

BIỂU HIỆN GEN MÃ HÓA PROTEIN HUỖNH QUANG *GFP* VÀ *DsRed* Ở CHỦNG NẤM SỢI *Aspergillus oryzae* VS1 SỬ DỤNG PHƯƠNG PHÁP CHUYỂN GEN NHỜ VI KHUẨN *Agrobacterium tumefaciens*

Hồ Ngọc Quỳnh¹, Nguyễn Thị Khuyên¹, Trần Thị Phương¹, Trần Văn Tuấn^{1,2*}

¹Phòng Genomic, Phòng thí nghiệm Trọng điểm Công nghệ Enzym và Protein, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội

²Bộ môn Vi sinh vật học, Khoa Sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội

TÓM TẮT: *Aspergillus oryzae* là loài nấm sợi, được sử dụng phổ biến trong công nghiệp sản xuất thực phẩm và đồ uống ở nhiều nước châu Á, trong đó có Việt Nam. Khai thác loài vi nấm này để sản xuất các protein tái tổ hợp đã được thực hiện ở một số phòng thí nghiệm trên thế giới. Tuy nhiên, việc chuyển gen vào *A. oryzae* vẫn chủ yếu sử dụng phương pháp thông qua tế bào trần (protoplast) với quy trình thực hiện phức tạp, chi phí thí nghiệm cao. Gần đây, nhóm nghiên cứu của chúng tôi đã phát triển thành công phương pháp chuyển gen vào *A. oryzae* nhờ vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens* sử dụng chủng *A. oryzae* AUT1-PID trợ đường uridine/uracil do Đại học Tokyo, Nhật Bản cung cấp. Để chứng minh phương pháp chuyển gen này cũng hoạt động tốt trên các chủng *A. oryzae* khác, chúng tôi đã lựa chọn chủng *A. oryzae* VS1 có nguồn gốc Việt Nam cho việc chuyển gen. Chủng VS1 sinh trưởng nhanh, không sinh độc tố aflatoxin và có khả năng tiết mạnh enzym vào môi trường nuôi cấy. Sử dụng phương pháp chuyển gen nhờ vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens* với marker trợ đường *pyrG*, kết quả cho thấy hiệu suất chuyển gen vào chủng VS1 cao hơn khoảng 100 lần so với chủng *A. oryzae* AUT1-PID có xuất xứ Nhật Bản. Với phương pháp chuyển gen nêu trên, các gen chỉ thị huỳnh quang *GFP* và *DsRed* đã được tích hợp thành công vào hệ gen của chủng *A. oryzae* VS1 và cả hai gen đều biểu hiện mạnh ở cả hệ sợi cũng như trong toàn bộ cuống mang bào tử của các thể chuyển gen.

Từ khóa: *Aspergillus oryzae*, biểu hiện gen tái tổ hợp, chuyển gen nhờ vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens*, protein huỳnh quang xanh (GFP), protein huỳnh quang đỏ (DsRed).

MỞ ĐẦU

Nấm sợi *A. oryzae* đã được thuần hóa bởi con người cách đây hơn 1000 năm. Loài nấm này đã và đang được sử dụng rộng rãi trong sản xuất thực phẩm và đồ uống ở nhiều nước châu Á như Nhật Bản, Hàn Quốc, Trung Quốc, Thái Lan và Việt Nam để lên men đậu nành, làm tương và một số đồ uống chứa rượu như sake, shochu, makgeolli và huangjiu (Bhumiratana et al., 1980; Kitamoto, 2015; La Anh, 2015). Loài nấm này có khả năng tiết lượng lớn enzym vào môi trường nuôi cấy và đã được Cục Quản lý Thực phẩm và Dược phẩm Hoa Kỳ (FDA) công nhận là an toàn (Generally Recognized As Safe, GRAS) (Machida et al., 2008).

Các phương pháp chuyển gen phổ biến nhất hiện nay dùng cho nấm sợi là chuyển gen thông qua tế bào trần (protoplast) và chuyển gen nhờ vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens*

(*Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation) (de Groot et al., 1998; Meyer et al. 2003; Michielse et al., 2005). Tuy nhiên, nghiên cứu cải biến di truyền và biểu hiện gen ở nấm sợi *Aspergillus oryzae* chủ yếu vẫn sử dụng phương pháp chuyển gen bằng protoplast (Ward, 2012; Zhu et al., 2013). Phương pháp này yêu cầu nguyên liệu cho chuyển gen là protoplast với quy trình thực hiện nghiêm ngặt và sử dụng hỗn hợp enzym có giá thành rất cao. Sản phẩm protoplast thu được phải sử dụng ngay cho chuyển gen mà không thể lưu giữ cho những lần chuyển gen tiếp theo (Michielse et al., 2005). Phương pháp chuyển gen nhờ vi khuẩn *A. tumefaciens* được áp dụng thành công đối với nấm sợi vào năm 1998 sử dụng nguyên liệu cho chuyển gen là bào tử nấm. Sau đó phương pháp này đã được áp dụng thành công trên nhiều loài nấm sợi khác nhau, trong đó có các loài thuộc chi *Aspergillus* như *A. niger*, *A.*

awamori, *A. giganteus* và *A. fumigatus* (Michielse et al., 2005; Sugui et al. 2005). Chuyển gen vào nấm thông qua vi khuẩn *A. tumefaciens* cần một hệ thống gồm plasmid trợ giúp (*vir* helper) có chứa các gen *vir* (virulence) hỗ trợ vận chuyển T-DNA (transfer DNA) vào tế bào chủ và một vector nhị thể (binary vector) mang đoạn T-DNA đã được cải biến cho mục đích chuyển gen (Michielse et al., 2005). Vector nhị thể luôn mang gen kháng kháng sinh dùng để chọn lọc vi khuẩn sau biến nạp và vùng T-DNA nằm giữa biên trái (left border, LB) và biên phải (right border, RB) chứa cấu trúc ADN cần chuyển vào tế bào nấm, cùng với marker để chọn lọc các thể chuyển gen (Hoekema et al., 1983; Park et al. 2000).

