường bất lợi.

## II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Vật liệu nghiên cứu

Giống lúa J02 do Công ty Giống cây trồng Phú Thọ cung cấp; chủng vi khuẩn *E. coli* DH5α được mua từ hãng Thermo Fisher Scientific (Mỹ).

Vector pENTR4/gRNA và pCas9 do nhóm nghiên cứu của Tiến sĩ Sebastien Cunnac (Trung tâm Nghiên cứu vì sự phát triển, Montpellier, Pháp) cung cấp, được thiết kế dựa trên bộ khung vector pCAMBIA1300 (Marker Gene Technologies, Hoa Kỳ) và pENTR4 (Invitrogen, Hoa Kỳ). Các oligonucleotide dùng cho PCR được đặt mua từ hãng Sigma (Mỹ).

### 2.2. Phương pháp nghiên cứu

#### 2.2.1. Tách chiết DNA từ lúa

DNA tổng số của cây lúa được tách chiết theo phương pháp của Doyle và Doyle, (1990) sử dụng dung dịch CTAB 2%. Mẫu lá lúa (100 mg) được nghiền trong niro lỏng thành bột mịn, sau đó được bổ sung 500 µl dung dịch CTAB 2% (có chứa ARNase 40 mg/ml) và ly tâm ở tốc độ 13.000 vòng/phút để thu dịch nổi. 500 µl hỗn hợp phenol : chloroform : isoamyl (25 : 24 : 1) được bổ sung vào dung dịch để kết tủa protein. Hỗn hợp sau đó được ly tâm với tốc độ 13.000 vòng/phút để thu DNA tinh sạch.

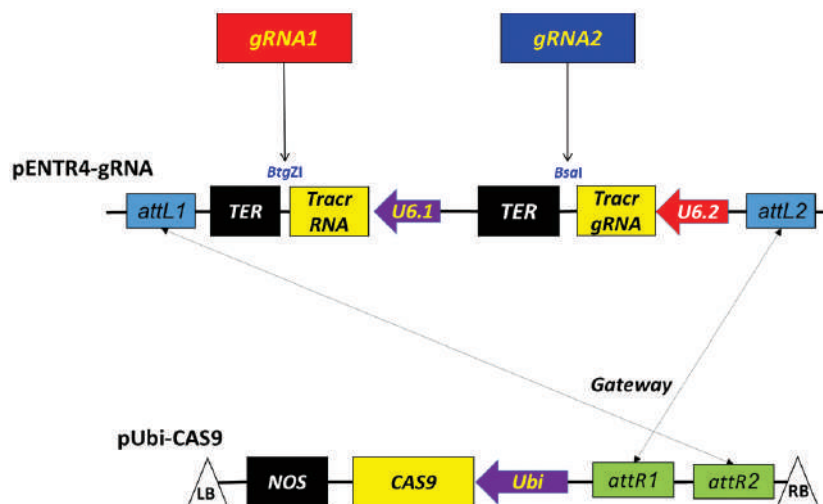
#### 2.2.2. Thiết kế trình tự gRNA chỉnh sửa *IPA1-J02*

Đoạn exon III của gen *IPA1* (AP014968.1) được phân lập từ DNA tổng số của cây lúa J02 bằng kỹ thuật PCR (Sambrook and Russel, 2001), sử dụng hai mỗi *IPA1-Fw* (5'-AAGAGCATCGCAGGTTCA-3') và *IPA1-Rv* (5'-GTCCTCGACAATACAGCATTA-3'). Sản phẩm PCR được tinh sạch bằng bộ kit *GenJET-TM Gel Extraction* (Thermo Fisher Scientific) và giải trình tự nucleotide theo phương pháp của Smith và cộng tác viên (1986). Kết quả giải trình tự được xử lý bằng phần mềm BioEdit 4.0, so sánh với cơ sở dữ liệu trên GenBank và phân tích bằng phần mềm Genetyx 4.0.

Trình tự gRNA đặc hiệu cho chỉnh sửa vùng exon III của *IPA1-J02* được thiết kế bằng phần mềm CRISPR-P v2.0 (<http://crispr.hzau.edu.cn/CRISPR2/>). Cấu trúc bậc II của các gRNA được phân tích bằng phần mềm Mfold 2.3 (<http://unafold.rna.albany.edu/>). Đoạn DNA tương đồng với các gRNA trong hệ gen lúa được xác định bằng phần mềm CCTop (<http://crispr.cos.uni-heidelberg.de>). Trình tự gRNA (20 Nu) được đặt tổng hợp bởi công ty Sigma (Hoa Kỳ).

