

NGHIÊN CỨU SẢN XUẤT mRNA MÃ HÓA SLEEPING BEAUTY TRANSPOSASE TRONG TẠO KHỐI TẾ BÀO CAR-T

Lê Duy Cường¹, Cấn Văn Mão^{2*}

TÓM TẮT

Mục tiêu: Sản xuất mRNA mã hóa Sleeping Beauty transposase từ khuôn DNA là plasmid pSB100X.

Đối tượng và phương pháp: Nghiên cứu khuếch đại gen biểu hiện protein Sleeping Beauty (SB) từ khuôn DNA là plasmid pSB100X bằng phản ứng PCR. Sau đó, sản phẩm PCR được tinh sạch trực tiếp bằng bộ sinh phẩm QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen). Phiên mã in vitro mRNA bằng T7 Polymerase (New England Biolabs) với thời gian tối ưu là 2 giờ, 6 giờ và 15 giờ, cùng với lượng enzyme T7 polymerase được tối ưu hóa là 10U, 30U và 100U. Tinh sạch sản phẩm cuối cùng và giải trình tự gen sanger tại MacroGen (Seoul, Hàn Quốc).

Kết quả: Thời gian phiên mã in vitro tạo mRNA biểu hiện protein SB100X trong 2 giờ cho lượng sản phẩm nhiều hơn so với phản ứng phiên mã trong 30 phút hoặc 1 giờ, khác biệt với $p < 0,05$. mRNA sau phản ứng phiên mã in vitro là một băng sản phẩm đặc hiệu, phù hợp với kích thước khoảng 1.200 bp. Lượng enzyme T7 polymerase tối ưu sử dụng cho mỗi phản ứng là 30U/1 phản ứng. Sau khi tinh sạch sản phẩm phiên mã, tiến hành giải trình tự sanger tại MacroGen (Seoul, Hàn Quốc) thu được một băng sản phẩm đặc hiệu ở khoảng 1.200 bp và có trình tự hoàn toàn chính xác.

Kết luận: Sản xuất thành công mRNA mã hóa SB transposase với trình tự đúng, có độ tinh khiết, với lượng enzyme sử dụng là 30U sau 15 giờ phiên mã in vitro.

Từ khóa: mRNA, Sleeping Beauty transposase, plasmid pSB100X.

ABSTRACT

Objectives: To produce mRNA Encoding Sleeping Beauty Transposase from the DNA Template Plasmid pSB100X.

Subjects and methods: The gene encoding the Sleeping Beauty (SB) transposase protein was amplified from the DNA template plasmid pSB100X using PCR. The PCR product was then directly purified using the QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen). In vitro transcription of mRNA was performed using T7 polymerase (New England Biolabs) with optimized incubation times of 2 hours, 6 hours, and 15 hours, and varying enzyme concentrations of 10 U, 30 U, and 100 U to determine optimal conditions. The final mRNA product was purified and subjected to Sanger sequencing at MacroGen (Seoul, South Korea).

Results: In vitro transcription for 2 hours produced a significantly higher yield of mRNA encoding the SB100X protein compared to reactions conducted for 30 minutes or 1 hour ($p < 0.05$). The resulting mRNA appeared as a distinct, specific band corresponding to an approximate size of 1,200 bp. The optimal amount of T7 polymerase for each transcription reaction was determined to be 30 U. After purification, the transcribed mRNA was subjected to Sanger sequencing at MacroGen (Seoul, South Korea), yielding a specific band of approximately 1,200 bp with a sequence that was completely accurate.

Conclusion: mRNA encoding the SB transposase was successfully produced with high purity and correct sequence, using 30 U of enzyme after 15 hours of in vitro transcription.

Keywords: mRNA, Sleeping Beauty transposase, plasmid pSB100X.

Chịu trách nhiệm nội dung: Cấn Văn Mão, Email: canvanmao2011@gmail.com

Ngày nhận bài: 20/2/2025; mời phản biện khoa học: 3/2025; chấp nhận đăng: 21/5/2025.

¹Bệnh viện Trung ương Quân đội 108.