Marker dùng trong chọn lọc các thể chuyển gen ở nấm sợi gồm hai loại là gen kháng kháng sinh và các gen trợ dưỡng liên quan đến sinh tổng hợp một hoặc một số hợp chất cần cho quá trình sinh trưởng của nấm. Do nấm sợi *A. oryzae* kháng tự nhiên với nhiều loại kháng sinh dùng trong chuyển gen, nên việc sử dụng chất kháng sinh trong chọn lọc thể chuyển gen ở *A. oryzae* không hiệu quả (Suzuki et al., 2009). Do đó, sử dụng gen trợ dưỡng làm marker chọn lọc để chuyển gen vào *A. oryzae* là phương pháp thích hợp với chi phí thấp. Ở nấm sợi, gen

pyrG mã hóa orotidine 5'-monophosphate decarboxylase (OMP decarboxylase) cần cho sinh tổng hợp uridine (tiền chất của pyrimidine uracil) (Hartingsveldt et al., 1987). Các chủng đột biến hỏng gen *pyrG* sẽ không thể sinh trưởng trên môi trường tối thiểu nếu uridine và/hoặc uracil không được bổ sung. Khi gen *pyrG* được sử dụng làm marker để chuyển gen, các thể chuyển gen thành công sẽ sinh trưởng được trên môi trường tối thiểu không chứa hai hợp chất trên. Phương pháp chuyển gen vào nấm sợi *A. oryzae* sử dụng marker trợ dưỡng *pyrG* đã được nhóm nghiên cứu của chúng tôi thực hiện thành công trên chủng *A. oryzae* AUT1-PID có xuất xứ Nhật Bản (Nguyen et al., 2016). Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã chứng minh phương pháp chuyển gen sử dụng marker *pyrG* cũng hoạt động hiệu quả khi áp dụng với chủng *A. oryzae* khác, cụ thể là chủng VS1 trợ dưỡng uridine/uracil có nguồn gốc Việt Nam.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Các chủng nấm sợi và vi khuẩn dùng trong nghiên cứu này nhận được từ Bảo tàng giống chuẩn vi sinh vật (VTCC), Đại học Quốc gia Hà Nội (ĐHQGHN) và từ các bảo tàng giống chuẩn quốc tế (bảng 1).

Bảng 1. Các chủng vi sinh vật được sử dụng trong nghiên cứu này

STT	Tên chủng	Phân loại	Nguồn gốc
1	AGL1	<i>A. tumefaciens</i>	(Lazo et al. 1991)
2	RIB40	<i>A. oryzae</i>	(Machida et al. 2008)
3	VTCCF-032	<i>A. oryzae</i>	Viện Vi sinh vật học và Công nghệ sinh học, ĐHQGHN
4	VTCCF-040	<i>A. oryzae</i>	Viện Vi sinh vật học và Công nghệ sinh học, ĐHQGHN
5	VTCCF-048	<i>A. oryzae</i>	Viện Vi sinh vật học và Công nghệ sinh học, ĐHQGHN
6	VTCCF-051	<i>A. oryzae</i>	Viện Vi sinh vật học và Công nghệ sinh học, ĐHQGHN
7	VTCCF-053	<i>A. oryzae</i>	Viện Vi sinh vật học và Công nghệ sinh học, ĐHQGHN
8	VTCCF-912	<i>A. oryzae</i>	Viện Vi sinh vật học và Công nghệ sinh học, ĐHQGHN
9	VS1	<i>A. oryzae</i>	Bộ môn Vi sinh vật học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQGHN
10	VS1 Δ <i>pyrG</i>	<i>A. oryzae</i>	Phòng Genomic, Phòng thí nghiệm Trọng điểm Công nghệ Enzym và Protein
11	NRRL3357	<i>A. flavus</i>	ARS (NRRL) Culture Collection (Mỹ)

Môi PCR và các hóa chất: Các cặp môi sử dụng trong nghiên cứu gồm cặp môi ITS1/ITS4 đặc hiệu cho vùng ITS của ADN ribosome; cặp

môi AFB-F/AFB-R đặc hiệu cho trình tự nối giữa gen *aflR* và *aflJ* thuộc nhóm gen liên quan đến sinh tổng hợp aflatoxin; cặp môi *pyrG*-orf-

F/pyrG-orf-R khuếch đại gen *pyrG* của *A. oryzae*; cặp mồi GFP-F/GFP-R và DsRed-F/DsRed-R khuếch đại tương ứng gen *GFP* và *DsRed* (bảng 2). Các mồi PCR do Công ty IDT

(Singapore) tổng hợp. Các hóa chất với độ tinh khiết cao được mua từ những hãng uy tín như Thermo Scientific, Biobasic, Merck, Sigma, Biozym, Promega.

Bảng 2. Các mồi PCR được sử dụng trong nghiên cứu này

Tên mồi	Trình tự mồi (5'-3')	Sản phẩm PCR (bp)	Tham khảo
ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	595	(White et al. 1990)
ITS4	TCCTCCGCTTATTGAATTGC		
AFB-F	AAGCAAACCAAGACCAACAAG	116	(Chiba et al. 2013)
AFB-R	AACAAGTCTTTTCTGGGTTCTA		
pyrG-orf-F	ATGTCTTCCAAGTCGCAATT	899	(Nguyen et al. 2016)
pyrG-orf-R	TATTGCGCACCAACACG		
GFP-F	ATGGTGAGCAAGGGCGAG	720	(Nguyen et al. 2016)
GFP-R	TCACTTGTACAGCTCGTCCATC		
DsRed-F	AACTCGAGCACGTGCTTAAGGATATCA	730	(Nguyen et al. 2016)
DsRed-R	TGGCCTCCTCCGAGG AAGGATCCCCGCGGGAGCTCGATATCC TACAGGAACAGGTGGTGCC		

Thu nhận bào tử nấm: Các chủng nấm sợi được nuôi trên môi trường Czapek-Dox (2% sucrose; 0,2% NaNO₃; 0,1% KH₂PO₄; 0,05% MgSO₄; 0,05% KCl; 0,05% NaCl; 0,002% FeSO₄; 2% agar; pH 5,5). Riêng chủng *A. oryzae* VS1 trợ dưỡng uridine/uracil (VS1Δ*pyrG*) được nuôi trên môi trường Czapek-Dox bổ sung 0,1% uridine và 0,1% uracil. Sau 3 ngày nuôi cấy ở 30°C, nước cất vô trùng được bổ sung lên bề mặt đĩa nuôi cấy và dùng que gạt thủy tinh vô trùng gạt nhẹ để bào tử nấm rời khỏi hệ sợi và hòa vào nước. Dùng micropipet hút phần dịch và lọc qua màng Miracloth (Calbiochem, Đức). Dịch lọc được ly tâm ở tốc độ 4000 vòng/phút trong 10 phút để thu bào tử. Cặn bào tử được rửa bằng nước cất vô trùng 2 lần trước khi hòa trở lại vào nước cất vô trùng. Nồng độ bào tử được điều chỉnh đến 10⁶ bào tử/ml và dịch bào tử được bảo quản ở 4°C. Đối với chủng trợ dưỡng uridine/uracil, dịch bào tử cần kiểm tra để tránh nhiễm bằng cách nhỏ khoảng 20-50 μl dịch trên đĩa môi trường tối thiểu Czapek-Dox (CD) và ủ đĩa khoảng 1-2 ngày ở 30°C. Nếu hệ sợi nấm không xuất hiện, chứng tỏ dịch bào tử là thuần khiết và đáp ứng yêu cầu dùng cho chuyển gen.

