

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

Thái Hạnh Dung

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

LUẬN ÁN TIẾN SĨ SINH HỌC

Hà Nội – 2023

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

LUẬN ÁN TIẾN SĨ SINH HỌC

NGƯỜI HƯỚNG DẪN KHOA HỌC:

- 1. PGS.TS. TRẦN VĂN TUẤN**
- 2. PGS.TS. NGUYỄN QUANG HUY**

Hà Nội – 2023

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan đây là công trình nghiên cứu của tôi dưới sự hướng dẫn của PGS.TS. Trần Văn Tuấn và PGS.TS. Nguyễn Quang Huy. Các số liệu, kết quả trình bày trong luận án là trung thực, một phần đã được công bố trong các Tạp chí Khoa học, phần còn lại chưa từng được công bố trong bất kỳ công trình nào khác.

Hà Nội, ngày tháng năm 2023

Tác giả luận án

Thái Hạnh Dung

LỜI CẢM ƠN

Tôi xin bày tỏ lòng kính trọng và biết ơn sâu sắc nhất tới PGS.TS. Trần Văn Tuấn, Trưởng Bộ môn Vi sinh vật học, Khoa Sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội, người thầy đã dành nhiều thời gian, tâm huyết, trí tuệ để chỉ bảo, định hướng, cho tôi cơ hội được thực hiện và hoàn thành luận án.

Tôi xin trân trọng cảm ơn PGS.TS. Nguyễn Quang Huy, Giám đốc Phòng thí nghiệm Trọng điểm Công nghệ Enzym và Protein, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội, người thầy đã quan tâm, động viên và hết lòng giúp đỡ tôi trong suốt quá trình học tập.

Tôi xin chân thành cảm ơn các thầy cô Bộ môn Vi sinh vật học, Khoa Sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội, đã giảng dạy, hỗ trợ và sẵn sàng tạo điều kiện để tôi học tập và rèn luyện.

Tôi xin cảm ơn Đề tài của Quỹ phát triển Khoa học và Công nghệ Quốc gia NAFOSTED (mã số: 106.04-2018.36), Tập đoàn Vingroup – Công ty Cổ phần và Chương trình học bổng thạc sĩ, tiến sĩ trong nước của Quỹ Đổi mới sáng tạo Vingroup (VINIF), Viện Nghiên cứu Dữ liệu lớn, mã số VINIF.2021.TS.076 đã hỗ trợ kinh phí để tôi hoàn thành nghiên cứu này.

Tôi xin cảm ơn Ban Giám hiệu, Phòng Đào tạo, Khoa Sinh học và Phòng thí nghiệm Trọng điểm Công nghệ Enzym và Protein, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội đã tạo mọi điều kiện thuận lợi cho tôi trong suốt quá trình học tập và nghiên cứu.

Cuối cùng tôi xin gửi lòng biết ơn sâu sắc tới gia đình, bạn bè, người thân và tập thể nhóm nghiên cứu tại Phòng Genomic, Phòng thí nghiệm Trọng điểm Công nghệ Enzym và Protein đã sát cánh, ủng hộ, động viên và giúp đỡ tôi trong suốt quá trình học tập và nghiên cứu.

Một lần nữa, tôi xin chân thành cảm ơn!

Hà Nội, ngày tháng năm 2023

Tác giả luận án

Thái Hạnh Dung

MỤC LỤC

DANH MỤC CÁC CHỮ VIẾT TẮT.....	4
DANH MỤC BẢNG.....	6
DANH MỤC HÌNH.....	7
MỞ ĐẦU	10
Chương 1 TỔNG QUAN CÁC VẤN ĐỀ NGHIÊN CỨU.....	14
1.1. Giới thiệu về chi <i>Aspergillus</i>	14
1.1.1. Đặc điểm phân loại.....	14
1.1.2. Đặc điểm sinh lý sinh hóa	15
1.1.3. Di truyền học và hệ gen nấm.....	16
1.1.4. Vai trò ứng dụng trong công nghệ sinh học và công nghiệp	16
1.2. Nấm sợi <i>A. oryzae</i>	18
1.2.1. Đặc điểm hình thái	18
1.2.2. Hệ gen <i>A. oryzae</i>	19
1.2.3. Sinh thái học và ý nghĩa kinh tế	20
1.3. Nấm sợi <i>A. niger</i>	21
1.3.1. Đặc điểm hình thái	21
1.3.2. Hệ gen <i>A. niger</i>	22
1.3.3. Sinh thái học và ý nghĩa kinh tế	23
1.4. Một số phương pháp chuyển gen phục vụ cải biến di truyền ở nấm sợi	24
1.4.1. Chuyển gen bằng xung điện	24
1.4.2. Chuyển gen bằng sóng xung kích	25
1.4.3. Chuyển gen thông qua tế bào trần (protoplast-mediated transformation, PMT)	26
1.4.4. Chuyển gen thông qua vi khuẩn <i>Agrobacterium tumefaciens</i> (<i>Agrobacterium tumefaciens</i> -mediated transformation, ATMT).....	27
1.5. Marker chọn lọc dùng trong chuyển gen.....	31
1.5.1. Marker chọn lọc là gen kháng thuốc	31
1.5.2. Marker chọn lọc là gen dinh dưỡng	32
1.6. Một số protein điều hoà quan trọng ở nấm sợi <i>Aspergillus</i>	34
1.6.1. AmyR	35
1.6.2. LaeA	35
1.6.3. PrtR/PrtT	37

1.6.4. StuA.....	37
1.6.5. VeA	38
1.7. Các chiến lược tăng cường sản xuất enzyme/protein ở <i>A. oryzae</i> và <i>A. niger</i>	39
1.7.1. Tối ưu hóa cấu trúc biểu hiện gen	39
1.7.2. Giảm sự phân hủy protein ngoại bào	41
1.7.3. Cải biến hình thái học hệ sợi nấm	41
Chương 2 VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU.....	43
2.1. Các chủng vi sinh vật và vector sử dụng trong nghiên cứu	43
2.1.1. Các chủng vi sinh vật	43
2.1.2. Các vector sử dụng trong nghiên cứu.....	44
2.2. Môi trường nuôi cấy	45
2.3. Các cặp môi dùng trong phản ứng PCR.....	46
2.4. Thiết bị, hóa chất	46
2.5. Phương pháp nghiên cứu.....	47
2.5.1. Sơ đồ nghiên cứu.....	47
2.5.2. Thu bào tử và hệ sợi nấm	47
2.5.3. Tách chiết DNA tổng số, tách chiết RNA tổng số và tạo cDNA.....	48
2.5.4. Tạo các vector dùng cho xóa gen và biểu hiện gen ở <i>A. oryzae</i> và <i>A. niger</i>	49
2.5.5. Chuyển gen vào <i>A. oryzae</i> và <i>A. niger</i> nhờ vi khuẩn <i>Ag. tumefaciens</i> sử dụng marker chọn lọc là các gen dinh dưỡng	54
2.5.6. Sàng lọc, đánh giá và kiểm tra khả năng sinh trưởng và tiết protein/enzyme của các chủng chuyển gen	56
2.5.7. Xác định số bản sao và mức độ hoạt động của gen phyA thông qua real- time PCR	58
2.5.8. Xác định và phân tích các gen ở <i>A. oryzae</i> và <i>A. niger</i>	58
2.5.9. Phân tích và xử lý số liệu	58
Chương 3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN	59
3.1. Phát triển hệ thống chuyển gen mới với marker chọn lọc là gen dinh dưỡng <i>hisB</i> phục vụ cải biến di truyền nấm sợi <i>A. oryzae</i> và <i>A. niger</i>	59
3.1.1. Tạo chủng đột biến khuyết dưỡng histidine nhờ xóa gen <i>hisB</i> theo cơ chế trao đổi chéo tương đồng.....	59
3.1.2. Chuyển gen vào <i>A. oryzae</i> và <i>A. niger</i> sử dụng phương pháp ATMT với marker chọn lọc là <i>hisB</i>	69

3.1.3. Tạo các chủng đột biến khuyết dưỡng kép nhờ giải pháp tái sử dụng marker chọn lọc <i>pyrG</i>	78
3.1.4. Xây dựng và đánh giá hiệu quả chuyển gen của các vector nhị thể mới .	80
3.2. Hệ thống chuyển gen thông qua vi khuẩn <i>Ag. tumefaciens</i> (ATMT) mới phát triển cho phép thực hiện nghiên cứu về chức năng của các gen.....	83
3.2.1. Tạo vector nhị thể pKH1 phục vụ xóa gen	83
3.2.2. Xóa và bổ trợ thành công gen điều hòa <i>laeA</i> ở <i>A. oryzae</i> và <i>A. niger</i> bằng cách sử dụng hệ thống ATMT đã xây dựng	84
3.3. Đánh giá hiệu quả xóa gen sử dụng hệ thống ATMT mới và xác định vai trò của một số gen cụ thể.....	92
3.3.1. Sử dụng marker <i>hisB</i> phục vụ xóa gen <i>stuA</i> ở <i>A. oryzae</i> và <i>A. niger</i>	92
3.3.2. So sánh hiệu quả xóa một số gen điều hòa ở <i>A. oryzae</i> và <i>A. niger</i>	99
3.3.3. Hệ thống chuyển gen 2 marker <i>hisB</i> và <i>pyrG</i> mới cho phép dễ dàng tạo chủng đột biến xóa kép.....	102
3.4. Thiết lập chiến lược mới để tăng hiệu quả xóa gen <i>A. oryzae</i> và <i>A. niger</i> ...	111
3.4.1. Chiến lược tăng tỷ lệ xóa gen ở nấm sợi <i>A. oryzae</i>	113
3.4.2. Chiến lược tăng tỷ lệ xóa gen ở nấm sợi <i>A. niger</i>	116
3.5. Khai thác các hệ thống chuyển gen mới phát triển để biểu hiện enzyme tái tổ hợp	122
3.5.1. Tạo vector nhị thể mang cấu trúc biểu hiện gen <i>phyA</i> và chuyển thành công vào nấm sợi <i>A. oryzae</i> và <i>A. niger</i>	122
3.5.2. Xác định số bản sao gen <i>phyA</i> của các chủng chuyển gen và xác định hoạt tính enzyme phytase ở các chủng chuyển gen.....	128
3.5.3. Áp dụng hệ thống chuyển gen mới để tuyển chọn các chủng nấm sợi <i>A. niger</i> đột biến phục vụ biểu hiện enzyme tái tổ hợp hiệu suất cao	131
KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ	142
DANH MỤC CÔNG TRÌNH KHOA HỌC CỦA TÁC GIẢ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN.....	144
TÀI LIỆU THAM KHẢO	145
PHỤ LỤC	

DANH MỤC CÁC CHỮ VIẾT TẮT

Chữ viết tắt	Từ đầy đủ và giải thích
ATMT	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> -mediated transformation (chuyển gen thông qua vi khuẩn <i>Agrobacterium tumefaciens</i>)
AS	Acetosyringone
bp	base pair
BSA	Bovine Serum Albumin
CD	Czapek-Dox
Ct	Cycle threshold (ngưỡng chu kỳ)
DNA	Deoxyribonucleic acid
DSB	Double-strand break (đứt sợi kép)
EDTA	Ethylene Diamine Tetraacetic Acid
GRAS	Generally Recognized As Safe (được nhận dạng là an toàn)
HEPES	4-(2-hydroxyethyl) piperazine-1-ethanesulfonic acid
HR	Homologous recombination (tái tổ hợp tương đồng)
IGPD	Imidazoleglycerol phosphate dehydratase
IM	Induction medium (môi trường cảm ứng để chuyển gen)
kb	kilobase pairs
LB	Luria Bertani (môi trường LB)
MM	Miminal Medium (môi trường tối thiểu)
MES	2-(<i>N</i> -morpholino)ethanesulfonic acid
NAT	Nourseothricin N-acetyl transferase
NHEJ	Non-homologous end joining (nối đầu cuối không tương đồng)

OD	Optical Density (mật độ quang)
OTA	Ochratoxin A
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDA	Potato Dextrose Agar (môi trường PDA)
PSM	Phytase Screening Medium (môi trường sàng lọc phytase)
PMT	Protoplast-mediated transformation (chuyển gen thông qua tế bào trần)
RNA	Ribonucleic acid
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
TAE	Tris-acetate-EDTA
T-DNA	Transferred DNA (DNA được vận chuyển)
Ti plasmid	Tumor inducing plasmid (plasmid cảm ứng tạo khối u)
TF	Transcription factor (yếu tố điều hòa)
<i>Vir</i>	Virulence region (vùng độc lực)

DANH MỤC BẢNG

	Trang
Bảng 2.1. Danh sách các chủng vi sinh vật khởi động	43
Bảng 2.2. Các vector sử dụng làm khung trong nghiên cứu	44
Bảng 3.1. Tỷ lệ xoá một số gen điều hoà ở nấm sợi <i>A. oryzae</i> với marker <i>hisB</i>	101
Bảng 3.2. Tỷ lệ xoá một số gen điều hoà ở nấm sợi <i>A. niger</i> với marker <i>hisB</i>	102
Bảng 3.3. Kết quả xác định số bản sao quy đổi của một số chủng chuyển gen <i>phyA</i> ở <i>A. oryzae</i>	128
Bảng 3.4. Kết quả xác định số bản sao quy đổi của một số chủng chuyển gen <i>phyA</i> ở <i>A. niger</i>	135

DANH MỤC HÌNH

	Trang
Hình 1.1. Hình ảnh <i>Aspergillus conidiophore</i> mô tả bởi Pier Micheli	14
Hình 1.2. Hình thái 3 loại nấm <i>Aspergillus</i> dùng trong sản xuất các sản phẩm lên men truyền thống	17
Hình 1.3. Hình thái nấm sợi <i>A. oryzae</i> RIB40	19
Hình 1.4. Hình thái hệ sợi của chủng <i>A. niger</i> TL8 trên môi trường thạch và cuống sinh bào tử dưới kính hiển vi	22
Hình 1.5. Quá trình chuyển gen thông qua vi khuẩn <i>Agrobacterium</i>	28
Hình 2.1. Sơ đồ nghiên cứu	47
Hình 3.1. Cấu trúc gen <i>hisB</i> ở <i>A. oryzae</i> và các ortholog từ các loài <i>Aspergillus</i> khác và phân tích protein tương ứng	60
Hình 3.2. Sơ đồ tạo vector pAoH	61
Hình 3.3. Kết quả tạo chủng đột biến khuyết dưỡng histidine ở <i>A. oryzae</i> RIB40	62
Hình 3.4. Sự phục hồi sinh trưởng của các chủng đột biến khuyết dưỡng histidine ở <i>A. oryzae</i>	63
Hình 3.5. Kết quả tạo các chủng đột biến khuyết dưỡng histidine ở <i>A. niger</i>	65
Hình 3.6. Sự phục hồi sinh trưởng của các chủng đột biến khuyết dưỡng histidine ở <i>A. niger</i>	67
Hình 3.7. Các thông số tối ưu cho chuyển gen ở chủng <i>A. oryzae</i> khuyết dưỡng histidine bằng phương pháp ATMT	70
Hình 3.8. Sự tích hợp và biểu hiện của protein DsRed ở các chủng đột biến khuyết dưỡng histidine $\Delta hisB$	71
Hình 3.9. Các điều kiện tối ưu cho hệ thống ATMT ở <i>A. niger</i> khuyết dưỡng histidine	72
Hình 3.10. Các thông số tối ưu cho chuyển gen vào nấm <i>A. oryzae</i> và <i>A. niger</i> khuyết dưỡng histidine sử dụng phương pháp ATMT	74
Hình 3.11. Sự tích hợp và biểu hiện huỳnh quang đỏ DsRed ở <i>A. niger</i>	77
Hình 3.12. Kết quả tạo các chủng khuyết dưỡng kép $\Delta hisB\Delta pyrG$ ở <i>A. oryzae</i>	79
Hình 3.13. Sự biểu hiện đồng thời 2 gen độc lập ở <i>A. oryzae</i> bằng cách sử dụng hệ thống ATMT mới được xây dựng	81

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 <i>A. niger</i> N402	82
Hình 3.15. Sơ đồ tạo vector pKH1 và các vị trí của enzyme cắt giới hạn phục vụ tạo các cấu trúc xoá gen tiếp theo	84
Hình 3.16. Kết quả xoá điều hòa <i>laeA</i> ở <i>A. oryzae</i> áp dụng hệ thống chuyển gen mới xây dựng	85
Hình 3.17. Kết quả xoá gen điều hòa <i>laeA</i> ở <i>A. niger</i> bằng cách sử dụng hệ thống ATMT đã xây dựng	87
Hình 3.18. Kết quả xoá và bổ trợ gen <i>laeA</i> ở <i>A. oryzae</i>	89
Hình 3.19. Kiểu hình của các chủng <i>A. oryzae</i> RIB40, RIB40 Δ <i>laeA</i> và chủng bổ trợ RIB40 <i>laeA</i> comp trên CDA có chứa các nguồn cacbon khác nhau	90
Hình 3.20. Kết quả bổ trợ gen điều hòa <i>laeA</i> ở <i>A. niger</i>	91
Hình 3.21. Kết quả tạo chủng đột biến xoá gen <i>stuA</i> ở <i>A. oryzae</i>	93
Hình 3.22. Kết quả tạo chủng đột biến xoá gen <i>stuA</i> ở <i>A. niger</i>	95
Hình 3.23. Khả năng tăng cường hình thành bào tử của các chủng xoá gen <i>stuA</i> nhờ nhiệt độ	98
Hình 3.24. Chiến lược tạo các cấu trúc xoá gen <i>pyrG</i> phục vụ xoá đa gen ở nấm sợi chỉ sử dụng duy nhất 1 marker chọn lọc <i>pyrG</i>	103
Hình 3.25. Kết quả tạo chủng đột biến xoá kép <i>laeA</i> và <i>stuA</i> ở <i>A. niger</i> N402 (N402 Δ <i>laeA</i> Δ <i>stuA</i>)	105
Hình 3.26. Khả năng sinh axit hữu cơ của các chủng <i>A. niger</i>	106
Hình 3.27. Mức độ biểu hiện gen ở <i>A. niger</i> xoá <i>stuA</i> và xoá kép <i>laeA</i> - <i>stuA</i> được so sánh thông qua real-time PCR	109
Hình 3.28. Sơ đồ tóm tắt chiến thuật tăng cường hiệu quả xoá gen ở <i>A. oryzae</i> và <i>A. niger</i> với <i>pyrG</i> là marker chọn lọc thứ 2	112
Hình 3.29. Chiến lược tăng tỷ lệ xoá gen <i>laeA</i> ở nấm <i>A. oryzae</i> RIB40 Δ <i>hisB</i> Δ <i>pyrG</i>	114
Hình 3.30. Chiến lược tăng tỷ lệ xoá gen <i>stuA</i> ở nấm <i>A. oryzae</i> RIB40 Δ <i>hisB</i> Δ <i>pyrG</i>	115
Hình 3.31. Kết quả xoá gen <i>veA</i> sử dụng marker <i>hisB</i> ở <i>A. niger</i>	117
Hình 3.32. Chiến lược tăng tỷ lệ xoá gen <i>stuA</i> ở nấm <i>A. niger</i> N402 Δ <i>hisB</i> Δ <i>pyrG</i>	118
Hình 3.33. Sơ đồ tạo cấu trúc biểu hiện gen <i>phyA</i> từ <i>A. fumigatus</i>	124

Hình 3.34. Sơ đồ tạo cấu trúc biểu hiện gen <i>phyA</i> từ <i>A. niger</i>	125
Hình 3.35. Kết quả biểu hiện tái tổ hợp <i>phyA</i> ở <i>A. oryzae</i> và <i>A. niger</i>	126
Hình 3.36. Kết quả chuyển gen <i>phyA</i> từ <i>A. fumigatus</i> vào <i>A. oryzae</i>	127
Hình 3.37. Kết quả đánh giá hoạt tính phytase của <i>A. oryzae</i> AUT1-PID và AP2	129
Hình 3.38. Kết quả đánh giá hoạt tính phytase của <i>A. niger</i> biểu hiện quá mức <i>phyA</i> trên các chủng nền khác nhau	132
Hình 3.39. Mức độ biểu hiện gen <i>phyA</i> ở <i>A. niger</i> được đánh giá nhờ real-time PCR	137
Hình 3.40. Hoạt tính phytase của các chủng biểu hiện quá mức <i>phyA</i> từ <i>A. niger</i> ở <i>A. oryzae</i> RIB40	139
Hình 3.41. Kết quả xác định số bản sao gen <i>phyA</i> ở các chủng biểu hiện quá mức trên nền đột biến N402 Δ <i>laeA</i> Δ <i>stuA</i> nhờ real-time PCR (A) và định lượng enzyme phytase tiết ra môi trường nuôi cấy của các chủng chuyển gen (B)	140

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* cũng 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

tăng 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 hóa 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 có trong nước thải), ...

Từ những lý do nêu trên, chúng tôi tiến hành thực hiện 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 xoá 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 xoá 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).

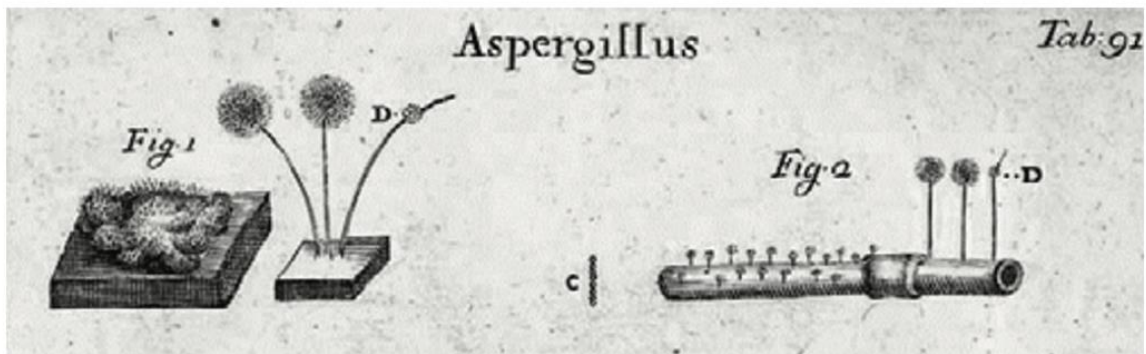
- Đã phát triển được giải pháp tối ưu để xóa nhiều gen ở cùng một chủng nấm *A. oryzae* hoặc *A. niger* với việc chỉ sử dụng một marker chọn lọc duy nhất là *pyrG*.
- Đã tìm ra giải pháp mới để tăng cường hiệu quả xóa gen ở *A. oryzae* và *A. niger* bằng cách sử dụng marker *hisB* để xóa gen mong muốn 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 Pier Antonio Micheli vào năm 1729 (Hình 1.1). Khi quan sát cấu trúc sinh bào tử của chi nấm này qua kính hiển vi, Micheli đã nhớ đến một thiết bị được giáo sĩ Công giáo La Mã sử dụng để vẩy nước thánh gọi là asperges. Kể từ năm 1926, sau khi Tom và Church xuất bản sách chuyên khảo lớn đầu tiên về chi nấm này, *Aspergillus* đã trở thành một trong những nhóm nấm mốc được biết đến và được nghiên cứu nhiều nhất. Sự phổ biến của chúng trong môi trường tự nhiên, khả năng dễ nuôi cấy trên môi trường nhân tạo và tầm quan trọng kinh tế của một số loài *Aspergillus* đã thu hút nhiều nhà khoa học. *Aspergillus* phát triển mạnh dưới dạng sinh vật hoại sinh trên thảm thực vật mục nát, trên các nguyên liệu đa dạng như phân, mô người và giấy da cổ [16].



Hình 1.1. Hình ảnh *Aspergillus conidiophore* mô tả bởi Pier Micheli [45]

1.1.1. Đặc điểm phân loại

Đặc điểm xác định của chi *Aspergillus* là cấu trúc mang bào tử giống aspergillum. Đây là đặc điểm hiển vi quan trọng nhất được sử dụng trong phân loại *Aspergillus*. Trong quá trình biệt hóa sợi nấm, một số tế bào phình to, hình thành các tế bào chân. Nhánh sợi nấm phát triển từ tế bào chân gọi là cuống sinh bào tử (conidiophore), mở rộng ở đỉnh tạo thành một túi hình tròn, hình elip hoặc hình que. Vùng giàu dinh dưỡng của túi là một lớp tế bào gọi là phialide (thể bình), hay steigmata trong tài liệu cũ, tạo ra chuỗi dài các bào tử gọi là conidia (bào tử đính)

hoặc conidiospore nhờ quá trình sinh sản vô tính. Kích thước và sự sắp xếp của các conidia cũng như màu sắc của bào tử là đặc điểm nhận dạng quan trọng. Ví dụ, các loài trong nhóm *A. niger* có bào tử màu đen, nhóm *A. ochraceus* có màu vàng đến nâu, trong khi *A. fumigatus*, *A. nidulans* và *A. flavus* có màu xanh lá cây. Các đặc điểm nuôi cấy chính được sử dụng trong việc xác định loài là màu sắc của khuẩn lạc, tốc độ sinh trưởng và khả năng chịu nhiệt. *Aspergillus* có đặc điểm hình thái và sinh trưởng khác nhau trên các nguồn dinh dưỡng khác nhau. Các nhà phân loại học hiện nay thường nuôi cấy các chủng nấm trên một số loại môi trường nhất định, ở một số nhiệt độ khác nhau để xác định loài [9].

Ngoài conidiophore, các cấu trúc hình thái khác cũng hữu ích cho việc xác định, nhận dạng nấm, bao gồm cleistothecia (quả thể sinh sản hữu tính), tế bào Hülle (còn gọi là nursing cells, một loại tế bào đặc biệt giúp nuôi dưỡng cleistothecia) và sclerotia (một dạng tế bào ở dạng thể nghỉ). Cả cleistothecia và sclerotia đều là cấu trúc dạng đóng và thường có hình tròn. Cleistothecia được hình thành ở giai đoạn sinh sản hữu tính và chứa các bào tử có tên là ascospore sinh ra trong nang (ascus) [16].

1.1.2. Đặc điểm sinh lý sinh hóa

Bào tử *Aspergillus* là thành phần phổ biến của các sol khí, tự phát tán theo khoảng cách ngắn hoặc dài tùy thuộc vào điều kiện môi trường. *Aspergillus* có thể phát triển ở phạm vi nhiệt độ rộng (6-55°C) và ở độ ẩm tương đối thấp. Các loài *Aspergillus* có thể sử dụng nhiều loại cơ chất khác nhau có trong môi trường. Trong tự nhiên, *Aspergillus* đóng vai trò quan trọng trong việc phân giải các cơ chất phức tạp như tinh bột, hemicellulose, cellulose, pectin và các polyme khác. Một số loài *Aspergillus* có khả năng làm phân huỷ các hợp chất bền như chất béo, dầu, chitin và keratin. Các loài *Aspergillus* tiết ra nhiều loại enzyme để phân huỷ cơ chất phức tạp thành các phân tử nhỏ để sử dụng làm chất dinh dưỡng. Ví dụ, amylase được tiết ra để phân giải tinh bột, xylanase phân giải xylan, pectinase phân giải pectin có trong nguyên liệu thực vật. Khả năng tiết ra một lượng lớn enzyme/protein, các chất chuyển hóa (axit hữu cơ, lovastatin, sắc tố, ...), kết hợp với công nghệ lên men và các kỹ thuật sinh học phân tử hiện đại đã giúp tạo ra các nhà máy tế bào ưu việt ở *A. niger*,

A. oryzae, *A. awamori*, *A. sojae* và *A. terreus* phục vụ sản xuất các sản phẩm có giá trị ở quy mô công nghiệp [97].

Tuy nhiên, một số loài của chi *Aspergillus* là tác nhân gây hại cho sản xuất nông nghiệp, ảnh hưởng đến sức khỏe của con người và vật nuôi. Một số loài *Aspergillus* có khả năng sinh độc tố (mycotoxin) trên nông sản, như *A. flavus* sinh aflatoxin hay *A. westerdijkiae* sinh ochratoxin A [82]. Đặc biệt, *A. fumigatus* là tác nhân gây bệnh cơ hội ở người, thường gây bệnh ở những người có hệ miễn dịch bị suy yếu [77].

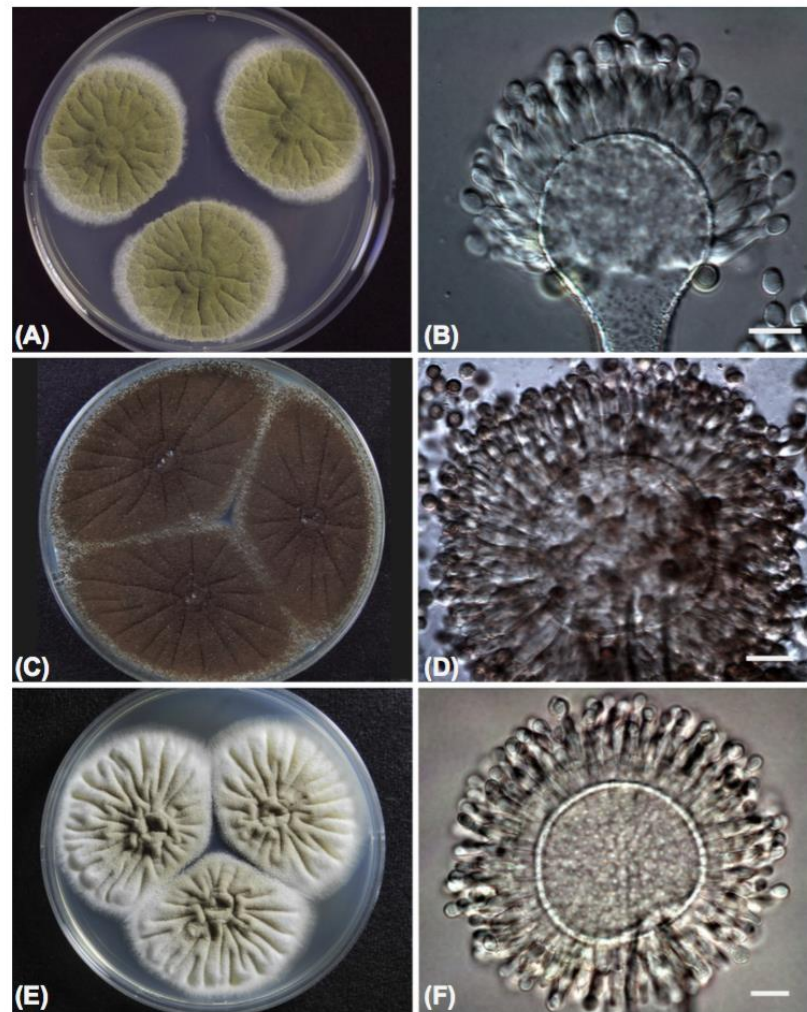
1.1.3. Di truyền học và hệ gen nấm

Năm 2005, dữ liệu hệ gen của 3 loài *Aspergillus* đã được công bố, gồm *A. nidulans*, *A. oryzae* và *A. fumigatus*. Việc xuất bản đồng thời 3 công trình về hệ gen của 3 loài *Aspergillus* này trên tạp chí danh tiếng Nature vào tháng 12 năm 2005 đã khẳng định *Aspergillus* là chi nấm hàng đầu cho các nghiên cứu về phân tích hệ gen. Kích thước hệ gen của các loài *Aspergillus* được giải trình tự nằm trong khoảng từ 29,3 Mb đối với *A. fumigatus* đến 37,1 Mb đối với *A. oryzae*; trong khi số lượng gen dự đoán thay đổi từ khoảng 9926 đối với *A. fumigatus* đến khoảng 12.071 đối với *A. oryzae* [89, 109]. Đến năm 2017, 10 trình tự hệ gen mới của chi *Aspergillus* đã được công bố, cụ thể là *A. luchuensis*, *A. aculeatus*, *A. brasiliensis*, *A. carbonarius*, *A. glaucus*, *A. sydowii*, *A. tubingensis*, *A. versicolor*, *A. wentii* và *A. zonatus* [42]. Những loài này được chọn chủ yếu để cung cấp độ bao phủ tốt hơn cho toàn bộ chi, để bổ sung cho trình tự hệ gen đã có sẵn của *A. clavatus*, *A. fischeri*, *A. flavus*, *A. fumigatus*, *A. nidulans*, *A. niger*, *A. oryzae*, và *A. terreus*, và để cho phép khai thác dữ liệu chi tiết hơn của nhóm công nghiệp Nigri (*A. luchuensis*, *A. aculeatus*, *A. brasiliensis*, *A. carbonarius*, *A. niger*, *A. tubingensis*) [42].

1.1.4. Vai trò ứng dụng trong công nghệ sinh học và công nghiệp

Aspergillus đã được sử dụng trong biến đổi gạo, đậu nành và các thực phẩm từ thực vật khác nhằm cải thiện hương vị và tăng khả năng lên men. Việc sử dụng *Aspergillus* để sản xuất thực phẩm được cho là bắt nguồn từ Trung Quốc cách đây khoảng 2000 năm. Sau đó, quá trình lên men thực phẩm tương tự đã được tiến hành ở Indonesia, Nhật Bản, Hàn Quốc và các khu vực khác của châu Á. Các quy trình lâu

đòi nhất có liên quan đến quá trình lên men thực phẩm truyền thống, bao gồm miso (tương làm từ bột đậu nành và gạo), shoyu (nước tương), rượu sake (rượu vang gạo), shochu (rượu mạnh) và yonezu (giấm gạo). Koji là tên tiếng Nhật của các loại ngũ cốc lên men và/hoặc đậu nành (Hình 1.2). Trong koji, nấm sợi tiết ra nhiều loại enzyme và làm biến đổi cơ chất từ protein thành peptide và axit amin, và từ tinh bột thành đường đơn [118].



Hình 1.2. Hình thái 3 loại nấm *Aspergillus* dùng trong sản xuất các sản phẩm lên men truyền thống [118]

Bên trái là hình ảnh khuẩn lạc *Aspergillus oryzae* (koji vàng; A), *Aspergillus luchuensis* (koji đen; C) và *Aspergillus luchuensis* var. *kawachii* (koji trắng; E). Bên phải là đầu cấu trúc sinh bào tử của các loại nấm này (B, *Aspergillus oryzae*; D, *Aspergillus luchuensis*; F, *Aspergillus luchuensis* var. *kawachii*). Thang chia = 20 μ m.

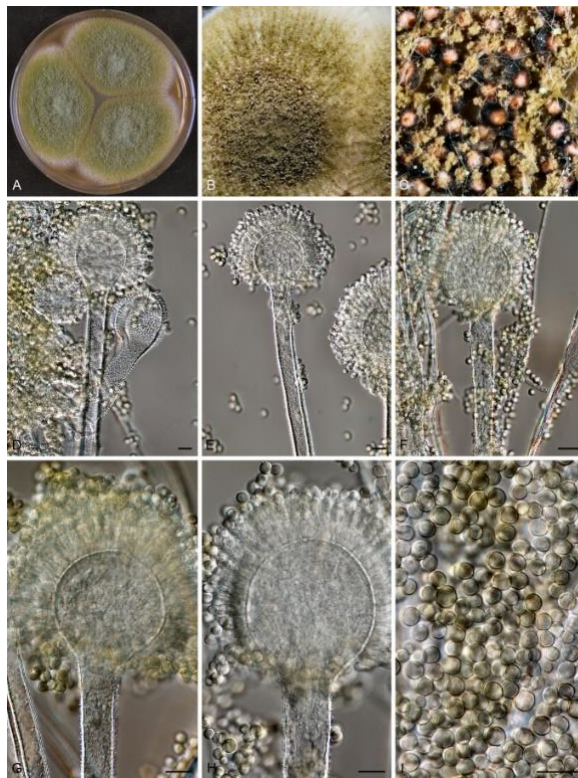
Aspergillus có hiệu quả kinh tế cao, các thành viên của chi nấm này đã được khai thác trong nhiều quy trình công nghiệp khác nhau. Các loài *Aspergillus* được sử dụng trong ngành công nghiệp đồ uống, dược phẩm và sản xuất enzyme. Các sản phẩm thương mại được sản xuất từ *Aspergillus* bao gồm axit citric, gluconic, itaconic và kojic. Axit citric là một trong những thành phần thực phẩm được sử dụng rộng rãi nhất, chủ yếu được sản xuất bởi *A. niger*. Axit citric cũng được sử dụng trong các ngành công nghiệp dược phẩm và mỹ phẩm. *A. niger* cũng đã được khai thác trong sản xuất công nghiệp axit gluconic - một loại axit hữu cơ được dùng làm phụ gia trong một số ứng dụng làm sạch kim loại, cũng như cho liệu pháp điều trị thiếu hụt canxi và sắt. *A. terreus* được sử dụng để sản xuất axit itaconic, dùng trong sản xuất một số loại polyme tổng hợp. *A. oryzae* được lên men để sản xuất axit kojic, ứng dụng trong mỹ phẩm làm trắng da [97]. Một số chất chuyển hóa thứ cấp từ *Aspergillus* cũng có tầm quan trọng kinh tế lớn; trong đó statin và các dẫn xuất của chúng đem lại lợi nhuận lớn nhất. Những loại thuốc giảm cholesterol hiện nay là một trong những loại thuốc được sử dụng rộng rãi. Một nhóm các nhà khoa học tại công ty Merck ở Hoa Kỳ đã phát triển statin đầu tiên được phê duyệt cho người sử dụng, lovastatin, một chất chuyển hóa thứ cấp được phân lập từ *A. terreus* [6]. Do tính chất an toàn của *A. oryzae* và *A. niger* để điều chế thực phẩm và đồ uống của con người, các sản phẩm mới từ các loại nấm này dễ dàng được chấp thuận hơn các sản phẩm từ các sinh vật khác. Với khả năng tiết cao, các enzyme ngoại bào của *A. oryzae* và *A. niger* có thể dễ dàng được khai thác để sản xuất các enzyme dùng trong các ngành công nghiệp như làm bánh, nước giải khát và sản xuất bia; bổ sung vào thức ăn cho động vật; và dùng trong ngành công nghiệp giấy. *Aspergillus* cũng có tiềm năng to lớn trong việc cung cấp các enzyme mới có thể được sử dụng để chuyển hóa sinh khối thực vật thành nhiên liệu và các sản phẩm công nghiệp hữu ích khác [13].

1.2. Nấm sợi *A. oryzae*

1.2.1. Đặc điểm hình thái

A. oryzae là loài nấm sợi hiếu khí. Giai đoạn đầu khuẩn lạc có màu trắng, sau đó chuyển sang màu vàng-xanh. Hệ sợi nấm bao gồm những sợi mỏng với kích thước

theo chiều ngang 5-7 μm , phân nhánh nhiều, và có vách ngăn. *A. oryzae* hình thành bào tử đính (hay conidia) nhờ quá trình sinh sản vô tính. Sợi nấm phát triển tế bào chân đế và biệt hóa thành sợi cuống dài (conidiophore) với cấu trúc phồng lên ở đầu cuối dạng củ hành gọi là bong (vescicle). Xung quanh bong chứa một vài lớp tế bào chuyên biệt gọi là thể bình (phialide). Từ bộ cuống ngoài cùng, những bào tử được sinh ra đính vào nhau, nên gọi là bào tử đính. Bào tử của *A. oryzae* có màu vàng lục hay màu vàng hoa cau [90].



Hình 1.3. Hình thái nấm sợi *A. oryzae* RIB40 [150]

Khuẩn lạc A. oryzae RIB40 trên các môi trường CYA (A), MEA (B) sau 7 ngày nuôi cấy ở 25°C. Hình dạng sclerotia (C), conidiophore và conidia (D-I). Thang chia = 10 μm .

1.2.2. Hệ gen *A. oryzae*

Hệ gen của một số loài nấm sợi thuộc chi *Aspergillus* dùng trong công nghiệp đã được nghiên cứu từ cuối những năm 1990. Mặc dù *A. sojae* đã được sử dụng trong sản xuất công nghiệp như *A. oryzae*, nhưng nghiên cứu về hệ gen của *A. sojae* còn

hạn chế. Phân tích trình tự EST (Expressed Sequence Tags, chỉ thị các trình tự được biểu hiện) được hoàn thành vào năm 2001 với chủng *A. oryzae* RIB40 (ATCC 42149). Hệ gen đầy đủ của *A. oryzae* RIB40 chứa 8 nhiễm sắc thể và ty thể (hình tròn) và ước tính kích thước là 37,6 Mb hay 37.878.829 bp. Hệ gen của *A. oryzae* chứa 12.074 gen, dài hơn 7-9Mb (hoặc lớn hơn 25-30%) so với *A. nidulans* và *A. fumigatus*. Có 12.084 khung đọc mở trong hệ gen của *A. oryzae* RIB40, có thể mã cho các protein hoặc peptide thiết yếu. Các vùng mã hóa chiếm 44,02% hệ gen [90].

A. oryzae có các gen mã hóa cho sinh tổng hợp các chất chuyển hóa. Một số gen ở *A. oryzae* giúp tăng cường tiết các enzyme thủy phân khi lên men lỏng hoặc lên men rắn. Vì vậy, *A. oryzae* được xem là vi sinh vật hiệu quả dùng cho các quá trình lên men. Ngoài ra, gen mã hóa cho con đường sinh độc tố aflatoxin không được biểu hiện trong *A. oryzae* [56]. Do quá trình thuần hoá và chọn lọc trong lên men, *A. oryzae* đã mất hoặc giảm khả năng sản xuất nhiều chất chuyển hóa thứ cấp như aflatoxin và axit cyclopiazonic, đồng thời tăng chuyển hóa carbohydrate, một phần là do sự nhân đôi của gen mã hóa α -amylase. Gần đây, trình tự và phân tích so sánh hệ gen của 82 chủng *A. oryzae* đã được thực hiện và chia *A. oryzae* thành 8 nhánh riêng biệt với sự đa dạng trong số lượng các gen tham gia vào quá trình trao đổi chất thứ cấp. Ngoài ra, số lượng bản sao α -amylase thay đổi từ 1 đến 4 ở các chủng *A. oryzae* và các sự kiện sao chép gen này có khả năng liên quan đến các transposon Tc1/mariner. Có thể quá trình chọn lọc nhân tạo nhằm tăng sản xuất amylase có liên quan mật thiết tới sự nhân đôi độc lập của gen mã hóa cho α -amylase ở *A. oryzae* [33].

1.2.3. Sinh thái học và ý nghĩa kinh tế

A. oryzae có xu hướng ưa thích môi trường giàu oxy. Nấm này phát triển mạnh ở 30-40°C và trên môi trường có đủ độ ẩm cho bào tử phát triển. *A. oryzae* là loài được thuần hoá và thường được tìm thấy ở các khu vực phía bắc, đặc biệt là ở khu vực Đông Á. Chi *Aspergillus* có mặt phổ biến trong tự nhiên, mặc dù vậy loài *A. oryzae* hiếm hơn do được tạo ra từ quá trình thuần hoá để sử dụng trong lên men công nghiệp thực phẩm [14].

A. oryzae được sử dụng chủ yếu trong sản xuất các loại thực phẩm như nước tương, rượu sake và giấm ở Nhật Bản và Trung Quốc [14]. Ở Châu Âu, *A. oryzae* đã được sử dụng từ đầu thế kỷ 20 trong việc sản xuất các enzyme để nướng và pha. Cả *A. oryzae* và các enzyme của nó đều được chấp nhận như các thành phần của thực phẩm (FAO/WHO JECFA 1987). *A. oryzae* có tiềm năng lớn nhất trong sản xuất enzyme của chi *Aspergillus* và loài nấm này được sử dụng rộng rãi trong lĩnh vực kỹ thuật di truyền và công nghệ sinh học nhằm tạo ra các enzyme công nghiệp có giá trị kinh tế cao [90].

Năm 1894, enzyme amylase sản xuất bởi *A. oryzae* lần đầu tiên được bán trên thị trường dưới tên gọi “Taka-diastrase”. Đây được coi là mốc khởi đầu cho cuộc cách mạng sản xuất enzyme thương mại có nguồn gốc từ nấm trên toàn thế giới. Cho đến nay, glucoamylase và α -amylase thu được từ *A. oryzae* chiếm gần 20% lượng enzyme amylase được sản xuất. Ngoài amylase, *A. oryzae* còn được coi như một nhà máy sản xuất nhiều loại enzyme thủy phân có giá trị kinh tế cao khác như protease, lipase, và cellulase. Bên cạnh đó, sự phát triển các hệ thống chuyển gen ở *A. oryzae* đã giúp sản xuất số lượng enzyme từ nấm sợi với lượng phù hợp phục vụ công nghiệp. Khả năng *A. oryzae* biểu hiện mức độ cao của các enzyme tái tổ hợp khác nguồn (heterologous enzyme), ví dụ protease aspartic và lipase từ *Rhizomucor miehei* đã được chứng minh bởi Christensen (1988) và Huge-Jensen (1989) [36, 62]. Ngày nay, việc sản xuất một số enzyme công nghiệp tái tổ hợp từ *A. oryzae* đã được cấp phép. Việc sử dụng lipase *Rhizomucor miehei* biểu hiện bởi *A. oryzae* đã được chấp thuận tại Đan Mạch trong sử dụng chất béo và dầu ăn cho người [14]. Tuy nhiên, các nghiên cứu cơ bản về đặc tính sinh học của *A. oryzae* còn gặp một số khó khăn do loài nấm này không có quá trình sinh sản hữu tính, bào tử sinh sản vô tính (conidia) đa nhân và kích thước hệ gen lớn [4].

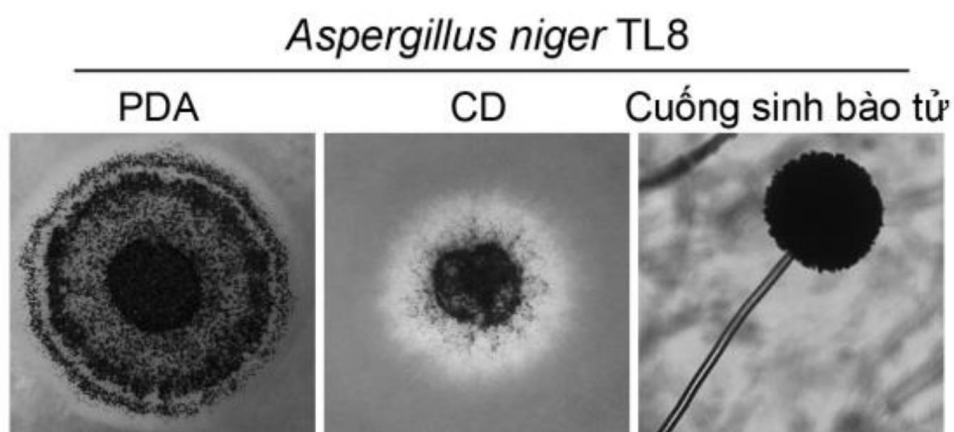
1.3. Nấm sợi *A. niger*

1.3.1. Đặc điểm hình thái

A. niger được mô tả vào năm 1867 trong một bản thảo có tựa đề “Physiologie des mucédinées” của nhà thực vật học người Pháp Philippe Edouard Léon van Tieghem. Ông đã phân lập loại nấm này từ các loại nấm mốc với mục đích chính là

nghiên cứu sản xuất axit gallic bằng một quá trình lên men nấm. Từ các nấm mốc, ông đã phân lập được nấm *Penicillium glaucum* và một loài *Aspergillus* với các bào tử tương tự như *Aspergillus glaucus*, nhưng có màu đen trên các môi trường khác nhau cùng với một vài đặc điểm khác được đặt tên là *A. niger* [45].

A. niger sinh sản chủ yếu bằng bào tử vô tính và hiện chưa phát hiện thấy giai đoạn sinh sản hữu tính tồn tại ở loài nấm này. Khuẩn lạc của *A. niger* có màu trắng hoặc vàng, bị che khuất bởi màu đen của bào tử sinh sản vô tính mọc trên bề mặt (Hình 1.4). Dưới kính hiển vi có thể quan sát thấy sợi nấm trong suốt, có vách ngăn, phân nhánh liên tục, đường kính hệ sợi 2,5 – 8 μm . Cuống sinh bào tử dài 300 – 400 μm , đường kính 40 – 70 μm , không màu, một đầu gắn với bong hình cầu có màu sẫm hơn. Bong cầu được bao phủ bởi thể bình sơ cấp có màu trong suốt tới nâu, có vách ngăn. Trên tầng thể bình sơ cấp là thể bình thứ cấp, đỉnh bào tử hình cầu có gai nhọn với đường kính 3,5 – 5 μm . Sợi nấm mới phát triển có màu trắng, sau đó được bao phủ bởi bào tử có màu nâu hoặc đen tạo nên màu sắc đặc trưng [94].



Hình 1.4. Hình thái hệ sợi của chủng *A. niger* TL8 trên môi trường thạch và cuống sinh bào tử dưới kính hiển vi [1]

1.3.2. Hệ gen *A. niger*

Năm 2007, lần đầu tiên hệ gen của loài *Aspergillus* quan trọng nhất trong công nghiệp được giải trình tự. Hệ gen của chủng được sử dụng phổ biến trong sản xuất glucoamylase A là CBS 513.88 có kích thước là 33,9 Mb, với 14.165 gen được dự đoán là mã hoá cho protein [122]. Đối với chủng *A. niger* CBS 513.88, có nhiều gen được làm giàu, bao gồm glucoamylase A, tRNA-synthase và các yếu tố vận chuyển

liên quan đến chuyển hóa axit amin và tổng hợp protein. Trong khi đó, chủng *A. niger* ATCC 1015 dùng trong sản xuất công nghiệp axit citric có số lượng cao các gen và con đường liên quan đến sản xuất axit hữu cơ [7].

1.3.3. Sinh thái học và ý nghĩa kinh tế

A. niger có thể được phân lập từ tất cả các châu lục. *A. niger* phát triển mạnh trong đất và trên các vật liệu thực vật trong tự nhiên nhưng cũng rất phong phú, đa dạng trong môi trường nhân tạo. Loài nấm này có thể phát triển trong khoảng nhiệt độ từ 6°C đến 47°C, pH từ 1,5 đến 9,8 [77].

A. niger được sử dụng như “nhà máy tế bào để sản xuất enzyme”. Những enzyme từ loài nấm này được sử dụng trong rất nhiều ứng dụng khác nhau, từ lọc nước ép trái cây, thủy phân lipid trong quá trình sản xuất phô mai và phân hủy phytate trong thức ăn chăn nuôi [45]. Amylase có nguồn gốc từ *A. niger* được sử dụng để thủy phân tinh bột trong sản xuất bánh mì và bia, và trong việc loại bỏ vôi. Invertase được sử dụng trong các loại bánh kẹo, trong khi pectinase được áp dụng trong quá trình tiền xử lý nước ép trái cây để loại bỏ độ đục cũng như làm giảm độ đục trong rượu vang. Phytase được sử dụng trong thức ăn chăn nuôi như một chất phụ gia để giải phóng phốt phát khỏi nguyên liệu thực vật. Do *A. niger* có tính linh hoạt và đa dạng giữa các chủng, một số chủng cũng có thể được sử dụng để sản xuất enzyme glucoamylase, một loại enzyme thủy phân có ý nghĩa trong ngành công nghiệp tinh bột. Thị trường glycoamylase đóng vai trò quan trọng cho sự thành công của các công ty công nghệ sinh học đa quốc gia hàng đầu, bao gồm AB Enzymes, Amano Enzyme, DSM, Genencor, Novozymes và Verenium [31]. Protease từ *A. niger* được sử dụng trong cả làm mềm thịt và để giảm độ đàn hồi của protein gluten trong bánh mì. Ngoài ra, *A. niger* đã được sử dụng trong sản xuất một số loại axit công nghiệp từ hơn 100 năm trước như axit citric và axit gluconic [38].