²Học Viện Quân y.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Sử dụng tế bào lympho T biểu hiện thụ thể kháng nhân tạo (CAR) nhằm hướng phản ứng miễn dịch đến tế bào ung thư (gọi là liệu pháp miễn dịch tế bào CAR-T). Liệu pháp này đã đạt được hiệu quả đáng kể trên những bệnh nhân mắc bệnh ác tính tế bào B kháng trị [1]. Trong liệu pháp này, tế bào T phân lập từ người bệnh và được biến đổi gen để biểu hiện thụ thể CAR kháng CD19 nhằm điều trị bệnh nhân nhi mắc bệnh bạch cầu lympho B cấp tính và u lympho B.

Gần đây, các cơ quan quản lý tại Hoa Kỳ, Liên minh châu Âu và Nhật Bản đã chấp thuận và thương mại hóa các liệu pháp tế bào CAR-T nhằm vào CD19, thiết lập một cột mốc quan trọng trong việc sử dụng liệu pháp tế bào và gen trong chăm sóc sức khỏe con người [2]. Các quy trình sản xuất tế bào CAR-T được thiết kế nhằm đáp ứng nhu cầu tăng; đồng thời, giảm thời gian sản xuất và chi phí. Trong đó, Sleeping Beauty (SB) transposon là phương pháp biến đổi gen tế bào lympho T đầy hứa hẹn. Từ đó, plasmid DNA thường được sử dụng làm cơ chất cho các phản ứng chuyển nạp vào tế bào (sử dụng virus hoặc hệ thống transposon-transposase) [3].

Transposon là các yếu tố di truyền kép, gồm

một plasmid mang cấu trúc cần chuyển nạp và một plasmid mang gen mã hóa transposase. Tuy nhiên, việc tồn dư plasmid biểu hiện enzyme transposase trong các tế bào đã chuyển nạp có thể gây ra hiện tượng trao đổi chéo tương đồng không mong muốn, gây biến đổi sinh lý tế bào [4]. Nhằm hạn chế hiện tượng này, mRNA biểu hiện transposase có thể được sử dụng trong các phản ứng chuyển nạp. Ngoài việc không cần phiên mã, khiến cho protein được biểu hiện nhanh chóng sau khi chuyển nạp, mRNA không được đưa vào nhân tế bào. Monjezi và cộng sự (2017) đã tiên phong áp dụng mRNA và minicircle trong chuyển nạp tạo tế bào CAR-T [5].

Từ thực tiễn trên, chúng tôi thực hiện đề tài này nhằm mục tiêu nghiên cứu sản xuất mRNA mã hóa SB transposase, thay thế cho cơ chất plasmid DNA trong các phản ứng chuyển nạp tạo tế bào CAR-T.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu, thiết bị nghiên cứu

- Vật liệu: vector pSB100X; các cặp môi tổng hợp từ hãng MacroGen (Hàn Quốc) gồm: các cặp môi dùng khuếch đại gen, sàng lọc chọn dòng và giải trình tự (bảng 1).

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

TT	Tên môi	Trình tự (5'-3')	Mục đích
1	T7Pro-SB100-V40pAN-F	CGGAATTAATACGACTCACTATAGG	Khuếch đại gen SB100
2	T7Pro-SB100-V40pAN-R	TGTTGTAACTTGTATTATGCAGC	Khuếch đại và giải trình tự gen SB100
3	SB100-seq-F	GGGACTAGTACCATGGGAAA	Giải trình tự gen SB100
4	ybbW-401-F	TGATTGGCAAATCTGGCCG	Khuếch đại gen ybbW của E.coli
5	ybbW-611-R	GAAATCGCCCAAATCGCCAT	

- Thiết bị: máy chu kỳ nhiệt 96 mẫu (Eppendorf, Đức); máy soi chụp ảnh gel (Gensnap, Hoa Kỳ); bộ điện di DNA Horizontal mini (CBS Scientific, Hoa Kỳ); máy quang phổ NanoDrop 2000 (Thermo Fisher, Hoa Kỳ); máy lắc ổn nhiệt (Eppendorf, Hoa Kỳ); máy li tâm (Eppendorf, Đức); máy vortex (Rotolab, OSI); micropipette các loại (Gilson, Pháp), Biohit (Phân Lan).

