

DOI:10.22144/ctu.jvn.2022.222

NGHIÊN CỨU TẠO PHÔI CHUỘT KNOCKOUT GENE LEP SỬ DỤNG KỸ THUẬT CRISPR/CAS9

Âu Dương Tuyết Mai¹, Nguyễn Lê Trâm Anh¹, Nguyễn Thị Thanh Giang^{1*}, Huỳnh Chí Thiện¹, Phạm Minh Chiến², Huỳnh Nguyễn Loan Anh² và Nguyễn Đăng Quân¹

¹Trung tâm Công nghệ Sinh học Thành phố Hồ Chí Minh

²Trường Đại học Quốc tế Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh

*Người chịu trách nhiệm về bài viết: Nguyễn Thị Thanh Giang (email: nttgiang84@yahoo.com.vn)

Thông tin chung:

Ngày nhận bài: 17/05/2022

Ngày nhận bài sửa: 16/06/2022

Ngày duyệt đăng: 21/06/2022

Title:

Research to create mouse embryo knockout gene lep using crispr/Cas9

Từ khóa:

Béo phì, chuột knock-out, CRISPR/Cas9, Leptin, vi tiêm

Keywords:

Obesity, knockout mouse, CRISPR/Cas9, Leptin, injected

ABSTRACT

CRISPR/Cas 9 technology is has been increasingly used in gene editing technology. In this study, mouse embryo knockout Lep gene was generated by microinjecting a plasmid with the CRISPR/Cas9 construct directed at exon 3 of the gene site. The study used bioinformatics software to design 2 gRNAs, and cloned plasmids px330-gRNA-R and px330-gRNA-L capable of guiding the CRISPR/Cas9 system to direct removal of exon 3 with a length of 420bp, at positions 29070816 – 29071236 on the Lep gene. Mouse embryos were generated by intracytoplasmic sperm injection (ICSI). After 6 h of ICSI, mouse embryos, zygote in two progenitor stages, were knockout gene by microinjection px330-gRNA-R and px330-gRNA-L plasmids at a concentration of 5 ng/ μ l into the male pronucleus. The PCR test showed that 36/72 (50%) the embryos were injected with plasmid removed the Lep genes. Thus, the study has successfully created mouse embryo knockout Lep gene in heterozygous zygote form.

TÓM TẮT

Kỹ thuật CRISPR/Cas 9 đang được sử dụng nhiều trong công nghệ chỉnh sửa gene. Trong nghiên cứu này, phôi chuột knockout gene Lep được tạo ra bằng cách vi tiêm plasmid có cấu trúc CRISPR/Cas9 hướng đến exon 3 của gene. Các phần mềm tin sinh học thiết kế 2 gRNA được sử dụng và tạo dòng được plasmid px330-gRNA-R và px330-gRNA-L có khả năng định hướng giúp hệ CRISPR/Cas9 loại bỏ đoạn exon 3 có chiều dài 420bp, ở vị trí 29070816 – 29071236 trên gene Lep. Phôi chuột được tạo ra bằng phương pháp bơm tinh trùng vào bào tương trứng (ICSI). Sau 6 h ICSI (Intra-Cytoplasmic Sperm Injection), phôi chuột ở giai đoạn hợp tử hai tiền nhân, được knockout gene bằng cách vi tiêm plasmid px330-gRNA-R và px330-gRNA-L với nồng độ 5 ng/ μ l vào tiền nhân đực. Kết quả kiểm tra PCR các phôi có vi tiêm plasmid cho thấy 36/72 (50%) phôi đã được loại bỏ đoạn exon 3 gene Lep. Như vậy, nghiên cứu đã tạo thành công phôi knockout gene Lep ở dạng dị hợp.

1. GIỚI THIỆU

Ở Việt nam, việc tạo động vật chuyển gene vẫn còn là vấn đề mới. Hiện tại, vẫn chưa có công bố về các nghiên cứu biến đổi di truyền trên chuột - mô hình động vật để nghiên cứu các bệnh lý trên người. Chuột knockout có hữu ích trong việc nghiên cứu và mô hình hóa các loại bệnh khác nhau như ung thư, béo phì, bệnh tim, đái tháo đường, viêm khớp, stress, lão hóa và bệnh Parkinson. Chuột knockout cũng cung cấp một bối cảnh sinh học trong đó thuốc và các liệu pháp khác có thể được phát triển và thử nghiệm (Rajashekar et al., 2013). Do đó, việc chủ động công nghệ tạo chuột biến đổi di truyền sẽ hỗ trợ rất lớn cho các nghiên cứu y sinh phục vụ nâng cao chất lượng cuộc sống con người.

