

TÍNH ỔN ĐỊNH CỦA GEN CHUYỂN RANKL Ở DÒNG CÁ MEDAKA CHUYỂN GEN RANKL:HSE:CFP LÀM MÔ HÌNH BỆNH LOÃNG XƯƠNG

Lại Thị Nguyệt¹, Phạm Thị Thanh¹, Phạm Văn Cường¹,
Trần Đức Long¹, Tô Thanh Thúy¹

TÓM TẮT: Bệnh loãng xương, đặc trưng bởi sự suy giảm mật độ và cấu trúc xương, là bệnh xương phổ biến và đã được nghiên cứu rất nhiều trên mô hình động vật có vú. Gần đây cá medaka (*Oryzias latipes*) được sử dụng trong nhiều nghiên cứu về xương do có các ưu điểm nổi trội của động vật mô hình và cơ chế phân tử về xương giống với người như Rankl kích thích biệt hóa tế bào hủy xương. Đại học Quốc gia Xin-ga-po đã tạo ra cá medaka chuyển gen rankl:HSE:CFP biểu hiện đồng thời Rankl và CFP nhờ cảm ứng nhiệt. Rankl biểu hiện quá mức làm tế bào hủy xương xuất hiện sớm, gây hủy xương và tạo kiểu hình loãng xương. Chúng tôi đã tiếp nhận dòng cá này về phòng thí nghiệm Khoa Sinh học, Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG Hà Nội làm mô hình bệnh loãng xương và sàng lọc hoạt chất chống loãng xương. Việc dùng cá medaka làm mô hình thí nghiệm còn rất mới ở Việt Nam, do vậy chúng tôi đã thiết lập phòng thí nghiệm với các qui trình nuôi cá và đã duy trì được một số thế hệ cá medaka với những chỉ số sinh học tương đương với cá được nuôi bằng các qui trình chuẩn đã công bố. Hơn nữa chúng tôi đã kiểm tra và thấy gen chuyển rankl của dòng cá rankl:HSE:CFP vẫn ổn định về di truyền và chức năng sau 4 thế hệ, khẳng định việc chúng tôi có thể tiếp tục duy trì và hoàn thiện dòng cá này làm mô hình bệnh loãng xương để sử dụng cho các nghiên cứu tiếp theo.

Từ khóa: cá medaka, cá chuyển gen, gen chuyển, loãng xương, RANKL

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Bệnh loãng xương đặc trưng bởi sự suy giảm mật độ và cấu trúc xương, là bệnh xương phổ biến và đã được nghiên cứu rất nhiều trên mô hình động vật có vú [2,3]. Gần đây cá medaka (*Oryzias latipes*) được nhiều nhóm nghiên cứu trên thế giới chứng minh là một mô hình rất tốt để nghiên cứu về xương và các bệnh về xương do cơ chế phân tử và tế bào của quá trình tái tạo xương (bone remodeling) ở cá medaka và người là khá tương đồng. Loãng xương gây ra do quá trình hủy xương lấn át quá trình tạo xương, cũng quan sát thấy ở cá [8,10,11]. Thêm

vào đó, cá medaka có những đặc điểm vượt trội so với động vật có vú: kích thước nhỏ, chi phí nuôi dưỡng thấp, thời gian trưởng thành sinh dục ngắn, thu tinh ngoài, phôi nhỏ trong suốt giúp dễ quan sát tế bào xương *in vivo* và sàng lọc thuốc với số lượng lớn. Đặc biệt việc biến đổi hệ gen để tạo cá chuyển gen hay đột biến làm mô hình bệnh có thể thực hiện rất dễ dàng [4,6].

Tô Thanh Thúy và cộng sự tại Đại học Quốc gia Xin-ga-po đã tạo ra dòng cá chuyển gen rankl:HSE:CFP biểu hiện đồng thời Rankl ngoại sinh và protein phát huỳnh quang CFP dưới tác dụng của sốc nhiệt để dùng làm mô hình loãng xương [10]. RANKL (Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand) là một trong những yếu tố chính có vai trò kích thích sự tăng sinh, biệt hóa và hoạt động chức năng của tế bào hủy xương ở người và động vật có xương sống [7,9,10]. Biểu

¹ Khoa Sinh học, Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc Gia Hà Nội

* Tác giả chịu trách nhiệm chính:

Tô Thanh Thúy

Email: ttthuy2012@gmail.com

Ngày nhận bài: 22/5/2015

Ngày nhận bài phản biện: 1/6/2015

Ngày chấp nhận đăng: 8/6/2015

hiện *Rankl* ngoại sinh kích thích sự hình thành và hoạt động của tế bào hủy xương làm cho mô xương của cá chuyển gen bị phá hủy ở giai đoạn phát triển rất sớm [10]. Dòng cá *rankl:HSE:CFP* vì vậy có tiềm năng rất lớn để sử dụng như một mô hình bệnh loãng xương, đặc biệt cho việc sàng lọc các hợp chất có hoạt tính chống loãng xương.