Tách chiết ADN từ hệ sợi nấm: Quy trình tách chiết ADN tổng số (genomic DNA) được

thực hiện theo quy trình tối ưu đã được công bố gần đây của nhóm nghiên cứu (Nguyen et al., 2016). Sản phẩm ADN được điện di trên gel agarose 0,8% để kiểm tra chất lượng.

Phân biệt *A. oryzae* với *A. flavus* dựa vào sự phát quang của aflatoxin: Các chủng *A. oryzae* RIB40, *A. oryzae* VS1, *A. flavus* NRRL3357 được nuôi trên đĩa môi trường CAM (coconut agar medium). Sau 5 ngày nuôi cấy trong tối ở 28°C, đĩa được kiểm tra dưới đèn tím UVA (bước sóng 365 nm). Nếu khuẩn lạc nấm phát quang màu xanh lá cây chứng tỏ nấm sinh độc tố aflatoxin. Môi trường CAM được chuẩn bị như sau: 100 g củi dừa tươi thái nhỏ, đun sôi 15 phút trong 300 ml nước cất. Hỗn hợp được lọc qua màng Miracloth để loại bỏ bã. Phần dịch thu được bổ sung thêm 2% agar và điều chỉnh đến pH 7. Môi trường được khử trùng ở 121°C, 20 phút (Rodrigues et al., 2009).

Phân biệt *A. oryzae* với *A. flavus* bằng PCR: Cặp mồi ITS1/ITS4 được sử dụng để khuếch đại vùng ITS của ADN ribosome nhằm đánh giá chất lượng ADN chiết được từ hệ sợi của *A. oryzae* và *A. flavus*. Cặp mồi AFB-F/AFB-R đánh giá sự có mặt của nhóm gen sinh tổng hợp aflatoxin. PCR sử dụng cặp mồi này sẽ khuếch đại trình tự ADN đặc trưng và chỉ xuất

hiện ở *A. flavus* mà không xuất hiện ở *A. oryzae*. Chu trình nhiệt như sau: 94°C (3 phút); 30 chu kỳ của 94°C (30 giây), 58°C (30 giây) và 72°C (20-40 giây); 72°C (5 phút). Sản phẩm PCR được điện di kiểm tra trên gel agarose 1%. Enzym dùng cho PCR là GoTaq® Green Master Mix của hãng Promega (Hoa Kỳ).

Đánh giá khả năng sinh trưởng và tiết amylase của *A. oryzae*: 10 µl dịch bào tử của hai chủng RIB40 (Nhật Bản) và VS1 (Việt Nam) được nhỏ lên đĩa môi trường PDA để quan sát sự sinh trưởng. Khả năng tiết amylase của hai chủng *A. oryzae* được kiểm tra bằng cách nhỏ dịch bào tử lên môi trường CD + 1% tinh bột (pH 6,5). Sau 3 ngày sinh trưởng ở 30°C, vòng phân giải tinh bột xung quanh khuẩn lạc nấm được nhận biết bằng dung dịch thuốc thử lugol (Teodoro & Martins, 2000).

Đánh giá mức độ miễn cảm kháng sinh của các chủng *A. oryzae*: 10 µl dịch bào tử *A. oryzae* được nhỏ lên môi trường CD (pH 7) chứa kháng sinh (hygromycin, nourseothricin hoặc phleomycin) với các nồng độ 100 mg/l, 150 mg/l và 200 mg/l. Đĩa nuôi cấy được ủ ở 30°C trong 3 ngày để quan sát sự sinh trưởng của nấm.

Chuyển gen vào chủng *A. oryzae* VS1Δ*pyrG*: Quy trình chuyển gen vào chủng *A. oryzae* VS1 trợ dưỡng uridine/uracil sử dụng marker *pyrG* được thực hiện theo quy trình mà nhóm nghiên cứu đã thiết lập gần đây (Nguyen et al., 2016). Cụ thể như sau: vector nhị thể pEX1 hoặc pEX2 được biến nạp vào vi khuẩn *A. tumefaciens* AGL1 bằng phương pháp xung điện sử dụng thiết bị Gene Pulser Xcell™ Electroporation System (Bio-Rad, Mỹ). Các khuẩn lạc AGL1 mang vector mong muốn được nuôi trong môi trường LB lỏng khoảng 16-18 giờ, ở 28°C với tốc độ lắc 200 vòng/phút. Hút 1 ml dịch nuôi vi khuẩn bổ sung vào ống falcon có sẵn 9 ml môi trường cảm ứng IM lỏng chứa 200 µM acetosyringone (AS). Môi trường IM gồm 8 ml MES 1M; 80 ml MM salts 2,5x (2,05 g K₂HPO₄; 1,45 g KH₂PO₄; 0,15 g NaCl; 0,5 g MgSO₄.7H₂O; 0,1g CaCl₂.6H₂O; 0,5 g (NH₄)₂SO₄; 0,0025 g FeSO₄.7H₂O, 1000 ml H₂O cất; 0,36 g glucose; 1 ml glycerol và 200 ml nước cất. Ống falcon chứa dịch vi khuẩn pha

loãng được tiếp tục nuôi trên máy lắc cho đến khi OD₆₀₀ đạt 0,6-0,8 (khoảng 5-6 giờ). Hỗn hợp gồm 100 µl bào tử nồng độ 10⁶ bào tử/ml và 100 µl dịch vi khuẩn được trải đều trên màng giấy lọc loại mỏng (Sartorius, Đức) đặt sẵn trên đĩa môi trường cảm ứng IM+AS. Sau 60 giờ đồng nuôi cấy ở 22°C, màng được chuyển sang môi trường tối thiểu Czapek-Dox có bổ sung kháng sinh cefotaxime (200 mg/l) để loại bỏ vi khuẩn *A. tumefaciens* tạo khoảng trống cho các thể chuyển gen sinh trưởng. Đĩa được ủ ở nhiệt độ 30°C và sau 5-7 ngày sẽ thu được các thể chuyển gen nguyên dưỡng.