Động vật biến đổi gene thường được sử dụng trong phòng thí nghiệm như một mô hình trong nghiên cứu y sinh. Chúng là những công cụ quan trọng để nghiên cứu bệnh ở người, được sử dụng để tìm hiểu chức năng gene trong từng bệnh cụ thể, tiến trình phát triển và xác định các đáp ứng với can thiệp điều trị. Hơn 95% trong số đó được sử dụng là loài gặm nhấm biến đổi gene, chủ yếu là chuột. Để tạo mô hình động vật bị biến đổi gene, ta có thể sử dụng phương pháp chuyển gene loại bỏ hoặc khoá gene nào đó để xác định chức năng của gene. Sự phát triển của động vật chuyển gene gần đây có nhiều thay đổi nhờ sự xuất hiện của công cụ chỉnh sửa gene mới CRISPR, giúp giảm đáng kể số bước để tạo động vật chuyển gene, làm cho toàn bộ quá trình nhanh hơn và ít tốn kém hơn (Wang et al., 2019). CRISPR/Cas9 (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) là một hệ thống miễn dịch thích nghi, tồn tại trong nhiều loại vi khuẩn. Việc ứng dụng CRISPR/Cas 9 trong nghiên cứu sản xuất động vật biến đổi di truyền giúp tạo các sinh vật mô hình một cách nhanh chóng, hiệu quả và tiết kiệm chi phí (Zhang et al., 2017). Công nghệ CRISPR/Cas cho phép việc chỉnh sửa gene ở giai đoạn phôi trở nên dễ dàng hơn chỉ với 3 bước chính gồm (1) chuẩn bị hợp tử, (2) chuyển hỗn hợp gRNA và Cas9 mRNA vào trong hợp tử, và (3) chuyển phôi chứa hỗn hợp CRISPR/Cas9 vào con cái “mang thai hộ” để sản xuất thế hệ F0. Năm 2013, mô hình chuột KO (knockout) đầu tiên áp dụng kỹ thuật CRISPR/Cas9 được tạo ra từ phòng thí nghiệm Jaenisch. Theo nhóm nghiên cứu, việc kết hợp mRNA Cas9 và gRNA (Tet1, Tet2) đã tạo ra những con chuột mang 80% đột biến ở cả 2 gene này (Wang et al., 2103). Các nghiên cứu đều chỉ ra rằng, việc sử dụng hệ thống CRISPR/Cas9 mang lại sự thuận tiện, hiệu quả và nhanh chóng trong việc tạo ra chuột knockout gene. Ngày nay, CRISPR/Cas9 đang được sử dụng

manh mẽ để sản sinh ra các allele đột biến trên nhiều loài sinh vật khác như chuột cống (rat), heo, thỏ, chó, khỉ và cả tế bào gốc phôi người (Li-Fang & Jin-Song, 2016).

Leptin là một protein gồm 167 axit amin được tạo ra bởi gene leptin, một tín hiệu quan trọng trong việc điều chỉnh khối lượng mô mỡ và trọng lượng cơ thể, hoạt động bằng cách ức chế lượng thức ăn và kích thích tiêu hao năng lượng. Khiếm khuyết trong sản xuất leptin gây béo phì nghiêm trọng (Moon et al., 2013). Ở chuột, gene *Lep* chứa ba exon trong đó exon 2 và exon 3 mã hóa cho protein leptin (Lonnqvist et al., 1995). Vì vậy, các đột biến của gene *Lep* được nghiên cứu sâu để sản xuất các mô hình chuột béo phì và tiểu đường. Để loại bỏ chức năng của gene *Lep*, các gRNA thường được thiết kế nằm trong vùng exon 3, nhằm phá vỡ cấu trúc của protein leptin (Moon et al., 2013). Roh et al. (2018) đã tạo được các mô hình chuột béo phì và chuột tiểu đường thông qua công cụ CRISPR/Cas9.

Trong nghiên cứu này, gRNA được thiết kế hướng đến loại bỏ chức năng gene *Lep*, để tạo phôi chuột knockout, tạo chuột knockout làm tiền đề cho các nghiên cứu về tạo động vật biến đổi di truyền.

2. NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Nguyên liệu

Nguyên liệu là *Mus musculus* var. *Albino* (Viện Pasteur thành phố Hồ Chí Minh), dòng tế bào HEK293 (Phòng Công nghệ sinh học động vật - Trung tâm Công nghệ sinh học thành phố Hồ Chí Minh), plasmid px330-U6-Chimeric_BB-CBh-hSpCas9-hGem và plasmid pCAG-EGFP (Addgene, Mỹ (Code # 71707 và code # 50716 tương ứng)), các đoạn oligonucleotide (Công ty IDT).

2.2. Phương pháp

2.2.1. Thiết kế gRNA và tạo dòng plasmid px330-gRNA

Các trình tự gRNA được thiết kế dựa trên trình tự genome và các công cụ tin sinh học trực tuyến như: CRISPOR, IDT CRISPR, KOnezumi, CHOPCHOP, Benchling CRISPR Guide Design. gRNA được sàng lọc có vị trí bắt cặp tương ứng trên exon nhằm giúp protein Cas 9 cắt bỏ DNA mục tiêu. Các gRNA được chọn sẽ thỏa các tiêu chí sau:

- Điểm S-Score, E-Score ≥ 50
- Phần trăm GC > 50-60%, bắt đầu bằng G
- Kích thước gRNA: 17-20bp

Tạo dòng các plasmid px330-gRNA-R và plasmid px330-gRNA-L (dùng để knockout gene LEP trên phôi). Tổng hợp plasmid pCAG-EGxxFP-lep (plasmid pCAG-EGxxFP được chèn đoạn exon 3 của gene lep, có độ dài 420bp, trong khoảng vị trí 29070816 - 29071236 có chứa gRNA-L và gRNA-R).

2.2.2. Đánh giá sự cắt đặc hiệu của hệ CRISPR/Cas9

Plasmid pCAG-EgxxFP-lep có chứa trình tự exon 3 gene lep được sử dụng để kiểm tra khả năng cắt đặc hiệu của hệ CRISPR/Cas9 trên tế bào HEK293.

Đồng chuyển plasmid px330-gRNA-L hoặc px330-gRNA-R hoặc cả hai plasmid px330-gRNA-L, px330-gRNA-R và plasmid pCAG-EGxxFP-lep vào tế bào HEK293. Nếu Cas9 cắt đúng trình tự gRNA-L và gRNA-R trên gene LEP, lúc này gene EGFP sẽ ở dạng hoàn chỉnh, làm tế bào HEK293 phát sáng. Điều này chứng tỏ hệ CRISPR/Cas9 cắt đặc hiệu.

2.2.3. Vi tiêm hỗn hợp plasmid chứa hệ CRISPR/Cas9 vào hợp tử hai tiền nhân

Chuột cái được gây siêu bài noãn bằng 10 IU PMSG và 10 IU hCG (Ittner & Gotz, 2007; Cho et al., 2009). Sau 12 - 14 giờ tiêm hCG, trứng được thu. Sau 6 giờ ISCI (Intra-Cytoplasmic Sperm Injection) hợp tử 2 tiền nhân được thu nhận. Plasmid px330-gRNA-L và px330-gRNA-R được vi tiêm vào hợp tử hai tiền nhân với nồng độ 5ng/μl. Hợp tử hai tiền nhân được vi tiêm thành công tiền nhân còn nguyên vẹn, không bị vỡ, không bị trào tế bào chất ra ngoài và sau 24 giờ vi tiêm, phôi không bị chết.

2.2.4. PCR đánh giá kiểu gene của phôi

Những phôi sau vi tiêm được nuôi đến giai đoạn phôi 4 – 8 tế bào, thu một tế bào để kiểm tra kiểu gene và tiếp tục nuôi phôi. Kiểu gene được kiểm tra dựa trên kết quả chạy PCR khi điện di trên gel agarose. Cặp mồi sử dụng để khuếch đại đoạn exon của gene LEP.

Primer (F) LEP: 5'-CAGCTGATGACAGGAAGTAAGG-3'

Primer (R) LEP 5'-CAGCTGATGACAGGAAGTAAGG-3'

Sử dụng đoạn gene SOX21 dài 237 bp, một đoạn gene của động vật hữu nhũ làm chứng nội:

Primer (F) SOX21: 5'-AGCCCTTGGGGASTTGAATTGCTG-3'