Dòng cá *rankl:HSE:CFP* được tạo ra, chăm sóc và nuôi bằng các qui trình đã được chuẩn hóa của thế giới [10] và duy trì bằng cách nội phối giữa những cá cùng thế hệ tại Đại học Quốc gia Xin-ga-po. Chúng tôi đã tiếp nhận dòng cá này về phòng thí nghiệm Khoa Sinh học, Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG Hà Nội để dùng cho các nghiên cứu tiếp theo về loãng xương và sàng lọc chất chống loãng xương. Việc dùng cá medaka làm mô hình thí nghiệm còn rất mới ở Việt Nam, do vậy chúng tôi đã thiết lập phòng thí nghiệm, các qui trình để nuôi và duy trì cá medaka. Trong quá trình nuôi và duy trì cá, sự ổn định về di truyền và chức năng của gen chuyển là một vấn đề luôn phải được chú ý. Thực tế đã cho thấy, gen chuyển có thể bị mất khỏi hệ gen hay bị bất hoạt sau một số thế hệ [1]. Vì vậy việc kiểm tra và khẳng định tính ổn định của gen chuyển *rankl* trên dòng cá *rankl:HSE:CFP* chúng tôi nuôi dưỡng là việc rất cần thiết. Do đó nghiên cứu của chúng tôi tiến hành với mục tiêu thiết lập được các qui trình nuôi cá và kiểm định được tính ổn định của gen chuyển *rankl:HSE:CFP* của dòng cá medaka từ Đại học quốc gia Singapore về phòng thí nghiệm tại Khoa sinh Đại học khoa học tự nhiên Đại học quốc gia Hà Nội.

2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Nghiên cứu của chúng tôi thực hiện trên dòng cá medaka chuyển gen *rankl:HSE:CFP* và dòng cá chủng đại

nhận từ Đại học Quốc gia Xin-ga-po từ tháng 3 năm 2013.

2.1.1. Thiết lập phòng thí nghiệm, qui trình nuôi và chăm sóc cá medaka

Chúng tôi dựa vào các qui trình chuẩn đã phổ biến ở các phòng thí nghiệm trên thế giới [4] để tìm ra qui trình nuôi phù hợp với điều kiện nghiên cứu tại phòng thí nghiệm của Bộ môn Sinh lý học và Sinh học người, Khoa Sinh học. Chúng tôi đã xây dựng hệ thống thiết bị, dụng cụ cho phòng nuôi, đảm bảo được điều kiện về nhiệt độ (28°C) và ánh sáng (chu kỳ ánh sáng là 14 giờ sáng: 10 giờ tối). Chúng tôi cũng thiết lập hệ thống dụng cụ và phương pháp nuôi, xử lý nước, tạo nguồn thức ăn và phương pháp nuôi cho từng loại: phôi cá, cá ấu trùng, cá con và cá trưởng thành. Cá được nuôi trong các khay nhựa Song Long thể tích 11l; 6l và 2,5l với mật độ phù hợp với từng loại cá. Các khay cá được đặt trên giá thép có lắp đèn LED chiếu sáng theo chu kỳ. Nước nuôi phôi cá là môi trường E3 hay nước lọc RO có pha thêm muối [4]. Nước dùng nuôi cá con và trưởng thành là nước máy phơi cho bay clo, sau 4 ngày thay 1/3 lượng nước có trong khay. Các khay cá trưởng thành được thả thêm sỏi và ốc nhỏ để tạo hệ sinh cảnh, làm sạch nước. Mỗi khay cá cũng được gắn thiết bị lọc nước và sục khí nhỏ. Để kiểm tra phương pháp xử lý nước có phù hợp, các chỉ số nước như pH, độ dẫn, độ cứng được đo bằng máy Water quality checker WQC-22A của Nhật Bản; nồng độ NH₃, nitrat, nitrit được đo bằng các bộ kit Sera (Đức). Cá được cho ăn 3 lần/ngày bằng thức ăn khô Aquafin red Flake (của hãng Natunafish food), ngoài ra cá còn được cho ăn giun sậy nghiền nhỏ. Các loại thức ăn này đều có thể mua ở các cửa hàng cá cảnh.

