

ĐẠI HỌC QUỐC GIA HÀ NỘI
TRƯỜNG ĐẠI HỌC KHOA HỌC TỰ NHIÊN

Thái Hạnh Dung

**NGHIÊN CỨU PHÁT TRIỂN HỆ THỐNG CHUYỂN GEN
MỚI PHỤC VỤ CẢI BIẾN DI TRUYỀN MỘT SỐ LOÀI NẤM
SỢI THUỘC CHI *Aspergillus***

Chuyên ngành: Vi sinh vật học

Mã số: 9420101.07

TÓM TẮT LUẬN ÁN TIẾN SĨ SINH HỌC

Hà Nội – 2023

Công trình được hoàn thành tại:

Trường Đại học Khoa học Tự nhiên – Đại học Quốc gia Hà Nội

Người hướng dẫn khoa học: 1. PGS.TS. Trần Văn Tuấn
2. PGS.TS. Nguyễn Quang Huy

Phản biện: PGS.TS. Tô Kim Anh – Đại học Bách khoa Hà Nội

Phản biện: PGS.TS. Đoàn Văn Thược – Trường Đại học Sư phạm Hà Nội

Phản biện: PGS.TS. Phí Quyết Tiến – Viện Công nghệ Sinh học – Viện HLKH&CNVN

Luận án sẽ được bảo vệ trước Hội đồng đánh giá luận án tiến sĩ họp tại Trường Đại học Khoa học Tự nhiên – ĐHQGHN vào hồi giờ ngày tháng năm 2023.

Có thể tìm hiểu luận án tại:

- Thư viện Quốc gia Việt Nam;
- Trung tâm Thư viện và Tri thức số - Đại học Quốc gia Hà Nội

MỞ ĐẦU

Nấm sợi *Aspergillus oryzae* và *Aspergillus niger* được chứng nhận là an toàn đối với con người bởi Cục quản lý Thực phẩm và Dược phẩm Hoa Kỳ (FDA). Hai loài nấm này được sử dụng phổ biến trong công nghiệp sản xuất enzyme và axit hữu cơ. Gần đây, *A. oryzae* và *A. niger* được đánh giá là nhà máy tế bào tiềm năng để sản xuất các sản phẩm trao đổi chất có hoạt tính sinh học dùng trong lĩnh vực y-dược. Tuy nhiên, khả năng sinh tổng hợp và tiết sản phẩm của các chủng phân lập từ tự nhiên thường thấp, khó đáp ứng được nhu cầu sản xuất ở quy mô công nghiệp. Việc cải biến các chủng tự nhiên bằng kỹ thuật di truyền có thể giúp tạo ra các chủng đột biến có năng lực sinh tổng hợp các sản phẩm với hiệu suất cao. Một số gen liên quan đến sinh tổng hợp protease, điều hòa trao đổi chất, kiểm soát hình thái tế bào và tiết sản phẩm cần được hiệu chỉnh để tạo ra các chủng nấm có đặc tính mới, phù hợp cho biểu hiện enzyme/protein tái tổ hợp. Mục đích của luận án là nhằm tạo ra hệ thống chuyển gen mới ở *A. oryzae* và *A. niger* mà không sử dụng gen kháng kháng sinh. Hệ thống này sẽ giúp cải biến các chủng nấm tự nhiên để tạo ra các chủng nấm tái tổ hợp có năng suất cao và an toàn cho sản xuất sản phẩm.

1. Tính cấp thiết của đề tài

Chi *Aspergillus* gồm hơn 180 loài đã được công nhận chính thức, hầu hết trong số đó có khả năng phân giải polysaccharide thực vật. Nhiều loài trong chi nấm này có khả năng tiết một lượng lớn các enzyme thủy phân vào môi trường nuôi cấy; do đó, chúng được coi là các nhà máy tế bào quan trọng để sản xuất enzyme tái tổ hợp cùng nguồn và khác nguồn ở quy mô công nghiệp. Ngoài khả năng tiết enzyme vượt trội, nấm sợi *Aspergillus* còn sinh trưởng nhanh, dễ nuôi cấy với chi phí thấp. Đặc biệt, *A. oryzae* và *A. niger* được xem là vật

chủ tiềm năng cao cho sản xuất các sản phẩm tái tổ hợp phục vụ phát triển công nghiệp sinh học.

Tuy nhiên, phần lớn các nghiên cứu cải biến di truyền ở nấm sợi *A. oryzae* và *A. niger* vẫn sử dụng phương pháp chuyển gen thông qua tế bào trần (protoplast). Phương pháp chuyển gen này bao gồm nhiều bước thực hiện phức tạp, chi phí cao và kết quả thí nghiệm thiếu ổn định ở những lần lặp lại. Việc phát triển hệ thống chuyển gen mới với hiệu suất cao, chi phí thấp và an toàn ở *A. oryzae* và *A. niger* sẽ là nền tảng ưu việt phục vụ sản xuất enzyme/protein tái tổ hợp có tiềm năng thương mại hóa. Kể từ năm 1998, phương pháp chuyển gen thông qua vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens* đã được thực hiện thành công ở nhiều loài nấm sợi khác nhau. Hiệu suất chuyển gen của phương pháp này có thể đạt đến 97% và thậm chí cao hơn phương pháp chuyển gen thông qua tế bào trần lên tới 400 lần ở nấm *Aspergillus awamori*. Tuy nhiên, phương pháp này mới chỉ được áp dụng một cách hạn chế ở *A. oryzae* và *A. niger*. Đặc biệt, các marker chọn lọc dùng cho chuyển gen ở cả *A. oryzae* và *A. niger* mới chỉ giới hạn ở một số lượng nhất định do *A. oryzae* kháng với hầu hết các loại kháng sinh dùng cho chuyển gen còn *A. niger* thường đòi hỏi nồng độ kháng sinh khá cao để đảm bảo chọn lọc được các thể chuyển gen. Điều này không những làm tăng chi phí thí nghiệm mà còn có thể gây ra lo ngại về việc phát tán của các chủng nấm mang gen kháng kháng sinh ra môi trường tự nhiên.

Xây dựng được hệ thống chuyển gen với hiệu suất cao thông qua việc sử dụng các marker chọn lọc là gen dinh dưỡng hay gen “tự thân” sẽ đảm bảo sự an toàn của chủng tái tổ hợp và là nền tảng di truyền quan trọng phục vụ nghiên cứu biểu hiện tái tổ hợp định hướng ứng dụng. Hệ thống này có thể được sử dụng để loại bỏ đi các gen

không mong muốn khỏi hệ gen của nấm, như các mã hoá protease (gây phân giải sản phẩm enzyme/protein tái tổ hợp), các gen sinh tổng hợp amylase (gây cản trở việc thu hồi và tinh chế sản phẩm tái tổ hợp), ... Hệ thống chuyển gen phát triển được trong nghiên cứu này cũng sẽ là công cụ đắc lực giúp tăng cường khả năng biểu hiện của gen mã hóa enzyme tái tổ hợp như phytase (enzyme thủy phân phytate, thường được bổ sung vào thức ăn chăn nuôi), laccase (ứng dụng trong xử lý loại bỏ thuốc nhuộm trong nước thải),...

