

PROBIOTIC CHỈNH SỬA GEN - TIỀM NĂNG VÀ ĐỊNH HƯỚNG ỨNG DỤNG

Bùi Thị Hải Hòa¹, Đặng Thị Hương¹, Vũ Thị Hồng Chinh²

Email: haihoacnsh@hou.edu.vn

Ngày tòa soạn nhận được bài báo: 02/04/2025

Ngày phản biện đánh giá: 02/10/2025

Ngày bài báo được duyệt đăng: 21/10/2025

DOI: 10.59266/houjs.2025.849

Tóm tắt: Probiotic chỉnh sửa gen là thế hệ vi sinh vật trị liệu mới, tạo ra bằng kỹ thuật chỉnh sửa hệ gen chính xác trên các chủng truyền thống. Sự phát triển của công cụ di truyền, đặc biệt là CRISPR-Cas, cho phép lập trình probiotic nhằm tăng khả năng chịu đựng, mở rộng chức năng sinh học và tối ưu hóa hiệu quả điều trị. Dù đã ứng dụng trong công nghiệp thực phẩm và lâm sàng, hiệu quả chưa đồng nhất và cơ chế tác động chưa rõ vẫn hạn chế việc mở rộng ứng dụng. Bài báo tập trung vào công nghệ chỉnh sửa gen, đặc biệt là CRISPR-Cas, trong thiết kế probiotic tùy biến để điều trị các bệnh phức tạp như viêm ruột, nhiễm khuẩn, rối loạn chuyển hóa và ung thư, qua đó nhấn mạnh tiềm năng của công nghệ sinh học trong phát triển liệu pháp vi sinh vật và chẩn đoán bệnh.

Từ khóa: probiotic chỉnh sửa gen, CRISPR-Cas

I. Đặt vấn đề

Probiotic là các vi sinh vật sống mang lại lợi ích sức khỏe cho vật chủ do chúng có thể điều hòa viêm, tăng cường hàng rào ruột và cải thiện chức năng thần kinh (Zhang & cộng sự, 2022).

Tuy nhiên, hiệu quả ứng dụng của probiotic phụ thuộc nhiều vào khả năng tồn tại trong điều kiện khắc nghiệt và khả năng định cư tại đường tiêu hóa, vốn rất khác nhau giữa các loài và giữa các chủng. Để vượt qua hạn chế này, các công nghệ chỉnh sửa hệ gen, đặc biệt là công nghệ

CRISPR-Cas, đã mở ra hướng phát triển mới cho việc thiết kế các chủng probiotic có đặc tính vượt trội và cá nhân hóa.

Hệ thống CRISPR-Cas, ban đầu được phát hiện như một cơ chế miễn dịch tự nhiên của vi khuẩn và cổ khuẩn nhằm bảo vệ khỏi vật liệu di truyền ngoại lai, hiện nay đã được khai thác như một công cụ chỉnh sửa hệ gen. Các hệ thống CRISPR-Cas được chia thành hai lớp, sáu nhóm và hơn 30 phân nhóm khác nhau, với các protein Cas đặc trưng như Cas9, Cas12 và Cas13. Nhờ tính chính xác và linh hoạt cao, CRISPR-Cas đã trở thành

¹ Trường Đại học Mở Hà Nội

² Bệnh viện Đa khoa Quốc tế Vinmec

nền tảng trung tâm trong công nghệ sinh học tổng hợp, cho phép chỉnh sửa hệ gen vi khuẩn một cách hiệu quả, phục vụ mục tiêu phát triển probiotic có chức năng thiết kế chuyên biệt.