Hiệu quả của các qui trình và phương pháp nuôi cá chúng tôi xây dựng được được đánh giá bằng số thế hệ, số lượng cá được nuôi và duy trì, số trứng mỗi cá

cái đẻ, tỷ lệ trứng được thụ tinh và tỷ lệ cá sống sau hai tháng tuổi.

2.2.2. Phương pháp sốc nhiệt

Chúng tôi thực hiện sốc nhiệt phôi cá *rankl:HSE:CFP* theo phương pháp đã được mô tả [10]. Phôi/ấu trùng cá 9 ngày tuổi đựng trong đĩa petri có nắp đậy được đặt vào bể ổn nhiệt ở 39°C trong 2 giờ.

2.2.3. Tách chiết ADN từ phôi cá đơn lẻ

ADN của từng phôi cá được tách chiết thô theo phương pháp của Nathan D.M. và cộng sự [5].

2.2.4. Phản ứng chuỗi trùng hợp (PCR)

Sự ổn định về di truyền của gen chuyển *rankl* trong hệ gen của cá chuyển *rankl:HSE:CFP* được kiểm tra bằng PCR với cặp mồi MF-RANKL.Seq.F: ACAGGTCCTACCTGCGAAAC, và MF-RANKL.Seq.R:

GGTCTTTTCTGCCTCCTGGT. Phản ứng PCR này sẽ cho sản phẩm 734bp khi ADN khuôn là ADN hệ gen của cá chuyển gen và không cho sản phẩm PCR nào khi khuôn là ADN hệ gen của cá medaka chủng đại [10]. Chu kỳ nhiệt của phản ứng PCR là: 95°C: 2'; 30x(92°C:10"-55°C:10"-72°C:30"); 72°C:5'.

2.2.5. Điện di ADN

Sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose 1%, sử dụng đệm TAE 1x, thuốc nhuộm gel SYBR® safe ADN gel Stain.

2.2.6. Nhuộm xương cá

Xương cá được nhuộm bằng thuốc nhuộm Alizarin red (Sigma A5533) như đã được công bố [10].

2.2.7. Kỹ thuật chụp ảnh và xử lý hình ảnh

Phôi/ấu trùng cá đã nhuộm được xử lý như qui trình đã công bố [10], chụp ảnh bằng máy Optika với kính hiển vi Axioplanz Zeiss VMI0070. Hình ảnh được phân tích nhờ phần mềm ImageJ 1.46 (Rasband, W.S., ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <http://imagej.nih.gov/ij/>, 1997-2014).

3. KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

3.1. Kết quả nuôi và duy trì dòng cá medaka *rankl:HSE:CFP*

Chúng tôi đã thiết lập được phòng thí nghiệm nuôi cá medaka với hệ thống dụng cụ, điều kiện ánh sáng, nhiệt độ và các qui trình cho cá ăn, xử lý nước phù hợp (số liệu không đăng). Sau khi nhận 4 phôi cá *rankl:HSE:CFP* từ Đại học Xin-ga-po, đến nay chúng tôi đã duy trì dòng cá này được 12 thế hệ. Vì các thí nghiệm của chúng tôi được thực hiện chủ yếu trên phôi cá nên khả năng sinh sản và số lượng trứng mỗi lần cá đẻ là rất quan trọng. Chúng tôi thống kê một số chỉ số sinh học ở thời kỳ sinh sản của cá trong một bể với 7 cá cái và 4 cá đực trong vòng 60 ngày và thu được kết quả như sau:

Bảng 1. Một số chỉ số sinh học của dòng cá *rankl:HSE:CFP*

Chỉ số sinh học	
Tổng số trứng thu được (trứng)	928
Số trứng được thụ tinh (trứng)	766
Số trứng trung bình mỗi lần cá cái đẻ (trứng/cá cái)	16
Tỷ lệ trứng được thụ tinh (%)	83
Tỷ lệ trứng nở (%)	91
Tỷ lệ sống của ấu trùng (%)	91