Từ những lý do nêu trên, chúng tôi tiến hành đề tài: “**Nghiên cứu phát triển hệ thống chuyển gen mới phục vụ cải biến di truyền một số loài nấm sợi thuộc chi *Aspergillus***”.

2. Mục tiêu của đề tài

- Phát triển được hệ thống chuyển gen hiệu suất cao thông qua vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens* dựa trên cơ chế trợ dưỡng đơn và trợ dưỡng kép.
- Áp dụng được hệ thống chuyển gen để cải biến di truyền nấm sợi *A. oryzae* và *A. niger* thông qua việc xoá gen và tăng cường biểu hiện gen nhằm tạo ra các chủng đột biến có đặc tính sinh học ưu việt.

3. Nội dung nghiên cứu

Nội dung 1: Phát triển hệ thống chuyển gen mới (tạo chủng đột biến khuyết dưỡng, tạo vector, tối ưu quy trình chuyển gen, biểu hiện gen chỉ thị huỳnh quang).

Nội dung 2: Chứng minh tính khả thi của hệ thống chuyển gen thông qua vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens* thu được trong nghiên cứu vai trò, chức năng gen.

Nội dung 3: Đánh giá hiệu quả xoá gen (*amyR*, *laeA*, *priT*, *stuA*, *veA*) sử dụng hệ thống chuyển gen thông qua vi khuẩn *Agrobacterium*

tumefaciens và đánh giá vai trò của các gen này đến quá trình sinh trưởng, biệt hoá tế bào, phân giải cơ chất và tiết sản phẩm.

Nội dung 4: Xây dựng giải pháp nhằm nâng cao hiệu suất xóa gen ở *A. oryzae* và *A. niger* mà không sử dụng gen kháng kháng sinh.

Nội dung 5: Áp dụng hệ thống chuyển gen thu được để tăng cường sự biểu hiện của gen *phyA* mã hoá enzyme phytase ở các chủng đột biến xoá gen.

4. Ý nghĩa khoa học và thực tiễn của đề tài

Nghiên cứu này đã phát triển thành công hệ thống chuyển gen mới với hiệu suất cao dựa trên marker chọn lọc là gen dinh dưỡng để phục vụ cải biến di truyền nấm sợi *A. oryzae* và *A. niger*. Đề tài chứng minh được hiệu quả của hệ thống chuyển gen mới thông qua việc xóa gen và tăng cường biểu hiện gen nhằm tạo ra các chủng nấm có đặc tính ưu việt phục vụ sản xuất enzyme và protein tái tổ hợp.

5. Những đóng góp mới của luận án

- Đã xây dựng được phương pháp tối ưu cho chuyển gen thông qua vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens* ở nấm sợi *A. oryzae* và *A. niger* dựa trên cơ chế trợ dưỡng đơn (trợ dưỡng histidine) và trợ dưỡng kép (trợ dưỡng histidine, uridine/uracil).
- Đã phát triển được giải pháp tối ưu để xóa nhiều gen ở cùng một chủng nấm *A. oryzae* hoặc *A. niger* với việc chỉ sử dụng một marker chọn lọc duy nhất là *pyrG*.
- Đã tìm ra giải pháp mới để tăng cường hiệu quả xóa gen ở *A. oryzae* và *A. niger* bằng cách sử dụng marker *hisB* để xóa gen mong muốn và marker *pyrG* để chặn sinh trưởng của các thể chèn ngẫu nhiên.

- Đã xây dựng được bộ dữ liệu về kiểu hình và đặc điểm sinh học của các chủng đột biến xóa gen mã hoá protein điều hoà (*amyR*, *laeA*, *priT*, *stuA*, *veA*) và một số chủng tăng cường biểu hiện gen mã hoá enzyme phytase (*phyA*) ở *A. oryzae* và *A. niger*.

CHƯƠNG 1

TỔNG QUAN CÁC VẤN ĐỀ NGHIÊN CỨU

1.1. Giới thiệu về chi *Aspergillus*

Aspergillus là một trong những chi nấm lâu đời nhất được đặt tên bởi Micheli vào năm 1729. Sự phổ biến của chi nấm này trong môi trường tự nhiên, khả năng dễ nuôi cấy trên môi trường phòng thí nghiệm và tầm quan trọng kinh tế của một số loài *Aspergillus* đã thu hút sự chú ý của các nhà nấm học và vi sinh vật học công nghiệp.

Aspergillus có hiệu quả kinh tế cao, các thành viên của chi nấm này đã được khai thác trong nhiều quy trình công nghiệp khác nhau. Các loài *Aspergillus* được sử dụng trong ngành công nghiệp đồ uống, dược phẩm và sản xuất enzyme. Các sản phẩm thương mại được sản xuất từ *Aspergillus* bao gồm axit citric, gluconic, itaconic và kojic. Một số chất chuyển hóa thứ cấp từ *Aspergillus* như statin và các dẫn xuất của chúng cũng đem lại lợi nhuận lớn, và giữ vai trò quan trọng trong phát triển thuốc điều trị bệnh mỡ máu (cholesterol cao). Một nhóm các nhà khoa học tại Công ty Merck ở Hoa Kỳ đã phát triển thành công statin đầu tiên (có tên là lovastatin) từ *A. terreus* và được phê duyệt để sử dụng cho người. Mặc dù *A. nidulans* là loài *Aspergillus* có đặc tính di truyền tốt nhất, nhưng chúng không phù hợp để làm vật chủ cho nghiên cứu tái tổ hợp do các nấm này tạo ra độc tố sterigmatocystin, tiền chất của aflatoxin. Hai loài đặc biệt quan trọng

của chi *Aspergillus* là *A. niger* và *A. oryzae*. Hai loài này đã được ứng dụng rộng rãi trong sản xuất các sản phẩm tự nhiên có giá trị như axit hữu cơ và enzyme. *A. niger* và *A. oryzae* cũng được công nhận là vật chủ an toàn để sản xuất các sản phẩm tái tổ hợp phục vụ nông nghiệp, công nghiệp thực phẩm và y-dược.