Mặt khác, xét về mức độ an toàn, *A. niger* có thể ứng dụng để sản xuất sản phẩm an toàn cho sức khỏe được FDA công nhận, rất ít trường hợp cho thấy dị ứng hoặc quá nhạy cảm với các sản phẩm từ *A. niger* được phát hiện. Vào đầu những năm 1960, FDA đã công nhận rằng α -amylase, cellulase, amyloglucosidase, catalase, glucose oxidase, lipase và pectinase được sản xuất từ *A. niger* có thể coi là an toàn

(Generally Recognized as Safe, GRAS) nếu các chủng không gây bệnh và gây độc. Năm 1983, Godfrey và Reichelt đã khẳng định β -galactosidase và protease được sản xuất từ *A. niger* là an toàn. Carbohydrase và cellulase từ *A. niger* cũng được FDA chấp nhận là phụ gia thực phẩm thứ cấp [132].

Hiện nay, tỷ lệ tác nhân gây bệnh kháng thuốc ngày càng cao. Do đó, các chất chuyển hóa thứ cấp của vi nấm được coi là nguồn phong phú với nhiều hoạt tính sinh học mới. Trọng tâm của một số phòng thí nghiệm trong những năm qua là tạo ra các chủng *A. niger* làm chủng nền (background strain) để nghiên cứu và sản xuất tái tổ hợp các sản phẩm tự nhiên có hoạt tính sinh học quý, trong đó có hoạt tính kháng vi sinh vật gây bệnh [31].

1.4. Một số phương pháp chuyển gen phục vụ cải biến di truyền ở nấm sợi

Không giống như vi khuẩn và nấm men, hiệu quả biến nạp ở nấm sợi không cao. Các loài nấm thuộc chi *Aspergillus* có thành tế bào dày khiến các quá trình can thiệp vào hệ gen nấm gặp khó khăn. Hiện nay, một số phương pháp chuyển gen đã được phát triển cho nấm sợi và đã được áp dụng thành công cho các loài nấm thuộc chi *Aspergillus*, bao gồm chuyển gen bằng xung điện, chuyển gen bằng sóng xung kích, chuyển gen qua trung gian tế bào trần và chuyển gen thông qua vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens* [84].

1.4.1. Chuyển gen bằng xung điện

Chuyển gen bằng xung điện là một phương pháp hiệu quả cao để đưa DNA ngoại lai vào tế bào. Phương pháp này được sử dụng lần đầu tiên ở *A. nidulans*. Tại thời điểm đó, nguyên sinh chất được sử dụng là các tế bào nhận DNA ngoại lai. Để tăng hiệu quả và giảm thời gian bằng cách loại bỏ quá trình chuẩn bị nguyên sinh chất, một số nhóm nghiên cứu đã sử dụng bào tử nảy chồi hoặc bào tử của *A. oryzae*, *A. niger*, và *A. nidulans*. Ngoài ra, một số yếu tố cần được tối ưu hóa, bao gồm cường độ điện trường, tình trạng xung điện, nồng độ DNA và thành phần đệm. Mặc dù đây là một phương pháp đơn giản và thuận tiện so với các phương pháp chuyển gen khác, nhưng cần phải có thiết bị đo đắt tiền. Hiện nay, chuyển gen bằng xung điện hiếm khi được các nhà nghiên cứu sử dụng cho các nghiên cứu về nấm [84].

1.4.2. Chuyển gen bằng sóng xung kích

Sóng xung kích (shock wave) là sóng cơ học sinh ra từ quá trình giải phóng năng lượng đột ngột trong một không gian hạn chế và được sử dụng thường xuyên trong chính hình điều trị các bệnh cơ xương khớp và trong tiết niệu để làm tan sỏi thận mà không cần phẫu thuật. Đối với các ứng dụng y sinh, sóng xung kích được tạo ra bằng cách sử dụng máy phát điện thủy lực, áp điện hoặc điện từ. Mỗi sóng xung kích bao gồm một đỉnh áp suất cao tới 150 MPa với thời gian pha là 0,5–3 μ s, tiếp theo là xung giảm áp lên đến -20 MPa với thời gian pha là 2–20 μ s. Sóng xung kích có thể gây ra sự gia tăng tính thấm của màng tế bào. Hiện tượng này được gọi là lỗ hồng âm thanh, là sự hình thành và sụp đổ dữ dội của các hạt nhỏ bên trong chất lỏng bao quanh các tế bào. Các hạt nhỏ không khí chứa trong huyền phù tế bào bị nén bởi đỉnh áp suất dương của mỗi sóng xung kích. Sau khi vượt qua một lần sóng xung kích, các bong bóng xuất hiện vào khoảng vài trăm μ s, bị vỡ nhanh chóng và phát ra phản lực tốc độ cao. Tác động này tạo ra các lỗ trong màng tế bào cho phép hấp thụ các đại phân tử có trong chất lỏng bao quanh tế bào. Việc đưa DNA ngoại lai vào tế bào bằng sóng xung kích đã được thử nghiệm thành công ở *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa* và *Salmonella typhimurium*. Ở nấm, 4 loài quan trọng trong công nghiệp và nông nghiệp là *A. niger*, *Trichoderma reesei*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Fusarium oxysporum* cũng đã được chuyển gen thành công với phương pháp sóng xung kích [91].

Phương pháp sóng xung kích có hiệu quả cao, nhanh chóng và có thể áp dụng cho một số loài nấm. So với các phương pháp phát triển trước đó, phương pháp sóng xung kích có nhiều ưu thế hơn, các thông số vật lý, tức là số sóng xung kích, năng lượng và tốc độ có thể được kiểm soát một cách chính xác. Trong các phương pháp đã được thiết lập, người ta thường sử dụng các enzyme phân giải thành tế bào để tạo điều kiện thuận lợi cho quá trình biến nạp, nhưng trong phương pháp này không cần thao tác với thành tế bào. Việc sử dụng hỗn hợp chứa enzyme để phân hủy thành tế bào nấm có thể có vấn đề. Khả năng sống của tế bào thường bị giảm mạnh sau khi được xử lý với enzyme và hoạt tính cụ thể của các enzyme phân hủy thành tế bào có thể khác nhau. Hơn nữa, đây là một quá trình tốn nhiều thời gian. Ngược lại, trong

các thí nghiệm sử dụng sóng xung kích, các bào tử nguyên vẹn được tiếp xúc trực tiếp với sóng xung kích và được cấy vào môi trường chọn lọc [91].

Mặc dù một lượng lớn DNA được sử dụng khi chuyển gen thông qua sóng xung kích, nhưng một phần lớn DNA này có thể bị hư hỏng trong quá trình xử lý. Do hiện tượng này, tần số biến nạp trên mỗi μg DNA là rất thấp so với các phương pháp khác. Tuy nhiên, nếu so sánh số lượng thể chuyển gen thu được trên số lượng tế bào được sử dụng, thì tần suất biến nạp với phương pháp này vẫn rất cao. Ở *F. oxysporum*, tần suất biến nạp cao hơn 30 lần so với giá trị được báo cáo với ATMT. Kết quả này là một sự cải thiện gấp 25.000 lần so với chuyển gen bằng cách sử dụng PMT. Ở *A. niger*, số lượng khuẩn lạc thu được cao hơn 280 và 5400 lần so với kết quả được báo cáo với PMT và ATMT. Ở *T. reesei*, hiệu quả chuyển gen cao hơn 100 lần so với ATMT và 500 lần so với PMT. Với *P. chrysosporium*, tần số biến nạp cao hơn khoảng 160 đến 280 lần so với sử dụng ATMT và PMT [91]. Việc sử dụng các phương pháp vật lý để biến nạp bất kỳ sinh vật nào thường dẫn đến đồng tích hợp các gen chuyển thành nhiều bản sao tại một vị trí di truyền duy nhất, điều này có thể gây ra sự bất ổn định về gen và làm bất hoạt gen. Do đó, ATMT vẫn là phương pháp có nhiều ưu thế vì khả năng phục hồi các thể chuyển gen với các bản sao chép đơn lẻ. Ngoài ra, phương pháp sử dụng sóng xung kích yêu cầu thiết bị chuyên dụng là máy tạo sóng xung kích, thường không thích hợp cho các phòng thí nghiệm vừa và nhỏ [91].

1.4.3. Chuyển gen thông qua tế bào trần (protoplast-mediated transformation, PMT)

Trong số các phương pháp chuyển gen khác nhau, PMT là phương pháp được sử dụng nhiều nhất đối với các loài nấm nói chung và đối với các loài thuộc chi *Aspergillus* nói riêng. PMT đã được sử dụng để chuyển một plasmid chứa gen mã hóa cho acetamidase vào *A. nidulans* [144]. Quy trình này sau đó đã được cải tiến và áp dụng cho một số loài thuộc chi *Aspergillus* khác. Sau khi tạo tế bào trần, dung dịch chứa tế bào trần được trộn với DNA ngoại lai (sản phẩm PCR hoặc plasmid) với nồng độ PEG cao (40–50%) và CaCl_2 để tạo ra sự hấp thu DNA và tăng tính thấm của màng. Tế bào trần nhạy cảm với các yếu tố stress thẩm thấu, vì vậy, trong quá trình

chuẩn bị và tái tạo, các chất ổn định thẩm thấu như KCl và sorbitol nên được thêm vào dung dịch đệm và môi trường chọn lọc [144].

Nhìn chung, PMT được sử dụng rộng rãi trong chuyển gen ở nhiều loại nấm sợi vì phương pháp này không đòi hỏi thiết bị đắt tiền và quy trình chuyển gen tương đối đơn giản. Ngoài ra, không nhất thiết phải sử dụng vector để can thiệp di truyền. Tuy nhiên, để đạt được thành công trong quá trình biến nạp, điều kiện nuôi cấy, thành phần đệm và các enzyme phân giải thành tế bào cần được tối ưu cho từng loài. Đối với một số loài nấm thuộc chi *Aspergillus*, bao gồm *A. nidulans*, *A. oryzae*, và *A. fumigatus*, quy trình PMT đã được thiết lập khá tốt, nhưng vẫn cần tối ưu các điều kiện, đặc biệt là vấn đề enzyme ly giải để có hiệu suất biến nạp cao nhất [169].

1.4.4. Chuyển gen thông qua vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens* (*Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation, ATMT)

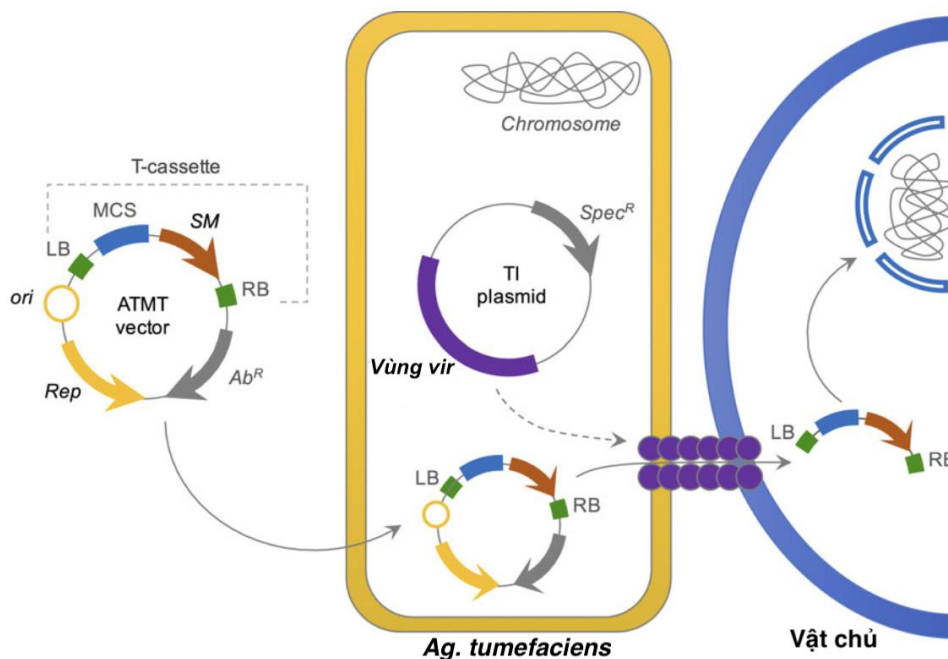
Vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens*

Vi khuẩn *Ag. tumefaciens* gây ra sự phát triển không kiểm soát được của mô thực vật và gây bệnh phá huỷ cây. Chi *Agrobacterium* có mối quan hệ chặt chẽ với chi *Rhizobium*, cả hai đều thuộc họ *Rhizobiaceae*. Một số nghiên cứu đã đề nghị đổi tên *Ag. tumefaciens* thành *Rhizobium radiobacter*. Tuy nhiên, việc này vẫn còn nhiều tranh cãi và cộng đồng khoa học sử dụng loài này làm công cụ chuyển gen vẫn sử dụng tên *Ag. tumefaciens* [65].

Ag. tumefaciens gây ra khối u trên thực vật bằng cách chuyển một phần DNA của nó (T-DNA), nằm trên một plasmid gây ra khối u (Ti) cho vật chủ. Các gen nằm trên T-DNA này mã hoá các enzyme tác động đến việc sản xuất các chất điều hòa sinh trưởng thực vật và sự biểu hiện của các gen này dẫn đến sự tăng trưởng không kiểm soát của các tế bào thực vật, tạo thành khối u [99]. Khả năng chuyển DNA của *Ag. tumefaciens* đã được sử dụng rộng rãi để chuyển gen ở thực vật và ứng dụng trong nghiên cứu và công nghệ sinh học thực vật. Quá trình chuyển gen thông qua vi khuẩn *Ag. tumefaciens* cụ thể được minh họa trong Hình 1.5 [114].

Trong 2 thập kỷ qua, các vật chủ không còn chỉ là thực vật. Rất nhiều sinh vật nhân thực và thậm chí sinh vật nhân sơ có thể chuyển gen thông qua *Agrobacterium* trong điều kiện phòng thí nghiệm. Kể từ khi công trình chuyển gen tiên phong trên

nấm sợi thành công vào năm 1998, một số loại nấm sợi đã được sử dụng làm vật chủ cho việc chuyển gen thông qua *Agrobacterium*. Cho đến nay, phương pháp này đã trở thành công cụ hiệu quả để thao tác gen ở nhiều loại nấm [41].



Hình 1.5. Quá trình chuyển gen thông qua vi khuẩn *Agrobacterium* [114]

Các vector ATMT chứa T-cassette, bao gồm vùng trình tự nhận biết trong *Ag. tumefaciens* ở 2 đầu (LB và RB), các vị trí đa điểm cắt (MCS) và marker chọn lọc (SM). Vector này sau đó được đưa vào chủng *Ag. tumefaciens* thích hợp. Thông qua cơ chế chuyển gen ở *Ag. tumefaciens*, T-cassette có thể được đưa vào các vật chủ như nấm và thực vật.

Các chủng *Ag. tumefaciens* dùng cho chuyển gen

Có nhiều chủng *Ag. tumefaciens* đã được sử dụng để chuyển gen ở nấm, bao gồm LBA4404, LBA1100, EHA105, C58C1, GV3101 và AGL1. Trong một số trường hợp, các thể chuyển gen có thể thu được từ các chủng *Ag. tumefaciens* khác nhau, nhưng hiệu quả chuyển gen của các chủng này khác nhau đáng kể. Ví dụ, chủng *Ag. tumefaciens* EHA105 đã được chứng minh là chuyển T-DNA vào *Penicillium marneffei* tốt hơn chủng LBA4404 [164]. Khi chuyển gen ở *Sporothrix schenckii*, chủng AGL1 cho hiệu suất chuyển gen cao gấp 4 lần so với chủng EHA105 và gấp 10 lần so với chủng LBA4404 [165]. Tuy nhiên, khi chuyển gen ở *Talaromyces*

marneffeii, số lượng thể chuyển gen thu được cao hơn gấp 3 lần với EHA105 so với AGL1 khi áp dụng phương pháp đồng nuôi cây rấn [158]. Các kết quả cho thấy sự kết hợp giữa chủng nấm và chủng *Ag. tumefaciens* là một yếu tố quan trọng để chuyển gen thành công [159].

Hệ thống vector nhị thể

Năm 1983, Hoekema, de Framond và cộng sự đã tạo ra một bước đột phá cho phép các phòng thí nghiệm sử dụng *Agrobacterium* để chuyển gen. Vùng *vir* và T-DNA của Ti-plasmid có thể được tách ra và nằm trên hai replicon, hay còn gọi là hệ thống nhị thể T-DNA. Các gen mong muốn có thể dễ dàng được tích hợp vào các vùng T-DNA nhỏ trong các vector nhị thể phù hợp. Sau khi xác minh cấu trúc ở *E. coli*, vector nhị thể T-DNA có thể dễ dàng được chuyển vào *Agrobacterium* có chứa vùng trợ giúp *vir* (Hình 1.5). Cả vector nhị thể T-DNA và các chủng *Agrobacterium* có chứa sẵn plasmid *vir* helper đã trở nên ngày càng phù hợp cho các mục đích chuyên biệt [81].

Ưu điểm của phương pháp ATMT

ATMT có nhiều ưu điểm vượt trội mặc dù phương pháp này xuất hiện muộn hơn so với phương pháp PMT. Khi sử dụng ATMT, không cần phải tạo tế bào trần bằng cách loại bỏ thành tế bào nấm. Các nguyên liệu ban đầu khác nhau như nguyên sinh chất, bào tử, sợi nấm và mô thể quả có thể được sử dụng cho ATMT [99]. Hơn nữa, hiệu quả chuyển gen sử dụng ATMT thường cao hơn. Ở *A. awamori*, hiệu suất chuyển gen sử dụng ATMT cao hơn tới 600 lần so với PEG [41]. Ngoài ra, việc xóa bằng ATMT thường đạt được kết quả tốt hơn với 97%, trong khi PEG có hiệu quả xóa chỉ từ 1-50% ở *Penicillium chrysogenum* [40].

Một ứng dụng quan trọng khác của ATMT là sự tích hợp ngẫu nhiên của T-DNA vào hệ gen. Sự xuất hiện của ATMT chủ yếu thay thế cho sự tích hợp qua enzyme giới hạn trung gian (REMI) để gây đột biến chèn ở nấm. Có thể sử dụng phương pháp gây đột biến chèn nhờ *Agrobacterium* trong nấm để xác định và phân lập các đột biến có kiểu hình mong muốn và sau đó làm sáng tỏ các chức năng gen như gen laccase (LAC1), gen mã hóa kênh cổng điện thế clorua (CLC1) trong việc kiểm soát đáp ứng ánh sáng (BWC2) [99]. Đột biến chèn cũng được áp dụng để khám

phá các gen tiềm năng cần thiết để sàng lọc các chủng đột biến không gây bệnh hoặc ít độc tính của *Penicillium digitatum* trên quả có múi [152].

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*. Sự dễ dàng trong thao tác và hiệu suất chuyển gen tương đối cao của ATMT có thể làm cho phương pháp này trở thành một công cụ hữu ích trong các thí nghiệm gây đột biến đích [99].

Với sự sẵn có của trình tự hệ gen của nấm, sự phát triển của các hệ thống promoter cảm ứng, các marker chọn lọc hoặc cách thức chỉnh sửa gen CRISPR-Cas đã giúp ATMT trở thành một công cụ mạnh trong việc can thiệp gen ở các loài nấm. Nhiều đột phá hơn có thể được phát hiện và được áp dụng trong công nghiệp, nghiên cứu cơ chế gây bệnh và các tác động giả định của thuốc ở nhiều loại nấm [65].

Tình hình nghiên cứu chuyển gen ở một số loài nấm sợi sử dụng phương pháp ATMT ở Việt Nam

Hiện nay, phương pháp ATMT đã được sử dụng ở Việt Nam trong chuyển gen ở nhiều loài nấm sợi như *P. digitatum*, *P. chrysogenum*, *P. lilacinum*, *A. oryzae* với hiệu suất chuyển gen vượt trội [152, 153]. Đặc biệt, khi sử dụng marker chọn lọc là gen *pyrG* trong chuyển gen ở *P. lilacinum*, hiệu suất chuyển gen có thể đạt tới hơn 2800 thể chuyển gen/ 10^6 bào tử nấm [18]. Đối với *A. oryzae*, hiệu quả chuyển gen dao động tùy chủng, nhưng có thể đạt được hơn 1000 thể chuyển gen/ 10^6 bào tử nấm [106]. Đặc biệt, ATMT là một phương pháp phù hợp để xóa gen *pyrG* ở nấm sợi *A. oryzae*. Trong đó, 100% các thể chuyển gen kháng 5-FOA thu được đều là chủng đột biến xóa *pyrG*. So với việc gây đột biến ngẫu nhiên, việc xóa toàn bộ gen *pyrG* khỏi hệ gen *A. oryzae* bằng cách tái tổ hợp tương đồng có thể tạo ra các chủng đột biến khuyết dưỡng uridine/uracil ổn định [106]. Bên cạnh việc biểu hiện các gen mã hoá cho protein phát huỳnh quang, hệ thống chuyển gen dựa trên cơ chế trợ dưỡng uridine/uracil đã cho phép biểu hiện thành công enzyme laccase tái tổ hợp ở một số chủng *A. oryzae* [143]. Tuy nhiên, sử dụng ATMT trong chuyển gen ở *A. niger* vẫn

còn nhiều hạn chế với hiệu quả chuyển gen thấp và cần nồng độ cao kháng sinh cho chọn lọc các thể chuyển gen.

1.5. Marker chọn lọc dùng trong chuyển gen

Chuyển gen thành công ở nấm đòi hỏi phải có marker chọn lọc phù hợp để chọn lọc các thể chuyển gen và loại bỏ các tế bào không nhận được cấu trúc cần chuyển. Hiện nay, marker chọn lọc được chia thành 2 nhóm chính là gen kháng thuốc và gen dinh dưỡng.

1.5.1. Marker chọn lọc là gen kháng thuốc

Marker thường được sử dụng ở cả thực vật và nấm là gen *hygromycin phosphotransferase* (*hph* hoặc *hpt*) từ *E. coli* có khả năng kháng với hygromycin B. Các trình tự *hph* được tìm thấy trong hầu hết các vector nhị thể để chuyển gen nấm có nguồn gốc từ vector pAN7-1 và bao gồm promoter *A. nidulans* (*An*) *glyceraldehyde dehydrogenase* (*gpdA*) và terminator *anthranilate synthase* (*trpC*). Gen kháng thuốc này đã được sử dụng thành công với *Ascomycetes*, nhưng vẫn còn hạn chế trong *Basidiomycetes* [52].

Nourseothricin (NTC) là một chất chuyển hóa được sản xuất bởi *Streptomyces noursei*. NTC thuộc nhóm kháng sinh streptothricin - aminoglycoside có tác dụng ức chế tổng hợp protein. NTC N-acetyl transferase (NAT) có nguồn gốc từ *S. noursei* làm bất hoạt NTC bằng cách acetyl hóa nhóm beta-amino của dư lượng beta-lysine. NAT đã được sử dụng làm marker chọn lọc cho chuyển gen ở nhiều loại sinh vật bao gồm vi khuẩn, nấm, tế bào thực vật và động vật có vú. Ở nấm sợi *P. digitatum*, hiệu suất chuyển gen có thể đạt tới hơn 1000 thể chuyển gen cho 10^6 bào tử nấm khi NAT được lựa chọn làm marker chọn lọc [152]. Bên cạnh đó, các gen kháng thuốc như hygromycin, phleomycin, pyriithiamine đã được sử dụng để chuyển gen ở nhiều loài nấm sợi thuộc chi *Aspergillus* như *A. fumigatus*, *A. oryzae*, *A. nidulans*, *A. flavus* và *A. terreus* [151].

Một loạt các gen kháng kháng sinh khác nhau được sử dụng để chọn lọc giúp đạt được các kỹ thuật sinh học phân tử tiên tiến hơn, chẳng hạn như gây đột biến ngẫu nhiên, sau đó là bổ trợ gen và kết hợp biểu hiện quá mức và xóa gen hoặc xóa nhiều gen. Mặc dù các marker là gen kháng thuốc có ưu điểm là không cần phải xác định

đầy đủ đặc tính của vật chủ, các alen kháng thuốc là nguyên nhân dẫn đến sự biến đổi chủng hoang dại thành kháng thuốc. Một nhược điểm khác là những khó khăn trong sàng lọc vì các alen kháng có thể không cho thấy sự khác biệt đáng kể so với các alen kiểu hoang dại. Các hợp chất để chọn lọc thường rất tốn kém, làm tăng chi phí cho môi trường chọn lọc. Ngoài ra, một số marker chọn lọc như *OliC* thường mang tính đặc hiệu loài [157].

1.5.2. Marker chọn lọc là gen dinh dưỡng

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. Ngoài ra, các marker trợ dưỡng như *URA3* và *TRP1* đã được sử dụng thành công để chuyển gen ở nấm men *S. cerevisiae*. Các marker trợ dưỡng uracil cũng đã được sử dụng trong quá trình chuyển gen thông qua *Agrobacterium* ở nấm sợi [99]. 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 chủng đột biến khuyết dưỡng uracil có thể được bổ 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 chủng đột biến xóa đa gen. Hơn nữa, nếu có thể sử dụng nhiều marker chọn lọc trên một cùng một vật chủ, thì việc tạo ra nhiều đột biến xóa gen hoặc các chủng bổ trợ rất thuận tiện và hiệu quả [112]. Các hệ thống này thường hiệu quả và có giá thành thấp, nhưng yêu cầu về sự sẵn có và tạo ra các chủng gây khó khăn trong việc chuyển gen ở một loài mới trong lần đầu tiên. Đối với *A. oryzae*, là loài có khả năng kháng với hầu hết các loại kháng sinh thông thường như hygromycin B, geneticin (G418), bleomycin và phleomycin, hệ thống marker trợ dưỡng đã được phát triển [106]. Ở *A. oryzae*, các marker chọn lọc như *pyrG*, *argB*, *niaD*, và *adeA* đã được sử dụng cho chuyển gen. Đối với *A. niger*, số lượng marker là gen dinh dưỡng hiện bị giới hạn ở một số lượng nhất định, bao gồm *pyrG*, *trpC*, *amdS*, *niaD*, *sC*, *agaA*, *argB*, *nicB*, *adeA* và *hisB* [49]. Mặc dù việc tái sử dụng marker chọn lọc bằng hệ thống Cre/loxP đã được thiết lập cho các loài nấm thuộc chi *Aspergillus*, nhưng hệ thống này thường

có hiệu suất tái tổ hợp thấp (5 - 20%). Cho đến nay, trong tập hợp các marker dinh dưỡng có sẵn cho *A. niger*, chỉ vị trí của gen (locus) *pyrG* và *agaA* là đáp ứng yêu cầu cho việc tích hợp tương đồng hiệu quả cao [49].

Marker *pyrG*

Gen *pyrG* mã hóa orotidine-5-monophosphate (OMP) decarboxylase. Đây là một loại enzyme của con đường sinh tổng hợp pyrimidine, đóng vai trò quan trọng đối với sự tổng hợp uridine. Axit 5-fluorotic (5-FOA) ức chế sự tăng sinh tế bào ở hầu hết các sinh vật bằng cách đi vào con đường tổng hợp pyrimidine và được chuyển hoá thành chất tương tự pyrimidine là fluoroorotidine monophosphate. Khả năng kháng với 5-FOA có thể đạt được bằng cách ngăn chặn con đường pyrimidine thông qua sự bất hoạt đột biến orotidine-5-monophosphate (OMP) decarboxylase. Ở nấm sợi, các thể đột biến khuyết dưỡng pyrimidine thu được thông qua việc bất hoạt gen OMP decarboxylase (thường là gen *pyrG*). Ở *A. niger*, cũng như ở các loại nấm khác, marker chọn lọc *pyrG* rất phổ biến vì đây là một marker dinh dưỡng có thể được bổ trợ bằng uridine hoặc uracil. Một ưu điểm khác của marker *pyrG* so với các marker trợ dưỡng khác là nó có thể được chọn lọc ngược và có thể thu được các đột biến *pyrG* bằng cách phân lập các đột biến kháng 5-fluoro-orotic. Ngoài ra, chủng đột biến *pyrG* AB4.1 thường được sử dụng trong cải biến di truyền ở *A. niger* và cho hiệu quả tốt [10]. Đột biến hỏng gen *pyrG* kháng 5-FOA đã được báo cáo ở các nhiều loài nấm khác nhau bao gồm *A. aculeatus*, *A. niger*, *Sclerotinia sclerotiorum*, và *T. reesei*. Hầu hết các thể đột biến gen *pyrG* được phân lập sau khi gây đột biến bằng tia cực tím (UV) hoặc hóa học. Các thể đột biến được tạo ra theo những cách này thường không ổn định (dễ quay lại dạng hoang dại) và có thể bao gồm nhiều đột biến không mong muốn. Ngược lại, các thể đột biến được tạo ra bằng cách xoá gen có định hướng sẽ ổn định. Tuy nhiên, việc gây đột biến gen theo cách này sẽ khó hơn [10].

pyrG đã được chứng minh là marker hiệu quả cho chuyển gen. Marker *pyrG* từ loài nấm này có thể bổ sung cho thể đột biến hỏng gen *pyrG* ở loài nấm khác. Các gen *A. nidulans pyrG* và *N. crassa pyr-4* đều có thể bổ trợ cho các thể đột biến khuyết dưỡng uridine/uracil ở cả *A. nidulans* và *N. crassa pyr-4* [145]. Bên cạnh đó, hiệu suất điện biến nạp có thể lên tới 3400 thể điện biến nạp/10⁸ conidia hoặc 1700 thể

điện biến nạp/ μg DNA [145]. Hiệu suất chuyển gen sử dụng marker *pyrG* cũng có thể đạt tới hơn 1000 thể chuyển gen/ 10^6 bào tử ở nấm *A. oryzae* [106].

Marker *hisB*

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. Ở một số vi khuẩn γ -proteobacteria, IGPD là một enzyme có hoạt tính hisprisol phosphatase. Con đường sinh tổng hợp histidine cũng đã được nghiên cứu ở *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Corynebacterium glutamicum*, *A. nidulans* và *A. fumigatus* [49]. Không có sinh vật nào trong số các sinh vật này bị xóa các gen mã hóa cho IGPD dẫn đến các kiểu hình khác biệt, ngoại trừ khuyết dưỡng histidine. 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*. Marker *hisB* đã được sử dụng cho các nghiên cứu biểu hiện gen và xóa gen ở *A. niger*. Ngoài ra, khi sử dụng gen báo cáo luciferase, mức độ biểu hiện gen 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 [49].

1.6. Một số protein điều hoà quan trọng ở nấm sợi *Aspergillus*

Các protein điều hoà còn gọi là yếu tố điều hoà (transcription factors, viết tắt là TFs) là các protein có khả năng liên kết với phân tử DNA tại các trình tự điều hoà *cis* (cis-regulatory sequences, CRS) của gen đích. Liên kết TF-CRS ngăn chặn hoặc thúc đẩy quá trình phiên mã nhờ RNA polymerase. Tác động của các protein điều hoà không mang tính riêng lẻ mà mang tính cộng hợp. Các mạng lưới điều hoà biểu hiện gen được hình thành bởi nhiều protein điều hoà và protein liên kết. Việc sửa đổi trình tự, bất hoạt, hoặc biểu hiện quá mức gen mã hóa protein điều hoà nhằm đánh giá chức năng của các protein này có thể giúp làm sáng tỏ các cơ chế kiểm soát điều hoà biểu hiện gen ở nấm sợi [119].

1.6.1. AmyR

Việc điều hòa sự biểu hiện của gen phân giải tinh bột (amylolytic) ở *A. oryzae* liên quan trực tiếp đến quá trình sản xuất rượu sake. Sự biểu hiện của gen amylolytic được điều hòa trực tiếp bởi yếu tố phiên mã AmyR. Yếu tố phiên mã AmyR kiểu $Zn(II)_2Cys_6$ liên kết với trình tự CGGN8(C/A)GG trong vùng promoter của gen amylolytic, chẳng hạn như α -amylase (*amyA/B/C*), glucoamylase (*glaA* và *glaB*), và gen α -glucosidase (*agdA*). Sự biểu hiện của những gen này được cảm ứng bởi maltose, isomaltose và cũng bởi glucose khi có sự kìm hãm chất dị hoá cacbon. Gen *amyR* được biểu hiện liên tục, protein AmyR khu trú trong tế bào chất. AmyR nhanh chóng được chuyển vào nhân khi isomaltose được thêm vào môi trường. Glucose và maltose cũng tạo ra sự di chuyển của AmyR, nhưng những loại đường này đòi hỏi nồng độ cao hơn và khoảng thời gian dài hơn isomaltose để tạo ra sự dịch chuyển của AmyR và biểu hiện gen amylolytic [123].

Ngoài ra, promoter của gen α -amylase (*amyB*) cũng được sử dụng để nghiên cứu biểu hiện mức độ cao các protein khác nguồn ở *A. oryzae* [70]. Các promoter cải tiến như *glaA142* và *enoA142*, đã được xây dựng bằng cách chèn song song các trình tự liên kết AmyR (Vùng III) trong các promoter phục vụ biểu hiện glucoamylase và enolase. Các promoter này hiện được sử dụng trong sản xuất protein cùng nguồn và khác nguồn [70].

1.6.2. LaeA

Hầu hết các gen cấu trúc liên quan đến quá trình trao đổi chất thứ cấp của nấm được tập hợp và nằm trên cùng 1 locus. Sự điều hòa các cụm gen này phần lớn phụ thuộc vào các yếu tố phiên mã cụ thể, các protein điều hòa phổ biến và thường phụ thuộc vào các con đường dẫn truyền tín hiệu liên kết quá trình trao đổi chất thứ cấp với quá trình hình thành bào tử. Protein LaeA điều hòa nhiều cụm gen chuyển hóa thứ cấp ở *Aspergillus* [24]. Việc loại bỏ *laeA* làm giảm sản lượng nhiều chất chuyển hóa ở *A. nidulans*, *A. fumigatus* và *A. flavus*. Các chủng đột biến *laeA* đã được tạo ra trong nhiều nhà máy sản xuất tế bào nấm, được sử dụng để kích hoạt đồng thời sự hình thành sản phẩm tự nhiên và biến đổi hình thái ở nhiều loài khác nhau. Sự biểu hiện quá mức của gen này tăng cường quá trình sản xuất các chất chuyển hóa. Các

ortholog LaeA được tìm thấy trong tất cả các loại nấm sợi nhưng chức năng mới chỉ được xác định ở hầu hết các loài nấm thuộc chi *Aspergillus* [24].

Ở nấm *A. fumigatus*, LaeA đóng vai trò quan trọng trong sinh tổng hợp gliotoxin và các sắc tố sợi nấm. Protein này cũng liên quan trực tiếp tới khả năng gây bệnh của *A. fumigatus* và *A. flavus*. Ở *A. flavus*, *laeA* ảnh hưởng đến hình thái tế bào và góp phần tạo ra các chất chuyển hóa thứ cấp (SM) bao gồm aflatoxin, axit cyclopiazonic và aflatrem. *A. flavus* $\Delta laeA$ không thể sản sinh aflatoxin và không thể gây nhiễm hạt giống ở mức độ giống như các chủng hoang dại [88]. Việc loại bỏ *laeA* trong *A. carbonarius* dẫn đến việc giảm đáng kể sản xuất ochratoxin A ở quả xuân đào và nho [93]. Chủng đột biến $\Delta laeA$ không thể axit hóa mô khuẩn lạc một cách hiệu quả, do kết quả trực tiếp của việc giảm sản xuất axit gluconic, dẫn đến độc lực trên quả bị nhiễm bệnh giảm đi so với chủng hoang dại [93]. Hơn nữa, protein này cũng cần thiết để biểu hiện cụm gen lovastatin (*LOV*) tái tổ hợp ở *A. nidulans* cũng như để biểu hiện *LOV* bản địa ở *A. terreus* [24]. LaeA cũng đã được chứng minh là yếu tố kiểm soát quá trình sản xuất axit citric ở nấm sợi công nghiệp *A. niger* và nấm koji trắng *Aspergillus luchuensis* mut. *kawachii* (*A. kawachii*) dùng cho sản xuất rượu shochu [71, 111]. Điều thú vị là, protein này dường như bảo thủ ở nấm sợi, nhưng nó không có trong *S. cerevisiae*, một loại nấm không có chất chuyển hóa thứ cấp. Không giống như các gen khác quy định sự trao đổi chất thứ cấp, việc mất gen *laeA* có tác động không đáng kể đến các quá trình phát triển hình thái [24].

Sinh tổng hợp chất chuyển hóa thứ cấp thường liên quan đến sự hình thành bào tử và phát triển tế bào ở nấm sợi. Các quá trình phát triển này phản ánh nhu cầu tiếp cận nhiều chất dinh dưỡng; tối ưu hóa hình thái tế bào và sự phân hóa trao đổi chất để cạnh tranh hiệu quả trong môi trường phức tạp. Việc xác định được các cơ quan điều hòa phổ biến cụ thể về trao đổi chất thứ cấp có thể tách rời quá trình điều hòa và trao đổi chất thứ cấp. Các protein điều hòa như vậy là cực kỳ mong muốn bởi vì chúng sẽ có tính đặc hiệu rộng để kích hoạt và/hoặc giảm biểu hiện của toàn bộ các cụm gen mã hoá cho chất chuyển hóa thứ cấp trong khi cung cấp các chủng có khả năng phát triển và tăng trưởng bình thường hoặc gần bình thường. Việc xác định các yếu tố điều hoà như vậy sẽ cho phép tăng cường sản xuất các chất chuyển hóa

thứ cấp bằng cách cung cấp các chủng sinh vật biến đổi gen được cải thiện và cũng sẽ góp phần vào sự hiểu biết rộng rãi hơn về cơ chế phân tử mà các chất chuyển hóa thứ cấp được tạo ra. Protein LaeA là một trong những yếu tố điều hoà đáp ứng được những yêu cầu như trên [24].

1.6.3. PrtR/PrtT

Ở *A. oryzae*, PrtR là protein điều hoà phiên mã thuộc họ $Zn(II)_2Cys_6$. Protein này điều hoà sự biểu hiện của các gen mã hóa enzyme phân giải protein ngoại bào. Việc loại bỏ gen *prtR* tương ứng dẫn đến sự suy giảm đáng kể hoạt tính protease ngoại bào. Điều thú vị là gen *prtR* nằm liền kề với cụm gen liên quan đến phân giải tinh bột (amylolytic) bao gồm *amyR*, *agdA* và *amyA* [57]. Các protein tương đồng (ortholog) của PrtR cũng được tìm thấy trong hệ gen của các loài *Aspergillus* khác và được đặt tên là PrtT [128]. Sự sao chép hoặc nhân đôi vùng nhiễm sắc thể chứa gen *prtR* đã làm gia tăng đáng kể hoạt tính của protease kiềm và axit carboxypeptidase trong môi trường nuôi cấy rắn ở nấm *A. oryzae* [139]. Mức độ biểu hiện của gen protease kiềm (*alpA*) tăng hơn 5 lần khi *prtR* được tăng biểu hiện dưới sự điều hoà của promoter từ gen α -amylase [139]. Ngoài ra, mức độ biểu hiện của 2 trong số 3 gen vận chuyển di/tripeptit (*potA* và *potB*) cũng tăng lên khi *prtR* được biểu hiện quá mức và giảm đi khi gen *prtR* bị bất hoạt [142]. Những kết quả này cho thấy PrtR đóng vai trò trung tâm trong việc điều hoà biểu hiện các gen liên quan đến phân giải protein. Trên thực tế, thể đột biến hỏng gen *prtR* phát triển kém khi được nuôi cấy ở trạng thái rắn sử dụng cám lúa mì làm chất nền. Ở *A. niger* và *A. fumigatus*, PrtT quy định sự biểu hiện của nhiều gen protease và gen vận chuyển tri/tetrapeptit. Các ortholog của PrtR hoặc PrtT không có ở *A. nidulans* [128]. Việc hỏng nhiều gen mã hoá cho protease đã giúp cho sản xuất protein khác nguồn hiệu quả cao ở *A. oryzae* [70].

1.6.4. StuA

Các yếu tố phiên mã thuộc họ APSES (Asm1p, Phd1p, Sok2p, Efg1p và StuAp) đã được chứng minh là yếu tố điều hoà chính đối với sự phát triển của nấm và bảo thủ ở nấm men, nấm sợi [168]. Hiện có các bằng chứng chứng minh rằng StuA bảo thủ và đóng vai trò trung tâm trong quá trình phát triển vô tính của nấm cũng như trong quá trình phát triển của nhiều loài nấm sợi [168]. Ở *A. nidulans*, StuA kiểm soát

sự biểu hiện của cả gen điều hòa phát triển quan trọng *brlA* và *abaA* và các gen liên quan tới chu kỳ tế bào. StuA liên kết trực tiếp với motif bảo thủ (A/TCGCGT/ANA/C), để kiểm soát quá trình phát triển của nấm. Ngoài ra, StuA cũng điều hoà quá trình hình thành thành tế bào bằng cách ức chế biểu hiện *fkxA* (mã hóa β -1,3-glucan synthase) trong quá trình phát triển vô tính [117]. StuA có thể gián tiếp điều hoà quá trình sinh tổng hợp aflatoxin ở *A. flavus* bằng cách điều hoà sự chuyển hóa glutamine. StuA cũng đóng vai trò quan trọng trong quá trình sinh tổng hợp axit cyclopiazonic ở *A. flavus*. Gần đây, một yếu tố phiên mã APSES giả định cũng đã được chứng minh là cần thiết cho sự tăng trưởng và phát triển ở *A. nidulans* [80]. Tuy nhiên, ngoài StuA, vai trò điều hoà của các yếu tố phiên mã APSES khác vẫn chưa được hiểu rõ trong quá trình sinh tổng hợp các sản phẩm trao đổi chất thứ cấp [168].

1.6.5. VeA

VeA được biết đến là có vai trò kích hoạt quá trình sinh sản hữu tính và ức chế sinh sản vô tính phụ thuộc vào ánh sáng ở nấm. Vai trò của gen *veA* đối với sinh sản hữu tính đã được Kim và cộng sự làm rõ bằng cách tạo ra các chủng đột biến xoá gen và biểu hiện quá mức [75]. Chủng đột biến loại bỏ *veA* (ΔveA) không thể hình thành quả thể ngay cả trong các điều kiện thúc đẩy sinh sản hữu tính. Tác động ngược lại đã được quan sát thấy khi *veA* được biểu hiện quá mức, với sự gia tăng sự hình thành các cấu trúc sinh sản hữu tính kèm theo giảm hình thành bào tử đỉnh ngay cả trong những điều kiện bất lợi cho sự hình thành các cấu trúc sinh sản hữu tính và thuận lợi cho hình thành bào tử đỉnh (nồng độ muối cao). Biểu hiện quá mức VeA ở *A. nidulans* cũng tạo ra các tế bào Hülle (tế bào nuôi dưỡng liên quan đến sự hình thành vách ngăn) và cleistothecia trong môi trường nuôi cấy lỏng. Việc phân tích kiểu hình của những cá thể này đã xác nhận rằng VeA là protein điều hòa dương của quá trình sinh sản hữu tính và đồng thời là yếu tố điều hoà âm của quá trình sinh sản vô tính. Ngoài ra, *veA* có vai trò điều hoà sự biểu hiện của gen mã hoá cho yếu tố phiên mã sinh sản vô tính BrlA [72]. Một ortholog của *veA* cũng đã được xác định trong tác nhân gây bệnh cơ hội *A. fumigatus*. Ở loài nấm này, mặc dù sự biểu hiện quá mức *veA* không dẫn đến bất kỳ kiểu hình rõ ràng nào, nhưng việc xoá bỏ *veA* dẫn đến giảm khả năng

hình thành bào tử trên môi trường chứa nitrat, chứng minh rằng VeA có thể hoạt động trong quá trình chuyển hóa nitơ [76]. Bên cạnh vai trò điều hòa hình thái, *veA* còn có chức năng như một yếu tố kiểm soát quá trình sinh tổng hợp các chất chuyển hóa thứ cấp, bao gồm độc tố nấm và kháng sinh [46].

1.7. Các chiến lược tăng cường sản xuất enzyme/protein ở *A. oryzae* và *A. niger*

Sàng lọc các chủng có năng suất cao rất quan trọng trong biểu hiện enzyme tái tổ hợp. Để cải thiện hơn nữa việc sinh tổng hợp 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.

1.7.1. Tối ưu hóa cấu trúc biểu hiện gen

Sử dụng promoter mạnh

Trong các nghiên cứu trước đây, *gpdA* là một trong những promoter biểu hiện mạnh ở *A. oryzae* và *A. niger* [50]. Promoter *mbfA*, mạnh hơn *gpdA* trong môi trường tối thiểu với glucose là nguồn cacbon đã được xác định ở *A. niger* ATCC 1015 [20]. Ngoài các promoter cơ định này, một loạt các promoter cảm ứng cũng đã được xác định ở *A. niger*, như 1,3-beta-glucanosyltransferase (được tạo ra bởi pH thấp), benzoat hydroxylase (được tạo ra bởi axit benzoic, metyl benzoat và para-aminobenzoat), catalase (cảm ứng bởi H₂O₂ và CaCO₃) và các promoter dựa trên Tet-On (được tạo ra bởi tetracycline hoặc dẫn xuất doxycycline) [96]. Trong điều kiện cảm ứng cụ thể, các promoter cảm ứng có thể có hiệu quả như các promoter biểu hiện liên tục. Ngoài việc phát hiện ra các promoter mới, giải pháp chỉnh sửa gen đã được sử dụng để cải thiện quá trình phiên mã ở nấm sợi [96].

Cải biến vùng 5' không dịch mã

Vùng 5' không dịch mã (5'-UTR) thường là vùng nằm giữa vị trí bắt đầu phiên mã và codon bắt đầu dịch mã. Để cải thiện việc sản xuất enzyme, có thể điều khiển vùng 5'-UTR thông qua việc thay thế vùng 5'-UTR từ các nguồn khác hoặc gây đột biến định hướng. Dưới sự điều hòa của promoter *glaA*, sản lượng enzyme oxidase đa đồng giống với laccase MCOB ở *A. niger* N593 được tăng cường 41–159% sau khi thay thế vùng 5'-UTR ban đầu bằng *ntp303* (gen phấn hoa thuốc lá) và chèn thêm

trình tự poly (CAA) [141]. Gây đột biến ngẫu nhiên trong 5'-UTR đã được sử dụng để cải thiện sản xuất enzyme ở vi khuẩn. Với sự cải tiến của tốc độ biến nạp và công nghệ sàng lọc thông lượng cao, việc xây dựng thư viện 5'-UTR thông qua gây đột biến ngẫu nhiên sẽ giúp ích hơn nữa cho việc sản xuất enzyme ở *A. oryzae* và *A. niger* [83].

Chỉnh sửa khung đọc mở

Với các thành phần biểu hiện và vật chủ giống nhau, các gen khác nhau thường có các mức độ biểu hiện khác nhau, cho thấy vai trò quan trọng của trình tự gen đích trong biểu hiện protein. Sự biểu hiện các protein khác nguồn có thể được tăng cường đáng kể khi protein đó được dung hợp với một chuỗi các protein được biểu hiện quá mức. GlaAG1, miền xúc tác của GlaA (1–489), đã được sử dụng để cải thiện sự biểu hiện tái tổ hợp ở *A. niger* bằng cách hợp nhất nó với đầu N của các enzyme đích. Bằng cách làm này, sản lượng protein khác nguồn như phospholipase A2 tụy lợn, interleukin-6 ở người và lysozyme lòng trắng trứng gà đã được tăng lên gấp 1000 lần. Sự kết hợp với GlaAG1 có thể cải thiện quá trình glycosyl hóa enzyme và quá trình tiết ở *A. niger* [44].

Tăng số bản sao và vị trí sao chép gen

Tương tự như sự biểu hiện của protein ở các vật chủ khác, sự gia tăng số lượng bản sao gen mã hoá cho protein cần biểu hiện có thể tăng cường hiệu suất ở *A. oryzae* và *A. niger*. Tuy nhiên, số lượng bản sao cao cũng không đảm bảo năng suất protein cao. Ví dụ, 10 - 12 bản sao của gen mã hoá cho lysozyme lòng trắng trứng tạo ra khoảng 70 mg/l enzyme, trong khi 20–25 bản sao chỉ thu được 8,6–9,6 mg/l enzyme [68]. Tại một vị trí gen đơn lẻ, số lượng bản sao gen hợp lý để biểu hiện protein là ít hơn 10 [50]. Ở các chủng hoang dại, các locus gen của các protein biểu hiện ở mức độ cao (locus amylase) có hiệu suất dịch mã cao hơn so với các locus khác. Do đó, các vị trí tích hợp đóng một vai trò thiết yếu trong việc biểu hiện enzyme [68]. Các locus *glaA* và α -*amylase* là hai vị trí tích hợp được sử dụng rộng rãi để biểu hiện quá mức các gen khác nguồn. Sự tích hợp đồng thời của các gen khác nguồn tại các locus này nói chung đã giúp gia tăng đáng kể khả năng sản xuất enzyme ở *A. niger*. Việc bổ sung gen glucose oxidase tại các locus *glaA* và α -*amylase* đã làm tăng sản xuất

enzyme gấp 4 lần so với chủng tích hợp với gen glucose oxidase ở một vị trí α -amylase. Năng suất tổng hợp trehalase đã tăng lên gấp 4,8 lần sau khi chỉ thêm 1 bản sao gen mã hoá cho enzyme này tại một vị trí α -amylase khác. *A. niger* NRRL 3122 với 1 bản sao *glaA* đã được thực hiện nhiều đợt gây đột biến cổ điển để tạo ra chủng đột biến *A. niger* GAM-53 với 7 bản sao của gen *glaA*, rất thích hợp cho sản xuất công nghiệp các enzyme thực phẩm. Bằng cách tiến hành xóa 7 gen mã hoá cho *GlaA* và các cải biến di truyền khác trong *A. niger* GAM-53, chủng mới tạo *A. niger* ISO-502 có thể cung cấp 7 locus *glaA* cho biểu hiện tích hợp. *A. niger* ISO-502 đã được sử dụng thành công để sản xuất một loạt các enzyme thực phẩm, chẳng hạn như xylanase, acid lactase, asparaginase, peroxidase, carboxypeptidase, lipase và phospholipase A2 [83].

1.7.2. Giảm sự phân hủy protein ngoại bào

Nói chung, cả *A. oryzae* và *A. niger* hoang dại tiết ra một lượng lớn protease, không có lợi cho biểu hiện enzyme tái tổ hợp. Aspergillopepsin A (PepA) là một trong những protease quan trọng nhất, chiếm 80–85% tổng hoạt tính của protease ở *A. niger*. Ngoài PepA, các protease giống pepsin, chẳng hạn như PepAa, PepAb, PepAc và PepAd, cũng có tác động đáng kể đến sự phân giải của protein khác nguồn ở *A. niger* [156]. Bằng cách xóa *pepAa*, *pepAb* và *pepAd*, laccase từ *Trametes versicolor* đã tăng lên lần lượt là 21%, 42% và 30% trong *A. niger* GICC2773 [156]. Hoạt động của protease ở *A. oryzae* và *A. niger* cũng có thể bị giảm bởi các yếu tố phiên mã. Các nhà nghiên cứu đã xác định được yếu tố phiên mã đặc hiệu protease PrtR/PrtT, thuộc về protein điều hòa lớp Zn_2Cys_6 [128]. Ở *A. niger* HL-1, mức độ phiên mã của 32 gen protease, bao gồm các peptidase loại serine, endopeptidase loại aspartic, aminopeptidase và carboxypeptidase đều bị giảm mạnh ở chủng xóa gen *prtT* [61].