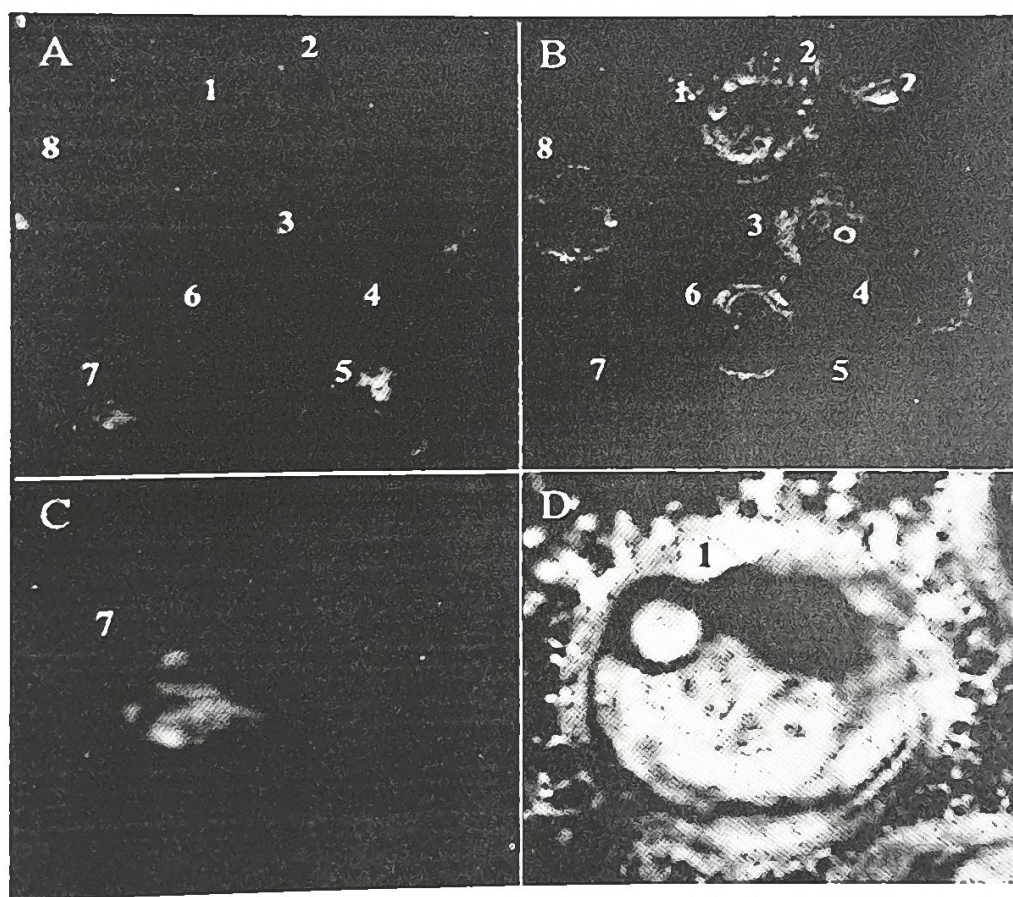
Các chỉ số về số trứng trung bình mỗi lần cá đẻ, tỉ lệ trứng thụ tinh, tỷ lệ trứng nở, tỷ lệ sống của ấu trùng tới 60 ngày tuổi của cá chúng tôi nuôi được là tương đương với các chỉ số của cá nuôi bởi các qui trình chuẩn [4,6].

3.2. Sự ổn định về biểu hiện của protein phát huỳnh quang CFP là chỉ thị cho biểu hiện của *rankl* trong hệ gen cá *rankl:HSE:CFP*

Vì gen chuyển của động vật chuyển gen có thể bị mất hay bất hoạt sau một số thế hệ [1], sau khi duy trì được bốn thế hệ chúng tôi kiểm tra sự ổn định về di truyền và chức năng của gen chuyển *rankl* trong hệ gen của dòng cá này.

Cá chuyển gen *rankl:HSE:CFP* mang cấu trúc gen chuyển gồm promotor sốc

nhật hoạt động hai chiều điều khiển biểu hiện đồng thời của *rankl* và CFP (protein phát huỳnh quang màu xanh lam) nên CFP được dùng làm chỉ thị cho sự biểu hiện của gen chuyển *rankl* [10]. Chúng tôi sốc nhiệt 8 phôi cá *rankl:HSE:CFP* vào lúc 2 ngày tuổi, quan sát và chụp ảnh bằng kính hiển vi đồng trụ lúc 3 ngày tuổi thấy có 6 phôi phát huỳnh quang CFP (phôi đánh số 2, 4, 5, 6, 7, 8, Hình 1A,C) và 2 phôi không phát quang (phôi đánh số 1, 3, Hình 1A,B). Điều này cho thấy gen chuyển mã hóa cho CFP vẫn tồn tại và hoạt động trong hệ gen của 6 phôi cá phát quang CFP và 6 phôi này có khả năng vẫn mang gen chuyển *rankl*.