- Hóa chất: các kit tinh sạch trực tiếp sản phẩm PCR QIAquick, PCR Purification Kit (Qiagen), kit tinh sạch RNA RNeasy Mini Kit (Qiagen). Hóa chất điện di: Agarose, Tris-base, acid acetic, EDTA, High Ranger 1kb DNA Ladder (Norgen). Enzyme: GoTaq® DNA Polymerase, SuperScript III RT/Platinum Taq Mix, T7 RNA Polymerase, RNase Inhibitor.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

- Phương pháp khuếch đại gen biểu hiện protein SB100: khuếch đại gen biểu hiện protein SB từ khuôn DNA là plasmid pSB100X, với thành phần và quy trình phản ứng PCR tuân thủ theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Vector pSB100X, các cặp môi được cung cấp từ hãng MacroGen (Hàn Quốc), gồm các cặp môi dùng khuếch đại gen, sàng lọc chọn dòng và giải trình tự.

- Phương pháp tinh sạch trực tiếp sản phẩm PCR: tinh sạch trực tiếp sản phẩm PCR bằng bộ sinh phẩm QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) theo quy trình của nhà sản xuất, sau đó sử dụng làm khuôn cho phản ứng phiên mã *in vitro*.

- Phương pháp phiên mã *in vitro* tạo mRNA:

phiên mã *in vitro* mRNA bằng T7 polymerase (theo hướng dẫn của nhà sản xuất - New England Biolabs) với thời gian thực hiện phản ứng được tối ưu lần lượt là 2 giờ, 6 giờ và 15 giờ. Ngoài ra, lượng enzyme T7 polymerase sử dụng được tối ưu hóa là 10U, 30U và 100U. Các thông số thời gian ủ và lượng enzyme sử dụng cho mỗi phản ứng phiên mã được tối ưu và đánh giá bằng RT-PCR với thành phần phản ứng (bảng 2) theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Bảng 2. Thành phần phản ứng RT-PCR

Thành phần phản ứng	Thể tích
2X Reaction Mix	25 µl
Mỗi xuôi SB100-seq-F 10 µM	1 µl
Mỗi ngược T7Pro-SB100-SV40pAN-R 10 µM	1 µl
SuperScript III RT/Platinum Taq Mix	1 µl
RNA	5 µl
Nước	Đến 25 µl

Bảng 3. Trình tự các cặp mồi sử dụng nghiên cứu

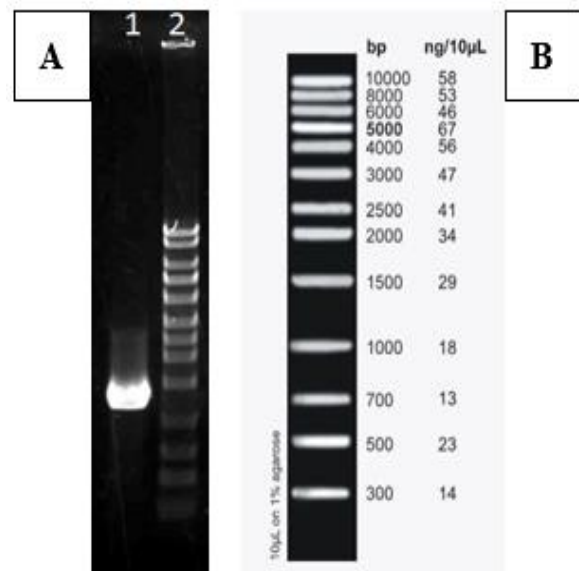
Thành phần phản ứng	Thể tích
5X Colorless GoTaq Reaction Buffer	5 µl
MgCl ₂ 25 mM	2 µl
dNTPs 10 mM	0,5 µl
GoTaq 5 U/µl	0,125 µl
Mỗi xuôi T7Pro-SB100-SV40pAN-F 10 µM	0,5 µl
Mỗi ngược T7Pro-SB100-SV40pAN-R 10 µM	0,5 µl
DNA	5 µl
Nước	Đến 25 µl

- Xử lý số liệu: bằng phần mềm SPSS 26.0. Các biến số được thể hiện theo trung bình (mean), độ lệch chuẩn (SD). Sử dụng các kiểm định Kruskal-Wallis Test và Mann-Whitney U test để đánh giá khác biệt giữa hai hay nhiều nhóm độc lập, không phân phối chuẩn. Khác biệt có ý nghĩa thống kê khi $p < 0,05$.