#### 2.2.3. Thiết kế vector chỉnh sửa *IPA1-J02*

Hai cặp oligonucleotide *BtgZI-IPA1-F/BtgZI-IPA1-R* (5'-tggtGAGAGCACAGCTCGAGTCGG-3' và 5'-aaacCCGACTCGAGCTGTGCTCTC-3') và *BsaI-IPA1-F/BsaI-IPA1-R* (5'-gtgtGGTGGATG-TCTCGCAGGGGT-3' và 5'-aaacACCCCTGCGA-GACATCCACC-3') được liên kết với nhau bằng phản ứng biến tính/phục hồi DNA (95°C-10 phút, 4°C-∞) để tạo thành 2 crRNA sợi đôi hoàn chỉnh (*IPA1-gRNA1* và *IPA1-gRNA2*). *IPA1-gRNA1* và *IPA1-gRNA2* được lần lượt chèn vào vị trí enzyme *BtgZI* và *BsaI* nằm sau vùng promoter *OsU6.1* và *OsU6.2* trên vector pENTR4/gRNA (Hình 1). Vector tái tổ hợp được kiểm tra bằng PCR với cặp mỗi *U6.1-F/BtgZI-IPA1-R* (0,36 kb), *BsaI-IPA1-F/Ter-R* (0,19kb) và *BtgZI-IPA1-F/BsaI-IPA1-R* (0,44 kb). Tiếp theo, đoạn trình tự chứa 2 cấu trúc [*U6.1::IPA1-gRNA1*] và [*U6.2::IPA1-gRNA2*] (0,94 kb) được ghép nối vào vị trí enzyme *HindIII* trên vector nhị phân pCas9 bằng T4 DNA ligase. Vector tái tổ hợp pCas9/gRNA-IPA được kiểm tra bằng PCR với cặp mỗi *Ubi-F/Cas9-R* (0,36 kb), *BtgZI-IPA1-F/BsaI-IPA1-R* (0,44 kb) và giải trình tự DNA.



Hình 1. Sơ đồ thiết kế vector biểu hiện pCas9/gRNA-IPA

### 2.3. Thời gian và địa điểm nghiên cứu

Nghiên cứu được thực hiện từ tháng 01 đến tháng 4 năm 2020 tại Bộ môn Bệnh học Phân tử, Viện Di truyền Nông nghiệp.

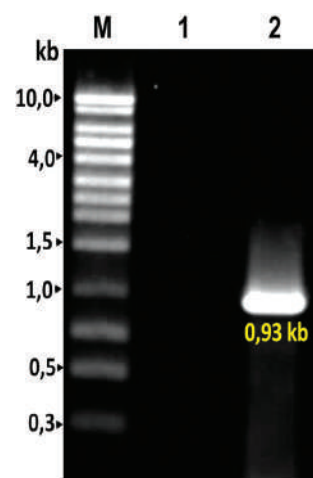
## III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### 3.1. Phân lập vùng exon III của *IPA1-J02*

Vùng exon III của *IPA1* đã được xác định mang bộ ba mã hóa cho vị trí axit amin tương tác với yếu tố điều hòa OsmiR156 trên protein OsSPL14, có vai trò quyết định đến năng suất hạt (Fan *et al.*, 2006; Mao *et al.*, 2010). Chính vì vậy, vùng exon III của *IPA1-J02* (vị trí [+583] đến [+1501]) đã được phân lập bằng PCR để phục vụ mục đích thiết kế gRNA chỉnh sửa *IPA1-J02*. Sản phẩm PCR nhân bản từ DNA tổng số của lúa J02 bằng cặp mồi đặc hiệu có kích thước xấp xỉ 0,93 kb tương ứng với kích thước lý thuyết của đoạn trình tự cần phân lập (933 bp) (Hình 2, giếng 2). Kết quả giải trình tự nucleotide cho thấy đoạn DNA phân lập được chứa toàn bộ vùng exon III (918 bp) của *IPA1* (Hình 3), giống lẫn lộn 100% và 99,89% so với trình tự tương ứng của giống lúa *Japonica* Nipponbare (AP014964.1) và *Indica* Shuhui498 (CP018164.1) đã được công bố trên GenBank.