1.7.3. Cải biến hình thái học hệ sợi nấm

Hiện đã xác định được hàng loạt gen liên quan đến hình thái ở *A. niger*. *RacA* mã hóa Rho-GTPase quản lý việc duy trì phân cực bằng cách điều khiển actin. Việc loại bỏ *racA* gây ra tần suất phân nhánh cao hơn 30% và tạo ra các chủng có năng suất *GlaA* cao hơn 4 lần so với chủng hoang dại [47]. Cùng với sự hình thành kiểu

hình tăng nhánh và các viên nhỏ, quá trình điều hòa giảm *aplD* (mã hóa γ -adaptin giả định) cũng giúp tăng 2 lần tổng hàm lượng protein tiết [30]. Biểu hiện quá mức *arfA* (yếu tố ADP ribosyl hóa) làm giảm đáng kể đường kính viên và do đó làm tăng sản lượng của các enzyme ngoại bào [48]. Làm im lặng *chsC* (một yếu tố tổng hợp chitin loại III ở *A. niger*) không chỉ làm tăng tỷ lệ sợi nấm mà còn làm giảm độ chặt của viên giúp cải thiện hiệu suất truyền oxy và chất dinh dưỡng [137]. Ngoài sự hình thành các viên sợi nấm, tác động tiêu cực của sự hình thành bào tử đối với sự biểu hiện của protein cũng được nghiên cứu. 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 [78]. 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 [25]. Đột biến diethyl sulfite ở *T. reesei* đã tạo ra một chủng có sợi nấm ngắn, phân nhánh cao, tiết ra nhiều hơn 60% cellulase so với chủng phân lập từ tự nhiên [59]. Nhiều khả năng các yếu tố điều hòa 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 [60, 74].

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 [97]. Một loạt các enzyme sử dụng trong 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 làm 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 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. Các chủng vi sinh vật và vector sử dụng trong nghiên cứu

2.1.1. Các chủng vi sinh vật

Các chủng vi sinh vật sử dụng trong nghiên cứu này được liệt kê ở Bảng 2.1.

Bảng 2.1. Danh sách các chủng vi sinh vật khởi động

Tên chủng	Mô tả	Nguồn gốc
<i>E. coli</i> DH5 α	F ⁻ <i>endA1 hsdR17 supE44 thi-1 λ recA1 gyrA96 relA1 deoR Δ(lacZYA-argF)-U169 Φ80dlacZΔM15</i>	[58]
<i>Ag. tumefaciens</i> AGL1	C58, <i>recA::bla</i> , pTiBo542 Δ T-DNA, Mop ⁺ , Cb ^R	[79]
<i>A. oryzae</i> RIB40	Chủng <i>A. oryzae</i> phân lập từ tự nhiên	[89]
<i>A. oryzae</i> RIB40 Δ <i>pyrG</i>	Δ <i>pyrG</i>	[106]
<i>A. oryzae</i> RIB40 Δ <i>hisB</i>	<i>pyrG</i> ⁺ , Δ <i>hisB</i>	Nghiên cứu này
<i>A. oryzae</i> RIB40 Δ <i>hisB</i> Δ <i>pyrG</i>	Δ <i>hisB</i> , Δ <i>pyrG</i>	Nghiên cứu này
<i>A. oryzae</i> AUT1-PID	Chủng <i>A. oryzae</i> khuyết dưỡng uridine/uracil được cải biến từ chủng RIB40 với kiểu gen: <i>niaD</i> ⁻ <i>sC</i> ⁻ <i>adeA</i> ⁻ Δ <i>argB::adeA</i> Δ <i>tppA::argB</i> Δ <i>pepE::adeA</i> <i>aut1</i> ⁻ Δ <i>ligD</i> Δ <i>pyrG</i>	[169]
<i>A. oryzae</i> AUT1 Δ <i>hisB</i>	Chủng <i>A. oryzae</i> khuyết dưỡng histidine cải biến từ AUT1-PID với kiểu gen Δ <i>hisB::pyrG</i>	Nghiên cứu này
<i>A. oryzae</i> AUT1 Δ <i>hisB</i> Δ <i>pyrG</i>	Chủng <i>A. oryzae</i> khuyết dưỡng histidine và uridine/uracil cải biến từ AUT1-PID	Nghiên cứu này

<i>A. niger</i> CBS 113.46	Chủng <i>A. niger</i> phân lập từ tự nhiên	[7]
<i>A. niger</i> CBS 113.46 Δ <i>pyrG</i>	Δ <i>pyrG</i>	*
<i>A. niger</i> CBS 113.46 Δ <i>hisB</i>	<i>pyrG</i> ⁺ , Δ <i>hisB</i>	Nghiên cứu này
<i>A. niger</i> N402	Chủng chuẩn phòng thí nghiệm (bắt nguồn từ chủng <i>A. niger</i> N401)	[26]
<i>A. niger</i> N402 Δ <i>pyrG</i>	Δ <i>pyrG</i>	*
<i>A. niger</i> N402 Δ <i>hisB</i>	<i>pyrG</i> ⁺ , Δ <i>hisB</i>	Nghiên cứu này
<i>A. niger</i> N402 Δ <i>hisB</i> Δ <i>pyrG</i>	Δ <i>hisB</i> , Δ <i>pyrG</i>	Nghiên cứu này

* Các chủng vi sinh vật được cung cấp bởi phòng Genomic, Phòng thí nghiệm Trọng điểm Công nghệ Enzym và Protein (KLEPT), Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội.

2.1.2. Các vector sử dụng trong nghiên cứu

Các vector sử dụng làm khung để tạo các vector thế hệ tiếp theo trong nghiên cứu được thống kê chi tiết trong Bảng 2.2 và các vector được tạo trong nghiên cứu này được liệt kê tại Phụ lục 1.

Bảng 2.2. Các vector sử dụng làm khung trong nghiên cứu

Vector	Đặc điểm của vector	Nguồn gốc
pKG2	Vector nhị thể pKG2 mang marker chọn lọc <i>pyrG</i> từ <i>A. niger</i> được sử dụng làm khung cho việc tạo các cấu trúc xóa gen	**

Vector	Đặc điểm của vector	Nguồn gốc
pKO2	Vector nhị thể pKO2 mang gen kháng nourseothricin dưới sự điều hòa của promoter <i>gpdA</i> từ <i>A. nidulans</i> dùng làm khung cho việc tạo các cấu trúc xóa gen	**
pEX1	Vector nhị thể pEX1 mang cấu trúc biểu hiện gen <i>GFP</i> (<i>gpdA</i> promoter, gen <i>GFP</i> , <i>trpC</i> terminator) với marker chọn lọc là gen <i>pyrG</i> từ <i>A. oryzae</i>	[107]
pEX2	Vector nhị thể pEX2 mang cấu trúc biểu hiện gen <i>DsRed</i> (<i>gpdA</i> promoter, gen <i>DsRed</i> , <i>trpC</i> terminator) với marker chọn lọc là gen <i>pyrG</i> từ <i>A. oryzae</i> được dùng cho việc tạo các vector biểu hiện khác	[107]

** Các vector được cung cấp bởi Phòng Genomic, Phòng thí nghiệm Trọng điểm Công nghệ Enzym và Protein (KLEPT), Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội.

2.2. Môi trường nuôi cấy

- **Môi trường LB** (Luria Bertani): nuôi vi khuẩn (1% peptone; 0,5% cao nấm men; 0,5% NaCl).
- **Môi trường DPY**: nuôi và thu bào tử *A. oryzae* AUT1 (2% glucose; 1% peptone; 0,5% cao nấm men; 0,5% KH₂PO₄; 0,05% MgSO₄.7H₂O; 2% agar; pH 5,5) [169].
- **Môi trường PDA** (Potato Dextrose Agar): nuôi và thu bào tử các chủng nấm sợi (2% glucose; 0,4% bột chiết xuất khoai tây; 2% agar).
- **Môi trường MM** (Minimal medium): nuôi, sàng lọc các chủng nấm sợi (178 mM H₃BO₃; 70 mM NaNO₃; 11 mM KH₂PO₄; 2mM MgSO₄.7H₂O; 7mM KCl; 18 nM FeSO₄.7H₂O; 25 nM MnCl₂. 4H₂O; 76 nM ZnSO₄.7H₂O; 7,1 nM CoCl₂.6H₂O; 6,4 nM CuSO₄.5H₂O; 6,2 nM (NH₄)₆Mo₇O₂₄.4H₂O; 174nM EDTA-Na₄; 1% glucose; 2% agar; pH 6,5) [11].
- **Môi trường IM** (induction medium) **lỏng**: cảm ứng (4 ml 2-(*N*-morpholino)ethanesulfonic acid (MES) 1M; 40 ml MM salts 2,5X; 0,18 g

glucose; 0,5 ml glycerol; 100 ml nước cất) [28]. Dung dịch MM salts bao gồm 2,05g K_2HPO_4 ; 1,45g KH_2PO_4 ; 0,15g NaCl; 0,5g $MgSO_4.7H_2O$; 0,1g $CaCl_2.6H_2O$; 0,5g $(NH_4)_2SO_4$; 0,0025g $FeSO_4.7H_2O$, 1000 ml nước cất. Dung dịch MES 1M gồm: 195,2 g/l MES pH = 5,3.

- **Môi trường IM rắn:** đồng nuôi cấy bào tử nấm và vi khuẩn (4 ml MES 1M; 40 ml MM salts 2,5X; 0,09 g glucose; 0,5 ml glycerol; 1,5 g agar; 0,05 g uracil; 0,05 g uridine; 100 ml nước cất) [28].
- **Môi trường M + Met:** sàng lọc các chủng chuyển gen (0,2% NH_4Cl ; 0,1% $(NH_4)_2SO_4$; 0,05% KCl; 0,05% NaCl; 0,1% KH_2PO_4 ; 0,05% $MgSO_4.7H_2O$; 0,002% $FeSO_4.7H_2O$; 2% glucose; 0,15% methionine; 2% agar; pH 5,5) [169].
- **Môi trường CDA (Czapek-Dox Agar):** nuôi, sàng lọc các chủng nấm sợi (3% sucrose; 0,3% $NaNO_3$; 0,1% KH_2PO_4 ; 0,05% KCl; 0,05% $MgSO_4.7H_2O$; 0,001% $FeSO_4.7H_2O$; 0,005% $CuSO_4.5H_2O$; 0,001% $ZnSO_4.7H_2O$; 2% agar; pH 5,5).
- **Môi trường PSM (phytase screening medium):** sàng lọc các chủng nấm sinh enzyme phytase (1% glucose; 0,4% Natri phytate; 0,2% $CaCl_2.2H_2O$; 0,5% NH_4NO_3 ; 0,05% KCl; 0,05% $MgSO_4.7H_2O$; 0,001% $FeSO_4.7H_2O$; 0,001% $MnSO_4.H_2O$; 2% agar; pH 6).

Các môi trường được khử trùng ở 121°C trong 20 phút trước khi sử dụng.

2.3. Các cặp mồi dùng trong phản ứng PCR

Các cặp mồi được tổng hợp bởi Công ty PHUSA Biochem (Việt Nam) hoặc IDT (Singapore). Các mồi được pha bằng nước khử ion vô trùng đến nồng độ sử dụng là 10 pmol. Danh sách mồi được liệt kê trong Phụ lục 2.

2.4. Thiết bị, hóa chất

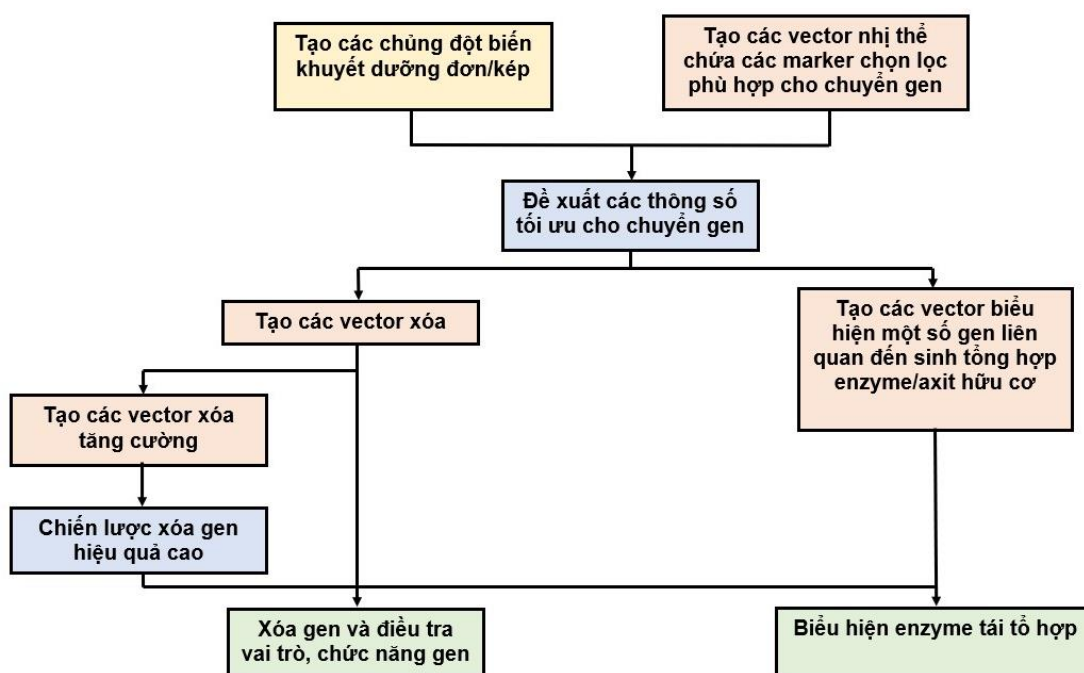
Các hóa chất và trang thiết bị được sử dụng tại Phòng Genomic, Phòng thí nghiệm Trọng điểm Công nghệ Enzym và Protein (KLEPT), Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội.

Hóa chất dùng trong nuôi cấy vi sinh vật, các hoá chất và enzyme dùng trong sinh học phân tử được đặt mua từ các hãng Himedia, Merck, Thermo Fisher Scientific, Biobasic, Biozym.

Danh sách các thiết bị sử dụng trong nghiên cứu này được liệt kê trong Phụ lục 3.

2.5. Phương pháp nghiên cứu

2.5.1. Sơ đồ nghiên cứu



Hình 2.1. Sơ đồ nghiên cứu

2.5.2. Thu bào tử và hệ sợi nấm

Thu bào tử nấm: các chủng nấm sợi được nuôi cấy trên môi trường đĩa thạch PDA hoặc DPY bổ sung uridine/uracil hoặc (và) histidine (khi cần) trong 3-5 ngày ở 30°C để thu bào tử. Thêm nước muối sinh lý vô trùng đã bổ sung 0,05% Tween-80 lên bề mặt đĩa nuôi, dùng que gạt vô trùng gạt nhẹ để bào tử nấm tách khỏi hệ sợi và hòa vào nước. Dịch thu được lọc qua màng Miracloth (Calbiochem, Đức). Phần dịch đi qua màng lọc sẽ được ly tâm ở tốc độ 5000 vòng/phút trong 10 phút. Phần cặn chứa bào tử nấm sẽ được rửa lại hai lần bằng nước cất vô trùng, sau đó hòa lần cuối vào nước cất vô trùng. Dịch bào tử sau thu được xác định nồng độ bằng buồng đếm

Thoma (Heinz Herenz Medizinalbedarf GmbH, Đức). Giữ dịch bào tử ở 4°C để sử dụng cho các thí nghiệm tiếp theo hoặc bổ sung glycerol đến 20% thể tích, làm đông lạnh nhanh bằng nitơ lỏng và giữ ở -80°C [107, 152, 153].

Thu hệ sợi nấm: nuôi lác 1 ml dịch bào tử nấm trong 50 ml môi trường CD (Czapek-Dox) lỏng ở 30°C, 200 vòng/phút trong 2-3 ngày. Hệ sợi nấm thu được bằng cách lọc qua màng Miracloth (Calbiochem, Đức) và thấm khô bằng giấy lọc. Đối với mẫu dùng để tách DNA, lượng 0,2 g hệ sợi nấm được cho vào ống ly tâm 2 ml vô trùng.

2.5.3. Tách chiết DNA tổng số, tách chiết RNA tổng số và tạo cDNA

Tách chiết DNA tổng số: quy trình tách chiết DNA tổng số không sử dụng phenol, chloroform được áp dụng theo Nguyễn Thị Khuyên và cộng sự [2]. Trước khi tách chiết DNA, giã mẫu bằng đũa thủy tinh trong khoảng 1 phút. Sau đó, bổ sung thêm 600 µl đệm chiết GX (2,5% SDS, 200 mM Tris-HCl pH 8, 250 mM NaCl, 25 mM EDTA; 0,2% β-mercaptoethanol), vortex. Ủ 60°C trong 30 phút, bổ sung 300 µl natri acetate 3M; pH 5,2 và ly tâm 12000 vòng/phút, trong 20 phút, ở 4°C. Chuyển dịch nổi sang một ống ly tâm 1,5 ml mới và bổ sung 1 thể tích isopropanol lạnh để tủa DNA. Ly tâm 12000 vòng/phút, 10 phút, 4°C. Thu tủa, rửa tủa trong 700 µl ethanol 70%. Sau đó, làm khô mẫu ở 60°C. DNA kết tủa được hòa tan trong 50 µl đệm TE (Tris-EDTA pH 8) và thêm 3 µl RNase A (10 mg/ml), ủ ở 60°C, trong 30 phút để loại bỏ RNA. Mẫu DNA được điện di kiểm tra nồng độ trên gel agarose 0,7% (0,7 g agarose/100 ml đệm TAE) ở 90V, 30 phút và giữ ở 4°C.

Tách chiết RNA tổng số và tạo cDNA: RNA tổng số được tách chiết theo Total RNA Purification Kit, PureHelix™ (NanoHelix, Hàn Quốc). Mẫu RNA được ủ ở 37°C trong 30 phút với enzyme DNase I để loại bỏ DNA tổng số. Sau đó, enzyme này được bất hoạt ở 75°C trong 15 phút và mẫu được chuyển ngay lên đá. Độ sạch của mẫu RNA được đánh giá bằng giá trị tỷ lệ độ hấp phụ quang ở bước sóng 260 nm và 280 nm (A₂₆₀/A₂₈₀). RNA tinh khiết thường có tỷ lệ A₂₆₀/A₂₈₀ là từ 1,9 đến 2,1. Ngoài ra, để đảm bảo không có tạp nhiễm của DNA tổng số, các mẫu RNA được kiểm tra với phản ứng PCR sử dụng cặp mồi ITS1/ITS4 để khuếch đại vùng ITS của DNA ribosom (rDNA). RNA không tạp nhiễm DNA được sử dụng làm khuôn để

tổng hợp cDNA sử dụng bộ kit ProtoScript® First Strand cDNA Synthesis (New England Biolabs, Mỹ) theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

2.5.4. Tạo các vector dùng cho xoá gen và biểu hiện gen ở *A. oryzae* và *A. niger*

Khuếch đại các đoạn DNA nhờ PCR: Đối với phản ứng PCR khuếch đại đoạn gen dùng cho cắt nối tạo vector, sử dụng enzyme Phusion™ high-fidelity DNA polymerase (Thermo Fisher Scientific, Mỹ) theo hướng dẫn của nhà sản xuất để đảm bảo độ chính xác của quá trình sao chép DNA. Thành phần phản ứng PCR với tổng thể tích 25 µl như sau:

• 5x HF buffer	: 5 µl
• dNTPs (nồng độ 2 mM mỗi thành phần)	: 1 µl
• Mồi xuôi (nồng độ 10 pmol/µl)	: 1 µl
• Mồi ngược (nồng độ 10 pmol/µl)	: 1 µl
• Phusion™ high-fidelity polymerase	: 1 µl
• Khuôn DNA (50-100 ng/µl)	: 1 µl
• Nước vô trùng	: 15 µl
Tổng thể tích	: 25 µl

Phản ứng PCR được tiến hành với cặp mồi đặc hiệu để nhân các đoạn gen từ nấm sợi *A. oryzae* RIB40 hoặc *A. niger* N402 theo các chu trình nhiệt thích hợp. Sản phẩm được điện di trên gel agarose 0,7% và tinh sạch bằng MEGA quick-spin™ Plus Total Fragment DNA Purification Kit (iNtRON Biotechnology, Hàn Quốc). Sản phẩm tinh sạch được bảo quản ở nhiệt độ -30°C. Đối với phản ứng PCR nhằm mục đích kiểm tra, GoTaq® Green Master Mix (Promega) được sử dụng theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Xử lý vector, đoạn DNA bằng enzyme giới hạn, nối DNA và vector: Từ các vector khung, các enzyme giới hạn được sử dụng để mở vòng. Tỷ lệ thể tích enzyme giới hạn, đệm được sử dụng, nhiệt độ xử lý vector và các đoạn DNA này được thực hiện theo hướng dẫn của nhà sản xuất Thermo Fisher Scientific (Mỹ). Sau đó, khung

vector và đoạn DNA tinh sạch được nối nhờ enzyme T4 DNA ligase hoặc enzyme T4 DNA polymerase (Thermo Fisher Scientific, Mỹ).

Biến nạp sản phẩm nối vào *E. coli* DH5 α khả biến: 10 μ l sản phẩm nối được biến nạp vào 200 μ l tế bào *E. coli* DH5 α khả biến. Các bước tiến hành thực hiện theo quy trình của Phòng Genomic bao gồm: 20 phút ủ trên nước đá, sốc nhiệt ở 42°C trong 40 giây, tiếp tục ủ trên nước đá trong 2 phút, bổ sung thêm 800 μ l môi trường SOC lỏng và nuôi lắc 200 vòng/phút ở 30°C trong 1 giờ 30 phút. Tế bào *E. coli* DH5 α được thu lại nhờ ly tâm ở tốc độ 8000 vòng/phút trong 20 giây. Sau đó tế bào vi khuẩn được cấy trải lên đĩa Petri chứa môi trường LB có bổ sung kháng sinh kanamycin (100 mg/l). Các khuẩn lạc riêng rẽ được kiểm tra nhờ colony-PCR (PCR khuẩn lạc) sử dụng cặp mồi đặc hiệu [17].

Tách plasmid: Các plasmid được thu hồi theo quy trình của Phòng Genomic, Phòng thí nghiệm Trọng điểm Công nghệ Enzym và Protein. Khuẩn lạc được chọn cấy vào bình tam giác 50 ml chứa 10-20 ml môi trường LB lỏng bổ sung thêm kháng sinh kanamycin (100 mg/l). Bình nuôi cấy được lắc qua đêm ở 30-37°C. Ly tâm 6 ml dịch nuôi ở 12000 vòng/phút, 20 giây để thu sinh khối vi khuẩn. Bổ sung 250 μ l buffer P1 (50 mM Tris-HCl; 10 mM EDTA; pH 7,6) và 3 μ l RNase A (10 mg/ml), vortex để hòa tan cặn tế bào vào đệm. Sau đó thêm 250 μ l buffer P2 (200 mM NaOH, 1% SDS) và đảo ống nhẹ nhàng 5 lần. Tiếp tục thêm 350 μ l buffer N3 (natri acetate 3M; pH 5,5) vào ống và đảo nhẹ ống 5 lần. Ly tâm hỗn hợp ở 12000 vòng/phút, 4°C trong 20 phút. Hút 700 μ l dịch trong có chứa plasmid chuyển sang ống ly tâm 1,5 ml và bổ sung thêm 700 μ l isopropanol lạnh. Ống được trộn đều bằng vortex và được ly tâm ở tốc độ 12000 vòng/phút trong 20 phút ở 4°C. Đổ bỏ dịch trong và rửa cặn bằng 500 μ l ethanol 70%. Ly tâm 5 phút và đổ bỏ dịch. Cặn chứa plasmid được làm khô ở 60°C và hòa vào 50 μ l đệm TE. Plasmid được bảo quản ở nhiệt độ -30°C.

Tạo các vector nhĩ thể để xoá gen *hisB* ở *A. oryzae* và *A. niger*

Các đoạn 5' *hisB* (1,414 kb) và 3' *hisB* (1,374 kb) từ DNA tổng số của chủng *A. oryzae* RIB40 được khuếch đại nhờ PCR với các cặp mồi AohisB-P1/AohisB-P2 và AohisB-P3/AohisB-P4 tương ứng và sử dụng enzyme PhusionTM high-fidelity DNA polymerase (Thermo Fisher Scientific, Mỹ) để đảm bảo độ chính xác của quá

trình sao chép DNA. Sản phẩm PCR được tinh sạch theo quy trình của MEGA quick-spin™ Plus Total Fragment DNA Purification Kit (iNtRON Biotechnology, Hàn Quốc) và được nối vào vector trung gian pKG2 theo phương pháp One-Step SLIC sử dụng enzyme T4 DNA polymerase [69]. Cấu trúc mới tạo được đặt tên là pAoH và được cắt kiểm tra bằng enzyme giới hạn *XbaI*.

Quy trình tạo cấu trúc xoá *hisB* ở *A. niger* được tiến hành tương tự với quy trình tạo vector pAoH với DNA tổng số của chủng *A. niger* N402 được khuếch đại nhờ PCR với các cặp mồi AnhisB-P1/AnhisB-P2 và AnhisB-P3/AnhisB-P4. Cấu trúc mới tạo được đặt tên là pAnH và được cắt kiểm tra bằng enzyme giới hạn *SalI*.

Tạo các vector phục vụ xoá kép *hisB* và *pyrG* ở *A. oryzae* và *A. niger*

Từ các cấu trúc xoá *hisB* ở *A. oryzae* và *A. niger*: pAoH và pAnH, đoạn gen *pyrG* được loại bỏ nhờ enzyme *XbaI* (đối với pAoH) và *SpeI* và *XbaI* (đối với pAnH), và được tự đóng vòng nhờ enzyme T4 DNA ligase. Các cấu trúc mới tạo được đặt tên là pAoHG và pAnHG.

Tạo cấu trúc biểu hiện gen chỉ thị huỳnh quang sử dụng marker *hisB*

Để tạo vector mang marker chọn lọc là *hisB* có nguồn gốc *A. oryzae*, *hisB* cassette từ *A. oryzae* RIB40 (AO090701000070) đã được khuếch đại bằng cặp mồi AohisB-P7/AohisB-P8. Sản phẩm PCR đã xử lý bằng *EcoRI* và *SpeI* được nối nhờ T4 DNA ligase vào vector pEX2 đã loại *pyrG* với *EcoRI* và *SpeI* tương ứng. Cấu trúc mới đã được xác nhận thêm với *SalI* và được đặt tên là pEX2D.

Gen *hisB* bao gồm 672 bp vùng 5', toàn bộ ORF và 131 bp của vùng 3' được khuếch đại từ DNA tổng số của *A. niger* N402 nhờ PCR với cặp mồi AnhisB-F/AnhisB-R. Sản phẩm PCR được xử lý với các enzyme cắt giới hạn *EcoRI* và *SpeI*, và được nối bằng T4 DNA ligase vào vector nhị thể pEX2 đã xử lý với các enzyme giới hạn tương ứng nhằm thay thế marker *pyrG*. Plasmid mới tạo được cắt kiểm tra với enzyme *StuI*. Vector này được đặt tên là pEX2E.

Tạo cấu trúc phục hồi/biểu hiện quá mức một số gen liên quan đến sinh axit hữu cơ và enzyme

Cấu trúc phục hồi/biểu hiện quá mức gen *laeA* từ *A. oryzae* được tạo bằng cách thay thế vùng trình tự gen *DsRed* ở vector pEX2 bằng trình tự gen *laeA* ở *A. oryzae*

nhờ 2 enzyme cắt giới hạn *PmlI* và *SacI*. Enzyme T4 DNA ligase được sử dụng để nối. Cấu trúc mới tạo được cắt kiểm tra bằng enzyme *EcoRI* và đặt tên là pEX2*laeA*.

Toàn bộ trình tự mã hóa của gen *phyA* được khuếch đại nhờ PCR dựa trên khuôn là DNA bổ sung từ *A. fumigatus* với cặp mồi đặc hiệu AfphyA-F/AfphyA-R. Để đảm bảo độ chính xác của quá trình khuếch đại gen đích bằng PCR, enzyme Phusion™ high-fidelity DNA polymerase (Thermo Fisher Scientific, Mỹ) được sử dụng. Sản phẩm PCR được tinh sạch bằng kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up (Promega, Mỹ). Sản phẩm PCR sau tinh sạch được xử lý với enzyme giới hạn *PmlI* và *BamHI* để nối vào khung vector pEX2B (cũng đã được xử lý với các enzyme tương ứng). Plasmid tái tổ hợp được biến nạp vào tế bào khả biến *E. coli* DH5α và được tinh sạch bằng kit Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega, Mỹ). Sự có mặt của cấu trúc biểu hiện gen *phyA* được xác nhận bằng PCR với cặp mồi AfphyA-F/AfphyA-R, bằng cắt với enzyme giới hạn và bằng giải trình tự. Vector mới tạo được đặt tên là pEX2B-AfphyA.

Cấu trúc biểu hiện quá mức gen *phyA* liên quan đến sinh tổng hợp enzyme phytase có nguồn gốc từ *A. niger* được tạo thông qua việc thay thế vùng trình tự gen *DsRed* trên khung vector pEX2 tại vị trí cắt của enzyme *PmlI* và *BssHIII*. Gen *phyA* từ *A. niger* được khuếch đại từ N402 bằng cặp mồi AnphyA-orf-F/AnphyA-orf-R, sau đó được xử lý với *PmlI* và *BssHIII* và nối vào khung vector tương ứng nhờ T4 DNA ligase. Vector mới tạo được đặt tên là pEX2-AnphyA và được cắt kiểm tra bằng *BamHI*.

Tạo cấu trúc xoá gen liên quan đến quá trình biệt hoá tế bào, sinh tổng hợp enzyme/axit hữu cơ

Tạo vector trung gian pKH1 nhằm tạo các cấu trúc phục vụ xoá gen với marker *hisB*: Marker *hisB* có nguồn gốc từ *A. niger* được khuếch đại nhờ PCR với cặp mồi AnhisB-F/AnhisB-R. Sản phẩm PCR được xử lý với enzyme *SpeI* và *BamHI* và nối vào vector pKO2 đã được loại bỏ marker là gen kháng kháng sinh nourseothricin bằng các enzyme tương ứng. Việc nối ghép vector với sản phẩm PCR đã xử lý bằng cùng enzyme giới hạn được thực hiện với T4 DNA ligase. Vector mới tạo được đặt tên là pKH1 và được cắt kiểm tra bằng enzyme *StuI*.

Tạo vector xoá gen *amyR* ở *A. oryzae* và *A. niger* với marker *hisB*: Các đoạn 5' và 3' *amyR* từ *A. oryzae* và *A. niger* được khuếch đại nhờ PCR với các cặp mồi AoamyR-P1/AoamyR-P2; AoamyR-P3/AoamyR-P4 và AnamyR-P1/AnamyR-P2; AnamyR-P3/AnamyR-P4 với khuôn là DNA tổng số từ chủng RIB40 hoặc N402. Các đoạn 5' và 3' *amyR* được đưa lần lượt vào vector pKH1 và được đặt tên là pKH- Δ AoamyR và pKH- Δ AnamyR tương ứng.

Tạo vector xoá gen *laeA* ở *A. oryzae* với marker *hisB*: Các đoạn 5' và 3' *laeA* từ *A. oryzae* được khuếch đại nhờ PCR với các cặp mồi AolaeA-P1/AolaeA-P2 và AolaeA-P3/AolaeA-P4 với khuôn là DNA tổng số từ chủng RIB40. Đoạn 5' *laeA* được xử lý với *EcoRI* và *SacI*, đưa vào vector trung gian pKH1 đã được xử lý với các enzyme tương ứng nhờ T4 DNA ligase. Đoạn 3' *laeA* tiếp tục được đưa vào vector nhờ xử lý với *BamHI* và *HindIII* và nối nhờ T4 DNA ligase. Vector mới tạo được cắt kiểm tra bằng *PstI* và *ApaI* và được đặt tên là pKH- Δ AolaeA.

Tạo vector xoá gen *stuA* ở *A. oryzae* với marker *hisB*: Vector trung gian pKO201-AostuA được tạo ra như sau: Đoạn gen *AostuA* được khuếch đại bằng PCR sử dụng cặp mồi AostuA-orf-F/AostuA-orf-R và khuôn là DNA tổng số tách từ chủng RIB40. Sản phẩm PCR được xử lý với enzyme giới hạn *EcoRV* và *XbaI* và được nối vào vector pKO2 cũng đã xử lý với cùng 2 enzyme tương ứng. Việc nối đoạn gen *AostuA* vào pKO2 được thực hiện nhờ enzyme T4 DNA ligase. Vector pKO2-AostuA sau đó được xử lý tiếp với *SacI* và *BamHI* để loại bỏ đi 1 đoạn gen *AostuA* và được nối với marker *hisB* khuếch đại bằng cặp mồi AnhisB-F/AnhisB-R cũng được xử lý với cùng hai enzyme giới hạn tương thích. Vector mới tạo được đặt tên là pKH- Δ AostuA và được xác nhận thêm nhờ cắt kiểm tra bằng *XbaI*.

Tạo vector xoá gen *laeA* ở *A. niger* với marker *hisB*: Từ vector pKG2- Δ AnlaeA, marker chọn lọc *pyrG* được loại bỏ bằng cách xử lý với *SacI* và *XbaI*. Đoạn gen *hisB* có nguồn gốc từ *A. niger* được khuếch đại nhờ PCR với cặp mồi AnhisB-F/AnhisB-R và xử lý với cùng enzyme giới hạn *SacI* và *SpeI* trước khi nối vào vector đã mở vòng. Vector mới tạo được pKH- Δ AnlaeA được cắt kiểm tra bằng *StuI* và *EcoRI*.

Tạo vector xoá gen *stuA* ở *A. niger* với marker *hisB*: Từ vector pKG1- Δ *AnstuA*, marker chọn lọc là gen kháng kháng sinh nourseothricin được loại bỏ với *SacI* và *BamHI*. Đoạn gen *hisB* có nguồn gốc từ *A. niger* được khuếch đại nhờ PCR với cặp mồi AnhisB-F/AnhisB-R và xử lý với *SacI* và *BamHI* trước khi nối vào vector nhờ T4 DNA ligase. Vector mới tạo được đặt tên là pKH- Δ *AnstuA* và được cắt kiểm tra bằng *XbaI*.

Tạo vector xoá gen *prtT* ở *A. niger* với marker *hisB*: Đoạn 5' *prtT* được khuếch đại nhờ PCR với cặp mồi AnprtT-P1/AnprtT-P2 và xử lý với *EcoRI* và *SacI*. Đoạn 5' *prtT* được nối vào vector pEX2E đã được xử lý với hai enzyme tương ứng nhờ T4 DNA ligase. Tương tự, đoạn 3' *prtT* sau khi được khuếch đại nhờ PCR với cặp mồi AnprtT-P3/AnprtT-P4 và xử lý với *SpeI* và *HindIII* được tiếp tục nối vào vector tại các vị trí cắt của enzyme giới hạn tương ứng. Cấu trúc mới tạo được pKH- Δ *AnprtT* được cắt kiểm tra bằng enzyme *XbaI*.

Tạo vector xoá gen *veA* ở *A. niger* với marker *hisB*: Các đoạn 5' và 3' của gen *veA* từ *A. niger* được khuếch đại nhờ PCR với các cặp mồi AnveA-P1/AnveA-P2 và AnveA-P3/AnveA-P4 và xử lý với các enzyme giới hạn. Đoạn 5' *veA* được xử lý với *EcoRI* và *SpeI* và được đưa vào vector pKH1 nhờ T4 DNA ligase. Đoạn 3' *veA* tiếp tục được đưa vào vector pKH1-5' *veA* sau khi đã xử lý với enzyme *BamHI* và *HindIII*. Vector mới tạo được pKH- Δ *AnveA* được cắt kiểm tra bằng enzyme *XbaI*.

Tạo các cấu trúc nhằm tăng hiệu suất xoá gen ở *A. oryzae* và *A. niger*

Các cấu trúc xoá gen đã được tạo ở *A. oryzae* và *A. niger* trước đó được mở vòng với enzyme *EcoRI* và xử lý với enzyme alkaline phosphatase. Marker chọn lọc *pyrG* đã được khuếch đại nhờ PCR với cặp mồi AnpyrG-M1/AnpyrG-M2 và xử lý với *EcoRI* được nối vào vector nhờ T4 DNA ligase. Các cấu trúc mới tạo được cắt kiểm tra với enzyme *BamHI*.

2.5.5. Chuyển gen vào *A. oryzae* và *A. niger* nhờ vi khuẩn *Ag. tumefaciens* sử dụng marker chọn lọc là các gen dinh dưỡng

Biến nạp các vector vào vi khuẩn *Ag. tumefaciens*: Các vector được biến nạp vào chủng vi khuẩn *Ag. tumefaciens* AGL1 bằng phương pháp xung điện [140]. Khuẩn lạc chủng AGL1 tươi được nuôi lắc trong môi trường LB qua đêm ở 28°C,

200 vòng/phút. Ly tâm dịch nuôi vi khuẩn ở 4000 vòng/phút trong 10 phút ở 4°C. Cặn chứa tế bào vi khuẩn được rửa 3 lần bằng HEPES 100 mM, 1 lần bằng glycerol 10% và ly tâm 4000 vòng/phút, 10 phút ở 4°C giữa mỗi lần rửa. Cuối cùng, hòa cặn tế bào trong 1 ml glycerol 10%. Sau đó, 50 µl dịch tế bào AGL1 khả biến được trộn với 0,5 µl plasmid, chuyển hỗn hợp vào cuvet 2 mm và đặt trên đá. Quá trình biến nạp được thực hiện bằng máy chuyển gen xung điện Gene Pulser Xcell™ Electroporation System (Bio-Rad) với các thông số 2,5 kV, 400 Ω, 25 µF. Sau khi kích hoạt xung điện, 500 µl môi trường LB lỏng được bổ sung vào cuvet, trộn nhẹ và chuyển hỗn hợp sang ống ly tâm 1,5 ml. Ống được nuôi lắc ở tốc độ 200 vòng/phút, 28°C trong 1 giờ. Tế bào vi khuẩn được thu lại bằng ly tâm ở tốc độ 8000 vòng/phút trong 20 giây và được cấy trải trên môi trường LB chứa kanamycin (100 mg/l). Đĩa được ủ ở 28°C trong 2 ngày để thu nhận các khuẩn lạc kháng kanamycin. Các khuẩn lạc vi khuẩn được kiểm tra bằng kỹ thuật colony-PCR với mỗi đặc hiệu [17].

Chuyển gen vào nấm sợi *A. oryzae* và *A. niger* sử dụng *Ag. tumefaciens*:

Một khuẩn lạc tươi lấy từ đĩa nuôi cấy chủng vi khuẩn *Ag. tumefaciens* AGL1 đã xác nhận mang vector được nuôi trong bình tam giác với 20 ml môi trường LB có bổ sung kháng sinh kanamycin (100 mg/l). Dịch vi khuẩn được nuôi lắc ở tốc độ 200 vòng/phút, 28°C. Sau 15-17 giờ, 1 ml dịch được lấy ra và tiếp tục nuôi trong 9 ml môi trường IM lỏng cùng 200 µM acetosyringone (AS), kháng sinh kanamycin (100 mg/l) ở 28°C, 200 vòng/phút, trong điều kiện tối. Máy đo quang phổ được sử dụng để đánh giá sự sinh trưởng của vi khuẩn cho đến khi OD_{600nm} đạt 0,6-0,8 (thường cần khoảng 5-6 giờ nuôi). Trộn đều 100 µl bào tử nấm (nồng độ 10⁶ bào tử/ml hoặc 10⁷ bào tử/ml, phụ thuộc vào từng chủng nấm) với 100 µl dịch vi khuẩn *Ag. tumefaciens*. Hỗn hợp được trải đều lên màng giấy lọc cellulose (Satorius, Đức) đặt sẵn trên môi trường đĩa thạch IM (môi trường cảm ứng chứa 200 µM AS và nồng độ các axit amin thích hợp). Quá trình đồng nuôi cấy được thực hiện bằng cách ủ đĩa ở điều kiện tối, trong 60 giờ ở 22°C. Sau đó màng giấy lọc được chuyển sang đĩa môi trường sàng lọc có bổ sung kháng sinh cefotaxime (300 mg/l) và ủ ở nhiệt độ 30°C. Khuẩn lạc nấm chuyển gen được quan sát sau 5 ngày.

Sàng lọc và xác nhận các thể chuyển gen: Các khuẩn lạc nấm xuất hiện riêng rẽ trên đĩa chuyển gen được tiếp tục cấy truyền sang môi trường có thành phần giống với môi trường sàng lọc trong chuyển gen. Các khuẩn lạc có khả năng sinh trưởng trên môi trường sàng lọc sẽ được thuần khiết bằng phương pháp phân lập bào tử đơn và tiến hành tách DNA tổng số từ sinh khối hệ sợi. Phản ứng PCR sử dụng mồi đặc hiệu nhằm xác định sự có mặt của cấu trúc được chuyển trong hệ gen của các thể chuyển gen.

2.5.6. Sàng lọc, đánh giá và kiểm tra khả năng sinh trưởng và tiết protein/enzyme của các chủng chuyển gen

Kiểm tra khả năng phục hồi sinh trưởng ở các chủng xoá gen *hisB*: Chủng xoá gen *hisB* được kiểm tra mức độ phục hồi khi nuôi cấy trên môi trường CDA hoặc M + Met bổ sung histidine với các tỷ lệ khác nhau. Hình thái của các chủng xoá gen được so sánh đồng thời với các chủng *A. oryzae* (RIB40, AUT1-PID, NsPID1) và *A. niger* N402 tương ứng. Thể tích 5 µl dịch bào tử nấm (10^6 bào tử/ml) được nhỏ trên các đĩa môi trường và tiến hành quan sát hình thái khuẩn lạc sau 4 ngày nuôi cấy ở 30°C.

Kiểm tra hình thái và cấu trúc cuống sinh bào tử: Đối với kiểm tra hình thái, 5 µl dịch bào tử nấm (10^6 bào tử/ml) được nhỏ trên đĩa môi trường CDA và tiến hành quan sát hình thái khuẩn lạc sau 4 ngày nuôi cấy ở 30°C. Đối với kiểm tra cấu trúc cuống sinh bào tử, chủng nấm được nuôi trực tiếp trên tiêu bản vô trùng có chứa môi trường phù hợp (phương pháp slide culture) [107]. Các chủng nấm được cấy lên các giọt môi trường nhỏ sẵn trên lam kính. Sau đó, tiến hành đẩy lam lên các giọt môi trường đã cấy nấm và ủ trong các đĩa petri. Cấu trúc cuống sinh bào tử được quan sát dưới kính hiển vi quang học Olympus (Nhật Bản) sau 4 ngày nuôi cấy ở 30°C.

Kiểm tra khả năng sinh trưởng trên các nguồn cacbon và nitơ khác nhau: Nhỏ lần lượt 5 µl bào tử (nồng độ 10^6 bào tử/ml) của mỗi chủng nấm lên đĩa môi trường thạch CDA chứa các nguồn cacbon và nitơ khác nhau. Khả năng sinh trưởng của các chủng được đánh giá sau 4 ngày nuôi cấy ở 30°C.

Kiểm tra khả năng hình thành bào tử của các chủng *A. oryzae* xoá gen *laeA*: Tiến hành cấy trải 10 µl bào tử (10^6 bào tử/ml) chủng RIB40 và các chủng đột

biến xoá gen *laeA* lên môi trường CDA. Thu và định lượng bào tử các chủng nấm sau 3 ngày nuôi cấy ở 30°C.

Kiểm tra khả năng đáp ứng stress: Nhỏ lần lượt 5 µl bào tử (nồng độ 10⁶ bào tử/ml) của các chủng nấm trên đĩa môi trường CDA bổ sung NaCl và Sorbitol ở các nồng độ khác nhau. So sánh sự sinh trưởng giữa các chủng sau 4 ngày nuôi cấy ở 30°C.

Kiểm tra sự ảnh hưởng của nhiệt độ tới việc hình thành bào tử: 10 µl bào tử (10⁶ bào tử/ml) của các chủng nấm được nhỏ trên môi trường PDA. Tiến hành quan sát và thu bào tử các chủng nấm sau 5 ngày nuôi cấy ở các nhiệt độ 25°C, 30°C, 35°C và 37°C.

Sàng lọc và đánh giá các thể chuyển gen phát huỳnh quang: phương pháp nuôi trên tiêu bản (slide culture) được sử dụng để quan sát dưới kính hiển vi huỳnh quang [107]. Các chủng chuyển gen được nuôi trên môi trường CDA (có bổ sung uridine/uracil hoặc histidine) ở 30°C trong 4 ngày. Cấu trúc cuống sinh bào tử và hệ sợi được quan sát dưới kính hiển vi huỳnh quang Axioplan Fluorescence Microscope (Carl Zeiss, Đức) sử dụng bước sóng kích thích là 558 nm (đối với DsRed) và 488 nm (đối với GFP); và được lọc ánh sáng phát ra ở bước sóng 583 nm (đối với DsRed) và 509 nm (đối với GFP).

Kiểm tra khả năng sinh axit hữu cơ: nhỏ 5 µl dịch bào tử (10⁶ bào tử/ml) của các chủng nghiên cứu lên đĩa môi trường tối thiểu MM (loại bỏ NaNO₃) và bổ sung 2% bột môi trường Mac Conkey để tạo màu và 1% sữa gầy. Đĩa được ủ ở 30°C trong 3 ngày. Khả năng axit hóa môi trường được đánh giá thông qua vòng phân giải sữa hình thành trên đĩa nuôi cấy [111].

Kiểm tra khả năng sinh enzyme phytase: nhỏ 5 µl dịch bào tử (10⁶ bào tử/ml) lên đĩa môi trường PSM. Đĩa được ủ ở 30°C trong 3 ngày. Enzyme phytase sẽ phân giải phytate tạo thành vòng trong suốt xung quanh khuẩn lạc. Vòng phân giải càng lớn cho thấy mức độ sinh enzyme và hoạt tính enzyme càng mạnh.

100 µl dịch bào tử (10⁶ bào tử/ml) của các chủng nấm được nuôi lắc trong 50 ml môi trường PSM lỏng trong 3 ngày ở 30°C, 200 rpm. Dịch enzyme phytase thô được lọc qua màng Miracloth (Calbiochem, Đức) và ly tâm ở 5000 rpm, 4°C trong

15 phút. Dịch enzyme phytase thô được định lượng hoạt tính phytase với kit K-Phytase của hãng Megazyme (Ireland) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần độc lập.

2.5.7. Xác định số bản sao và mức độ hoạt động của gen *phyA* thông qua real-time PCR

DNA hoặc DNA bổ sung (cDNA) của các chủng chuyển gen *phyA* được tách chiết và pha loãng đến nồng độ 50 ng/μl (đối với DNA) và 100 ng/μl (đối với cDNA). Phản ứng real-time PCR sử dụng iTaq™ Universal SYBR® Green Supermix (Bio-Rad, Mỹ) được tiến hành theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Chu trình nhiệt như sau: 50°C 2 phút, 95°C 10 phút; 40 chu kỳ của 95°C 10 giây, 60°C 30 giây. Phản ứng PCR thực hiện bằng hệ thống máy IQ5 real-time PCR (Bio-Rad, Mỹ) và Rotor-Gene Q (Qiagen, Đức). Công thức quy đổi số bản sao dựa trên kết quả phân tích real-time PCR như sau [131]: **Số bản sao của một gen = $2^{-\Delta Ct}$**

$$\text{Trong đó: } \Delta Ct = Ct_{(\text{gen cần xác định})} - Ct_{(\text{gen đối chứng})}$$

Mức độ biểu hiện gen được xác định theo công thức $2^{-\Delta\Delta Ct}$, trong đó các gen biểu hiện liên tục được sử dụng làm gen tham chiếu [87].

2.5.8. Xác định và phân tích các gen ở *A. oryzae* và *A. niger*

Thông tin về các gen của nấm *A. oryzae* và *A. niger* được trích xuất từ cơ sở dữ liệu hệ gen nấm (<https://fungidb.org> và <https://mycocosm.jgi.doe.gov>). Cấu trúc protein và được vùng bảo thủ được phân tích bằng công cụ InterPro (<https://www.ebi.ac.uk/interpro>) và Pfam (<https://pfam.xfam.org>). Các trình tự protein được so sánh và đối chiếu nhờ công cụ Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo>).

2.5.9. Phân tích và xử lý số liệu

Tất cả các thí nghiệm trong nghiên cứu này đều được tiến hành độc lập ít nhất 3 lần. Các kết quả thí nghiệm được thể hiện dưới dạng số trung bình ± độ lệch chuẩn (standard deviation, SD). Các phân tích thống kê được tiến hành với phần mềm GraphPad Prism 8 sử dụng chức năng phân tích Student's *t*-test. Sự khác biệt có ý nghĩa thống kê được đánh giá với giá trị $p < 0,05$.