1.2. Phương pháp chuyển gen thông qua vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens* (*Agrobacterium tumefaciens* – mediated transformation ATMT)

Mặc dù xuất hiện muộn hơn phương pháp chuyển gen bằng tế bào trần, ATMT đã được chứng minh là có những ưu điểm vượt trội khi sử dụng ở để chuyển gen ở cả thực vật và nấm. Đối với phương pháp ATMT, việc tạo tế bào trần từ hệ sợi nấm để làm nguyên liệu cho chuyển gen là không cần thiết. Việc tạo tế bào trần đã được áp dụng thành công ở nhiều loài nấm khác nhau, tuy nhiên, quy trình tạo tế bào trần thường phức tạp và phải sử dụng nhiều loại enzyme khác nhau để loại bỏ thành tế bào nấm. Ngược lại, các nguyên liệu dùng cho chuyển gen ở phương pháp ATMT rất đa dạng và đơn giản như bào tử nấm, sợi nấm, mô quả thể của nấm, hoặc tế bào trần. Nhiều nghiên cứu cũng đã chỉ ra phương pháp ATMT có hiệu quả cao trong chuyển gen ở nấm, thậm chí cao hơn nhiều so với các phương pháp chuyển gen thông dụng khác.

ATMT là một công cụ quan trọng để xóa gen. Mặc dù hiệu quả của xóa gen thông qua *Ag. tumefaciens* khác nhau rất nhiều ở các loài nấm, như 0,04% đối với *B. dermatitidis*, 29% đối với *A. awamori*, 74% đối với *Fusarium avenaceum* và 84,6% đối với *F. graminearum*. Với hiệu suất chuyển gen cao và sự đơn giản trong thao tác thí nghiệm, phương pháp ATMT ngày càng trở nên phổ biến trong các ứng dụng

cải biến di truyền ở nấm. Sự sẵn sàng của các cơ sở dữ liệu hệ gen nấm, cùng với các hệ thống promoter cảm ứng, các marker chọn lọc phù hợp đã và đang giúp cho việc khai thác phương pháp ATMT hiệu quả hơn trong nghiên cứu chức năng gen, tạo các thể đột biến định hướng và biểu hiện tái tổ hợp ở nhiều loài nấm khác nhau.

1.3. Marker trợ dưỡng dùng trong chuyển gen

Các gen dinh dưỡng, được định nghĩa là các gen mã hóa một loại protein cần thiết để sinh tổng hợp một chất dinh dưỡng thiết yếu, được sử dụng rộng rãi để chọn lọc các thể chuyển gen trong kỹ thuật di truyền. Các marker trợ dưỡng hiện có sẵn trong việc chuyển gen ở nấm. Các marker trợ dưỡng uracil cũng đã được sử dụng trong quá trình chuyển gen thông qua *Agrobacterium* ở nấm sợi. Nhiều thể đột biến khuyết dưỡng *pyrG* khác nhau đã được tạo ra và những thể đột biến này không thể phát triển trong môi trường không có uridine hoặc uracil, nhưng chúng có thể tồn tại bằng cách thêm uridine hoặc uracil vào môi trường, vì vậy rất dễ sử dụng trong chọn lọc. Sử dụng các marker trợ dưỡng là một trong những cách phổ biến nhất để chuyển gen trong nấm sợi, đặc biệt là sử dụng tính kháng axit 5-fluoroorotic để tạo ra các thể đột biến khuyết dưỡng uracil có thể được hỗ trợ bởi gen *pyrG* (*A. nidulans*) hoặc *pyr-4* (*N. crass*). Một tính năng quan trọng khác của marker *pyrG* là nó có thể được phát triển với hệ thống tái sử dụng marker, giúp tạo các thể đột biến xóa đa gen. Nếu có thể sử dụng nhiều marker chọn lọc trên một cùng một vật chủ, thì việc tạo ra nhiều thể đột biến xóa gen hoặc các thể hỗ trợ gen rất thuận tiện và hiệu quả.

Gen mã hóa imidazole glycerol-phosphate dehydratase (IGPD) của nấm men *S. cerevisiae* (*HIS3*) là một marker chọn lọc thường được

sử dụng cho các kỹ thuật phân tử. Khi gen *HIS3* được chèn vào plasmid tích hợp hoặc sao chép, *HIS3* cho phép chọn ngược lại các tế bào có được đặc tính nguyên dưỡng histidine để chúng có thể phát triển mà không cần bổ sung histidine trong môi trường. Một ortholog duy nhất (An15g00610) cho *HIS3* trong hệ gen của *A. niger* với độ tương đồng về trình tự protein là 57,6%, được gọi là *hisB*. Mức độ biểu hiện gen báo cáo luciferase khi sử dụng marker *hisB* cao hơn so với sự tích hợp ngẫu nhiên mà *pyrG* là marker chọn lọc. Ngoài ra, việc sử dụng marker *hisB* từ *A. nidulans* để bổ trợ vào *A. niger* khuyết dưỡng histidine là hoàn toàn khả thi.

1.4. Các chiến lược tăng cường sản xuất enzyme/protein hai loài nấm công nghiệp *A. oryzae* và *A. niger*

Sàng lọc các chủng sản xuất tốt rất quan trọng trong biểu hiện enzyme tái tổ hợp. Để cải thiện hơn nữa việc sản xuất enzyme ở *A. oryzae* và *A. niger*, các chiến lược biểu hiện đã tập trung vào việc tối ưu hóa cấu trúc biểu hiện gen, điều khiển quá trình sau dịch mã và kỹ thuật hình thái học. Bằng cách bất hoạt gen *flbA* liên quan đến quá trình tạo bào tử, khả năng tiết protein trên khắp khuẩn lạc được nuôi cấy trên môi trường thạch ở *A. niger* đã được tăng cường. Đột biến gây ra bởi tia cực tím và axit nitric đã tạo ra một số chủng *A. oryzae* có khả năng làm cho môi trường nuôi cấy ít nhớt và tăng sản xuất glucoamylase. Nhiều khả năng các yếu tố điều hoà phát triển quan trọng khác (ví dụ: StuA, FlbA, BrlA) có thể sẽ trở thành các thành phần phổ biến của bộ công cụ công nghệ sinh học để kích hoạt hoặc cải thiện sự hình thành sản phẩm tự nhiên trong các loài nấm công nghiệp.

