

BÀI TỔNG QUAN

HIỆN TRẠNG CÔNG NGHỆ GEN Ở TRUNG QUỐC, NHẬT BẢN VÀ HÀN QUỐC TRONG LĨNH VỰC Y DƯỢC VÀ NÔNG NGHIỆP

Phạm Lê Bích Hằng, Nguyễn Hải Hà, Lê Thị Thu Hiền✉

Viện Nghiên cứu hệ gen, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

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

Ngày nhận bài: 22.8.2017

Ngày nhận đăng: 28.12.2017

TÓM TẮT

Nghiên cứu và ứng dụng công nghệ gen ở các nước châu Á, đặc biệt là ba quốc gia Trung Quốc, Nhật Bản và Hàn Quốc, đã đạt được nhiều thành tựu và được áp dụng trong nhiều lĩnh vực của đời sống xã hội. Đối với lĩnh vực y dược, các quốc gia tập trung nghiên cứu chẩn đoán ung thư, bệnh truyền nhiễm và bệnh di truyền bằng các kỹ thuật phân tử liên quan đến PCR, giải trình tự gen thế hệ mới; thử nghiệm lâm sàng điều trị bằng liệu pháp gen và nâng cao biện pháp phòng bệnh bằng các loại vaccine cải tiến như vaccine tiêu đơn vị hay vaccine DNA. Bên cạnh đó, những nghiên cứu thăm dò được tiến hành trên tế bào hay phôi người sử dụng kỹ thuật chỉnh sửa gen CRISPR/Cas9 với hy vọng tìm ra phương pháp mới để điều trị bệnh di truyền và ung thư. Trong lĩnh vực nông nghiệp, nhiều quốc gia ở châu Á không dừng ngoài xu thế nghiên cứu và cấp phép thương mại các giống cây trồng biến đổi gen cho phép sử dụng làm thực phẩm, nguyên liệu chế biến và thức ăn chăn nuôi. Các tính trạng được biến đổi chủ yếu là kháng sâu bệnh, kháng virus, chịu được thuốc diệt cỏ, chịu hạn, chịu mặn và tăng hàm lượng dinh dưỡng. Nhìn chung, tốc độ phát triển và ứng dụng công nghệ gen ở các quốc gia này tiến bộ vượt bậc so với các nước khác ở châu Á, nhưng vẫn còn hạn chế so với Hoa Kỳ, Canada và một số quốc gia ở châu Âu. Vì vậy, mỗi quốc gia cần định hướng chính sách và đầu tư phù hợp để ứng dụng những công nghệ sinh học tiên tiến trên thế giới góp phần cải thiện chất lượng cuộc sống con người.

Từ khóa: PCR, giải trình tự gen thế hệ mới, hệ thống chỉnh sửa gen CRISPR/Cas9, liệu pháp gen, vaccine, cây trồng biến đổi gen

MỞ ĐẦU

Công nghệ gen là một phần quan trọng của công nghệ sinh học hiện đại, cho phép trực tiếp sửa đổi vật liệu di truyền, thay đổi cấu trúc của tế bào để tạo ra các sinh vật cải tiến hoặc sinh vật mới, mang các tính trạng mới theo đúng nhu cầu. Trên thực tế, nhiều thành tựu nghiên cứu của công nghệ gen đã được áp dụng đa dạng vào các lĩnh vực như nông nghiệp, y dược và môi trường. Sự phát triển vượt bậc của công nghệ đã mở ra thời kỳ phát triển của các nghiên cứu giải trình tự toàn bộ hệ gen, các lĩnh vực khoa học omics và các chương trình nghiên cứu liên quan tạo ra các ứng dụng và sản phẩm khoa học công nghệ có giá trị cao. Thị trường di truyền học, dựa trên các ứng dụng, được phân chia thành các thị phần chẩn đoán, tìm kiếm và phát triển thuốc, y học cá thể, pháp y, nghiên cứu nông

ng nghiệp và động vật. Các nhà kinh tế dự đoán thị trường di truyền học sẽ tăng từ 12,44 tỷ USD vào năm 2015 lên 19,99 tỷ USD vào năm 2020 với đóng góp lớn nhất đến từ Bắc Mỹ, tiếp theo là châu Âu, châu Á - Thái Bình Dương và phần còn lại của thế giới. Các quốc gia châu Á, đặc biệt là Trung Quốc, Nhật Bản và Hàn Quốc, đã và đang tập trung nghiên cứu và phát triển công nghệ gen trong suốt 15 năm qua. Quan trọng hơn, các khía cạnh ứng dụng của công nghệ gen đã nhận được nhiều sự quan tâm và đầu tư tích cực ở cả khu vực nhà nước và tư nhân, dẫn đến việc thành lập nhiều công ty chuyên môn trong các lĩnh vực liên quan đến y học và nông nghiệp. Mục đích của tổng quan này là đánh giá hiện trạng công nghệ gen trong lĩnh vực y dược và nông nghiệp ở châu Á, cụ thể tập trung vào ba quốc gia có nền công nghệ sinh học phát triển là Trung Quốc, Nhật Bản và Hàn Quốc.

TRUNG QUỐC

Nghiên cứu phát triển và ứng dụng công nghệ gen trong lĩnh vực y dược

Hiện nay, Trung Quốc là một trong những quốc gia phát triển hàng đầu của châu Á về lĩnh vực khoa học công nghệ ứng dụng trong y học. Do nhận được sự ủng hộ và đầu tư đáng kể từ chính phủ và các tập đoàn lớn, các nhà khoa học Trung Quốc tập trung đồng thời nghiên cứu cơ bản và ứng dụng, tạo ra nhiều thành tựu nổi bật so với các nước trong khu vực. Kế thừa dữ liệu, trình tự hệ gen của 1092 cá thể từ 14 quần thể dân số thuộc các quốc gia khác nhau trên thế giới với lượng lớn các biến thể di truyền (Dự án 1.000 hệ gen sử dụng công nghệ giải trình tự gen thế hệ mới, next generation sequencing - NGS), các nhà khoa học của Viện Gen học Bắc Kinh, thuộc Viện Hàn lâm Khoa học Trung Quốc, đã xây dựng Cơ sở dữ liệu hệ gen người Trung Quốc tự động (Virtual Chinese Genome Database - VCGDB) trên cơ sở dữ liệu trình tự toàn bộ hệ gen của 194 cá thể. Qua phân tích và xử lý dữ liệu, VCGDB đã cung cấp thông tin di truyền gồm 35 triệu biến thể nucleotide đơn (single nucleotide variants - SNVs), 0,5 triệu indels và 29 triệu biến thể hiếm cùng với thông tin chú giải về gen (Ling *et al.*, 2014). Gần đây, các nhà khoa học Trung Quốc lần đầu tiên đã mô tả nghiên cứu trên phôi người không thể phát triển thành người được (nonviable human embryo) để biến đổi một gen liên quan đến bệnh thiếu máu di truyền thalassaemia bằng công nghệ CRISPR/Cas9. Trong nghiên cứu này, gen β -globin nội sinh (*HBB*) được phân cắt trong hợp tử ba nhân (tripronuclear (3PN) zygote). Tuy nhiên, hiệu quả của việc sửa chữa theo cơ chế tái tổ hợp tương đồng trực tiếp (HDR) của *HBB* thấp và phôi được chỉnh sửa ở dạng thể khảm. Hơn nữa, gen delta-globin nội sinh (*HBD*), tương đồng với *HBB*, cạnh tranh với các oligo ngoại sinh để hoạt động như một khuôn mẫu sửa chữa, dẫn đến các đột biến không mong muốn (Liang *et al.*, 2015). Thử nghiệm thứ hai trên phôi người được các nhà khoa học Trung Quốc thực hiện nhằm tạo tế bào miễn dịch người kháng HIV-1, làm cho lượng virus HIV xuống mức không thể phát hiện được ở ít nhất một cá thể. Bằng cách tiêm đồng thời Cas9 mRNA, gRNA và DNA người cho, allele đột biến *CCR5A32* tự nhiên đã được chuyển thành công vào các phôi người 3PN ở giai đoạn sớm. Gen đột biến sẽ thay thế protein CCR5 theo cách ngăn cản virus HIV xâm nhập vào tế bào T đích gây nhiễm. Phân tích di truyền cho thấy 4 trong 26 phôi người đã được biến đổi thành công. Tuy nhiên, không phải tất cả các nhiễm sắc thể

của phôi đều chứa đột biến *CCR5A32*. Một số phôi có chứa CCR5 chưa được biến đổi, trong khi một số khác lại có các đột biến indel khác (Kang *et al.*, 2016). Năm 2016, các nhà khoa học Trung Quốc đã tiến hành thử nghiệm lâm sàng đầu tiên sử dụng phương pháp chỉnh sửa gen CRISPR cho bệnh nhân ung thư phổi tế bào không nhỏ, di căn, không đáp ứng hóa trị, xạ trị hay bất kỳ liệu pháp nào. Các tế bào T được tách từ máu bệnh nhân, sau đó sử dụng CRISPR để loại bỏ gen mã hóa protein *PD-1* có chức năng điều hòa đáp ứng miễn dịch của tế bào T để ngăn chặn chúng tấn công các tế bào khỏe mạnh. Các tế bào T đã chỉnh sửa gen *PD-1* này được nhân bản và đưa vào mạch máu của bệnh nhân với hy vọng có thể tấn công và tiêu diệt bệnh ung thư (Cyranoski, 2016).

Trong 20 năm qua, công nghệ chẩn đoán phân tử lâm sàng đã phát triển nhanh chóng và trở thành lĩnh vực hừng hực nhất trong y học thực nghiệm lâm sàng. Do xét nghiệm bệnh truyền nhiễm là ứng dụng lớn nhất và lượng lớn các xét nghiệm PCR cho các bệnh truyền nhiễm được thực hiện ở Trung Quốc sử dụng các bộ kit chẩn đoán sản xuất trong nước, thị trường chẩn đoán phân tử của Trung Quốc đang ngày càng mở rộng. Nhiều nghiên cứu cải tiến các kỹ thuật dựa trên PCR cơ bản cũng được Trung Quốc phát triển nhanh chóng để kịp thời phát hiện nhiều loại bệnh truyền nhiễm nguy hiểm và có tính lây lan cao. Phương pháp real-time PCR được thiết kế dựa trên vùng ITS-2 của ribosomal DNA *Necator americanus* để tiến hành điều tra dịch tễ học về tình trạng nhiễm giun móc *N. americanus* cho kết quả nhanh, nhạy và chính xác hơn phương pháp PCR truyền thống hay soi dưới kính hiển vi (Wang *et al.*, 2012). Nghiên cứu các nhiễm trùng cơ hội (opportunistic infections - OIS) hệ thần kinh trung ương ở những người sống chung với HIV tại Trung Quốc, kỹ thuật real-time PCR dịch não tủy với các mẫu đặc hiệu phát hiện trên 54 bệnh nhân nhiễm HIV cho thấy dương tính đối với DNA của cytomegalo virus (CMV), varicella-zoster virus (VZV), Epstein-Barr virus (EBV), human herpes 6 virus (HHV-6) và John Cunningham virus (JCV) (tương ứng là 22,2%; 3,7%; 1,9%; 1,9%; 1,9%). Phương pháp chẩn đoán xác định mầm bệnh này giúp cải thiện việc chẩn đoán OIS liên quan đến AIDS ở các nước đang phát triển (Yang *et al.*, 2017). Là quốc gia đang phải đối mặt với thách thức lớn trong việc phục vụ lượng dân số mắc bệnh hiểm lớn nhất thế giới, năm 2013 Trung Quốc đã khởi động dự án thí điểm đầu tiên của mình nhằm thiết lập một trung tâm xét nghiệm di truyền phân tử tập trung vào 20 bệnh hiểm gặp đại diện.

Các công nghệ NGS có thể cung cấp sàng lọc di truyền nhanh, toàn diện và tiết kiệm chi phí cho các bệnh di truyền và đã được áp dụng thành công trong chẩn đoán di truyền một số bệnh hiếm gặp. Bước đầu, 9 gen đơn và 7 phân tích dựa trên NGS bao phủ 15 bệnh hiếm gặp sẽ được phát triển để hỗ trợ các dịch vụ chẩn đoán di truyền phân tử (Cui *et al.*, 2014). Nhờ sự phát triển lý thuyết và lâm sàng của y học hiện đại, liệu pháp gen đã trở thành một chiến lược điều trị đầy hứa hẹn cho bệnh ung thư và các bệnh di truyền khác. Một số thử nghiệm lâm sàng về liệu pháp gen đã được thực hiện ở Trung Quốc từ năm 1998, từ đó nghiên cứu y khoa ở Trung Quốc phát triển rất mạnh. Thử nghiệm lâm sàng giai đoạn I của vector adenovirus tái tổ hợp biểu hiện p53 được thực hiện từ năm 1998 đến năm 2003 tại bốn bệnh viện ở Bắc Kinh và được cho là khởi đầu của liệu pháp gen ở Trung Quốc. Năm 2003, Cục Quản lý Thực phẩm và Dược phẩm Trung Quốc (State Food and Drug Administration of China - SFDA) đã phê duyệt thuốc thử liệu pháp gen đầu tiên và Trung Quốc đã trở thành nước đầu tiên chấp thuận một sản phẩm liệu pháp gen cho các ứng dụng lâm sàng. Adenoviral p53 tái tổ hợp (hay rAd-p53, Gendicine™ sản xuất bởi ShenZhen SiBiono Gene Tech, Shenzhen, Trung Quốc) là adenovirus serotype 5 tái tổ hợp của người, trong đó các vùng E1 được thay thế bằng một cấu trúc biểu hiện WT p53 của người. Tổng cộng có 16 thử nghiệm lâm sàng có kiểm soát của rAd-p53 (Gendicine™) đã được thực hiện để điều trị những ung thư khó, bao gồm ung thư đầu mạch cổ, ung thư biểu mô tế bào gan, ung thư phổi tế bào không nhỏ NSCLC, u ác tính và ung thư biểu mô buồng trứng. Nhìn chung, kết quả của các thử nghiệm lâm sàng hiện nay khá tốt với tỷ lệ đáp ứng tổng thể và tỉ lệ sống sót ở các nhóm điều trị rAd-p53 tốt hơn so với các nhóm đối chứng (Li *et al.*, 2017). Bên cạnh đó, vector oncolytic adenovirus có khả năng nhân bản là sản phẩm liệu pháp gen thứ hai trên thế giới được Trung Quốc thông qua. Liệu pháp này được thử nghiệm lâm sàng giai đoạn II trên 123 bệnh nhân ung thư và cho tỷ lệ đáp ứng tổng thể là 78,8% khi điều trị kết hợp với hóa trị liên quan đến phác đồ cisplatin/5-fluorouracil, trong khi điều trị đơn thuần bằng cisplatin/5-fluorouracil chỉ cho tỷ lệ đáp ứng 39,6% (Xia *et al.*, 2004). Oncorine (H101) - một oncolytic adenovirus bị loại bỏ vùng gen *E1B* và một phần *E3* - được SFDA cấp phép sử dụng kết hợp với hóa trị liệu như là một phương pháp điều trị cho bệnh nhân ung thư vòm họng giai đoạn cuối. Từ năm 2000 đến năm 2004, 228 bệnh nhân với 13