Xác nhận các thể chuyển gen: Các thể chuyển gen được thuần khiết bằng phương pháp phân lập bào tử đơn và được sử dụng để nuôi cấy cho tách chiết ADN hệ gen. Sự có mặt của *GFP* hoặc *DsRed* trong hệ gen vi nấm được kiểm tra bằng PCR sử dụng cặp mồi đặc hiệu cho từng gen là GFP-F/GFP-R hoặc DsRed-F/DsRed-R và cặp mồi đặc hiệu cho marker *pyrG*. Chu trình nhiệt sử dụng cho cả ba cặp mồi: 94°C (5 phút); 35 chu kỳ của 94°C (30 giây), 58°C (30 giây) và 72°C (1 phút); 72°C (10 phút). Sự biểu hiện của gen *GFP* hoặc *DsRed* ở các thể chuyển gen được xác nhận trực tiếp dưới kính hiển vi huỳnh quang Axioplan (Carl Zeiss, Đức) sử dụng phương pháp nuôi trên tiêu bản (slide culture).

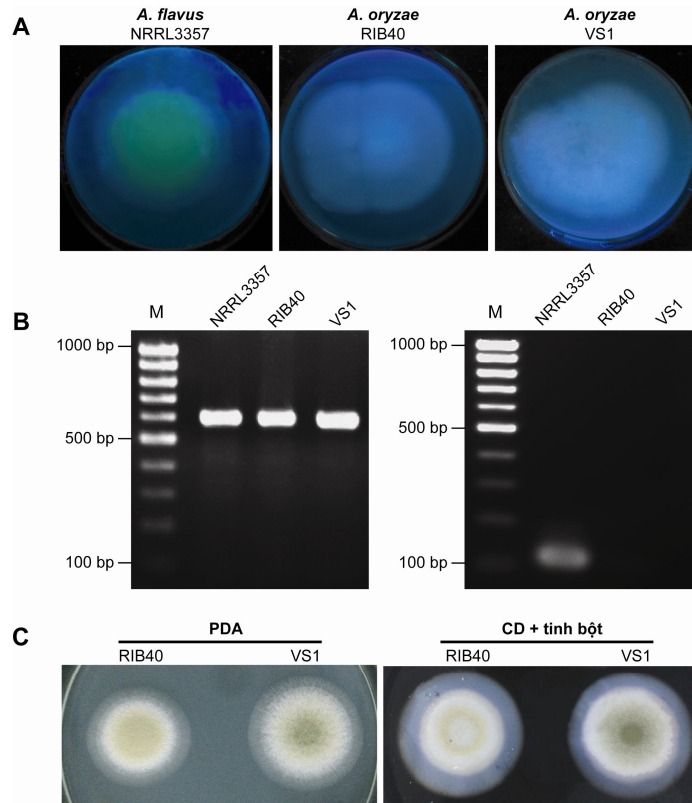
KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Đặc điểm sinh học của chủng *A. oryzae* VS1

Nấm sợi *A. oryzae* gần như giống hệt với *A. flavus* sinh độc tố aflatoxin về hình thái và ADN hệ gen có độ mức độ tương đồng lên đến 99,5% (Machida et al., 2008). Để xác nhận chủng *A. oryzae* VS1 phân lập tại Việt Nam là an toàn và không sinh độc tố aflatoxin, chúng tôi sử dụng hai chủng chuẩn *A. oryzae* RIB40 và *A. flavus* NRRL3357 làm đối chứng. Hai chủng *A. oryzae* (RIB40, VS1) và chủng *A. flavus* (NRRL3357) được nuôi trên môi trường CAM (môi trường thạch dừa) khoảng 5-7 ngày, trong tối ở nhiệt độ 28°C. Sự phát quang màu lục của độc tố aflatoxin trên môi trường CAM có thể quan sát được trực tiếp dưới đèn tím UVA ở bước sóng 365 nm (Rodrigues et al., 2009; Sudini et al., 2015). Kết quả thí nghiệm cho thấy chủng *A.*

flavus NRRL3357 sinh độc tố aflatoxin có hệ sợi phát quang màu lục, trong khi đó ở cả chủng *A. oryzae* VS1 và chủng chuẩn *A. oryzae* RIB40

đều không thấy hiện tượng này (hình 1A). Do đó, có thể sơ bộ kết luận chủng VS1 không sinh độc tố aflatoxin.



Hình 1. Đánh giá mức độ an toàn, khả năng sinh trưởng và tiết enzyme của chủng *A. oryzae* VS1. **A.** Sinh độc tố aflatoxin ở *A. flavus* và *A. oryzae* trên môi trường CAM. **B.** Phân biệt *A. oryzae* với *A. flavus* bằng PCR sử dụng cặp mồi ITS1/ITS4 (trái) và AFB-F/AFB-R (phải). **C.** Khả năng sinh trưởng và tiết amylase của chủng *A. oryzae* VS1 so với chủng RIB40. Các thí nghiệm đều được lặp lại 3 lần độc lập.

Để đảm bảo chắc chắn chủng *A. oryzae* VS1 không sinh độc tố aflatoxin, cặp mồi AFB-F/AFB-R đặc hiệu cho trình tự nối giữa gen *aflR* và *aflJ* liên quan đến sinh tổng hợp aflatoxin được sử dụng. Cặp mồi này có thể sử dụng để phân biệt đặc hiệu các chủng *A. flavus* sinh độc tố aflatoxin và các chủng *A. oryzae* bằng kỹ thuật PCR (Chiba et al., 2013). Cặp mồi đa năng ITS1/ITS4 được sử dụng để đánh giá chất lượng ADN tổng số dùng làm khuôn cho PCR. Cặp mồi ITS1/ITS4 có khả năng khuếch đại vùng ITS của ADN ribosome ở hầu hết các loài nấm (White et al., 1990). Với cặp mồi này, sản phẩm PCR kích thước 595 bp xuất

hiện ở cả hai chủng *A. oryzae* và chủng *A. flavus* chứng tỏ chất lượng ADN đảm bảo cho các phân tích PCR. Với cặp mồi AFB-F/AFB-R, sản phẩm PCR có kích thước 116 bp chỉ xuất hiện ở *A. flavus* mà không xuất hiện ở *A. oryzae* (hình 1B). Dựa vào khả năng sinh aflatoxin trên đĩa môi trường CAM và kết quả PCR đặc hiệu, chúng tôi kết luận chủng *A. oryzae* VS1 của Việt Nam an toàn và phù hợp cho các nghiên cứu biểu hiện gen tái tổ hợp. Chủng *A. oryzae* VS1 được phân lập từ vùng làm tương truyền thống ở miền Bắc Việt Nam (bảng 1). Trên môi trường PDA, chủng này sinh trưởng nhanh hơn chủng chuẩn quốc tế *A. oryzae* RIB40 với

đường kính khuẩn lạc tương ứng là $3,5 \pm 0,1$ cm so với $3 \pm 0,08$ cm sau 3 ngày nuôi ở nhiệt độ 30°C . Cả hai chủng đều cho thấy khả năng sinh enzyme phân giải tinh bột khá tốt (hình 1C). Khả năng tiết mạnh amylase để phân giải tinh bột ở *A. oryzae* cũng đã được báo cáo trong các nghiên cứu trước đây (te Biesebeke et al., 2005; Zambare, 2010). Việc sử dụng chủng *A. oryzae* với khả năng tiết mạnh enzyme vào môi trường nuôi cấy rất có ích cho các nghiên cứu biểu hiện protein/enzyme tái tổ hợp, bởi vì quá trình tinh chế sản phẩm sẽ thuận lợi hơn, chi phí thí nghiệm thấp và có tiềm năng áp dụng vào điều kiện sản xuất thực tiễn.