Cả *A. oryzae* và *A. niger* đều là những nhà máy tế bào quan trọng trong sản xuất enzyme thực phẩm do có các đặc tính an toàn và có hệ thống tiết protein mạnh. Một loạt các enzyme thực phẩm như amylase, glucoamylase được sản xuất thương mại bởi các chủng *A. oryzae* và *A. niger* đã chứng minh đây là các chủng nền thích hợp cho việc cải biến di truyền để tạo các chủng siêu sản xuất enzyme. Tuy nhiên, những khó khăn trong thao tác di truyền và sự thiếu hụt các chiến lược biểu hiện đã hạn chế những bước tiến mới trong lĩnh vực này. Hơn nữa, một số độc tố nấm mốc gần đây đã được phát hiện trong một số chủng *A. niger* đã khiến cho quy trình phê duyệt đối với sản xuất enzyme thực phẩm càng nghiêm ngặt hơn. Trong nghiên cứu này, các công cụ phục vụ cải biến di truyền với hiệu quả cao, các cách thức tạo các chủng phù hợp cho biểu hiện protein tái tổ hợp, các chiến lược để sản xuất enzyme thực phẩm hiệu quả hơn ở 2 loài nấm *A. oryzae* và *A. niger* sẽ được xem xét.

CHƯƠNG 2

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu

Các chủng vi sinh vật sử dụng làm chủng khởi động trong nghiên cứu bao gồm: *Escherichia coli* DH5 α , *Agrobacterium tumefaciens* AGL1, *Aspergillus oryzae* RIB40, *Aspergillus oryzae* AUT1-PID, *Aspergillus oryzae* NsPID1, *Aspergillus oryzae* RIB40 Δ pyrG, *Aspergillus niger* N402, *Aspergillus niger* CBS 113.46, *Aspergillus niger* N402 Δ pyrG, *Aspergillus niger* CBS 113.46 Δ pyrG.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Thu bào tử và hệ sợi nấm

- 2.2.2. Tách chiết DNA tổng số, tách chiết RNA tổng số và tạo cDNA
- 2.2.3. Tạo các vector dùng cho xoá gen và biểu hiện gen ở *A. oryzae* và *A. niger*
- 2.2.4. Chuyển gen ở nấm sợi *A. oryzae* và *A. niger* thông qua vi khuẩn *Ag. tumefaciens* sử dụng marker chọn lọc là các marker dinh dưỡng
- 2.2.5. Sàng lọc, đánh giá và kiểm tra khả năng sinh trưởng và tiết protein/enzyme của một số chủng chuyển gen
- 2.2.6. Xác định số bản sao và mức độ hoạt động của gen *phyA* thông qua real-time PCR
- 2.2.7. Xác định và phân tích các gen ở *A. oryzae* và *A. niger*
- 2.2.8. Phân tích và xử lý số liệu

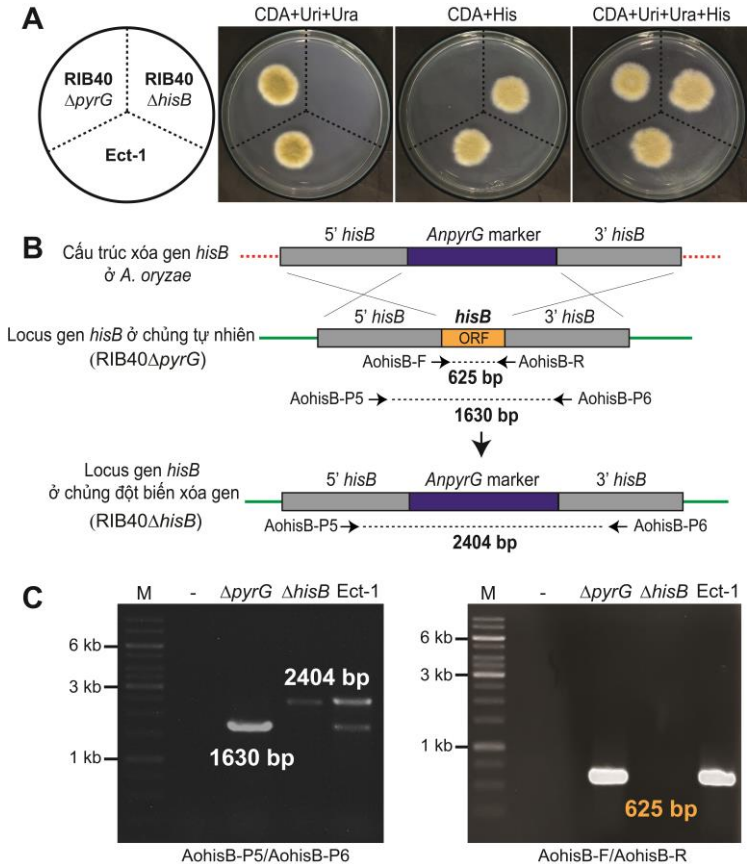
CHƯƠNG 3

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Phát triển hệ thống chuyển gen mới với marker chọn lọc là gen dinh dưỡng *hisB* phục vụ cải biến di truyền nấm sợi *A. oryzae* và *A. niger*

3.1.1. Tạo chủng đột biến khuyết dưỡng histidine nhờ xoá gen *hisB* theo cơ chế trao đổi chéo tương đồng

Vector pAoH dùng cho xoá gen *hisB* có chứa marker chọn lọc *pyrG* được chuyển vào *A. oryzae* khuyết dưỡng uridine/uracil RIB40 Δ *pyrG* thông qua phương pháp ATMT như đã báo cáo trước đây. Tất cả các thể chuyển gen sau đó được chuyển sang CDA để sàng lọc các thể đột biến khuyết dưỡng histidine tiềm năng. Chủng đột biến xoá histidine (RIB40 Δ *hisB*) đã được kiểm tra sự sinh trưởng trên các môi trường khác nhau (Hình 3.3A). Việc xoá gen *hisB* theo cơ chế trao đổi chéo tương đồng được xác nhận bằng PCR sử dụng các cặp mồi đặc hiệu (Hình 3.3B, 3.3C).



Hình 3.3. Kết quả tạo chủng đột biến khuyết dưỡng histidine ở *A. oryzae* RIB40

(A) Khả năng sinh trưởng của chủng đột biến khuyết dưỡng histidine (RIB40 Δ hisB) được kiểm tra đồng thời trên CDA + Uri + Ura, CDA + His và CDA + Uri + Ura + His. Các đĩa được ủ ở 30°C trong 4 ngày. (B) Sơ đồ xác nhận xóa *hisB* nhờ PCR với các vị trí bấm mỗi đặc hiệu. (C) Kết quả xác nhận xóa gen *hisB* nhờ PCR với các cặp mỗi đặc hiệu AohisB-P5/AohisB-P6 và AohisB-F/AohisB-R, (-) là đối chứng âm, M là DNA marker 1 kb (Thermo Fisher Scientific, Mỹ).