loại ung thư biểu mô được chọn lọc từ giai đoạn I đến giai đoạn III, cho tiến hành thử nghiệm lâm sàng với H101. Tỷ lệ bệnh nhân có đáp ứng lâm sàng rõ rệt của nhóm kết hợp H101 với hóa trị liệu (73%) cao hơn so với nhóm chỉ dùng hóa trị liệu (40%) (Yu, Fang, 2007; Shi, Zheng, 2009). Ngoài Oncorine, thuốc tiêm adenovirus tái tổ hợp nhắm khối u (H102) và oncolytic adenovirus tái tổ hợp (H103) cũng được phát triển để điều trị ung thư. H102 đặc biệt hướng đến ung thư biểu mô tế bào thượng thận nguyên phát. Adenovirus H103 ly giải các tế bào khối u và biểu hiện Hsp70 có thể kích thích mạnh mẽ đáp ứng miễn dịch kháng khối u (Kaptein *et al.*, 2010).

Chính phủ Trung Quốc đã và đang đầu tư và tăng cường tài trợ để nghiên cứu các bệnh truyền nhiễm, áp dụng công nghệ hiện đại để tạo ra vaccine thế hệ mới, đẩy mạnh sản xuất vaccine nhằm phát triển ngành công nghiệp vaccine tại địa phương của Trung Quốc. Kết quả nghiên cứu protein tái tổ hợp cúm (rH5HA) kháng hemagglutinin (HA) của virus cúm gia cầm H5N1 cho thấy rH5HA có khả năng cảm ứng đáp ứng miễn dịch dịch thể và kéo dài hơn 6 tháng (Liu *et al.*, 2013). Virus cúm gia cầm nhóm J (Avian leukosis virus - ALV-J) cũng được ngăn chặn hiệu quả bằng 2 loại vaccine tái tổ hợp rMDV/ALV-gag+env và rMDV/ALV-env, được tạo ra bằng cách chèn gen gag+env hoặc env vào gen *US2* của Marek's disease herpes virus (MDV) (Liu *et al.*, 2016b). Việc bảo vệ chống lại nhiễm trùng lao *Mycobacterium tuberculosis* được tạo ra bởi một loại vaccine tiêu đơn vị đa phân tử mới sử dụng 5 kháng nguyên biểu hiện ở các giai đoạn khác nhau (Rv1813, Rv2660c, Ag85B, Rv2623 và HspX) của *M. tuberculosis* được chứng minh có khả năng làm tăng số lượng tế bào T CD4⁺ IFN- γ ⁺IL-2⁺ và IFN- γ ⁺ CD8⁺ (Wang *et al.*, 2015b); và tổ hợp protein ESAT6-Ag85B-MPT64₁₉₀₋₁₉₈-Mtb8.4 (EAMM) + Mtb10.4-HspX (MH) cho hiệu quả diệt vi khuẩn lao trong phổi và lá lách tương đương với vaccine BCG (Xin *et al.*, 2013). Nhìn chung, các sản phẩm vaccine của Trung Quốc không chỉ đảm bảo phòng ngừa và kiểm soát bệnh truyền nhiễm ở trong nước mà còn đáp ứng nhu cầu về sức khỏe cộng đồng quốc tế. Trong những năm gần đây, nhờ vào sự tiến bộ trong công nghệ, nhiều nghiên cứu kịp thời tại thời điểm dịch bệnh bùng nổ và tạo ra các loại vaccine mới nhằm làm tăng hiệu quả đáp ứng miễn dịch và giảm rủi ro sau khi tiêm phòng cho con người và vật nuôi.

Nghiên cứu phát triển và ứng dụng công nghệ gen trong lĩnh vực nông nghiệp

Với chính sách ưu tiên phát triển công nghệ sinh học nông nghiệp ngay từ những năm 1970, cây lương thực và bông đã được tập trung nghiên cứu. Trong Chiến lược phát triển khoa học và công nghệ quốc gia trung và dài hạn (2006 - 2020), các giống cây trồng (lúa, lúa mì, ngô và bông) và vật nuôi (lợn, gia súc và cừu) được đầu tư nghiên cứu. Mục tiêu là chọn tạo được các giống mang những tính trạng mới như kháng côn trùng, kháng bệnh và chống chịu được các điều kiện bất lợi (kháng hạn và kháng mặn), tăng cường hàm lượng chất dinh dưỡng. Để kiểm soát sâu bệnh, Trung Quốc đóng vai trò tích cực trong việc phát triển và ứng dụng công nghệ di truyền vào cây trồng và đã phát triển hàng chục dòng lúa và ngô biến đổi gen biểu hiện các protein diệt côn trùng từ vi khuẩn đất *Bacillus thuringiensis* (*Bt*). Các dòng lúa *Bt* này có thể được chia thành ba loại như sau:

(i) Các dòng chứa một gen *Bt* đơn như *cry1Ab* trong các dòng Kemin dao (KMD) và mfb-MH86; *cry1Ac* trong AC-1, E10, và E54; *cry1C* trong TIC-19

và C-54; *cry2A* trong T2A-1, T2A-2, T2A-3, và T2A-4; và *cry9C* trong 9C-1, 9C-2, 9C-3, 9C-4 và 9C-5;

(ii) Chứa một gen *Bt* dung hợp, như gen hợp nhất *cry1Ab/1Ac* trong TT51-1 (Huahui 1), TT9-3 và *Bt* Shanyou 63; và gen *cry1Ab/vip3H* trong G6H-1, G6H-2, G6H-3, G6H-4, G6H-5 và G6H-6;

(iii) Có chứa các gen diệt côn trùng như *cry1Ac* và *CpTI* (cowpea trypsin inhibitor) cải tiến ở MSA, MSB và Kefeng6.

Ngoài ra, một số dòng lúa *Bt* đa gen chuyển, ví dụ gen *bar* chịu được thuốc diệt cỏ và *Xa21* để kháng bệnh. Trong lúa *Bt*, các promoter cơ định như *ubiquitin* và *actin1* được sử dụng rộng rãi để biểu hiện gen *Bt*, kết quả là các protein *Bt* được biểu hiện trong toàn bộ cây. Tuy nhiên, để giảm rủi ro tiềm ẩn về khả năng kháng *Bt* của các loài côn trùng và mối lo ngại về an toàn của người tiêu dùng, các promoter đặc hiệu mô bắt đầu được sử dụng để phát triển cây lúa *Bt*. Điển hình là các promoter đặc hiệu mô xanh ở lúa *rbcS* và *pGreen* được sử dụng tương ứng trong các dòng lúa RJ-5 và S21.



Hình 1. Diện tích trồng bông biến đổi gen (GM) ở Trung Quốc năm 2014.

Việc phát triển ngô *Bt* bắt đầu vào cuối những năm 1980 ở Trung Quốc, nhưng chuyển động tương đối chậm trong giai đoạn đầu. Quá trình này tiến triển tốt hơn trong thập kỷ vừa qua, đặc biệt là sau khi bắt đầu Chương trình Đa dạng các sinh vật biến đổi gen (GMOs) quốc gia mới trong năm 2008. Giống như lúa *Bt*, tất cả các dòng ngô *Bt* phát triển ở Trung Quốc biểu hiện gen *cry1* và/hoặc *cry2* nhằm diệt sâu *Lepidopteran*. Hầu hết các dòng ngô *Bt* chứa một gen *Bt* đơn, ví dụ *cry1Ac* trong dòng BT-799 và Zhengdan958K, *cry1Ie* trong IE09S034 và *cry1Ah* trong G186. Một số dòng ngô *Bt* chứa gen *Bt* dung hợp như *cry1Ab/cry2Aj* ở Shuangkang 12-5 và *cry1Ah/cry1Ie* trong HIF21. Ngoài ra, có một số dòng ngô *Bt* chứa đa gen *epsps*, *bar* hoặc *G10evo-epsps*, do đó biểu hiện cả khả năng kháng sâu bệnh và chịu được thuốc diệt cỏ. Các kỹ thuật thông qua vi khuẩn *Agrobacterium*, súng bắn gen và ông phân hoa thường được sử dụng để chuyển gen cho ngô *Bt*. Các promoter được sử dụng trong ngô *Bt* chủ yếu bao gồm *pZmUbi-1* (*Zea mays* polyubiquitin-1), *P35S* và *CaMV 35S* (Liu *et al.*, 2016a).

Trung Quốc là quốc gia canh tác cây trồng công nghệ sinh học đứng thứ tám trên thế giới về diện tích (2,8 triệu ha) (James, 2016). Tuy nhiên, việc canh tác cây trồng biến đổi gen được phê duyệt trên cơ sở từng tỉnh. Phần lớn các chứng chỉ an toàn sinh học trong gieo trồng cấp phép cho các giống bông *Bt* kháng côn trùng (*GK12*, *SGK321*) phát triển trong nước. Năm 2014, diện tích trồng bông biến đổi gen chiếm 3,9 triệu ha, đạt 93% tổng số diện tích trồng bông tại Trung Quốc. Các giống cây trồng đang trong quá trình khảo nghiệm đồng ruộng bao gồm ngô kháng côn trùng, ngô có hàm lượng lysine cao, lúa mạch không nảy mầm trước thu hoạch và đậu tương kháng côn trùng. Kế hoạch 5 năm lần thứ 13 về Sáng kiến Khoa học và Công nghệ Quốc gia (FYP 13th) do Hội đồng Nhà nước ban hành vào tháng 8/2016 cho thấy Trung Quốc sẽ thúc đẩy việc thương mại hóa các sản phẩm chủ chốt, bao gồm bông *Bt*, ngô *Bt* và đậu tương chịu được thuốc diệt cỏ (Kim, 2016). Hình 1 trình bày các diện tích trồng bông biến đổi gen (GM) ở Trung Quốc năm 2014 (Puette, 2016).

Trung Quốc cũng là quốc gia đi đầu trong nghiên cứu công nghệ sinh học trên động vật. Kinh phí tài trợ khoa học và công nghệ chủ chốt của Trung Quốc dành cho việc nhân giống các giống công nghệ sinh học mới đưa ra trong năm 2008 đã hỗ trợ nghiên cứu động vật biến đổi gen bao gồm lợn, gia súc và cừu. Trung tâm Nghiên cứu Công nghệ

động vật biến đổi gen Quốc gia được thành lập tại Đại học Nội Mông vào tháng 9/2012 nhằm cải thiện giống vật nuôi mới và chăn nuôi ở Trung Quốc, đồng thời tạo điều kiện cho việc giáo dục cộng đồng về công nghệ chăn nuôi gia súc. Nghiên cứu chủ yếu tập trung vào phát triển được phẩm, nâng cao khối lượng và chất lượng sản xuất sữa, cải tiến chất lượng thịt và len. Kể từ năm 2015 trở lại đây, với sự phát triển mạnh mẽ của công cụ chỉnh sửa hệ gen bằng hệ thống CRISPR/Cas9 ở Trung Quốc, nhiều nghiên cứu tạo động vật biến đổi gen được tiến hành thử nghiệm trên dê, cừu, lợn, khí và chó. Wang và đồng tác giả (2015a) với mục đích cải thiện hiệu suất của dê cashmere về khả năng cung cấp thịt và sợi cashmere, 2 gen myostatin (*MSTN*) và fibroblast growth factor 5 (*FGF5*) được chọn để thực hiện đột biến. Theo nhiều nghiên cứu, mất chức năng *MSTN* là nguyên nhân gây ra kiểu hình tăng khối cơ và đột biến *FGF5* giúp tăng chiều dài lông ở một số động vật có vú. Do đó, *MSTN* và *FGF5* được chọn để tạo dê cashmere biến đổi gen với cả hai gen bị gián đoạn bởi hệ thống CRISPR/Cas9. Nhóm nghiên cứu đã thành công khi đồng vi tiêm các phôi giai đoạn một tế bào với Cas9 mRNA và sgRNA đích tới hai gen trên, dẫn đến một hoặc cả hai gen bị gián đoạn. Hiệu quả hướng mục tiêu của *MSTN* và *FGF5* trong các nguyên bào sợi sơ cấp nuôi cấy lên đến 60%, trong khi hiệu quả làm gián đoạn *MSTN* và *FGF5* ở 98 động vật thí nghiệm lần lượt là 15% và 21%, và 10% đối với sự biến đổi cho 2 gen (Wang *et al.*, 2015a). Bên cạnh đó, chó beagle biến đổi gen cũng được tạo ra với kỹ thuật tương tự nhằm cải tiến nghiệp vụ an ninh sân bay, hải quan và các nhiệm vụ đặc biệt khác. Gen *MSTN* ức chế cơ bắp được xóa trong phôi có hình thái bình thường nhờ vi tiêm hỗn hợp Cas9 mRNA và *MSTN* sgRNA. Thành công của nghiên cứu đã tạo ra hai con chó beagle biến đổi gen “Hercules” và “Tiangou”; trong đó quá trình chỉnh sửa gen của Hercules không hoàn chỉnh (một phần cơ của Hercules vẫn tạo ra myostatin), nhưng Tiangou được chỉnh sửa hoàn toàn tạo ra kiểu hình khác biệt rõ rệt so với chó bình thường ở cùng độ tuổi (Zou *et al.*, 2015). Mặc dù Trung Quốc không phải là nơi nghiên cứu ra kỹ thuật CRISPR nhưng đã trở thành quốc gia tích cực sử dụng công nghệ này. Kế thừa những thành tựu đạt được trong công cuộc nghiên cứu tạo ra động vật biến đổi gen, các nhà khoa học Trung Quốc hướng mục tiêu tìm hiểu cách tiếp cận để tạo ra mô hình chó bị bệnh ở người phục vụ cho nghiên cứu y sinh học như bệnh Parkinson và chứng loạn dưỡng cơ; hay mô hình linh trưởng bệnh để hiểu rõ hơn các tình trạng của con người như

bệnh tự kỷ, bệnh tâm thần phân liệt và bệnh Alzheimer (Tu *et al.*, 2015). Tuy được đầu tư lớn và có những nghiên cứu tiên tiến, Trung Quốc vẫn chưa

cấp phép thương mại hoá bất kỳ loại gia súc nhân bản hoặc động vật biến đổi gen và các sản phẩm có nguồn gốc từ động vật công nghệ sinh học.