Đánh giá khả năng miễn cảm kháng sinh của chủng *A. oryzae* VS1

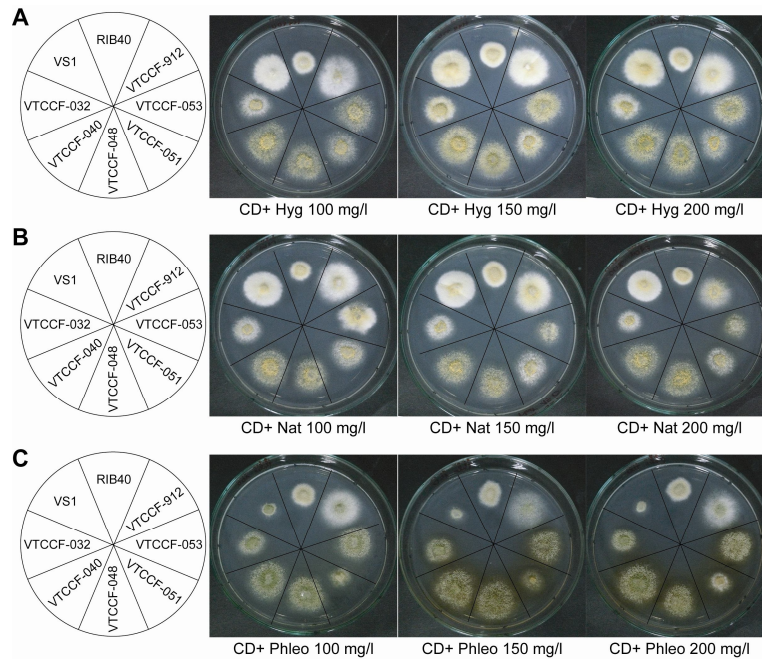
Để đánh giá một cách tổng quát về khả năng miễn cảm kháng sinh của nấm sợi *A. oryzae*, chủng VS1 được nuôi cấy cùng với một số chủng *A. oryzae* khác trên môi trường có bổ sung kháng sinh hygromycin (Hyg), nourseothricin (Nat) hoặc phleomycin (Phleo) với các nồng độ khác nhau. Cả ba kháng sinh này đều là những kháng sinh được sử dụng phổ biến trong nghiên cứu chuyển gen (Punt et al., 1992; De Groot et al., 1998; Kochupurakkal et al., 2013; Mora-Lugo et al., 2014; Wang et al., 2014). Sau 3 ngày nuôi ở nhiệt độ 30°C , 8 chủng *A. oryzae* được kiểm tra đều kháng lại cả ba loại kháng sinh ở nồng độ 100, 150 và 200 mg/l (hình 2). Tất cả các chủng *A. oryzae* đều kháng với kháng sinh hygromycin (hình 2A) và chỉ bị ức chế một phần bởi nourseothricin hoặc phleomycin (hình 2B, C). Đây là những kháng sinh có giá thành rất cao và nồng độ dùng cho chuyển gen ở vi nấm thông thường khoảng 50-100 mg/l. Như vậy, cả ba loại kháng sinh trên đều không thể sử dụng cho chuyển gen ở *A. oryzae*, thậm chí ở nồng độ cao 200 mg/l.

Biểu hiện gen mã hóa protein huỳnh quang GFP và DsRed ở *A. oryzae* VS1

Do *A. oryzae* VS1 kháng tự nhiên với các kháng sinh thông dụng dùng trong chuyển gen nên giải pháp duy nhất để chuyển gen vào chủng này là sử dụng marker trợ dưỡng để chọn lọc các thể chuyển gen. Nhóm nghiên cứu của chúng tôi đã loại bỏ thành công gen *pyrG* khỏi hệ gen của chủng VS1 để tạo ra chủng trợ

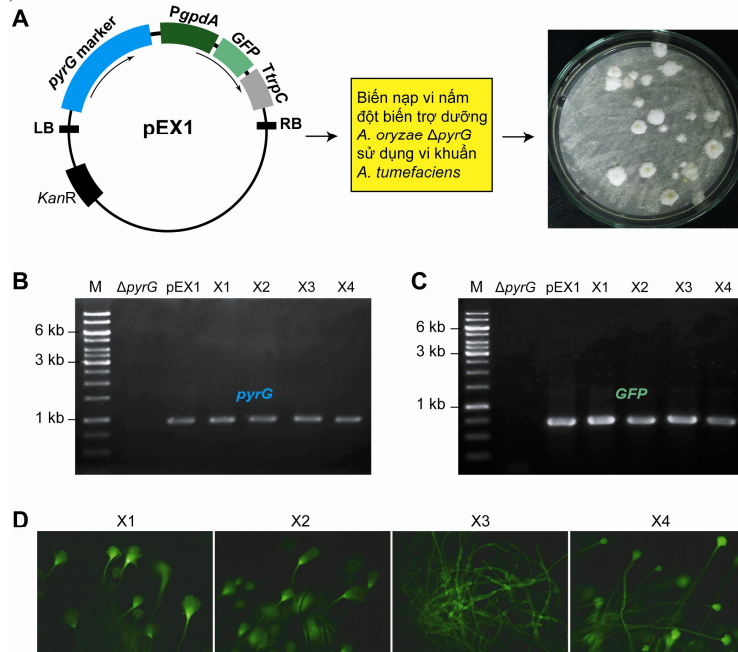
dưỡng uridine/uracil. Kết quả về xóa gen *pyrG* sẽ được chúng tôi báo cáo trong một công trình khác. Chủng đột biến xóa gen *pyrG* (*VS1 Δ pyrG*) mất khả năng tự tổng hợp uridine và uracil nên không thể sinh trưởng trên môi trường tối thiểu Czapek-Dox. Hai vector nhị thể mang marker *pyrG* là pEX1 cho biểu hiện protein huỳnh quang xanh (GFP) và pEX2 cho biểu hiện protein huỳnh quang đỏ (DsRed) được sử dụng để chuyển gen vào chủng *VS1 Δ pyrG* theo quy trình đã thực hiện thành công trên chủng trợ dưỡng AUT1-PID (Nguyen et al., 2016). Hiệu quả chuyển gen ở chủng *A. oryzae* *VS1 Δ pyrG* trung bình đạt 15-20 thể chuyển gen/đĩa, tương ứng với 150-200 thể chuyển gen/ 10^6 bào tử (hình 3A, 4A). Cho đến nay, phương pháp chuyển gen sử dụng vi khuẩn *A. tumefaciens* sử dụng marker trợ dưỡng *pyrG* mới chỉ áp dụng thành công trên *Trichoderma reesei* với hiệu suất trung bình là 10-20 thể chuyển gen/ 10^5 bào tử và trên *Aspergillus aculeatus* với 100-200 thể chuyển gen/ 10^7 bào tử (Kunitake et al., 2011; Zhong et al., 2011). Như vậy, chuyển gen vào *A. oryzae* VS1 nhờ vi khuẩn *A. tumefaciens* đạt hiệu suất tương đối cao. Kết quả chuyển gen của chúng tôi cũng cho thấy, hiệu suất chuyển gen vào chủng VS1 trợ dưỡng có nguồn gốc Việt Nam cao hơn khoảng 100 lần so với chuyển gen vào chủng AUT1-PID xuất xứ Nhật Bản (18-20 thể chuyển gen/ 10^7 bào tử) (Nguyen et al., 2016).