Hiện nay, các marker dinh dưỡng thường được khai thác để thao tác di truyền ở nấm nhờ chuyển gen thông qua tế bào trần. Các marker chọn lọc này được khuyến nghị sử dụng trong sản xuất protein tái tổ hợp để có thể đáp ứng các tiêu chuẩn an toàn trong công nghiệp thực phẩm. Việc sử dụng *hisB* như một marker chọn lọc để biến đổi gen chưa được báo cáo ở *A. oryzae*. Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã xóa thành công gen *hisB* ở *A. oryzae* khuyết dưỡng uridine/uracil để tạo ra các chủng đột biến khuyết dưỡng histidine.

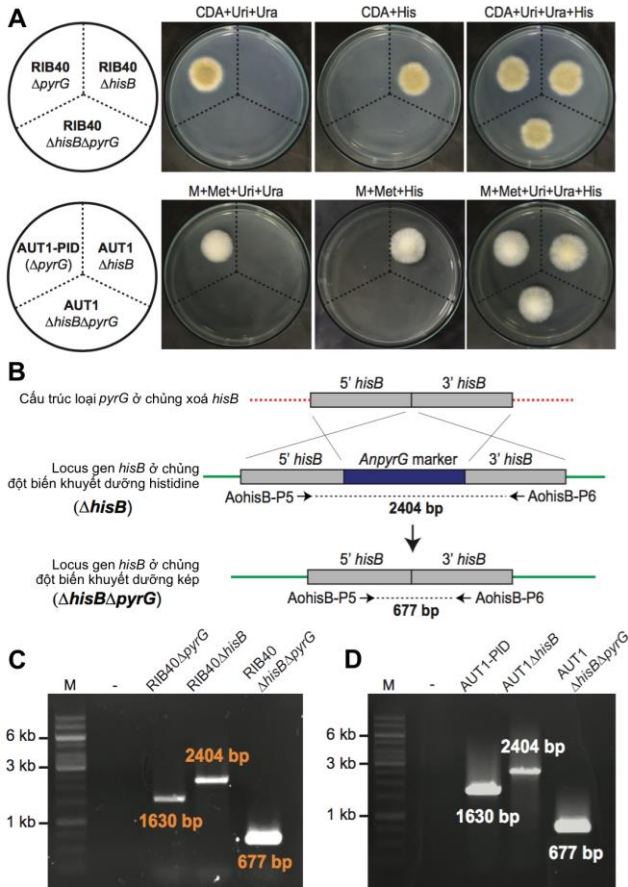
Chiến thuật tạo các chủng đột biến khuyết dưỡng histidine ($\Delta hisB$) ở *A. niger* cũng được tiến hành tương tự như với *A. oryzae*.

3.1.2. Chuyển gen vào *A. oryzae* và *A. niger* sử dụng phương pháp ATMT với marker chọn lọc là *hisB*

Các vector nhĩ thể mới được đặt tên là pEX2D và pEX2E mang marker chọn lọc *hisB* để biểu hiện gen tái tổ hợp ở *A. oryzae* và *A. niger* khuyết dưỡng histidine đã được xây dựng. Hiệu suất chuyển gen sử dụng ATMT với các điều kiện tối ưu đạt 515 ± 99 thể chuyển gen/ 10^6 bào tử nấm (đối với *A. oryzae* RIB40 $\Delta hisB$), 297 ± 62 thể chuyển gen cho 10^7 bào tử với chủng nền *A. niger* N402 $\Delta hisB$ và 285 ± 58 thể chuyển gen cho 10^7 bào tử với chủng nền *A. niger* CBS113.46 $\Delta hisB$.

3.1.3. Tạo các chủng đột biến khuyết dưỡng kép nhờ giải pháp tái sử dụng marker chọn lọc *pyrG*

Marker *pyrG* ở các đột biến khuyết dưỡng histidine được tiến hành loại bỏ theo cơ chế tái tổ hợp tương đồng để tạo các chủng đột biến khuyết dưỡng cả 2 gen *hisB* và *pyrG*.

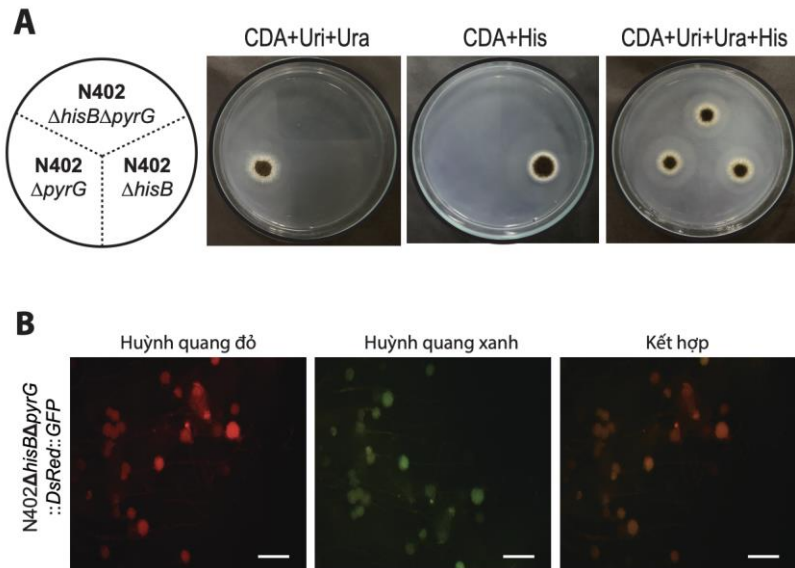


Hình 3.12. Kết quả tạo các chủng khuyết dưỡng kép $\Delta hisB\Delta pyrG$ ở *A. oryzae*

(A) Sự sinh trưởng của các chủng đột biến $\Delta hisB\Delta pyrG$ được kiểm tra trên các môi trường khác nhau. (B) Sơ đồ xác nhận việc loại bỏ marker *pyrG* ở các chủng đột biến nhờ PCR với cặp mồi đặc hiệu P5/P6. (C) Kết quả xác nhận tạo chủng RIB40 $\Delta hisB\Delta pyrG$ nhờ PCR. (D) Kết quả xác nhận tạo chủng AUT1 $\Delta hisB\Delta pyrG$ nhờ PCR, (-) là đối chứng âm, M là DNA marker 1 kb (Thermo Fisher Scientific, Mỹ).

3.1.4. Xây dựng và đánh giá hiệu quả chuyển gen của các vector nhị thể mới

Trong nghiên cứu này, lần đầu tiên chúng tôi đã thành công trong việc xây dựng các chủng *A. oryzae* và *A. niger* khuyết dưỡng kép và thiết lập hệ thống ATMT mới với marker chọn lọc *pyrG* và *hisB*.