Chương 3

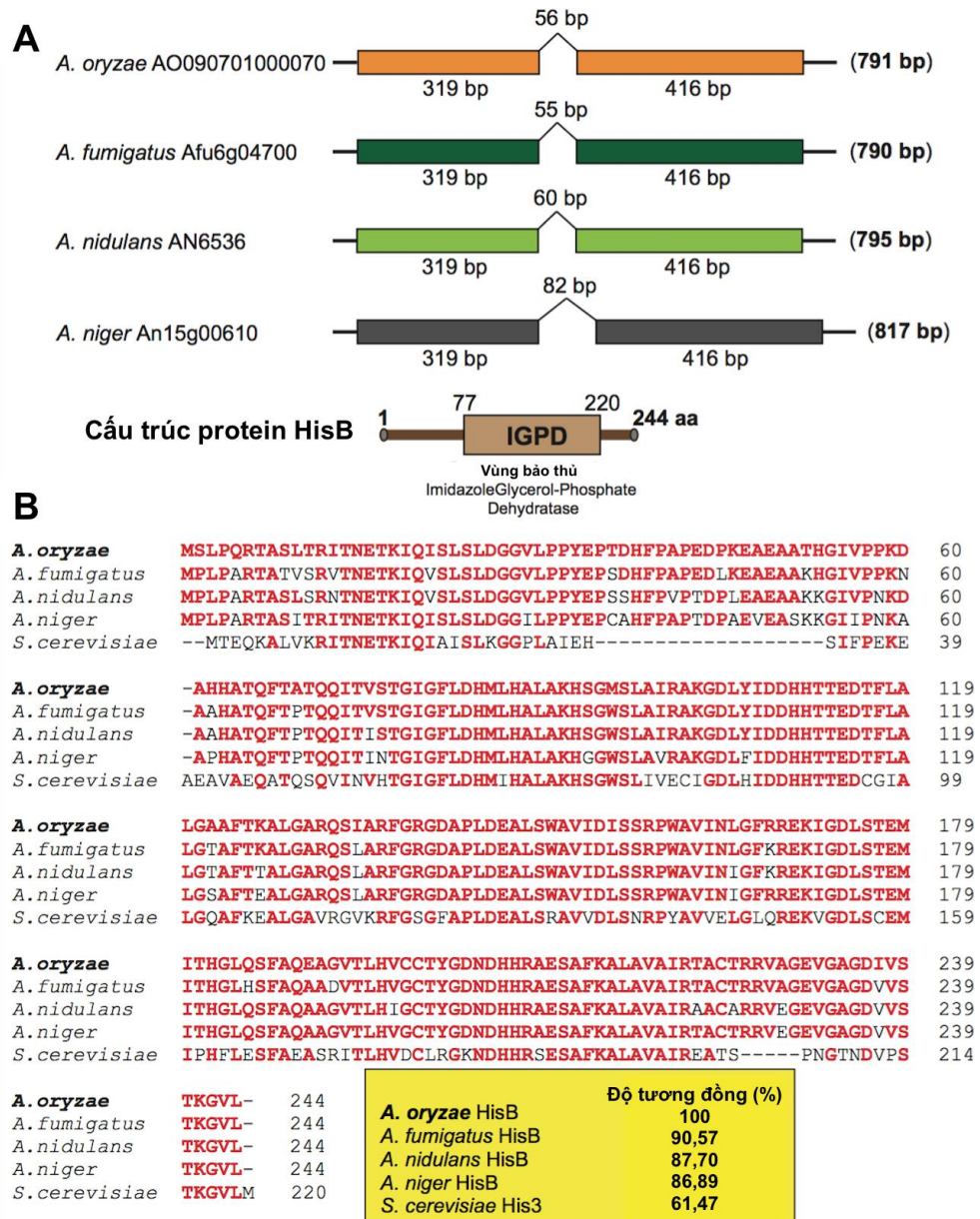
KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

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*

Quá trình sinh tổng hợp histidine đóng một vai trò bắt buộc đối với sự sinh trưởng và phát triển của vi sinh vật. Chỉ có 1 locus duy nhất được chú thích là *hisB* trong hệ gen của nấm sợi mô hình *A. nidulans* (AN6536) và các ortholog ở *A. fumigatus* (Afu6g04700), *A. niger* (An15g00610) và *A. oryzae* (AO090701000070). Tất cả các gen *hisB* có cấu trúc tương tự nhau, bao gồm 2 exon (319 bp, 416 bp) bị gián đoạn bởi 1 intron có kích thước 56–82 bp. Trình tự của các gen này mã hóa cho 244 axit amin giả định của imidazoleglycerol-phosphate dehydratase, là một loại enzyme cần thiết cho quá trình sinh tổng hợp histidine (Hình 3.1A). Phân tích trình tự so sánh cho thấy: *A. oryzae* HisB thể hiện sự tương đồng rất cao với các ortholog *Aspergillus* khác, từ 86,89% đến 90,57% và có độ tương đồng tới 61,47% với protein His3 (YOR202W) của nấm men *S. cerevisiae* (Hình 3.1B).

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

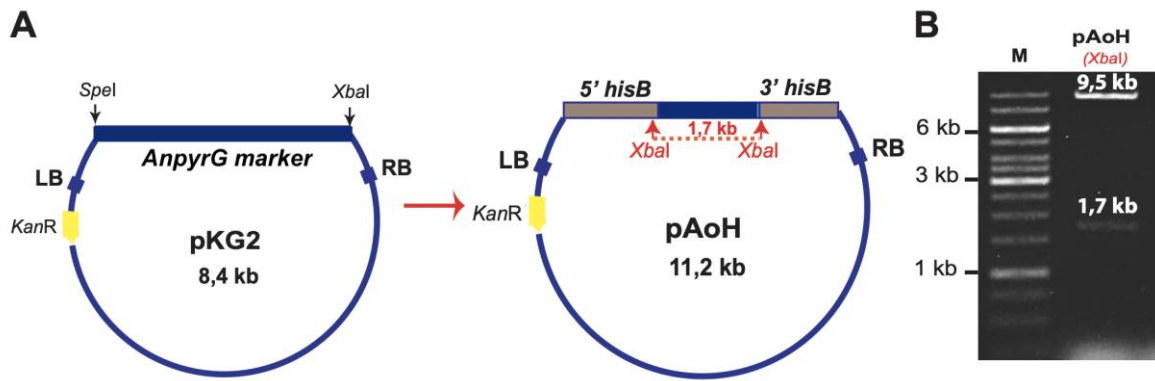
Để xóa gen *hisB* ở nấm sợi *A. oryzae*, vector nhị thể với vùng T-DNA chứa marker chọn lọc *pyrG* (từ *A. niger*) nằm giữa đoạn 5' với đoạn 3' của gen *hisB* được tạo mới. Vector mới tạo được kiểm tra độ chính xác bằng cách xử lý với enzyme giới hạn *XbaI* (có 1 vị trí nhận biết trong đoạn 5' *hisB* và 1 vị trí nhận biết trong marker *pyrG*). Phân tích sản phẩm cắt enzyme giới hạn trên gel agarose bằng phương pháp điện di cho 2 băng DNA có kích thước lần lượt là 1,7 kb và 9,5 kb. Kết quả này đúng với kích thước tính toán dựa trên trình tự gen. Vector mới tạo dùng để xóa gen *hisB* ở *A. oryzae* được đặt tên là pAoH (Hình 3.2). Vector này cho phép thay thế toàn bộ vùng khung đọc mở của gen *hisB* bằng marker chọn lọc *pyrG* nhờ cơ chế tái tổ hợp tương đồng ở nấm.



Hình 3.1. Cấu trúc gen *hisB* ở *A. oryzae* và các ortholog từ các loài *Aspergillus* khác và phân tích protein tương ứng

(A) Trình tự của các gen *hisB* được trích xuất từ cơ sở dữ liệu hệ gen *Aspergillus*, bao gồm trình tự mã hóa (exon) và trình tự không mã hóa (intron). Các trình tự protein *Aspergillus* HisB (244 aa) được phân tích với Pfam (<http://pfam.xfam.org>).

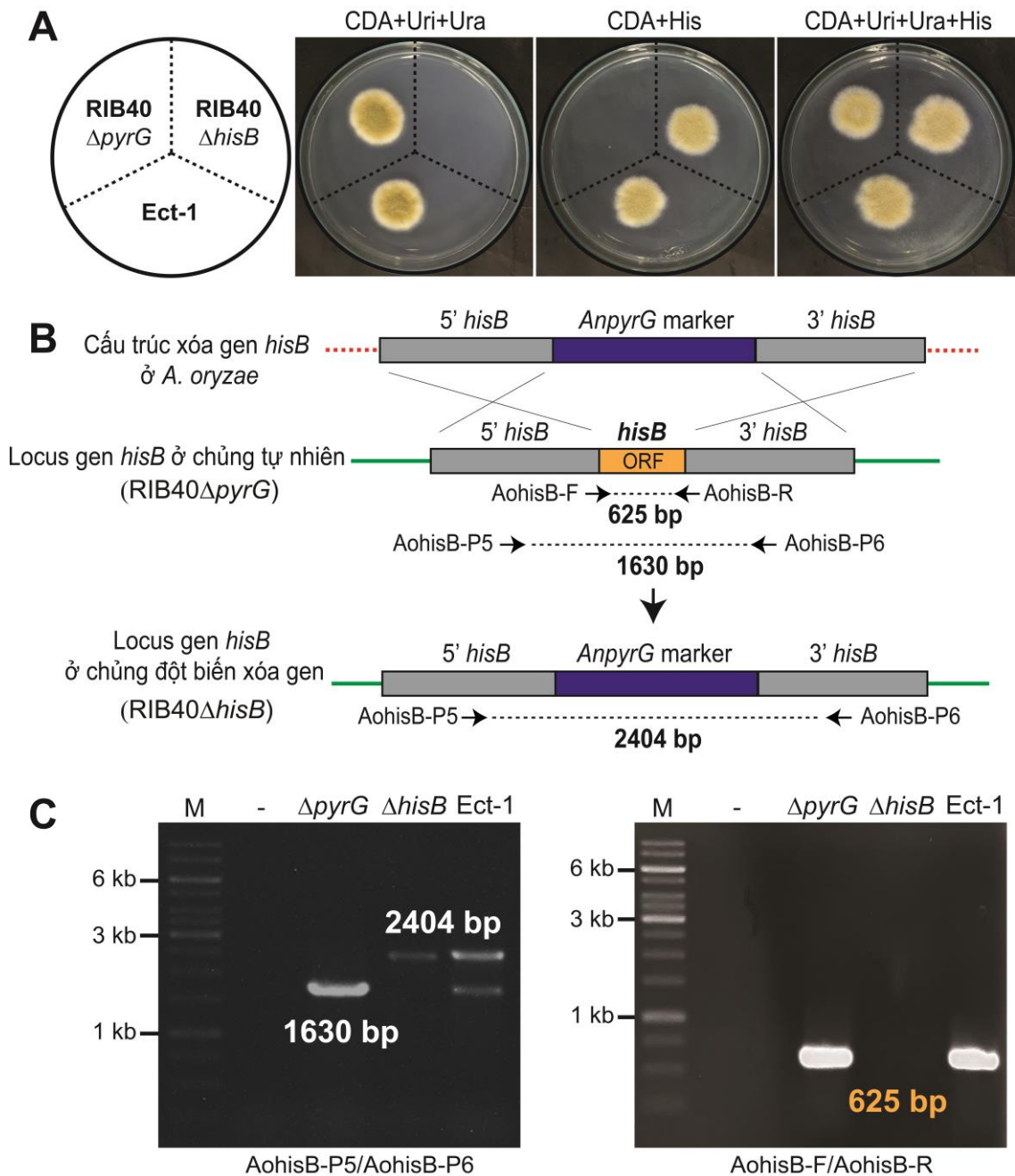
(B) Trình tự protein *A. oryzae* HisB (AO090701000070) được so sánh với các protein *Aspergillus* HisB khác (*A. fumigatus*: Afu6g04700, *A. nidulans*: AN6536, *A. niger*: An15g00610) và *S. cerevisiae* His3 (YOR202W). Các axit amin giống nhau được biểu thị bằng màu đỏ và tính tương đồng (%) giữa *A. oryzae* HisB và các homolog được thể hiện trong ô nền vàng.



Hình 3.2. Sơ đồ tạo vector pAoH

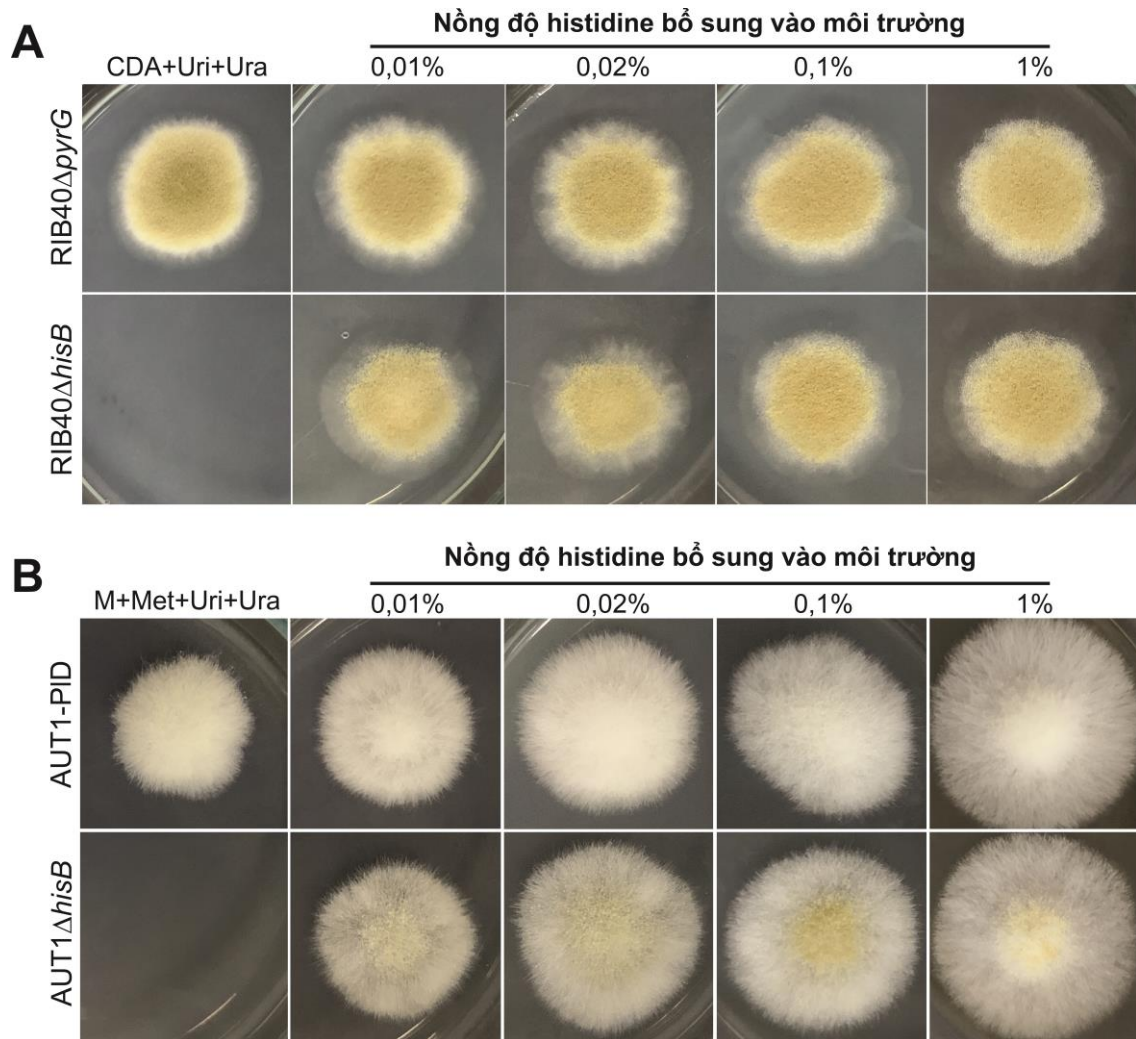
(A) Vector *pKG2* được sử dụng làm vector khung cho tạo cấu trúc xoá gen và gen *pyrG* từ *A. niger* được lựa chọn làm marker chọn lọc. (B) Kết quả cắt kiểm tra vector *pAoH* bằng enzyme giới hạn *XbaI*. M là DNA marker 1 kb (Thermo Fisher Scientific, Mỹ).

Vector *pAoH* dùng cho xóa gen *hisB* có chứa marker chọn lọc *pyrG* được chuyển vào *A. oryzae* khuyết dưỡng uridine/uracil *RIB40ΔpyrG* thông qua phương pháp ATMT như đã báo cáo trước đây [106]. Tất cả các thể chuyển gen sau đó được chuyển sang CDA để sàng lọc các thể đột biến khuyết dưỡng histidine tiềm năng. Chúng đột biến xoá histidine (*RIB40ΔhisB*) đã được kiểm tra sự sinh trưởng trên các môi trường khác nhau. Kết quả cho thấy, so với chủng nền *RIB40ΔpyrG* và 1 thể đột biến chèn ngẫu nhiên (Ect-1) thì chủng đột biến *RIB40ΔhisB* không thể phát triển trên môi trường CDA thiếu histidine (CDA + Uri + Ura), và chỉ phát triển trên CDA được bổ sung histidine (CDA + His) hoặc với môi trường đầy đủ uridine, uracil và histidine (CDA + Uri + Ura + His) (Hình 3.3A). Việc xóa 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). Với cặp mồi AohisB-P5/AohisB-P6, chủng *RIB40ΔhisB* cho 1 băng DNA với kích thước 2,4 kb, lớn hơn 0,77 kb so với chủng nền *RIB40ΔpyrG* và thể đột biến chèn ngẫu nhiên cho 2 băng DNA (2,4 kb và 1,63 kb). Ngoài ra, cặp mồi AohisB-F/AohisB-R có vị trí liên kết trong khung đọc mở *hisB* (ORF) đã được sử dụng để xác nhận sự mất gen.



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 $\Delta hisB$) được kiểm tra đồng thời trên CDA + Uri + Ura, CDA + His và CDA + Uri + Ura + His so với chủng khuyết dưỡng uridine/uracil (RIB40 $\Delta pyrG$) và 1 thể đột biến chèn ngẫu nhiên (Ect-1). Các đĩa được ủ ở 30°C trong 4 ngày. (B) Sơ đồ xác nhận xóa *hisB* nhờ PCR với các vị trí bám mồi đặc hiệu. (C) Kết quả xác nhận xóa gen *hisB* nhờ PCR với các cặp mồi 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).

Kết quả PCR cho thấy không có băng DNA nào ở chủng đột biến khuyết dưỡng histidine RIB40 Δ *hisB*, trong khi các chủng khác cho băng 0,625 kb (Hình 3.3C). Những dữ liệu này đã chứng minh rằng việc loại bỏ toàn bộ vùng ORF của gen *hisB* ở chủng đột biến RIB40 Δ *hisB* đã thành công.

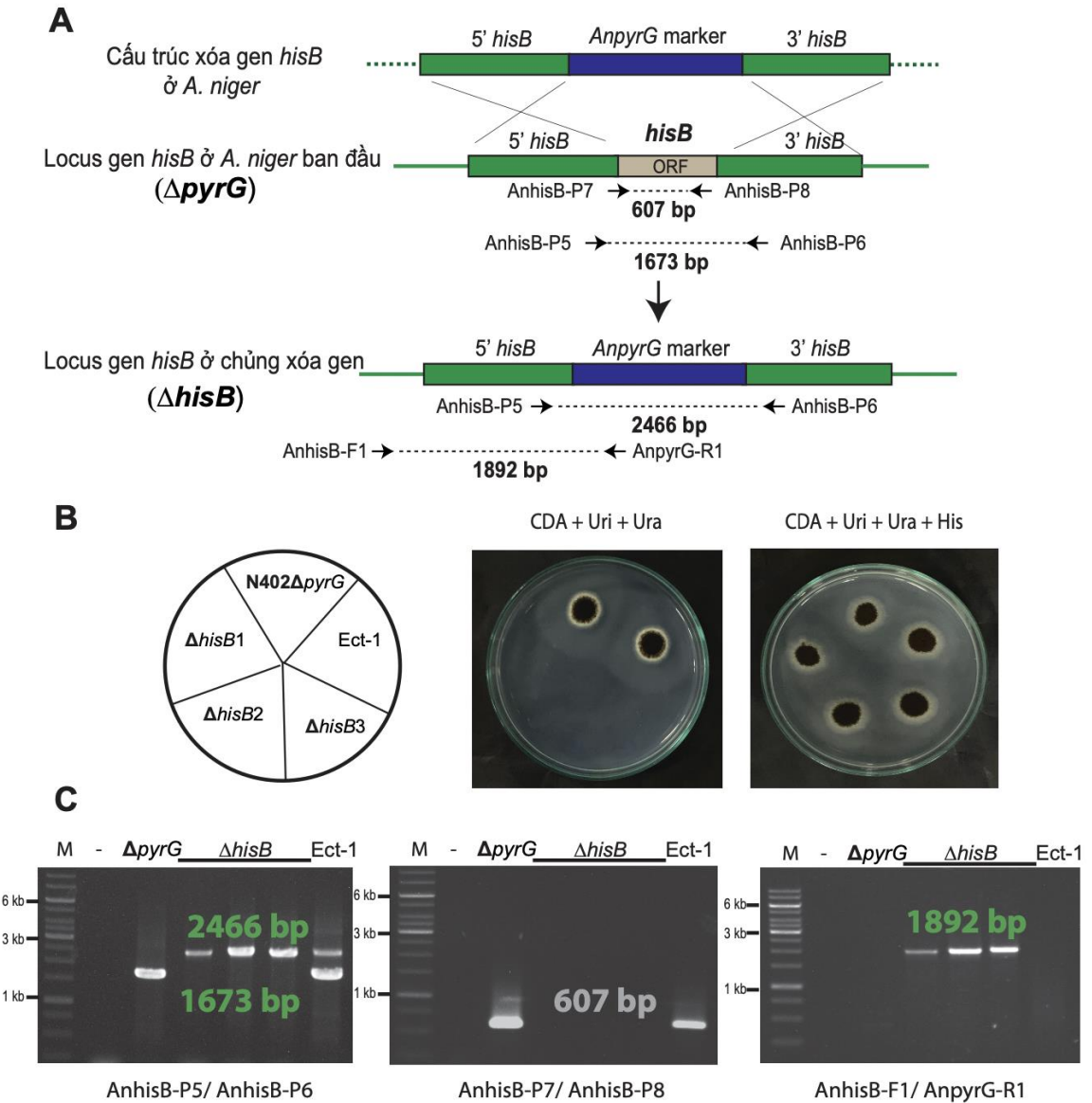


Hình 3.4. Sự phục hồi sinh trưởng của các chủng đột biến khuyết dưỡng histidine ở *A. oryzae*

(A) Các nồng độ histidine khác nhau (0,01-1%) được thêm vào môi trường CDA + Uri + Ura đối với RIB40 Δ *hisB* hoặc (B) M + Met + Uri + Ura đối với AUT1 Δ *hisB*. Các chủng khuyết dưỡng uridine/uracil RIB40 Δ pyrG và AUT1-PID được sử dụng làm đối chứng để so sánh. Các đĩa được ủ ở 30°C trong 4 ngày.

Gen *hisB* cũng bị xóa thêm ở chủng *A. oryzae* AUT1-PID và NsPID1 khuyết dưỡng uridine/uracil để tạo ra chủng đột biến khuyết dưỡng histidine AUT1 Δ *hisB* và NsPID1 Δ *hisB* (Phụ lục 4). Các chủng đột biến khuyết dưỡng histidine được kiểm tra mức độ ổn định bằng cách nuôi cấy bào tử đơn trong ít nhất 3 thế hệ độc lập. Các chủng *A. oryzae* Δ *hisB* được tạo ra trong nghiên cứu này tương đồng về hình thái với chủng gốc. Kiểu hình khuyết dưỡng histidine của chủng đột biến có thể được phục hồi về trạng thái nguyên dưỡng bằng cách bổ sung một lượng nhỏ histidine (0,01–1%) vào môi trường chọn lọc CDA + Uri + Ura hoặc M + Met + Uri + Ura (Hình 3.4, Phụ lục 4).

Việc tạo các chủng đột biến khuyết dưỡng histidine (Δ *hisB*) ở *A. niger* cũng được tiến hành tương tự như ở *A. oryzae*. Trong đó, vector pAnH chứa marker *pyrG* nằm giữa vùng 5' và 3' *hisB*, được sử dụng cho chuyển gen thông qua vi khuẩn *Ag. tumefaciens* ở các chủng N402 Δ *pyrG* và CBS113.46 Δ *pyrG*. Các chủng đột biến khuyết dưỡng histidine N402 Δ *hisB* và CBS113.46 Δ *hisB* được tạo ra nhờ cơ chế trao đổi chéo tương đồng và đã được xác nhận nhờ PCR với các cặp mồi đặc hiệu. Với cặp mồi AnhisB-P5/AnhisB-P6, chủng xóa *hisB* cho 1 băng duy nhất với kích thước 2,466 kb, lớn hơn băng 1,673 kb của chủng N402 Δ *pyrG* và CBS113.46 Δ *pyrG*. Trong khi đó, cấu trúc xóa gen *hisB* chỉ được tích hợp vào hệ gen mà không xảy ra quá trình trao đổi chéo tương đồng ở các thể đột biến chèn ngẫu nhiên. Vì vậy, các thể đột biến chèn ngẫu nhiên cho cả 2 băng 2,466 kb và 1,673 kb. Cặp mồi AnhisB-P7/AnhisB-P8 với vị trí bám mồi hoàn toàn ở trong khung đọc mở của gen *hisB* tiếp tục được xác nhận xóa. Chủng N402 Δ *pyrG* hoặc CBS113.46 Δ *pyrG* ban đầu và thể đột biến chèn ngẫu nhiên đều xuất hiện sản phẩm PCR với kích thước 0,607 kb do vẫn còn khung đọc mở của gen *hisB*, trong khi đó, chủng xóa gen không xuất hiện băng. Cặp mồi AnhisB-F1/AnpyrG-R1 được lựa chọn để khẳng định quá trình xóa gen dựa trên cơ chế tái tổ hợp tương đồng đã diễn ra ở các chủng xóa gen. Chỉ các chủng xóa gen mới cho các sản phẩm PCR với kích thước 1892 bp (Hình 3.5).

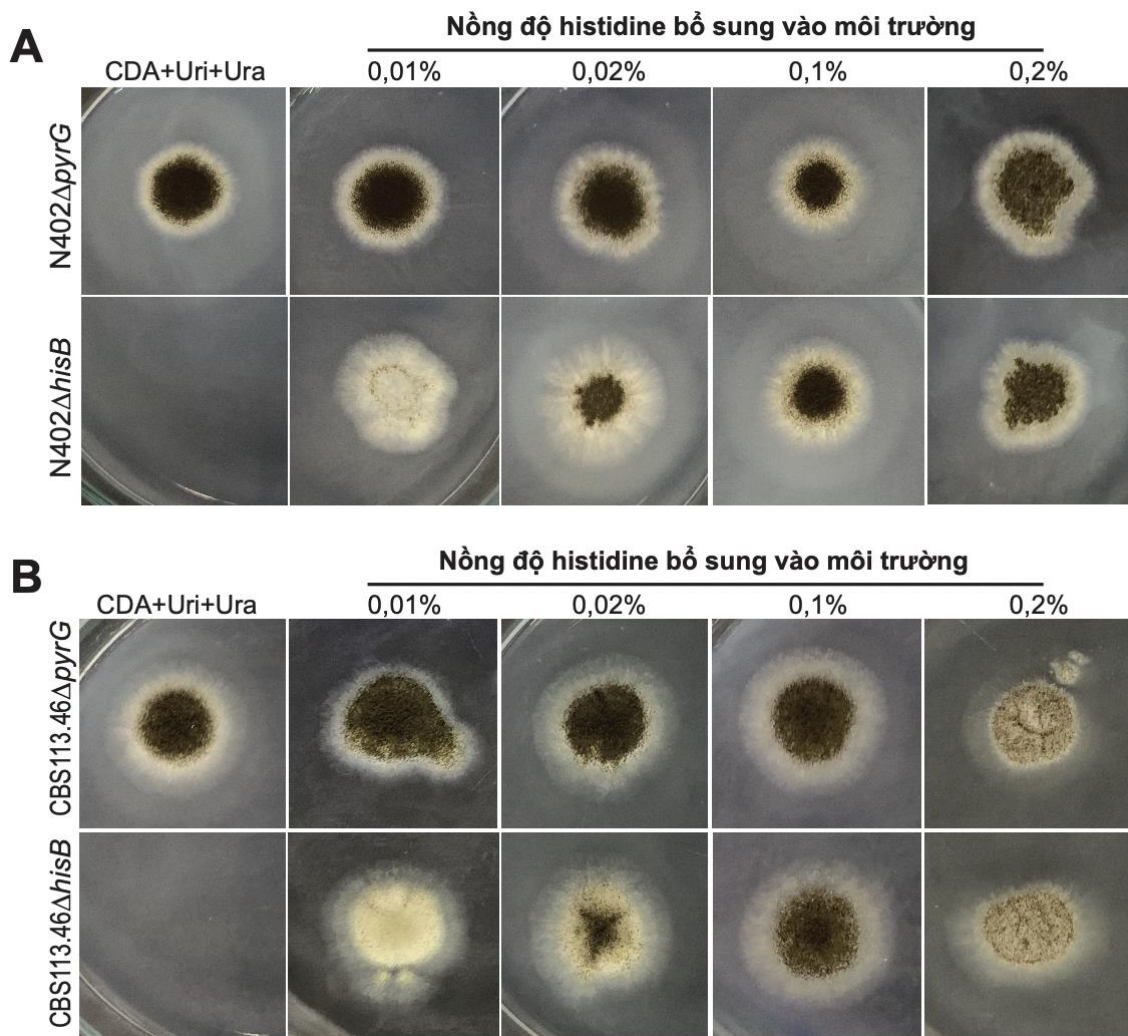


Hình 3.5. Kết quả tạo các chủng đột biến khuyết dưỡng histidine ở *A. niger*

(A) Sơ đồ xác nhận xóa *hisB* nhờ PCR với các vị trí bám mỗi đặc hiệu. (B) Sự phát triển của chủng đột biến khuyết dưỡng histidine ($N402\Delta hisB$) được kiểm tra đồng thời trên CDA + Uri + Ura và CDA + Uri + Ura + His so với chủng khuyết dưỡng uridine/uracil ($N402\Delta pyrG$, $CBS113.46\Delta pyrG$) ban đầu. Các đĩa được ủ ở 30°C trong 4 ngày. (C) Kết quả xác nhận xóa gen *hisB* nhờ PCR với các cặp mồi đặc hiệu *AnhisB-P5/AnhisB-P6*, *AnhisB-P7/AnhisB-P8* và *AnhisB-F1/AnpyrG-R1*, (-) là đối chứng âm, M là DNA marker 1 kb (Thermo Fisher Scientific, Mỹ).

Tương tự với *A. oryzae*, các chủng xoá gen *hisB* ở *A. niger* cũng được kiểm tra mức độ phục hồi sinh trưởng và hình thành bào tử. Các chủng nấm này được nuôi cấy trên môi trường CDA có bổ sung 0,1% uridine, 0,1% uracil (CDA + Uri + Ura) và histidine với các tỷ lệ 0%; 0,01%; 0,02%; 0,1% và 0,2%. Hình thái của các chủng xoá gen được so sánh đồng thời với chủng nền dùng cho chuyển gen là N402 Δ *pyrG*, CBS113.46 Δ *pyrG*. Chủng xoá gen *hisB* không thể sinh trưởng trên môi trường CDA + Uri + Ura thông thường, chúng chỉ có thể phục hồi sinh trưởng khi môi trường được bổ sung thêm histidine. Ở các nồng độ histidine thấp như 0,01%; chủng xoá gen hầu như chưa phục hồi được khả năng hình thành bào tử. Khi nồng độ histidine đạt tới 0,02% khả năng hình thành bào tử đã phục hồi. Tuy nhiên, nếu nồng độ histidine được bổ sung vào môi trường quá cao, khả năng hình thành bào tử của các chủng nấm đều bị ức chế. Đặc biệt, ở nồng độ 0,02% histidine, chủng CBS113.46 Δ *pyrG* và CBS113.46 Δ *hisB* đều bị giảm khả năng hình thành bào tử (Hình 3.6).

Phương pháp ATMT đã được sử dụng rộng rãi để chuyển gen ở nhiều loại nấm sợi. Phương pháp này cũng đã được chứng minh là hiệu quả cho cả xoá gen và biểu hiện gen [65, 84]. Tuy nhiên, việc áp dụng ATMT vẫn chủ yếu dựa trên marker chọn lọc là các gen kháng thuốc. Hiện nay, các marker chọn lọc là gen dinh dưỡng đã được ứng dụng rộng rãi trong chuyển gen ở nấm thông qua phương pháp sử dụng tế bào trần [97]. 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. Một số chủng khuyết dưỡng cùng với các marker chọn lọc tương ứng đã được thiết lập ở cả nấm men và nấm sợi [112, 127]. *A. oryzae* có khả năng kháng tự nhiên đối với nhiều loại kháng sinh phổ biến trong chuyển gen [107]. Do đó, việc xây dựng các đột biến khuyết dưỡng đóng một vai trò quan trọng trong việc phát triển các hệ thống chuyển gen mới cho loài nấm này. Một số marker dinh dưỡng như *pyrG*, *adeA*, *niaD*, *argB* đã được tuyển chọn để biến đổi gen ở *A. oryzae* với phương pháp chuyển gen bằng tế bào trần. Cho đến nay, *pyrG* là marker chọn lọc duy nhất được sử dụng thành công để chuyển gen ở *A. oryzae* nhờ ATMT [107].



Hình 3.6. Sự phục hồi sinh trưởng của các đột biến *A. niger* xóa gen *hisB*

(A) Các nồng độ histidine khác nhau (0,01-0,2%) được thêm vào môi trường CDA + Uri + Ura. Các chủng khuyết dưỡng uridine/uracil N402 Δ pyrG và CBS113.46 Δ pyrG được sử dụng làm đối chứng để so sánh. Các đĩa được ủ ở 30°C trong 4 ngày.

Gần đây, 1 ortholog của *HIS3* là *hisB* ở nấm sợi *A. niger* đã được báo cáo là một marker chọn lọc tốt cho các nghiên cứu xoá gen [49]. Trên thực tế, gen *HIS3* mã hóa imidazoleglycerol phosphate dehydratase (một enzyme cần thiết cho quá trình sinh tổng hợp histidine) là một trong những marker dinh dưỡng phổ biến nhất được sử dụng để thao tác di truyền ở nấm men *S. cerevisiae* [127]. Protein His3/HisB bảo thủ trong hệ gen của các loại nấm khác nhau và protein HisB từ các loài *Aspergillus* có mức độ tương đồng cao khoảng 87–90% (Hình 3.1B). Fieldler và cộng sự (2017)

đã chỉ ra rằng gen *hisB* của *A. nidulans* có thể được sử dụng để bổ trợ cho *A. niger* khuyết dưỡng histidine nhằm giúp phục hồi trạng thái nguyên dưỡng cho các chủng *A. niger* chuyển gen [49].

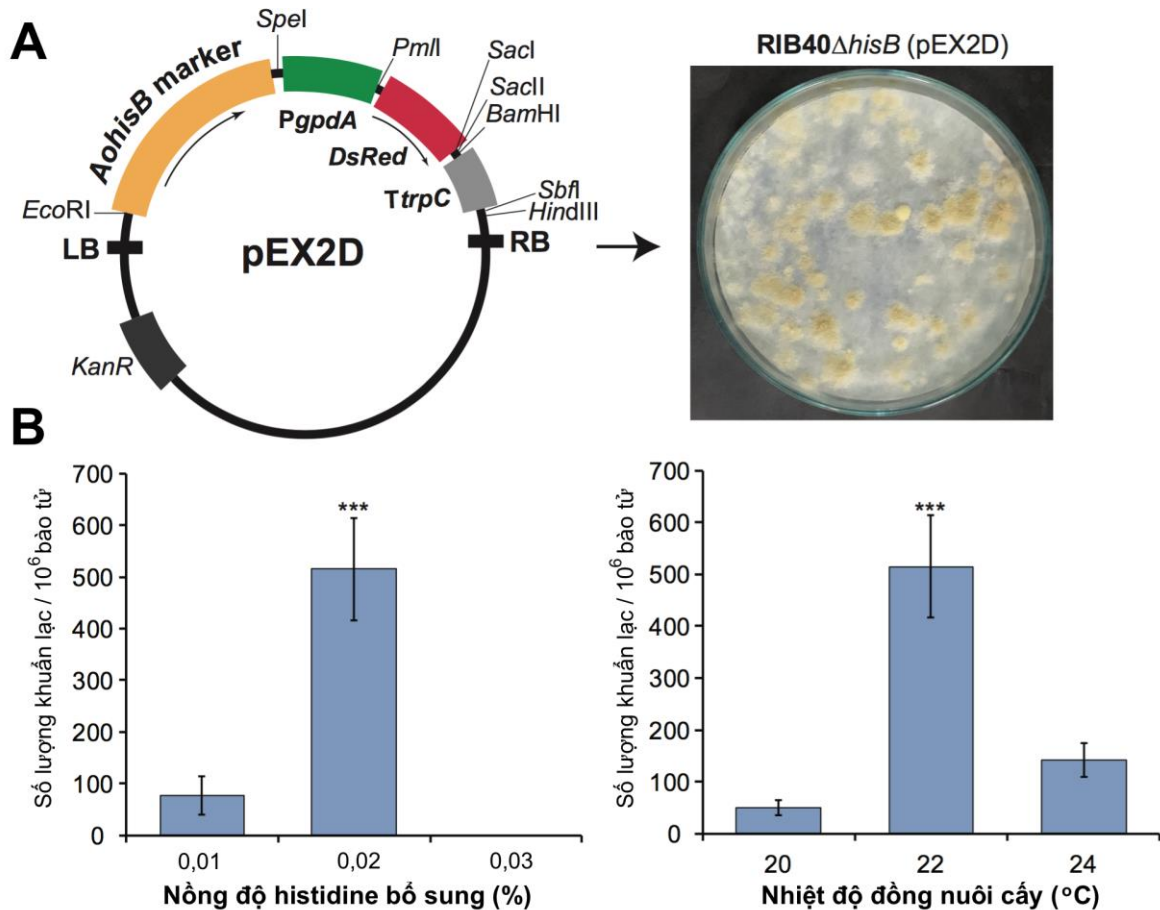
Tuy nhiên, việc sử dụng *hisB* như một marker chọn lọc để biến đổi gen chưa được báo cáo ở *A. oryzae*. Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã xóa thành công gen *hisB* trong 3 chủng nấm *A. oryzae* khuyết dưỡng uridine/uracil độc lập để tạo ra các chủng đột biến khuyết dưỡng histidine (Hình 3.3, Phụ lục 4). Chúng tôi đã phải sử dụng các chủng khuyết dưỡng uridine/uracil và marker chọn lọc *pyrG* để xóa *hisB* vì không thể xóa gen này trực tiếp ở *A. oryzae* hoang dại mà không cần bất cứ marker chọn lọc nào. Việc thay thế gen *hisB* nguyên vẹn bằng cassette xóa *hisB* chứa marker *pyrG* bằng cách tái tổ hợp tương đồng dẫn đến việc loại bỏ vùng ORF của gen *hisB* khỏi hệ gen nấm (Hình 3.2B). Hiệu quả loại bỏ *hisB* rất thấp (<1%) ở các chủng *A. oryzae* khuyết dưỡng uridine/uracil. LigD tham gia vào quá trình tích hợp nhiễm sắc thể không tương đồng ở nấm và việc xóa gen *ligD* đã giúp cho hiệu quả xóa gen nhờ tái tổ hợp tương đồng cao hơn ở *A. oryzae* [102]. Tuy nhiên, việc loại bỏ *hisB* ở chủng nền AUT1-PID và NsPID1 có kiểu gen $\Delta ligD$ [169] không cho thấy hiệu quả cao hơn so với ở chủng RIB40 $\Delta pyrG$ vẫn mang gen *ligD* nguyên vẹn. Mặc dù vậy, việc loại bỏ thành công *hisB* bằng cách tái tổ hợp tương đồng vẫn là một lựa chọn tốt để tạo ra các đột biến khuyết dưỡng histidine ổn định cho các thao tác di truyền tiếp theo ở *A. oryzae*.

So với *A. oryzae*, hiệu quả xóa *hisB* ở cả 2 chủng *A. niger* đều cao hơn, đạt tới $16,51\% \pm 3,01\%$ (đối với N402 $\Delta pyrG$) và $13,69\% \pm 2,98\%$ (đối với CBS113.46 $\Delta pyrG$) khi sử dụng phương pháp ATMT. Gen *hisB* trước đó đã được xóa ở *A. niger* với hệ thống xóa gen không đánh dấu (Unmarked Gene Deletion System) nhờ chuyển gen bằng tế bào trần ở chủng nấm đột biến khuyết dưỡng uridine/uracil (*pyrG*⁻) và bị hỏng con đường NHEJ [43, 49]. Tuy nhiên, khi sử dụng phương pháp này, cần tiến hành kiểm tra và sàng lọc nhiều lần để có thể thu được thể đột biến xóa gen. Trong khi đó, sử dụng hệ thống chuyển gen sử dụng ATMT mới phát triển, các thể đột biến đã được xác nhận nhờ PCR ổn định về mặt di truyền và sẵn sàng cho các thí nghiệm kế tiếp. Hơn nữa, hệ thống chuyển gen này cho phép loại bỏ gen *hisB* ở

nấm sợi *A. oryzae* và *A. niger* khi các chủng ban đầu chỉ cần là chủng khuyết dưỡng uridine/uracil ($\Delta pyrG$ hoặc $pyrG^-$).

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

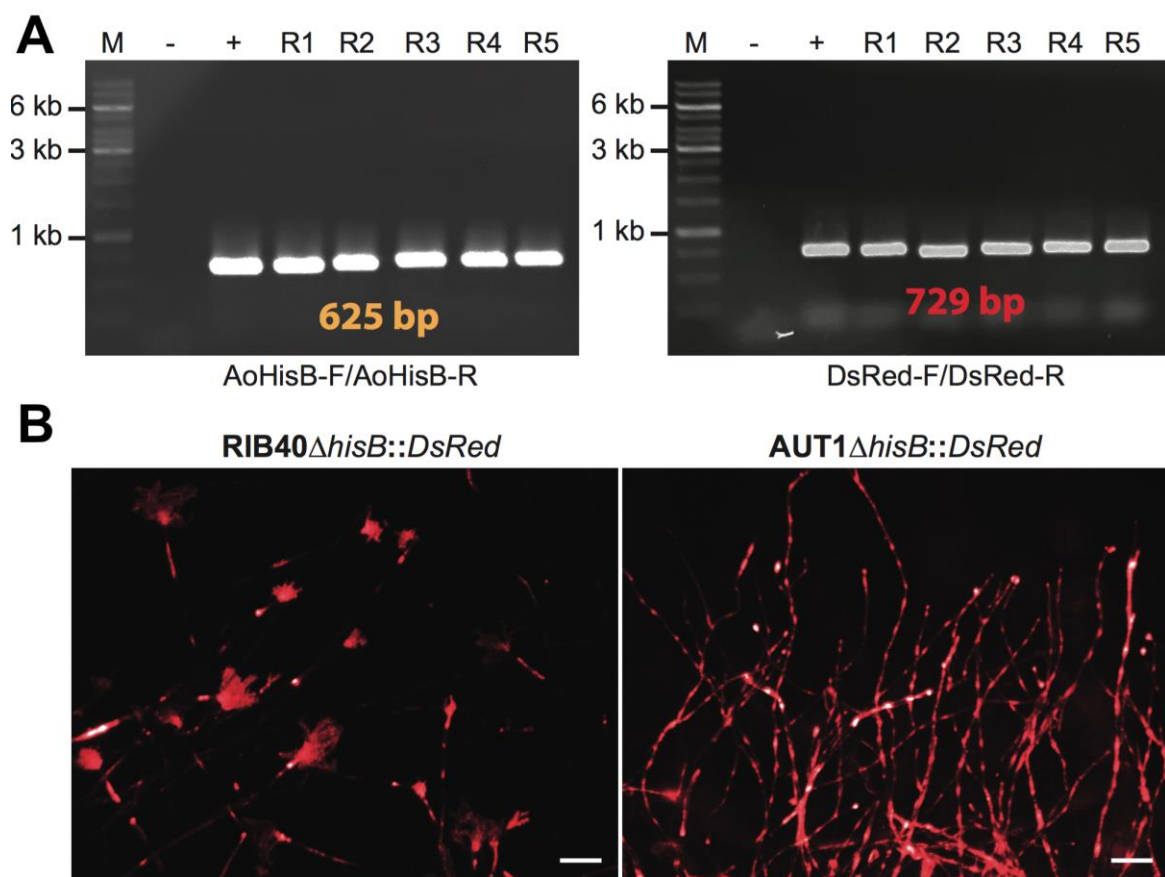
Gần đây, ATMT đã được chứng minh là một công cụ hiệu quả để chuyển gen ở nấm sợi *A. oryzae* [106, 138]. Tuy nhiên, phương pháp này vẫn còn nhiều hạn chế do thiếu các marker chọn lọc phù hợp, đặc biệt là các marker trợ dưỡng mới. Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã xây dựng vector nhị thể mới pEX2D mang marker chọn lọc *hisB* để biểu hiện gen tái tổ hợp ở *A. oryzae* khuyết dưỡng histidine. Vector này chứa các vị trí enzyme giới hạn thích hợp để tạo các cấu trúc biểu hiện gen quan tâm (Hình 3.7A). Trước đây chúng tôi đã tìm ra rằng các điều kiện tối ưu cho chuyển gen với ATMT ở *A. oryzae* khuyết dưỡng uridine/uracil bao gồm việc bổ sung 200 μ M AS, 0,05% uridine và 0,05% uracil vào môi trường cảm ứng; nhiệt độ 22°C và thời gian 60 giờ cho quá trình đồng nuôi cấy [106]. Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã xác nhận rằng những điều kiện này cũng thích hợp cho sự chuyển gen của *A. oryzae* khuyết dưỡng histidine bằng cách sử dụng phương pháp ATMT và marker chọn lọc *hisB*. Tuy nhiên, histidine đã được thêm vào môi trường cảm ứng thay vì uridine/uracil để hỗ trợ sự nảy mầm của bào tử nấm. Việc bổ sung 0,02% histidine vào môi trường cảm ứng để đồng nuôi cấy cho hiệu suất chuyển gen cao, đạt 515 ± 99 thể chuyển gen/ 10^6 bào tử nấm. Ngược lại, khi giảm nồng độ histidine xuống 0,01%, hiệu suất chuyển gen thấp hơn đáng kể. Khi môi trường cảm ứng chứa nồng độ histidine cao hơn (0,03%), quá trình chuyển gen không thành công do sự phát triển quá mức của chủng khuyết dưỡng histidine. Trong quá trình đồng nuôi cấy, những thay đổi về nhiệt độ có thể ảnh hưởng đến sự nảy mầm của bào tử và sự phát triển ban đầu của *A. oryzae* khuyết dưỡng histidine. Do đó, chúng tôi đã kiểm tra thêm liệu các nhiệt độ khác nhau (20, 22, 24°C) trong quá trình đồng nuôi cấy có thể ảnh hưởng đến hiệu quả chuyển gen hay không. Kết quả cho thấy, nhiệt độ 22°C vẫn là thích hợp nhất cho sự chuyển gen thông qua vi khuẩn *Agrobacterium* của *A. oryzae* khuyết dưỡng histidine (Hình 3.7B).



Hình 3.7. Các thông số tối ưu cho chuyển gen ở chủng *A. oryzae* khuyết dưỡng histidine bằng phương pháp ATMT

(A) Vector nhị thể mới pEX2D được xây dựng chứa marker chọn lọc là *A. oryzae hisB* (*AohisB*) và kết quả đại diện cho chuyển gen thông qua vi khuẩn *Agrobacterium* ở *A. oryzae* RIB40 Δ *hisB* bằng cách sử dụng vector nhị thể pEX2D. (B) Nồng độ histidine được thêm vào môi trường cảm ứng và nhiệt độ đồng nuôi cấy ảnh hưởng mạnh mẽ đến hiệu quả chuyển gen. Các thí nghiệm được thực hiện trong 3 lần độc lập. Dữ liệu đại diện cho giá trị trung bình \pm SD và sự khác biệt có ý nghĩa thống kê được phân tích bằng Student's *t*-test ($p < 0,05$). Ký hiệu *** cho biết $p < 0,001$.

Hiệu suất ATMT chuyển gen sử dụng marker *hisB* cho 515 ± 99 thể chuyển gen/ 10^6 bào tử, thấp hơn đáng kể khi so sánh với chuyển gen sử dụng marker *pyrG* (đạt 1060 ± 143 thể chuyển gen/ 10^6 bào tử) [106]. Tuy nhiên, hiệu suất này vẫn đủ tốt cho các nghiên cứu trong tương lai về thao tác di truyền ở loại nấm sợi này.

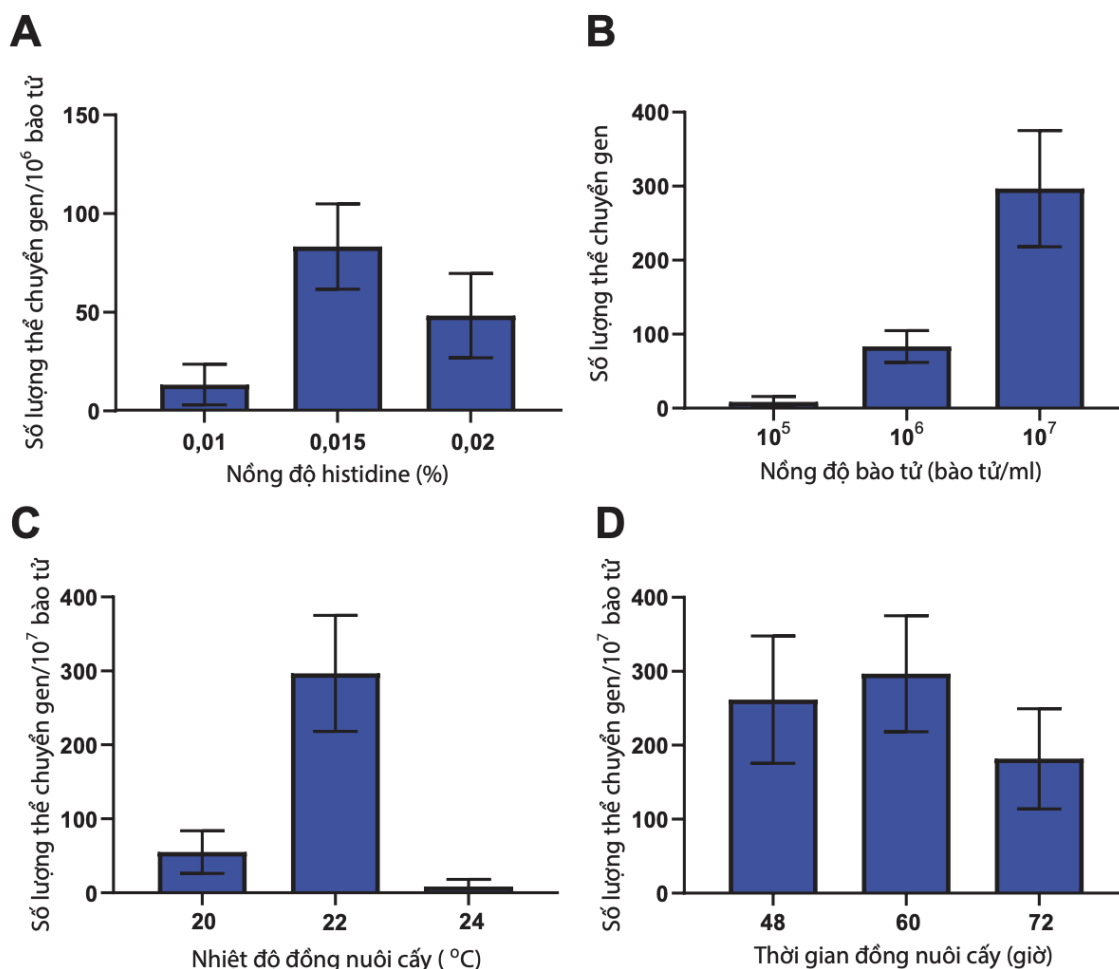


Hình 3.8. Sự tích hợp và biểu hiện của protein DsRed ở các chủng đột biến khuyết dưỡng histidine Δ hisB

(A) Năm thể chuyển gen được chọn (R1 – R5) được sử dụng để chứng minh cấu trúc T-DNA chứa marker chọn lọc *hisB* và trình tự mã hoá cho protein DsRed trong hệ gen nấm. Các cặp môi cụ thể: AohisB-F/AohisB-R và DsRed-F/DsRed-R đã được lựa chọn để khuếch đại gen *hisB* và DsRed từ hệ gen của các thể chuyển gen. M là DNA marker 1 kb (Thermo Fisher Scientific, Mỹ). (B) Các thể chuyển gen biểu hiện DsRed (RIB40 Δ hisB::DsRed, AUT1 Δ hisB::DsRed) dưới kính hiển vi huỳnh quang Axioplan với độ phóng đại 400 lần. Các thể chuyển gen được nuôi cấy trên các lam kính có chứa môi trường CDA hoặc M + Met ở 30°C trong 3 ngày.