Hình 1. Biểu hiện CFP ở phôi cá chuyển gen *rankl:HSE:CFP*.

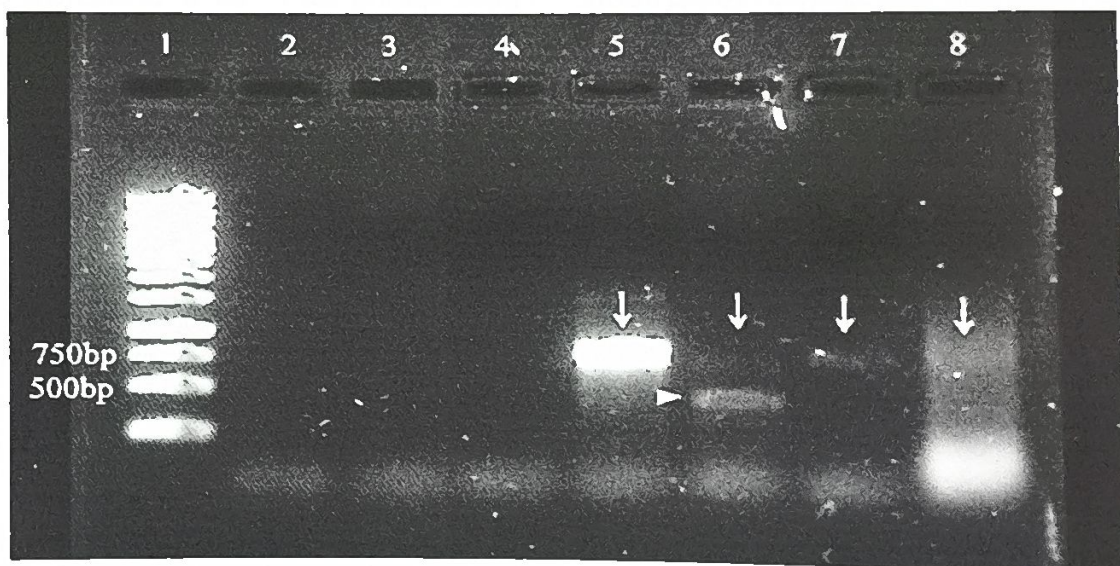
Phôi cá được sốc nhiệt 39°C trong 2 giờ lúc 2 ngày tuổi và chụp ảnh lúc 3 ngày tuổi. Ảnh chụp từ kính hiển vi đồng trụ của 8 phôi cá (đánh dấu từ 1-8) dưới ánh sáng trắng (B) và ánh sáng huỳnh quang (A) cho thấy trong 8 phôi cá này chỉ có 6 phôi phát quang CFP (phôi số 2, 4, 5, 6, 7, 8 thấy được ở cả A và B) và 2 phôi không phát quang (phôi số 1, 3 chỉ thấy được ở B, không thấy ở A); Ảnh phóng to của phôi số 7 (C) biểu hiện CFP và phôi số 1 (D) không biểu hiện CFP.

3.3. Gen chuyển *rankl* di truyền ổn định trong hệ gen *rankl:HSE:CFP*

Để khẳng định gen chuyển *rankl* có trong hệ gen của những cá phát huỳnh quang CFP chúng tôi thực hiện phản ứng PCR với mỗi thiết kế để nhân đoạn 734bp của gen chuyển *rankl* từ ADN của 3 phôi cá phát quang CFP, 1 phôi cá chị em không phát huỳnh quang CFP, 1 phôi cá chủng đại làm đối chứng âm và ADNc của cá medaka chủng đại hai tuần tuổi (lúc *rankl* đã biểu hiện) làm đối chứng dương. Để loại trừ trường hợp nhiễm ADN từ các thành phần phản ứng, chúng

tôi thực hiện thêm một phản ứng PCR không có ADN khuôn mà thay vào đó là nước.

Cặp mồi được thiết kế để nhân được một đoạn ADN có kích thước 734 bp từ ADNc của medaka mà không nhân được sản phẩm nào từ ADN hệ gen do ADN hệ gen chứa intron dài [10]. Như vậy ngoài ADNc của cá medaka ở những giai đoạn phát triển thích hợp, chỉ có ADN hệ gen của cá mang gen chuyển *rankl:HSE:CFP* cho sản phẩm PCR 734bp với cặp mồi này.



Hình 2. Kết quả điện di sản phẩm PCR với mỗi đặc hiệu cho gen chuyển *rankl*.