II. Cơ sở lý thuyết

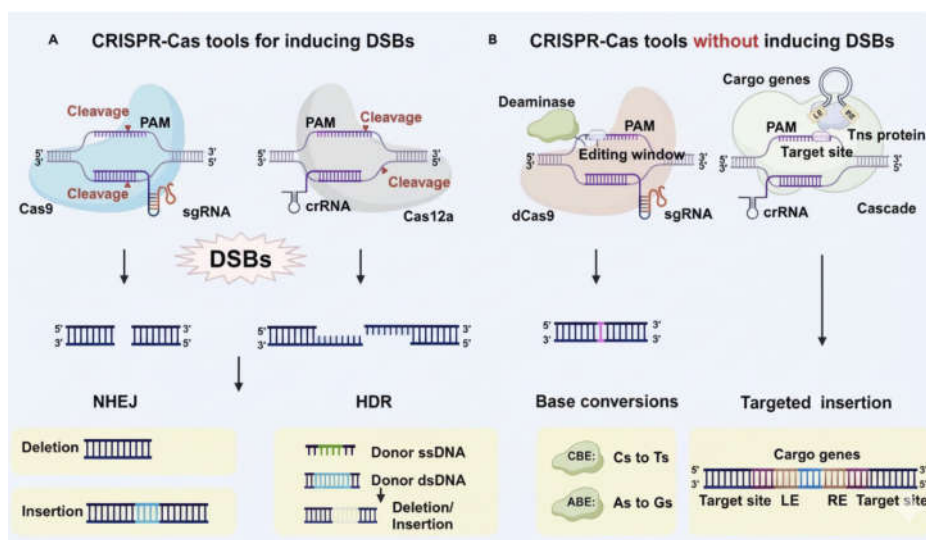
2.1. Cơ sở lý thuyết của công nghệ chỉnh sửa gen probiotic

Chỉnh sửa gen là công cụ quan trọng giúp biến đổi các chủng probiotic hiện có nhằm tạo ra các dòng probiotic mang đặc điểm di truyền và chức năng mong muốn. Ba thể hệ công nghệ chỉnh sửa gen đã được phát triển, bao gồm:

(1) Zinc finger nucleases (ZFNs): là một công cụ chỉnh sửa gen, kết hợp giữa vùng nhận biết DNA (zinc finger domain) và enzyme cắt DNA (FokI nuclease domain), cho phép tạo ra đứt gãy kép trong DNA tại vị trí được thiết kế sẵn.

(2) Transcription Activator-like Effector Nucleases (TALENs): là các protein chỉnh sửa gen nhân tạo, được tạo ra bằng cách kết hợp các yếu tố hiệu ứng giống chất hoạt hóa phiên mã với enzyme nuclease để nhận diện và cắt DNA tại vị trí xác định, từ đó thực hiện chỉnh sửa bộ gen một cách chính xác.

(3) Hệ thống CRISPR-Cas (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats - CRISPR và CRISPR-associated proteins - Cas): là một hệ thống miễn dịch tự nhiên của vi khuẩn và vi sinh vật cổ (archaea), giúp chúng nhận diện và tiêu diệt DNA ngoại lai (như của virus thực khuẩn - bacteriophage). Dựa trên cơ chế này, các nhà khoa học đã phát triển công cụ chỉnh sửa gen chính xác, mạnh mẽ và dễ sử dụng - gọi là công nghệ CRISPR-Cas (Liu & cộng sự, 2023).



Hình 1. Sơ đồ một số quá trình chỉnh sửa gene trung gian bởi CRISPR-Cas

(Wang & cộng sự, 2024)

(A) Các công cụ CRISPR-Cas có khả năng tạo ra đứt gãy sợi kép (DSBs). Cas9 cắt DNA để tạo ra đầu bằng (blunt ends) dưới sự định hướng của sgRNA, trong khi Cas12a (Cpf1) cắt DNA với sự hỗ trợ của crRNA để tạo ra đầu dính (sticky ends). Sau khi hình thành DSBs, quá trình sửa chữa tái tổ hợp được thực hiện thông qua NHEJ hoặc HDR, dẫn đến sự chèn hoặc xóa gene.

(B) Các công cụ CRISPR-Cas không tạo ra DSBs. Hệ thống CRISPR-dCas9 kết hợp với bộ chỉnh sửa base (base editor) cho phép tạo ra đột biến một base đơn mà không cần DSBs. Các CASTs vi khuẩn (CRISPR-associated transposases) hỗ trợ việc chèn các trình tự DNA mục tiêu mà không tạo ra DSBs.