Để xác nhận sự thành công của chuyển gen ở *A. oryzae*, một số khuẩn lạc đã được chọn để xác định sự tích hợp của marker *hisB* và gen báo cáo DsRed trong hệ gen bằng PCR. Các cặp môi đặc hiệu AohisB-F/AohisB-R và DsRed-F/DsRed-R

được sử dụng để khuếch đại đoạn gen *hisB* và *DsRed* tương ứng. Kết quả cho thấy rằng, cả marker *hisB* và đoạn gen *DsRed* đều có mặt trong hệ gen của các thể chuyển gen được lựa chọn (Hình 3.8A). Việc kiểm tra thêm các thể chuyển gen này dưới kính hiển vi huỳnh quang chỉ ra rằng gen báo cáo *DsRed* được biểu hiện mạnh trong hệ sợi nấm, conidiophore và bào tử (Hình 3.8B).

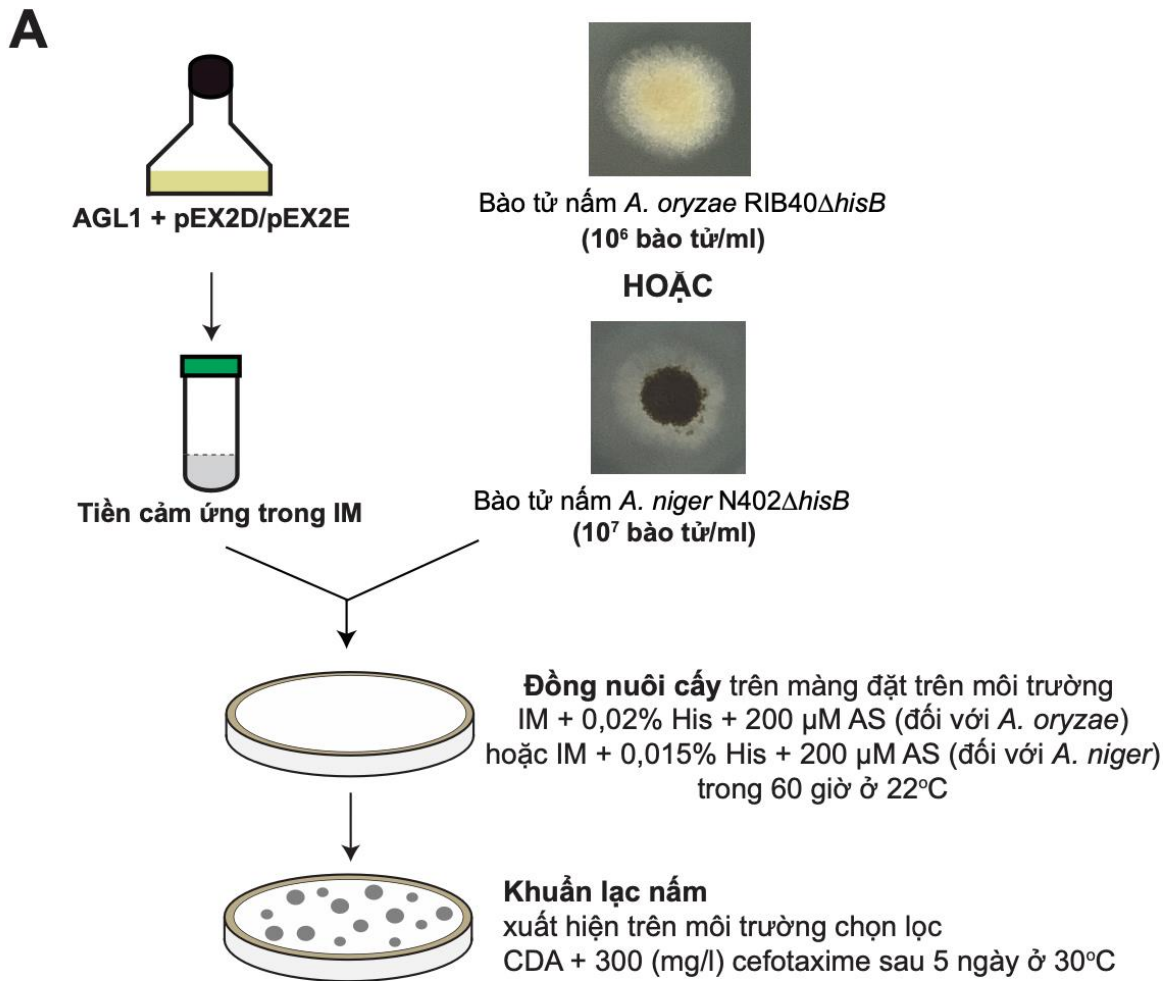


Hình 3.9. Các điều kiện tối ưu cho hệ thống ATMT ở *A. niger* khuyết dưỡng histidine

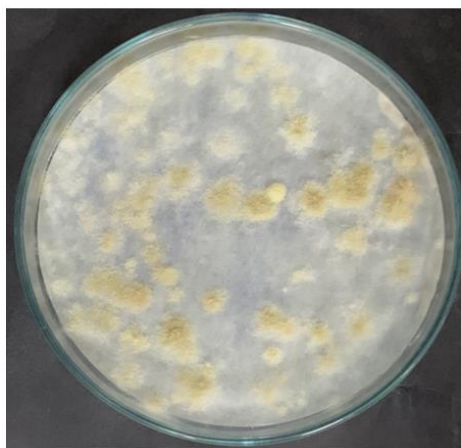
Bốn thông số quan trọng đối với ATMT bao gồm nồng độ histidine (0,01; 0,015; 0,02%) trong môi trường cảm ứng (A), nồng độ bào tử (10⁵, 10⁶, 10⁷ bào tử/ml) (B), nhiệt độ đồng nuôi cấy (20, 22, 24°C) (C) và thời gian đồng nuôi cấy (48, 60, 72 giờ) (D) đã được kiểm tra. Tất cả các thí nghiệm được thực hiện 3 lần độc lập và dữ liệu được biểu thị dưới dạng giá trị trung bình ± độ lệch chuẩn.

Một vector nhĩ thể có tên là pEX2E chứa marker chọn lọc là gen *hisB* từ *A. niger* đã được tạo để tối ưu chuyển gen cho các chủng đột biến khuyết dưỡng histidine ở *A. niger* (Hình 3.11A). Vector này chứa 672 bp vùng promoter của *hisB*, toàn bộ vùng khung đọc mở của gen *hisB* và 131 bp *hisB* terminator. Điều kiện tối ưu cho chuyển gen ở *A. niger* khuyết dưỡng histidine tương tự đối với *A. oryzae*, trong đó nồng độ bào tử tối ưu là 10^7 bào tử/ml, môi trường cảm ứng IM được bổ sung 0,015% histidine và 200 μ M AS, nhiệt độ đồng nuôi cấy là 22°C, thời gian đồng nuôi cấy đạt 60 giờ. Hiệu suất chuyển gen trong trường hợp này đạt được là 297 ± 62 thể chuyển gen cho 10^7 bào tử với chủng nền N402 Δ *hisB* và 285 ± 58 thể chuyển gen cho 10^7 bào tử với chủng nền CBS113.46 Δ *hisB* (Hình 3.9).

Các thông số tối ưu cho chuyển gen ở *A. oryzae* và *A. niger* khuyết dưỡng histidine được mô tả như trong Hình 3.10. Nói chung, hiệu suất chuyển gen bị ảnh hưởng bởi nhiều yếu tố. Trong một số trường hợp, bắt buộc phải dùng protoplast là nguyên liệu ban đầu để chuyển gen thành công ở *Rhizopus oryzae* và *Mucor circinelloides* [99]. Tuổi của nguyên liệu cũng đóng một vai trò quan trọng. Ví dụ, sử dụng bào tử được lưu trữ trong thời gian dài ở 4°C đối với *A. awamori* và *A. niger* cho hiệu quả chuyển gen kém hơn [99]. Vì vậy, trong các nghiên cứu của chúng tôi, bào tử dùng cho chuyển gen là các bào tử mới thu và đã được kiểm tra khả năng khuyết dưỡng. Bên cạnh đó, các chủng khác nhau của cùng một loài nấm thường cho hiệu suất chuyển gen khác nhau, có thể là do sự khác biệt của thành tế bào hoặc đặc điểm sinh trưởng. Với cùng một vector biểu hiện, hiệu quả chuyển gen ở các chủng *A. oryzae* đột biến khuyết dưỡng uridine/uracil cũng rất khác nhau. Với chủng *A. oryzae* RIB40 Δ *pyrG*, hiệu quả chuyển gen lên tới hơn 1000 thể chuyển gen cho 10^6 bào tử. Trong khi đó hiệu quả chuyển gen chỉ đạt 265 ± 13 thể chuyển gen cho 10^6 bào tử nấm ở chủng *A. oryzae* VS1 Δ *pyrG* [106]. Thậm chí, hiệu quả chuyển gen vào chủng *A. oryzae* AUT1-PID hỏng gen *ligD* chỉ đạt 116 ± 39 thể chuyển gen cho 10^7 bào tử nấm [106]. Tương tự, các chủng đột biến histidine cũng cho hiệu quả chuyển gen khác nhau. Đặc biệt, với 2 chủng có đột biến hỏng gen *ligD* là *A. oryzae* AUT1 Δ *hisB* và *A. oryzae* NsHID1, hiệu quả chuyển gen chỉ đạt tương ứng là 340 thể chuyển gen cho 10^7 bào tử hoặc 73 thể chuyển gen cho 10^6 bào tử.



B



RIB40 Δ hisB::DsRed



N402 Δ hisB::DsRed

Hình 3.10. Các thông số tối ưu cho chuyển gen vào nấm *A. oryzae* và *A. niger* khuyết dưỡng histidine sử dụng phương pháp ATMT

(A) Sơ đồ chuyển gen tối ưu. (B) Kết quả chuyển gen đại diện đối với *A. oryzae* RIB40 Δ hisB và *A. niger* N402 Δ hisB.

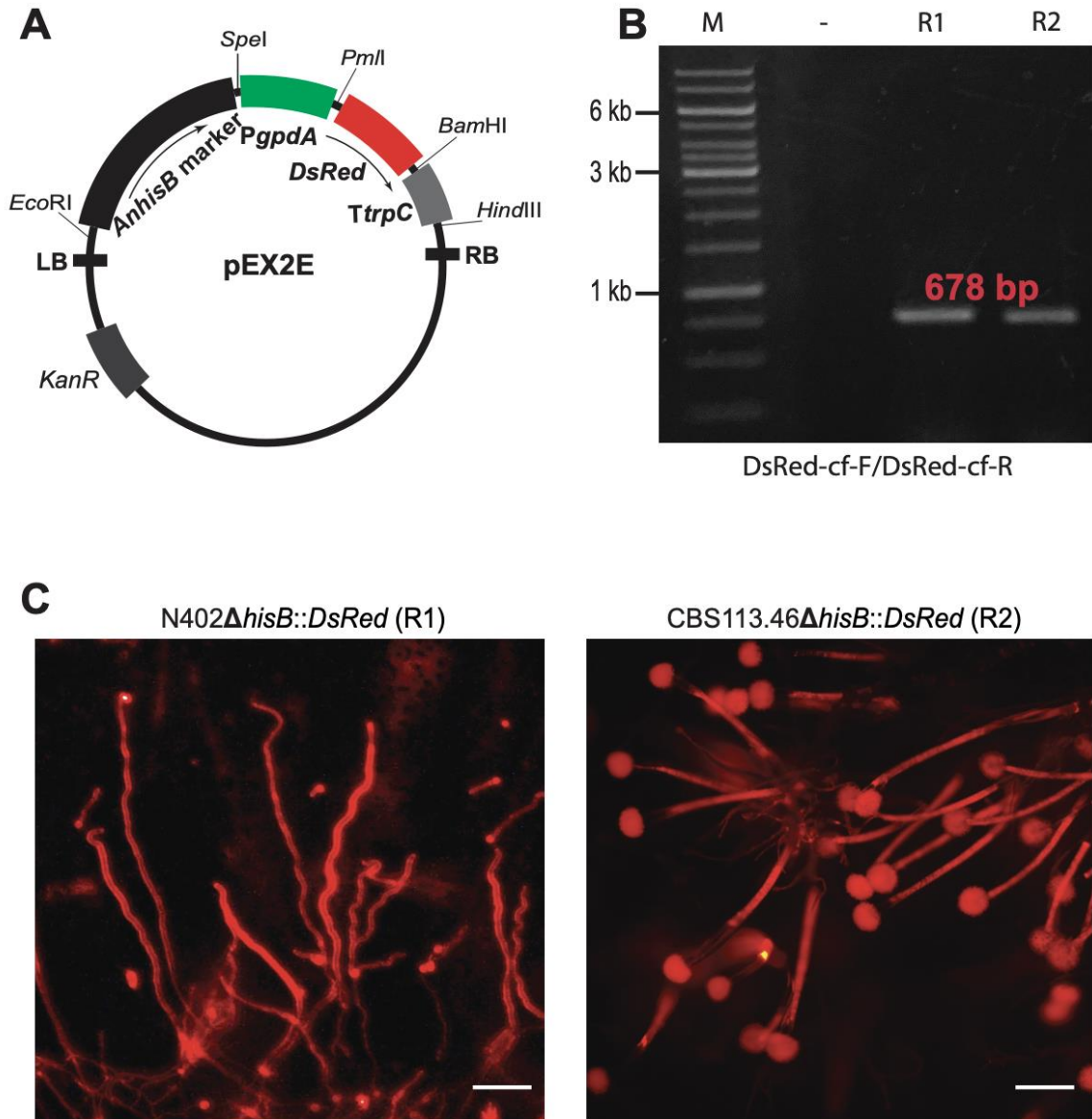
Hiệu quả chuyển gen phụ thuộc chủ yếu vào các điều kiện đồng nuôi cấy. Thời gian đồng nuôi cấy, nhiệt độ, pH và loại màng lọc được chọn có ảnh hưởng rất lớn tới số lượng thể chuyển gen. Để chuyển gen ở nấm, nhiệt độ thích hợp là từ 20°C đến 28°C. Đây là nhiệt độ tối ưu cho việc chuyển T-DNA. Trong nghiên cứu liên quan tới chuyển gen ở *A. oryzae* với marker chọn lọc là gen *pyrG*, 22°C là nhiệt độ được lựa chọn cho đồng nuôi cấy vi khuẩn và nấm [106]. Trong nghiên cứu này, chúng tôi một lần nữa xác nhận rằng 22°C là nhiệt độ tối ưu cho chuyển gen ở các chủng *A. oryzae* và *A. niger* khuyết dưỡng histidine sử dụng phương pháp ATMT. Các công bố trước đó cũng khẳng định 16-96 giờ là thời điểm thích hợp cho đồng nuôi cấy tùy thuộc vào nấm và chủng *Ag. tumefaciens* [99]. Đối với *A. oryzae* và *A. niger*, 60 giờ là thời gian đồng nuôi cấy thích hợp để có thể đạt được số lượng các thể chuyển gen cao nhất.

Bên cạnh đó, màng lọc ưa nước được sử dụng để hỗ trợ đồng nuôi cấy và giúp chuyển các khuẩn lạc đơn vào môi trường sàng lọc. Màng lọc Nitrocellulose, Hybond, giấy lọc, giấy bóng kính và polyvinylidene difluoride đã được sử dụng cho ATMT. Tuy nhiên, hiệu quả chuyển gen không giống nhau. Ví dụ, sử dụng màng Hybond N hoặc Hybond N⁺ cho hiệu quả chuyển gen cao hơn ở *A. awamori* so với sử dụng màng Hybond C và nitrocellulose. Khi sử dụng màng nitrocellulose cho *P. infestans*, không thu được thể chuyển gen. Nếu sử dụng màng Nytran hoặc Hybond N⁺ ở *P. infestans* thì kết quả chuyển gen tốt hơn 2 đến 3 lần so với Hybond N⁺ [99]. Trong nghiên cứu này, chúng tôi sử dụng giấy lọc cellulose (FT 3-303-090, Sartorius) để thực hiện các thí nghiệm chuyển gen. Loại giấy lọc này đã được chứng minh là hỗ trợ cho chuyển gen hiệu quả ở nấm sợi *P. digitatum* với hiệu suất chuyển gen lên tới 1240 ± 65 thể chuyển gen cho 10^6 bào tử [152]. Đặc biệt, sử dụng loại giấy lọc này trong chuyển gen ở *A. oryzae* RIB40 cũng cho hiệu suất chuyển gen vượt trội, lên tới 1060 ± 143 thể chuyển gen cho 10^6 bào tử. Ngoài ra, để kích hoạt sự biểu hiện của các gen *vir* cần thiết cho quá trình vận chuyển và tích hợp T-DNA vào hệ gen nấm, việc bổ sung AS vào môi trường cảm ứng và môi trường tiền cảm ứng trước quá trình chuyển gen là rất cần thiết. Các loại nấm khác nhau cho thấy yêu cầu về nồng độ AS khác nhau để đạt hiệu quả chuyển gen cao nhất. Nồng độ AS phù hợp đã cải thiện tần số chuyển

gen của nấm *B. bassiana*, *F. oxysporum* và *M. grisea*. Bên cạnh đó, tỷ lệ tối ưu của nấm và *Ag. tumefaciens* nên được xác định để có hiệu quả chuyển gen cao nhất. Thông thường, tỷ lệ nấm được tối ưu tương đương với tỷ lệ các tế bào vi khuẩn *Ag. tumefaciens*. Trong một số trường hợp, sự gia tăng của các tế bào *Ag. tumefaciens* trong hỗn hợp đồng nuôi cấy đôi khi tăng tần số chuyển gen, nhưng quá nhiều tế bào *Ag. tumefaciens* sẽ làm giảm hiệu quả chuyển gen. Mặt khác, rất khó để phân tách các thể chuyển gen nếu nấm phát triển quá nhiều trong quá trình đồng nuôi cấy. pH đồng nuôi cấy có tác động mạnh mẽ đến sự chuyển gen. Không quan sát thấy thể chuyển gen khi được nuôi cấy ở pH 5,0 hoặc pH 5,9; pH tối ưu là khoảng 5,5 đối với *U. scitaminea*. pH tối ưu cho chuyển gen ở *U. maydis* là 5,7. pH tối ưu cho *C. trifolii* và *C. lagenarium* nằm trong khoảng từ 5,0 đến 5,3. pH cũng phụ thuộc vào các chủng *Ag. tumefaciens*, trong đó pH là tối ưu cho các gen *vir* khác nhau của các chủng *Ag. tumefaciens* là khác nhau [99].

Trong những nghiên cứu đầu tiên về chuyển gen ở *A. niger* sử dụng phương pháp ATMT, de Groot và cộng sự chỉ ghi nhận 5 thể chuyển gen cho 10^7 bào tử *A. niger* khi sử dụng marker chọn lọc là gen kháng kháng sinh hygromycin. Sau đó, các nhà khoa học đã phát triển các cách tiếp cận khác nhau nhằm nâng cao hiệu suất chuyển gen ở *A. niger* [41]. Hiệu suất chuyển gen đã đạt 50-100 thể chuyển gen/ 10^7 bào tử [85]. Trong nghiên cứu này, hiệu suất chuyển gen ở *A. niger* với marker chọn lọc là gen *hisB* đạt tới 285-297 thể chuyển gen/ 10^7 bào tử, cao hơn 3-60 lần so với các nghiên cứu trước đó.

Sự thành công của quá trình chuyển gen ở *A. niger* cũng tiếp tục được xác nhận bằng cách kiểm tra khả năng phát quang đỏ của các thể chuyển gen dưới kính hiển vi huỳnh quang (Hình 3.11C). Các tín hiệu huỳnh quang đỏ trên toàn bộ hệ sợi nấm của các thể chuyển gen được quan sát rõ ràng dưới kính hiển vi huỳnh quang. Như vậy, hệ thống chuyển gen ATMT dựa trên cơ chế khuyết dưỡng histidine là công cụ tiềm năng cho biểu hiện gen.

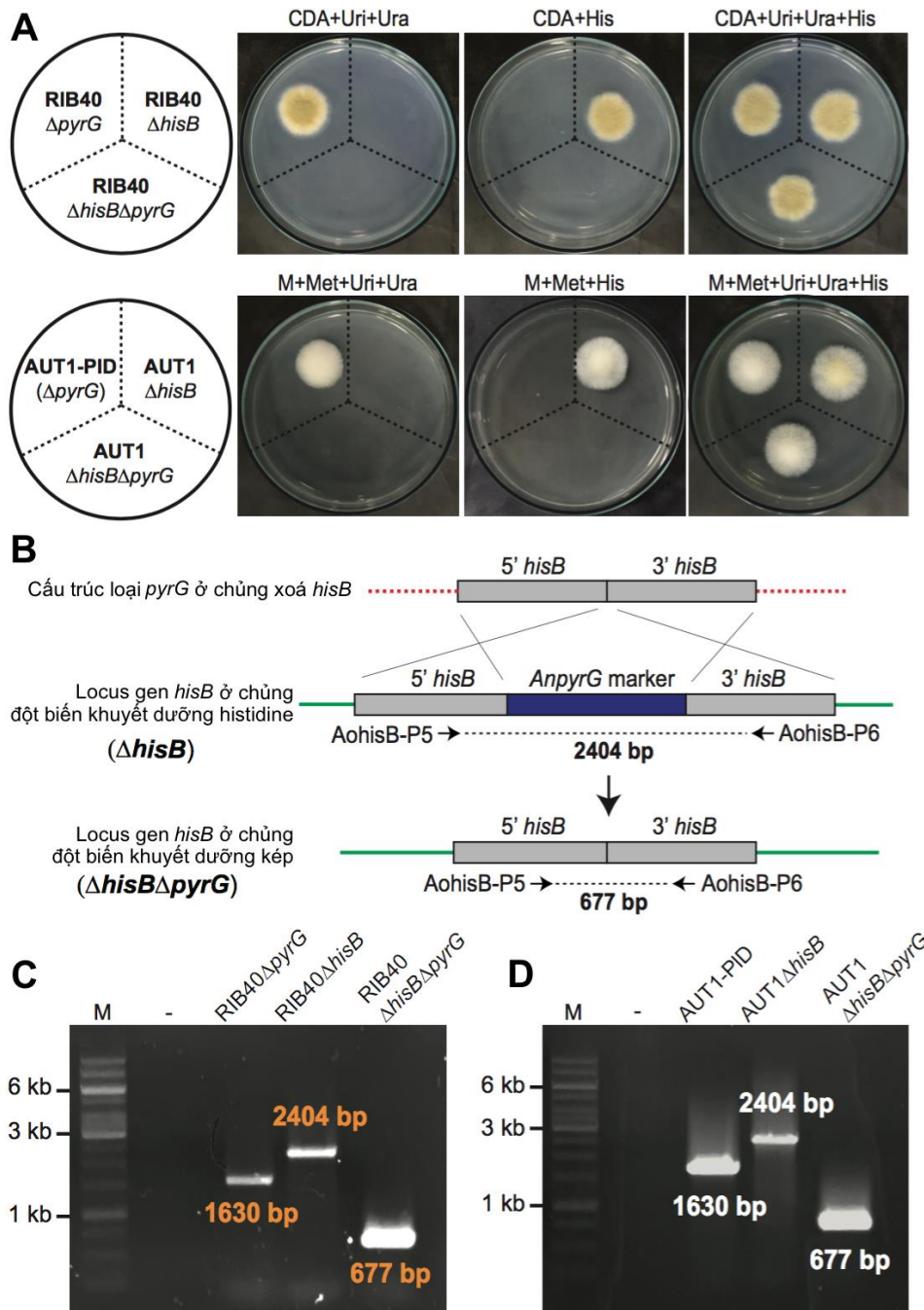


Hình 3.11. Sự tích hợp và biểu hiện huỳnh quang đỏ DsRed ở *A. niger*

(A) Sơ đồ giản lược vector nhị thể mới pEX2E với các vị trí nhận biết của một số enzyme cắt giới hạn. (B) Sự có mặt của gen báo cáo DsRed (678 bp) trong hệ gen của các thể chuyển gen được xác nhận nhờ PCR với cặp mồi đặc hiệu DsRed-cf-F/DsRed-cf-R. M là DNA marker 1 kb (Thermo Fisher Scientific, Mỹ). (C) Các chủng biểu hiện DsRed dưới kính hiển vi huỳnh quang Axioplan với độ phóng đại 400 lần.

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

Vector nhị thể pAoHG (dùng cho *A. oryzae*) và pAnHG (dùng cho *A. niger*) đã được tạo nhằm loại marker *pyrG* khỏi hệ gen của các chủng đột biến khuyết dưỡng histidine. Như vậy, thể chuyển gen thành công sẽ là các chủng đột biến khuyết dưỡng cả 2 gen *hisB* và *pyrG*. Việc loại bỏ marker *pyrG* ở vector pAoH và pAnH đã nối các vùng 5' và 3' *hisB* để tạo ra một đoạn T-DNA mới mà không có khung đọc mở của gen *hisB*. Sau khi chuyển cấu trúc này vào thể đột biến $\Delta hisB$, marker *pyrG* đã được loại bỏ thông qua cơ chế tái tổ hợp tương đồng. Các thể đột biến thu được là đột biến khuyết dưỡng kép *hisB* và *pyrG*, và chỉ có thể sinh trưởng khi được bổ sung đầy đủ histidine, uridine/uracil vào môi trường nuôi cấy. Trong trường hợp này, chúng tôi thu được 1–2 thể biến nạp có kiểu hình kháng 5-FOA đối với 10^5 hoặc 10^6 bào tử từ các chủng nền khuyết dưỡng histidine RIB40 $\Delta hisB$, AUT1 $\Delta hisB$ hay N402 $\Delta hisB$. Các thể chuyển gen sau đó đã được sàng lọc sự khuyết dưỡng uridine/uracil trên các môi trường khác nhau (Hình 3.12A). Khi môi trường không bổ sung thêm uridine/uracil, các thể chuyển gen mới thu nhận không có khả năng sinh trưởng do gen *pyrG* đã bị loại bỏ khỏi hệ gen. Các chủng khuyết dưỡng kép RIB40 $\Delta hisB\Delta pyrG$ và AUT1 $\Delta hisB\Delta pyrG$ chỉ có thể sinh trưởng khi môi trường được bổ sung thêm histidine và uridine/uracil. Đối với *A. oryzae*, xóa gen *pyrG* được xác nhận thêm bằng phân tích PCR sử dụng cặp mồi AohisB-P5/AohisB-P6 (Hình 3.12B, 3.12C). Các chủng đột biến khuyết dưỡng kép có kiểu gen $\Delta hisB\Delta pyrG$ cho 1 băng DNA với kích thước 677 bp do cassette *pyrG* đã bị loại khỏi hệ gen. Ngược lại, kết quả PCR cho thấy đối với các chủng $\Delta pyrG$, khi gen *hisB* vẫn chưa bị can thiệp, cho 1 băng 1,63 kb; trong khi đó băng 2,4 kb xuất hiện trong các chủng khuyết dưỡng $\Delta hisB$ (Hình 3.12B, 3.12C). Xác nhận nhờ PCR với cặp mồi AnpyrG-F/AnpyrG-R đặc hiệu cho gen *A. niger pyrG* cũng chỉ ra rằng marker *pyrG* đã được loại bỏ thành công khỏi hệ gen của các chủng đột biến khuyết dưỡng kép RIB40 $\Delta hisB\Delta pyrG$ và AUT1 $\Delta hisB\Delta pyrG$. Như vậy, tất cả các thể chuyển gen kháng 5-FOA thu được trong nghiên cứu này đều là các chủng *A. oryzae* khuyết dưỡng kép histidine và uridine/uracil.



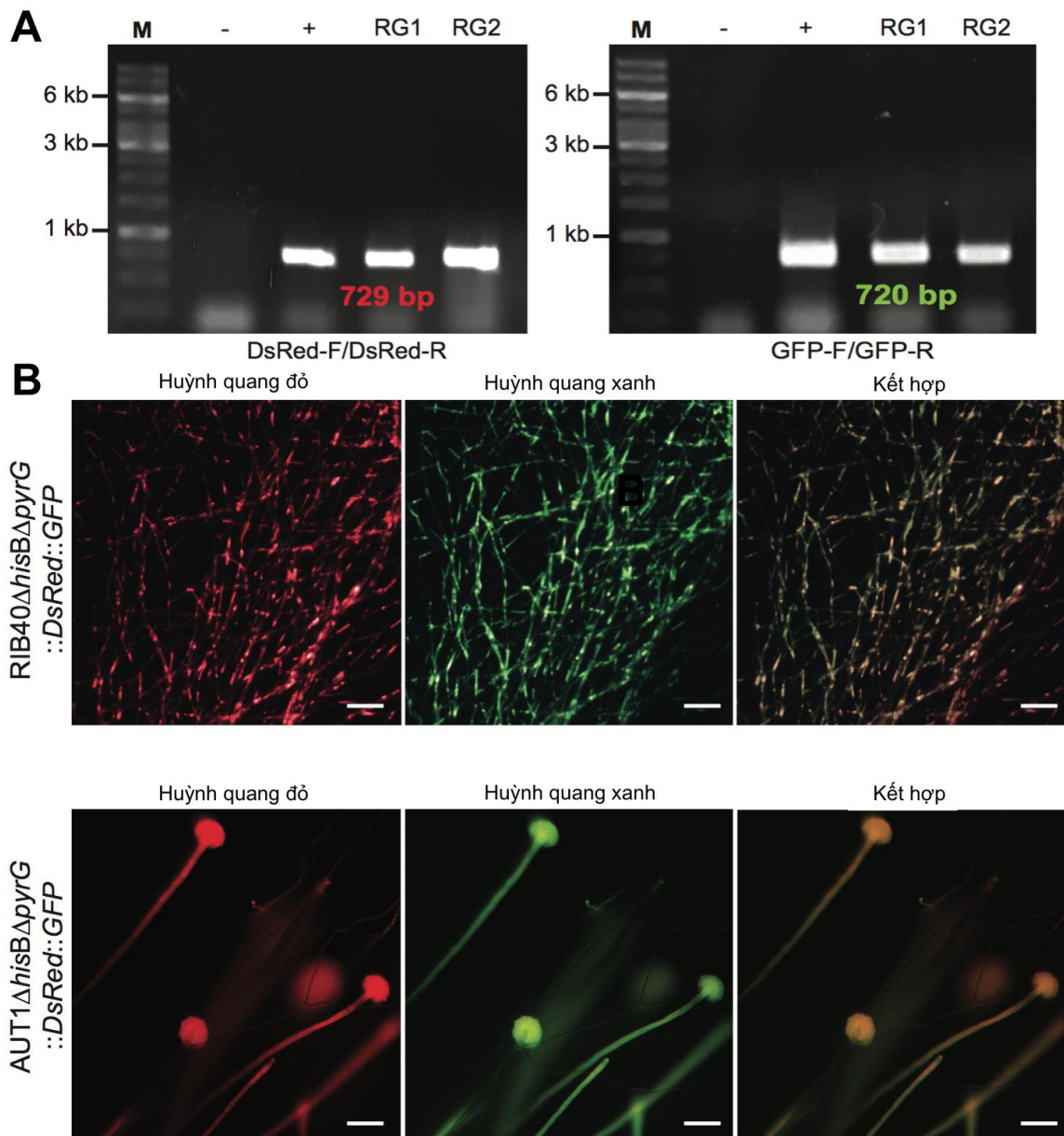
Hình 3.12. Kết quả tạo các chủng khuyết dưỡng kép $\Delta hisB\Delta pyrG$ ở *A. oryzae*

(A) Sự sinh trưởng của các chủng đột biến $\Delta hisB\Delta pyrG$ được kiểm tra trên các môi trường khác nhau so với chủng khuyết dưỡng uridine/uracil $\Delta pyrG$ và chủng khuyết dưỡng histidine $\Delta hisB$. (B) Sơ đồ xác nhận việc loại bỏ marker *pyrG* ở các chủng đột biến nhờ PCR với cặp môi đặc hiệu P5/P6. (C) Kết quả loại bỏ marker *pyrG* ở chủng RIB40 $\Delta hisB$ để tạo ra đột biến RIB40 $\Delta hisB\Delta pyrG$ khuyết dưỡng kép. (D) Kết quả xác nhận xóa marker *pyrG* ở đột biến xóa kép AUT1 $\Delta hisB\Delta pyrG$, (-) 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

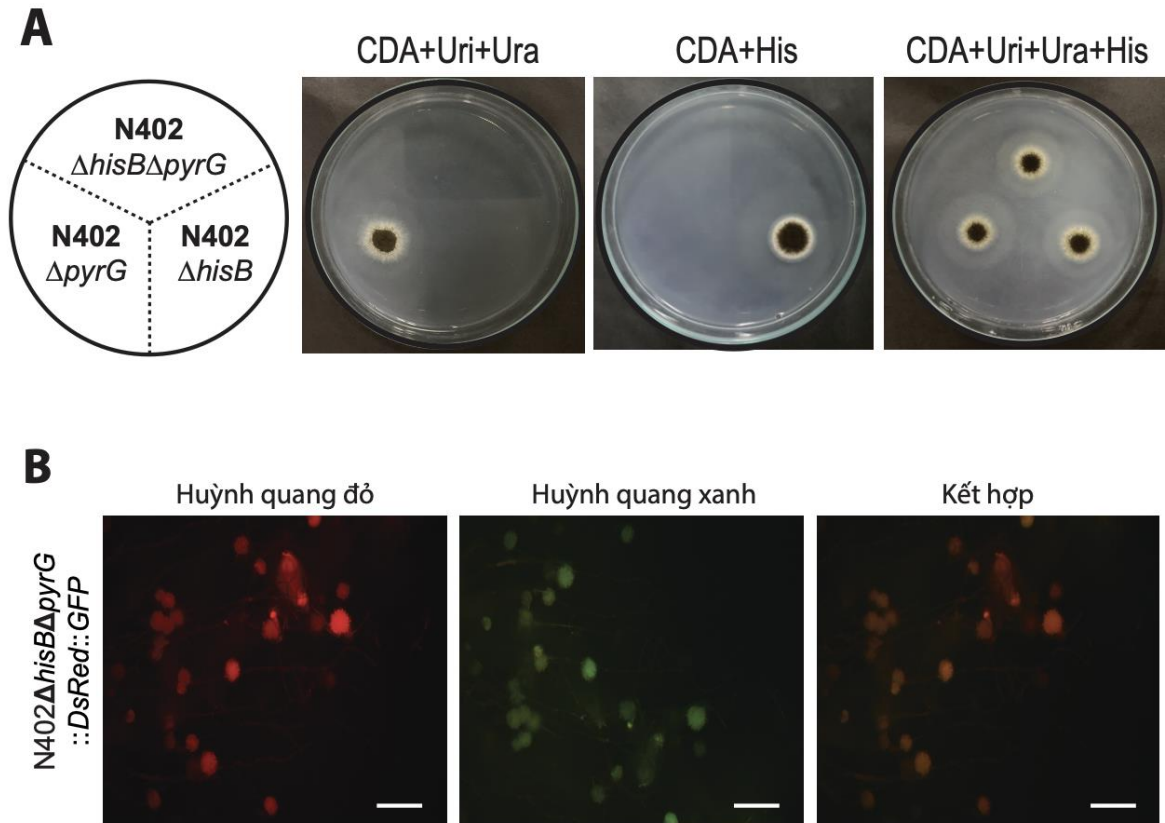
Hai hệ thống ATMT được phát triển gần đây ở *A. oryzae* đã sử dụng một marker chọn lọc duy nhất là *pyrG* [106, 107] hoặc sự kết hợp của *pyrG* và gen kháng pyrithiamine (*ptrA*) [138]. Việc thiết lập các hệ thống ATMT mới và hiệu quả với các marker dinh dưỡng khác nhau là điều cần thiết cho các nghiên cứu kỹ thuật di truyền ở *A. oryzae*. Chúng tôi đã sử dụng các điều kiện ATMT tối ưu ở các chủng khuyết dưỡng đơn để chuyển gen ở các chủng đột biến khuyết dưỡng kép $\Delta hisB\Delta pyrG$. Hai vector nhị thể pEX2D và pEX1 được sử dụng để đánh giá hệ thống ATMT này. Plasmid pEX2D chứa marker *hisB* và đoạn gen *DsRed* được chọn cho vòng đầu tiên của quá trình chuyển gen, trong khi pEX1 với marker *pyrG* và đoạn gen *GFP* được sử dụng cho vòng thứ hai. Kết quả cho thấy hiệu suất chuyển gen của chủng RIB40 $\Delta hisB\Delta pyrG$ trong vòng chuyển gen đầu là 232 ± 86 thể chuyển gen/ 10^6 bào tử. Ở vòng chuyển gen thứ hai, với marker chọn lọc *pyrG*, hiệu suất lên tới 318 ± 98 thể chuyển gen/ 10^6 bào tử. Sự tích hợp thành công của cả 2 gen báo cáo *DsRed* và *GFP* trong hệ gen của nấm đã được xác nhận bằng PCR sử dụng các cặp mồi đặc hiệu và sự biểu hiện cùng lúc của 2 gen này trong sợi nấm được quan sát rõ ràng dưới kính hiển vi huỳnh quang (Hình 3.13). Tuy nhiên, khi marker *pyrG* được sử dụng cho vòng đầu tiên ở các chủng $\Delta hisB\Delta pyrG$, sự biến nạp không hoạt động. Nhược điểm này vẫn sẽ được giải quyết trong tương lai. Các kết quả hiện tại kết hợp với dữ liệu trước đây [106] chứng minh rằng hệ thống ATMT với các marker dinh dưỡng rất hiệu quả.

Hai vector pEX2E và pEX1 tiếp tục được sử dụng để xác nhận cho hệ thống chuyển gen mới thiết lập ở *A. niger*. Đáng chú ý, xu hướng và thứ tự các vòng chuyển gen của *A. niger* cũng giống với *A. oryzae*. Khi sử dụng *hisB* cho vòng chuyển gen đầu tiên, hiệu quả chuyển gen có thể đạt tới hơn 1000 thể chuyển gen/ 10^6 bào tử. Trong khi đó, nếu *pyrG* được sử dụng trước cho chuyển gen, hiệu suất chuyển gen chỉ đạt 10 khuẩn lạc/ 10^6 bào tử. Sự biểu hiện của các thể chuyển gen cũng được kiểm tra bằng PCR với các cặp mồi đặc hiệu cho các gen phát huỳnh quang và đánh giá sự phát quang của hệ sợi nấm dưới kính hiển vi huỳnh quang. Như vậy, hệ thống chúng tôi mới tạo được cũng rất hiệu quả đối với nấm sợi *A. niger* (Hình 3.14).



Hình 3.13. Sự biểu hiện đồng thời 2 gen độc lập ở *A. oryzae* bằng cách sử dụng hệ thống ATMT mới được xây dựng

(A) Sự tích hợp của gen *DsRed* và *GFP* trong ở các thể chuyển gen khác nhau (RG1, RG2) được xác nhận nhờ PCR sử dụng cặp mồi *DsRed-F/DsRed-R* và *GFP-F/GFP-R* tương ứng. M: DNA marker 1 kb (Thermo Fisher Scientific, Mỹ). (B) Thể chuyển gen đại diện biểu hiện cả *DsRed* và *GFP* được nuôi cấy trên CDA (đối với *RIB40ΔhisBΔpyrG::DsRed::GFP*) hoặc *M + Met* (đối với *AUT1ΔhisBΔpyrG::DsRed::GFP*) bằng phương pháp nuôi cấy trên tiêu bản trong 3 ngày ở 30°C. Tiêu bản được sử dụng để quan sát trực tiếp dưới kính hiển vi huỳnh quang Axioplan với độ phóng đại 400 lần.



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 suất của 2 sự kiện biến nạp độc lập trong một chủng nấm thường yêu cầu 2 marker chọn lọc khác nhau. Điều tra chức năng gen là một ví dụ điển hình, trong đó một marker được sử dụng cho xóa gen và marker còn lại dùng để bổ trợ gen. Ở *A. oryzae*, các nghiên cứu như vậy bị hạn chế do thiếu các marker chọn lọc có thể được sử dụng trong cùng một chủng nấm. Gần đây, một hệ thống chuyển gen ATMT kép đã được phát triển ở *A. oryzae* dựa trên sự khuyết dưỡng uridine/uracil và kháng pyrithiamine. Tuy nhiên, việc sử dụng marker chọn lọc là gen *ptrA* mang lại tính kháng pyrithiamine ở *A. oryzae* đòi hỏi phải có sự kiểm soát chặt chẽ để tránh vấn đề

mọc nền do sự phát triển nấm không mong muốn trong quá trình chọn lọc các thể chuyển gen [138]. Trong nghiên cứu này, lần đầu tiên chúng tôi đã thành công trong việc xây dựng các chủng *A. oryzae* khuyết dưỡng kép và thiết lập một hệ thống ATMT mới với marker chọn lọc *pyrG* và *hisB* (Hình 3.13). Hiệu quả biến nạp của hệ thống ATMT này khá tốt, đạt từ 232–318 thể chuyển gen cho 10^6 bào tử tùy thuộc vào marker chọn lọc. Đặc biệt, kết hợp các điều kiện chuyển gen tối ưu từ các chủng đột biến khuyết dưỡng đơn *pyrG* và *hisB*, chúng tôi đề xuất các thông số tối ưu cho chuyển gen ở các chủng đột biến khuyết dưỡng kép sử dụng phương pháp ATMT ở *A. oryzae* và *A. niger*. 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 mới 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* (Hình 3.13, 3.14). Ngoài ra, marker chọn lọc là gen dinh dưỡng từ *A. niger* cũng có thể được sử dụng để chuyển gen và biểu hiện gen ở loài nấm sợi khác như *P. lilacinum* với hiệu quả cao [18].

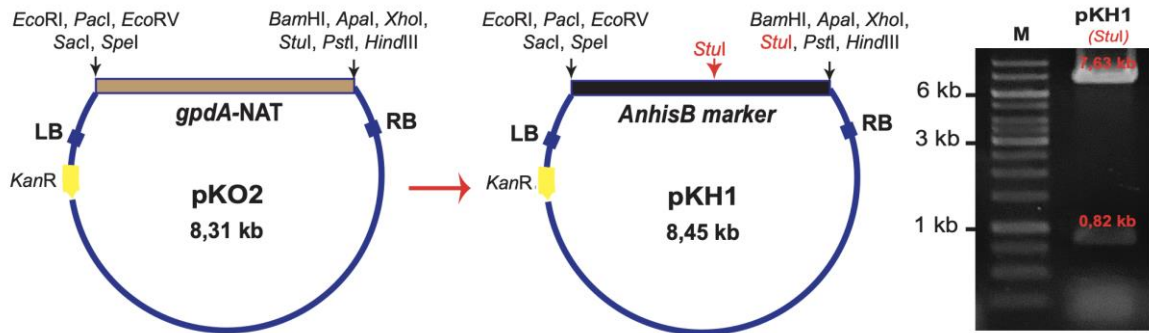
3.2. Hệ thống chuyển gen thông qua vi khuẩn *Ag. tumefaciens* (ATMT) mới phát triển cho phép thực hiện nghiên cứu về chức năng của các gen

3.2.1. Tạo vector nhị thể pKH1 phục vụ xóa gen

Marker *hisB* có nguồn gốc từ *A. niger* được khuếch đại nhờ PCR với cặp mồi AnhisB-F/AnhisB-R với khuôn DNA là N402. Sản phẩm PCR được xử lý với enzyme *SpeI* và *BamHI* và nối nhờ T4 DNA ligase vào vector pKO2 đã được loại bỏ marker là gen kháng kháng sinh nourseothricin (NAT) nhờ các enzyme tương ứng. Vector mới tạo được cắt kiểm tra bằng enzyme *StuI* và được đặt tên là pKH1 (Hình 3.15).

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. Cho đến hiện nay, phương pháp tạo cấu trúc phụ thuộc vào các enzyme cắt giới hạn và ligase vẫn là phương pháp

được sử dụng phổ biến và hiệu quả nhất. Nhiều vector xóa gen đã được tạo và tiến hành xóa thành công trên nhiều loài nấm sợi khác nhau với hiệu suất rất cao [52, 153]. Vector trung gian pKH1 sẽ được khai thác cho các thí nghiệm xóa gen tiếp theo.



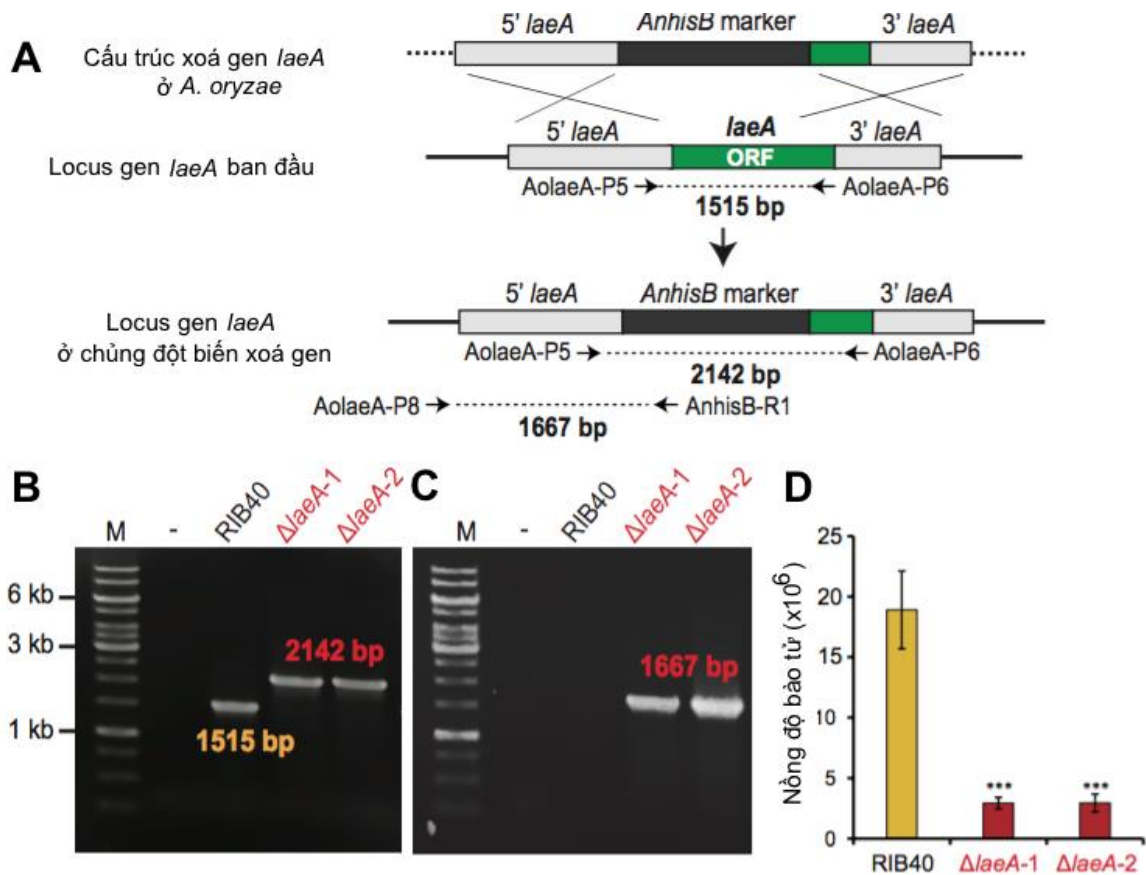
Hình 3.15. Sơ đồ tạo vector pKH1 và các vị trí của enzyme cắt giới hạn phục vụ tạo các cấu trúc xóa gen tiếp theo

Vector pKO2 được sử dụng làm vector khung cho tạo cấu trúc và gen *hisB* từ *A. niger* được lựa chọn làm marker chọn lọc. Kết quả cắt kiểm tra vector pKH1 bằng enzyme giới hạn *StuI*. M là DNA marker 1 kb (Thermo Fisher Scientific, Mỹ).

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 hoà phổ rộng *LaeA* đóng vai trò quan trọng trong quá trình trao đổi chất thứ cấp và phát triển của nhiều loài nấm [15]. Ở *A. oryzae*, yếu tố điều hoà *LaeA* kiểm soát quá trình tạo bào tử và sản xuất axit kojic [73]. Xóa gen *laeA* làm giảm khả năng sinh tổng hợp axit hữu cơ ở *A. niger* [111]. Trong nghiên cứu này, gen *laeA* đã bị xóa ở chủng khuyết dưỡng histidine (RIB40 Δ *hisB*) (Hình 3.16, 3.18). Ngoài ra, chúng tôi đã chứng minh rằng marker *hisB* của *A. niger* có thể được sử dụng để xóa *laeA* ở *A. oryzae*. Sự tái tổ hợp tương đồng dẫn đến sự trao đổi giữa băng xóa *laeA* và các vùng 5' và 3' *laeA* trong hệ gen nấm (Hình 3.16A). Một đoạn lớn (khoảng 900 bp) của gen *laeA* bao gồm trình tự 1 phần mã hoá cho miền methyltransferase đã bị xóa. Sự mất đoạn *laeA* này trong các thể chuyển gen được xác định bằng PCR sử dụng 2 cặp mồi đặc hiệu là AolaeA-P5/AolaeA-P6 và AolaeA-P8/AnhisB-R1 (Hình 3.16, 3.18). Hiệu suất xóa gen *laeA*

đạt $55,2\% \pm 13,54\%$ với chủng nền RIB40 Δ hisB. Chúng tôi đã kiểm tra 2 thể đột biến Δ laeA độc lập về khả năng hình thành bào tử so với chủng RIB40 tự nhiên. Dữ liệu cho thấy rằng việc loại bỏ laeA làm giảm đáng kể sự hình thành bào tử của *A. oryzae* (Hình 3.16D).