Việc chuyển thành công gen *GFP* vào chủng VS1 trợ dưỡng được xác nhận bằng PCR với các cặp mồi đặc hiệu là *pyrG*-orf-F/*pyrG*-orf-R và *GFP*-F/*GFP*-R (bảng 2). Kết quả kiểm tra hệ gen của 4 thể chuyển gen ngẫu nhiên (X1- X4) đều cho thấy xuất hiện các băng ADN có kích thước tương ứng với gen *pyrG* (899 bp) và *GFP* (720 bp) (hình 3B, C). Điều này đã chứng minh gen *pyrG* và *GFP* đã được tích hợp vào hệ gen của vi nấm. Bên cạnh việc xác nhận bằng PCR, sự biểu hiện của gene *GFP* cũng được kiểm tra trực tiếp dưới kính hiển vi huỳnh quang. Hệ sợi nấm và cuống sinh bào tử của cả 4 thể chuyển gen đều phát tín hiệu huỳnh quang xanh GFP khá tốt (hình 3D). Từ các kết quả thu được, chúng tôi kết luận gen *GFP* đã được biểu hiện thành công ở chủng *A. oryzae* VS1.



Hình 2. Kiểm tra sự mẫn cảm với kháng sinh của các chủng *A. oryzae*

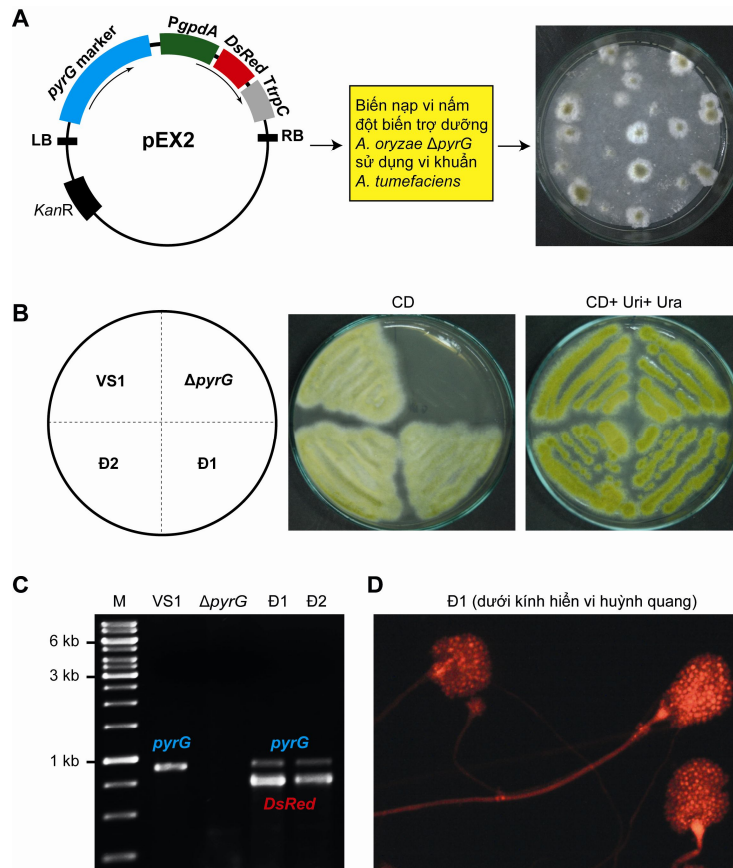
A. Sinh trưởng của các chủng trên môi trường CD bổ sung hygromycin (Hyg). B. Sinh trưởng của các chủng trên môi trường CD bổ sung nourseothricin (Nat). C. Sinh trưởng của các chủng trên môi trường CD bổ sung phleomycin (Phleo).



Hình 3. Biểu hiện protein huỳnh quang xanh GFP ở chủng *A. oryzae* VS1 trợ dưỡng uridine/uracil. A. Chuyển vector nhị thể pEX1 chứa marker *pyrG* và gen chỉ thị *GFP* vào chủng nấm *A. oryzae* VS1 Δ *pyrG* sử dụng vi khuẩn *A. tumefaciens*. B. Xác nhận thể chuyển gen với cặp môi *pyrG*-orf-F/*pyrG*-orf-R. C. Xác nhận thể chuyển gen với cặp môi *GFP*-F/*GFP*-R. D. Hình thái sợi nấm và cuống sinh bào tử của các thể chuyển gen khi quan sát dưới kính hiển vi huỳnh quang.

Kết quả tương tự cũng nhận được khi thực hiện việc chuyển gen *DsRed* vào chủng *A. oryzae* VS1 trợ dưỡng uridine/uracil. Các thể chuyển gen nhận được marker *pyrG* đã phục hồi khả năng tổng hợp uridine/uracil và sinh trưởng được trên môi trường tối thiểu Czapek-Dox (CD) (hình 4A, B). Sau 3 ngày nuôi ở 30°C, hai chủng chuyển gen được chọn ngẫu nhiên (Đ1, Đ2) thể hiện khả năng sinh trưởng bình thường trên môi trường tối thiểu CD với hình thái và màu sắc tương tự như chủng tự nhiên VS1 (hình 4B). Các thể chuyển gen sinh trưởng được trên môi trường tối thiểu mà không cần bổ sung uridine/uracil đồng nghĩa với việc chức năng gen *pyrG* ở các chủng này đã được phục hồi.