Các công nghệ chỉnh sửa gen ZFN và TALEN tạo đứt gãy sợi đôi DNA tại vị trí mục tiêu, kích hoạt cơ chế sửa chữa NHEJ hoặc HDR để chỉnh sửa trình tự. Chúng là các enzyme nhân tạo nhận diện DNA nhờ vùng zinc finger hoặc TAL domain. Tuy nhiên, hạn chế về độ đặc hiệu, nguy cơ đột biến ngoài mục tiêu và thiết kế phức tạp khiến chúng ít được áp dụng cho chỉnh sửa gen probiotic. Hệ thống CRISPR-Cas ban đầu được phát hiện như một hệ thống miễn dịch thích nghi ở vi khuẩn và cổ khuẩn, giúp bảo vệ sinh vật chủ khỏi DNA ngoại lai như plasmid và phage bằng cách cắt đứt trình tự DNA của chúng. Cơ chế hoạt động này bao gồm ba giai đoạn chính: thu nhận (adaptation), biểu hiện (expression) và can thiệp (interference) (Wang & cộng sự, 2024).

Về mặt phân loại, hệ thống CRISPR-Cas được chia thành:

- Hai lớp (classes):
 - Lớp 1 (Class 1): Hệ thống sử dụng phức hợp đa protein Cas để nhận diện và cắt DNA/RNA mục tiêu.
 - Lớp 2 (Class 2): Chỉ sử dụng một protein Cas duy nhất có khả năng thực hiện toàn bộ chức năng (ví dụ Cas9, Cas12, Cas13).
 - Sáu loại chính (Types I-VI), được phân chia dựa trên cấu trúc và cơ chế hoạt động:
 - Type I, III, IV (thuộc Class 1)
 - Type II, V, VI (thuộc Class 2)
 - Hơn 30 phân nhóm (subtypes) đã được xác định đến nay, phản ánh sự đa dạng chức năng và tiến hóa của hệ thống này.
- Các endonuclease điển hình được khai thác trong chỉnh sửa gen bao gồm:
- Cas9 (Type II): cắt DNA kép tại vị trí được hướng dẫn bởi RNA, phổ biến trong chỉnh sửa gen người.

- Cas12a (Type V): tạo đứt gãy DNA khác biệt so với Cas9, với một số ưu điểm về độ đặc hiệu.

- Cas13 (Type VI): tác động lên RNA thay vì DNA, mở rộng ứng dụng trong điều hòa biểu hiện gen.

CRISPR-Cas9 là hệ thống chỉnh sửa gen phổ biến, trong đó RNA dẫn đường giúp enzyme Cas9 cắt DNA tại vị trí mục tiêu, cho phép chèn, loại bỏ hoặc sửa đổi gen với độ chính xác cao (Jinek & cộng sự, 2012). Nhờ tính linh hoạt và hiệu quả, công nghệ này trở thành nền tảng quan trọng để phát triển các chủng probiotic thiết kế cho ứng dụng y sinh.

2.2. Sự phân bố của hệ thống CRISPR-Cas trong probiotic

Hệ CRISPR-Cas xuất hiện ở 85,2% loài cổ khuẩn và 42,3% loài vi khuẩn, với tỷ lệ khác nhau ở các probiotic. Trong chi *Lactobacillus*, hơn 40% chủng mang hệ CRISPR-Cas hoàn chỉnh, đặc biệt *L. crispatus* (96%) và *L. delbrueckii* (93%). Loại II-A phổ biến nhất, trong khi loại III chỉ có ở *L. ruminis* (41%) và *L. salivarius* (32%). Ở chi *Bifidobacterium*, khoảng 57% chủng mang hệ CRISPR-Cas, chủ yếu loại I, đặc biệt là dưới nhóm I-E; loại III không được phát hiện (Hsu & cộng sự, 2014).

Ở *Streptococcus thermophilus*, một loài quan trọng trong chỉnh sửa gen, có thể mang hệ thống loại I, II và III. Một số loài có hệ CRISPR-Cas đa dạng: *Limosilactobacillus reuteri* (17% chủng), *Pediococcus acidilactici* (~30% chủng loại II-A), *Akkermansia muciniphila* (phần lớn loại I-C; 9% mang I-C và II-C (Wang & cộng sự, 2024)), *Clostridium butyricum* (loại I-B (Zhou & cộng sự, 2021)). *Bacillus coagulans* chủ yếu loại I với nhiều locus, còn *Bacillus subtilis* không có CRISPR-Cas (Aggarwal & cộng sự, 2020).