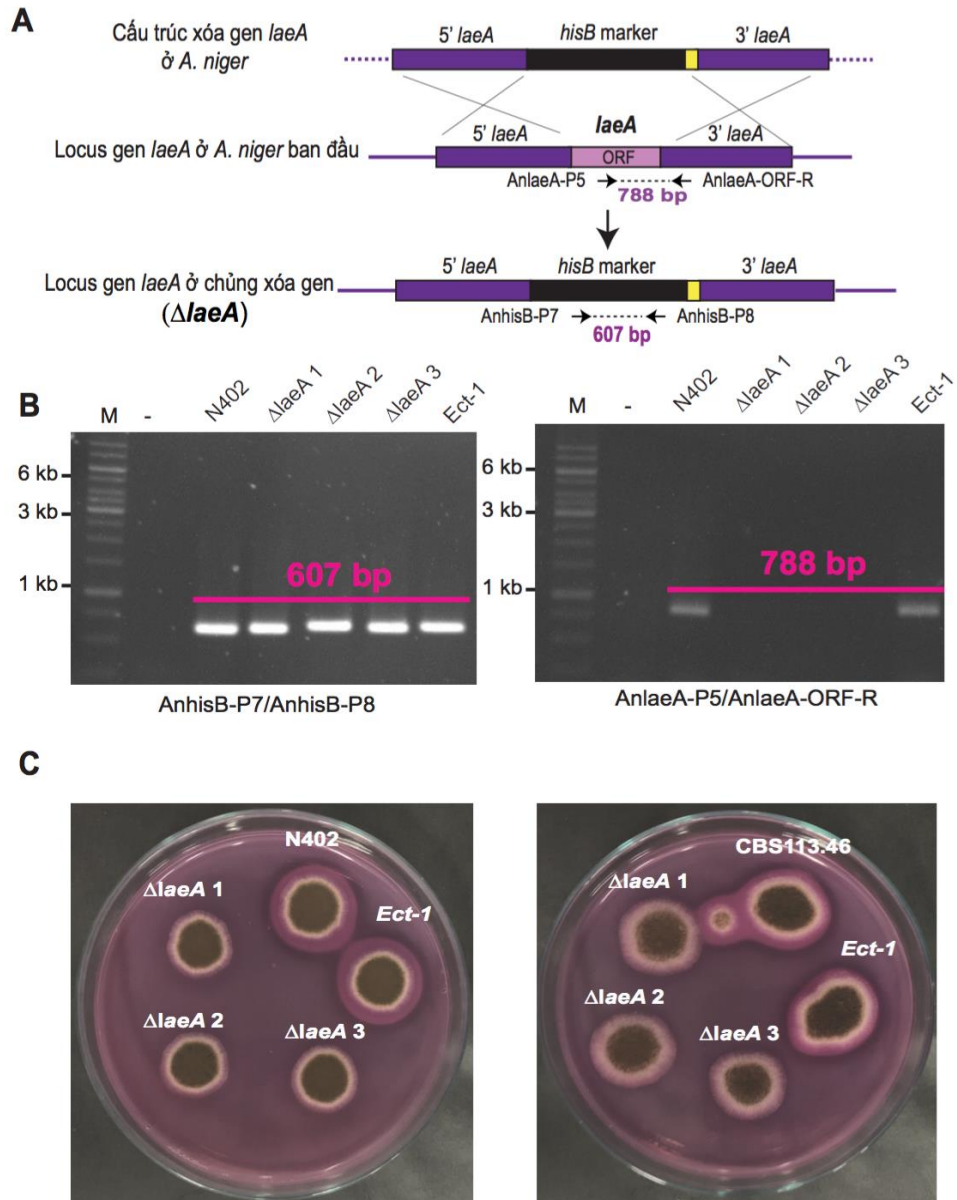
Hình 3.16. Kết quả xoá gen điều hòa *laeA* ở *A. oryzae* áp dụng hệ thống chuyển gen mới xây dựng

(A) Sơ đồ loại bỏ gen *laeA* ở *A. oryzae* khuyết dưỡng histidine bằng cách sử dụng marker chọn lọc *hisB* từ *A. niger* (*AnhisB*) và vị trí bám của các đoạn môi đặc hiệu để xác định các đột biến Δ laeA. Hai thể đột biến Δ laeA khác nhau được xác định bằng PCR sử dụng cặp môi đặc hiệu (B) AolaeA-P5/AolaeA-P6 và (C) AolaeA-P8/*AnhisB*-R1. M là DNA marker 1 kb (Thermo Fisher Scientific, Mỹ). (D) 10 μ l bào tử (10^6 bào tử/ml) của chủng hoang dại RIB40 và các thể đột biến xoá gen *laeA* được cấy trải trên môi trường CDA ở 30°C trong 3 ngày phục vụ thu và định lượng bào tử. Nồng độ bào tử trung bình \pm SD và sự khác biệt có ý nghĩa thống kê được kiểm định Student's *t*-test, *** $p < 0,001$.

Xoá gen *laeA* ở *A. oryzae* đã làm cho khả năng hình thành bào tử ở chủng đột biến bị suy giảm nghiêm trọng. Khuẩn lạc của chủng xoá gen *laeA* có màu nhạt hơn và số chuỗi bào tử dính trên cấu trúc cuống sinh bào tử giảm mạnh (Phụ lục 18, 20). Tương tự với *A. oryzae*, xoá gen *laeA* ở *A. flavus* đã làm khuẩn lạc có màu nhạt. Ngoài ra, cuống sinh bào tử của các chủng đột biến xoá gen này ngắn hơn so với chủng hoang dại [34]. Xoá gen *laeA* ở *A. fumigatus* tuy không làm thay đổi sắc tố bào tử nhưng cũng làm giảm khả năng hình thành bào tử [23].

Vector nhị thể pKH- Δ An*laeA* bao gồm vùng 5' *laeA*, *hisB* từ *A. niger* là marker chọn lọc và vùng 3' *laeA* được sử dụng để xóa *laeA* ở chủng nền N402 Δ *hisB*. Vì đột biến xóa gen *laeA* làm ảnh hưởng đến khả năng sinh axit hữu cơ ở *A. niger*, môi trường MacConkey bổ sung 1% sữa gầy được sử dụng để kiểm tra khả năng axit hóa môi trường của các thể chuyển gen và sàng lọc nhanh các thể đột biến xóa gen *laeA* [111]. Có thể dễ dàng quan sát quá trình axit hóa môi trường của *A. niger* bằng cách sử dụng đĩa sữa thạch MacConkey. Các đĩa này chứa sữa bột hòa tan. pH ban đầu của môi trường trên 5 nên môi trường sẽ trong suốt. Khi pH trong đĩa giảm xuống dưới 4, kết tủa màu trắng sẽ hình thành. Sự phát triển của chủng nấm *A. niger* N402 hoặc CBS 113.46 và sự axit hóa của môi trường làm xuất hiện kết tủa trắng xung quanh khuẩn lạc. Trong khi đó, không có kết tủa nào hình thành ở thể đột biến xóa gen *laeA* (Hình 3.17).

Kết quả cho thấy, $68\% \pm 7\%$ các thể chuyển gen mất khả năng axit hóa môi trường. Các thể chuyển gen này bao gồm cả đột biến xóa gen và đột biến chèn ngẫu nhiên đã được chọn để xác nhận thêm bằng PCR với các cặp mồi AnhisB-P7/AnhisB-P8 và An*laeA*-P5/An*laeA*-orf-R (Hình 3.17). Hiệu quả xóa gen *laeA* với marker *hisB* ở *A. niger* cao hơn 70 lần so với xoá gen sử dụng marker là gen kháng kháng sinh nourseothricin (NAT). Hơn nữa, khi sử dụng các marker chọn lọc là các gen kháng kháng sinh cho chuyển gen ở *A. niger*, hiện tượng dương tính giả xuất hiện khá phổ biến. Trong đó, nhiều khuẩn lạc xuất hiện trên màng chuyển gen nhưng những khuẩn lạc này không kháng với kháng sinh nourseothricin trong những vòng sàng lọc tiếp theo. Vì vậy, sự xuất hiện của các khuẩn lạc dương tính giả này đã làm giảm tỷ lệ xóa gen thành công ở *A. niger*.

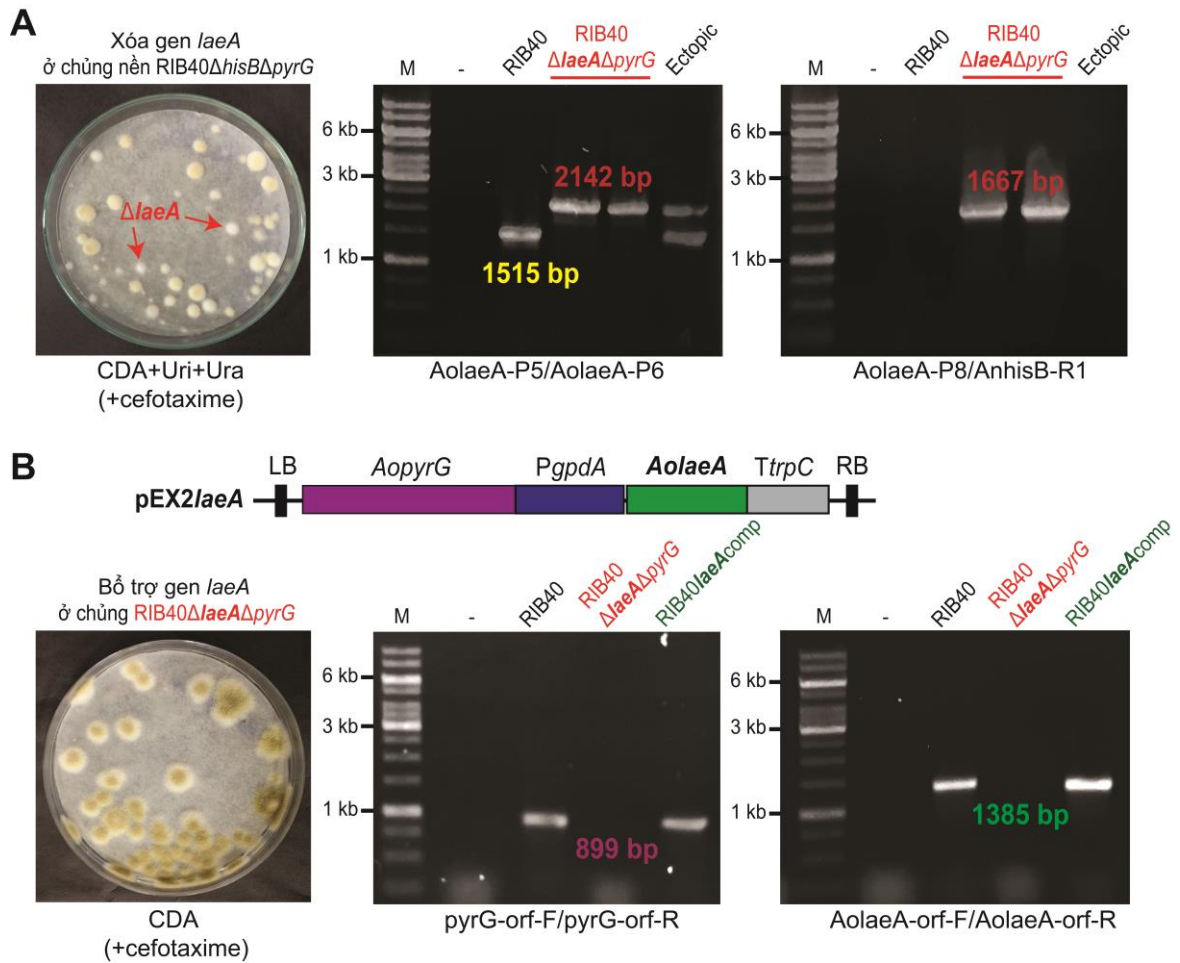


Hình 3.17. Kết quả xóa gen điều hòa *laeA* ở *A. niger* bằng cách sử dụng hệ thống ATMT đã xây dựng

(A) Chiến lược xóa *laeA* ở *A. niger* dựa trên cơ chế tái tổ hợp tương đồng. (B) Kiểm tra sự loại bỏ 1 phần gen *laeA* ở *A. niger* bằng PCR với AnhisB-P7/AnhisB-P8 và AnlaeA-P5/AnlaeA-orf-R, (-) là đối chứng âm, M là DNA marker 1 kb (Thermo Fisher Scientific, Mỹ). (C) Kiểu hình không gây axit hóa môi trường của thể đột biến mất gen *laeA* được quan sát trên môi trường sữa thạch MacConkey. Quá trình axit hóa môi trường làm các vòng tua sữa xuất hiện xung quanh các khuẩn lạc. Các đĩa được ủ ở 30°C trong 2,5 ngày. Các chủng ban đầu (N402, CBS113.46) và thể đột biến chèn ngẫu nhiên (*Ect-1*) được sử dụng làm đối chứng.

Trong nghiên cứu này, gen *laeA* đã bị xóa ở cả chủng khuyết dưỡng histidine (RIB40 Δ *hisB*, N402 Δ *hisB*) và chủng khuyết dưỡng kép histidine-uridine/uracil (RIB40 Δ *hisB* Δ *pyrG*, N402 Δ *hisB* Δ *pyrG*) (Hình 3.16, 3.17, 3.18). Sự tái tổ hợp tương đồng dẫn đến sự trao đổi giữa băng xóa *laeA* và các vùng 5' và 3' *laeA* trong hệ gen nấm (Hình 3.16A, 3.17A). Trình tự 1 phần mã hoá cho miền methyltransferase đã bị loại bỏ ở locus gen *laeA*. Sự mất đoạn *laeA* này trong các thể chuyển gen được xác định bằng PCR sử dụng các cặp mồi đặc hiệu AolaeA-P5/AolaeA-P6 và AolaeA-P8/AnhisB-R1 (với *A. oryzae*) và AnhisB-P7/AnhisB-P8 và AnlaeA-P5/AnlaeA-orf-R (với *A. niger*) (Hình 3.16, 3.17, 3.18). Hiệu suất xóa gen *laeA* đạt 55,2% \pm 13,54% với chủng nền RIB40 Δ *hisB*, 68% \pm 7% ở chủng N402 Δ *hisB*; 38,02 \pm 5,25% ở chủng RIB40 Δ *hisB* Δ *pyrG*, 66,34% \pm 3,84% ở chủng N402 Δ *hisB* Δ *pyrG*. Chúng tôi đã kiểm tra các thể đột biến Δ *laeA* độc lập về khả năng hình thành bào tử so với chủng RIB40 tự nhiên (với *A. oryzae*) và khả năng sinh tổng hợp axit hữu cơ so với chủng N402 ban đầu (với trường hợp *A. niger*). Dữ liệu cho thấy rằng việc loại bỏ *laeA* làm giảm đáng kể sự hình thành bào tử của *A. oryzae* và các thể đột biến xóa gen *laeA* ở *A. niger* giảm mạnh khả năng sinh axit hữu cơ (Hình 3.16, 3.17).

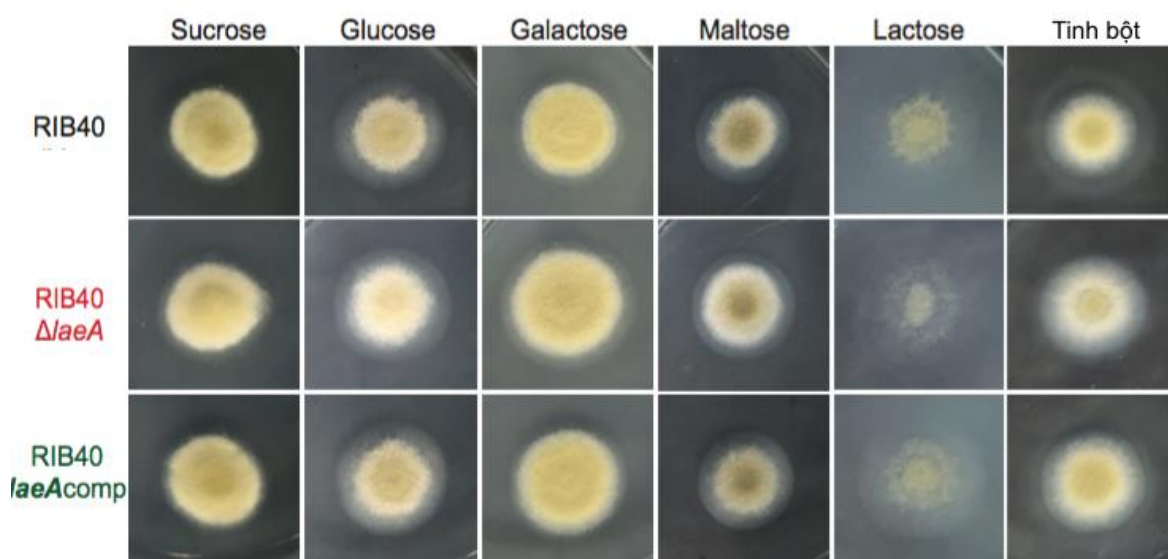
Vai trò của LaeA đã được chứng minh ở nhiều loài nấm sợi thuộc chi *Aspergillus*. Ở *A. oryzae*, loại bỏ gen *laeA* mã hoá cho yếu tố điều hoà LaeA làm mất khả năng sản xuất axit kojic [73]. Biểu hiện của cụm gen có khả năng tham gia vào quá trình sinh tổng hợp axit kojic (AO09113000136 - oxidoreductase phụ thuộc FDA; AO09113000137- yếu tố phiên mã; và AO09113000138- protein vận chuyển) bị giảm mạnh trong thể đột biến Δ *laeA* ở *A. oryzae*. Vai trò của LaeA trong sản xuất axit citric ở *A. niger* ban đầu được chứng minh bằng cách biểu hiện quá mức *laeA* từ *A. nidulans* ở *A. niger*. Hàm lượng axit citric đã tăng 40% ở các chủng biểu hiện quá mức gen *laeA*. Việc tăng sản xuất axit citric khi biểu hiện quá mức gen *laeA* và giảm sản xuất ở chủng xóa gen *laeA* đã chứng minh protein LaeA đóng vai trò điều hoà trực tiếp quá trình sản xuất axit citric ở *A. niger* [111].



Hình 3.18. Kết quả xóa và bổ trợ gen *laeA* ở *A. oryzae*

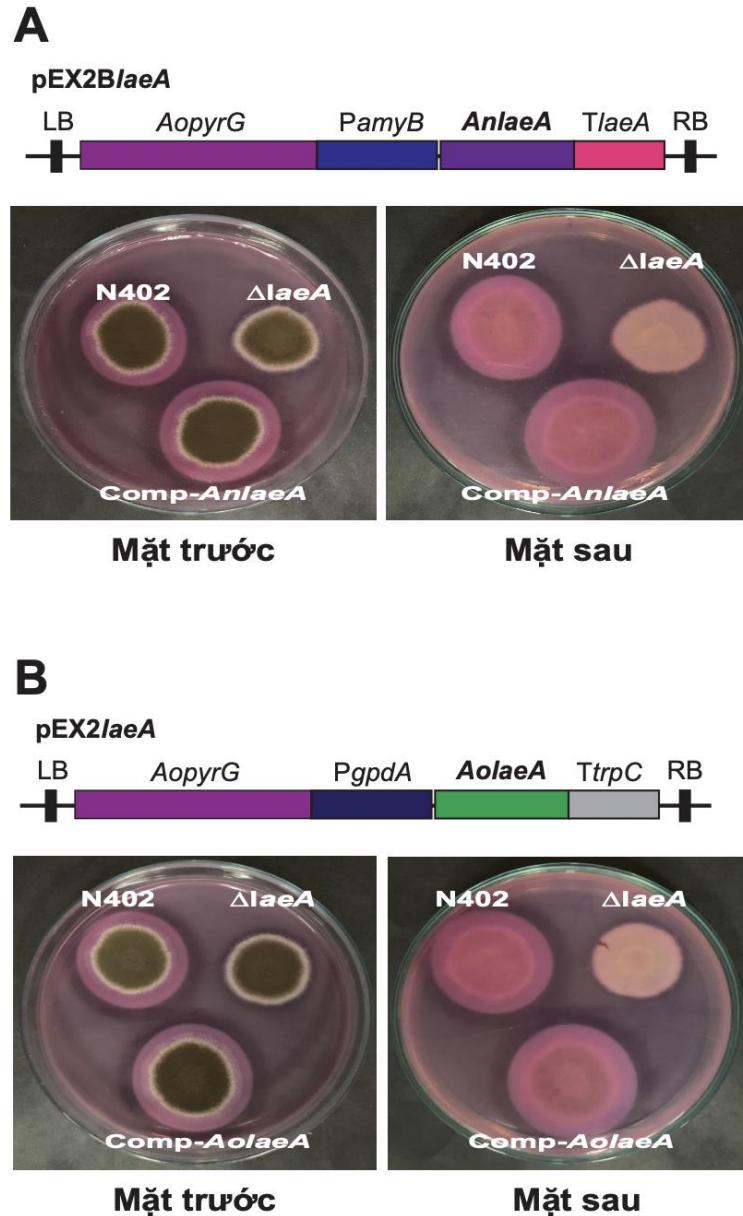
(A) Kết quả xóa gen điều hòa *laeA* ở chủng khuyết dưỡng kép RIB40 Δ hisB Δ pyrG bằng cách tái tổ hợp tương đồng sử dụng marker chọn lọc *hisB*. Các chủng đột biến xóa gen *laeA* (RIB40 Δ laeA Δ pyrG) với sự giảm hình thành bào tử được xác nhận bằng PCR sử dụng 2 cặp mồi đặc hiệu AolaeA-P5/AolaeA-P6 và AolaeA-P8/AnhisB-R1. M: DNA marker 1 kb (Thermo Fisher Scientific, Mỹ). (B) Đoạn gen *laeA* tích hợp trong T-DNA của vector nhị thể pEX2laeA được chuyển vào chủng đột biến Δ laeA (RIB40 Δ laeA Δ pyrG) để phục hồi chức năng của gen *laeA* bằng cách sử dụng marker chọn lọc *pyrG* và phương pháp ATMT. CDA được sử dụng làm môi trường sàng lọc. Chủng bổ trợ *laeA* (RIB40laeAcomp) với sự phục hồi hình thành bào tử được xác nhận bằng PCR với cặp mồi *pyrG-orf-F/pyrG-orf-R* và *AolaeA-orf-F/AolaeA-orf-R*. Chủng hoang dại RIB40 và chủng đột biến loại bỏ gen *laeA* là RIB40 Δ laeA Δ pyrG được chọn làm đối chứng để so sánh.

Để phục hồi khả năng hình thành bào tử của thể đột biến $\Delta laeA$, chúng tôi đã bổ trợ cho thể đột biến này gen *laeA* nguyên vẹn dưới sự điều hoà của promoter *A. nidulans gpdA* (để bổ trợ cho nấm *A. oryzae*) và promoter *A. oryzae amyB* (để bổ trợ cho nấm *A. niger*) và sử dụng marker *pyrG* để chuyển gen. Các kết quả chỉ ra rằng sự hình thành bào tử của chủng bổ trợ *laeA* đã được phục hồi về trạng thái bình thường của kiểu hoang dại ở nấm *A. oryzae* và khả năng sinh axit hữu cơ đã được phục hồi ở *A. niger* bổ trợ *laeA* (Hình 3.19, 3.20A).



Hình 3.19. Kiểu hình của các chủng *A. oryzae* RIB40, RIB40 $\Delta laeA$ và chủng bổ trợ RIB40*laeAcomp* trên CDA có chứa các nguồn cacbon khác nhau
Các đĩa được ủ ở 30°C trong 3 ngày.

Hơn nữa, khi chúng tôi tiến hành bổ trợ chéo, sử dụng cấu trúc chứa gen *laeA* từ *A. oryzae* (pEX2*laeA*) để bổ trợ vào chủng N402 $\Delta laeA\Delta pyrG$, khả năng sinh axit hữu cơ của chủng nấm mới tạo đã được phục hồi (Hình 3.20B). Tương tự, khi cấu trúc chứa gen *laeA* từ *A. niger* (pEX2BAn*laeA*) được sử dụng cho chuyển gen vào chủng nấm RIB40 $\Delta laeA\Delta pyrG$, khả năng hình thành bào tử đã được khôi phục ở các chủng bổ trợ (Phụ lục 7).



Hình 3.20. Kết quả bổ trợ gen điều hoà *laeA* ở *A. niger*

(A) Khả năng sinh axit hữu cơ được phục hồi ở chủng bổ trợ *laeA* khi cấu trúc pEX2B*laeA* được tích hợp vào hệ gen của các chủng N402 Δ *laeA* Δ *pyrG*. (B) Chủng bổ trợ chéo gen *laeA* từ *A. oryzae* có kiểu hình tương tự với chủng N402 ban đầu và có khả năng phục hồi khả năng sinh axit hữu cơ.

Khi phân tích trình tự so sánh, protein *A. oryzae* LaeA có độ tương đồng rất cao với các ortholog *Aspergillus* khác (trên 75%) và độ tương đồng tới 62,16% với protein LaeA của *P. chrysogenum* (Phụ lục 8). Đặc biệt, LaeA từ *A. oryzae* và *A.*

niger có độ tương đồng tới 75,21%. Các kết quả nghiên cứu bổ trợ gen cho thấy sự bảo thủ về chức năng gen *laeA* ở hai loài nấm sợi cùng chi - *A. oryzae* và *A. niger*.

Với những bằng chứng trên, chúng tôi kết luận rằng hệ thống ATMT đã xây dựng có thể được khai thác để điều tra vai trò của các gen ở *A. oryzae* và *A. niger*.

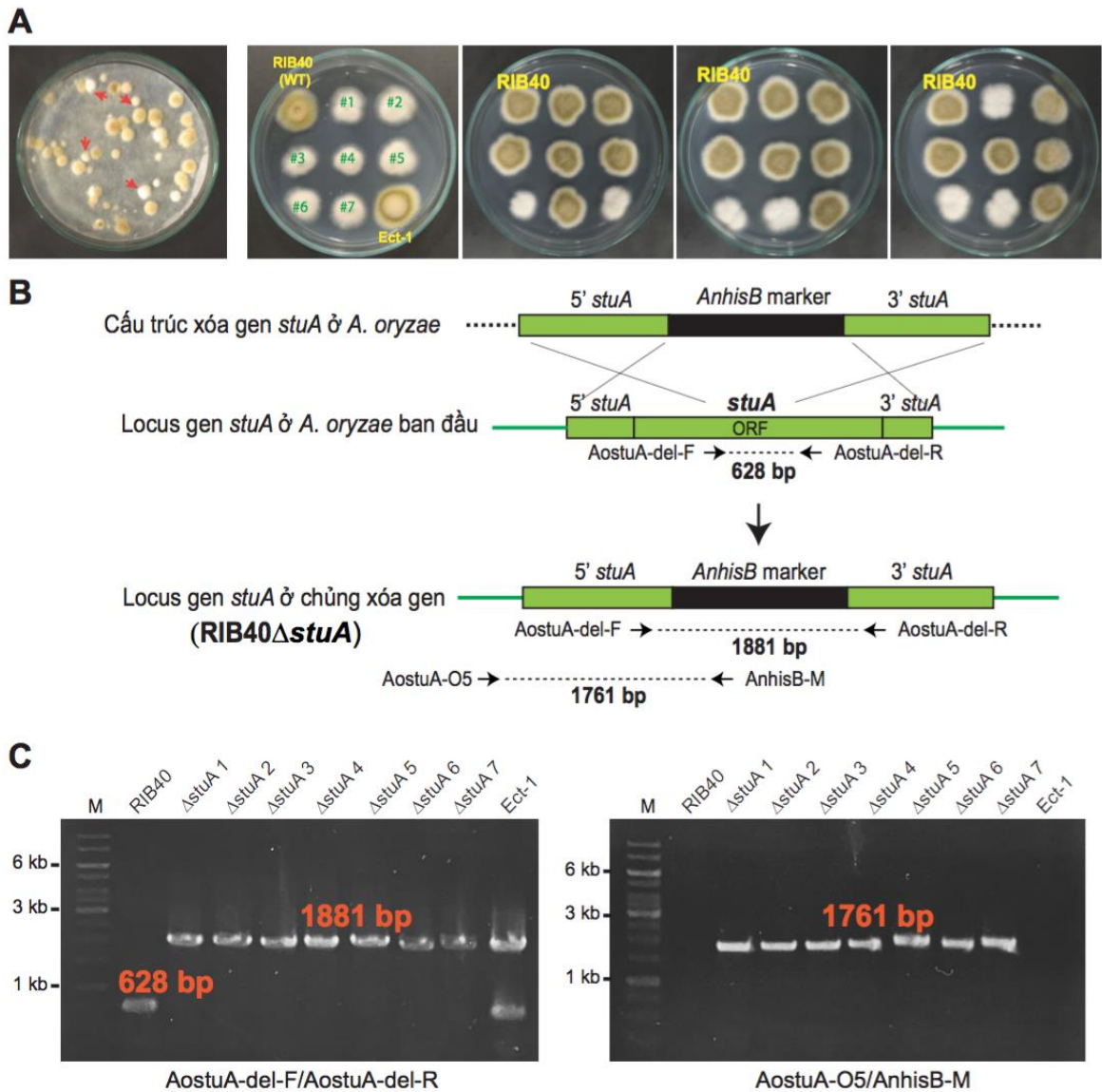
3.3. Đánh giá hiệu quả xoá gen sử dụng hệ thống ATMT mới và xác định vai trò của một số gen cụ thể

3.3.1. Sử dụng marker *hisB* phục vụ xoá gen *stuA* ở *A. oryzae* và *A. niger*

Không giống với vi khuẩn và nấm men, xoá gen là thách thức rất lớn đối với nấm sợi. 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 2 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.

Gen *stuA* mã hóa cho các protein thuộc họ APSES – là các nhân tố phiên mã điều hòa quá trình phát triển đặc trưng của nấm sợi. Chủng đột biến xoá gen *stuA* ở *A. nidulans* khiến cuống sinh bào tử ngừng lại, giảm số bong bào tử và thiếu thể bình, một vài bào tử xuất hiện ngay trên bong bào tử [100, 101]. Tuy nhiên, vai trò, chức năng của gen *stuA* vẫn chưa được nghiên cứu ở *A. oryzae*.

Vector xoá *stuA* ở *A. oryzae* (pKH- Δ *AostuA*) được tạo ra bằng cách thay thế một phần khung đọc mở *stuA* trên vector nhị thể p*AostuA* bằng marker *hisB*. Sử dụng vector này để xoá *stuA* ở RIB40 Δ *hisB* cho 13,41% \pm 4,33% khuẩn lạc có màu trắng. Các thể chuyển gen này sau đó được xác nhận bằng PCR sử dụng cặp mồi *AostuA*-del-F/*AostuA*-del-R và *AostuA*-O5/*AnhisB*-M (Hình 3.21C). Sự thay thế vùng khung đọc mở của gen *stuA* bằng marker *hisB* đã được chứng minh bằng sự hiện diện của băng 1881 bp trong các thể đột biến xoá gen khi xác nhận nhờ PCR với cặp mồi *AostuA*-del-F/*AostuA*-del-R. Với RIB40 và các thể đột biến chèn ngẫu nhiên, băng 628 bp đại diện cho 1 phần của *stuA* ORF. Sự tái tổ hợp tương đồng ở chủng RIB40 Δ *stuA* được thể hiện qua sản phẩm PCR có kích thước 1761 bp khi sử dụng cặp mồi *AostuA*-O5/*AnhisB*-M (Hình 3.21C).



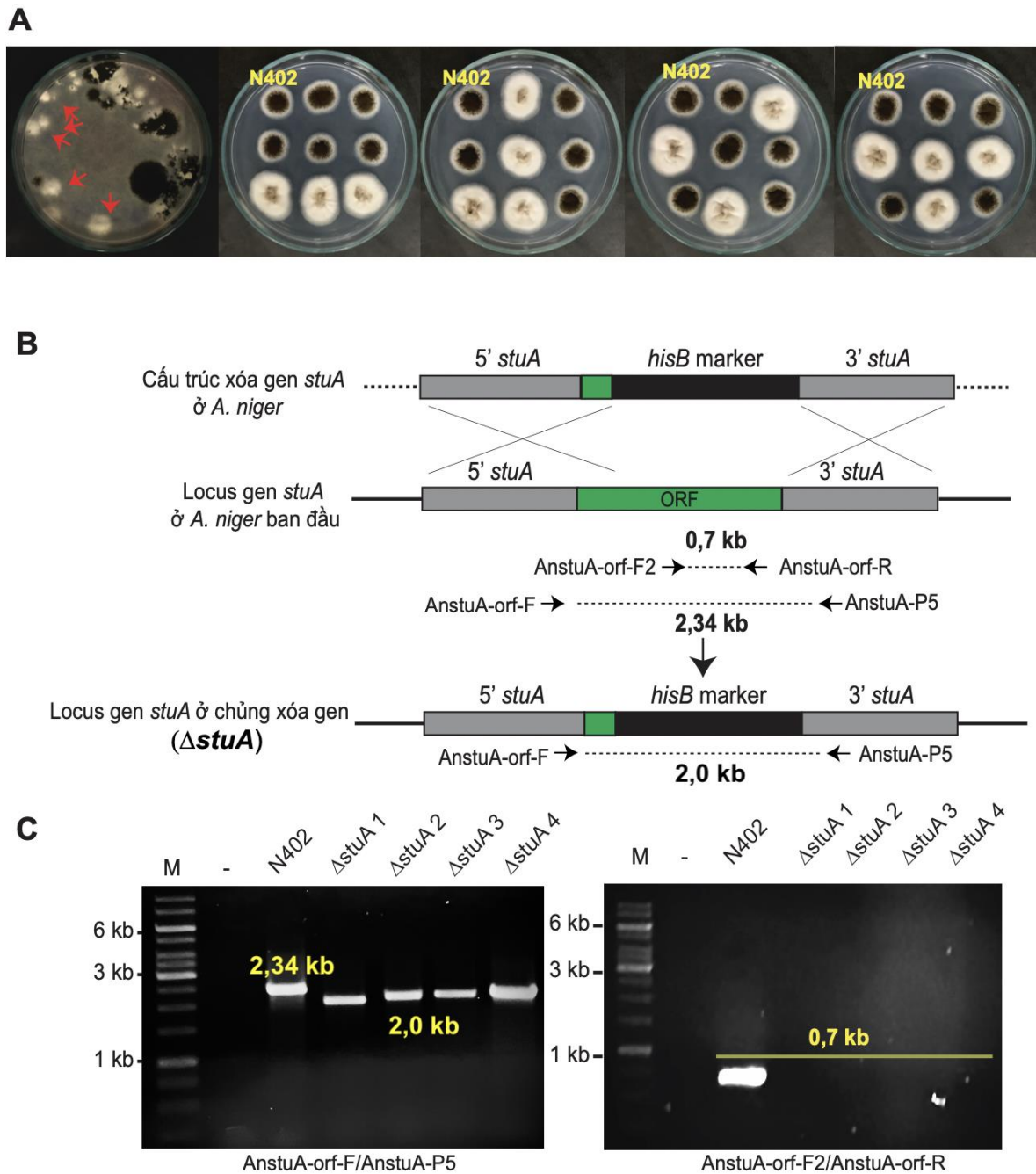
Hình 3.21. Kết quả tạo chủng đột biến xoá gen *stuA* ở *A. oryzae*

(A) Hình đại diện chuyển gen xoá *stuA* ở *RIB40ΔhisB* và sự phát triển của chủng đột biến xoá gen *stuA* (*RIB40ΔstuA*) được kiểm tra trên CDA so với *RIB40* ban đầu và 1 thể đột biến chèn ngẫu nhiên (*Ect-1*). Các đĩa được ủ ở 30°C trong 4 ngày. (B) Sơ đồ xác nhận xoá *stuA* nhờ PCR với các vị trí bám môi đặc hiệu. (C) Kết quả xác nhận xoá gen *stuA* nhờ PCR với các cặp môi đặc hiệu *AostuA-del-F/AostuA-del-R* và *AostuA-O5/AnhisB-M*. (-) là đối chứng âm. M là DNA marker 1 kb (Thermo Fisher Scientific, Mỹ).

Xoá gen *stuA* ở *A. niger* chỉ đạt được 6,52% với marker chọn lọc là gen kháng kháng sinh nourseothricin (NAT) (Phụ lục 11). Vector xoá gen *stuA* ở *A. niger* mới

được thiết kế dựa trên vector pKO2 Δ *AnstuA* bằng cách thay thế marker chọn lọc NAT bằng marker chọn lọc *hisB* (Phụ lục 9). Cấu trúc mới tạo được đặt tên là pKH- Δ *AnstuA*. Cấu trúc này cho phép loại bỏ một phần ORF của gen *stuA* theo cơ chế tái tổ hợp tương đồng (Hình 3.22B). Nếu hiện tượng trao đổi chéo theo cơ chế tái tổ hợp tương đồng không diễn ra, đoạn T-DNA sẽ được tích hợp ngẫu nhiên vào hệ gen nấm. Tương tự với *A. oryzae*, các khuẩn lạc màu trắng xuất hiện trên màng chuyển gen sẽ tiếp tục được sàng lọc và kiểm tra việc xoá gen *stuA* thành công nhờ PCR với 2 cặp mồi đặc hiệu là AnstuA-orf-F/AnstuA-P5 và AnstuA-orf-F/AnstuA-orf-R. Đối với cặp mồi AnstuA-orf-F/AnstuA-P5, các chủng xoá gen *stuA* sẽ cho sản phẩm PCR có kích thước ngắn hơn do một phần của vùng ORF đã bị loại bỏ và thay thế bằng marker *hisB*. Ngoài ra, việc loại bỏ thành công một phần vùng ORF của gen *stuA* cũng được tiếp tục kiểm tra nhờ PCR sử dụng cặp mồi AnstuA-orf-F2/AnstuA-orf-R. Cặp mồi đặc hiệu thứ hai này cho phép khuếch đại một phần ORF của gen *stuA* và cho sản phẩm có kích thước 0,7 kb ở các chủng không bị loại bỏ gen *stuA*. Như vậy, với kết quả sàng lọc và xác nhận bằng PCR với 2 cặp mồi đặc hiệu, có thể khẳng định Δ *stuA1*, Δ *stuA2*, Δ *stuA3* và Δ *stuA4* là 4 chủng đã xoá gen *stuA* thành công.

Chúng tôi tiến hành lặp lại thí nghiệm xoá gen *stuA* bằng phương pháp ATMT dựa trên cơ chế trợ dưỡng histidine để xác định hiệu suất xoá gen cho hệ thống mới thiết lập. Tỷ lệ xoá gen *stuA* thành công ở *A. niger* N402 Δ *hisB* có thể đạt tới 37,60% \pm 9,42%. So với các dữ liệu trước đó được cung cấp bởi phòng Genomic, Phòng Thí nghiệm Trọng điểm Công nghệ Enzym và Protein, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội; hiệu suất xoá gen *stuA* ở *A. niger* nhờ hệ thống mới thiết lập cao gấp 3 lần so với phương pháp ATMT với marker trợ dưỡng *pyrG* (tỷ lệ xoá gen thành công đạt 12,7%) và cao hơn gần 6 lần so với xoá gen sử dụng marker là gen kháng kháng sinh nourseothricin (tỷ lệ xoá gen thành công đạt 6,52%) (Phụ lục 11).



Hình 3.22. Kết quả tạo chủng đột biến xóa gen *stuA* ở *A. niger*

(A) Hình đại diện chuyển gen xóa *stuA* ở *N402ΔhisB* và sự phát triển của thể chuyển gen được kiểm tra trên CDA so với *N402* ban đầu. Các đĩa được ủ ở 30°C trong 4 ngày. (B) Sơ đồ xác nhận xóa *stuA* nhờ PCR với các vị trí bám mỗi đặc hiệu. (C) Kết quả xác nhận xóa gen *stuA* nhờ PCR với các cặp mỗi đặc hiệu *AnstuA-orf-F/AnstuA-P5* và *AnstuA-orf-F2/AnstuA-orf-R*. (-) là đối chứng âm. M là DNA marker 1 kb (Thermo Fisher Scientific, Mỹ).

Sau 4 ngày nuôi cấy ở điều kiện 30°C, kích thước khuẩn lạc của thể đột biến xoá gen *stuA* ở *A. oryzae* nhỏ hơn so và sự chênh lệch rõ ràng nhất được quan sát khi cellulose được lựa chọn là nguồn cacbon duy nhất (Phụ lục 20). Trong khi đó, đường kính khuẩn lạc của chủng N402Δ*stuA* có kích thước lớn hơn đáng kể so với các chủng còn lại. Như vậy, gen *stuA* đóng vai trò quan trọng trong điều hòa quá trình đồng hóa các nguồn cacbon ở nấm sợi *A. oryzae* và *A. niger*.

Để nghiên cứu vai trò của gen *stuA* ở tác nhân gây bệnh đốm nâu trên lúa mì *Stagonospora nodorum*, các chủng đột biến xoá gen cũng được tạo bằng cách tái tổ hợp tương đồng. Chủng đột biến xoá gen *stuA* cũng bị mất khả năng hình thành bào tử. Đồng thời, chủng đột biến xoá gen phát triển chậm hơn khi sử dụng nguồn cacbon là glucose. Khi sử dụng glutamate với vai trò là nguồn cacbon duy nhất thì tốc độ tăng trưởng của thể đột biến xoá gen đã được phục hồi mặc dù quá trình tạo bào tử ở các chủng này vẫn bị suy giảm. Nói chung, gen *stuA* đã được báo cáo là đóng vai trò quan trọng trong đồng hóa các nguồn cacbon. Gen *stuA* đóng vai trò chính trong các quá trình điều hòa chuyển hóa cacbon trung tâm, với quá trình đường phân, chu trình TCA và tổng hợp axit amin ở *S. nodorum*. Ngoài ra, các chủng đột biến xoá gen *stuA* về cơ bản là không gây bệnh. Như vậy, StuA cũng kiểm soát quá trình gây bệnh ở *S. nodorum* [66].

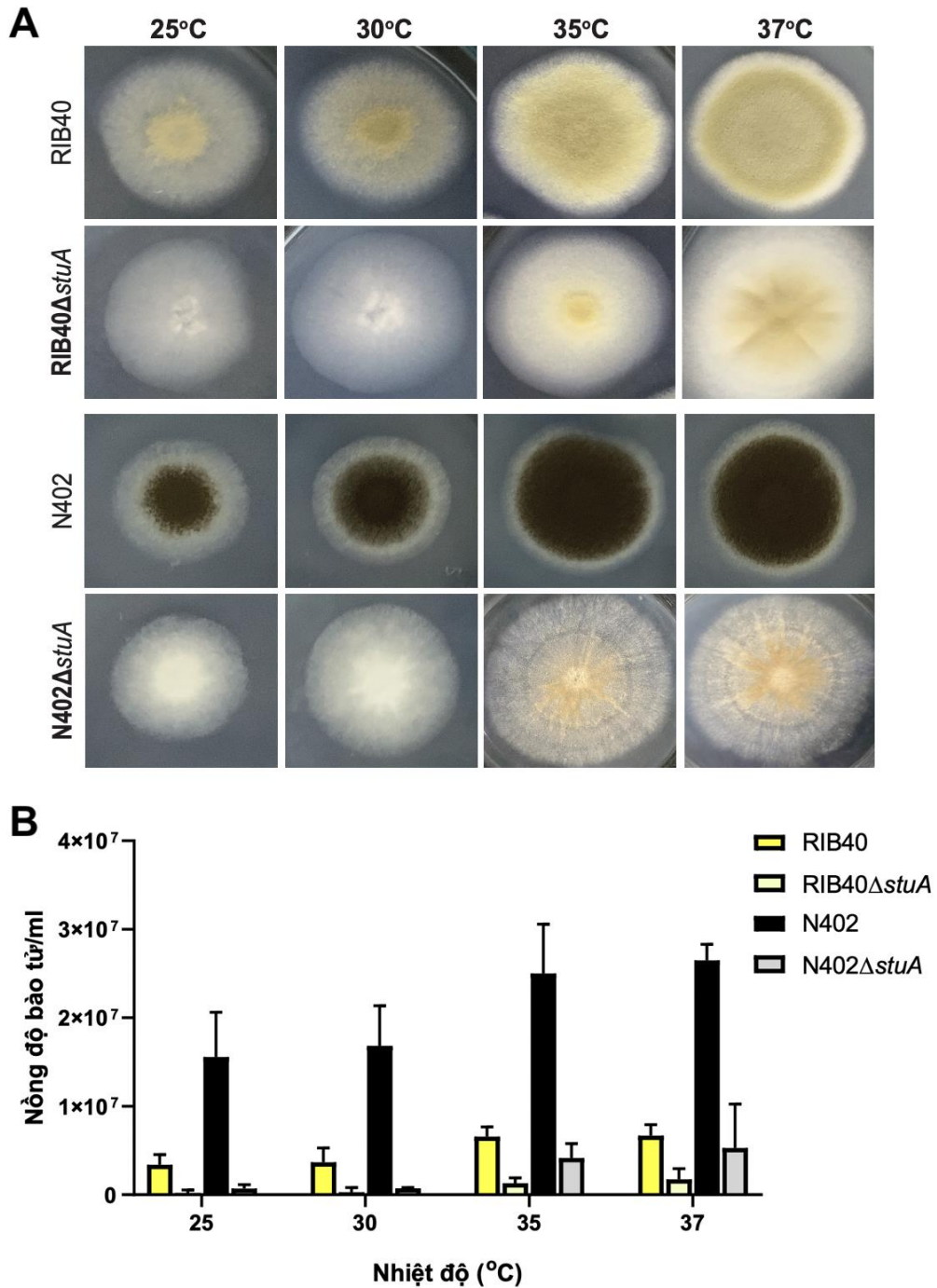
Gen *stuA* đóng vai trò quan trọng trong các quá trình điều hoà kiểm soát sinh trưởng; xoá gen *stuA* giúp cho các chủng đột biến sinh trưởng tốt hơn đối với *A. niger*. Yếu tố điều hoà StuA đóng vai trò quan trọng trong sự phát triển của nấm sợi. StuA tham gia trực tiếp vào quá trình sinh tổng hợp Penicillin V ở *P. chrysogenum*. Đối với *A. chrysogenum*, StuA liên quan tới quá trình hình thành bào tử, sinh tổng hợp cephalosporin, phân mảnh và liên kết thành tế bào. Ở nấm sợi *A. fumigatus*, bào tử các chủng xoá gen *stuA* nảy mầm và phát triển hệ sợi khá sớm trong môi trường lỏng (khoảng 3-4 giờ). Ngoài ra, gen *stuA* cũng đã được chứng minh là đóng vai trò điều hoà dương trong quá trình hình thành bào tử và tham gia vào quá trình sinh tổng hợp trao đổi chất thứ cấp ở nấm sợi *A. fumigatus* [134]. Ở *A. nidulans*, thể đột biến xoá gen *stuA* có cường độ sinh bào tử bị ngăn lại. Không giống như thể đột biến xoá gen *brlA*, thể đột biến xoá gen *stuA* vẫn tạo ra một số lượng nhỏ bào tử, trực tiếp nảy chồi

từ bào tử. Hơn nữa, chỉ hỏng gen *stuA* làm suy giảm quá trình sinh sản hữu tính [95].

Bào tử là nguyên liệu chính được sử dụng trong các nghiên cứu cải biến di truyền sử dụng phương pháp chuyển gen ATMT. Mật độ bào tử thu được thấp sẽ gây khó khăn trong quá trình chuyển gen, lưu trữ và ứng dụng chủng xóa gen trong thực tiễn. Số lượng bào tử của các chủng xóa gen *stuA* thu được khi nuôi cấy ở 25°C trên môi trường PDA rất thấp khi so sánh với các chủng RIB40 và N402 ban đầu. Tuy nhiên, bào tử của chủng xóa gen *stuA* ở cả *A. oryzae* và *A. niger* có thể được tăng cường khi nuôi cấy trên môi trường PDA với điều kiện nhiệt độ 35-37°C trong thời gian 5 ngày (Hình 3.23).

Đặc biệt, khi tăng nhiệt độ lên 35°C hoặc 37°C, màu sắc khuẩn lạc của chủng xóa gen RIB40 Δ *stuA* có sự khác biệt rõ rệt. Ở 25°C và 30°C khuẩn lạc của chủng RIB40 Δ *stuA* có màu trắng. Trong khi đó, khuẩn lạc của chủng xóa gen có màu vàng nhạt ở nhiệt độ 35°C hoặc 37°C. Đồng thời, nồng độ bào tử cũng được gia tăng khi nuôi cấy ở 35°C hoặc 37°C (Hình 3.23).

A. oryzae được sử dụng rộng rãi trong các ứng dụng công nghiệp, vốn luôn gặp phải những thay đổi trong nhiều điều kiện môi trường trong quá trình lên men, chẳng hạn như độ mặn cao, nồng độ ethanol và nhiệt độ thay đổi. Nhiệt độ là yếu tố môi trường quan trọng nhất ảnh hưởng đến sự sinh trưởng và hoạt động của *A. oryzae* và ảnh hưởng trực tiếp đến hoạt động của các enzyme phân giải cơ chất. Thông thường, *A. oryzae* có nhiệt độ tăng trưởng tối ưu là 32°C-36°C ($\pm 1^\circ\text{C}$), nhiệt độ trên hoặc dưới phạm vi này đều ức chế sự phát triển của sợi nấm và sự hình thành bào tử và *A. oryzae* không thể phát triển ở nhiệt độ trên 44°C. Trên môi trường thạch khoai tây dextrose, *A. oryzae* phát triển nhanh với các khuẩn lạc nặng; trên môi trường thạch Czapek-Dox, *A. oryzae* có khuẩn lạc đạt đường kính 7–8 cm sau 7 ngày ở 25°C [39].



Hình 3.23. Khả năng tăng cường hình thành bào tử của các chủng xoá gen *stuA* nhờ nhiệt độ

(A) Các chủng nấm xoá gen *stuA* được nuôi cấy trên môi trường PDA ở 25°C, 30°C, 35°C và 37°C trong 5 ngày. (B) Kết quả định lượng bào tử của các chủng nấm nuôi trên môi trường PDA trong 5 ngày. 10 μ l bào tử (10^6 bào tử/ml) của các chủng nấm được cấy điểm trên môi trường PDA và ủ ở 25°C, 30°C, 35°C và 37°C trong 5 ngày. Các thí nghiệm được lặp lại độc lập 3 lần.

Đối với *A. niger*, xu hướng cũng diễn ra tương tự. Khi tăng nhiệt độ nuôi cấy lên 35°C hoặc 37°C, trên môi trường giàu dinh dưỡng PDA, khuẩn lạc của chủng xoá gen *stuA* có nâu nhạt. Kích thước khuẩn lạc và nồng độ bào tử của chủng xoá gen cũng có sự gia tăng rõ rệt (Hình 3.23). Điều kiện nuôi cấy thông thường đối với nấm sợi thường là từ 3–5 ngày ở $22,5 \pm 2,5^\circ\text{C}$ hoặc 5 ngày ở 25°C. Tuy nhiên, nhiệt độ tăng trưởng tối ưu cho các loài nấm thuộc chi *Aspergillus* thường lớn hơn 30°C. Hơn nữa, nhiệt độ sinh trưởng tối ưu của *A. niger* là 33°C với giới hạn trên là 42°C. Tốc độ tăng trưởng của khuẩn lạc và bào tử *A. niger* tăng lên khi nhiệt độ nuôi cấy đạt tới 30°C, sau đó tốc độ tăng trưởng được duy trì ở 35°C. Ngoài ra, nhiệt độ ảnh hưởng rõ rệt đến sự nảy mầm và chiều dài ống mầm của *A. niger*. Hơn 90% bào tử nảy mầm trong khoảng 30°C–34°C và hình thành chiều dài ống mầm tối đa. Ở nhiệt độ từ 38°C đến 43°C, tỷ lệ bào tử nảy mầm cũng như chiều dài ống mầm đều giảm dần. Tuy nhiên, ở 47°C, sự hình thành ống mầm bị ức chế hoàn toàn trong 15 giờ sau khi cấy [3].

Việc phục hồi kiểu hình tương tự chủng tự nhiên đã được nghiên cứu trên chủng đột biến xoá gen *stuA* ở nấm *A. chrysogenum*. Chủng đột biến xoá gen *stuA* ở nấm này cũng mất khả năng hình thành bào tử, nhưng hình thái hệ sợi và khả năng hình thành bào tử có thể được phục hồi bằng cách thêm NaCl 0,7 M vào môi trường nuôi cấy [60]. Như vậy, nhiệt độ nuôi cấy đóng vai trò quan trọng đối với sự hình thành bào tử ở cả 2 chủng nấm *A. oryzae* và *A. niger* xoá gen *stuA*.