Hình 2. Động vật biến đổi gen bằng kỹ thuật CRISPR/Cas9 ở Trung Quốc. (A) Cừu biến đổi gen 30 ngày tuổi (Wang *et al.*, 2015a); (B) Chó beagle biến đổi gen Hercules và Tiangou (Zou *et al.*, 2015).

NHẬT BẢN

Nghiên cứu phát triển và ứng dụng công nghệ gen trong lĩnh vực y dược

Công nghệ gen, cụ thể là kỹ thuật giải trình tự gen, được Nhật Bản quan tâm và đầu tư nghiên cứu trong nhiều dự án quốc tế và trong nước. Từ khi công nghệ gen bắt đầu phát triển, Nhật Bản đã tham gia vào nhiều dự án quốc tế về genomics, epigenomics và các omics khác. Trong Dự án Hệ gen người, Viện RIKEN tham gia thực hiện giải trình tự một phần nhiễm sắc thể 11, 18 và 21, trong khi Trường Đại học Keio giải trình tự một phần nhiễm sắc thể 2, 6, 8, 21 và 22, giúp Nhật Bản đóng góp xác định 6% toàn bộ trình tự hệ gen người. Năm 2002, Dự án HapMap Quốc tế phát triển một bản đồ haplotype của hệ gen người với mục tiêu là lập bản đồ và hiểu các mô hình đa dạng di truyền chung trong hệ gen của con người, nhằm đẩy nhanh việc tìm kiếm các nguyên nhân di truyền của bệnh ở người (Thorisson *et al.*, 2005). Trên cơ sở đó, Bộ Giáo dục, Văn hóa, Thể thao, Khoa học và Công nghệ Nhật Bản (MEXT) đã tài trợ cho các nhóm nghiên cứu Nhật Bản tham gia dự án. Viện RIKEN và Đại học Tokyo đã thực hiện được 24,3% hệ gen của nhiễm sắc thể 5, 11, 14, 15, 16, 17 và 19 bằng kỹ thuật SNP (single nucleotide polymorphism) genotyping. Trong Hiệp hội Hệ gen Ung thư Quốc tế (International Cancer Genome Consortium – ICGC), Nhật Bản dẫn đầu nghiên cứu ung thư gan - ung thư

biểu mô tế bào gan (có liên quan đến virus). Mục đích của ICGC là nghiên cứu sự thay đổi gen ở nhiều dạng ung thư và tạo ra các danh mục toàn diện về các gen bất thường ở các khối u từ 50 loại và phân loại ung thư khác nhau. Nhật Bản đã cố gắng làm sáng tỏ những thay đổi sinh dưỡng toàn diện trong hệ gen (đột biến, tái tổ hợp và thay đổi số lượng bản sao), ngoài hệ gen/ epigenome (methyl hóa) của các khối u và hệ gen phiên mã của virus liên quan đến ung thư biểu mô tế bào gan (gồm HBV và HCV) (Zhang *et al.*, 2011). Gần đây vào tháng 4/2016, Ủy ban Đạo đức sinh học của chính phủ Nhật Bản đã phê duyệt việc chỉnh sửa các gen từ tế bào trứng người đã được thụ tinh bằng kỹ thuật CRISPR/Cas9 để phục vụ nghiên cứu cơ bản, tìm ra các gen chịu trách nhiệm cho giai đoạn phát triển sớm. Điều này có thể giúp các nhà nghiên cứu phát triển phương pháp điều trị các bệnh bẩm sinh và cải tiến công nghệ liên quan đến sinh sản.

Thị trường chẩn đoán *in vitro* của Nhật Bản trị giá 3 tỷ USD vào năm 2014 và dự kiến sẽ đạt 3,91 tỷ USD vào cuối năm 2020. Tốc độ tăng trưởng của thị trường nhanh là do một số yếu tố góp phần như gia tăng nhanh số người mắc bệnh mãn tính và bệnh truyền nhiễm, tiến bộ công nghệ, dân số già và sự ra đời của các chẩn đoán xét nghiệm tại chỗ. Tổng ngành công nghiệp chẩn đoán phân tử được chia thành 4 lĩnh vực chính: bệnh truyền nhiễm, ung thư học, rối loạn di truyền và dược động học. Xét về mặt công nghệ, các kỹ thuật dựa trên PCR thông thường,

đặc biệt là real-time PCR và các giải pháp tự động để phục vụ cho số lượng lớn, được ưu tiên sử dụng trong chẩn đoán bệnh. Tiếp theo là các phương pháp giải trình tự gen thế hệ mới đang dần dần xâm nhập vào thị trường Nhật Bản (Frost, Sullivan, 2017). Nhiều nghiên cứu đánh giá chất lượng của các phương pháp chẩn đoán bệnh lao, bệnh viêm gan do hepatitis B virus (HBV) cho thấy phương pháp nested PCR làm tăng độ nhạy và độ đặc hiệu đáng kể khi khuếch đại DNA so với PCR một bước thông thường (Takahashi *et al.*, 2013; Naito *et al.*, 2001). Đối với bệnh cúm, real-time PCR định lượng, real-time PCR siêu tốc và nhân bản DNA đẳng nhiệt (gồm kỹ thuật khuếch đại đẳng nhiệt qua trung gian cấu trúc kẹp tóc - LAMP và kỹ thuật giải trình tự gen thông qua nhân bản gen - NASBA) góp phần vào việc chẩn đoán và định type nhanh chóng và dễ dàng hơn (Sakurai, Shibasaki, 2012). Bên cạnh đó, sự xuất hiện của công nghệ NGS đã cho phép phân tích một cách có hệ thống và toàn diện nhiều gen, với kích thước khác nhau của các hội chứng di truyền cổ điển nhưng có các triệu chứng không điển hình. Một số đột biến gen không điển hình như đột biến *FBN1* của hội chứng progeroid bẩm sinh (Takenouchi *et al.*, 2013), đột biến *MAP2K2* trong hội chứng giống Noonan-caffe au lait syndrome (Takenouchi *et al.*, 2014a), đột biến *SOX9* trong hội chứng giống Stickler syndrome (Takenouchi *et al.*, 2014b), đột biến gen *NFI* của hội chứng rối loạn chức năng thần kinh đệm loại 1 (Maruoka *et al.*, 2014), đột biến gen *CHM* ở bệnh mất thị giác do khiếm khuyết trên nhiễm sắc thể X (Shimizu *et al.*, 2015) và nhiều bệnh di truyền khác. Công nghệ giải trình tự gen còn là công cụ hứa hẹn trong việc phân tích nguyên nhân phân tử và cơ chế toàn diện về ung thư. Bằng cách so sánh trình tự đọc của hệ gen khối u và hệ gen bình thường tương ứng của bệnh nhân, có thể xác định sự thay đổi hệ gen sinh dưỡng bao gồm các đột biến, thay đổi số lượng bản sao và tái sắp xếp cấu trúc hệ gen. Giải trình tự hệ gen phiên mã (Whole-transcriptome sequencing – WTS) có thể đánh giá hiệu quả các gen đột biến gây ung thư (oncogenes) được biểu hiện, đặc biệt là các gen hợp nhất trong khối u. Ngoài ra để đánh giá biểu hiện gen như phân tích microarray thông thường, WTS cũng có thể xác định RNA không mã hóa và các biến thể ghép nối sau phiên mã, phân loại hoặc giải thích chức năng của các gen đột biến do quá trình splicing hay các điều hòa ngoài di truyền (epigenetic) (Shibata, 2015). Tính đến nay, có khá nhiều nghiên cứu được các bác sĩ và khoa học Nhật Bản tiến hành sử dụng NGS để tìm ra các đột biến gen chức năng hay đột biến

kháng thuốc của nhiều loại ung thư như ung thư vú và buồng trứng (Hirotsu *et al.*, 2015), ung thư phổi (Masago *et al.*, 2015), ung thư tụy (Kameta *et al.*, 2016), u tủy (Ikeda *et al.*, 2015).

Việc áp dụng công nghệ gen trong điều trị bệnh thể hiện rõ nhất thông qua liệu pháp gen và nghiên cứu hệ gen được học. Mặc dù Nhật Bản là một quốc gia phát triển, tiên bộ về khoa học và công nghệ nhưng vẫn có tỷ lệ tương đối thấp trong lĩnh vực liệu pháp gen, do quan điểm bảo thủ của cơ quan quản lý Nhật Bản cũng như do sự do dự của các công ty dược phẩm trong việc tham gia vào công nghệ mới này. Các thử nghiệm lâm sàng về liệu pháp gen ở Nhật Bản đã phát triển dưới ảnh hưởng mạnh mẽ của các thử nghiệm ở Hoa Kỳ và châu Âu. Thử nghiệm liệu pháp gen đầu tiên của Nhật Bản được Bộ Y tế và Phúc lợi chấp thuận cho một bệnh nhân suy giảm miễn dịch kết hợp trầm trọng và khiếm khuyết adenosine deaminase. Các nhà nghiên cứu tại Đại học Hokkaido điều trị cho bệnh nhân bằng vector retrovirus nhập khẩu từ Genetic Therapy (Gaithersburg, MD), sử dụng cùng quy trình của nhóm Anderson áp dụng. Kể từ lần thử nghiệm đầu tiên này, đến nay có 58 thử nghiệm lâm sàng đã được chấp thuận; trong đó có 37 trường hợp áp dụng cho bệnh ác tính và 21 trường hợp cho bệnh bẩm sinh hoặc bệnh không ác tính (Tani, 2016). Nghiên cứu hệ gen dược học đóng vai trò quan trọng trong đáp ứng thuốc. Các biến thể di truyền trên hệ gen của các bệnh nhân sẽ cho đáp ứng khác nhau trong việc hấp thụ thuốc, phân bố, chuyển hóa và đào thải (absorption, distribution, metabolism and excretion - ADME). Đồng thời, các thụ thể gắn kết với các phân tử thuốc cũng khác nhau giữa các bệnh nhân. Đây cũng là một công cụ đặc biệt quan trọng trong sự phát triển y học cá thể. Các công ty Nhật Bản đã thành lập Tổ chức Pharma SNP vào năm 2000 với mục đích tiến hành nghiên cứu dược động học về đa hình gen Nhật Bản trong ba năm. Các nghiên cứu cụ thể xác định SNP trong gen liên quan đến dược động học, tần suất xuất hiện SNP ở người Nhật, và phân tích biểu hiện và chức năng của protein dạng đột biến tạo ra dưới ảnh hưởng của SNP. Năm 2009, Hiệp hội Khoa học dữ liệu PGx Nhật Bản (JPDSC) được thành lập bởi 6 công ty dược phẩm hàng đầu của Nhật như Astellas Pharma, Otsuka Pharmaceutical, Daiichi Sankyo, Taisho Pharmaceutical, Takeda Pharmaceutical và Mitsubishi Tanabe Pharmaceutical. Hiệp hội này nhằm mục đích xây dựng một cơ sở dữ liệu DNA cho thuốc tạo ra cho người Nhật để kiểm tra phân

úng bất lợi, hiệu quả và an toàn của thuốc. Trong giai đoạn đầu, 1.000 mẫu đối chứng đã được xác định kiểu gen (<http://www.jpds.org/english/jpds2.html>).