2.3. Kỹ thuật chỉnh sửa gen probiotic bằng hệ thống CRISPR-Cas

Cơ chế chính là tạo đứt gãy đôi DNA tại vị trí mục tiêu bằng enzyme nuclease, thường là Cas9, rồi sửa chữa DNA để tạo đột biến mong muốn. Cas9 có khả năng cắt chuỗi kép nhờ miền C giàu histidine-asparagine-histidine và được ứng dụng rộng rãi trong sinh học phân tử (Jinek & cộng sự, 2012; Wang & cộng sự, 2024).

Nhiều biến thể Cas9 với độ đặc hiệu PAM khác nhau, như SpRY không cần PAM, đã mở rộng ứng dụng của CRISPR. Ngoài Cas9, các enzyme Cas12, Cas3 và Csm/Cmr cũng có khả năng gây đứt gãy DNA (Oh & van Pijkeren, 2014; Liu & cộng sự, 2023).

Ngoài phương pháp dựa trên đứt gãy chuỗi kép, các kỹ thuật chỉnh sửa không tạo DSB như base editing và prime editing đã được phát triển, cùng với việc sử dụng dCas9 để điều chỉnh biểu hiện gen và Cas13 để phân giải RNA. Sau khi cắt DNA, quá trình sửa chữa diễn ra qua NHEJ, MMEJ hoặc HDR, trong đó HDR có độ chính xác cao nhưng hiệu quả thấp ở vi khuẩn. Những cải tiến này cho thấy CRISPR là nền tảng linh hoạt để phát triển chiến lược chỉnh sửa gen tiên tiến (Wang & cộng sự, 2024).

III. Các yếu tố ảnh hưởng trong chỉnh sửa hệ gen probiotic bằng CRISPR-Cas

Hiệu quả chỉnh sửa hệ gen ở probiotic phụ thuộc vào cách đưa hệ thống CRISPR-Cas vào tế bào, trong đó điện di là phương pháp được áp dụng rộng rãi cho vi khuẩn axit lactic. Quá trình này đòi hỏi tối ưu đồng thời yếu tố tế bào chủ, đặc tính plasmid và thông số điện di để tăng hiệu quả biến nạp.

Ngoài ra, các chiến lược như khai thác hệ CRISPR-Cas nội sinh giúp giảm

độc tính nuclease ngoại lai, trong khi việc sử dụng nuclease bất hoạt (dCas9, dCpf1) mở ra khả năng điều hòa biểu hiện gen mà không gây đứt gãy DNA. Vấn đề tồn tại là kiểm soát sự sống và tính ổn định của probiotic trong cơ thể; các hướng tiếp cận bao gồm hệ thống tự hủy có kiểm soát, điều chỉnh hoạt tính CRISPR-Cas bằng yếu tố vật lý-hóa học, và tích hợp thành phần sinh học tổng hợp để nâng cao tính an toàn cũng như khả năng ứng dụng y sinh (Bikard & Barrangou, 2017).

IV. Ứng dụng của probiotic chỉnh sửa gen trong y học

4.1. Ứng dụng probiotic chỉnh sửa gen trong điều trị bệnh viêm ruột (IBD)

Sự mất cân bằng hệ vi sinh vật đường ruột liên quan mật thiết đến sự hình thành và tiến triển của bệnh viêm ruột (IBD). Probiotic có thể điều chỉnh hệ vi sinh, ức chế vi khuẩn gây bệnh và điều hòa phản ứng viêm mà không gây tác động bất lợi lên miễn dịch (Bron & cộng sự, 2012). Probiotic chỉnh sửa gen được thiết kế chuyên biệt cho chẩn đoán và điều trị IBD (Wang & cộng sự, 2024).

Các chủng vi khuẩn biến đổi gen có thể đóng vai trò cảm biến sinh học, phát hiện dấu ấn viêm như thiosulfate, tetrasulfate và nitric oxide (NO) (Zhang & cộng sự, 2022). Trong điều trị, *E. coli* Nissle 1917 (ECN) đã được chỉnh sửa để tiết ma trận protein chứa Trefoil Factor (TFF), giúp tăng cường hàng rào biểu mô và phục hồi tổn thương ruột, cũng như biểu hiện các phân tử điều hòa miễn dịch như IL-10, 3-hydroxybutyrate (3HB) và Sjl6 nhằm giảm viêm. Dù hiệu quả đã được chứng minh trên mô hình động vật, các thử nghiệm lâm sàng vẫn cần thiết để xác nhận giá trị ứng dụng (Zhang & cộng sự, 2022).