Trong các nghiên cứu trước đây, một số QTL (quantitative trait loci - QTLs) liên quan tới tính trạng năng suất hạt cũng đã được chọn làm mục tiêu trong các nghiên cứu cải thiện năng suất lúa bằng công cụ CRISPR/Cas (Shen *et al.*, 2018). Li và cộng tác viên (2016) đã gây đột biến 4 gen *Gn1a*, *DEP1*, *GS3* và *IPA1* liên quan đến tính trạng số lượng hạt, cấu trúc bông, kích thước hạt và cấu trúc thân của giống lúa Zhonghua 11. Trong nghiên cứu này, vùng

exon I của *Gn1a* và *IPA1* và exon III của *DEP1* và *IPA1* đã được chọn làm mục tiêu cho các sgRNA vì các đột biến ở các vùng đó đã được chứng minh là có khả năng hình thành kiểu hình mong muốn (năng suất cao hơn). Trong nghiên cứu này, toàn bộ vùng exon III trên *IPA1* của giống lúa J02 cũng đã được nhân bản bằng PCR từ DNA tổng số để phân tích trình tự nucleotide phục vụ cho việc thiết kế gRNA chỉnh sửa gen *IPA1*.



Hình 2. Kết quả phân lập vùng exon III của *IPA1-J02* từ hệ gen lúa J02 bằng kỹ thuật PCR

Ghi chú: Giếng M: Thang chuẩn DNA 1kb (iNtRon); Giếng 1: Đối chứng âm (không có DNA khuôn); Giếng 2: Khuôn là DNA tổng số của lúa J02.

### 3.2. Thiết kế trình tự gRNA chỉnh sửa *IPA1-J02*

Hoạt động cắt sợi đôi DNA của hệ thống CRISPR/Cas9 vận hành dựa trên sự phối hợp của 2 thành phần chính là protein Cas9 có hoạt tính endonuclease và phân tử sgRNA (single guide RNA) có vai trò dẫn đường cho phức hệ protein-RNA CRISPR/Cas9 tới

vị trí cần cắt trên DNA. Trong đó, trình tự crRNA (khoảng 20 nucleotide) trên phân tử sgRNA có vai trò quy định tính đặc hiệu của phức hệ CRISPR/Cas9 (Bortesi and Fischer, 2015). Để đảm bảo chức năng, trình tự crRNA đầu 3' phải nối tiếp với trình tự bảo thủ PAM (NGG), có độ dài 19 - 20 Nu và vị trí cắt DNA nằm trên trình tự đích (Doench *et al.*, 2016; Fu *et al.*, 2014; Liang *et al.*, 2016). Trong nghiên cứu này, các trình tự crRNA chỉnh sửa exon III trên gen *IPAI* của lúa J02 đã được thiết kế dựa trên phần mềm CRISPR-P v2.0. Kết quả phân tích (Bảng 1) đã thu được 17 trình tự crRNA đáp ứng đầy

đủ 3 điều kiện trên và đều đảm bảo việc hình thành cấu trúc bậc II ổn định trong nhân tế bào thực vật. Tuy nhiên, để đảm bảo hiệu quả gây đột biến, crRNA cần có điểm On-score cao (khả năng hoạt động cao) và ưu tiên có Guanine ở đầu 5' (là yếu tố giúp các cấu trúc biểu hiện RNA điều khiển bởi gen *U6* hoạt động hiệu quả hơn) (Doench *et al.*, 2016; Fu *et al.*, 2014; Liang *et al.*, 2016). Chính vì vậy, trình tự crRNA-10 và crRNA-11 có chứa đầu G và điểm On-score cao nhất (0,5435 và 0,4230) đã được lựa chọn để tiếp tục phân tích.