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

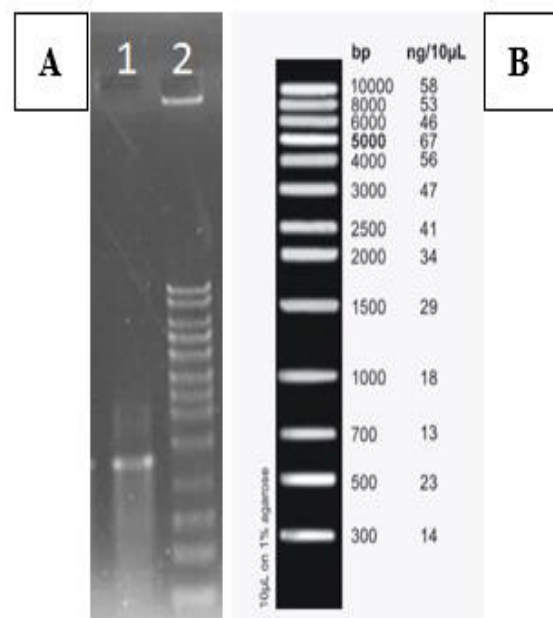
- Kết quả PCR khuếch đại gen mã hóa cho protein SB100:

Vùng gen mã hóa cho protein SB100 được khuếch đại bằng PCR như đã trình ở phần phương pháp. Kết quả cho thấy sản phẩm PCR có một băng sáng rõ nét, xấp xỉ 1.200 bp, đúng với tính toán lý thuyết. Ngoài ra, không quan sát thấy sản phẩm phụ (Hình 1). Điều này cho thấy sản phẩm PCR được tinh sạch trực tiếp trước khi dùng cho phản ứng phiên mã *in vitro*.



Hình 1. A: Kết quả PCR khuếch đại gen mã hóa cho protein SB100 (1: Sản phẩm gen mã hóa protein SB100; 2: HighRanger 1 kb DNA Ladder - Norgen); B: Thang đo chuẩn kích thước sản phẩm của HighRanger 1 kb DNA Ladder - Norgen).

- Kết quả phiên mã *invitro* mRNA SB100:



Hình 2. A: Kết quả phiên mã invitro mRNA SB100 trong 15 giờ (1: mRNA phiên mã invitro SB100; 2: HighRanger 1 kb DNA Ladder - Norgen); B: Thang đo chuẩn kích thước sản phẩm của HighRanger 1 kb DNA Ladder - Norgen).

Tổng hợp mRNA thông qua phản ứng phiên mã *in vitro* với enzyme T7 polymerase. Kết quả điện di RNA sau phản ứng: sau 2 giờ thực hiện phản ứng phiên mã *in vitro*, có một băng sản phẩm đặc hiệu, phù hợp với kích thước theo lý thuyết, xấp xỉ 1.200 bp.

Bảng 4. Kết quả tối ưu thời gian phiên mã *in vitro* tạo mRNA biểu hiện protein SB100X

Lượng RNA/DNA (µg/µg) thu được	Thời gian phiên mã <i>in vitro</i>		
	0,5 giờ ⁽¹⁾	1 giờ ⁽²⁾	2 giờ ⁽³⁾
Lần 1	14,4	22,0	31,2
Lần 2	15,1	22,9	31,1
Lần 3	15,0	21,3	30,6
$\bar{X} \pm SD$	14,83 $\pm 0,38$	22,07 $\pm 0,80$	30,97 $\pm 0,32$
p	$p_{1-3} < 0,05; p_{2-3} < 0,05$		

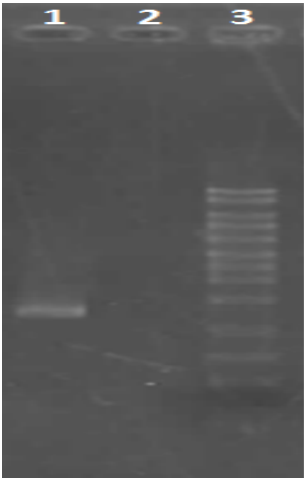
Kết quả thí nghiệm tối ưu thời gian phiên mã cho thấy phiên mã trong 2 giờ cho lượng sản phẩm nhiều hơn có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$) so với phản ứng phiên mã trong 30 phút hoặc 1 giờ.