Ngoài ECN, probiotic nấm men tự điều hòa biểu hiện thụ thể P2Y2 và tiết enzyme phân giải ATP cho thấy khả năng giảm viêm, hạn chế xơ hóa và phục hồi hệ vi sinh vật ở chuột IBD (Wang & cộng sự, 2024). Ngoài ra, việc bao phủ ECN bằng polydopamine - một chất ức chế miễn dịch nano - giúp hạn chế phản ứng viêm quá mức và điều hòa lại hệ vi sinh, mở ra triển vọng phát triển probiotic có khả năng tự tiết chất ức chế miễn dịch để thích nghi trong môi trường viêm mạn (Li & cộng sự, 2021).

4.2. Ứng dụng probiotic chỉnh sửa gen trong kiểm soát nhiễm khuẩn

Nhiễm khuẩn là nguyên nhân tử vong hàng đầu toàn cầu trong bối cảnh kháng thuốc gia tăng và thiếu hụt kháng sinh mới. Probiotic được thiết kế là chiến lược hứa hẹn cho phòng ngừa, chẩn đoán và điều trị. Một số chủng đã được chỉnh sửa để tăng khả năng đối kháng vi khuẩn, chẳng hạn *E. coli* Nissle 1917 được biến đổi nhằm tiêu diệt đặc hiệu *Enterococcus* kháng vancomycin, giúp giảm mật độ vi khuẩn gây bệnh (Aggarwal & cộng sự, 2020). Ngoài ra, *Saccharomyces boulardii* được thiết kế tiết protein trung hòa độc tố của *Clostridium difficile*, chứng minh tiềm năng trong kiểm soát nhiễm trùng (Pusch & cộng sự, 2021).

4.3. Ứng dụng probiotic chỉnh sửa gen trong điều trị khối u

Ứng dụng vi khuẩn trong điều trị ung thư đã được nghiên cứu từ lâu, một số probiotic có khả năng chống ung thư thông qua thúc đẩy apoptosis và giảm stress oxy hóa. Công nghệ chỉnh sửa gen đã tạo ra các chủng probiotic thiết kế có khả năng khu trú và tác động chọn lọc lên khối u, như *E. coli* "SLIC" tự ly giải giải phóng kháng thể nano chống PD-

L1 và CTLA-4 (Chowdhury & cộng sự, 2019), hay *E. coli* Nissle 1917 vận chuyển TUM-5 và p53 đến vùng khối u (Kurtz & cộng sự, 2019), chuyển hóa chất thải tế bào ung thư thành L-arginine để hỗ trợ ức chế PD-1/PD-L1 (Canale & cộng sự, 2021), hoặc điều khiển bằng ánh sáng để điều trị chính xác (Liu & cộng sự, 2023). Một số chủng, như SYN1891 sản xuất cyclic di-AMP kích hoạt miễn dịch bẩm sinh qua con đường interferon, đã tiến tới thử nghiệm lâm sàng, cho thấy tiềm năng lâm sàng hứa hẹn của probiotic thiết kế trong điều trị ung thư.