Hình 3.14. Kết quả tạo chủng đột biến khuyết dưỡng kép và sự biểu hiện đồng thời 2 gen độc lập trong cùng một chủng nấm ở *A. niger* N402

(A) Sự phát triển của chủng đột biến khuyết dưỡng kép ($\Delta hisB \Delta pyrG$) so với các chủng đột biến khuyết dưỡng đơn ($\Delta pyrG$ và $\Delta hisB$) trên CDA + Uri + Ura, CDA + His và CDA + Uri + Ura + His. Các đĩa được ủ ở 30°C trong 4 ngày. (B). Sự biểu hiện đồng thời DsRed và GFP trong cùng một chủng nấm dưới kính hiển vi huỳnh quang Axioplan với độ phóng đại 400 lần.

Hiệu quả biến nạp của hệ thống ATMT này khá tốt với 200–1000 thể chuyển gen cho 10^6 bào tử tùy thuộc vào marker chọn lọc. Ngoài ra, sự hình thành nền không mong muốn do sự phát triển quá mức của các chủng khuyết dưỡng trong quá trình đồng nuôi cấy được kiểm soát dễ dàng bởi nồng độ histidine và uridine/uracil được bổ sung vào môi trường cảm ứng. Hệ thống ATMT được xây dựng đã được xác nhận bằng cách biểu hiện thành công 2 gen báo cáo khác nhau bao gồm *DsRed* và *GFP* trong cùng một chủng *A. oryzae* và *A. niger*.

3.2. Hệ thống chuyển gen thông qua vi khuẩn *Ag. tumefaciens* (ATMT) mới phát triển cho phép thực hiện nghiên cứu về chức năng của các gen

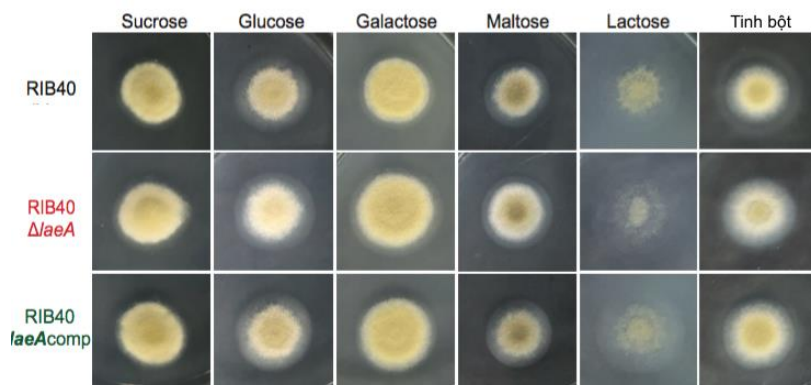
3.2.1. Tạo vector nhị thể pKH1 phục vụ xóa gen

Vector nhị thể pKH1 mới tạo, chứa các vị trí nhận biết của các enzyme cắt giới hạn ở cả 2 đầu 5' và 3' của marker chọn lọc *hisB* giúp cho việc đưa các trình tự tái tổ hợp tương đồng của gen đích vào vector trở nên dễ dàng hơn. Các đoạn trình tự tái tổ hợp tương đồng được đưa tuần tự vào 2 phía của marker chọn lọc trong vector nhờ sử dụng enzyme cắt giới hạn và T4 DNA ligase. Vector trung gian pKH1 sẽ được khai thác cho các thí nghiệm xóa gen tiếp theo.

3.2.2. Xóa và bổ trợ thành công gen điều hòa *laeA* ở *A. oryzae* và *A. niger* bằng cách sử dụng hệ thống ATMT đã xây dựng

Để đánh giá hệ thống ATMT trong nghiên cứu vai trò, chức năng gen ở *A. oryzae* và *A. niger*, chúng tôi đã lựa chọn gen *laeA*. Yếu tố điều hòa phổ rộng *LaeA* đóng vai trò quan trọng trong quá trình trao đổi chất thứ cấp và phát triển của nhiều loài nấm. Ở *A. oryzae*, yếu tố điều hòa *LaeA* kiểm soát quá trình tạo bào tử và sản xuất axit kojic.

Xoá gen *laeA* làm giảm khả năng sinh tổng hợp axit hữu cơ ở *A. niger*. Trong nghiên cứu này, gen *laeA* đã bị xoá ở chủng khuyết dưỡng histidine (RIB40 Δ *hisB*). Ngoài ra, chúng tôi đã chứng minh rằng marker *hisB* của *A. niger* có thể được sử dụng để xoá *laeA* ở *A. oryzae*. Dữ liệu cho thấy rằng việc loại bỏ *laeA* làm giảm đáng kể sự hình thành bào tử của *A. oryzae* (Hình 3.19). Ngoài ra, sử dụng hệ thống chuyển gen với 2 marker mới thiết lập, chúng tôi đã tạo thành công các chủng bổ trợ gen *laeA*. Chủng bổ trợ đã phục hồi khả năng hình thành bào tử (Hình 3.19).



Hình 3.19. Kiểu hình của các chủng *A. oryzae* RIB40, RIB40 Δ *laeA* và chủng bổ trợ RIB40*laeA*comp trên CDA có chứa các nguồn cacbon khác nhau

Các đĩa được ủ ở 30°C trong 3 ngày.

3.3. Đánh giá hiệu quả xoá gen sử dụng hệ thống ATMT mới và xác định vai trò của một số gen cụ thể

Để đánh giá tiềm năng của hệ thống chuyển gen mới phát triển trong tạo ra các đột biến xoá gen bền, ổn định nhiều thế hệ, chúng tôi lựa chọn can thiệp vào một loạt các gen điều hòa ở cả hai loài nấm sợi

A. oryzae và *A. niger*. Những gen này đóng vai trò quan trọng trong điều hòa hoạt động trao đổi chất. Hầu hết các chủng đột biến xoá gen có kiểu hình đặc trưng, dễ dàng quan sát và chọn lọc.