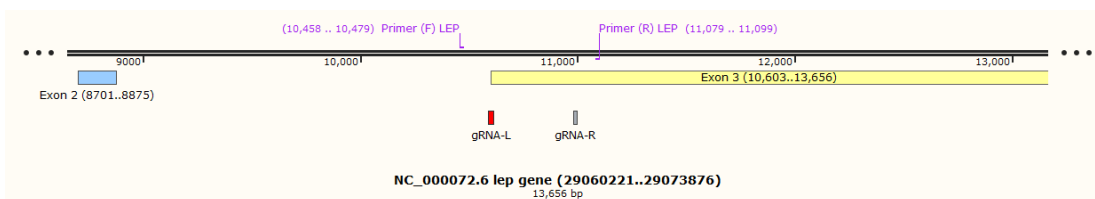
Primer (R) SOX21: 5'-GCACTCCAGAGGACAGCAGTGTCAATA-3'

Điện di trên gel agarose 2-3% và đọc kết quả trên hệ thống Image Quant Lab 500 của GE.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Thiết kế gRNA và tạo dòng plasmid px330-gRNA

Gene *Lep* nằm trên nhiễm sắc thể số 6, có vùng mã hóa protein nằm trong 03 exon. Dựa vào trình tự gene mục tiêu, gRNA được thiết kế nhằm knockout (loại bỏ) một đoạn DNA có kích thước 396 bp trong exon 3 (Hình 1). Kết quả chọn lọc *in silico* với các thông số S-score, E-score, %GC, kích thước và trình tự PAM đã sàng lọc được 70 cặp gRNA, có khả năng sử dụng để knockout gene *Lep*. Từ kết quả này, 2 gRNA (Bảng 1 và Hình 2) được chọn để sử dụng cho các thí nghiệm sau (kết quả chọn cặp gRNA đã được công bố trong bài báo khác).



Hình 1. Sơ đồ mô tả vùng gene mục tiêu trên gene *Lep*

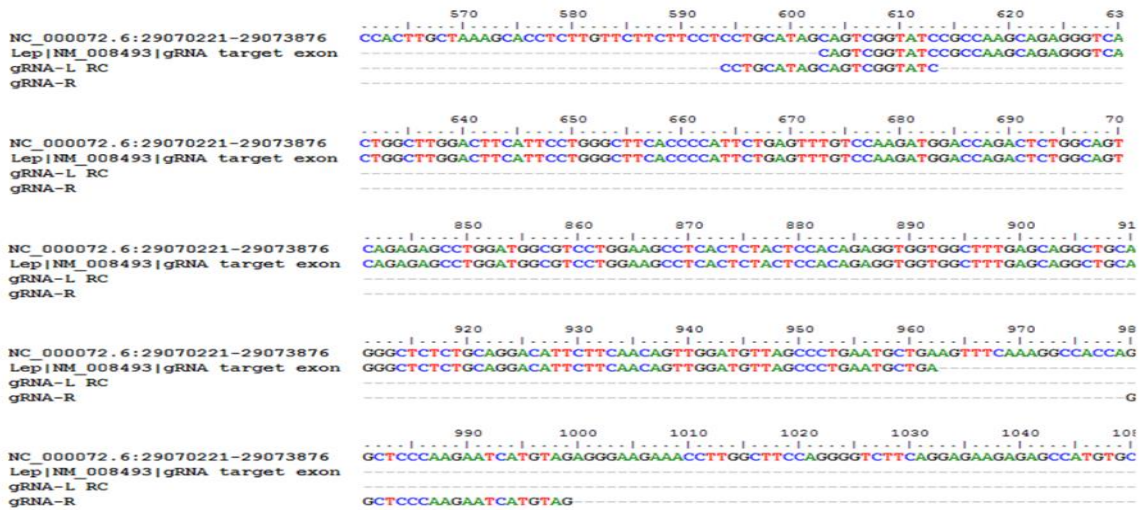
Primer (F) LEP, Primer (R) LEP: trình tự primer để chọn vùng trình tự 640bp trên exon 3; gRNA-L, gRNA-R: trình tự gRNA định hướng giúp protein Cas9 cắt đúng đoạn DNA 396 bp của exon 3.