3.3.2. So sánh hiệu quả xoá một số gen điều hòa ở *A. oryzae* và *A. niger*

Xoá gen *amyR* và *priT* đều làm biến đổi kiểu hình của các chủng nấm trên các môi trường đặc hiệu (Phụ lục 12, 13, 17). Cụ thể, do AmyR liên quan mật thiết tới quá trình sinh tổng hợp amylase, các chủng đột biến xoá gen *amyR* đều sinh trưởng rất yếu trên môi trường sử dụng nguồn cacbon duy nhất là tinh bột (Phụ lục 12A). Tỷ lệ các thể chuyển gen có biến đổi kiểu hình trên các môi trường đặc hiệu rất cao, đạt tới $89,72\% \pm 1,48\%$ đối với xoá *amyR* ở RIB40 Δ *hisB* và $83,75\% \pm 6,38\%$ đối với xoá *amyR* ở N402 Δ *hisB*. Việc xác nhận xoá thành công gen *amyR* ở *A. oryzae* và *A. niger* được kiểm tra bằng PCR với các cặp mồi đặc hiệu. Vị trí bám của các mồi này được thể hiện trong Phụ lục 12B. Kết quả PCR cho thấy, một phần của vùng ORF đã

được loại bỏ hoàn toàn khỏi hệ gen của các thể chuyển gen có biến đổi kiểu hình trên môi trường chứa nguồn cacbon là tinh bột ở cả *A. oryzae* và *A. niger* (Phụ lục 12C).

Tương tự với *A. fumigatus*, các chủng đột biến xóa gen *priT* ở *A. niger* cũng bị giảm khả năng hình thành bào tử khi BSA được sử dụng là nguồn nitơ duy nhất (Phụ lục 13). Sự phân giải tinh bột không bị ảnh hưởng ở các thể đột biến hỏng gen *priT*, cho thấy rằng chủng xóa *priT* không bị suy giảm chức năng tiết chung của các protein như amylase [133]. Thể đột biến hỏng gen *priT* đồng hóa kém trên các đĩa thạch môi trường tối thiểu với albumin (BSA) là nguồn nitơ hoặc nitơ/cacbon duy nhất hoặc với collagen là nguồn nitơ duy nhất, cho thấy rằng trong các điều kiện hạn chế, việc không có khả năng phân hủy protein ảnh hưởng đến sự phát triển của thể đột biến [133].

Tỷ lệ xóa gen *priT* ở *A. niger* thấp hơn so với xóa *amyR*, đạt $45,1\% \pm 1,77\%$ khi *hisB* được sử dụng là marker chọn lọc. Đối với nấm *A. niger*, chủng N402 và các thể đột biến xóa gen *laeA*, *amyR*, *priT* đã hình thành nhiều bào tử chứa sắc tố melanin màu đen đặc trưng. Khi quan sát dưới kính hiển vi, các chủng N402 và $N402\Delta laeA$, $N402\Delta amyR$, $N402\Delta priT$ đều hình thành cuống sinh bào tử với thể bình chứa nhiều bào tử đính (Phụ lục 19).

Hiệu quả của hiện tượng tái tổ hợp tương đồng còn phụ thuộc vào locus. Ở *A. oryzae*, hiệu suất loại bỏ *hisB* (dưới 1%). Trong khi đó, hiệu suất loại bỏ của một số gen tương đối cao như *amyR*, *laeA* (tỷ lệ xóa gen lớn hơn 55% với marker *hisB* ở cả 2 loài nấm sợi *A. oryzae* và *A. niger*). Dữ liệu hiện tại của chúng tôi cho thấy rằng hiệu quả xóa gen thông qua hệ thống ATMT ở cả *A. oryzae* và *A. niger* dường như phụ thuộc vào từng gen trong hệ gen của nấm.

Gen *veA*, mã hóa cho protein VeA (velvet A) thuộc phức hệ protein velvet, cho tỷ lệ xóa gen tương đối thấp. Ở *A. niger*, chủng xóa gen *veA* có cấu trúc cuống sinh bào tử rất giống với loài *A. sydowii* hoang dại [155]. Xóa gen *veA* ở *A. niger* đã ức chế hình thành bào tử vô tính [155, 163]. Khả năng hình thành bào tử vô tính giảm ở các chủng bị hỏng gen *veA* ở nhiều loài nấm, chẳng hạn như *A. carbonarius*, *A. flavus*, *A. parasiticus*, *F. fujikuroi*, *F. oxysporum* và *P. chrysogenum*. Đối với *A. nidulans*, đột biến hỏng gen *veA* làm suy yếu hoàn toàn sự hình thành quả thể hữu

tính và thúc đẩy hình thành bào tử vô tính [75]. Các kết quả tương tự cũng được báo cáo ở *N. crassa*, *C. heterostrophus*, *F. graminearum*, *F. verticillioides*, *A. alternata*, và *B. cinerea* [46]. Các thể đột biến xóa gen *veA* ở *A. niger* có kích thước khuẩn lạc nhỏ, lượng bào tử hình thành bị suy giảm từ 8 đến 17 lần [155]. Khi sử dụng marker chọn lọc là gen kháng kháng sinh nourseothricin (NAT) và áp dụng phương pháp chuyển gen ATMT, tỷ lệ xóa gen ở *A. niger* chỉ đạt 9,09%. Trong nghiên cứu này, cấu trúc xóa gen *veA* (pKO2 Δ AnveA) được xử lý để thay thế marker chọn lọc NAT bằng marker *hisB* từ *A. niger*. Cấu trúc mới tạo được đặt tên là pKH- Δ AnveA được sử dụng để kiểm tra khả năng xóa gen *veA* ở N402 Δ *hisB*. Tỷ lệ xóa gen *veA* thành công với marker chọn lọc mới không có sự khác biệt đáng kể với marker chọn lọc là gen kháng kháng sinh nourseothricin (NAT), số lượng khuẩn lạc xóa gen *veA* thu được rất ít, đạt $7,32\% \pm 2,66\%$ (Hình 3.31). Điều này cũng đã xuất hiện khi xóa gen *olvA* ở *A. niger* với phương pháp chuyển gen thông qua tế bào trần [49]. Phân tích kiểu hình của các thể chuyển gen cho thấy, khi sử dụng *hisB* làm marker chọn lọc, hiệu quả xóa gen *olvA* đạt tới 91,2%. Hiệu quả xóa gen đạt $89\% \pm 1,9\%$ với *pyrG* là marker chọn lọc [49].

Tỷ lệ xóa gen chi tiết ở nấm sợi *A. oryzae* và *A. niger* được thể hiện trong Bảng 3.1 và Bảng 3.2. Một số đặc điểm hình thái và khả năng sinh trưởng, đáp ứng stress của các chủng đột biến xóa gen được mô tả trong Phụ lục 17-23.

Bảng 3.1. Tỷ lệ xóa một số gen điều hoà ở nấm sợi *A. oryzae* với marker *hisB*

Tên gen	Tỷ lệ xóa
<i>laeA</i>	$55,20\% \pm 13,54\%$
<i>stuA</i>	$13,41\% \pm 4,33\%$
<i>amyR</i>	$89,72\% \pm 1,48\%$

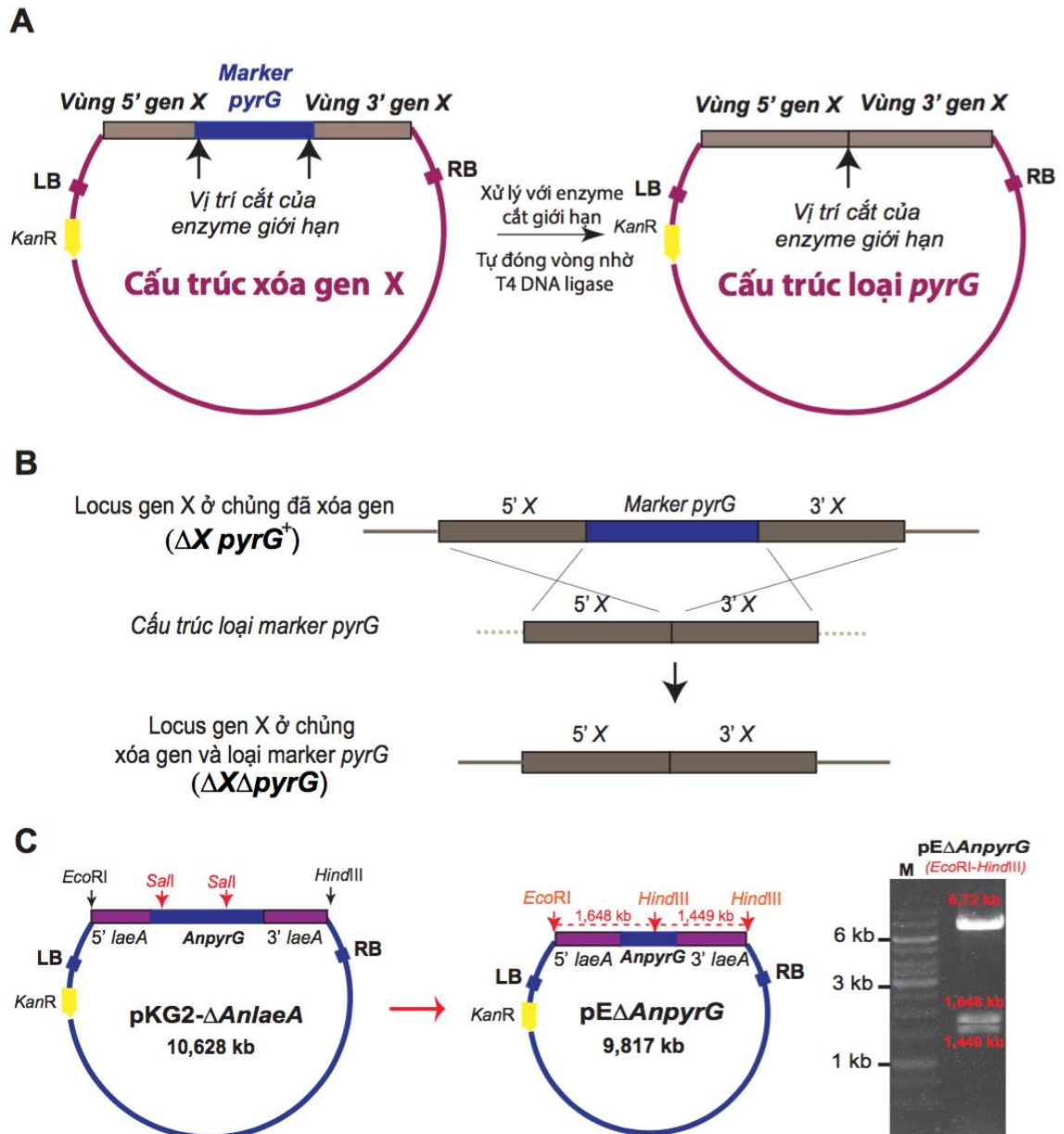
Bảng 3.2. Tỷ lệ xoá một số gen điều hoà ở nấm sợi *A. niger* với marker *hisB*

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%

3.3.3. Hệ thống chuyển gen 2 marker *hisB* và *pyrG* mới cho phép dễ dàng tạo chủng đột biến xoá kép

Trước đó, chúng tôi đã phát triển hệ thống xoá nhiều gen chỉ sử dụng 1 marker chọn lọc duy nhất – *pyrG* (tạo các chủng đột biến xoá kép $\Delta hisB\Delta pyrG$). Hệ thống này cho phép xoá nhiều gen trên cùng một chủng nấm sợi dựa trên đặc tính marker chọn lọc 2 chiều của *pyrG*. Việc xác định sự có mặt hay đã mất của gen *pyrG* dựa trên môi trường đặc hiệu có bổ sung 5'fluoroorotic acid (FOA) [11]. Nói chung, các đột biến mất gen *pyrG* ngăn cản sự biến đổi 5-FOA thành chất độc đối với nấm và làm cho các thể đột biến chỉ có thể mọc được khi môi trường có bổ sung uridine/uracil. Điều này đã giúp cho *pyrG* trở thành công cụ tiềm năng nhất trong chuyển gen khi marker *pyrG* có thể được tái sử dụng nhiều lần bằng phương pháp chọn lọc ngược với 5-FOA.

Cấu trúc loại gen *pyrG* ở các chủng *A. niger* đã xoá gen *laeA* nhờ marker trợ dưỡng *pyrG* được thiết kế dựa trên khung vector pKG2- $\Delta AnlaeA$. Hầu hết vùng trình tự *pyrG* ở vector pKG2- $\Delta AnlaeA$ đã bị loại bỏ thông qua 2 vị trí cắt của enzyme giới hạn *Sall*. Vector sau khi đã đóng vòng được xác nhận bằng enzyme *EcoRI* và *HindIII*. Kết quả thu được trên bản điện di là 3 băng: 1,449 kb; 1,648 kb và 6,72 kb đúng như tính toán lý thuyết (Hình 3.24). Vector mới tạo được đặt tên là pE $\Delta AnpyrG$.



Hình 3.24. Chiến lược tạo các cấu trúc xóa gen *pyrG* phục vụ xóa đa gen ở nấm sợi chỉ sử dụng duy nhất 1 marker chọn lọc *pyrG*

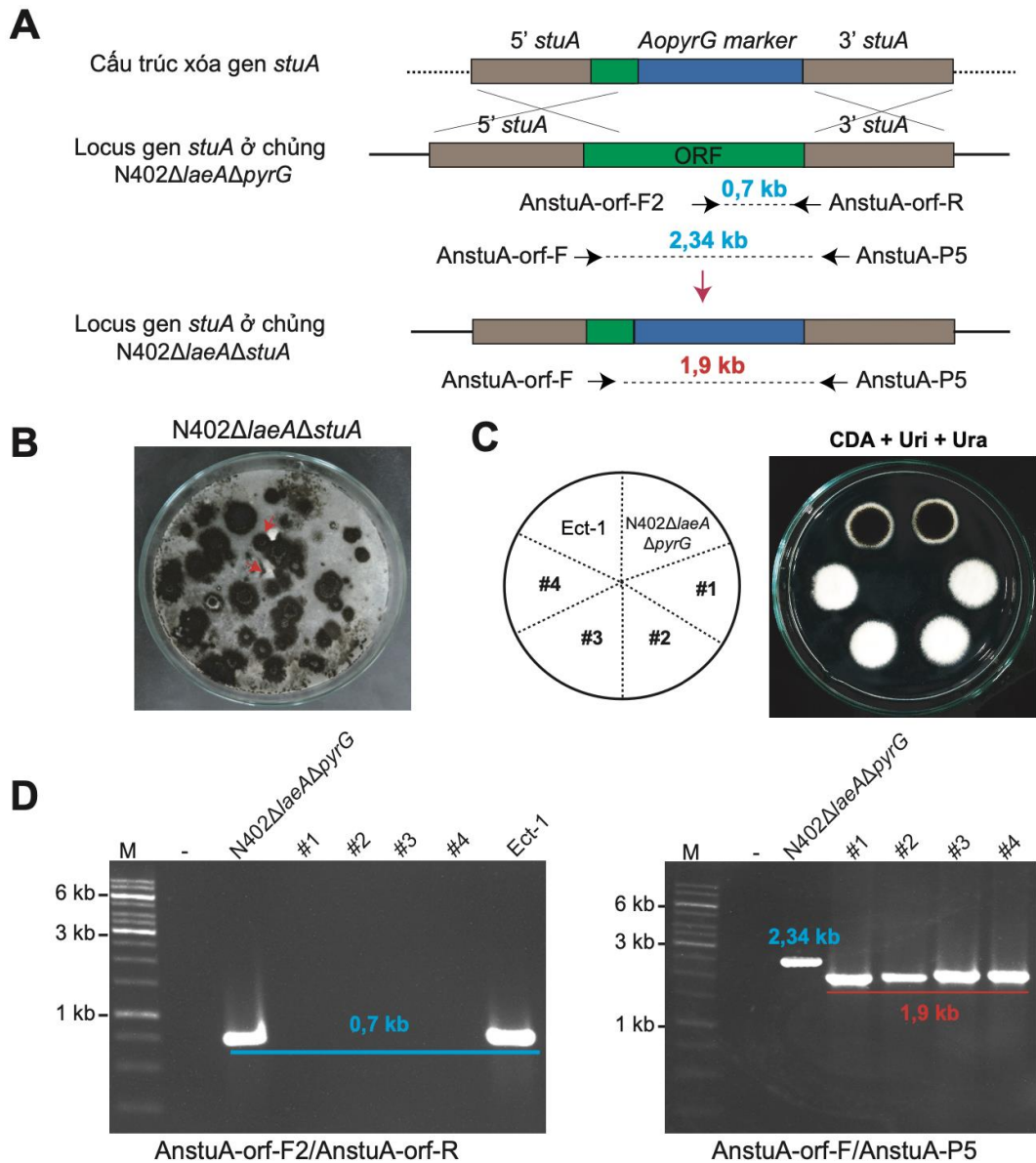
(A) Cách thức tạo vector nhị thể phục vụ loại bỏ gen *pyrG* ở chủng nấm đã xóa gen.
 (B) Cơ chế trao đổi chéo tương đồng để tạo ra chủng xóa một gen chức năng và khuyết dưỡng *pyrG*. (C) Cấu trúc xóa gen *pyrG* cho chủng nấm *A. niger* đã xóa gen *laeA* và kết quả xác nhận cấu trúc xóa bằng cắt kiểm tra với enzyme giới hạn *EcoRI* và *HindIII*. M là DNA marker 1 kb (Thermo Fisher Scientific, Mỹ).

Tuy nhiên, việc sử dụng duy nhất 1 marker là *pyrG* đã kéo dài thời gian tạo cấu trúc và cần nhiều vòng chuyển gen. Đặc biệt, với mỗi một gen, cần thiết kế một

vector trung gian để loại bỏ marker *pyrG* và yêu cầu 1 lần chuyển gen và xác nhận tiếp theo để tạo chủng đột biến xóa gen chức năng và khuyết dưỡng uridine/uracil. Hệ thống chuyển gen 2 marker chúng tôi mới phát triển cho phép xóa trực tiếp 2 gen chức năng mà không cần các vòng chuyển gen trung gian. Sơ đồ tạo chủng xóa kép N402 Δ *laeA* Δ *stuA* vừa giảm khả năng sinh axit hữu cơ, vừa giảm khả năng hình thành bào tử sẽ làm rõ tính ưu việt của hệ thống chuyển gen 2 marker mới (Phụ lục 24).

Với cách sử dụng hệ thống chuyển gen 1 marker *pyrG*, cần xóa *pyrG* ở các chủng N402 Δ *laeA*. Các chủng nấm khuyết dưỡng kháng 5-FOA được thuần khiết và xác nhận nhờ PCR với các cặp mồi đặc hiệu để tiến hành các bước chuyển gen tiếp theo. Trong khi đó, với cách sử dụng hệ thống chuyển gen 2 marker, chủng đột biến N402 Δ *laeA* Δ *pyrG* có thể được tạo ngay với một lần chuyển gen bằng cách sử dụng cấu trúc pKH- Δ *AnlaeA* hoặc pKHG- Δ *AnlaeA* để loại bỏ gen *laeA* ở N402 Δ *hisB* Δ *pyrG* (Phụ lục 24).

Vector pKG1- Δ *AnstuA* mang marker chọn lọc *pyrG* do phòng Genomic cung cấp (Phụ lục 10) được lựa chọn nhằm xóa gen *stuA* ở *A. niger* N402 Δ *laeA* Δ *pyrG*. Một số khuẩn lạc có kiểu hình màu trắng xuất hiện trên màng chuyển gen sẽ được lựa chọn để sàng lọc và xác nhận sự loại bỏ thành công của gen *stuA* (Hình 3.25B). Khi nuôi cấy một số thể chuyển gen trên môi trường tối thiểu CDA, các thể chuyển gen này vẫn có khả năng sinh trưởng bình thường. Việc xác nhận xóa gen *stuA* sẽ được tiến hành nhờ PCR sử dụng 2 cặp mồi đặc hiệu là AnstuA-orf-F2/AnstuA-orf-R và AnstuA-orf-F/AnstuA-P5. Cặp mồi AnstuA-orf-F2/AnstuA-orf-R có vị trí bám mồi nằm trong vùng ORF của gen *stuA*. Như vậy, chủng *A. niger* N402 Δ *laeA* Δ *pyrG* và thể đột biến chèn ngẫu nhiên Ect-1 cho sản phẩm PCR với kích thước 0,7 kb là do phân khung đọc mở (ORF) của chủng N402 Δ *laeA* Δ *pyrG* và thể đột biến chèn ngẫu nhiên không bị loại bỏ. Trong khi đó, một phần của vùng ORF đã bị loại bỏ ở 4 chủng có kiểu hình màu trắng nên không quan sát thấy băng DNA trên bản điện di (Hình 3.25D).

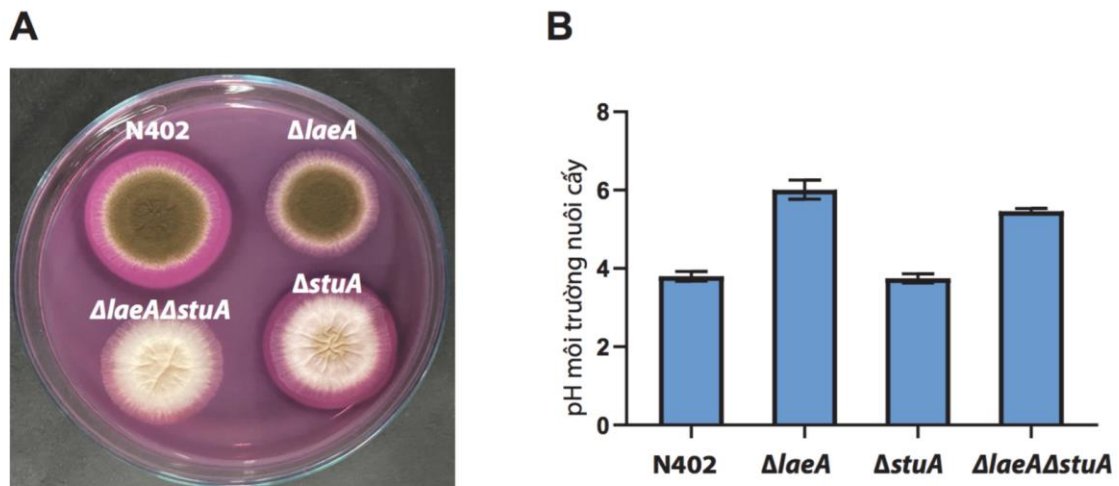


Hình 3.25. Kết quả tạo chủng đột biến xóa kép *laeA* và *stuA* ở *A. niger* N402 ($N402\Delta laeA\Delta stuA$)

(A) Sơ đồ xác nhận xóa *stuA* từ chủng nền $N402\Delta laeA\Delta pyrG$ nhờ PCR với các vị trí bám môi đặc hiệu. (B) Hình chuyển gen đại diện tạo chủng đột biến xóa kép $\Delta laeA\Delta stuA$ và sự phát triển của chủng đột biến mới tạo ($N402\Delta laeA\Delta stuA$) được kiểm tra đồng thời trên CDA + Uri + Ura so với chủng nền $N402\Delta laeA\Delta pyrG$ và một thể đột biến chèn ngẫu nhiên (*Ect-1*). Các đĩa được ủ ở 30°C trong 4 ngày. (C) Kết quả xác nhận xóa gen *pyrG* nhờ PCR với các cặp môi đặc hiệu AnstuA-*orf-F2*/AnstuA-*orf-R* và AnstuA-*orf-F*/AnstuA-P5. (-) là đối chứng âm. M là DNA marker 1 kb (Thermo Fisher Scientific, Mỹ).

Cặp mồi AnstuA-orf-F/AnstuA-P5 được sử dụng để xác nhận ở 4 chủng có kiểu hình màu trắng (#1, #2, #3, #4). Do một phần vùng ORF của gen *stuA* đã bị thay thế bằng marker *pyrG* nên cả 4 chủng màu trắng đều cho sản phẩm PCR với kích thước 1,9 kb. Đối với chủng N402, vùng ORF không bị can thiệp nên cho sản phẩm PCR có kích thước là 2,34 kb. Từ các kết quả sàng lọc và PCR, việc loại bỏ gen *stuA* theo cơ chế tái tổ hợp tương đồng ở chủng nền N402 Δ *laeA* Δ *pyrG* đã thành công.

Gen *laeA* liên quan mật thiết tới quá trình sinh tổng hợp axit citric ở *A. niger*. Đột biến hỏng gen *laeA* làm giảm mạnh hàm lượng axit citric mà *A. niger* có thể sản xuất [111]. Cả hai chủng đột biến xoá đơn gen *laeA* và xoá kép *laeA-stuA* đều suy giảm khả năng axit hoá môi trường (Hình 3.26).



Hình 3.26. Khả năng sinh axit hữu cơ của các chủng *A. niger*

(A) Kết quả định tính khả năng sinh axit hữu cơ của các chủng nấm với 5 μ l bào tử (10^6 bào tử/ml) nhỏ lên môi trường MM (ASP-N) bổ sung bột McConkey và sữa gầy sau 3 ngày ở 30°C. (B) Sự thay đổi của pH dịch nuôi cấy các chủng nấm sau 3 ngày ở 30°C.

Xoá gen *stuA* gây ra các đặc điểm bất thường về hình thái và sinh sản vô tính ở nhiều loài nấm sợi. Cụ thể, ở nấm sợi *A. flavus*, chủng xoá gen *stuA* mất khả năng sinh bào tử [160]. Ở *A. fumigatus*, loại bỏ gen *stuA* dẫn đến việc hình thành cấu trúc sinh bào tử bất thường, bào tử dị hình được sinh ra trực tiếp từ bọng bào tử với số

lượng ít [134]. Ở *F. culmorum*, hệ sợi của chủng xóa gen *stuA* phát triển còi cọc, số lượng cuống sinh bào tử của chủng này giảm 5-10 lần so với chủng tự nhiên [121]. Bên cạnh đó, các đột biến hỏng gen liên quan đến các quá trình hình thành bào tử khác ở nấm như *brlA* và *abaA* sẽ làm mất khả năng sống sót của bào tử, gây khó khăn trong việc nghiên cứu do không còn khả năng duy trì các thế hệ sau [101]. Mặc dù gen *stuA* tham gia trực tiếp vào quá trình hình thành bào tử và biệt hoá tế bào, nhưng khác với *brlA* và *abaA*, các chủng xoá gen *stuA* vẫn có khả năng hình thành bào tử. Khi đánh giá mức độ biểu hiện gen thông qua real-time PCR ở *A. niger*, khả năng biểu hiện gen đã giảm 5,26-6,33 lần đối với gen *brlA* và 16,67-20,41 lần đối với gen *abaA* ở chủng đột biến xoá gen *stuA* so với chủng N402 ban đầu (Hình 3.27). Đối với chủng đột biến xoá kép N402 Δ *laeA* Δ *stuA*, mức độ biểu hiện gen *brlA* đã giảm 13,15-13,51 lần và mức độ biểu hiện gen *abaA* đã giảm 6,67-14,28 lần so với chủng N402. Đối với *A. fumigatus*, mặc dù quá trình hình thành bào tử đều bất thường ở cả thể đột biến Δ *brlA* và Δ *stuA*, tuy nhiên, xoá gen *brlA* đã làm mất khả năng hình thành bào tử. Trong khi đó, bào tử vẫn có thể hình thành một cách bất thường ở thể đột biến Δ *stuA*. Ngoài ra, BrlAp và StuAp cũng điều hoà các chương trình phiên mã khác biệt nhưng chồng chéo nhau. 243 gen ở *A. fumigatus* đã được xác định là có sự biểu hiện khác biệt giữa chủng hoang dại và thể đột biến hỏng gen điều hoà *brlA* và/hoặc *stuA* [146]. Ở *A. nidulans*, StuA kiểm soát sự biểu hiện của cả 2 gen điều hoà phát triển quan trọng là *brlA* và *abaA* và các gen liên quan tới chu kỳ tế bào. Xoá gen *stuA* đã ảnh hưởng nghiêm trọng tới quá trình định vị của 2 protein điều hoà trung tâm là BrlAp và AbaAp. Điều này đã tạo ra các bào tử không có metulae hoặc phialide và làm giảm sự hình thành bào tử [100].

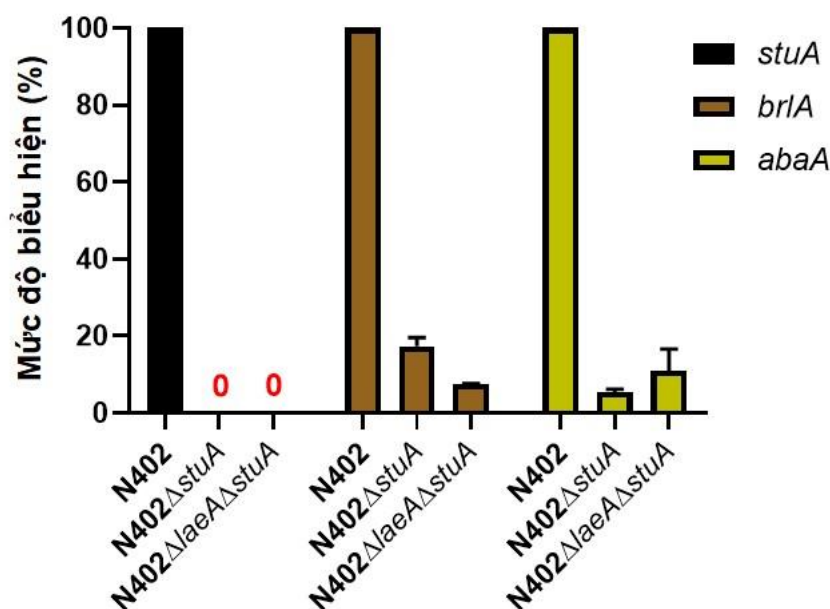
Gen *brlA* (bristle A) lần đầu tiên được xác định thông qua phân tích đột biến về sự phát triển vô tính ở *A. nidulans*. Các đột biến *brlA* làm mất khả năng hình thành bào tử ở *A. nidulans* và các chủng đột biến này biểu hiện kiểu hình giống như lông cứng. Xoá *brlA* cũng tạo kiểu hình tương tự ở *A. flavus*. Thể đột biến hỏng gen *brlA* tạo thành các khuẩn lạc màu trắng và không thể hình thành bào tử. Ở *A. oryzae*, thể đột biến gen *brlA* không hình thành bào tử và tăng sinh sợi nấm. Như vậy, chức năng của gen *brlA* trong sản xuất bào tử vô tính là bảo thủ ở các loài *Aspergillus*. Ngoài ra,

brlA cũng tham gia vào quá trình sinh sản hữu tính và sản xuất các chất chuyên hoá thứ cấp ở *A. nidulans* và *A. flavus* [35]. Thể đột biến *brlA* không thể tạo ra cleistothecia ở *A. nidulans*. Sự hình thành sclerotia cũng đã được chứng minh là giảm mạnh ở thể đột biến *brlA* ở *A. flavus*. Bên cạnh đó, các thể đột biến *brlA* cũng tăng sản xuất aflatoxin. Nói chung, yếu tố phiên mã ngón tay kềm C₂H₂ BrlA hoạt động như yếu tố kích hoạt thiết yếu cho quá trình hình thành bào tử vô tính ở *Aspergillus*, đột biến mất chức năng của nó ngăn chặn sự hình thành bào tử vô tính [5]. Yếu tố AbaA được đánh giá như một công tắc kiểm soát sự hình thành bào tử [8].

AbaA là một yếu tố điều hoà pha giữa của quá trình hình thành bào tử. Gen *abaA* biểu hiện mạnh ở pha giữa và pha cuối của quá trình hình thành bào tử, tuy nhiên gen này không biểu hiện trong bào tử. Kiểu hình điển hình của đột biến *abaA* là cấu trúc bàn tính (abacus), làm không phân biệt hoàn toàn các phialide với chuỗi bào tử ở *A. nidulans*. Kiểu hình này cũng đã được quan sát thấy ở các loài *Aspergillus* khác, chẳng hạn như *A. fumigatus* và *A. oryzae*. Ở *A. flavus*, thể đột biến *aba* cũng tạo kiểu hình màu trắng với các phialide giống bàn tính. AbaA cũng ảnh hưởng tới quá trình hình thành sclerotia và aflatoxin B [35].

Gen *stuA* (stunted-còi cọc) mã hóa một loại protein là thành viên của các yếu tố phiên mã APSES (Asm1p, Phd1p, Sok2p, Efg1p và StuAp). Ở *A. nidulans*, StuA kiểm soát biểu hiện mRNA của *brlA* và *abaA*. StuA điều hoà quá trình hình thành bào tử vô tính [100]. Ở *A. fumigatus*, mRNA *stuA* được biểu hiện khi nấm đã phát triển. Ngoài ra, các chủng đột biến $\Delta stuA$ đã tạo ra các bào tử dính bất thường với một số lượng bào tử rất nhỏ. StuA rất quan trọng đối với việc tạo ra bào tử dính ở *A. fumigatus* [134]. StuA không thể thiếu trong sự phát triển của nấm và chuyển hóa thứ cấp ở *A. flavus*. Các thể đột biến *stuA* làm suy giảm sự hình thành bào tử. Sự biểu hiện của các gen *brlA* và *abaA* cũng bị giảm nghiêm trọng ở *A. flavus* xóa *stuA*. Hơn nữa, sự vắng mặt của *stuA* dẫn đến khiếm khuyết trong quá trình điều hòa và sản xuất aflatoxin trong hạt đậu phộng và ngô [35]. StuA là một protein điều hòa bảo thủ và đóng vai trò trung tâm trong quá trình phát triển vô tính của nấm cũng như trong quá trình phát sinh hình thái của nhiều loài nấm sợi [35].

Các gen có vai trò trong các quá trình tế bào khác nhau như sau: *actin* và *tub* (cấu trúc tế bào), *ubi* (phân giải protein), *rpb1* và *tef1* (phiên mã và dịch mã), *gpd*, *try* và *cox5* (liên quan đến trao đổi chất) là những thường được sử dụng làm gen tham chiếu ở nhiều sinh vật, bao gồm cả động vật, thực vật và con người. Ngoài ra, gen *cox5* được chứng minh là gen tham chiếu phù hợp ở *A. flavus* và *A. niger* [22, 136]. Chúng tôi đã đánh giá mức độ biểu hiện của các gen tham chiếu bằng cách tính toán các giá trị ngưỡng chu kỳ (Ct) từ tổng số mẫu. Biểu đồ hộp các giá trị Ct cho mỗi gen được thể hiện trong Phụ lục 25. Giá trị Ct cho 4 gen được nghiên cứu nằm trong khoảng từ 16 đến 21, với phần lớn các giá trị này nằm trong khoảng từ 17 đến 20.



Hình 3.27. Mức độ biểu hiện gen ở *A. niger* xóa *stuA* và xóa kép *laeA-stuA* được so sánh thông qua real-time PCR

Mức độ biểu hiện mRNA của các gen *stuA*, *brlA*, *abaA* ở *A. niger* N402, N402Δ*stuA*, N402Δ*stuA*Δ*laeA* được phân tích thông qua so sánh với gen tham chiếu *cox5*.

Việc sử dụng các gen tham chiếu này có ưu điểm là cả gen tham chiếu và gen quan tâm đều được tiếp xúc với các bước chuẩn bị mẫu giống nhau trước khi thực hiện PCR. Trong quá trình áp dụng các gen tham chiếu, việc xác nhận tính phù hợp của chúng là vô cùng quan trọng. *act* là một gen tham chiếu thường được sử dụng để

chuẩn hóa dữ liệu real-time PCR. Vì gen *act* mã hóa cho actin, một protein liên quan đến sự hình thành của bộ xương tế bào, nó được biểu hiện ổn định do sự biểu hiện liên tục và ổn định của nó là điều kiện tiên quyết đối với một cơ thể sống. Vì *A. niger* là một loài nấm nổi tiếng với khả năng tiết ra nhiều loại enzyme, nên có vẻ hợp lý khi *sarA* được biểu hiện liên tục để đảm bảo sự truyền tải của protein tương ứng hỗ trợ quá trình tiết. *cox5*, mã hóa cho tiểu đơn vị thứ 5 của cytochrome c oxidase, một loại enzyme nằm trong chuỗi hô hấp cũng là một gen được biểu hiện ổn định [22, 136]. Trong đó, *sarA* và *cox5* biểu hiện ổn định hơn giữa các mẫu và thường được sử dụng để chuẩn hóa dữ liệu biểu hiện gen. Trong khảo sát của chúng tôi, gen *cox5* ít có sự biến đổi Ct giữa các mẫu khác nhau. Vì vậy, gen *cox5* được lựa chọn là gen tham chiếu để so sánh mức độ biểu hiện gen ở *A. niger*.

Ochratoxin A (OTA) là một chất chuyển hóa thứ cấp của nấm có tính độc cao và có khả năng tích tụ trong nội tạng người và động vật. OTA được tạo ra bởi một số loài nấm trong các chi *Aspergillus* và *Penicillium*. Trong phân nhóm *Nigri*, *A. carbonarius*, *A. niger* và *A. welwitschiae* là những loài có khả năng sản xuất lượng lớn OTA. Hiện nay, các gen quan trọng cho quá trình sinh tổng hợp OTA được điều hòa bởi 5 gen mã hóa cho halogenase (*hal*), yếu tố phiên mã bZIP (*bZIP*), cytochrome p450 monooxygenase (*p450*), peptide tổng hợp không ribosome (*nrps*) và polyketide synthase (*pks*). Việc mất sản xuất OTA dường như liên quan đến việc xóa các gen này trong hệ gen nấm [54].

Cụm sinh tổng hợp fumonisin ở *A. niger* rất khác với cụm sinh tổng hợp ở các loài *Fusarium* và một số gen quan trọng bị thiếu; do đó, các loài *Aspergillus* đen không thể tổng hợp tất cả các loại fumonisin thành fumonisin B2 (FB2) là loại có liên quan nhất đến an ninh lương thực. Gen mã hóa FUM1 được coi là gen chủ chốt của quá trình sinh tổng hợp FB2. Cặp môi qFUM1nigF/qFUM1nigR khuếch đại một vùng 207 bp khi sử dụng khuôn là DNA tổng số và 139 bp với khuôn là DNA sợi bổ sung (cDNA) do gen có chứa 1 intron; điều này dễ dàng cho phép phát hiện DNA hệ gen có trong các mẫu DNA bổ sung [55]. Khi tiến hành kiểm tra mức độ biểu hiện của một số gen sinh độc tố ochratoxin và fumonisin B2 ở *A. niger* nhờ real-time PCR, những gen này hoàn toàn không biểu hiện hoặc biểu hiện rất yếu ở các chủng xóa gen

laeA, *stuA* hoặc xóa kép *laeA-stuA* (Phụ lục 26). Các chủng giảm khả năng hình thành độc tố nấm này là các chủng tiềm năng cho sản xuất các sản phẩm dùng trong thực phẩm.

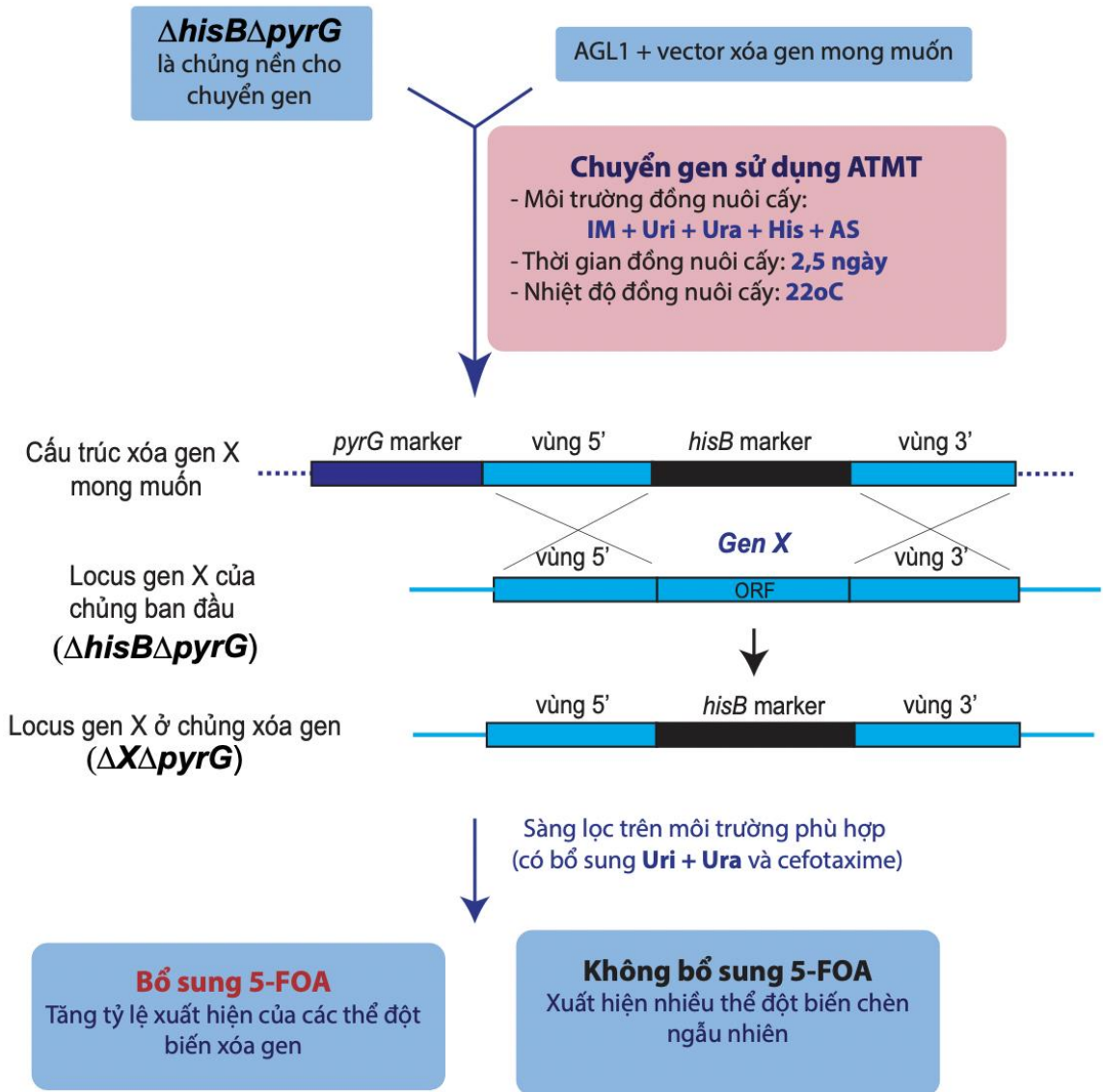
Sử dụng hệ thống chuyển gen 2 marker chọn lọc mới phát triển, chúng tôi cũng đã thành công trong tạo các chủng đột biến xóa kép vừa giảm khả năng sinh amylase, vừa giảm khả năng hình thành bào tử ở *A. niger* (N402 Δ *amyR* Δ *stuA*); vừa giảm khả năng sinh protease, vừa giảm khả năng hình thành bào tử ở *A. niger* (N402 Δ *prtT* Δ *stuA*); vừa giảm khả năng sinh axit kojic, vừa giảm khả năng hình thành bào tử ở *A. oryzae* (RIB40 Δ *laeA* Δ *stuA*) (Phụ lục 27-31). Đặc biệt, cả 3 thể đột biến xóa kép này đều sinh trưởng kém, có kích thước khuẩn lạc nhỏ hơn so với các chủng ban đầu và các chủng xóa đơn gen. Rất có thể tác động hiệp đồng của các yếu tố điều hòa phiên mã có vai trò quan trọng đối với khả năng sinh trưởng và phát triển ở *A. oryzae* và *A. niger*.

Như vậy, hệ thống được phát triển trong nghiên cứu này cho phép xóa gen với hiệu quả khá tốt và sẵn sàng cho các thí nghiệm xóa nhiều gen ở cả *A. oryzae* và *A. niger*. Đặc biệt, gen *pyrG* mã hóa orotidine-50 -phosphate (OMP) decarboxylase đã được sử dụng để tái sử dụng marker chọn lọc, cho phép xóa nhiều gen ở *A. fumigatus* và *A. nidulans* [108]. Hệ thống tái tổ hợp Cre/loxP từ bacteriophage P1 cũng cho phép xóa gen liên tiếp ở *A. nidulans* [51]. Tuy nhiên, gây gián đoạn gen nhiều lần theo cách thức này làm tích tụ nhiều bản sao của các đoạn DNA ngoại lai trong hệ gen của vật chủ. Với cách thức phát triển trong nghiên cứu của chúng tôi, các chủng đột biến xóa nhiều gen có thể được thực hiện mà không tích hợp thêm bất kỳ bản sao DNA nào do việc xóa gen được tiến hành theo cơ chế tái tổ hợp tương đồng. Hơn nữa, đây cũng là lần đầu tiên việc tái sử dụng marker cho xóa nhiều gen được thực hiện với *A. oryzae*.

3.4. Thiết lập chiến lược mới để tăng hiệu quả xóa 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 xóa gen dựa trên cơ chế tái tổ hợp

tương đồng và *pyrG* là marker chọn lọc 2 chiều được sử dụng để loại bỏ các thể chèn ngẫu nhiên. Chiến lược nâng cao hiệu suất xóa gen được thể hiện trong Hình 3.28.



Hình 3.28. Sơ đồ tóm tắt chiến thuật tăng cường hiệu quả xóa gen ở *A. oryzae* và *A. niger* với *pyrG* là marker chọn lọc thứ 2

Các thông số tối ưu cho xóa gen sử dụng phương pháp ATMT với các chủng nền là chủng đột biến khuyết dưỡng kép ở *A. oryzae* và *A. niger*. X đại diện cho gen muốn xóa.

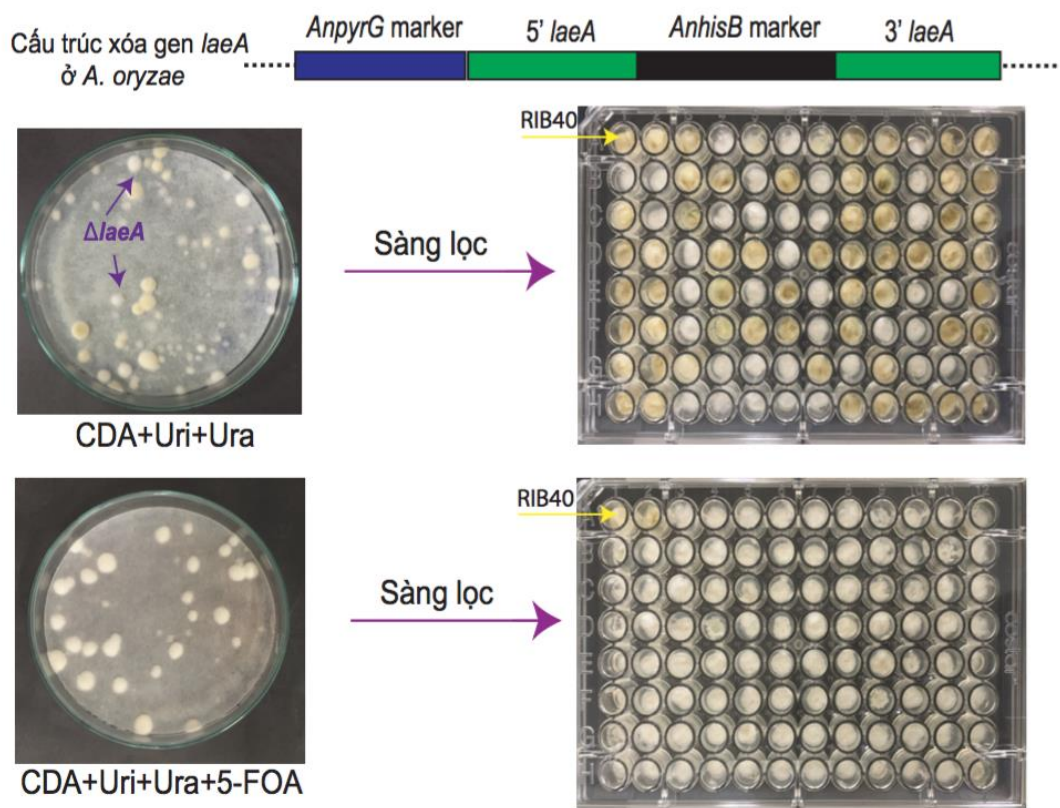
Marker *hisB* được đặt giữa vùng 5' và 3' của gen cần xoá, marker chọn lọc thứ hai - *pyrG*, có thể được để trước vùng 5' hoặc sau vùng 3'. Khi sự tái tổ hợp tương đồng diễn ra, các thể đột biến xoá gen sẽ được thay thế toàn bộ hoặc một phần khung đọc mở bằng marker *hisB* và vẫn là các chủng khuyết dưỡng uridine/uracil. Trong khi đó, với các thể đột biến chèn ngẫu nhiên, toàn bộ vùng T-DNA của cấu trúc xoá đã được tích hợp vào hệ gen, vì vậy, chúng trở nên nguyên dưỡng. Khi sàng lọc các thể đột biến này trên môi trường có bổ sung uridine/uracil và 5-FOA, hầu hết các thể chèn ngẫu nhiên bị loại bỏ. 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*.

3.4.1. Chiến lược tăng tỷ lệ xoá gen ở nấm sợi *A. oryzae*

Cấu trúc xoá gen *laeA* cho nấm sợi *A. oryzae* được tạo trước đó (pKH- $\Delta AolaeA$) được chèn thêm marker *pyrG* vào phía trước đoạn 5' *laeA* phục vụ cho các thí nghiệm kiểm tra hiệu suất xoá gen. Trong đó, cấu trúc pKH- $\Delta AolaeA$ được mở vòng bằng *EcoRI* và xử lý với Alkaline photphatse để ngăn chặn tự đóng vòng; marker *pyrG* được khuếch đại nhờ PCR, xử lý với *EcoRI* và được nối vào vector mở vòng nhờ T4 DNA ligase. Cấu trúc mới tạo được đặt tên là pKHG- $\Delta AolaeA$.

Khi sử dụng cấu trúc mới tạo này để xoá *laeA* ở chủng nền RIB40 $\Delta hisB\Delta pyrG$, nếu môi trường chọn lọc được bổ sung 5-FOA, tỷ lệ xoá có thể đạt tới $98,48\% \pm 1,5\%$. Hầu hết các khuẩn lạc được cấy chuyển và thuần khiết trên môi trường CDA + Uri + Ura với nguồn nitơ duy nhất là $(NH_4)_2SO_4$ đều có kiểu hình giảm hình thành bào tử (Hình 3.29). Để chắc chắn những thể chuyển gen mới thu được là các chủng xoá gen *laeA*, các phản ứng PCR với cặp mồi *AolaeA*-P5/*AolaeA*-P6 và *AolaeA*-P8/*AnhisB*-R1 đã được tiến hành. Như vậy, khi bổ sung thêm marker chọn lọc thứ 2 đã giúp tăng tỷ lệ xoá 2,6 lần so với sử dụng cấu trúc xoá gen *laeA* ban đầu.

Các chủng đột biến xoá gen *stuA* có kiểu hình đặc trưng, dễ dàng quan sát và chọn lọc. Vì vậy, gen *stuA* tiếp tục được lựa chọn để chứng minh tính khả thi của hệ thống trong can thiệp gen ở nấm sợi *A. oryzae*. Khi tiến hành xoá gen *stuA* ở chủng nền RIB40 $\Delta hisB$ với vector nhị thể pKH- $\Delta AostuA$, số lượng khuẩn lạc trắng xuất hiện trên màng chuyển gen chiếm $13,41\% \pm 4,33\%$. Cấu trúc xoá tăng cường pKHG- $\Delta AostuA$ tiếp tục được tạo tương tự với chiến thuật tạo pKHG- $\Delta AolaeA$.