Các thể chuyển gen *DsRed* cũng được xác nhận bằng PCR sử dụng cặp mồi *pyrG*-orf-F/*pyrG*-orf-R và *DsRed*-F/*DsRed*-R. Sản phẩm PCR được trộn cùng nhau và điện di trên gel agarose 0,8%. Kết quả cho thấy cả chủng Đ1 và Đ2 đều xuất hiện 2 băng ADN tương ứng với gen *pyrG* (899 bp) và *DsRed* (730 bp) (hình 4C). Khi quan sát dưới kính hiển vi huỳnh quang, sự biểu hiện của gen *DsRed* ở chủng chuyển gen đại diện (chủng Đ1) rất mạnh với toàn bộ hệ sợi và cuống mạng bào tử đều có màu đỏ thẫm (hình 4D). Từ các kết quả thu được, chúng tôi kết luận gen *DsRed* đã được biểu hiện thành công ở chủng *A. oryzae* VS1.



Hình 4. Biểu hiện gen huỳnh quang *DsRed* ở chủng *A. oryzae* VS1 trợ dưỡng uridine/uracil

A. Chuyển vector pEX1 chứa marker *pyrG* và gen huỳnh quang *DsRed* vào chủng *A. oryzae* VS1 Δ *pyrG* sử dụng vi khuẩn *A. tumefaciens*. B. Sinh trưởng của chủng *A. oryzae* VS1 tự nhiên, chủng trợ dưỡng VS1 Δ *pyrG* và 2 chủng chuyển gen (Đ1, Đ2) trên môi trường CD và CD + 0,1% uridine + 0,1% uracil. C. Xác nhận thể chuyển gen bằng PCR sử dụng cặp mồi *pyrG*-orf-F/*pyrG*-orf-R và *DsRed*-F/*DsRed*-R với chủng tự nhiên VS1 và chủng trợ dưỡng VS1 Δ *pyrG* làm đối chứng. D. Biểu hiện của gen huỳnh quang đỏ *DsRed* ở chủng chuyển gen đại diện (chủng Đ1) dưới kính hiển vi huỳnh quang.

Cả hai vector nhị thể (pEX1, pEX2) dùng cho chuyển gen vào *A. oryzae* có cấu trúc tương tự nhau và sự biểu hiện của gen huỳnh quang *GFP* cũng như *DsRed* được điều hòa bởi cùng promoter *gpdA* có nguồn gốc từ *A. nidulans* (Nguyen et al., 2016). Do đó, hiệu quả chuyển gen và mức độ biểu hiện của hai gen huỳnh quang ở *A. oryzae* tương đối giống nhau (hình 3, 4). Với các kết quả thu được trong nghiên cứu này, chúng tôi khẳng định quy trình chuyển gen vào nấm sợi *A. oryzae* nhờ vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens* sử dụng marker *pyrG* có thể áp dụng với các chủng *A. oryzae* trợ dưỡng uridine/uracil khác nhau. Đặc biệt, việc chuyển gen thành công vào chủng *A. oryzae* VS1 có nguồn gốc Việt Nam sẽ giúp chủ động về chủng giống phục vụ cho các nghiên cứu biểu hiện gen tái tổ hợp ở trong nước mà không phụ thuộc vào nguồn cung cấp giống từ nước ngoài.

KẾT LUẬN

Trong nghiên cứu này chúng tôi đã lựa chọn được chủng *A. oryzae* VS1 có nguồn gốc Việt Nam với đặc tính sinh trưởng nhanh, an toàn và tiết enzym ngoại bào mạnh để phục vụ cho nghiên cứu chuyển gen. Sử dụng phương pháp chuyển gen vào *A. oryzae* nhờ vi khuẩn *A. tumefaciens* sử dụng marker trợ dưỡng *pyrG*, hai gen chỉ thị huỳnh quang *GFP* và *DsRed* đã được biểu hiện thành công ở chủng VS1. Chuyển gen vào chủng *A. oryzae* VS1 theo phương pháp nêu trên cũng đạt được hiệu quả cao hơn khoảng 100 lần so với chủng AUT1-PID có xuất xứ Nhật Bản đã công bố trước đây.

Lời cảm ơn: Công trình được hỗ trợ về kinh phí từ đề tài cấp Đại học Quốc gia Hà Nội, mã số KLEPT.14.01. Các tác giả cũng xin cảm ơn Viện Vi sinh vật học và Công nghệ Sinh học, Đại học Quốc gia Hà Nội đã cung cấp một số chủng *Aspergillus oryzae* dùng trong nghiên cứu này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Bhumiratana A., Flegel T., Glinsukon T., Somporn W., 1980. Isolation and analysis of molds from soy sauce koji in Thailand. *Appl. Environ. Microbiol.*, 39(2): 430-435.

- Chiba T., Takahashi Y., Sadamasu K., Nakama A., Kai A., 2013. Discrimination of *Aspergillus flavus* group fungi using phylogenetic tree analysis and multiplex PCR. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi*, 55(3): 135-141.
- de Groot M.J., Bundock P., Hooykaas P., Beijersbergen A., 1998. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of filamentous fungi. *Nat. Biotechnol.*, 16(9): 839-842
- Hartingsveldt W., Mattern I. E., Zeijl C. M., Pouwels P.H., Hondel C.A., 1987. Development of a homologous transformation system for *Aspergillus niger* based on the *pyrG* gene. *Mol. Gen. Genet.*, 206(1): 71-75.
- Hoekema A., Hirsch P., Hooykaas P., Schilperoort R., 1983. A binary plant vector strategy based on separation of *vir*-and T-region of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti-plasmid. *Nature*, 303: 179-180.
- Kitamoto K., 2015. Cell biology of the Koji mold *Aspergillus oryzae*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 79(6): 863-869.
- Kochupurakkal B. S., Iglehart J. D., 2013. Nourseothricin N-acetyl transferase: a positive selection marker for mammalian cells. *PLoS One*, 8(7): e68509.
- Kunitake E., Tani S., Sumitani J.-I., Kawaguchi T., 2011. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Aspergillus aculeatus* for insertional mutagenesis. *AMB Express*, 1(1): 46.
- La Anh N., 2015. Health-promoting microbes in traditional Vietnamese fermented foods: A review. *Food Science and Human Wellness*, 4(4): 147-161.
- Lazo G. R., Stein P. A., Ludwig R. A., 1991. A DNA transformation-competent *Arabidopsis* genomic library in *Agrobacterium*. *Nat. Biotechnol.*, 9(10): 963-967.
- Machida M., Yamada O., Gomi K., 2008. Genomics of *Aspergillus oryzae*: learning from the history of Koji mold and