**Bảng 1.** Trình tự crRNA chỉnh sửa *IPAI-J02*

Tên	Trình tự crRNA-PAM (5'-3')	Kích thước	TBP	CBP	IBP	DSL	% GC	On score
crRNA-1	TGTGGGTAGTAGTATCCCA-TGG	19	9	3	0	-	45%	0,7063
crRNA-2	CTTCTGTCAACCCAGCCAT-GGG	19	10	5	0	-	55%	0,6310
crRNA-3	TCTTCTGTCAACCCAGCCA-TGG	19	11	5	0	-	50%	0,5435
crRNA-4	CCCCTGCGAGACATCCACC-TGG	19	9	3	0	-	65%	0,3475
crRNA-5	CTGCGAGACATCCACCTGG-AGG	19	9	3	0	-	60%	0,1933
crRNA-6	TGCGAGACATCCACCTGGA-GGG	19	9	3	3	-	60%	0,1539
crRNA-7	GGTAGTAGTATCCCATGGC-TGG	19	9	5	4	-	50%	0,0344
crRNA-8	GTGGATGTCTCGCAGGGGT-CGG	19	10	4	0	-	65%	0,0113
crRNA-9	TCTTCTGTCAACCCAGCCAT-GGG	20	11	5	0	-	50%	0,0972
crRNA-10	GAGAGCACAGCTCGAGTCGG-TGG	20	11	5	0	-	65%	0,5435
crRNA-11	GGTGGATGTCTCGCAGGGGT-CGG	20	10	5	0	-	65%	0,4230
crRNA-12	ACCCCTGCGAGACATCCACC-TGG	20	8	3	0	-	65%	0,3475
crRNA-13	GGTAGTAGTATCCCATGGCT-GGG	20	9	5	4	-	50%	0,2034
crRNA-14	CCTGCGAGACATCCACCTGG-AGG	20	9	3	0	-	65%	0,1933
crRNA-15	CTCTTCTGTCAACCCAGCCA-TGG	20	10	5	0	-	55%	0,1780
crRNA-16	CTGCGAGACATCCACCTGGA-GGG	20	9	3	0	-	60%	0,1539
crRNA-17	GGGTAGTAGTATCCCATGGC-TGG	20	9	5	5	-	55%	0,0344

Ghi chú: (% GC) tỉ lệ phần trăm GC; (TBP) tổng số cặp bazơ; (CBP) số cặp bazơ liên tục; (IBP) số cặp bazơ trong cấu trúc của crRNA; (DSL) vòng loop bị phá vỡ cấu trúc; (-) không ảnh hưởng đến cấu trúc vòng loop; (On score) Điểm dự đoán khả năng nhận biết đúng vị trí đích (từ 0,00 - 1,00).

Do crRNA chỉ nhận biết ~20 nucleotide và Cas9 vẫn có thể hoạt động dù trình tự DNA đích có một vài nucleotide sai khác so với crRNA (Bae *et al.*, 2014; Bortesi and Fischer, 2015; Doench *et al.*, 2016), tính đặc hiệu của các trình tự crRNA tiếp tục được phân tích bằng phần mềm CCTop (<http://crispr.cos.uni-heidelberg.de>). Kết quả phân tích cho thấy trong khi trình tự crRNA-11 không có trình tự tương đồng nào trong hệ gen lúa, crRNA-10 có 7 trình tự DNA tương đồng (Bảng 2). Tuy nhiên, hầu hết các trình

tự tương đồng với crRNA-10 đều có chứa ít nhất 1 Nu trong vùng lõi nên khả năng gây đột biến ngoài mục tiêu không cao (Doench *et al.*, 2016; Fu *et al.*, 2014; Liang *et al.*, 2016). Mặc dù vậy, bước sàng lọc đột biến ở các thể hệ cây chỉnh sửa gen sau này vẫn nên kiểm tra các vị trí tương đồng với crRNA này để đảm bảo không xảy ra đột biến không mong muốn (Doench *et al.*, 2016; Fu *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2016; Liang *et al.*, 2016).

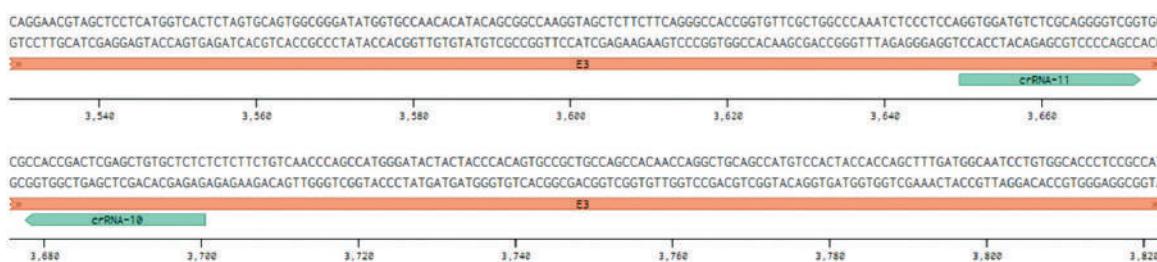
**Bảng 2.** Các trình tự DNA tương đồng với crRNA trong hệ gen lúa