Bảng 5. Kết quả tối ưu lượng enzyme T7 polymerase sử dụng cho 1 phản ứng phiên mã *in vitro* tạo mRNA biểu hiện protein SB100X

Lượng RNA/DNA thu được	Lượng enzyme T7 polymerase (µg/µg)		
	10U	30U	100U
Lần 1	22,4	31,2	31,2
Lần 2	24,1	32,5	31,4
Lần 3	23,1	31,7	32,5
$\bar{X} \pm SD$	23,20 $\pm 0,85$	31,80 $\pm 0,66$	31,70 $\pm 0,14$

Lượng enzyme T7 polymerase sử dụng cho mỗi phản ứng đã được tối ưu. Kết quả cho thấy hiệu suất phiên mã bão hòa ở lượng enzyme là 30U/1 phản ứng.

- Kết quả kiểm tra mRNA phiên mã *in vitro* SB100 bằng RT-PCR:



Hình 3. Kết quả kiểm tra mRNA phiên mã *in vitro* SB100 bằng RT-PCR. (1: sản phẩm RT-PCR kiểm tra mRNA phiên mã *in vitro* SB100; 2: sản phẩm RT-PCR âm tính; 3: High Ranger 1 kb DNA Ladder - Norgen).

Sau khi tinh sạch sản phẩm phiên mã, sử dụng sản phẩm làm khuôn phản ứng RT-PCR với cặp mồi đặc hiệu SB100-seq-F và T7Pro-SB100-SV40pAN-R. Kết quả thu được một băng sản phẩm đặc hiệu, xấp xỉ 1.200 bp.