Các giếng điện di được đánh số từ 1-8. Giếng 1, thang chuẩn ADN 1kb với băng kích thước 500bp và 750bp được chú thích. Giếng 2, không có ADN khuôn. Giếng 3, ADN khuôn từ phôi cá chủng đại. Giếng 4, ADN khuôn từ phôi cá không phát quang CFP. Giếng 5-7, ADN khuôn từ 3 phôi cá phát quang CFP. Giếng 8, ADN khuôn là ADNc của cá chủng đại 2 tuần tuổi. Các mũi tên chỉ các băng ADN được nhân lên ở giếng 5-8 có kích thước ~734bp của sản phẩm mong đợi. Đầu mũi tên trắng chỉ băng ADN có thể là sản phẩm PCR không đặc hiệu.

Như dự đoán, kết quả điện di sản phẩm PCR (Hình 2) cho thấy không có băng nào ở các giếng số 2,3,4 của các mẫu đối chứng âm, ADN cá chủng đại, ADN khuôn cá không phát quang CFP (Hình 2). Các giếng 5-7 dùng ADN khuôn từ phôi cá biểu hiện CFP có băng PCR tương ứng với băng PCR từ ADNc ở giếng 8 (băng mờ có thể do cá 2 tuần tuổi biểu hiện *rankl* còn yếu). Như vậy, các

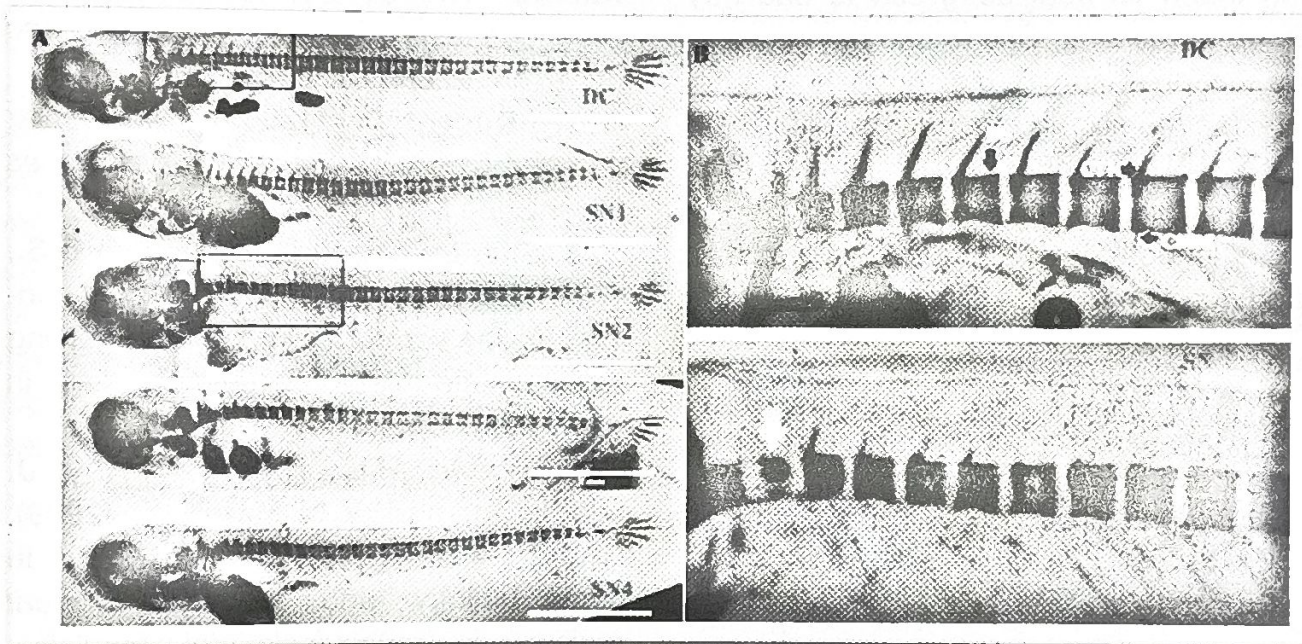
phôi cá biểu hiện CFP là những phôi cá chuyển gen *rankl*. Các băng PCR ở giếng 5-7 có độ sáng khác nhau có thể do phương pháp tách ADN đơn giản [5], lượng ADN tách được không đồng đều nên lượng ADN dùng làm khuôn cho các phản ứng PCR khác nhau. Băng không đặc hiệu ở giếng 6 có thể là do ADN khuôn không tinh sạch [5]. Qua những kết quả này chúng tôi có thể khẳng định được

gen chuyển *rankl* vẫn ổn định về mặt di truyền trong hệ gen của dòng cá *rankl:HSE:CFP*