Tên	Trình tự DNA tương đồng	Vị trí	Khoảng cách đến Exon gần nhất	Mã số gen đích
crRNA-10	GAGAGCAC[AGCTCGAGTCGG]	E	0	Os08g0509600 ( <i>IPA1</i> )
	GAGAGCAC[AGCTGGAGTCGG]	E	0	Os09g0491532
	GCGAGCGG[AGCACGAGTCGG]	-	12291	EPIOSAG00000037716
	GGGAGGGC[AGCTGGAGTCGG]	-	292	EPIOSAG00000012530
	GCGAGCCG[AGCTCGGGTCGG]	E	0	Os02g0511400
	GGCAGCAG[AGCTCGAGGCGG]	-	969	EPIOSAG00000027300
	GCGAGAAG[AGCTCGAGACGG]	-	4073	Os05g0226900
	CAGGGCAG[AGCTCGAGTCTG]	-	1239	Os12g0536300
crRNA-11	GGTGGATG[TCTCGCAGGGGT]	E	0	Os08g0509600 ( <i>IPA1</i> )

Ghi chú: Chữ trong ngoặc [] thể hiện trình tự tương đồng với vùng lõi (12 nu) của crRNA; chữ in đậm thể hiện vị trí sai khác so với vị trí Nu tương ứng trên crRNA; E: Exon.

Như vậy, hai trình tự crRNA-10 và crRNA-11 đã được chọn để sử dụng cho nghiên cứu gây đột biến vùng exon III của *IPA1-J02* theo cơ chế NHEJ

(Nekrasov *et al.*, 2013; Shen *et al.*, 2014) bằng hệ thống chỉnh sửa gen CRISPR/Cas9 (Bortesi and Fischer, 2015) (Hình 3).



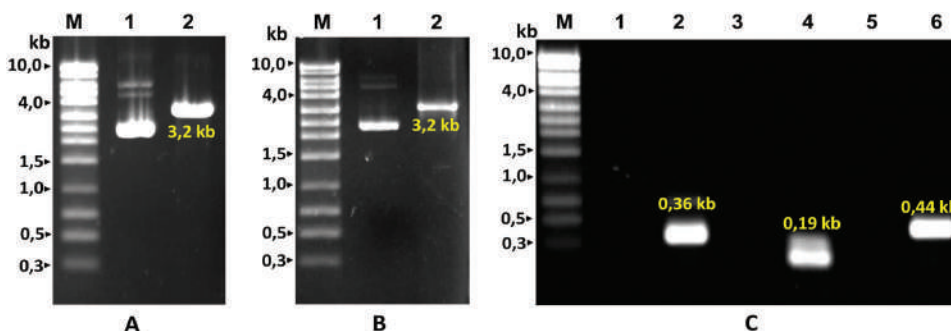
**Hình 3.** Một phần kết quả giải trình tự *IPA1-J02*

Ghi chú: Vị trí và chiều crRNA-10, crRNA-11 được đánh dấu bằng các mũi tên.

### 3.3. Thiết kế T-DNA mang cấu trúc biểu hiện sgRNA chỉnh sửa *IPA1-J02*

Để thiết kế cấu trúc biểu hiện sgRNA nhận biết *IPA1-J02*, đoạn DNA *IPA1-gRNA1* và *IPA1-gRNA2* có mang 2 đầu dính được ghép nối lần lượt vào

khung vector pENTR4-gRNA (Hình 1) đã được xử lý trước với enzyme *BtgZI* và *BsaI* (Hình 4 A & B, giếng 2). Vector tái tổ hợp (gọi là pENTR/gRNA-*IPA1*) đã được kiểm tra bằng PCR với ba cặp môi khác nhau.



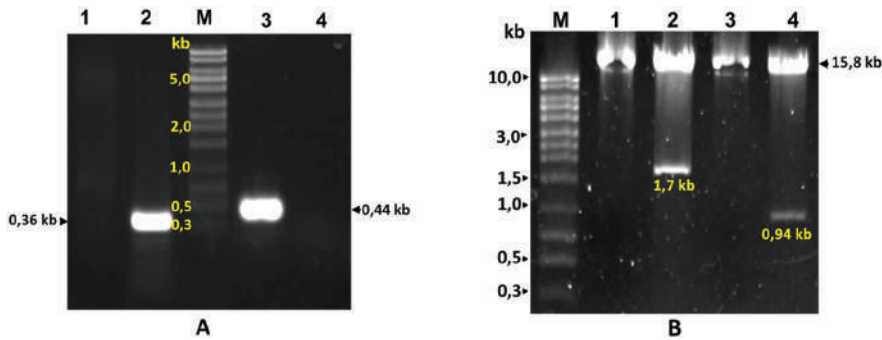
**Hình 4.** Ghép nối *IPA1-gRNA1* và *IPA1-gRNA2* vào cấu trúc biểu hiện trên pENTR4/gRNA (A&B)