Bảng 1. Thông số kỹ thuật của 2 sgRNA

Tên	Trình tự	PAM	S-Score	E-Score	%GC
gRNA-L	GATACCGACTGCTATGCAGG	AGG	73	63	55
gRNA-R	GGCTCCAAGAATCATGTAG	AGG	73	61	50

Hai gRNA được chọn, ở các vị trí lần lượt là gRNA-L (29070813- 29070833) và gRNA-R (29071199-29071219) có sự bắt cặp liên mạch với

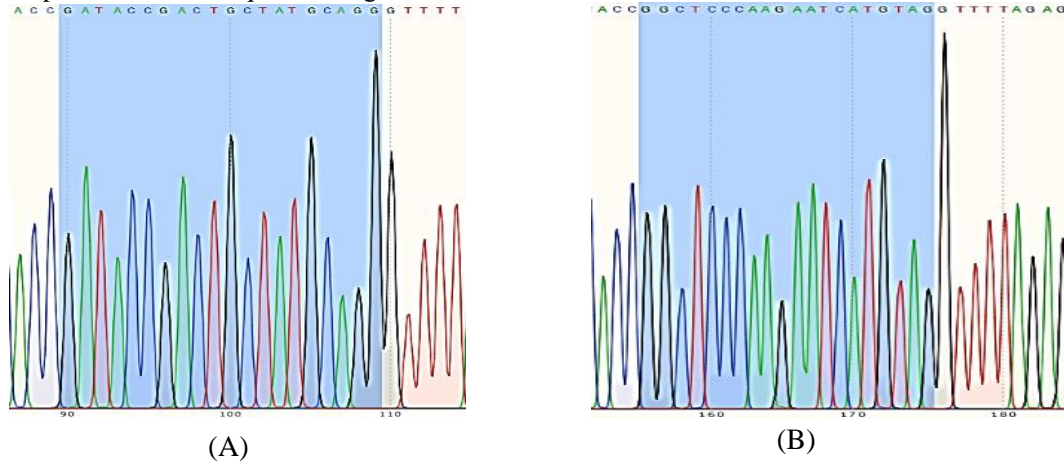
trình tự mục tiêu và không có đột biến nucleotide khi so với các trình tự gRNA khác (Hình 2).



Hình 2. Kết quả so sánh bắt cặp của cặp gRNA được chọn với trình tự gene *Lep* trên phần mềm Bioedit

Tạo dòng plasmid px330-gRNA-L và px330-gRNA-R bằng cách chèn trình tự gRNA-L hoặc gRNA-R vào plasmid px330-U6-Chimeric_BB-CBh-hSpCas9-hGem. Kết quả tạo dòng thu được 02

dòng plasmid px330 có chứa chính xác trình tự gRNA-L hoặc gRNA-R, thể hiện qua kết quả giải trình tự gene (Hình 3A, Hình 3B).



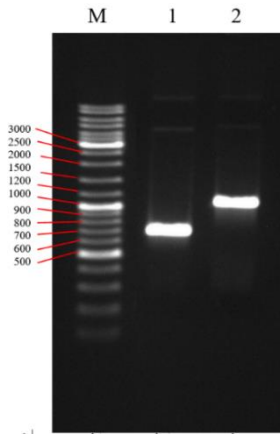
Hình 3. Kết quả giải trình tự các gRNA được chèn vào plasmid. A. gRNA-L, B. gRNA-R

Plasmid pCAG-EGxxFP được chèn đoạn exon 3 (420 bp) của gene *Lep* (sử dụng enzyme cắt giới hạn BamHI và EcoRI), kết quả tạo dòng được plasmid pCAG-EGxxFP-*lep*, sử dụng để kiểm tra khả năng cắt đặt hiệu của hệ CRISPR/Cas9 trên tế bào HEK293. Kết quả cho thấy trình tự exon 3 đã được chèn vào plasmid pCAG-EGxxFP, sản phẩm PCR với cặp môi pCAG-F, pCAG-R khi điện di trên gel agarose có kích thước khoảng 700 bp khi trình tự 3

chưa chèn vào và kích thước 1100 bp khi đã chèn đoạn exon 3 (Hình 4).

Môi pCAG-R:
GGTCAGCTTGCCGATATCGA (vị trí: 2372 - 2391)

Môi pCAG-F :
GCAACGTGCTGGTTATTGTG (vị trí: 1688 - 1707)