Sự ra đời của kỹ thuật di truyền đã ảnh hưởng nhanh chóng đến tiến bộ trong công nghệ vaccine. Trên thực tế, công nghệ vaccine của Nhật Bản không phát triển mạnh như của Hoa Kỳ, nhưng cũng tiến bộ so với các nước khác trong khu vực châu Á. Nhiều nhóm nghiên cứu khoa học về miễn dịch phân tử của các viện, trường ở Nhật Bản đã và đang thực hiện các nghiên cứu cơ bản, thử nghiệm tiền lâm sàng và lâm sàng cho nhiều loại vaccine thế hệ mới. Gần đây, nhóm nghiên cứu của Trung tâm nghiên cứu động vật bậc cao Tsukuba thuộc Viện Sảng kiến Y sinh học Quốc gia đã tiến hành đánh giá hiệu quả của vaccine phòng bệnh lao niêm mạc mới bằng cách thử nghiệm virus cúm trên người parainfluenza loại 2 tái tổ hợp (rhPIV2) ở chuột BALB/c. RhPIV2 là virus không đủ khả năng nhân bản (đã loại bỏ gen M) và được gắn với Ag85B (rhPIV2-Ag85B) bằng công nghệ di truyền ngược. Việc sử dụng rhPIV2-Ag85B trong ruột gây ra đáp ứng miễn dịch đặc hiệu *Mycobacterium tuberculosis* và chuột được chủng ngừa cho thấy có sự giảm đáng kể số lượng CFU của *M. tuberculosis* trong phổi và lá lách. Ngoài ra, rhPIV2-Ag85B có hoạt tính tự hỗ trợ thông qua thụ thể retinoic acid-inducible gene I giúp nâng cao hiệu quả của vaccine (Watanabe *et al.*, 2014). Những phát hiện này mở ra tiềm năng của rhPIV2-Ag85B như một vaccine bệnh lao mới. Virus hợp bào hô hấp (respiratory syncytial virus – RSV) là nguyên nhân phổ biến nhất gây nhiễm trùng hô hấp ở trẻ sơ sinh và không có vaccine. Vì thế các nhà khoa học thuộc Viện Khoa học sự sống Kitasato đã tạo ra vaccine sởi AIK-C tái tổ hợp có biểu hiện protein RSV F (MVAIK/RSV/F) và khảo sát hoạt tính kháng RSV của nó. Kết quả cho thấy chuột đã được tiêm chủng với MVAIK/RSV/F không phát hiện virus RSV khi cho lây nhiễm với RSV, và ghi nhận phản ứng viêm rất nhẹ ở phổi và không có biểu hiện kháng nguyên của RSV. Điều này cho thấy MVAIK/RSV/F là vaccine có nhiều hứa hẹn và hoạt tính bảo vệ cần được khảo sát thêm trong mô hình khỉ (Sawada *et al.*, 2011). Tiếp nối nghiên cứu trên, các chủng vaccine sởi AIK-C tái tổ hợp MVAIK/RSV/M2-1 và MVAIK/RSV/NP biểu hiện tương ứng protein RSV M2-1 hoặc nucleoprotein (NP) đã được phát triển. Thử nghiệm trên chuột được thiết kế tương tự như nghiên cứu trước và kết quả cho thấy virus sởi tái tổ hợp có gây đáp ứng miễn dịch và cảm ứng các tế bào IFN- γ (+) CD8 (+). Đồng thời, xét nghiệm mô học

phổi cho thấy có sự giảm đáng kể các phản ứng viêm và không có tổn thương phế nang. Những kết quả này hỗ trợ virus sởi tái tổ hợp trở thành vaccine tiềm năng, có hiệu quả kháng lại RSV (Yamaji, Nakayama, 2014). Một loại vaccine viêm não Nhật Bản (Japanese encephalitis virus - JEV) mới được nhóm nghiên cứu của công ty Kitasato-Daiichi Sankyo Vaccine tạo ra dựa trên công nghệ tái tổ hợp. Cụ thể, gen mã hóa protein JEV prM-E được nhân bản, chèn vào vị trí liên kết P/M của cDNA sởi AIK-C, và tạo ra virus tái tổ hợp có khả năng gây đáp ứng miễn dịch. Thử nghiệm trên tế bào B95a bị nhiễm virus tái tổ hợp này phát hiện được protein JEV E biểu hiện bên trong tế bào. Thử nghiệm trên chuột cho thấy phát hiện kháng thể kháng JEV phát triển một tuần sau khi tiêm virus tái tổ hợp, kháng thể sởi PA và kháng thể EIA sau ba tuần tiêm chủng. Các virus tái tổ hợp dựa trên DNA sởi AIK-C có thể gây đáp ứng miễn dịch đồng thời cho bệnh sởi và bệnh JEV, trở thành một loại vaccine cho trẻ sơ sinh. Do đó, chiến lược hiện tại của virus tái tổ hợp dựa trên vaccine ngừa bệnh sởi có thể áp dụng làm nền tảng để phát triển vaccine (Higuchi *et al.*, 2016).

Khác với Trung Quốc sử dụng công nghệ gen trên động vật để cải thiện giống vật nuôi trong chăn nuôi, hầu hết các nghiên cứu về biến đổi gen ở động vật tại Nhật Bản đều tập trung vào các mục đích y tế và dược phẩm của con người. Hiện nay, giống tằm biến đổi gen đang tiến gần đến giai đoạn áp dụng thương mại ở Nhật Bản. Viện Khoa học Sinh học nông nghiệp Quốc gia (National Institute of Agrobiological Sciences – NIAS) đưa ra Chương trình Nghiên cứu hệ gen tằm vào năm 1994. Protein tơ đã được sử dụng làm chất kết dính trong phẫu thuật. Vì thế, nghiên cứu sẽ mở rộng việc sử dụng protein tơ cho các vật liệu y tế như da nhân tạo, kính áp tròng... Năm 2003, nhóm nghiên cứu của Trường Đại học Hiroshima đã mô tả sự phát triển của tằm biến đổi gen tạo ra kén có chứa collagen tái tổ hợp loại III của người. Nghiên cứu được thực hiện bằng cách tạo một cDNA hợp nhất mã hóa một protein kết hợp chuỗi nhỏ procollagen type III người đã xóa phần C-propeptide, với chuỗi nhẹ fibroin (chuỗi L) và protein huỳnh quang xanh tăng cường (EGFP). cDNA này được nối phía dưới của promoter của fibroin L-chain và chèn vào vector *piggyBac*. Tiêm vector này vào trứng tằm, tạo ra tằm biểu hiện huỳnh quang EGFP trong các tuyến tơ của chúng. Những con kén phát huỳnh quang EGFP cho thấy promoter và cDNA fibroin L-chain tổng hợp các sản phẩm tiết ra bên trong kén (Tomita *et al.*, 2003). Sau ứng dụng tiềm năng của tằm biến đổi gen, nhiều nghiên cứu

sản xuất protein trị liệu trên giống tằm này được triển khai thực hiện như tạo ra giống tằm biến đổi gen sản xuất albumin huyết thanh người tái tổ hợp (recombinant human serum albumin - rHSA) (Ogawa *et al.*, 2007), kháng thể đơn dòng chuột tái tổ hợp (Iizuka *et al.*, 2009), chuỗi collagen alpha1 người loại I (Adachi *et al.*, 2010). Những nghiên cứu này cho thấy sự tồn tại của tằm biến đổi gen như một công cụ để sản xuất các protein hữu ích với số lượng lớn. Neosilk, công ty 100% vốn của IBL, đã bắt đầu bán loại mỹ phẩm có chứa collagen người từ tằm biến đổi gen này vào ngày 13/06/2013.

NIAS cũng tiến hành nghiên cứu về lợn biến đổi gen với mục đích phát triển lợn suy giảm miễn dịch để có thể cấy ghép cơ quan nội tạng cho người, tạo mô hình lợn bị các bệnh liên quan đến lối sống và ung thư ở người. Lợn được sử dụng đơn giản bởi vì sự tương đồng về sự trao đổi chất và kích thước của cơ quan đối với con người (<http://www.naro.affrc.go.jp/archive/nias/org/GMO/Pig/>). Phương pháp tạo ra lợn biến đổi gen chủ yếu bằng kỹ thuật chuyển gen vào nhân tế bào soma. Tuy nhiên, cách tiếp cận này đòi hỏi kỹ thuật vi thao tác phức tạp và đôi khi làm tăng nguy cơ tử vong trước và sau khi sinh. Do đó, Tanihara và đồng tác giả (2016) đã áp dụng phương pháp đơn giản cho việc chỉnh sửa gen ở lợn bằng kỹ thuật CRISPR/Cas9, đưa protein Cas9 và sợi RNA đơn hướng dẫn vào các hợp tử được thụ tinh trong ống nghiệm bằng kỹ thuật xung điện. Phương pháp này cho kết quả tạo đột biến gen mục tiêu với hiệu quả cao, tạo điều kiện cho việc sản xuất lợn biến đổi gen phục vụ cho mục đích y học.

Nghiên cứu phát triển và ứng dụng công nghệ gen trong lĩnh vực nông nghiệp

Theo ước tính có khoảng 20 - 30% dân số Nhật Bản bị dị ứng phấn hoa và thiệt hại về kinh tế do việc phấn hoa tăng lên khi nhiệt độ cao có thể lên đến hơn 5 tỷ USD. Do đó, bằng cách làm giảm biểu hiện các gen cụ thể trong quá trình ra hoa hoặc phát triển phấn hoa, nhóm nghiên cứu của Viện Nghiên cứu Rừng và Lâm sản (Forest and Forest Product Research Institute - FFPRI) đã tạo cây tuyết tùng Nhật Bản không có phấn hoa (*Cryptomeria japonica*). Vào ngày 8/4/2015, FFPRI đã nhận được giấy phép thử nghiệm đồng ruộng trong 2 năm sản phẩm cây tuyết tùng Nhật Bản biến đổi gen không có phấn hoa. Một đơn vị nghiên cứu khác của chính phủ, NIAS đã nghiên cứu để phát triển một loại lúa biến đổi gen có khả năng sản xuất ra một loại vaccine điều trị chống dị ứng hạt phấn của cây

tuyết tùng Nhật Bản. Các nhà nghiên cứu đã giải trình tự các gen kháng nguyên *C. japonica* 1 (*Cryj 1*) và *C. japonica* 2 (*Cryj 2*) của cây phấn hoa tuyết tùng Nhật Bản và chuyển các gen này vào giống lúa “Koshihikari”. Các kháng nguyên hạt phấn này được lắng đọng trong các thể dự trữ protein có nguồn gốc từ lưới nội chất (PB-I), thích hợp để phân phối đến hệ thống miễn dịch niêm mạc trong mô bạch huyết liên quan đến khi hấp thụ qua đường miệng, vì các kháng nguyên được đóng gói trong PB-I kháng enzyme đường ruột và môi trường khắc nghiệt thủy phân. Trong các thử nghiệm lâm sàng, chuột được cho ăn bằng gạo chuyển gen này phát hiện giảm đáng kể sự tăng sinh của các tế bào T CD4(+) đặc hiệu cho phản ứng dị ứng và lượng kháng thể IgE cũng như IgG so với chuột đối chứng. Nghiên cứu cho thấy lúa chuyển gen cũng thành công trong việc ngăn chặn các triệu chứng lâm sàng như hắt hơi và viêm mô mũi (Wakasa *et al.*, 2013). Vào tháng 3/2016, Bộ Nông Lâm Ngư nghiệp đã phê duyệt thử nghiệm đồng ruộng trong nước đối với dòng lúa chuyển gen *OSCR11* tạo ra vaccine có thể ăn được này. Một số nghiên cứu trong công nghệ sinh học nông nghiệp của Nhật Bản hướng đến cách tạo ra cây trồng đặc sản với lợi ích trực tiếp cho người tiêu dùng. Một nhóm nghiên cứu ở Đại học Tsukuba đã tạo ra cây đậu (Sugaya *et al.*, 2008) và cây cà chua chuyển gen (Hiwasa-Tanase *et al.*, 2012) có thể sản xuất miraculin. Miraculin là một loại protein tích lũy trong trái cây được gọi là “trái cây phép lạ” (*Richardella dulcifica*), có nguồn gốc từ Tây Phi. Một lượng nhỏ protein miraculin sẽ liên kết với các chồi vị giác và làm thay đổi vị chua thành ngọt. Bằng cách chuyển gen mã hoá protein miraculin dưới sự kiểm soát của promoter 35S hoặc E12 vào cây thông qua hệ thống chuyển gen *Agrobacterium*, đậu và cà chua biến đổi gen có chứa protein miraculin có thể dùng cho những người cần giảm lượng đường tiêu thụ như người bị tiểu đường.

Nhật Bản vẫn là một quốc gia nhận nhiều lợi ích từ công nghệ sinh học nông nghiệp để đảm bảo an ninh lương thực, thực phẩm. Hàng năm, Nhật Bản nhập khẩu gần 100% lượng ngô và 95% đậu tương biến đổi gen chủ yếu do Hoa Kỳ, Ukraine và Brazil cung cấp để làm thực phẩm và thức ăn chăn nuôi (Sato, 2016). Do sự phụ thuộc nhiều vào ngũ cốc cung cấp từ nước ngoài và sự thâm nhập cao của cây trồng biến đổi gen trong các loại cây trồng chính như đậu tương, ngô và bông, cây chuyển gen đã trở thành yếu tố thiết yếu để bảo đảm nguồn cung lương thực của Nhật Bản.

Mặc dù cây lương thực biến đổi gen không được sản xuất thương mại ở Nhật Bản, nhưng loại cây trồng công nghệ sinh học thương mại duy nhất được sản xuất là hoa hồng biến đổi gen được phát triển bởi Công ty Suntory, nhà máy bia lớn thứ ba ở Nhật Bản. Suntory đã phát triển hoa hồng “xanh” biến đổi gen đầu tiên trên thế giới bằng cách làm câm gen gây ra sắc tố đỏ trong hoa hồng dihydroflavonol reductase bằng kỹ thuật can thiệp RNA (RNA interference). Suntory cũng tạo ra một số dòng hoa cẩm chướng xanh biến đổi gen và đã được cấp phép trồng ở Nhật Bản. Một số hoa cẩm chướng biến đổi gen của Suntory cũng được phê chuẩn ở các nước khác như Malaysia và Liên minh châu Âu (Sato, 2016).