Ghi chú: Cắt giới hạn pENTR4/gRNA bằng *BtgZI* (A) và *BsaI*; Giếng 1: Vector nguyên bản; Giếng 2: Sản phẩm cắt giới hạn. (C) Kiểm tra pENTR4/gRNA-*IPA1* bằng PCR; Giếng 1 - 2: PCR với cặp môi U6.1-F/*BtgZI-IPA1-R*; Giếng 3 - 4: PCR với cặp môi *BsaI-IPA1-F/Ter-R*; Giếng 5 - 6: PCR với cặp môi *BtgZI-IPA1-F/BsaI-IPA1-gRNA2-R*; Giếng 1, 3, 5: Đối chứng âm (không có DNA khuôn); Giếng 2, 4, 6: Khuôn là pENTR4/gRNA-*IPA1*. Giếng M: Thang chuẩn DNA 1 kb (*iNtRon*).

Kết quả điện di cho thấy PCR với cặp mỗi đặc hiệu cho cấu trúc biểu hiện IPA1-gRNA1 (U6.1-F/BtgZI-IPA1-R), cấu trúc biểu hiện IPA1-gRNA2 (BsaI-IPA1-F/Ter-R) và đồng thời cả 2 cấu trúc biểu hiện gRNA (BtgZI-IPA1-F/BsaI-IPA1-R) đã thu được các sản phẩm có kích thước lần lượt khoảng 0,36 kb (Hình 4C, giếng 2); 0,19 kb (Hình 4C, giếng 4) và 0,44 kb (Hình 4C, giếng 6) phù hợp với kích thước theo tính toán lý thuyết của các đoạn DNA cần nhân bản. Điều này chứng tỏ plasmid tái tổ hợp pENTR4/gRNA-IPA1 thu được đã mang 2 trình tự IPA1-gRNA1 và IPA1-gRNA2 tại vị trí mong muốn.

Đoạn DNA mang 2 cấu trúc biểu hiện gRNA (U6.1::IPA1-gRNA1 và U6.2::IPA1-gRNA2) được ghép nối vào vị trí *Hind*III trên vector nhị phân pCas9 mang cấu trúc biểu hiện protein Cas9 (*Ubiquitin:Cas9:Nos*) bằng T4 DNA ligase. Plasmid tái tổ hợp được tách chiết từ thể biến nạp dương tính và kiểm tra sự có mặt của cấu trúc biểu hiện 2 gRNA

bằng phương pháp PCR và phương pháp xử lý với enzyme cắt giới hạn *Hind*III. Kết quả trên hình 5A cho thấy các băng sản phẩm PCR với cặp mỗi Ubi-F/Cas9-R (đặc hiệu cho cấu trúc [*Ubiquitin:Cas9*]) và BtgZI-IPA1-F/BsaI-IPA1-R (đặc hiệu cho 2 trình tự crRNA chỉnh sửa *IPA1-J02*) có kích thước lần lượt 0,36 kb và 0,44 kb, đúng với kích thước tính toán lý thuyết. Tương tự, kết quả cắt giới hạn vector tái tổ hợp pCas9/gRNA bằng enzyme *Hind*III cũng thu được 2 băng DNA có kích thước đúng với tính toán lý thuyết, bao gồm băng DNA 15,8 kb và 0,94 kb tương ứng với kích thước của khung vector pCas9 và cấu trúc biểu hiện 2 gRNA (Hình 5B, giếng 4). Vector tái tổ hợp đã được giải trình tự Nu (Hình 4) để đảm bảo sự ghép nối chính xác của các cấu trúc. Các kết quả này cho phép khẳng định vector pCas9/gRNA-IPA1 mang cấu trúc biểu hiện phức hệ chỉnh sửa *IPA1-J02* đã được thiết kế thành công.