4.4. Ứng dụng probiotic chỉnh sửa gen trong điều trị bệnh lý chuyển hóa

Rối loạn chuyển hóa là nhóm bệnh do đột biến gen hoặc rối loạn enzym, dẫn đến tích tụ hoặc thiếu hụt các chất chuyển hóa thiết yếu và ảnh hưởng nghiêm trọng đến sức khỏe. Probiotic được thiết kế hiện là chiến lược tiềm năng nhờ khả năng tái lập trình chức năng trao đổi chất để giảm độc chất và bổ sung hoạt tính sinh học có lợi. Ví dụ điển hình là *Escherichia coli* SYN1618, được thiết kế để tiêu thụ phenylalanine thông qua các enzyme dị hóa, đã chứng minh tính an toàn và khả năng giảm độc tính trong điều trị phenylketon niệu (Isabella & cộng sự, 2018). Tương tự, *E. coli* SYN8802 được phát triển nhằm hấp thu oxalate trong đường ruột, giúp giảm nguy cơ sỏi thận và rối loạn liên quan (Kurtz & cộng sự, 2019). Các nghiên cứu này cho thấy việc sử dụng vi sinh vật sống được chỉnh sửa gen không chỉ mang lại lợi ích trao đổi chất tại chỗ mà còn cải thiện toàn thân. Ngoài ra, những thử nghiệm lâm sàng ban đầu cũng củng cố tính khả thi của chiến lược này trong thực hành y học (Aggarwal & cộng sự, 2020).

Bảng 1. So sánh ứng dụng lâm sàng của probiotic chỉnh sửa gen và biện pháp điều trị hiện tại

Bệnh lý	Biện pháp điều trị hiện tại	Hạn chế	Probiotic chỉnh sửa gen	Ưu điểm	Tài liệu tham khảo
Viêm ruột (IBD)	Thuốc kháng viêm (corticosteroid, 5-ASA), thuốc sinh học (anti-TNF, anti-IL-12/23)	Tác dụng phụ, ức chế miễn dịch toàn thân, tái phát cao	Probiotic chỉnh sửa gen cảm nhận dấu ấn viêm, phục hồi hàng rào biểu mô, điều hòa miễn dịch và phân giải ATP, đồng thời sử dụng lớp phủ nano để hạn chế viêm quá mức, giúp cân bằng hệ vi sinh và cải thiện triệu chứng.	Tác động chọn lọc tại ruột, phục hồi biểu mô, điều hòa miễn dịch mà không ức chế toàn thân	Bron và cộng sự, 2012
Nhiễm khuẩn kháng thuốc	Kháng sinh phổ rộng, kháng sinh thế hệ mới	Kháng thuốc, rối loạn hệ vi sinh, tác dụng phụ	Nhắm đích, cạnh tranh bám dính, tiết protein/kháng sinh đặc hiệu, trung hòa độc tố, cảm biến sinh học	Giảm kháng thuốc, ít rối loạn hệ vi sinh, tăng tính an toàn, tiềm năng cá thể hóa	Aggarwal và cộng sự, 2020
Ung thư	Hóa trị, xạ trị, liệu pháp miễn dịch (anti-PD-1, anti-CTLA-4)	Độc tính cao, kháng thuốc, chi phí lớn	Probiotic chỉnh sửa gen có thể khu trú tại khối u, giải phóng kháng thể hoặc gen điều hòa, chuyển hóa chất thải ung thư và kích hoạt miễn dịch, từ đó tăng hiệu quả điều trị và giảm độc tính toàn thân.	Tác động chọn lọc khối u, giảm độc tính toàn thân, có thể kết hợp liệu pháp miễn dịch	Chowdhury và cộng sự, 2019; Canale và cộng sự, 2021
Bệnh lý chuyển hóa (PKU, tăng oxalat, tăng amoniac, tiểu đường)	Chế độ ăn kiêng nghiêm ngặt, ghép gan, thuốc hỗ trợ chuyển hóa	Khó tuân thủ, hiệu quả hạn chế, nhiều biến chứng	Probiotic chỉnh sửa gen có thể phân giải chất độc hoặc tiết phân tử có lợi, như giảm phenylalanine (SYNB1618), hấp thu oxalate (SYNB8802), chuyển hóa amoniac (SYNB1020) và tăng GLP-1, từ đó cải thiện triệu chứng	Duy trì lâu dài, cải thiện chất lượng sống, an toàn bước đầu trong thử nghiệm lâm sàng	Isabella và cộng sự, 2018; Kurtz và cộng sự, 2019

Ứng dụng công nghệ CRISPR-Cas trong probiotic mang lại tiềm năng điều trị đáng kể, nhưng vẫn đối mặt với nhiều hạn chế. Hiệu quả chỉnh sửa gen thường bị cản trở bởi tính đa dạng di truyền, cơ chế bảo vệ nội sinh của vi khuẩn và khả năng thu nhận plasmid thấp. Ngoài ra, nguy cơ chuyển gen ngang và tác động ngoài mục tiêu đặt ra thách thức nghiêm trọng về an toàn sinh học, trong khi khung pháp lý cho việc sử dụng probiotic chỉnh sửa gen còn chưa hoàn thiện (Bikard & Barrangou, 2017).