- exploration of its future. *DNA Res.*, 15(4): 173-183.
- Meyer V., Mueller D., Strowig T., Stahl U., 2003. Comparison of different transformation methods for *Aspergillus giganteus*. *Curr. Genet.*, 43(5): 371-377.
- Michielse C. B., Hooykaas P. J., van den Hondel C.A., Ram A.F., 2005. *Agrobacterium*-mediated transformation as a tool for functional genomics in fungi. *Curr. Genet.*, 48(1): 1-17.
- Mora-Lugo R., Zimmermann J., Rizk A. M., Fernandez-Lahore M., 2014. Development of a transformation system for *Aspergillus sojae* based on the *Agrobacterium tumefaciens*-mediated approach. *BMC Microbiol.*, 14(1): 247.
- Nguyen K. T., Ho Q. N., Pham T. H., Phan T. N., Tran V. T., 2016. The construction and use of versatile binary vectors carrying *pyrG* auxotrophic marker and fluorescent reporter genes for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Aspergillus oryzae*. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 32(12): 204.
- Park S., Lee B.-M., Salas M., Srivatanakul M., Smith R., 2000. Shorter T-DNA or additional virulence genes improve *Agrobacterium*-mediated transformation. *Theor. Appl. Genet.*, 101(7): 1015-1020.
- Punt P. J., van den Hondel C. A., 1992. Transformation of filamentous fungi based on hygromycin b and phleomycin resistance markers. *Methods Enzymol.*, 216: 447-457.
- Rodrigues P., Venâncio A., Kozakiewicz Z., Lima N., 2009. A polyphasic approach to the identification of aflatoxigenic and non-aflatoxigenic strains of *Aspergillus* section *Flavi* isolated from Portuguese almonds. *Int. J. Food Microbiol.*, 129(2): 187-193.
- Sudini H., Srilakshmi P., Vijay Krishna Kumar K., Njoroge S. M., Osiru M., Seetha A., Waliyar F., 2015. Detection of aflatoxigenic *Aspergillus* strains by cultural and molecular methods: A critical review. *Afr. J. Microbiol. Res.*, 9(8): 484-491.
- Sugui J. A., Chang Y. C., Kwon-Chung K., 2005 *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Aspergillus fumigatus*: an efficient tool for insertional mutagenesis and targeted gene disruption. *Appl. Environ. Microbiol.*, 71(4): 1798-1802.
- Suzuki S., Tada S., Fukuoka M., Taketani H., Tsukakoshi Y., Matsushita M., Oda K., Kusumoto K.-I., Kashiwagi Y., Sugiyama M., 2009. A novel transformation system using a bleomycin resistance marker with chemosensitizers for *Aspergillus oryzae*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 383(1): 42-47.
- te Biesebeke R., Record E., Van Biezen N., Heerikhuisen M., Franken A., Punt P., Van Den Hondel C., 2005. Branching mutants of *Aspergillus oryzae* with improved amylase and protease production on solid substrates. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 69(1): 44-50.
- Teodoro C. E. d. S., Martins M. L. L., 2000. Culture conditions for the production of thermostable amylase by *Bacillus* sp. *Braz. J. Microbiol.*, 31(4): 298-302.
- Wang D., He D., Li G., Gao S., Lv H., Shan Q., Wang L., 2014. An efficient tool for random insertional mutagenesis: *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of the filamentous fungus *Aspergillus terreus*. *J. Microbiol. Methods*, 98: 114-118.
- Ward O. P., 2012. Production of recombinant proteins by filamentous fungi. *Biotechnol. Adv.*, 30(5): 1119-1139.
- White T. J., Bruns T., Lee S., Taylor J., 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR protocols: a guide to methods and applications* 18(1): 315-322.
- Zambare V., 2010. Solid state fermentation of *Aspergillus oryzae* for glucoamylase production on agro residues. *Int. J. Life Sci.*, 4: 16-25.
- Zhong Y., Yu H., Wang X., Lu Y., Wang T., 2011. Towards a novel efficient T-DNA-based mutagenesis and screening system using green fluorescent protein as a vital reporter in the industrially important fungus *Trichoderma reesei*. *Mol. Biol. Rep.*, 38(6): 4145-4151.

Zhu L., Maruyama J.-I., Kitamoto K., 2013. Further enhanced production of heterologous proteins by double-gene disruption ($\Delta AosedD \Delta Aovps10$) in a hyper-

producing mutant of *Aspergillus oryzae*. Appl. Microbiol. Biotechnol., 97(14): 6347-6357.

EXPRESSION OF THE FLUORESCENT REPORTER GENES *GFP* AND *DsRed* in *Aspergillus oryzae* VS1 STRAIN USING *Agrobacterium tumefaciens*-MEDIATED TRANSFORMATION

Ho Ngoc Quynh¹, Nguyen Thi Khuyen¹, Tran Thi Phuong¹, Tran Van Tuan^{1,2*}

¹Genomics Unit, National Key Laboratory of Enzyme and Protein Technology, VNU University of Science, Vietnam National University Hanoi

²Department of Microbiology, Faculty of Biology, VNU University of Science, Vietnam National University Hanoi

SUMMARY

Aspergillus oryzae is a filamentous fungus commonly used in industrial production of food and beverages in Vietnam and other Asian countries. Due to its safety and high secretion ability, this fungus has been widely exploited for production of recombinant proteins and enzymes. However, *A. oryzae* transformation is still mainly performed via fungal protoplasts using a complicated and costly procedure. Recently, using the auxotrophic AUT1-PID strain provided by the University of Tokyo, Japan, our research group has successfully developed an optimized procedure of *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation (ATMT) for *A. oryzae*. In this study, we have confirmed that this ATMT method with the *pyrG* marker is working well for another *A. oryzae* strain (VS1) isolated in Vietnam. This strain is non-aflatoxigenic, fast-growing and represents a good capacity of extracellular enzyme secretion. Our results indicated that the transformation efficiency of the auxotrophic VS1 strain is approximately 100 times higher than that of the AUT1-PID strain originated from Japan. With this transformation method, the fluorescent reporter genes *GFP* and *DsRed* have been successfully integrated into the genome of the VS1 strain resulting in their strong expression in the fungal mycelia and conidiophores.

Keywords: *Aspergillus oryzae*, *Agrobacterium*-mediated transformation, recombinant gene expression, green fluorescent protein (GFP), red fluorescent protein (DsRed)

Citation: Ho Ngoc Quynh, Nguyen Thi Khuyen, Tran Thi Phuong, Tran Van Tuan, 2017. Expression of the fluorescent reporter genes *gfp* and *dsred* in *Aspergillus oryzae* vs1 strain using *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation. Tap chi Sinh hoc, 39(2): 199-209. DOI: 10.15625/0866-7160/v39n2.8955.

*Corresponding author: tuantran@vnu.edu.vn

Received 11 December 2016, accepted 20 March 2017