- Kết quả giải trình tự sản phẩm RT-PCR SB100:

```
T7Pro-SB100-SV40pAN-R ← ----- 60
SB100-seq-F → GGGACTAGTACCATGGGAAAATCAAAAGAAATCAGCCAAGACCTCAGAAAAAGAATTGTA 60
SB100          GGGACTAGTACCATGGGAAAATCAAAAGAAATCAGCCAAGACCTCAGAAAAAGAATTGTA 60
                  *****

T7Pro-SB100-SV40pAN-R ← ----- 120
SB100-seq-F → GACCTCCACAAGTCTGGTTCATCCTTGGGAGCAATTCCAAACGCCTGGCGGTACCACGT 120
SB100          GACCTCCACAAGTCTGGTTCATCCTTGGGAGCAATTCCAAACGCCTGGCGGTACCACGT 120
                  *****

T7Pro-SB100-SV40pAN-R ← ----- 180
SB100-seq-F → TCATCTGTACAAACAATAGTACGCAAGTATAAACACCATGGGACCACGCAGCCGTCATAC 180
SB100          TCATCTGTACAAACAATAGTACGCAAGTATAAACACCATGGGACCACGCAGCCGTCATAC 180
                  *****

T7Pro-SB100-SV40pAN-R ← ----- 240
SB100-seq-F → CGCTCAGGAAGGAGACGCGTTCTGTCTCCTAGAGATGAACGTA CTTGGTGCGAAAAGTG 240
SB100          CGCTCAGGAAGGAGACGCGTTCTGTCTCCTAGAGATGAACGTA CTTGGTGCGAAAAGTG 240
                  *****

T7Pro-SB100-SV40pAN-R ← ----- 300
SB100-seq-F → CAAATCAATCCCAGAACAACAGCAAAGGACCTTGTGAAGATGCTGGAGGAAACAGGTACA 300
SB100          CAAATCAATCCCAGAACAACAGCAAAGGACCTTGTGAAGATGCTGGAGGAAACAGGTACA 300
                  *****
```

```

T7Pro-SB100-SV40pAN-R ← ----- 360
SB100-seq-F → AAAGTATCTATATCCACAGTAAACGAGTCCTATATCGACATAACCTGAAAGGCCACTCA 360
SB100 AAAGTATCTATATCCACAGTAAACGAGTCCTATATCGACATAACCTGAAAGGCCACTCA 360
*****

T7Pro-SB100-SV40pAN-R ← -----CCAGACTACGGTTTGCAACT 420
SB100-seq-F → GCAAGGAAGAAGCCACTGCTCCAAAACCGACATAAGAAAAGCCAGACTACGGTTTGCAACT 420
SB100 GCAAGGAAGAAGCCACTGCTCCAAAACCGACATAAGAAAAGCCAGACTACGGTTTGCAACT 420
*****

T7Pro-SB100-SV40pAN-R ← GCACATGGGGACAAAGATCGTACTTTTGGAGAAATGTCTCTGGTCTGATGAAACAAAA 480
SB100-seq-F → GCACATGGGGACAAAGATCGTACTTTTGGAGAAATGTCTCTGGTCTGATGAAACAAAA 480
SB100 GCACATGGGGACAAAGATCGTACTTTTGGAGAAATGTCTCTGGTCTGATGAAACAAAA 480
*****

T7Pro-SB100-SV40pAN-R ← ATAGAACTGTTTGGCCATAATGACCATCGTTATGTTTGGAGGAAGAAGGGGGAGGCTTGC 540
SB100-seq-F → ATAGAACTGTTTGGCCATAATGACCATCGTTATGTTTGGAGGAAGAAGGGGGAGGCTTGC 540
SB100 ATAGAACTGTTTGGCCATAATGACCATCGTTATGTTTGGAGGAAGAAGGGGGAGGCTTGC 540
*****

T7Pro-SB100-SV40pAN-R ← AAGCCGAAGAACACCATCCCAACCGTGAAGCACGGGGGTGGCAGCATCATGTTGTGGGGG 600
SB100-seq-F → AAGCCGAAGAACACCATCCCAACCGTGAAGCACGGGGGTGGCAGCATCATGTTGTGGGGG 600