**Hình 5.** Kiểm tra pCas9/gRNA-IPA1 bằng PCR và enzyme cắt giới hạn

**Ghi chú:** (A) PCR vector tái tổ hợp; Giếng 1 - 2: PCR với cặp mỗi *Ubi-F/Cas9-R*; Giếng 3 - 4: PCR với cặp mỗi *BtgZI-IPA1-F/BsaI-IPA1-R*; giếng 1 và 4: đối chứng âm (không có DNA khuôn); Giếng 2 và 3: Khuôn là pCas9/gRNA-IPA1. (B) Cắt giới hạn vector bằng *Hind*III; Giếng 1 và 3: Vector nguyên bản; Giếng 2 và 4: sản phẩm cắt giới hạn bằng *Hind*III; Giếng 1 và 2: pCas9; Giếng 3 và 4: pCas9/gRNA-IPA1. Giếng M: thang chuẩn DNA 1 kb (*iNtRon*).

Trong các nghiên cứu trước đây, cấu trúc biểu hiện sgRNA có thể được thiết kế bằng nhiều phương thức khác nhau nhưng chủ yếu là kỹ thuật overlapping-PCR. Để biểu hiện phức hệ Cas9-sgRNA trong tế bào lúa, các tác giả thường thiết kế cấu trúc biểu hiện sgRNA điều khiển bởi promoter *U3* hoặc *U6* và cấu trúc biểu hiện Cas9 điều khiển bởi promoter *Ubiquitin* nằm trên cùng một hệ vector nhị phân nhằm thuận tiện cho bước biến nạp vào tế bào chủ. Hệ thống vector này được chứng minh là có khả năng đồng nhất, hiệu quả và tạo ra nhiều đột biến có thể di truyền (Ma *et al.*, 2016). Trong nghiên cứu này, 2 cấu trúc biểu hiện sgRNA điều khiển bởi promoter *U6* nhận biết 2 vị trí khác nhau trên vùng exon III của *IPA1-J02* đã được tạo ra bằng kỹ thuật ghép nối DNA sử dụng enzyme cắt giới hạn và T4 DNA ligase. Cấu trúc [*U6.1:IPA1-gRNA1*] và [*U6.2:IPA1-gRNA2*] đã được ghép nối vào vector nhị

phân pCas9 mang cấu trúc [*Ubiquitin:Cas9:NOS*] (biểu hiện protein Cas9) để tạo ra vector chuyển gen thực vật mang cấu trúc biểu hiện phức hệ protein-RNA chỉnh sửa *IPA1* của giống lúa J02 theo cơ chế ghép nối NHEJ (Nekrasov *et al.*, 2013; Shen *et al.*, 2014). Kết quả của nghiên cứu này là tiền đề cho việc tạo ra giống lúa chất lượng J02 có năng suất cao bằng công nghệ chỉnh sửa gen.

#### IV. KẾT LUẬN

Vùng mã hóa exon III của *IPA1-J02* liên quan đến các tính trạng năng suất ở giống lúa J02 đã được phân lập và giải trình tự đầy đủ để thiết kế 2 trình tự crRNA phục vụ nghiên cứu chỉnh sửa gen *IPA1-J02* bằng công nghệ CRISPR/Cas9. Cấu trúc biểu hiện gRNA mang 2 trình tự crRNA nhận biết 2 vị trí khác nhau trên exon III của *IPA1-J02* đã được đưa vào vector nhị phân pCas9. Vector pCas9/gRNA-IPA1