3.4. Sự ổn định về chức năng của gen chuyển *rankl* ở dòng cá *rankl:HSE:CFP*

Sau khi khẳng định được sự ổn định di truyền của gen chuyển *rankl* trong dòng cá này, chúng tôi kiểm tra sự ổn định về chức năng của gen. Ở dòng cá *rankl:HSE:CFP*, khi gen chuyển *rankl* hoạt động thì protein Rankl được tạo ra có thể gây ra kiểu hình loãng xương của ấu trùng cá ở giai đoạn phát triển sớm của xương

[10]. Sáu mươi chín ấu trùng cá *rankl:HSE:CFP* được nuôi đến 9 ngày tuổi và chia thành 2 nhóm: nhóm đối chứng gồm 17 con được nuôi và chăm sóc bình thường không sốc nhiệt và nhóm thí nghiệm có 52 con được sốc nhiệt ở nhiệt độ 39°C trong 2 giờ. Tất cả ấu trùng cá của 2 nhóm được tiếp tục nuôi bình thường đến 16 ngày tuổi sau đó được cố định và nhuộm xương bằng thuốc nhuộm Alizarin red (Hình 3).



Hình 3. Kiểu hình loãng xương ở cá *rankl:HSE:CFP* bị sốc nhiệt

A. Hình ảnh đại diện xương nhuộm của ấu trùng cá nhóm đối chứng (ĐC) và nhóm bị sốc nhiệt (SN). B. Hình ảnh phóng to của phần cột sống được đóng khung của cá đối chứng (ĐC) và cá bị sốc nhiệt (SN2) ở A. Cá đối chứng (ĐC) có bộ xương được nhuộm với những cấu trúc xương nguyên vẹn, các đốt sống (ĐS) ở phần đầu có đủ cung thần kinh (CTK), nhú xương của cung mạch máu (CMM) và thân đốt sống (ĐC, A và B). Cá bị sốc nhiệt (SN1, SN2, SN3, SN4) có những cấu trúc xương bị phá hủy ở các mức độ khác nhau, thông thường là các cấu trúc xương cung thần kinh bị mất (mũi tên nhỏ ở SN1, SN2, SN3, SN4) hay nghiêm trọng hơn khi thân đốt sống cũng bị phá hủy (mũi tên lớn hơn ở A và mũi tên bên trái của SN ở B).

Hình ảnh chụp xương ấu trùng cá cho thấy 88% (15/17) ấu trùng cá đối chứng 16 ngày tuổi có bộ xương bao gồm các cấu trúc xương nguyên vẹn được khoáng hóa bắt màu thuốc nhuộm tím đỏ ở phần đầu, cột sống và đuôi của ấu trùng. Xương cột sống của cá đối chứng (ĐC-Hình 3A,B) không bị sốc nhiệt bao gồm các đốt sống

có đủ phần thân đốt sống (ĐS), phần cung thần kinh (CTK) và nhú của cung mạch máu (CMM). Khác với nhóm đối chứng, 71% (37/52) ấu trùng cá bị sốc nhiệt cho thấy những cấu trúc xương ở cột sống bị phá hủy với những mức độ khác nhau ở từng cá thể (SN1, SN2, SN3, SN4, Hình 3A), phổ biến nhất là mất

cấu trúc xương cung thần kinh của xương đốt sống (mũi tên nhỏ hình 3A). Ở một số ấu trùng cá bị sốc nhiệt có xương bị phá hủy mạnh (8 trong số 37 ấu trùng), cấu trúc xương ở thân một số đốt sống cũng bị phá hủy (mũi tên bên trái của SN Hình 3B). Kết quả chúng tôi thu được tương tự như kết quả do Tô Thanh Thúy và cộng sự đã thực hiện trên các cá thể của dòng cá này ở những thế hệ đầu tiên [10]. Kiểu hình loãng xương của dòng cá này khi bị sốc nhiệt là do *Rankl* ngoại sinh biểu hiện ở cá chuyển gen đã kích thích sự hình thành và hoạt động của tế bào hủy xương ngoại sinh. Các tế bào này gây phá hủy xương mạnh ở giai đoạn phát triển sớm, lúc mô xương mới đang bắt đầu hình thành [10]. Kết quả này khẳng định gen chuyển *rankl* ở dòng cá *rankl*:HSE:CFP của chúng tôi hoạt động tốt và ổn định về chức năng qua bốn thế hệ.