Bảng 3.2. Tỷ lệ xoá một số gen điều hoà ở nấm sợi *A. niger* với marker *hisB*

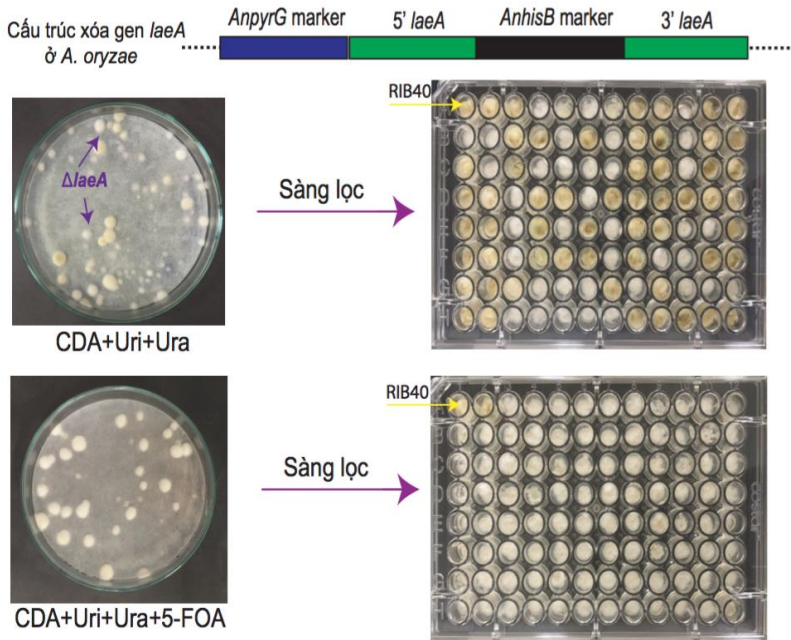
Tên gen	Tỷ lệ xoá
<i>laeA</i>	68,00% ± 7,00%
<i>stuA</i>	37,60% ± 9,42%
<i>amyR</i>	83,75% ± 6,38%
<i>prtT</i>	45,10% ± 1,77%
<i>veA</i>	7,32% ± 2,66%

3.4. Thiết lập chiến lược mới để tăng hiệu quả xoá gen *A. oryzae* và *A. niger*

Trong nghiên cứu này, chúng tôi hướng tới giải pháp không sử dụng các gen kháng thuốc làm marker chọn lọc mà vẫn giúp tăng hiệu suất biến nạp. *hisB* được lựa chọn là marker chọn lọc chính trong quá trình xoá gen dựa trên cơ chế tái tổ hợp tương đồng và *pyrG* là marker chọn lọc hai chiều được sử dụng để loại bỏ các thể chèn ngẫu nhiên. Chiến lược xoá gen hiệu quả cao này đã được chứng minh khi áp dụng xoá một số gen ở *A. oryzae* và *A. niger*.

Khi sử dụng cấu trúc mới tạo này để xoá *laeA* ở chủng nền RIB40 Δ *hisB* Δ *pyrG*, nếu môi trường chọn lọc được bổ sung 5-FOA, tỷ lệ xoá có thể đạt tới 98,48% ± 1,5%. Hầu hết các khuẩn lạc được cấy chuyển và thuần khiết trên môi trường CDA + Uri + Ura với nguồn

nitơ duy nhất là $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ đều có kiểu hình giảm hình thành bào tử (Hình 3.29).



Hình 3.29. Chiến lược tăng tỷ lệ xóa gen *laeA* ở nấm *A. oryzae* RIB40 $\Delta hisB\Delta pyrG$

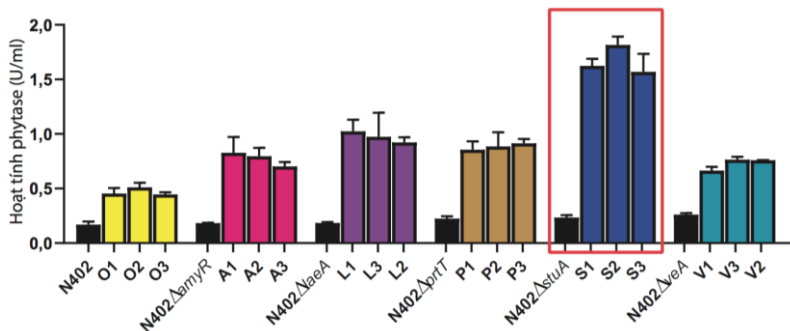
Sơ đồ loại bỏ gen *laeA* ở *A. oryzae* khuyết dưỡng kép RIB40 $\Delta hisB\Delta pyrG$ với việc bổ sung thêm marker chọn lọc *pyrG* từ *A. niger* (*AnpyrG*) để tăng tỷ lệ xóa gen và sàng lọc trên môi trường đặc hiệu với nguồn nitơ là $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ để xác định các thể đột biến $\Delta laeA$.

Các chủng đột biến được cung cấp trong nghiên cứu này cũng sẵn sàng cho các quá trình cải biến di truyền tiếp theo vì mang kiểu gen $\Delta pyrG$. Nói chung, chiến lược mới phát triển trong nghiên cứu

này là một công cụ triển vọng trong xoá gen quy mô lớn và cung cấp sàng lọc có định hướng khi xoá một gen mới.

3.5. Khai thác các hệ thống chuyển gen mới phát triển để biểu hiện enzyme tái tổ hợp

Để biểu hiện tái tổ hợp phytase, các chủng N402 mang đột biến hỏng gen điều hoà và khuyết dưỡng uridine/uracil ($\Delta pyrG$) sẽ được dùng làm nguyên liệu chuyển gen. Các thể chuyển gen được đặt tên lần lượt là O1, O2, O3 (đối với N402 biểu hiện quá mức *phyA*); A1, A2, A3 (đối với N402 $\Delta amyR$ biểu hiện quá mức *phyA*); L1, L2, L3 (đối với N402 $\Delta laeA$ biểu hiện quá mức *phyA*); P1, P2, P3 (đối với N402 $\Delta prtT$ biểu hiện quá mức *phyA*); S1, S2, S3 (đối với N402 $\Delta stuA$ biểu hiện quá mức *phyA*); V1, V2, V3 (đối với N402 ΔveA biểu hiện quá mức *phyA*). Kết quả định lượng hoạt tính cho thấy, các đột biến hỏng gen điều hoà *amyR*, *laeA*, *prtT*, *stuA* và *veA* và nhận cấu trúc biểu hiện quá mức gen *phyA* đều cho hoạt tính cao hơn từ 3-8,5 lần so với các chủng ban đầu. Trong đó, các chủng xoá gen *stuA* cho hoạt tính cao hơn tới 6,6-8,5 lần.



Hình 3.38. Kết quả đánh giá hoạt tính phytase của *A. niger* biểu hiện quá mức *phyA* trên các chủng nền khác nhau.