SB100 AAGCCGAAGAACACCATCCCAACCGTGAAGCACGGGGGTGGCAGCATCATGTTGTGGGGG 600
*****

T7Pro-SB100-SV40pAN-R ← TGCTTTGCTGCAGGAGGGACTGGTGCACTTCACAAAATAGATGGCATCATGGACGCGGTG 660
SB100-seq-F → TGCTTTGCTGCAGGAGGGACTGGTGCACTTCACAAAATAGATGGCATCATGGACGCGGTG 660
SB100 TGCTTTGCTGCAGGAGGGACTGGTGCACTTCACAAAATAGATGGCATCATGGACGCGGTG 660
*****

T7Pro-SB100-SV40pAN-R ← CAGTATGTGGATATATTGAAGCAACATCTCAAGACATCAGTCAGGAAGTTAAAGCTTGGT 720
SB100-seq-F → CAGTATGTGGATATATTGAAGCAACATCTCAAGACATCAGTCAGGAAGTTAAAGCTTGGT 720
SB100 CAGTATGTGGATATATTGAAGCAACATCTCAAGACATCAGTCAGGAAGTTAAAGCTTGGT 720
*****

T7Pro-SB100-SV40pAN-R ← CGCAAATGGGTCTTCCAACACGACAATGACCCCAAGCATACTTCCAAAGTTGTGGCAAAA 780
SB100-seq-F → CGCAAATGGGTCTTCCAACACGACAATGACCCCAAGCATACTTCCAAAGTTGTGGCAAAA 780
SB100 CGCAAATGGGTCTTCCAACACGACAATGACCCCAAGCATACTTCCAAAGTTGTGGCAAAA 780
*****

T7Pro-SB100-SV40pAN-R ← TGGCTTAAGGACAACAAAGTCAAGGTATTGGAGTGGCCATCACAAAGCCCTGACCTCAAT 840
SB100-seq-F → TGGCTTAAGGACAAC----- 840
SB100 TGGCTTAAGGACAACAAAGTCAAGGTATTGGAGTGGCCATCACAAAGCCCTGACCTCAAT 840
*****

T7Pro-SB100-SV40pAN-R ← CCTATAGAAAATTTGTGGGCAGAAGTGAAGGCGTGTGCGAGCAAGGAGGCCTACAAAC 900
SB100-seq-F → ----- 900
SB100 CCTATAGAAAATTTGTGGGCAGAAGTGAAGGCGTGTGCGAGCAAGGAGGCCTACAAAC 900
*****

T7Pro-SB100-SV40pAN-R ← CTGACTCAGTTACACCAGCTCTGTGAGGAGGAATGGGCCAAAATTACCCCAAATTATTGT 960
SB100-seq-F → ----- 960
SB100 CTGACTCAGTTACACCAGCTCTGTGAGGAGGAATGGGCCAAAATTACCCCAAATTATTGT 960
*****

T7Pro-SB100-SV40pAN-R ← GGGAAGCTTGTGGAAGGCTACCCGAAACGTTTGACCCAAGTTAAACAATTTAAAGGCAAT 1020
SB100-seq-F → ----- 1020
SB100 GGGAAGCTTGTGGAAGGCTACCCGAAACGTTTGACCCAAGTTAAACAATTTAAAGGCAAT 1020
*****

T7Pro-SB100-SV40pAN-R ← GCTACCAAATACTAGGGGCCCTAACC CGGGGATCCAGACATGATAAGATACATTGATGA 1080
SB100-seq-F → ----- 1080
SB100 GCTACCAAATACTAGGGGCCCTAACC CGGGGATCCAGACATGATAAGATACATTGATGA 1080
*****

T7Pro-SB100-SV40pAN-R ← GTTGGACAAACCACAACCTAGAATGCAGTGAAAAAATGCTTTATTTGTGAAATTTGTGA 1140
SB100-seq-F → ----- 1140
SB100 GTTGGACAAACCACAACCTAGAATGCAGTGAAAAAATGCTTTATTTGTGAAATTTGTGA 1140
*****

T7Pro-SB100-SV40pAN-R ← TGCTATTGCTTTATTTGTAACCATTTATAAGCTGCAATAAACAAGTTAACAACA 1193
SB100-seq-F → ----- 1193
SB100 TGCTATTGCTTTATTTGTAACCATTTATAAGCTGCAATAAACAAGTTAACAACA 1193
*****