4. KẾT LUẬN

Với những kết quả nghiên cứu trên chúng tôi có thể rút ra những kết luận sau:

Chúng tôi đã nuôi và duy trì thành công dòng cá medaka chuyển gen *rankl*:HSE:CFP.

Gen chuyển *rankl* của dòng cá *rankl*:HSE:CFP ổn định về di truyền và chức năng; biểu hiện quá mức *rankl* tạo kiểu hình loãng xương, đảm bảo việc tiếp tục dùng dòng cá này làm mô hình bệnh loãng xương cho các nghiên cứu tiếp theo.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Akitake, C.M., Macurak M., Halpern M.E., and Goll M.G. (2011), "Transgenerational analysis of transcriptional silencing in zebrafish", *Dev Biol*, 352 (2), pp. 191-201.
2. Ho, P.T.L. and Nguyen V.T. (2011), "Sinh lý học loãng xương", *Thời sự y học*, 62, pp. 22-27.
3. Kaveh, K., Ibrahim R., Abubakar M.Z., and Ibrahim T.A. (2010), "Osteoporosis Induction in Animal Model", *Animal and Veterinary Sciences*, pp. 139-145.
4. Kinoshita, M., Murata K., Naruse K., and Tanaka M. (2009), *Medaka Biology, Management, and Experimental Protocols*, Wiley-black well, USA.
5. Meeker, N., Hutchinson S., Ho L., and Trede N. (2007), "Method for isolation of PCR-ready genomic DNA from zebrafish tissues", *BioTechniques*, pp. 610-614.
6. Naruse, K., Tanaka M., and Takeda H. (2011), *A Model for Organogenesis Human Disease and Evolution*, Springer, Japan.
7. Rucci, N. (2008), "Molecular biology of bone remodeling", *Clin Cases Miner Bone Metab*, pp. 49-56.
8. Shanthanagouda, A.H., Guo B.S., et al. (2014), "Japanese medaka: a non-mammalian vertebrate model for studying sex and age-related bone metabolism in vivo", *PLoS One*, 9.
9. Wright, H.L., H.S. McCarthy, J. Middleton, and M.J. Marshall. (2009). RANK, RANKL and osteoprotegerin in bone biology and disease. *Current reviews in musculoskeletal medicine*. 2:56-64.
10. To, T.T., Witten P.E., Renn J., Bhattacharya D., Huysseune A., and Winkler C. (2012), "Rankl-induced osteoclastogenesis leads to loss of mineralization in a medaka osteoporosis model", *Development*, 139 (1), pp. 141-150.
11. Renn J, Büttner A, To TT, Chan SJ, Winkler C (2013). A col10a1:nIGFP transgenic line displays putative osteoblast precursors at the medakanotochordal sheath prior to mineralization. *Dev. Biol.* S0012-1606(13)00321-7

SUMMARY**STABILITY OF THE TRANSGENE RANKL IN THE RANKL:HSE:CFP TRANSGENIC MEDAKA FISH USED AS A MODEL FOR OSTEOPOROSIS**

**Lai Thi Nguyet¹, Pham Thi Thanh¹, Pham Van Cuong¹,
Tran Duc Long¹, To Thanh Thuy^{1,*}**

¹Faculty of Biology, VNU University of Science

Osteoporosis is a common bone disease characterized by deteriorated bone mass and structure. Research on osteoporosis has mainly used mammalian animals as experimental models. Medaka fish (*Oryzias latipes*) has recently been used for studies on bone and bone diseases because of its excellent experimental characteristics and its remarkable similarity to human in molecular and cellular mechanisms of bone metabolism such as Rankl, a main stimulator for differentiation of bone resorbing osteoclasts. The transgenic medaka rankl:HSE:CFP fish expressing both Rankl and CFP after being heat-shocked was generated in the National University of Singapore. In this fish, induced over-expression of Rankl promotes osteoclastogenesis, leading to bone demineralization and osteoporosis-like phenotypes. This fish line was kindly provided to our laboratory at the Faculty of Biology, VNU University of Science for use as a model for osteoporosis and screening for anti-osteoporosis substances. However, the use of medaka as a model organism has been largely unknown in Vietnam. Therefore we established fish facility and procedures to maintain medaka fish in our laboratory. Moreover, we have examined and confirmed that the transgene rankl is genetically and functionally stable in the rankl:HSE:CFP fish after four generations maintained in our facility. This assures the use of the transgenic rankl:HSE:CFP medaka as a model for osteoporosis for further studies.

Keywords: medaka, transgenic medaka, transgene, osteoporosis, RANKL