Hình 4. Sản phẩm PCR của pCAG-EGxxFP-lep với cặp môi pCAG-F, pCAG-R

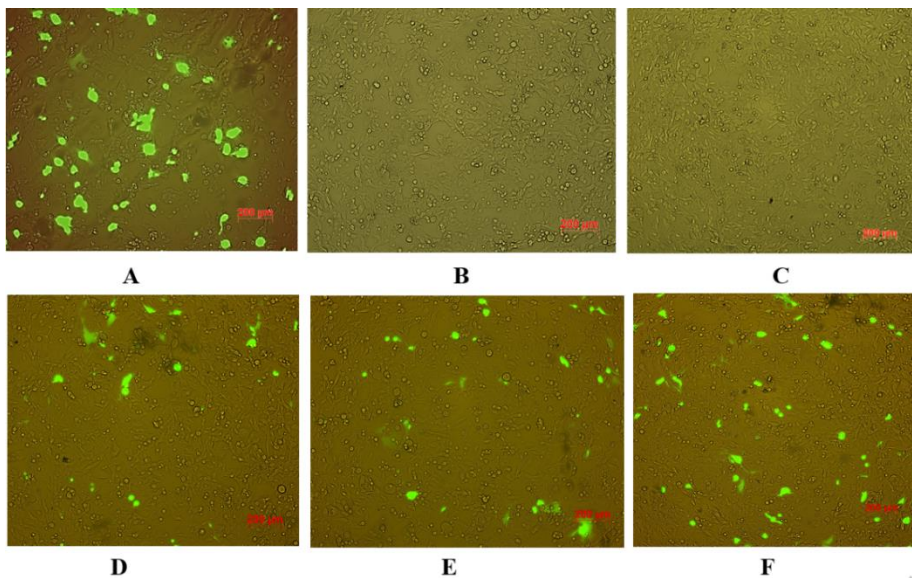
(M): thang DNA, (1): Sản phẩm PCR không chèn trình tự exon 3 gene *Lep* (704bp), (2): Sản phẩm PCR có chèn trình tự exon 3 gene *Lep* (1124 bp)

3.2. Đánh giá sự cắt đặc hiệu của hệ CRISPR/Cas9

Để đánh giá hiệu quả knockout bởi CRISPR/Cas9, tế bào HEK 293 sẽ được biến nạp đồng thời plasmid px330-gRNA-R; plasmid px330-gRNA-L và plasmid pCAG-EGxxFP-lep. Kết quả sau biến nạp cho thấy đoạn exon 3 của gene *Lep*

chèn trong plasmid pCAG-EGxxFP đã được cắt thành công, trình tự gene EGFP có độ dài đầy đủ đã được khôi phục và tổng hợp nên protein GFP - phát sáng huỳnh quang xanh trong tế bào HEK293 (Hình 5).

Kết quả chi tiết cho thấy sau 48h biến nạp, ở nhóm tế bào được biến nạp px330-gRNA-L và pCAG-EGxxFP-lep (Hình 5D); nhóm tế bào được biến nạp px330-gRNA-R và pCAG-EGxxFP-lep (Hình 5E) và nhóm tế bào được biến nạp đồng thời px330-gRNA-R; px330-gRNA-L và pCAG-EGxxFP-lep (Hình 5F) đều quan sát thấy tín hiệu GFP dương tính. Điều này chứng tỏ gRNA-L và gRNA-R nhận biết đúng trình tự mục tiêu trong pCAG-EGxxFP-*Lep*, nên đã hướng Cas9 đến cắt gene mục tiêu và gene EGFP được khôi phục, đã tạo ra protein GFP làm tế bào HEK 293 phát sáng. Trong khi ở nhóm đối chứng, các tế bào được biến nạp plasmid pCAG-GFP (Hình 5A), cũng được quan sát rõ tín hiệu dương tính của GFP, đây là đối chứng dương của quy trình biến nạp. Ngược lại, tín hiệu GFP không được phát hiện trong 2 nhóm đối chứng âm, các tế bào được đồng biến nạp pCAG-EGxxFP-lep và px330-U6-Chimeric_BB-CBh-hSpCas9-hGem (Hình 5B) và nhóm các tế bào được đồng biến nạp pCAG-EgxxFP với px330-gRNA-R và px330-gRNA-L (Hình 5C).



Hình 5. Biến nạp plasmid vào tế bào HEK 293 cho việc kiểm tra sự hoạt động CRISPR/Cas9 (10X)

A. pCAG-GFP; B. pCAG-EGxxFP-lep và px330-U6-Chimeric_BB-CBh-hSpCas9-hGem; C. pCAG-EgxxFP với px330-gRNA-R và px330-gRNA-L; D. pCAG-EGxxFP-lep và px330-gRNA-L; E. pCAG-EGxxFP-lep và px330-gRNA-R; F. pCAG-EGxxFP-lep, px330-gRNA-L và px330-gRNA-R

3.3. Vi tiêm hỗn hợp plasmid chứa hệ CRISPR/Cas9 vào hợp tử hai tiền nhân

Trứng và tinh trùng sau khi thu nhận được sử dụng làm nguyên liệu cho quá trình ICSI (bơm tinh trùng vào trứng) để tạo hợp tử 2 tiền nhân. Sau 6 giờ

thực hiện ICSI, các hợp tử 2 tiền nhân này được sử dụng làm nguyên liệu cho quá trình vi tiêm vào tiền nhân để tạo phôi knockout (KO) gene. Sau 3 lần thực hiện vi tiêm, kết quả quá trình vi tiêm tạo phôi KO được trình bày chi tiết trong Bảng 2.