HÀN QUỐC

Nghiên cứu phát triển và ứng dụng công nghệ gen trong lĩnh vực y dược

Do kỹ thuật NGS giảm chi phí đáng kể nên việc giải mã cấu trúc di truyền của một quần thể bằng cách giải trình tự một số lượng lớn các cá thể ở mức độ bao phủ sâu là điều hoàn toàn có thể. Từ năm 2009, Trung tâm Khoa học Hệ gen (Center for Genome Science - CGS) của Viện Nghiên cứu Y tế Quốc gia Hàn Quốc (Korea National Research Institute of Health - KNRIH) đã báo cáo các nghiên cứu liên hợp gen toàn cầu với một số đặc điểm dịch tễ học và bệnh ở cộng đồng người Hàn Quốc và người Á Đông. Các nghiên cứu hiện tại về các vị trí biến thể bắt nguồn từ hệ gen tham chiếu của người da trắng nên đã giới hạn trong việc nghiên cứu các vị trí biến thể cụ thể của người Hàn Quốc. Vì vậy, CGS đã xây dựng dự án Hệ gen Tham chiếu người Hàn Quốc (Korean Reference Genome - KRG) vào năm 2012 và đã tiến hành giải trình tự toàn bộ hệ gen bằng Illumina HiSeq2000 cho 622 cá thể người Hàn Quốc. Mục đích chính của dự án KRG là cung cấp một bản đồ toàn diện các biến thể di truyền của người Hàn Quốc cho các nghiên cứu liên quan đến bệnh trong tương lai và di truyền dân số. Tính đến nay, dữ liệu thu được từ dự án bao gồm tần số allele thay đổi thường xuyên $\geq 1\%$, 8,7 triệu SNVs; allele hiếm là 18,3 triệu SNVs; 4,9 triệu biến thể indel ngắn; và một số biến thể về cấu trúc và số lượng bản sao (<http://152.99.75.168/KRGDB/menuPages/intro.jsp>). Ngày 25/11/2015, Dự án 10.000 hệ gen Ulsan với tiêu đề “Hệ gen Hàn Quốc ở Ulsan” được giới thiệu tại tổ chức liên minh gồm thành phố Ulsan, Viện Khoa học và Công nghệ Quốc gia Ulsan (UNIST),

Bệnh viện Đại học Ulsan và Đại học Ulsan. Mục đích của dự án là lập bản đồ đa dạng hệ gen của người Hàn Quốc, xây dựng cơ sở dữ liệu biến đổi gen đã được chuẩn hóa, phát hiện các đột biến gen hiếm gặp, và cung cấp thông tin chủ giải đầy đủ toàn bộ hệ gen để phát triển ngành công nghiệp gen của Hàn Quốc. Dự án 10.000 hệ gen Ulsan là dự án công quy mô lớn đầu tiên sẽ mở rộng cho toàn bộ dân số Hàn Quốc, tương đương với các Dự án 100.000 hệ gen ở Anh và Dự án 1 triệu hệ gen ở Hoa Kỳ. Số mẫu ban đầu (10.000) sẽ được thu thập từ những người khỏe mạnh và người bị suy giảm miễn dịch. Trong dự án 1.000 Epigenomes của Hiệp hội Epigenome người Quốc tế (IHEC) với sự tham gia của Hàn Quốc, Viện Y tế Quốc gia Hàn Quốc (Korea National Institute of Health – KNIH) cho triển khai dự án Korea reference epigenome, mục tiêu tạo ra ít nhất 50 hệ epigenome tham chiếu và nghiên cứu chúng để nâng cao và khai thác kiến thức về các quá trình sinh học và cơ chế khi khỏe mạnh và bệnh tật. KNIH sẽ tập trung vào 50 loại tế bào đồng nhất của các mô liên quan đến 5 bệnh mãn tính (suy tim, bệnh tự miễn, tiểu đường, béo phì và bệnh thận mãn tính) từ mô bình thường và mô bệnh, chủ yếu là mô bị loại bỏ hoặc cấy ghép. Do đó, Dự án Korea reference epigenome đến năm 2017 sẽ đóng góp phân tích 12 thành phần cho IHEC bao gồm DNAm, H3K4me3, H3K4me1, H3K9me3, H3K27me3, H3K27ac, H3K36me3, RNA-seq và RNA-chromatin immunoprecipitation (RNA-ChIP), DNaseI hypersensitivity, formaldehyde-assisted isolation of regulatory elements (FAIRE)-seq, chromatin interaction analysis using paired end tags (CHIA-PET), và miRNA-seq (Bae, 2013).

Những tiến bộ gần đây trong việc chỉnh sửa hệ gen với các nuclease có thể lập trình đã mở ra con đường mới cho nhiều ứng dụng đa dạng từ nghiên cứu cơ bản đến điều trị lâm sàng. Một trong các nghiên cứu chữa bệnh rối loạn đông máu bằng kỹ thuật chỉnh sửa hệ gen, Lee và đồng tác giả đã chuẩn bị zinc-finger nuclease (ZFN) nhằm vào vùng đồng nhất intron 1 của *factor VIII* (FVIII) và cố gắng xây dựng mô hình đảo ngược intron 1 thông qua các tế bào HEK-293 được chuyển gen FVIII bình thường. Mặc dù hiệu quả đảo ngược không cao và các indels liên quan đến sửa sai qua trung gian NHEJ cũng được quan sát nhưng kết quả cho thấy nuclease này có khả năng đảo ngược gen để sửa chữa gen trở về gần với trạng thái ban đầu của nó (Lee *et al.*, 2012). Mô hình nghiên cứu như vậy cũng đã được thông qua khi sử dụng transcription activator-like effector nuclease (TALEN) trong tế bào gốc cảm ứng đa

năng (induced pluripotent stem cells - iPSCs) bình thường. Một cặp TALEN được dùng để đảo ngược đoạn nhiễm sắc thể dài 140 kb nằm ở vùng gen FVIII nhằm tạo ra mô hình dòng tế bào hemophilia A (Park *et al.*, 2014). Nối tiếp nghiên cứu này, các nhà khoa học sử dụng CRISPR/Cas9 nucleases để đảo ngược 2 vùng gen dài 140 kb ở intron 1 và 600 kb ở intron 2 của gen FVIII, sau đó chuyển vào iPSCs. Các iPSC mang đúng vùng gen đảo ngược được chọn lọc và tế bào nội mô biệt hóa từ các iPSC này biểu hiện gen FVIII, phục hồi chức năng của FVIII trong mô hình chuột bị bệnh hemophilia. Kết quả này cung cấp một bằng chứng về nguyên tắc để sửa chữa chức năng khi tái sắp xếp nhiễm sắc thể lớn trong iPSC, từ đó đề xuất các ứng dụng điều trị tiềm năng trong tương lai (Park *et al.*, 2015).

Thị trường Hàn Quốc đang chứng kiến sự tăng trưởng ổn định với việc đưa ra một số kỹ thuật sáng tạo mang tính ứng dụng trên nhiều lĩnh vực điều trị. Trong đó, thị trường chẩn đoán *in vitro* của Hàn Quốc ước tính 2,7 tỷ dollar Mỹ cho năm 2016 và dự kiến sẽ đạt 3,18 tỷ dollar vào cuối năm 2021, với tốc độ trung bình hàng năm là 5,40% trong giai đoạn dự báo 2016 - 2021. Tương tự như Nhật Bản, tốc độ tăng trưởng của thị trường chẩn đoán *in vitro* của Hàn Quốc bị ảnh hưởng do tăng nhanh các bệnh mãn tính; số bệnh viện tư nhân và phòng thí nghiệm kiểm tra độc lập ngày càng tăng; chính phủ đưa ra các sáng kiến để thúc đẩy y tế du lịch, thực hiện chăm sóc sức khỏe và điều chỉnh các sản phẩm chẩn đoán *in vitro*; tiến bộ công nghệ và dân số già. Các sản phẩm chẩn đoán *in vitro* được áp dụng chủ yếu trong các lĩnh vực y học, bao gồm các bệnh truyền nhiễm, tiểu đường, ung thư, tim mạch, các bệnh tự miễn, bệnh thận, xét nghiệm thuốc, HIV/AIDS và các dịch vụ khác. Các sản phẩm chẩn đoán *in vitro* sử dụng cho bệnh truyền nhiễm chiếm thị phần lớn nhất, tiếp theo là bệnh ung thư – thị phần phát triển nhanh nhất do sự gia tăng tỷ lệ mắc bệnh ung thư. Đối với các bệnh truyền nhiễm, việc chẩn đoán chủ yếu sử dụng các kỹ thuật liên quan đến PCR như RT-PCR, real-time PCR cho kết quả nhanh và chính xác. Nhóm bệnh đường ruột truyền nhiễm ở người do enterovirus (human EV) được đánh giá một trong những bệnh bùng nổ toàn quốc ở Hàn Quốc giai đoạn 1999-2011, đòi hỏi phương pháp chẩn đoán nhanh, nhạy, đặc hiệu và chính xác để phát hiện kịp thời sự hiện diện của EV trong bệnh nhân. Vì thế, RT-PCR hoặc real-time RT-PCR được sử dụng để phát hiện vùng bảo thủ cao 5' không mã hóa của hệ gen human EV và vùng gen VP1 (375 bp) được

khuếch đại bằng kỹ thuật seminested RT-PCR để xác định subtype. Ngoài ra, nhằm tăng cường khả năng phát hiện EV trong các mẫu lâm sàng, RT-PCR được kết hợp với công nghệ complementary locked primer (CLP) hoặc kỹ thuật ELISA. Độ nhạy của phương pháp RT-PCR với các cặp mồi đã biến đổi CLP hay RT-PCR kết hợp ELISA cao hơn 10 đến 100 lần so với RT-PCR thông thường (Park *et al.*, 2009; Hong *et al.*, 2010). Nhóm bệnh hô hấp có thể được phát hiện đồng thời 16 tác nhân gây bệnh khác nhau gồm Adenovirus (AdV), Influenza A (FluA) and B (FluB), Parainfluenza 1, 2, 3, 4, Rhinovirus A/B/C (HRV), Respiratory syncytial virus A and B (RSV A and B), Bocavirus (HBoV), Metapneumovirus (MPV), Coronavirus 229E, NL63, OC43 (CoV), Enterovirus (HEV) khi sử dụng kỹ thuật multiplex real-time PCR. Đây được xem là một công cụ chẩn đoán nhanh chóng cho việc phát hiện nhiều loại virus đường hô hấp và thường được sử dụng để giám sát chăm sóc sức khỏe mùa cúm (Roh *et al.*, 2016). Đối với việc chẩn đoán các bệnh di truyền và ung thư, kỹ thuật được lựa chọn sử dụng là DNA microarray và NGS. Các rối loạn di truyền có thể do bất thường nhiễm sắc thể như xóa hoặc sao chép toàn bộ/ một phần nhiễm sắc thể, hoặc phá vỡ, chuyển vị, đảo vị trong nhiễm sắc thể, dẫn đến tử vong và thậm chí tử vong ngay từ khi là bào thai. Kang và cộng sự đã phát triển DNA microarray sử dụng chip nhiễm sắc thể vi khuẩn nhân tạo (BAC chip) để chẩn đoán một loạt các bất thường về nhiễm sắc thể gây ra nhiều rối loạn di truyền khác nhau, bao gồm hội chứng Down, hội chứng Patau, hội chứng Edward, hội chứng Turner, hội chứng Klinefelter, chứng alpha-thalassemia retardation-16, Charcot-Marie-Tooth neuropathy 1A, hội chứng Cri-du-chat, bệnh thần kinh di truyền (hereditary neuropathy with liability to pressure palsies – HNPP), hội chứng Prader-Willi, hội chứng Rubinstein-Taybi, hội chứng Williams và hội chứng Wolf-Hirschhorn. Nghiên cứu này đã được cấp bằng sáng chế số US20070048742 A1 (Kang *et al.*, 2007). Nhiều rối loạn di truyền khác do đột biến đơn gen ở dạng trội (đồng hợp tử) hoặc lặn (dị hợp tử). Các nhà khoa học Hàn Quốc đã phát triển các chip DNA microarray để có thể phát hiện được bệnh khi người mang bệnh ở cả dạng đồng hợp tử hay dị hợp tử. Một số thành công được cấp bằng sáng chế trong lĩnh vực này như chip cDNA microarray phát hiện đột biến gen gây bệnh ataxia telangiectasia (150 kb) (Cheung *et al.*, 2005: US6979542), DNA microarray sử dụng thuật toán tìm kiếm codon (codon scanning algorithm - COSA) phát hiện đột biến trên gen *ATP7B* (hơn 80 kb) gây bệnh Wilson (Lee *et al.*,

2004: US20040132015 A1), đột biến trên gen *21-hydroxylase* (exon 1, intron 2 và exon 4) gây bệnh tăng sản thượng thận bẩm sinh (congenital adrenal hyperplasia - CAH) (Jin, 2003: US20030073082 A1). Bên cạnh đó, công nghệ NGS cũng được ứng dụng mạnh mẽ trong lĩnh vực chẩn đoán phân tử do khả năng phân tích đồng thời lượng lớn các gen và nhanh chóng. Nhóm nghiên cứu ở Bệnh viện Đại học Quốc gia Seoul đã sàng lọc 80 gen liên quan đến bệnh di truyền sử dụng NimbleGen SeCap EZ Human Exome Library v2.0 capture kit và HiSeq2000 để giải trình tự. Kết quả phân tích cho thấy 2 gen *GJB2* và *SLC26A4* chịu trách nhiệm cho 10 - 15% và 20% tổng số người Hàn Quốc bị điếc (Choi *et al.*, 2009; Park *et al.*, 2005). Chứng đau bụng do rối loạn thận được chẩn đoán bằng phương pháp giải trình tự exome mục tiêu cho 34 gen liên quan đến bệnh này cho thấy đa số bệnh nhân mang đột biến trên 9 gen *NPHP1*, *NPHP3*, *NPHP4*, *SDCCAG8/NPHP10*, *TTC21B/NPHP12*, *PKHD1* và *BBS4* (Kang *et al.*, 2016). Trong ung thư học, kỹ thuật NGS giúp phát hiện nhiều gen gây ung thư trong ung thư tiết niệu (Kim, Kim, 2015), ung thư đại trực tràng (Han *et al.*, 2013), ung thư buồng trứng (Lim, Randall, 2017)... NGS không chỉ dùng để sàng lọc, chẩn đoán mà còn là phương pháp kiểm tra tương tác của liệu pháp điều trị đối với ung thư, cung cấp thông tin về việc đáp ứng hay kháng thuốc trong quá trình trị liệu (Park *et al.*, 2016).