Quá trình hình thành bào tử ở nấm mốc liên quan chặt chẽ đến hình thành và tiết các sản phẩm trao đổi chất, đặc biệt sắc tố melanin màu đen ở bào tử nấm *A. niger* là một trong những nguyên nhân cản trở khả năng tiết của các enzyme ra ngoài môi trường. Biểu hiện quá mức *phyA* trên các chủng nền là đột biến xoá gen *stuA* ở *A. niger* đã giúp tăng hiệu quả biểu hiện lên tới 8,5 lần. Mặt khác, trong nghiên cứu của chúng tôi, các chủng nghiên cứu được nuôi cấy một cách đơn giản và không cần đưa pH môi trường về 2,5 mà vẫn có thể thu được một lượng lớn enzyme. Điều này chứng minh rằng, các chủng đột biến hỏng gen điều hòa *amyR*, *laeA*, *priT*, *veA* và đặc biệt là *stuA* là các chủng nền tiềm năng với nhiều ưu điểm để sử dụng cho các nghiên cứu tiếp theo nhằm tạo các chủng biểu hiện các enzyme tái tổ hợp đa mục đích có giá trị kinh tế phục vụ sản xuất công nghiệp. Việc biểu hiện quá mức *phyA* bởi cả *A. oryzae* và *A. niger* đã loại bỏ gen *stuA* đều cho những kết quả bước đầu khả quan và hứa hẹn sẽ đem lại cho ngành công nghiệp sản xuất enzyme phytase trong tương lai gần những bước tiến mới có giá trị. Bên cạnh đó, đây cũng là bước khởi đầu cho các nghiên cứu chuyên sâu hơn để hình thành hệ thống sản xuất enzyme/protein tái tổ hợp công nghiệp ở nấm sợi *A. oryzae* và *A. niger* nhờ chủng xoá gen *stuA*.

KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

Kết luận:

1. Đã phát triển thành công hệ thống chuyển gen hiệu quả cao dựa trên cơ chế trợ dưỡng sử dụng phương pháp ATMT ở *A. oryzae* và *A. niger*. Đã thiết lập được giải pháp tối ưu để nâng cao hiệu quả xoá gen ở cả 2 loài nấm sợi *A. oryzae* và *A. niger*.

- Đã tạo thành công 04 vector nhị thể tương thích phục vụ tạo đột biến khuyết dưỡng histidine và đột biến khuyết dưỡng kép histidine-uridine/uracil ở cả 2 loài nấm sợi *A. oryzae* và *A. niger*.
- Đã cung cấp 08 chủng nấm *A. oryzae* và *A. niger* mang đột biến khuyết dưỡng (histidine, uridine/uracil/hisididine).
- Đã đề xuất các thông số tối ưu cho chuyển gen vào nấm sợi *A. oryzae* và *A. niger* dựa trên cơ chế trợ dưỡng sử dụng phương pháp chuyển gen thông qua vi khuẩn *Ag. tumefaciens*. Hiệu quả chuyển gen đạt 515 ± 99 thể chuyển gen/ 10^6 bào tử ở *A. oryzae* và 297 ± 62 thể chuyển gen/ 10^7 bào tử ở *A. niger*.

2. Đã chứng minh được tính khả thi và mức độ hiệu quả của hệ thống chuyển gen mới trong nghiên cứu chức năng gen ở *A. oryzae* và *A. niger*.

- Đã xóa thành công một số gen điều hòa ở 2 loài nấm sợi *A. oryzae* và *A. niger* sử dụng hệ thống chuyển gen mới với hiệu quả cao.
- Đã xóa và bổ trợ thành công gen điều hòa *laeA* ở cả 2 loài nấm sợi *A. oryzae* và *A. niger* sử dụng hệ thống chuyển gen mới và chứng minh sự bảo thủ của gen *laeA* ở 2 loài nấm sợi cùng chi *A. oryzae* và *A. niger*.
- Đã cung cấp 16 chủng đột biến xóa gen, bổ trợ gen liên quan đến quá trình trao đổi chất và biệt hóa tế bào ở nấm sợi *A. oryzae* và *A. niger*.

3. Đã thiết lập chiến lược nâng cao hiệu quả xóa gen ở 2 loài nấm sợi công nghiệp *A. oryzae* và *A. niger*.

- Đã thiết lập 01 giải pháp xóa đồng thời nhiều gen ở một chủng nấm chỉ sử dụng marker chọn lọc duy nhất là *pyrG*.
- Đã đề xuất 01 giải pháp nâng cao hiệu suất xóa gen theo cơ chế tái tổ hợp tương đồng ở nấm sợi *A. oryzae* và *A. niger* bằng cách sử dụng đồng thời hai marker chọn lọc là *pyrG* và *hisB*.

4. Đã áp dụng thành công hệ thống chuyển gen mới để tăng cường sự biểu hiện của gen *phyA* mã hoá enzyme phytase có giá trị kinh tế ở 2 loài nấm sợi. Đã tạo và đánh giá được một số chủng nấm đột biến xóa gen có tiềm năng cao phục vụ nghiên cứu biểu hiện enzyme/protein tái tổ hợp.

- Đã thành công trong biểu hiện tái tổ hợp enzyme phytase ở nấm sợi *A. oryzae* và *A. niger*. Đã tuyển chọn được 03 chủng đột biến tiềm năng trong sản xuất một số sản phẩm phục vụ nông nghiệp, công nghiệp, y-dược.
- Đã xây dựng 05 bộ số liệu về phân tích kiểu hình, đặc điểm sinh lý sinh hóa của các chủng đột biến có tiềm năng ứng dụng.

Kiến nghị:

- 1. Khai thác hệ thống chuyển gen và các chủng đột biến xóa gen đã tạo được để nghiên cứu biểu hiện một số gen mã hoá enzyme có giá trị kinh tế.**
- 2. Khai thác hệ thống chuyển gen tạo được để nghiên cứu vai trò và chức năng của các gen tiềm năng ở nấm sợi *A. oryzae* và *A. niger*.**

DANH MỤC CÔNG TRÌNH KHOA HỌC CỦA TÁC GIẢ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN

1. **Hanh-Dung Thai**, Bich-Phuong Thi Nguyen, Van-Manh Nguyen, Quang-Huy Nguyen, Van-Tuan Tran (2021), “Development of a new *Agrobacterium*-mediated transformation system based on a dual auxotrophic approach in the filamentous fungus *Aspergillus oryzae*”, *World Journal of Microbiology and Biotechnology* Vol. 37: 92. DOI: 10.1007/s11274-021-03060-z.
2. **Thai Hanh Dung**, Tran Van Tuan (2020), “Heterologous phytase expression in the food filamentous fungus *Aspergillus oryzae* using the added rice husk cultivation model”, *Academia Journal of Biology* Vol. 42(2), pp. 75-84. DOI: 10.15625/2615-9023/v42n2.14985.
3. Van-Tuan Tran, **Hanh-Dung Thai**, Tao Xuan Vu (2022), Chapter 9: “*Agrobacterium tumefaciens*-Mediated Transformation Systems for Genetic Manipulation in Agriculturally Important Fungi”, Series on Biocatalysis Volume 10: *Agricultural Biocatalysis: Biological and Chemical Applications*, Jenny Stanford Publishing, ISBN: 978-981-4968-48-5, pp. 285-312. DOI: 10.1201/9781003313144.