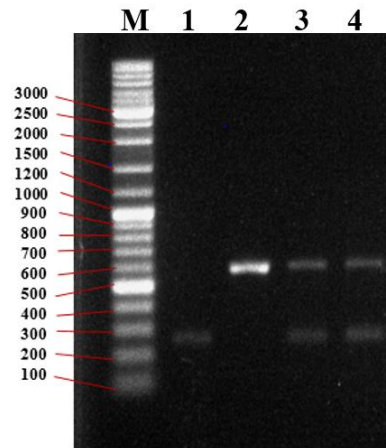
Bảng 2. Kết quả vi tiêm của các nhóm thí nghiệm

Vi tiêm plasmid		Vi tiêm dung dịch elution		ICSI	
Số phôi vi tiêm	Tỉ lệ (%) thành công	Số phôi vi tiêm	Tỉ lệ (%) thành công	Số hợp tử 2 tiền nhân	Tỉ lệ (%) phôi 2 tế bào
88	81,7 ± 2,93	74	82,4 ± 1,54	76	84,1 ± 3,75

Bảng 2 cho thấy tỉ lệ vi tiêm thành công đồng nhất ở 3 nhóm thí nghiệm dao động khoảng 82% và không có sự khác biệt khi xử lý thống kê, tỉ lệ vi tiêm thành công được đánh giá dựa trên số phôi không bị chết sau vi tiêm và số phôi phát triển lên giai đoạn tiếp theo sau 24 nuôi tiếp theo. Kết quả trên đây cho thấy, quá trình vi tiêm là đồng nhất và khả năng sống sót của phôi sau vi tiêm ở 2 nghiệm thức là như nhau, chứng tỏ dung dịch được chọn vi tiêm không ảnh hưởng đến tỉ lệ thành công của quá trình vi tiêm. Kết quả vi tiêm này thấp hơn so với nghiên cứu của Cho et al. (2009) với tỉ lệ phôi vi tiêm thành công là 95%.

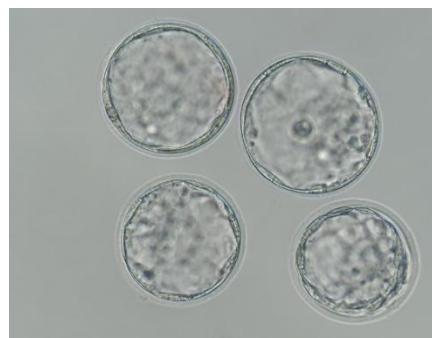
3.4. PCR đánh giá kiểu gene của phôi.

Những phôi sau vi tiêm được nuôi đến giai đoạn phôi 4 – 8 tế bào, thu một tế bào để kiểm tra khả năng knockout gene của hệ CRISPR/Cas9 bằng phản ứng PCR với cặp mồi tương ứng trong phần 2.2.4. Trong tổng số 72 phôi (81,7%) được vi tiêm thành công, 55 phôi được thu phát triển vượt qua giai đoạn phôi 8 tế bào để tạo thành phôi dâu, phôi nang (Hình 7), chiếm tỉ lệ 76% (55/72). Tất cả các phôi này đều được kiểm tra kiểu gene để xác định phôi có knockout hay không. Trong 55 phôi, có 36 phôi được knockout gen *Lep*, đạt tỉ lệ 50% (36/72) số phôi được vi tiêm plasmid. Kết quả điện di kiểm tra PCR thể hiện ở Hình 6 cho thấy giếng 2 (chứng dương), đối với phôi không bị knockout gene *Lep* sẽ tạo 1 band có kích thước 642 bp. Giếng 3,4 sản phẩm PCR đối với phôi bị knockout gene *Lep* cho 2 vị trí trên gel; một vị trí 642 bp và một vị trí 642 - 396 = 246 bp (Hình 6). Sản phẩm là 2 band, vì hệ CRISPR/Cas9 chỉ cắt một sợi DNA, sợi còn lại vẫn nguyên kích thước.