Trong lĩnh vực điều trị bệnh bằng công nghệ gen, liệu pháp gen là ứng dụng lâm sàng được nghiên cứu và phát triển nhanh chóng ở Hàn Quốc với sự đầu tư rộng rãi, mang lại tiềm năng lớn cho việc điều trị các bệnh nghiêm trọng khác nhau. Thử nghiệm lâm sàng đầu tiên được thực hiện vào năm 1994, sử dụng DNA plasmid đã xử lý với liposome có chứa gen allogenic major histocompatibility complex class I (MHC class I) (human leukocyte antigen-B7 / β 2-microglobulin) cho 9 bệnh nhân; trong đó 4 người bị ung thư sắc tố, 2 người bị ung thư đầu-mạch-cổ, 2 người bị ung thư phổi và 1 người bị ung thư dạ dày. Tất cả bệnh nhân đều chịu được các phương pháp điều trị thông thường (Heo *et al.*, 1998). Kể từ thử nghiệm lâm sàng đầu tiên, đến tháng 2/2016, có 43 nghiên cứu và thử nghiệm lâm sàng được phê duyệt thực hiện với các loại vector chuyển gen khác nhau, bao gồm plasmid (18), adenovirus (9), vaccinia (7), tế bào biến đổi gen (6), plasmid + adenovirus (1), và mRNA (2)

(<https://www.pmda.go.jp/files/000211334.pdf>).

Nhìn chung, ở Hàn Quốc, liệu pháp gen sử dụng DNA trần được nghiên cứu để đảm bảo mức độ biểu

hiện protein trị liệu *in vivo* có ý nghĩa (Lee *et al.*, 2000), cũng như các vector murine leukemia virus - based retrovirus được cải tiến hiệu quả và an toàn để hồi phục sự quan tâm của các nhà nghiên cứu đối với loại vector chuyển gen này (Kim *et al.*, 1998; Yu *et al.*, 2000, 2003).

Trong những năm gần đây, vì những lo ngại về đại dịch của các bệnh truyền nhiễm như virus Ebola, MERS hoặc do tỉ lệ ung thư đang gia tăng, việc đạt được “sự độc lập về vaccine” đang trở thành tiêu chí thiết yếu để đánh giá nền kinh tế và an ninh quốc gia. Tuy nhiên, ở Hàn Quốc, chỉ có 10 trong tổng số 27 loại vaccine được sản xuất và 80% số lượng vaccine được nhập khẩu. Mức độ tự cung tự cấp vaccine của Hàn Quốc rất thấp so với khả năng của Nhật Bản và Hoa Kỳ - châu Âu (59% và 100%). Song nhờ sự phát triển các kỹ thuật di truyền hiện đại đóng góp không ít cho công nghệ vaccine, các công ty dược phẩm của Hàn Quốc đang mở rộng nghiên cứu, phát triển và sản xuất nhiều loại vaccine. Một vaccine tiêu đơn vị có khả năng ngăn ngừa bệnh gà rù do Newcastle disease virus (NDV) gây ra ở gia cầm đã được đăng ký thành công. Kháng nguyên hemagglutinin-neuraminidase (HN) của NDV được chuyển vào và biểu hiện trong tế bào thực vật. Gà được tiêm chủng với vaccine có chứa protein này được chứng minh đã qua thử thách với NDV. Ngoài ra, các protein fusion (F) và HN thu được từ NDV phân lập và chủng La Sota của NDV được biểu hiện, tinh sạch và sử dụng như một loại vaccine tiêu đơn vị. Nghiên cứu cho thấy vaccine này làm giảm đáng kể lượng virus sau khi tiêm một liều đơn (Lee *et al.*, 2008). Đối với bệnh lở mồm long móng do foot - and - mouth disease virus (FMDV), VP1 là protein cấu trúc liên quan đến khả năng trung hòa của virus, trong khi 3D là RNA polymerase phụ thuộc RNA có tính bảo thủ cao giữa các serotype khác và có khả năng gây miễn dịch mạnh. Vì vậy, protein tái tổ hợp của cả VP1 và 3D tạo ra đáp ứng miễn dịch đặc hiệu kháng nguyên, cho thấy đây có thể là vaccine tiêu đơn vị tiềm năng chống lại FMDV (Bae *et al.*, 2009). Các protein pre-membrane (prM) và envelop (E) của virus viêm não Nhật Bản (Japanese encephalitis virus - JEV) được biểu hiện trong các tế bào côn trùng Sf9. Đặc tính gây đáp ứng miễn dịch của protein tái tổ hợp prM và E đã được chứng minh thông qua thử nghiệm trên chuột, thu được kết quả bảo vệ hoàn toàn các con chuột khỏi độc tính virus, cung cấp thông tin có giá trị cho việc phát triển các vaccine tiêu đơn vị hiệu quả chống lại JEV (Yang *et al.*, 2005). Bên cạnh đó, việc tiêm chủng dựa trên DNA trần đã trở thành một cách tiếp cận tương đối mới trong quá trình phát

triển vaccine. Vaccine DNA có chứa VP243 của infectious bursal disease virus (IBDV) gây bệnh viêm túi huyết truyền nhiễm - một bệnh cấp tính và có khả năng lây lan cao ở gà - đã cho thấy tỷ lệ sống sót cao hơn và teo cơ thấp hơn so với các nhóm không được chủng ngừa (Kim *et al.*, 2004). DNA plasmid có chứa gen gD của Aujeszky's disease virus (ADV) gây bệnh giả dại trên lợn tạo ra kháng thể trung hòa trong 4 tuần sau khi tiêm ngừa (Hwang *et al.*, 2001). Việc tiêm vaccine DNA có chứa gen N3 của hội chứng hô hấp cấp tính nặng (SARS) đã tạo ra mức đáp ứng kháng thể đáng kể ở chuột được chủng ngừa, trở thành vaccine DNA tiềm năng kháng được SARS (Dutta *et al.*, 2008). Gần đây, chính phủ bắt đầu hỗ trợ ngành dược phẩm bằng việc công bố toàn cầu hóa về kinh doanh vaccine, đưa ra mục tiêu quốc gia để trở thành quốc gia vaccine thứ năm trên thế giới vào năm 2020. Bộ An toàn Thực phẩm và Dược phẩm đã đưa ra kế hoạch mở rộng các loại vaccine sản xuất trong nước từ 10 lên 22 vào năm 2020, nhằm tăng cường khả năng tự cung cấp vaccine cho quốc gia.

Tương tự như Nhật Bản, Hàn Quốc tích cực sử dụng kỹ thuật di truyền để phát triển các động vật sản xuất ra các sản phẩm và cơ quan sinh học. Viện Khoa học Động vật Quốc gia (National Institute of Animal Science - NIAS) hiện đang tập trung phát triển các vật liệu sinh học mới sử dụng công nghệ di truyền, bảo đảm sự đa dạng của nguồn gen động vật, phát triển các sản phẩm gia súc có giá trị gia tăng cao, phát triển năng lượng tái tạo sử dụng tài nguyên vật nuôi, với mục tiêu trở thành “quốc gia công nghệ vật nuôi thế giới G7”. Đối tượng NIAS nghiên cứu để phát triển 24 tính trạng khác nhau trên hai loài động vật, bao gồm 17 tính trạng trên lợn và 7 tính trạng trên gà. Các tính trạng này được thiết kế để sản xuất protein và vật liệu chống virus có giá trị cao, bao gồm vật liệu sản xuất từ lợn có thể điều trị chứng thiếu máu, rối loạn đông máu, máu đông cục và trứng gà có chứa lactoferrin và các chất chống oxy hoá. NIAS đã tạo ra hai con lợn con biến đổi gen dùng để sản xuất các cơ quan sinh học. Cơ quan Phát triển Nông thôn (RDA) cũng đang tiến hành phát triển bốn tính trạng khác nhau ở tằm. Những tính trạng này cho phép sản xuất lụa với màu sắc tự nhiên và đa dạng, các peptide miễn dịch thay thế kháng sinh trong thức ăn gia súc và thuốc cho người. Năm 2014, RDA đã thành công trong việc cấy ghép tim từ lợn biến đổi gen gọi là GalT KO+MCP vào khỉ. Kết quả cho thấy nội tạng từ lợn biến đổi gen ức chế sự đào thải cấp tính giúp cho khỉ sống lâu hơn (<http://www.nias.go.kr/images/promote/result/file/res>

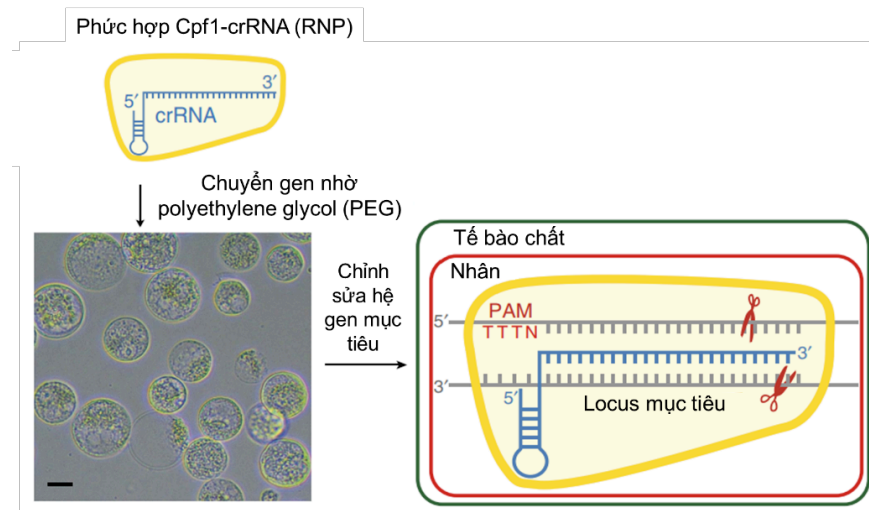
[ult_2014_0201.pdf](#)). Mặc dù có nhiều nỗ lực đáng kể nhưng tất cả các nghiên cứu này vẫn còn trong giai đoạn phát triển và còn thiếu giai đoạn đánh giá rủi ro. Các đơn vị tư nhân cũng đang phát triển động vật chuyển gen tạo ra các protein dược phẩm có giá trị cao. Năm 2012, một công ty dược phẩm đã sản xuất 14 con lợn được chèn gen hormone tăng trưởng của người (human growth hormone - hGH) và những con lợn này sản xuất sữa có biểu hiện hGH. Đây là một bước tiến tới sự phát triển dược phẩm hGH. Một số công ty khác đang phát triển gia súc biến đổi gen có thể sản xuất lactoferrin và insulin, chó phát huỳnh quang dùng để nghiên cứu bệnh ở người, gà có thể sản xuất ra chất để chữa ung thư bạch cầu và lợn con sản xuất các cơ quan nội tạng sinh học (Chung, Olson, 2016).

Nghiên cứu phát triển và ứng dụng công nghệ gen trong lĩnh vực nông nghiệp

Cây trồng biến đổi gen ở Hàn Quốc được nghiên cứu tập trung vào các tính trạng thể hệ thứ hai và thứ ba, như hạn hán, kháng bệnh và tăng chất dinh dưỡng. RDA đã thực hiện 170 sự kiện biến đổi gen đối với 17 giống cây trồng khác nhau. Các loại cây trồng này bao gồm lúa giàu vitamin A, lúa kháng côn trùng, lúa chịu được stress môi trường, hạt tiêu kháng virus, đậu giàu vitamin E, đậu kháng côn trùng, củ cải chịu được thuốc diệt cỏ, khoai tây và cải bắp Trung Quốc, dưa hấu, khoai lang, và táo kháng virus. RDA cũng phát triển lúa giàu resveratrol - một chất chống oxy hoá polyphenol giúp ngăn ngừa bệnh tim. Tuy nhiên do sự phản đối từ các tổ chức phi chính phủ và nông dân trồng lúa lo ngại rằng các thử nghiệm đồng ruộng của lúa biến đổi gen sẽ ảnh hưởng đến các cánh đồng lúa truyền thống, nên RDA đã quyết định không sử dụng loại gạo này làm thực phẩm. Họ dự định sản xuất gạo này trong môi trường hẹp và hạn chế chỉ sử dụng resveratrol do lúa biến đổi gen tạo ra cho các mục đích công nghiệp như dược phẩm hoặc mỹ phẩm. Một viện nghiên cứu của chính phủ đã phát triển giống khoai lang công nghệ sinh học chịu hạn và chịu mặn để khắc phục hậu quả của sa mạc hóa. Viện đã thành công trong việc trồng giống khoai lang này ở sa mạc Kubuchi của Trung Quốc và ở Kazakhstan - hai khu vực bán khô cằn lớn nhất Đông Bắc Á. Họ cũng bắt đầu quá trình giải trình tự hệ gen khoai lang vào năm 2014 cùng với các nhà nghiên cứu của Trung Quốc và Nhật Bản. Với thông tin đã được giải trình tự, nhóm nghiên cứu muốn phát triển một lượng lớn khoai lang công nghệ sinh học tại các khu vực bị ảnh hưởng bởi sa mạc hoá ở Trung Quốc, Trung Đông và châu Phi (Chung, Olson, 2016).