đã được kiểm tra bằng phương pháp PCR và cắt enzyme giới hạn để phục vụ nghiên cứu tăng năng suất cho giống lúa chất lượng cao J02 bằng công nghệ chỉnh sửa hệ gen.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Bae, S., Park J. and Kim J. S.**, 2014. Cas-OFFinder: a fast and versatile algorithm that searches for potential off-target sites of Cas9 RNA-guided endonucleases. *Bioinformatics.*, 30 (10): 1473-1475.
- Bortesi, L. and Fischer R.**, 2015. The CRISPR/Cas9 system for plant genome editing and beyond. *Biotechnol Adv.*, 33 (1): 41-52.
- Doench, J. G., Fusi N., Sullender M., Hegde M., Vaimberg E. W., Donovan K. F., Smith I., Tothova Z., Wilen C., Orchard R., Virgin H. W., Listgarten J. and Root D. E.**, 2016. Optimized sgRNA design to maximize activity and minimize off-target effects of CRISPR-Cas9. *Nat Bio.*, 34 (2): 184-191.
- Doyle, J. J. and Doyle J. L.**, 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus.*, 12: 13-15.
- Fan, C., Xing Y., Mao H., Lu T., Han B., Xu C., Li X. and Zhang Q.**, 2006. IPA1, a major QTL for grain length and weight and minor QTL for grain width and thickness in rice, encodes a putative transmembrane protein. *Theor Appl Genet.*, 112 (6): 1164-1171.
- Fu, Y., Sander, J., Reyon, D., Cascio V. M. and Joung J. K.**, 2014. Improving CRISPR-Cas nuclease specificity using truncated guide RNAs. *Nat Biotechnol.*, 32: 279-284.
- Jiao, Y., Wang Y., Xue D., Wang J., Yan M., Liu G., Dong G., Zeng D., Lu Z., Zhu X., Qian Q. and Li J.**, 2010. Regulation of OsSPL14 by OsmiR156 defines ideal plant architecture in rice. *Nat Genet.*, 42 (6): 541-544.
- Li, M., Li X., Zhou Z., Wu P., Fang M., Pan X., Lin Q., Luo W., Wu G. and Li H.**, 2016. Reassessment of the Four Yield-related Genes Gnl1a, DEP1, IPA1, and IPA1 in Rice Using a CRISPR/Cas9 System. *Front Plant Sci.*, 7: 377.
- Liang, G., Zhang H., Lou D. and Yu D.**, 2016. Selection of highly efficient scrRNAs for CRISPR/Cas9-based plant genome editing. *Sci Rep.*, 6: 21451.
- Ma, X., Zhu Q., Chen Y., and Liu Y. G.**, 2016. CRISPR/Cas9 platforms for genome editing in plants: Developments and applications. *Molecular Plant.*, 9 (7): 961-974.
- Mao, H., Sun S., Yao J., Wang C., Yu S., Xu C., Li X. and Zhang Q.**, 2010. Linking differential domain functions of the IPA1 protein to natural variation of grain size in rice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 107 (45): 19579-19584.
- Miura, K., Ikeda M., Matsubara A., Song X. J., Ito M., Asano K., Matsuoka., Kitano H., and Ashikari M.**, 2010. OsSPL14 promotes panicle branching and higher grain productivity in rice. *Nat Genet.*, 42 (6): 545-549.
- Nekrasov, V., Staskawicz B., Weigel D., Jones J. D. and Kamoun S.**, 2013. Targeted mutagenesis in the model plant *Nicotiana benthamiana* using Cas9 RNA-guided endonuclease. *Nat Biotechnol.*, 31 (8): 691-693.
- Sambrook, J. and Russel D. W.**, 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3rd ed. Cold Spring Harbour Laboratory. Cold Spring Harbour: NY.
- Shen, B., Zhang W., Zhang J., Zhou J., Wang J., Chen L., Wang L., Hodgkins A., Iyer V., Huang X. and Skarnes W. C.**, 2014. Efficient genome modification by CRISPR-Cas9 nickase with minimal off-target effects. *Nat Methods.*, 11 (4): 399-402.
- Shen, L., Wang C., Fu Y., Wang J., Liu Q., Zhang X., Yan C., Qian Q. and Wang K.**, 2018. QTL editing confers opposing yield performance in different rice varieties. *J Integr Plant Biol.*, 60 (2): 89-93.
- Smith, L. M., Sanders J. Z., Kaiser R. J., Hughes P., Dodd C., Connell C. R., Heiner C., Kent S. B. and Hood L. E.**, 1986. Fluorescence detection in automated DNA sequence analysis. *Nature*, 321 (6071): 674-679.

### Designing a T-DNA for editing *IPA1* gene related to yield trait of J02 rice variety

Phung Thi Thu Huong, Pham Thu Hang,  
Cao Le Quyen, Pham Xuan Hoi, Nguyen Duy Phuong

#### Abstract

With the aim of further improving the yield of high quality rice variety J02, the study focused on the isolation and sequencing of the exon III region of *IPA1-J02* related to traits for yield in rice variety J02, design crRNA sequences for modification of *IPA1-J02* and design T-DNA containing sgRNA expression structure for modification of *IPA1-J02*. The results showed that sgRNA expression constructs carrying two crRNA sequences recognizing two different positions on exon III of *IPA1-J02* was inserted into binary vector pCas9. Binary vector pCas9/gRNA-IPA1 was tested by PCR and restriction for future use of generating the yield-improved high-quality J02 rice variety using gene editing technology.

**Keywords:** Gene editing, yield, CRISPR/CAS9, *IPA1*, mutation

Ngày nhận bài: 06/9/2020  
Ngày phản biện: 21/9/2020

Người phản biện: GS.TS. Phạm Văn Toàn  
Ngày duyệt đăng: 02/10/2020