```

Hình 4. Kết quả giải trình tự sản phẩm RT-PCR SB100.

Sau khi tinh sạch trực tiếp, tiến hành giải trình tự sản phẩm PCR tại Macrogen (Seoul, Hàn Quốc), kết quả giải trình tự thấy mRNA thu được có trình tự hoàn toàn chính xác (Hình 4).

4. BÀN LUẬN

Quá trình chuyển vị gen ở SB liên quan đến cơ chế cắt và chèn, trong đó, yếu tố “transposon” chuyển vị từ phân tử DNA này sang phân tử DNA khác. Sự tích hợp của transposon vào nhiễm sắc thể đóng vai trò nền tảng cho sự bền vững của các transgene trong các tế bào và sinh vật chuyển gen. Năm 2009, Mátés và cộng sự đã mô tả mRNA mã hóa biến thể hoạt động quá mức của SB transposase [6]; năm 2011, Jin Z và cộng sự đã đề cập mRNA SB100 trong một nghiên cứu, cho rằng chúng chịu trách nhiệm mã hóa SB transposase [7].

Kết quả nghiên cứu thấy vùng gen mã hóa cho protein SB100, khuếch đại bằng PCR có một băng sáng rõ nét, xấp xỉ 1.200 bp (đúng với tính toán lý thuyết) và không quan sát thấy sản phẩm phụ. Điều này cho thấy sản phẩm PCR được tinh sạch trực tiếp trước khi dùng cho phản ứng phiên mã *in vitro*. Quá trình tổng hợp mRNA thông qua phản ứng phiên mã *in vitro* với enzyme T7 polymerase. Kết quả điện di RNA có một băng sản phẩm đặc hiệu, phù hợp với kích thước theo lý thuyết (xấp xỉ 1.200 bp). Kết quả thí nghiệm tối ưu thời gian phiên mã cho thấy, phiên mã trong 2 giờ cho lượng sản phẩm nhiều hơn có ý nghĩa so với phản ứng phiên mã trong 30 phút hoặc 1 giờ, khác biệt với $p < 0,05$. Hơn nữa, lượng enzyme T7 polymerase sử dụng cho mỗi phản ứng cũng đã được tối ưu. Kết quả nghiên cứu thấy hiệu suất phiên mã bão hòa ở lượng enzyme là 30U/1 phản ứng. Như vậy, hiệu suất phiên mã *in vitro* trong nghiên cứu này không đạt được như công bố của nhà sản xuất (New England Biolabs, E2040S). Điều này có thể do bản chất của khuôn DNA có ảnh hưởng đáng kể đến hiệu suất phiên mã ngược của enzyme T7 RNA polymerase [8, 9]. Sau khi tinh sạch trực tiếp, tiến hành giải trình tự sản phẩm PCR tại Macrogen (Seoul, Hàn Quốc), kết quả giải trình tự thấy mRNA thu được có trình tự hoàn toàn chính xác

Nhiều nghiên cứu chỉ ra mRNA có thể là một giải pháp thay thế hiệu quả cho DNA, như một nguồn SB transposase nhắm mục tiêu vào các tế bào và mô cơ thể. Mặc dù, RNA có thể trải qua phiên mã ngược, tiếp theo là tích hợp cDNA, nhưng rất khó xảy ra, khiến RNA trở thành giải pháp thay thế an toàn hơn cho DNA, như một nguồn transposase SB cho các ứng dụng liệu pháp gen. Kết quả này cũng tương đồng nghiên cứu của Wilber A và cộng sự năm 2006 (việc sản xuất mRNA tạo ra trong labo như một nguồn

transposase cho tương lai sau này) [10].

5. KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã sản xuất thành công mRNA mã hóa SB transposase với lượng enzyme sử dụng là 30U, sau 15 giờ phiên mã *in vitro*. Chế phẩm mRNA cuối cùng không còn lượng DNA nhiễm tạp và được kiểm tra bằng RT-PCR và giải trình tự Sanger cho trình tự đúng như thiết kế.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. June C.H, Sadelain M (2018), “Chimeric antigen receptor therapy”, *New England Journal of Medicine*; 379 (1): 64-73.
2. Chavez J.C, Bachmeier C, Kharfan-Dabaja M.A (2019), “CAR T-cell therapy for B-cell lymphomas: clinical trial results of available products”, *Therapeutic advances in hematology*; 10: 2040620719841581.
3. Mullan A (2017), “FDA approves first CAR T therapy”, *Nature reviews Drug discovery*; 16 (10): 669-70.
4. Huang X, Guo H, Kang J, et al (2008), “Sleeping Beauty transposon-mediated engineering of human primary T cells for therapy of CD19+ lymphoid malignancies”, *Molecular Therapy*; 16 (3): 580-9.
5. Monjezi R, Miskey C, Gogishvili T, et al (2017), “Enhanced CAR T-cell engineering using non-viral Sleeping Beauty transposition from minicircle vectors”, *Leukemia*; 31 (1): 186-94.
6. Mátés L, Chuah M.K, Belay E, et al (2009), “Molecular evolution of a novel hyperactive Sleeping Beauty transposase enables robust stable gene transfer in vertebrates”, *Nature genetics*; 41 (6): 753-61.
7. Jin Z, Maiti S, Huls H, et al (2011), “The hyperactive Sleeping Beauty transposase SB100X improves the genetic modification of T cells to express a chimeric antigen receptor”, *Gene therapy*; 18 (9): 849-56.
8. Yang X, Ma C (2016), “In Vitro Transcription Assays and Their Application in Drug Discovery”, *Journal of visualized experiments : JoVE*; (115): 54256.
9. Samnuan K, Blakney A.K, McKay P.F, et al (2021), “Design-of-Experiments In Vitro Transcription Yield Optimization of Self-Amplifying RNA”, *bioRxiv*: 2021.01.08. 425833.
10. Wilber A, Frandsen J.L, Geurts J.L, et al (2006), “RNA as a source of transposase for Sleeping Beauty-mediated gene insertion and expression in somatic cells and tissues”, *Molecular Therapy*; 13 (3): 625-30.