Gần đây, một số viện nghiên cứu bắt đầu ứng dụng kỹ thuật gen mới, hiện đại vào việc tạo cây trồng biến đổi gen. Việc chỉnh sửa hệ gen cây trồng mà không cần đưa DNA ngoại lai vào tế bào có thể làm giảm bớt những lo ngại về quy định liên quan đến cây biến đổi gen. Woo và đồng tác giả đã tiến hành chuyển các phức hợp đã được lắp ráp trước của protein Cas9 tinh sạch và RNA hướng dẫn vào trong các protoplast thực vật của cây *Arabidopsis thaliana*, thuốc lá, rau diếp và lúa. Kỹ thuật CRISPR/Cas9 ribonucleoproteins này thu được đột biến mục tiêu trong cây tái sinh với tần suất lên đến 46% (Woo *et al.*, 2015). Việc chỉnh sửa hệ gen thực vật không dùng DNA có thể sử dụng Cpf1 – một nhân tố CRISPR loại V có khả năng nhận diện motif thymidine-rich

protospacer-adjacent và cảm ứng mạch đôi đứt gãy tại vị trí được định hướng bằng CRISPR RNA (crRNA) (Hình 3). Kim và đồng tác giả (2017) đã áp dụng kỹ thuật này để chỉnh sửa gen *FAD2* ở đậu tương và *AOC* ở thuốc lá. Việc chỉnh sửa gen *FAD2* giúp làm tăng lượng acid oleic và giảm lượng chất béo không bão hòa trong đậu tương, hướng đến việc tạo ra loại hạt chứa dầu tốt cho sức khỏe. Không giống như SpCas9, Cpf1 chủ yếu cảm ứng xóa các nucleotide khác nhau tại vị trí mục tiêu và không có đột biến đáng kể nào được phát hiện ở các vị trí ngoài mục tiêu trong hệ gen đậu tương. Nghiên cứu này chứng tỏ CRISPR-Cpf1 là kỹ thuật hiệu quả cao, có thể trở thành công cụ mới để phát triển giá trị gia tăng của cây trồng (Hình 3) (Kim *et al.*, 2017).



Hình 3. Kỹ thuật chỉnh sửa hệ gen CRISPR/Cpf1-RNP áp dụng trên thực vật.

KẾT LUẬN

Hoạt động nghiên cứu định hướng triển khai ứng dụng các sản phẩm của công nghệ gen là xu hướng tất yếu trên toàn cầu, không giới hạn ở quốc gia phát triển hay đang phát triển, đòi hỏi thời gian dài, nguồn kinh phí và quy mô thực nghiệm lớn, với sự phối kết hợp tham gia của nhiều đối tác. Ba quốc gia Trung Quốc, Nhật Bản và Hàn Quốc có trình độ công nghệ vượt trội so với các nước còn lại trong khu vực nên đã công bố nhiều công trình nghiên cứu mang tính ứng dụng cao trong các lĩnh vực y tế, dược phẩm, trồng trọt, chăn nuôi, môi trường... mở ra nhiều hy vọng mới để nâng cao chất lượng cuộc sống cho con người. Do không bị hạn chế bởi những quy định khắt khe như châu Âu, các nước châu Á có cơ hội tiến hành thử nghiệm công nghệ gen trên đối

tượng phiôi hay tế bào người, tiếp cận cải tiến kỹ thuật mới để khắc phục những nhược điểm còn tồn đọng. Bên cạnh đó, việc tiếp nhận gieo trồng và sử dụng cây trồng công nghệ sinh học cũng ngày càng phát triển đối với các nước châu Á. Điều này có thể là do mục tiêu tăng cường nghiên cứu và ứng dụng công nghệ trong nông nghiệp, đồng thời do áp lực đảm bảo an ninh lương thực cho người dân trong nước, đặc biệt là Trung Quốc. Tuy nhiên, mức độ đầu tư của chính phủ cho công tác nghiên cứu và phát triển, cơ sở hạ tầng và nguồn nhân lực còn hạn chế rất nhiều so với Hoa Kỳ, Canada hay một số nước châu Âu. Vì vậy, mỗi quốc gia cần có chính sách riêng và cân đối hợp lý để đảm bảo theo kịp những tiến bộ công nghệ trên thế giới, học hỏi và áp dụng các công nghệ phù hợp vào đời sống xã hội của từng quốc gia.

Lời cảm ơn: Công trình được hoàn thành với sự hỗ trợ kinh phí của Đề tài "Đánh giá hiện trạng, năng lực và nhu cầu đổi mới công nghệ về nghiên cứu và ứng dụng công nghệ gen ở Việt Nam" (Mã số: DM.11.DA/15.) thuộc chương trình Đổi mới công nghệ Quốc gia đến năm 2020, Bộ Khoa học và Công nghệ.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Adachi T, Wang X, Murata T, Obara M, Akutsu H, Machida M, Umezawa A, Tomita M (2010) Production of a non-triple helical collagen alpha chain in transgenic silkworms and its evaluation as a gelatin substitute for cell culture. *Biotechnol Bioeng* 106(6): 860-870.
- Bae JB (2013) Perspectives of International Human Epigenome Consortium. *Genomics Inform* 11(1): 7-14.
- Bae JY, Moon SH, Choi JA, Park JS, Hahn BS, Kim KY, Kim B, Song JY, Kwon DH, Lee SC, Kim JB, Yang JS (2009) Recombinant DNA and protein vaccines for foot-and-mouth disease induce humoral and cellular immune responses in mice. *Immune Netw* 9(6): 265-273.
- Choi BY, Stewart AK, Nishimura KK, Cha WJ, Seong MW, Park SS, Kim SW, Chun YS, Chung JW, Park SN, Chang SO, Kim CS, Alper SL, Griffith AJ, Oh SH (2009) Efficient molecular genetic diagnosis of enlarged vestibular aqueducts in East Asians. *Genet Test Mol Biomarkers* 13(5): 679-687.
- Chung SA, Olson P (2016) South Korea: Agricultural Biotechnology Annual. *GAIN Report* KS1646.
- Cyranoski D (2016) CRISPR gene-editing tested in a person for the first time. *Nature* 539: 479. doi:10.1038/nature.2016.20988.
- Cui Y, Zhou X, Han J (2014) China launched a pilot project to improve its rare disease healthcare levels. *Orphanet J Rare Dis* 9: 14.
- Dutta NK, Mazumdar K, Lee BH, Baek MW, Kim DJ, Na YR, Park SH, Lee HK, Kariwa H, Mai le Q, Park JH (2008) Search for potential target site of nucleocapsid gene for the design of an epitope-based SARS DNA vaccine. *Immunol Lett* 118(1): 65-71.
- Frost, Sullivan (2017) APAC Molecular diagnostics market, Forecast to 2021. Report ID: 4837522.
- Han SW, Kim HP, Shin JY, Jeong EG, Lee WC, Lee KH, Won JK, Kim TY, Oh DY, Im SA, Bang YJ, Jeong SY, Park KJ, Park JG, Kang GH, Seo JS, Kim JI, Kim TY (2013) Targeted sequencing of cancer-related genes in colorectal cancer using next-generation sequencing. *PLoS One* 8(5): e64271.
- Heo DS, Yoon SJ, Kim WS, Lee KH, Seol JG, Lee SG (1998) Locoregional response and increased natural killer activity after intratumoral injection of HLA-B7/β2-microglobulin gene in patients with cancer. *Hum Gene Ther* 9: 2031-2038.
- Higuchi A, Toriniwa H, Komiya T, Nakayama T (2016) Recombinant measles AIK-C vaccine strain expressing the prM-E antigen of Japanese encephalitis virus. *PLoS One* 11(3): e0150213.
- Hirotsu Y, Nakagomi H, Sakamoto I, Amemiya K, Mochizuki H, Omata M (2015) Detection of BRCA1 and BRCA2 germline mutations in Japanese population using next-generation sequencing. *Mol Genet Genomic Med* 3(2): 121-129.
- Hiwasa-Tanase K, Hirai T, Kato K, Duhita N, Ezura H (2012) From miracle fruit to transgenic tomato: mass production of the taste-modifying protein miraculin in transgenic plants. *Plant Cell Rep* 31(3): 513-525.
- Hong JY, Kang BH, Kim AH, Hwang SY, Lee SW, Kim JH, Lee HY, Kang SH and Cheon DS (2010) Enhanced detection of enteroviruses in clinical samples by reverse transcription-PCR using complementary locked primer Technology. *J Clin Microbiol* 48(2): 615-616.
- Hwang DY, Lee JB, Kim TJ, Song JY, Hyun BH, Song CS, Park SY (2001) Induction of immune responses to glycoprotein gD of Aujeszky's disease virus with DNA immunization. *J Vet Med Sci* 63(6): 659-662.
- Iizuka M, Ogawa S, Takeuchi A, Nakakita S, Kubo Y, Miyawaki Y, Hirabayashi J, Tomita M (2009) Production of a recombinant mouse monoclonal antibody in transgenic silkworm cocoons. *FEBS J* 276(20): 5806-5820.
- Ikeda H, Ishiguro K, Igarashi T, Aoki Y, Hayashi T, Ishida T, Sasaki Y, Tokino T and Shinomura Y (2015) Molecular diagnostics of a single drug-resistant multiple myeloma case using targeted next-generation sequencing. *Oncotargets Ther* 8: 2805-2815.
- James C (2016) Global status of commercialized biotech/GM crops: 2016. *ISAAA Briefs* 52, Ithaca, New York, USA.
- Kameta E, Sugimori K, Kaneko T, Ishii T, Miwa H, Sato T, Ishii Y, Sue S, Sasaki T, Yamashita Y, Shibata W, Matsumoto N, Maeda S (2016) Diagnosis of pancreatic lesions collected by endoscopic ultrasound-guided fine-needle aspiration using next-generation sequencing. *Oncol Lett* 12(5): 3875-3881.
- Kang HG, Lee HK, Ahn YH, Joung JG, Nam J, Kim NK, Ko JM, Cho MH, Shin JI, Kim J, Park HW, Park YS, Ha IS, Chung WY, Lee DY, Kim SY, Park WY, Cheong HI (2016) Targeted exome sequencing resolves allelic and the genetic heterogeneity in the genetic diagnosis of nephronophthisis-related ciliopathy. *Exp Mol Med* 48: e251.
- Kang JJ, Oh EH, Kang HW, Lee JH, Bae CJ, Lee JH, Seo JS (2007) Detection method for chromosome abnormality and microarray chip. *US Patent Application Publication* <https://docs.google.com/viewer?url=patentimages.storage>.

googleapis.com/pdfs/US20070048742.pdf

Kang X, He W, Huang Y, Yu Q, Chen Y, Gao X, Sun X, Fan Y (2016) Introducing precise genetic modifications into human 3PN embryos by CRISPR/Cas-mediated genome editing. *J Assist Reprod Genet* 33(5): 581-588.

Kaptein LCM, Li Y, Wagemaker G (2010) Gene therapy in China - From a Dutch perspective. <http://www.genetherapynet.com/download/GeneTherapy-in-China-Dutch-Perspective.pdf>

Kim G (2016) Peoples Republic of China: Agricultural biotechnology annual - China moving towards commercialization of its own biotechnology crops. *GAINReport* CH16065.

Kim HR, Kim ST, Ryu JH, Kang BC, Kim JS, Kim SG (2017) CRISPR/CpfI-mediated DNA-free plant genome editing. *Nat Commun* 8: 14406.

Kim SH, Yu SS, Park JS, Robbins PD, An CS, Kim S (1998) Construction of retroviral vectors with improved safety, gene expression, and versatility. *J Virol* 72: 994-1004.

Kim SJ, Sung HW, Han JH, Jackwood D, Kwon HM (2004) Protection against very virulent infectious bursal disease virus in chickens immunized with DNA vaccines. *Vet Microbiol* 101(1): 39-51.

Kim SK and Kim WJ (2015) Next generation sequencing and urologic cancer. *Korean J Urol* 56: 87-89.

Lee HJ, Kweon J, Kim E, Kim S, Kim JS (2012) Targeted chromosomal duplications and inversions in the human genome using zinc finger nucleases. *Genome Res* 22(3): 539-548.

Lee Y, Park EJ, Yu SS, Kim DK, Kim S (2000) Improved expression of vascular endothelial growth factor by naked DNA in mouse skeletal muscles: implication for gene therapy of ischemic diseases. *Biochem Biophys Res Commun* 272: 230-235.

Lee YJ, Sung HW, Choi JG, Lee EK, Yoon H, Kim JH, Song CS (2008) Protection of chickens from Newcastle disease with a recombinant baculovirus subunit vaccine expressing the fusion and hemagglutininneuraminidase proteins. *J Vet Sci* 9(3): 301-308.

Li B, Gao N, Zhang Z, Chen QM, Li LJ and Li Y (2017) Review: Historical and clinical experiences of gene therapy for solid cancers in China. *Genes* 8(85): 1-16.

Liang P, Xu Y, Zhang X, Ding C, Huang R, Zhang Z, Lv J, Xie X, Chen Y, Li Y, Sun Y, Bai Y, Songyang Z, Ma W, Zhou C, Huang J (2015) CRISPR/Cas9-mediated gene editing in human triploid zygotes. *Protein Cell* 6: 363-372.

Lim MC, Randall LM (2017) Role and clinical application of next-generation sequencing (NGS) for ovarian cancer. *J Gynecol Oncol* 28(4): e51.

Ling Y, Jin Z, Su M, Zhong J, Zhao Y, Yu J, Wu J and Xiao J (2014) VCGDB: A dynamic genome database of the Chinese population. *BMC Genomics* 15: 265.

Liu G, Zhang F, Shi J, Tian G, Chen H, Yu K, Meng Q (2013) A subunit vaccine candidate derived from a classic H5N1 avian influenza virus in China protects fowls and BALB/c mice from lethal challenge. *Vaccine* 31(46): 5398-5404.