Hình 6. Kết quả điện di sản phẩm PCR của các tế bào phôi thu ở giai đoạn phôi 8 tế bào

(M): Thang kích thước DNA; (1): chứng nội, sản phẩm PCR khuếch đại đoạn gene 237 bp trong bộ gene động vật hữu nhũ, gene *SOX21*; (2): chứng dương, sản phẩm PCR khuếch đại đoạn 642 bp của gene *Lep* khi không bị knockout; (3), (4): sản phẩm PCR khuếch đại đoạn 642 bp của gene *Lep* khi knockout



Hình 7. Phôi sau vi tiêm phát triển đến giai đoạn phôi nang (200X)

4. KẾT LUẬN

Trong nghiên cứu này plasmid px330 được thiết kế và tổng hợp mang trình tự gRNA, có khả năng nhận biết và cắt đặc hiệu trình tự mục tiêu trên gene *Lep* của chuột. Quy trình vi tiêm plasmid vào tiền nhân đực cho thấy tỉ lệ phôi KO có thể đạt 50%. Kết quả nghiên cứu có tiềm năng to lớn trong ứng dụng tạo chuột chuyển gene trong tương lai phục vụ cho

các nghiên cứu y sinh học trong nước nhằm đưa các nghiên cứu của Việt Nam đến gần hơn với các nghiên cứu của thế giới.

LỜI CẢM ƠN

Công trình được hoàn thành với sự hỗ trợ kinh phí từ đề tài cấp cơ sở của Trung tâm Công nghệ Sinh học Thành phố Hồ Chí Minh.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Cho, A., Haruyama, N., Ashok, B., & Kulkarni. (2009). Generation of transgenic mice. *Current Protocols Cell Biology*, 42(1), 19-11. <https://doi.org/10.1002/0471143030.cb1911s42>
- Ittner, L. M., & Gotz, J. (2007). Pronuclear injection for the production of transgenic mice. *Nature Protocols*, 2, 1206-1215. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.145>
- Li-Fang, J. I., & Jin-Song, L. (2016). Generation of genetically modified mice using CRISPR/Cas9 and haploid embryonic stem cell systems. *Zoological Research*, 37(4), 205.
- Lonnqvist, F., Arner, P., Nordfors, L., & Schalling, M. (1995). Overexpression of the obese (*ob*) gene in adipose tissue of human obese subjects. *Nature Medicine*, 1(9), 950-953. <https://doi.org/10.1038/nm0995-950>
- Moon, H. S., Dalamaga, M., Kim, S. Y., Polyzos, S. A., Hamnvik, O. P., Magkos, F., Paruthi, J., & Mantzoros, C. S. (2013). Leptin's role in lipodystrophic and nonlipodystrophic insulin-resistant and diabetic individuals. *Endocrine Reviews*, 34(3), 377 - 412. <https://doi.org/10.1210/er.2012-1053>
- Rajashekar, B., Suhasini, K., & Jayashree, P. (2013). Gene kicked mouse: Knockout mouse and its application. *Int. Res. J. Pharm*, 4(7), 12-17. <https://doi.org/10.7897/2230-8407.04703>
- Roh, J. I., Lee, J., Park, S. U., Kang, Y. S., Lee, J., Oh, A. R., Choi, D. J., Cha, J. Y., & Lee, H. W. (2018). CRISPR – Cas 9 - mediated generation of obese and diabetic mouse models. *Exp Anim*, 67(2), 229-237. <https://doi.org/10.1538/expanim.17-0123>
- Wang, H., Yang, H., Shivalila, C. S., Dawlaty, M. M., Cheng, A. W., Zhang, F., & Jaenisch, R. (2013). One-step generation of mice carrying mutations in multiple genes by CRISPR/Cas-mediated genome engineering. *Cell*, 153(4), 910-918. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.04.025>
- Wang, L., Zheng, W., Liu, S., Li, B., & Jiang, X. (2019). Delivery of CRISPR/Cas9 by novel strategies for gene therapy. *ChemBioChem*, 20(5), 634-643. <https://doi.org/10.1002/cbic.201800629>
- Wang, Y. C., McPherson, K., Marsh, T., Gortmaker, S. L., & Brown, M. (2011). Health and economic burden of the projected obesity trends in the USA and the UK. *Lancet*, 378(9793), 815-825. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(11\)60814-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(11)60814-3)
- Zhang, Z., Zhang, Y., Gao, F., Han, S., Cheah, K. S., Tse, H. F., & Lian, Q. (2017). CRISPR/Cas9 genome-editing system in human stem cells: current status and future prospects. *Molecular Therapy-Nucleic Acids*, 9, 230-241. <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2017.09.009>