V. Kết luận

Tóm lại, mặc dù còn tồn tại nhiều rào cản kỹ thuật và sinh học, việc ứng dụng probiotic biến đổi gen trong y học người và động vật vẫn là một lĩnh vực nhiều hứa hẹn, đòi hỏi sự kết hợp chặt chẽ giữa công nghệ sinh học, miễn dịch học và an toàn sinh học để hiện thực hóa tiềm năng trong tương lai.

Tài liệu tham khảo

- [1]. Aggarwal, N., Breedon, A. M. E., Davis, C. M., Hwang, I. Y., & Chang, M. W. (2020). Engineering probiotics for therapeutic applications: Recent examples and translational outlook. *Current Opinion in Biotechnology*, 65, 171-182. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2020.02.016>.
- [2]. Bikard, D., & Barrangou, R. (2017). Using CRISPR-Cas systems as antimicrobials. *Current Opinion in Microbiology*, 37, 155-160. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2017.08.005>.
- [3]. Bron, P. A., van Baarlen, P., & Kleerebezem, M. (2012). Emerging molecular insights into the interaction between probiotics and the host intestinal mucosa. *Nature Reviews Microbiology*, 10(1), 66-78. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2690>.
- [4]. Brophy, J. A. N., & Voigt, C. A. (2014). Principles of genetic circuit design. *Nature Methods*, 11(5), 508-520. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2926>.
- [5]. Canale, F. P., Basso, C., Antonini, G., Perotti, M., Li, N., Sokolovska, A., Neumann, J., James, M. J., Geiger, S., Jin, W., Theurillat, J.-P., West, K. A., Leventhal, D. S., Lora, J. M., Sallusto, F., & Geiger, R. (2021). Metabolic modulation of tumours with engineered bacteria for immunotherapy. *Nature*, 598(7882), 662-666. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-04003-2>.
- [6]. Chowdhury, S., Castro, S., Coker, C., Hinchliffe, T. E., Arpaia, N., & Danino, T. (2019). Programmable bacteria induce durable tumor regression and systemic antitumor immunity. *Nature Medicine*, 25(7), 1057-1063. <https://doi.org/10.1038/s41591-019-0498-z>.
- [7]. Dou, J., Wang, Y., Wang, X., Fu, X., Zhang, Z., & Zhang, J. (2021). Engineered probiotics: potential strategies in the treatment of inflammatory bowel disease and colitis-associated colon cancer. *Frontiers in Pharmacology*, 12, 742171. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.742171>.
- [8]. Goh, Y. J., & Klaenhammer, T. R. (2013). Genetic mechanisms of prebiotic oligosaccharide metabolism in probiotic microbes. *Annual Review of Food Science and Technology*, 4, 377-399. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-030212-182545>.
- [9]. Hidalgo-Cantabrana, C., O'Flaherty, S., & Barrangou, R. (2017). CRISPR-based engineering of next-generation lactic acid bacteria. *Current Opinion in Microbiology*, 37, 79-87. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2017.03.014>.
- [10]. Hsu, P. D., Lander, E. S., & Zhang, F. (2014). Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering. *Cell*, 157(6), 1262-1278. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.05.010>.
- [11]. Isabella, V. M., Ha, B. N., Castillo, M. J., Lubkowitz, D. J., Rowe, S. E., Millet, Y. A., Anderson, C. L., Li, N., Fisher, A. B., West, K. A., Reeder, P. J., Momin, M. M., Bergeron, C. G., Guilmain, S. E., Miller, P. F., Kurtz, C. B., & Falb, D. (2018). Development of a synthetic live bacterial therapeutic for the human metabolic disease phenylketonuria. *Nature Biotechnology*, 36(9), 857-864. <https://doi.org/10.1038/nbt.4222>.
- [12]. Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J. A., & Charpentier, E. (2012). A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*, 337(6096), 816-821. <https://doi.org/10.1126/science.1225829>.
- [13]. Kurtz, C. B., Millet, Y. A., Puurunen, M. K., Perreault, M., Charbonneau, M. R., Isabella, V. M., Kotula, J. W., Antipov, E., Dagon, Y., Denney, W. S., Wagner, D. A., West, K. A., Degar, A. J., Brennan, A. M., & Miller, P. F. (2019). An engineered *E. coli* Nissle improves hyperammonemia and survival in mice and shows dose-dependent exposure in healthy humans. *Science Translational Medicine*, 11(475), eaau7975. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aau7975>.