Liu Q, Hallerman E, Peng Y, Li Y (2016a) Review: Development of *Bt* rice and *Bt* maize in China and their efficacy in target pest control. *Int J Mol Sci* 17(10): 1561.

Liu Y, Li K, Gao Y, Gao L, Zhong L, Zhang Y, Wang X (2016b) Recombinant Marek's disease virus as a vector-based vaccine against Avian Leukosis virus subgroup J in chicken. *Viruses* 8(11): 301.

Maruoka R, Takenouchi T, Torii C, Shimizu A, Misu K, Higasa K, Matsuda F, Ota A, Tanito K, Kuramochi A, Arima Y, Otsuka F, Yoshida Y, Moriyama K, Niimura M, Saya H, Kosaki K (2014) The use of next-generation sequencing in molecular diagnosis of neurofibromatosis type 1: A validation study. *Genet Test Mol Biomarkers* 18(11): 722-735.

Masago K, Fujita S, Muraki M, Hata A, Okuda C, Otsuka K, Kaji R, Takeshita J, Kato R, Katakami N, Hirata Y (2015) Next-generation sequencing of tyrosine kinase inhibitor-resistant non-small-cell lung cancers in patients harboring epidermal growth factor-activating mutations. *BMC Cancer* 15: 908.

Naito H, Hayashi S, Abe K (2001) Rapid and specific genotyping system for Hepatitis B virus corresponding to six major genotypes by PCR using type-specific primers. *J Clin Microbiol* 39(1): 362-364.

Ogawa S, Tomita M, Shimizu K, Yoshizato K (2007) Generation of a transgenic silkworm that secretes recombinant proteins in the sericin layer of cocoon: production of recombinant human serum albumin. *J Biotechnol* 128(3): 531-544.

Park CY, Kim J, Kweon J, Son JS, Lee JS, Yoo JE, Cho SR, Kim JH, Kim JS, Kim DW (2014) Targeted inversion and reversion of the blood coagulation factor 8 gene in human iPS cells using TALENs. *Proc Natl Acad Sci USA* 111(25): 9253-9258.

Park CY, Kim DH, Son JS, Sung JJ, Lee J, Bae S, Kim JH, Kim DW, Kim JS (2015) Functional correction of large factor VIII gene chromosomal inversions in hemophilia A patient-derived iPSCs using CRISPR-Cas9. *Cell Stem Cell* 17(2): 213-220.

Park HJ, Lee SJ, Jin HS, Lee JO, Go SH, Jang HS, Moon SK, Lee SC, Chun YM, Lee HK, Choi JY, Jung SC, Griffith AJ, Koo SK (2005) Genetic basis of hearing loss associated with enlarged vestibular aqueducts in Koreans. *Clin Genet* 67(2): 160-165.

- Park HS, Lim SM, Kim SR, Kim SW, Kim HR, Kwack KB, Lee MG, Kim JH, Moon YW (2016) Pilot study of a next-generation sequencing-based targeted anticancer therapy in refractory solid tumors at a Korean institution. *PLoS ONE* 11(4): e0154133.
- Park K, Lee K, Baek K, Jung E, Park S, Cho Y, Song J, Ahn G, Cheon DS (2009) Application of a diagnostic method using reverse transcription - PCR ELISA for the diagnosis of enteroviral infections. *Korean J Lab Med* 29(6): 594-600 [Article in Korean with English abstract].
- Puette L (2016) The Splice Must Grow: The bright and shady sides of GM agriculture in China. *ChinaAg Newsletter* 6: 1-5.
- Roh K, Park H, Shim H (2016) Prevalence of respiratory virus infections using multiplex real-time PCR in Korean nationwide reference laboratory (2015 annual report). *Int J Infect Dis* 53: 105.
- Sakurai A and Shibasaki F (2012) Review: Updated values for molecular diagnosis for highly pathogenic avian influenza virus. *Viruses* 4: 1235-1257.
- Sato S (2016) Japan: Agricultural biotechnology annual. *GAIN Report* JA6050.
- Sawada A, Komase K, Nakayama T (2011) AIK-C measles vaccine expressing fusion protein of respiratory syncytial virus induces protective antibodies in cotton rats. *Vaccine* 29(7): 1481-1490.
- Shi J and Zheng D (2009) An update on gene therapy in China. *Curr Opin Mol Ther* 11(5): 547-553.
- Shibata T (2015) Current and future molecular profiling of cancer by next-generation sequencing. *Jpn J Clin Oncol* 45(10): 895-899.
- Shimizu K, Oishi A, Oishi M, Ogino K, Morooka S, Sugahara M, Gotoh N and Yoshimura N (2015) Next-generation sequencing-based molecular diagnosis of Choroideremia. *Case Rep Ophthalmol* 6(2): 246-250.
- Sugaya T, Yano M, Sun HJ, Hirai T, Ezura H (2008) Transgenic strawberry expressing the taste-modifying protein miraculin. *Plant Biotechnol* 25: 329-333.
- Takahashi T, Tamura M, Takasu T, Kamei S (2013) Current advancement of the PCR-based molecular diagnosis for tuberculous meningitis. *Rinsho Shinkeigaku* 53(11): 1187-90 [Article in Japanese with English abstract].
- Takenouchi T, Hida M, Sakamoto Y, Torii C, Kosaki R, Takahashi T, Kosaki K (2013) Severe congenital lipodystrophy and a progeroid appearance: mutation in the penultimate exon of FBN1 causing a recognizable phenotype. *Am J Med Genet A* 161A: 3057-3062.
- Takenouchi T, Shimizu A, Torii C, Kosaki R, Takahashi T, Saya H, Kosaki K (2014a) Multiple Café au Lait spots in familial patients with MAP2K2 mutation. *Am J Med Genet A* 164A: 392-396.
- Takenouchi T, Matsuzaki Y, Yamamoto K, Kosaki K, Torii C, Takahashi T, Kosaki K (2014b) SOX9 dimerization domain mutation mimicking type 2 collagen disorder phenotype. *Eur J Med Genet* 57: 298-301.
- Tani K (2016) Current status of ex vivo gene therapy for hematological disorders: a review of clinical trials in Japan around the world. *Int J Hematol* 104(1): 42-72.
- Tanihara F, Takemoto T, Kitagawa E, Rao S, Do LTK, Onishi A, Yamashita Y, Kosugi C, Suzuki H, Sembon S, Suzuki S, Nakai M, Hashimoto M, Yasue A, Matsuhisa M, Noji S, Fujimura T, Fuchimoto D, Otoi T (2016) Somatic cell reprogramming-free generation of genetically modified pigs. *Sci Adv* 2(9): e1600803.
- Thorisson GA, Smith AV, Krishnan L, Stein LD (2005) The International HapMap Project Web site. *Genome Res* 15(11): 1592-1593.
- Tomita M, Munetsuna H, Sato T, Adachi T, Hino R, Hayashi M, Shimizu K, Nakamura N, Tamura T, Yoshizato K (2003) Transgenic silkworms produce recombinant human type III procollagen in cocoons. *Nat Biotechnol* 21(1): 52-56.
- Tu Z, Yang W, Yan S, Guo X, Li XJ (2015) CRISPR/Cas9: A powerful genetic engineering tool for establishing large animal models of neurodegenerative diseases. *Mol Neurodegener* 10: 35.
- Wakasa Y, Takagi H, Hirose S, Yang L, Saeki M, Nishimura T, Kaminuma O, Hiroi T, Takaiwa F (2013) Oral immunotherapy with transgenic rice seed containing destructed Japanese cedar pollen allergens, Cry j 1 and Cry j 2, against Japanese cedar pollinosis. *Plant Biotechnol J* 11(1): 66-76.
- Wang JX, Pan CS, Cui LW (2012) Application of a real-time PCR method for detecting and monitoring hookworm *Necator americanus* infections in Southern China. *Asian Pac J Trop Biomed* 2(12): 925-929.
- Wang X, Yu H, Lei A, Zhou J, Zeng W, Zhu H, Dong Z, Niu Y, Shi B, Cai B, Liu J, Huang S, Yan H, Zhao X, Zhou G, He X, Chen X, Yang Y, Jiang Y, Shi L, Tian X, Wang Y, Ma B, Huang X, Qu L, Chen Y (2015a) Generation of gene-modified goats targeting MSTN and FGF5 via zygote injection of CRISPR/Cas9 system. *Sci Rep* 5: 13878.
- Wang X, Zhang J, Liang J, Zhang Y, Teng X, Yuan X, Fan X (2015b) Protection against *Mycobacterium tuberculosis* infection offered by a new multistage subunit vaccine correlates with increased number of IFN- γ +IL-2+ CD4+ and IFN- γ + CD8+ T Cells. *PLoS ONE* 10(3): e0122560.
- Watanabe K, Matsubara A, Kawano M, Mizuno S, Okamura T, Tsujimura Y, Inada H, Nosaka T, Matsuo K, Yasutomi Y (2014) Recombinant Ag85B vaccine by taking advantage of characteristics of human parainfluenza type 2 virus vector showed Mycobacteria-specific immune

- responses by intranasal immunization. *Vaccine* 32(15): 1727-1735.
- Woo JW, Kim J, Kwon SI, Corvalán C, Cho SW, Kim H, Kim SG, Kim ST, Choe S, Kim JS (2015) DNA-free genome editing in plants with preassembled CRISPR-Cas9 ribonucleoproteins. *Nat Biotechnol* 33(11): 1162-1164.
- Xia ZJ, Chang JH, Zhang L, Jiang WQ, Guan ZZ, Liu JW (2004) Phase III randomized clinical trial of intratumoral injection of E1B gene-deleted adenovirus (H101) combined with cisplatin-based chemotherapy in treating squamous cell cancer of head and neck or esophagus. *Ai Zheng* 23: 1666-1670 [Article in Chinese with English abstract].
- Xin Q, Niu H, Li Z, Zhang G, Hu L, Wang B, Li J, Yu H, Liu W, Wang Y, Da Z, Li R, Xian Q, Wang Y, Zhang Y, Jing T, Ma X, Zhu B (2013) Subunit vaccine consisting of multi-stage antigens has high protective efficacy against *Mycobacterium tuberculosis* infection in mice. *PLoS ONE* 8(8): e72745.
- Yamaji Y, Nakayama T (2014) Recombinant measles viruses expressing respiratory syncytial virus proteins induced virus-specific CTL responses in cotton rats. *Vaccine* 32(35): 4529-4536.
- Yang DK, Kweon CH, Kim BH, Lim SI, Kwon JH, Kim SH, Song JY, Han HR (2005) Immunogenicity of baculovirus expressed recombinant proteins of Japanese encephalitis virus in mice. *J Vet Sci* 6(2): 125-133.
- Yang R, Zhang H, Xiong Y, Gui X, Zhang Y, Deng L, Gao S, Luo M, Hou W and Guo D (2017) Molecular diagnosis of central nervous system opportunistic infections and mortality in HIV-infected adults in Central China. *AIDS Res Ther* 14: 24.
- Yu SS, Kim JM, Kim S (2000) High efficiency retroviral vectors that contain no viral coding sequences. *Gene Ther* 7: 797-804.
- Yu SS, Han E, Hong Y, Lee JT, Kim S, Kim S (2003) Construction of a retroviral vector production system with the minimum possibility of a homologous recombination. *Gene Ther* 10: 706-711.
- Yu W, Fang H (2007) Clinical trials with oncolytic adenovirus in China. *Curr Cancer Drug Targets* 7: 65.
- Zhang J, Baran J, Cros A, Guberman JM, Haider S, Hsu J, Liang Y, Rivkin E, Wang J, Whitty B, Wong-Erasmus M, Yao L and Kasprzyk A (2011) International cancer genome consortium data portal - a one-stop shop for cancer genomics data. *Database (Oxford)* 2011: bar026.
- Zou Q, Wang X, Liu Y, Ouyang Z, Long H, Wei S, Xin J, Zhao B, Lai S, Shen J, Ni Q, Yang H, Zhong H, Li L, Hu M, Zhang Q, Zhou Z, He J, Yan Q, Fan N, Zhao Y, Liu Z, Guo L, Huang J, Zhang G, Ying J, Lai L, Gao X (2015) Generation of gene-target dogs using CRISPR/Cas9 system. *J Mol Cell Biol* 7(6): 580-583.

CURRENT STATUS OF GENETIC ENGINEERING IN THE FIELDS OF MEDICINE, PHARMACOLOGY AND AGRICULTURE IN CHINA, JAPAN AND KOREA

Pham Le Bich Hang, Nguyen Hai Ha, Le Thi Thu Hien

Institute of Genome Research, Vietnam Academy of Science and Technology

SUMMARY

Research and development (R&D) of genetic engineering in Asian countries, particularly in China, Japan and Korea, have been achieved great success and applied in many aspects of the social economic fields. In the area of medicine, these nations focus on studying the diagnosis of cancers, infectious, and hereditary diseases using molecular techniques based on PCR, and next generation sequencing; implementing clinical trials by gene therapy and improving prevention with innovative vaccines such as subunit or DNA vaccines. In addition, preparatory studies on human cells or embryos utilizing CRISPR/Cas9 genome editing technology have been undertaken in hopes of finding new treatments for genetic and cancer diseases. In the field of agriculture, many Asian countries have carried out R&D and approved genetically modified crops and products for releasing into the environment and utilizing for food, feed and processing. The modified traits mainly are insect resistance, virus resistance, herbicide tolerance, drought tolerance, salinity tolerance, and increased nutritional value. In general, the level of development and application of genetic engineering in these nations has outstripped in Asia, but still underdevelopment state compared to the United States, Canada and several European countries. Therefore, each country should have appropriate policies and investments to promote the application of advanced biotechnologies in the world in order to improve the quality of human life.

Keywords: *CRISPR/Cas9 genome editing system, gene therapy, genetically modified crops, next generation sequencing, PCR, vaccine*