- [14]. Li, M., Ma, Y., Chen, J., & Wang, L. (2021). Application of synthetic biology tools to engineer probiotic lactic acid bacteria. *Current Opinion in Biotechnology*, 70, 61-69. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2021.03.005>.
- [15]. Liu, L., Helal, S. E., & Peng, N. (2023). CRISPR-Cas-based engineering of probiotics. *BioDesign Research*, 2023, 5, 0017. <https://doi.org/10.34133/bdr.0017>.
- [16]. Makarova, K. S., Wolf, Y. I., Iranzo, J., Shmakov, S. A., Alkhnbashi, O. S., Brouns, S. J. J., Charpentier, E., Cheng, D., Haft, D. H., Horvath, P., Moineau, S., Mojica, F. J. M., Scott, D., Shah, S. A., Siksnys, V., Terns, M. P., Venclovas, C., White, M. F., Yakunin, A. F., ... & Koonin, E. V. (2020). Evolutionary classification of CRISPR-Cas systems: a burst of class 2 and derived variants. *Nature Reviews Microbiology*, 18(2), 67-83. <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0299-x>.
- [17]. Oh, J. H., & van Pijkeren, J. P. (2014). CRISPR-Cas systems: new tools for genetic manipulations of lactic acid bacteria. *Current Opinion in Biotechnology*, 31, 62-70. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2014.07.001>.
- [18]. Pusch, O., Kenngott, R. A.-M., Schönherr, M., & Schulze, K. (2021). Probiotic yeast *Saccharomyces boulardii* engineered to secrete *Clostridium difficile* toxin-neutralizing proteins. *Microbial Cell Factories*, 20, 190. <https://doi.org/10.1186/s12934-021-01691-y>.
- [19]. Wang, L., Hu, J., Li, K., Zhao, Y., & Zhu, M. (2024). Advancements in gene editing technologies for probiotic-enabled disease therapy. *iScience*, 27(9), Article 110791. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2024.110791>.
- [20]. Zhang, C., Liu, X., Wang, H., & Liu, C. (2022). Advances in engineering probiotics for the detection and treatment of inflammatory bowel diseases. *Biotechnology Advances*, 58, 107887. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2022.107887>.
- [21]. Zhou, X., Wang, X., Luo, H., Wang, Y., Wang, Y., Tu, T., Qin, X., Su, X., Bai, Y., Yao, B., Huang, H., & Zhang, J. (2021). Exploiting heterologous and endogenous CRISPR-Cas systems for genome editing in the probiotic *Clostridium butyricum*. *Biotechnology and Bioengineering*, 118(7), 2448-2459. <https://doi.org/10.1002/bit.27753>.

GENETICALLY ENGINEERED PROBIOTICS: POTENTIAL AND APPLICATION

Bui Thi Hai Hoa³, Dang Thi Huong³, Vu Thi Hong Chinh⁴

Abstract: *Genetically engineered probiotics represent a new generation of therapeutic microorganisms, created through precise genome-editing techniques applied to traditional strains. Advances in genetic engineering tools, particularly CRISPR-Cas systems, have enabled the programming of probiotics to enhance their resilience, expand their biological functions, and optimize therapeutic efficacy. Despite their applications in the food industry and clinical settings, inconsistent outcomes and unclear mechanisms of action still limit their broader application. This article focuses on genome-editing technologies, especially CRISPR-Cas, in the design of customized probiotics for treating complex diseases, including inflammatory bowel disease, bacterial infections, metabolic disorders, and cancer, thereby highlighting the potential of biotechnology in developing microbial therapeutics and diagnostic tools.*

Keywords: *genetically engineered probiotics, CRISPR-Cas*

³ Hanoi Open University

⁴ Vinmec International Hospital