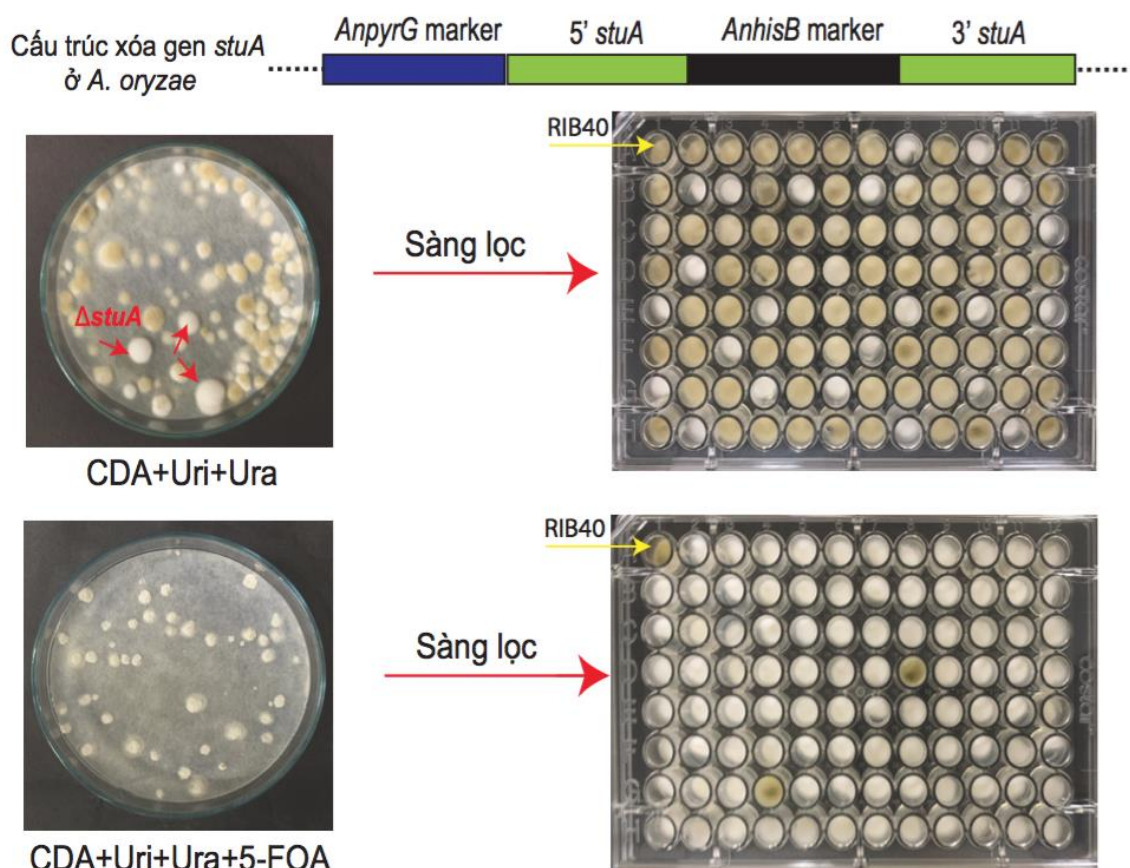


Hình 3.29. Chiến lược tăng tỷ lệ xoá gen *laeA* ở nấm *A. oryzae* RIB40 Δ *hisB* Δ *pyrG*
 Sơ đồ loại bỏ gen *laeA* ở *A. oryzae* khuyết dưỡng kép RIB40 Δ *hisB* Δ *pyrG* với việc bổ sung thêm marker chọn lọc *pyrG* từ *A. niger* (*AnpyrG*) để tăng tỷ lệ xoá gen và sàng lọc các thể chuyển gen trên môi trường đặc hiệu với nguồn nitơ là $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ để xác định các thể đột biến Δ *laeA*.

Khi không có sự hoạt động của marker chọn lọc thứ hai (marker *pyrG*), các khuẩn lạc trắng xuất hiện rất ít, hiệu suất xoá gen *stuA* chỉ đạt $25,64\% \pm 3,0\%$. Khi áp dụng chiến thuật xoá gen mới, hiệu suất xoá gen có thể đạt tới $96,99\% \pm 2,04\%$ đối với trường hợp xoá gen *stuA* ở *A. oryzae* (Hình 3.30).

Hiện nay, nấm sợi đa nhân *A. oryzae* vẫn là một trong số những nấm sợi khó thao tác gen. Hầu hết các nghiên cứu cải biến di truyền ở *A. oryzae* đều phụ thuộc vào gây đột biến nhờ tia UV hoặc sử dụng các phương pháp chuyển gen thông qua tế bào trần hoặc sử dụng các công cụ phức tạp như CRISPR/Cas9, lọc bào tử để thu được bào tử đơn nhân, ... Mặc dù việc bất hoạt con đường NHEJ (non-homologous end joining) ở một số nấm sợi, trong đó có *A. oryzae* và *A. niger* đã giúp tăng cường

hiệu quả trao đổi chéo tương đồng và có thể đạt tới tỷ lệ xóa 100% ở *A. oryzae*, các chủng đột biến hỏng con đường NHEJ thường không thích hợp để tạo các chủng hỗ trợ phục vụ quá trình điều tra vai trò, chức năng gen do những ảnh hưởng liên quan đến cơ chế sửa chữa DNA và tính không ổn định của hệ gen [92, 102].

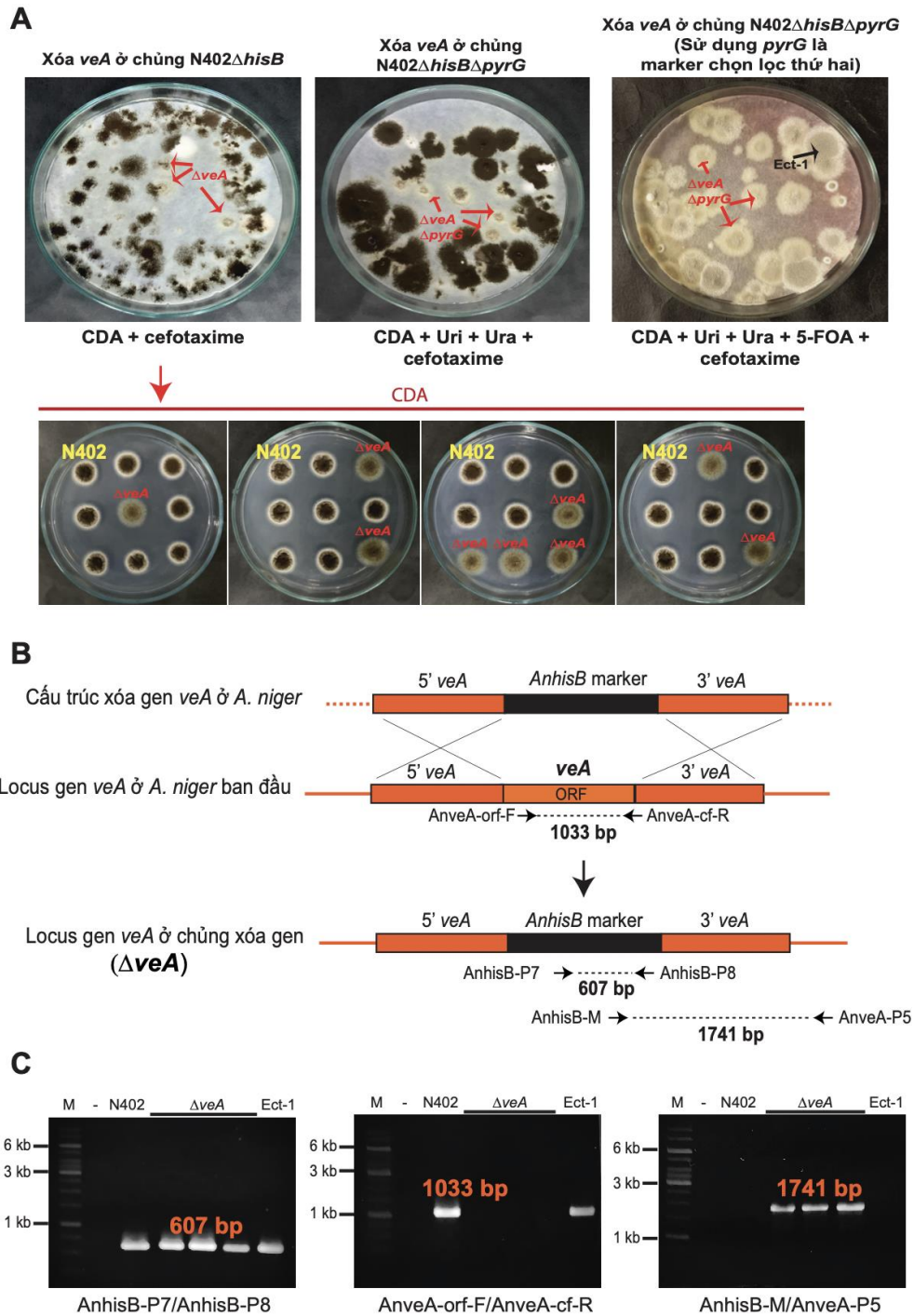


Hình 3.30. Chiến lược tăng tỷ lệ xóa gen *stuA* ở nấm *A. oryzae* **RIB40 Δ hisB Δ pyrG**
Sơ đồ loại bỏ gen *stuA* ở *A. oryzae* khuyết dưỡng kép **RIB40 Δ hisB Δ pyrG** với việc bổ sung thêm marker chọn lọc *pyrG* từ *A. niger* (*AnpyrG*) để tăng tỷ lệ xóa gen và sàng lọc các thể chuyển gen trên môi trường đặc hiệu để xác định các thể đột biến Δ *stuA*.

Kết quả thu được trong nghiên cứu này đề xuất một giải pháp mới, đơn giản, hiệu quả cao cho các nghiên cứu vai trò, chức năng gen ở nấm sợi *A. oryzae*. Các thể chuyển gen thu được khi áp dụng chiến thuật trên không chỉ giúp định hướng sàng lọc các chủng đột biến xóa gen mà còn là chủng nền có sẵn để tạo các thể phục hồi, đột biến xóa đa gen và biểu hiện quá mức.

3.4.2. Chiến lược tăng tỷ lệ xoá gen ở nấm sợi *A. niger*

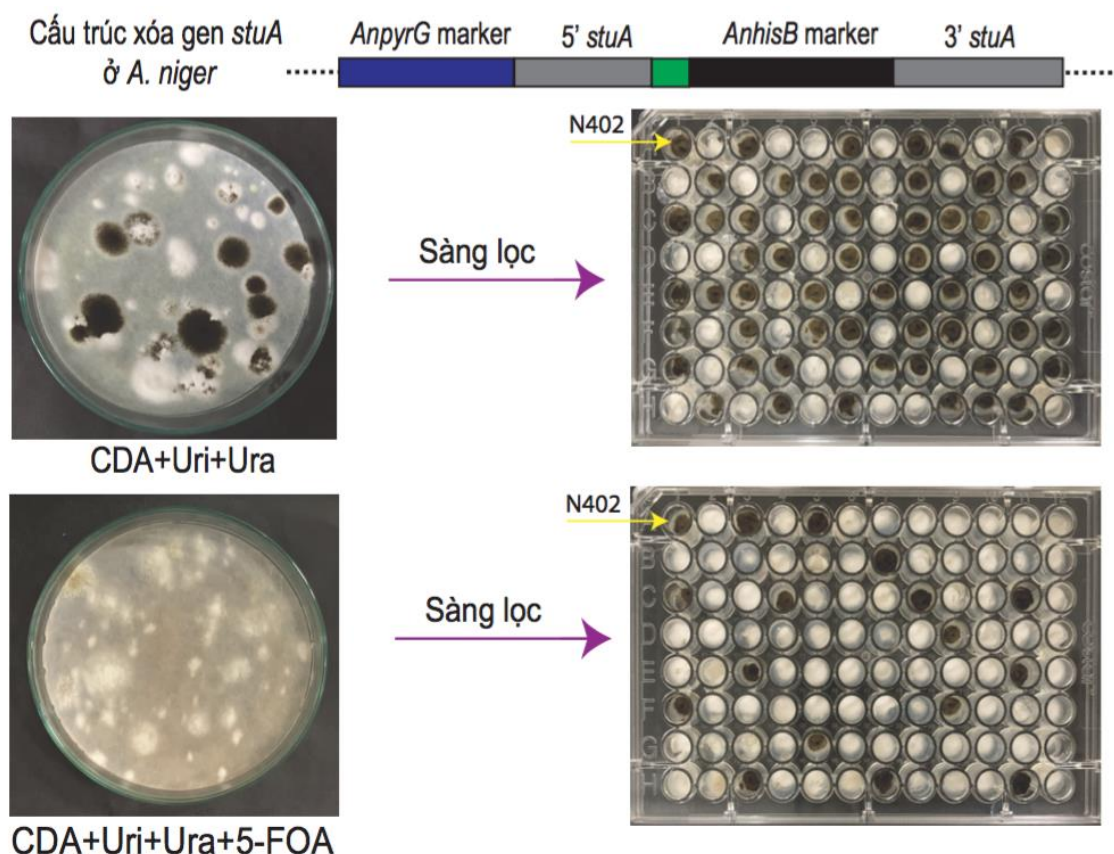
Xoá gen ở *A. niger* hiện nay còn gặp nhiều hạn chế. Cấu trúc xoá gen thường bao gồm một đoạn DNA chứa marker chọn lọc nằm giữa các vùng trình tự tương đồng của gen muốn xoá. Việc tạo các cấu trúc xoá bị giới hạn bởi số lượng các marker chọn lọc có sẵn ở *A. niger* và yêu cầu về chủng nấm phù hợp. Tuy nhiên, tỷ lệ xoá một số gen ở *A. niger* với phương pháp ATMT đã cho các kết quả khả quan, với tỷ lệ xoá *laeA* đạt $68\% \pm 7\%$ và xoá *amyR* đạt $83,75\% \pm 6,38\%$ ở chủng nền là *A. niger* N402 Δ *hisB*. Tương tự, khi sử dụng cấu trúc xoá *laeA* (pKH- Δ An*laeA*) và *amyR* (pKH- Δ An*amyR*) cho *A. niger* N402 Δ *hisB* Δ *pyrG*, tỷ lệ xoá gen có thể đạt lần lượt là $66,34\% \pm 3,84\%$ và $77,5\% \pm 2,5\%$, cao hơn rất nhiều so với các trường hợp xoá gen khác. Vì vậy, chúng tôi lựa chọn một số gen được cho là khó xoá ở *A. niger* để chứng minh hiệu quả của chiến lược mới phát triển. Tỷ lệ xoá thành công *veA* với cả 2 chủng nền N402 Δ *hisB* và N402 Δ *hisB* Δ *pyrG* rất thấp. Đối với chủng nền N402 Δ *hisB* tỷ lệ xoá gen chỉ đạt $7,32\% \pm 2,66\%$. Sử dụng cấu trúc xoá gen *veA* là pKH- Δ An*veA*, tỷ lệ xoá gen *veA* với chủng nền N402 Δ *hisB* Δ *pyrG* tuy cao hơn nhưng vẫn rất thấp, đạt $15,96\% \pm 1,48\%$. Áp dụng cách thức tương tự với *A. oryzae*, chúng tôi sử dụng gen *pyrG* là marker chọn lọc thứ hai nhằm nâng cấp khả năng xoá gen ở *A. niger*. Đoạn gen *pyrG* từ *A. niger* mã hóa cho orotidine-5-phosphate decarboxylase được khuếch đại nhờ PCR và chèn vào trước vùng 5'*veA* của vector pKH- Δ An*veA* để tạo thành vector mới pKHG- Δ An*veA*. Các thể đột biến Δ *veA* Δ *pyrG* là các tế bào thiếu enzyme orotidine-5-phosphate decarboxylase, không thể phát triển nếu không có uridine/uracil bổ sung thêm từ môi trường, trong khi các tế bào này có khả năng chống lại độc tính của axit 5-fluoro-orotic. Bên cạnh khả năng kháng 5-FOA, các đặc trưng về kiểu hình của các thể đột biến Δ *veA* Δ *pyrG*, các thể chuyển gen này cũng được xác nhận thêm nhờ PCR sử dụng 3 cặp môi độc lập: An*hisB*-P7/An*hisB*-P8 (chứng minh sự có mặt của marker *hisB* trong hệ gen nấm), An*veA*-orf-F/An*veA*-cf-R (chứng minh việc loại bỏ thành công vùng ORF của gen *veA*), và An*hisB*-M/An*veA*-P5 (chứng minh sự kiện tái tổ hợp tương đồng đã diễn ra). Áp dụng chiến thuật mới, tỷ lệ xoá *veA* ở N402 Δ *hisB* Δ *pyrG* đã đạt được $47,97\% \pm 10,7\%$ (Hình 3.31).



Hình 3.31. Kết quả xóa gen *veA* sử dụng marker *hisB* ở *A. niger*

(A) Kết quả chuyển gen xóa *veA* ở *A. niger* sử dụng marker chọn lọc *hisB* với các chủng nền khác nhau và kết quả sàng lọc các thể chuyển gen trên CDA. Các đĩa được ủ ở 30°C trong 4 ngày. (B) Sơ đồ xác nhận xóa *veA* nhờ PCR với các vị trí bám mồi đặc hiệu. (C) Kết quả xác nhận xóa gen *veA* nhờ PCR với các cặp mồi đặc hiệu. (-) là đối chứng âm. M là DNA marker 1 kb (Thermo Fisher Scientific, Mỹ).

Bên cạnh đó, khi cấu trúc pKH- $\Delta AnstuA$ được nâng cấp thành pKHG- $\Delta AnstuA$ để tăng cường xoá gen *stuA* ở N402 $\Delta hisB\Delta pyrG$, tỷ lệ xoá gen ghi nhận được là $80,13\% \pm 6,52\%$ khi được chọn lọc trên môi trường có bổ sung 5-FOA (Hình 3.32). So với những công bố đầu tiên về chuyển gen ở *A. niger*, hiệu suất xoá gen đạt được trong trường hợp này rất vượt trội. Chiến lược xoá gen mới phát triển sẽ là công cụ tiềm năng cho các nghiên cứu chuyên sâu về hệ gen ở *A. niger*.



Hình 3.32. Chiến lược tăng tỷ lệ xoá gen *stuA* ở nấm *A. niger* N402 $\Delta hisB\Delta pyrG$
Sơ đồ loại bỏ gen *stuA* ở *A. niger* khuyết dưỡng kép N402 $\Delta hisB\Delta pyrG$ với việc bổ sung thêm marker chọn lọc *pyrG* từ *A. niger* (*AnpyrG*) để tăng tỷ lệ xoá gen và sàng lọc các thể chuyển gen trên môi trường đặc hiệu để xác định các thể đột biến $\Delta stuA$.

Xoá gen là một cách tiếp cận quan trọng trong sinh học phân tử nấm. Việc vô hiệu hóa hoặc thay thế một vị trí nhất định cho thấy vai trò tế bào của gen đó. Thông thường, 1 đoạn DNA sẽ được sử dụng cho xoá hoặc thay thế vị trí gen đích và các thể

chuyên gen phải có môi trường chọn lọc đặc hiệu. Trong trường hợp đoạn DNA không chứa các yếu tố chức năng để tự sao chép hoặc phân ly, nó sẽ bị phân hủy hoặc được duy trì như một phần của hệ gen nấm. Về cơ bản, có 2 cơ chế sửa chữa mạch kép DNA đảm bảo rằng 1 đoạn DNA đã được tích hợp vào hệ gen nấm và được sao chép ổn định là cơ chế tái tổ hợp tương đồng (HR) và cơ chế nối các đoạn cuối không tương đồng (NHEJ), còn được gọi là tái tổ hợp không tương đồng [11].

Tuy nhiên, tần số tái tổ hợp tương đồng tự nhiên ở nấm sợi là rất thấp. Các phân tích gen chức năng gen đã không đạt hiệu quả như mong đợi trong một thời gian dài. Con đường NHEJ là một cơ chế đảm bảo việc sửa chữa các đứt gãy sợi kép DNA (DSB) và phụ thuộc vào hoạt động của Ku heterodimer (phức hợp protein Ku70/Ku80) và phức hợp DNA ligase IV-Xrcc4. Con đường NHEJ cạnh tranh với một cơ chế sửa chữa khác gọi là con đường tái tổ hợp tương đồng (HR). Con đường HR có sự tương tác giữa các trình tự DNA tương đồng, trong khi con đường NHEJ liên kết các DSB mà không cần bất kỳ sự tương đồng nào. Bằng cách xóa các gen *ku70*, *ku80* hoặc *lig4*, tần số các sự kiện tái tổ hợp tương đồng đã tăng lên đáng kể ở nhiều loài nấm sợi và các chủng đột biến hỏng con đường NHEJ này được coi là “chủng vàng” cho các thao tác gen bao gồm xóa gen, chèn gen và thay thế trình tự promoter [11]. Khi gây đột biến hỏng gen liên quan đến con đường NHEJ, tần số tái tổ hợp tương đồng lên đến 100% ở *N. crassa* [110].

Ở *A. niger*, xóa gen *kusA* mã hóa cho ortholog của protein Ku70 đã giúp cải thiện rõ rệt hiệu suất tái tổ hợp tương đồng. Hiệu suất tái tổ hợp tương đồng có thể lên đến hơn 80% và không ảnh hưởng đến sự phát triển của *A. niger*. Tuy nhiên, $\Delta ku70$ không dễ tạo ra từ chủng hoang dại (WT) theo cách truyền thống và các thể đột biến nhạy cảm hơn với một số hóa chất như methyl mesylate, ethyl methane sulfonate và bleomycin [95]. Vì vậy, ứng dụng của các thể đột biến này vẫn còn hạn chế.

Các đột biến hỏng con đường NHEJ là công cụ quan trọng trong nghiên cứu chức năng gen ở quy mô lớn. Tuy nhiên, do protein Ku tác động đến các cơ chế duy trì telomere, tổ chức không gian nhân và tái phân bào, nên cần xem xét tính ổn định về mặt di truyền của các chủng đột biến hỏng gen *ku70/ku80* hoặc hỏng con đường

NHEJ. Một nhược điểm của đột biến hỏng con đường NHEJ là các chủng nấm này dễ bị tổn thương bởi các điều kiện phá hủy DNA. Một nhược điểm khác của các chủng hỏng con đường NHEJ là các nghiên cứu bổ trợ gen thường không thực hiện được. Ví dụ, các sự kiện tích hợp ngẫu nhiên, thường được sử dụng trong phương pháp bổ trợ gen, hầu như không thể xảy ra ở các chủng nền hỏng con đường NHEJ. Hiệu suất biến nạp thường thấp ở các chủng hỏng con đường NHEJ và việc tái biến nạp vào các chủng xoá gen có thể rất khó khăn [92].

Gần đây, hệ thống CRISPR/Cas9 đã được ứng dụng thành công trong chỉnh sửa gen trên nhiều loài nấm sợi như *T. reesei*, *A. oryzae*, *A. fumigatus*, *N. crassa* và *P. chrysogenum* [166]. Hơn nữa, Nødvig và cộng sự đã thiết lập một hệ thống CRISPR–Cas9 linh hoạt với cấu trúc ribozyme–gRNA–ribozyme (RGR) đặc biệt dành cho nấm sợi và áp dụng thành công ở 6 loài nấm sợi khác nhau, trong đó có *A. niger* [113]. Cấu trúc này đã giải quyết một cách hiệu quả vấn đề thiếu các promoter được RNA polymerase III nhận diện để phiên mã gRNA ở *A. niger*. Mặc dù vậy, việc xây dựng các vector CRISPR–Cas9 thường phụ thuộc vào kỹ thuật USER (New England Biolabs, Mỹ) đã làm tăng chi phí của quy trình thí nghiệm. Ngoài ra, plasmid pFC330 không phổ biến đối với hầu hết các nhà nghiên cứu. Gần đây, một hệ thống CRISPR/Cas9 cải tiến với các đoạn trình tự tương đồng ngắn (100 bp) đã cho hiệu quả cao đối trong xoá và bất hoạt gen ở *A. niger* [166]. Tuy nhiên, hệ thống này không có marker chọn lọc nên các conidiophore nảy mầm từ khuẩn lạc sơ cấp dương tính trên môi trường chọn lọc có thể có 2 loại: thể đột biến đúng hoặc thể đột biến sai đích mang gen kháng kháng sinh hygromycin được tích hợp vào vị trí không đặc hiệu. Vì vậy, để xác định nhanh chóng các thể đột biến xoá gen, nên sử dụng một gen kháng kháng sinh đối với plasmid biểu hiện Cas9/sgRNA và một gen kháng kháng sinh khác hoặc gen dinh dưỡng cho đoạn trình tự chứa cấu trúc xoá. Tuy nhiên, để có thể sử dụng gen dinh dưỡng trong chọn lọc thì cần phải có chủng đột biến khuyết dưỡng tương ứng [166].

Nói chung, tái tổ hợp tương đồng là cơ chế được ưu tiên nhất trong tạo các chủng đột biến xoá gen nhờ tính ổn định về mặt di truyền qua các thế hệ. Hiệu quả của hiện tượng tái tổ hợp tương đồng chủ yếu phụ thuộc vào bộ máy sửa chữa DNA

của vật chủ. Ở nấm men, như *S. cerevisiae* và *Schizosaccharomyces pombe*, hiệu quả xoá gen có thể đạt từ 50% đến 100% khi sử dụng các vùng tương đồng khá ngắn 50–100 bp [12, 154]. Đối với nấm sợi, cần có các vùng tương đồng thường tương đối dài (hơn 1000 bp) để đạt được hiệu suất xoá gen từ 10 đến 30% [63].

Hiệu quả xoá gen cũng tăng lên khi tiến hành chuyển gen ở nấm *A. awamori* bằng ATMT so với chuyển gen thông qua tế bào trần CaCl_2/PEG [98]. Ngoài ra, ATMT cũng cho hiệu quả xoá gen ở *Kluyveromyces lactis* cao hơn so với chuyển gen bằng xung điện [29]. Hơn nữa, sự tái tổ hợp tương đồng được chứng minh là phụ thuộc vào locus [19]. Trong trường hợp xoá *laeA* ở *A. niger*, hiệu quả xoá ở các chủng nền khác nhau tương đối cao, đạt hơn 60%. Trong khi đó, tỷ lệ xoá *stuA* và *veA* ở *A. niger* là dưới 40%. Do đó, việc cải thiện khả năng loại bỏ gen ở các trường hợp khó xoá gen là cần thiết hơn. Marker chọn lọc thứ hai được sử dụng để tăng số lượng thể đột biến xoá gen và do đó làm giảm số lượng các thể biến nạp sơ cấp cần sàng lọc để phân lập các thể đột biến dự kiến. Việc bổ sung *pyrG* làm marker chọn lọc thứ hai giúp cho khả năng xoá gen được tăng cường ở chủng nền $\text{N402}\Delta\text{hisB}\Delta\text{pyrG}$.

Tuy nhiên, hiệu quả xoá gen khi áp dụng chiến lược mới ở *A. niger* vẫn còn kém hơn rất nhiều so với xoá gen ở *A. oryzae*. Nguyên nhân lớn nhất của hiện tượng này là do các chủng *A. oryzae* ΔpyrG kháng 100% với 5-FOA. Vì vậy, khi xoá gen *pyrG* ở *A. oryzae* có thể đạt được tỷ lệ xoá gần tới 100%. Trong khi đó, hiện tượng dương tính giả xuất hiện rất nhiều ở *A. niger*. Nhiều khuẩn lạc sau khi chuyển gen xoá *pyrG* ở *A. niger* vẫn khuyết dưỡng uridine/uracil và có thể mọc được trên môi trường có bổ sung 5-FOA nhưng vùng ORF vẫn chưa bị xoá. Như vậy, chiến lược chuyển gen hiệu quả cao này có thể đạt được hiệu suất tối ưu khi áp dụng xoá gen ở một số loài nấm nhạy cảm cao với 5-FOA như *A. oryzae*, *C. militaris*,...

Sử dụng marker chọn lọc thứ hai để phân biệt giữa các sự kiện tái tổ hợp tương đồng và không tương đồng đã được áp dụng ở nấm sợi. Marker chọn lọc thứ hai sẽ mất khi có hiện tượng tái tổ hợp tương đồng, trong khi tái tổ hợp không tương đồng cho phép tích hợp cùng lúc cả 2 marker chọn lọc. Chiến lược này đã giúp tăng hiệu quả xoá gen gấp 5 đến 20 lần ở nấm *A. chrysogenum* và *N. crassa* [86, 126]. Gen *amdS* đã được sử dụng làm marker chọn lọc thứ hai trong chuyển gen ở *A. awamori*.

Sự hiện diện của gen này do các sự kiện tích hợp ngẫu nhiên và có thể được phát hiện do các thể chuyển gen có thể mọc trên môi trường sử dụng acetamide là nguồn cacbon và nitơ duy nhất, và tính nhạy cảm của các thể chuyển gen với fluoro-acetamide giúp việc chọn lọc trở nên dễ dàng hơn [64]. Mặc dù việc sử dụng *amdS* làm marker chọn lọc thứ hai giúp tăng tỷ lệ xoá gen lên 2 lần, nhưng việc bổ sung fluoro-acetamide vào môi trường sàng lọc làm cho các khuẩn lạc rất nhỏ, rất khó phân biệt giữa thể *amdS*⁺ và *amdS*⁻ [98]. Hơn nữa, *A. awamori* tự nhiên có chứa một số hoạt tính giống như acetamidase và điều này làm phức tạp quá trình chọn lọc thể chuyển gen *amdS*⁻ trực tiếp trên đĩa thạch chứa fluoro-acetamide [98]. Trong khi đó, việc sàng lọc các thể đột biến *pyrG*⁻ trên môi trường bổ sung 5-FOA rất dễ dàng ở *A. niger* và *A. oryzae*. Việc thêm 1 marker chọn lọc vào cấu trúc xoá gen thường dẫn đến việc giảm tổng số các thể chuyển gen xuất hiện trên các đĩa chọn lọc. Tuy nhiên, sàng lọc trước trên môi trường không có uridine/uracil giúp làm giảm số lượng các thể chuyển gen cần xác định là các thể đột biến chèn ngẫu nhiên. Các thể 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

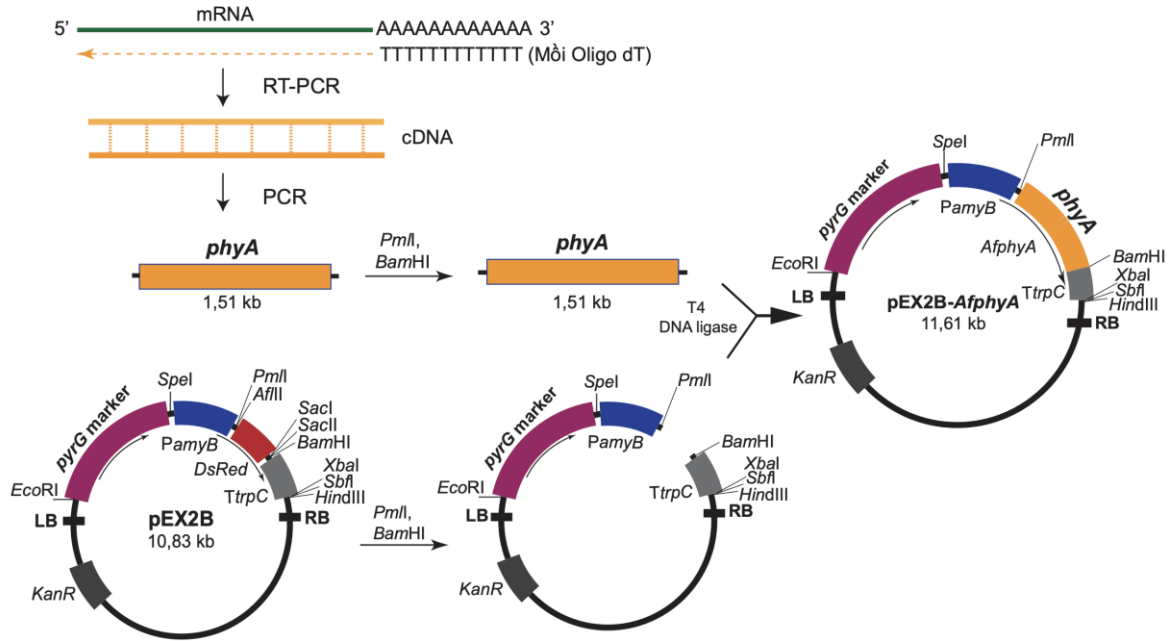
3.5.1. Tạo vector nhị thể mang cấu trúc biểu hiện gen *phyA* và chuyển thành công vào nấm sợi *A. oryzae* và *A. niger*

Một trong số các ứng dụng công nghiệp được phát triển gần đây nhất đối với enzyme là bổ sung enzyme vào thức ăn chăn nuôi. Các enzyme chọn lọc được thêm vào thức ăn có thể mang lại hiệu quả xúc tác mong muốn đối với sự tiêu hoá của vật nuôi. Hiện nay, khoảng 70% thức ăn cho động vật có chứa phytase như một chất phụ gia. Để ứng dụng trong ngành thức ăn chăn nuôi, phytase phải có hoạt tính đặc hiệu cao ở pH dạ dày, tính đặc hiệu của chất nền, khả năng chống lại sự phân giải protein bởi các proteinase tiêu hóa và tính ổn định trong quá trình bảo quản, đóng viên. Hơn

nữa, khả năng ổn định ở nhiệt độ cao là một yêu cầu quan trọng khác vì quá trình tạo viên thức ăn xảy ra ở nhiệt độ khoảng 65–90°C trong 30–60 giây. Nhu cầu cao đối với enzyme này đã thúc đẩy các nghiên cứu nhằm đạt được phytase với tỷ lệ thủy phân axit phytic cao hơn và với khả năng chịu nhiệt tăng lên [116]. Mặc dù một số gen mã hóa cho sinh tổng hợp enzyme phytase đã được phân lập từ nhiều nguồn khác nhau nhưng chỉ có phytase từ một vài nguồn trong số đó được sử dụng rộng rãi trong ngành công nghiệp vì sự không ổn định và chi phí của enzyme. Enzyme phytase của *A. fumigatus* có khả năng phục hồi hoạt tính sau khi xử lý nhiệt trong khi nhiều enzyme phytase thường bị bất hoạt trong quá trình ép viên sản xuất thức ăn chăn nuôi [120]. Tuy nhiên, việc sản xuất enzyme trực tiếp từ nấm sợi *A. fumigatus* không đảm bảo an toàn do loài nấm này gây bệnh cơ hội cho con người. Vì vậy, nhiều chiến lược khác nhau dựa trên kỹ thuật di truyền đã được áp dụng để tạo ra các chủng nấm tái tổ hợp có khả năng sinh tổng hợp lượng lớn enzyme phục vụ cho sản xuất ở quy mô công nghiệp.

Trình tự mã hóa của gen *phyA* từ nấm *A. fumigatus* gây bệnh cơ hội ở người được khuếch đại từ DNA bổ sung và gắn vào vector nhệ thể pEX2B để chuyển sang nấm sợi *A. niger* và *A. oryzae*. Vector pEX2B được loại bỏ gen *DsRed* và thay thế bằng trình tự mã hóa của gen *phyA*. Sự biểu hiện của gen *phyA* được điều hòa bởi promoter cảm ứng mạnh là *amyB* (Hình 3.33).

Ở nấm sợi *Aspergillus*, 2 promoter cảm ứng được sử dụng phổ biến nhất là *alcA* từ *A. nidulans* và *amyB* từ *A. oryzae*. Promoter cảm ứng maltose của gen Taka-amylase A (*amyB*) thường được sử dụng để biểu hiện tái tổ hợp. Promoter *amyB* đã được chứng minh là một trong số các promoter hiệu quả cho biểu hiện protein. Các sản phẩm tái tổ hợp được biểu hiện dưới sự điều hòa của promoter *amyB* bao gồm: indole-diterpene paxilline, asperipin-2a, ustiloxin B, multicopper oxidase [143]. Ở *A. oryzae*, khi biểu hiện gen mã hóa cho protein phát huỳnh quang đỏ DsRed dưới sự kiểm soát của promoter *amyB*, các thể chuyển gen cho tín hiệu huỳnh quang đỏ rất mạnh và có thể quan sát trực tiếp bằng mắt thường hệ sợi màu hồng ở một số thể chuyển gen [106].



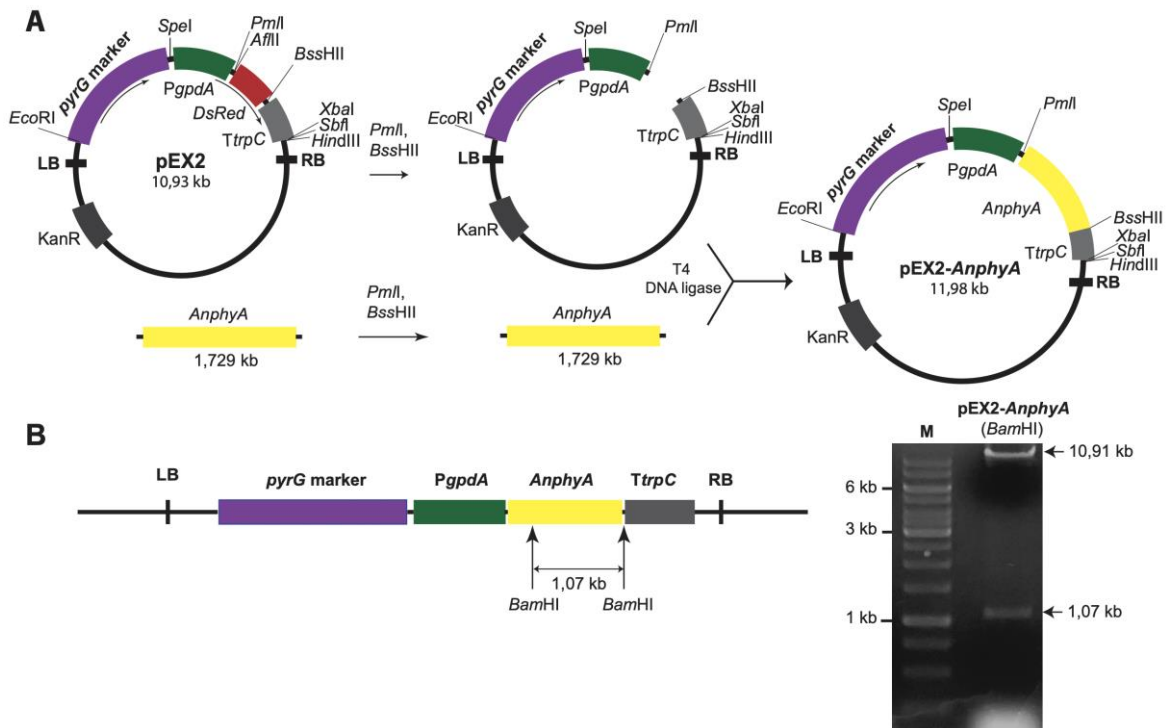
Hình 3.33. Sơ đồ tạo cấu trúc biểu hiện gen *phyA* từ *A. fumigatus*

Trình tự mã hóa của gen *phyA* từ *A. fumigatus* được khuếch đại từ mẫu cDNA nhờ PCR. Sản phẩm được xử lý với enzyme giới hạn *PmlI* và *BamHI* trước khi nối vào vị trí tương ứng trên vector nhệ thể *pEX2B* để tạo ra vector *pEX2B-AphyA*.

Bên cạnh đó, phytase bổ sung trong thức ăn chăn nuôi hiện được thương mại hoá chủ yếu xuất phát từ *A. niger* (3-phytase), *Peniophora lycii* và *E. coli* (6-phytase) [129]. Cấu trúc biểu hiện quá mức *phyA* từ *A. niger* được tạo tương tự với *pEX2B-AphyA*, trong đó, *pEX2* được lựa chọn làm vector khung; gen *phyA* của nấm *A. niger* được khuếch đại nhờ PCR với cặp mồi *AnphyA-orf-F/AnphyA-orf-R*. Quy trình tạo cấu trúc được thực hiện như Hình 3.34. Vector mới được đặt tên là *pEX2-AnphyA*. Vector *pEX2-AnphyA* chứa marker chọn lọc là gen *pyrG* từ nấm *A. oryzae*, gen *phyA* được biểu hiện dưới sự điều hoà của promoter mạnh *gpdA* từ nấm *A. nidulans*. Vector này tương thích cho chuyển gen ở các chủng nấm khuyết dưỡng uridine/uracil.

Việc chuyển gen *phyA* từ vector nhệ thể *pEX2B-AphyA* và *pEX2-AnphyA* vào các chủng nấm khuyết dưỡng uridine/uracil được thực hiện theo quy trình nhóm nghiên cứu đã phát triển và công bố trước đó [107]. Marker trợ dưỡng *pyrG* đã được chứng minh là hiệu quả cho chuyển gen vào *A. oryzae* sử dụng phương pháp chuyển gen thông qua vi khuẩn *Ag. tumefaciens*. Việc sử dụng các marker chọn lọc là gen

nội sinh *pyrG* để chuyển gen vào *A. oryzae* và *A. niger* sẽ giúp tạo ra chủng nấm chuyển gen không mang gen kháng kháng sinh.

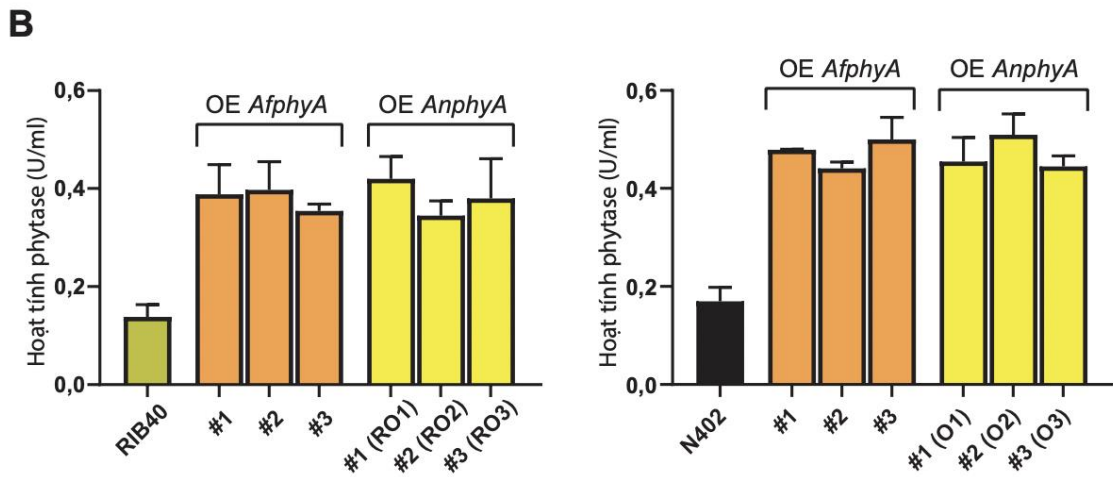
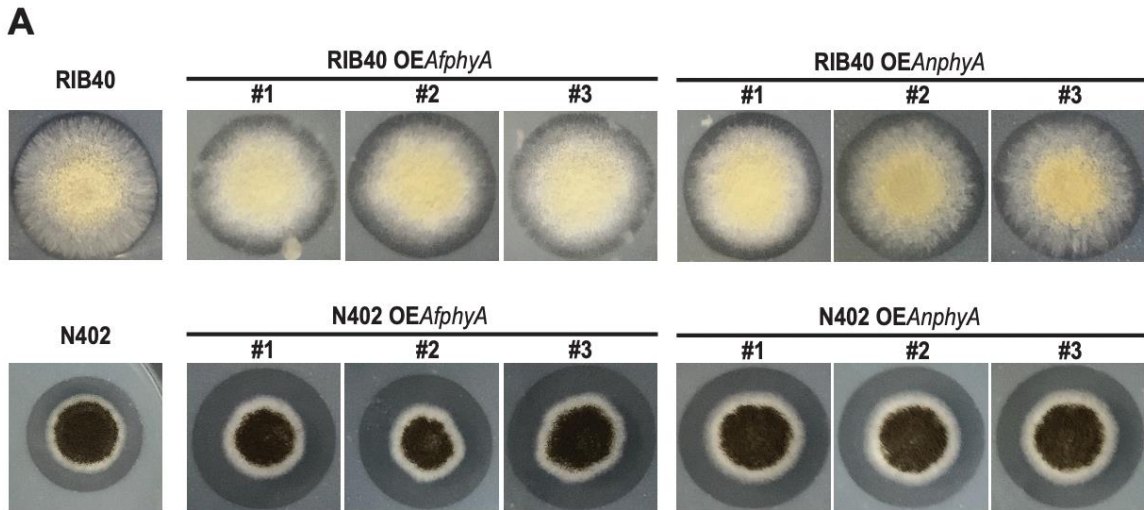


Hình 3.34. Sơ đồ tạo cấu trúc biểu hiện gen *phyA* từ *A. niger*

(A) Cấu trúc *pEX2-AnphyA* được tạo bằng cách thay thế phần trình tự gen *DsRed* trong vector *pEX2* bằng trình tự vùng ORF của gen *phyA* ở *A. niger* sử dụng enzyme giới hạn *PmlI* và *BssHIII*. (B) Xác nhận tạo thành công cấu trúc *pEX2-AnphyA* nhờ cắt kiểm tra với enzyme *BamHI*. M là DNA marker 1 kb (Thermo Fisher Scientific, Mỹ).

Nói chung, mức độ biểu hiện enzyme phytase có thể nói là rất thấp ở cả 2 chủng ban đầu là RIB40 và N402. Ở các chủng biểu hiện quá mức, hoạt tính enzyme phytase tăng 2-3 lần so với các chủng chưa can thiệp hệ gen (Hình 3.35). Do đó, với mục đích cuối cùng là sản xuất enzyme phytase thương mại với chi phí thấp, các quá trình cải biến di truyền và phát triển tái tổ hợp đã và đang được thiết kế. Các chiến lược như lên men trạng thái rắn và lên men chìm đã được lựa chọn là cách hứa hẹn cho sản xuất phytase từ nấm sợi [21]. Các hệ thống biểu hiện khác nhau cho phép sản

sinh ra lượng lớn cùng với sự gia tăng tính ổn định của phytase bằng cách biến đổi sau dịch mã phytase.

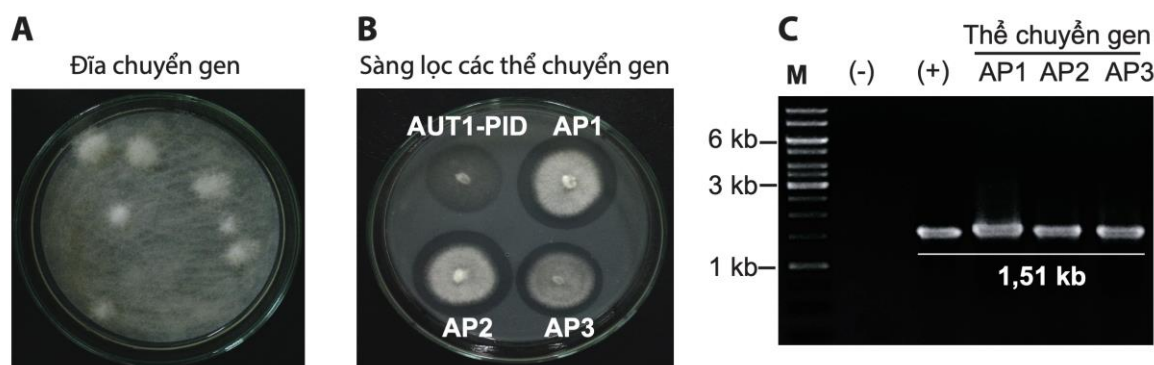


Hình 3.35. Kết quả biểu hiện tái tổ hợp *phyA* ở *A. oryzae* và *A. niger*

(A) Khả năng phân giải phytate ở các chủng chuyển gen so với các chủng ban đầu trên môi trường PSM. (B) Hoạt tính của một số chủng biểu hiện tái tổ hợp đại diện so sánh với các chủng gốc.

Ở nấm sợi *A. oryzae*, việc loại bỏ đồng thời 2 gen mã hoá cho proteinase (*tppA*, *pepE*) đã giúp cải thiện sản xuất tái tổ hợp lysozyme (HLY) có nguồn gốc từ người, mức sản xuất HLY cao hơn tới 2,6 lần so với chủng hoang dại. Hiệu quả sản xuất chymosin có nguồn gốc từ bò đã được tăng cường gấp 1,9-3,2 lần ở chủng *A. oryzae* bị loại bỏ gen *tppA* và *pepE* [161]. Mặc dù việc tăng cường sản xuất protein khác

nguồn với các chủng đột biến xoá kép (*tppA* và *pepE*) và xoá 5 gen (*tppA*, *pepE*, *nptB*, *dppIV* và *dppV*) làm gián đoạn gen mã hoá cho các protease ở *A. oryzae* đã được báo cáo, việc xoá thêm một loạt các gen như *alpA*, *pepA*, *AoepAa*, *AoepAd* và *cpI*, có thể cải thiện sản lượng của các protein khác nguồn [161]. Chủng đột biến xoá các gen này được đặt tên là AUT và được kỳ vọng là các vật chủ tốt để thu được lượng protein tái tổ hợp ở mức cao. AUT1-PID mang đột biến khuyết dưỡng *pyrG*, *niaD*, *sC* và các đột biến hỏng gen mã hoá cho protease là một trong số các chủng *A. oryzae* siêu sản xuất protein tái tổ hợp [169]. Chủng siêu sản xuất AUT1-PID này được lựa chọn là chủng nền cho biểu hiện quá mức enzyme phytase. Kết quả chuyển gen *phyA* vào chủng *A. oryzae* AUT1-PID thu được khoảng 5-7 thể chuyển gen/đĩa (Hình 3.36). Các thể chuyển gen *phyA* được cấy lên môi trường PSM (bổ sung 0,1% uridine, 0,1% uracil, 0,15% methionine) để sàng lọc các chủng có khả năng biểu hiện mạnh enzyme phytase. Vòng phân giải phytate càng lớn thì chủng nấm chuyển gen biểu hiện enzyme phytase càng mạnh. Chủng *A. oryzae* AUT1-PID được sử dụng làm đối chứng. Ba thể chuyển gen (AP1, AP2, AP3) với vòng phân giải phytate tốt nhất được lựa chọn tách DNA để kiểm tra sự có mặt của gen *phyA* nhờ PCR với cặp mồi đặc hiệu: AfphyA-F/AfphyA-R (Hình 3.36).



Hình 3.36. Kết quả chuyển gen *phyA* từ *A. fumigatus* vào *A. oryzae*

(A) Các thể chuyển gen mọc trên màng giấy lọc đặt trên môi trường M+Met (có bổ sung cefotaxime) sau 5 ngày ở 30°C. (B) Khả năng phân giải phytate của 3 chủng đại diện (AP1, AP2, AP3) trên môi trường PSM (bổ sung 0,1% uridine, 0,1% uracil, 0,15% methionine) sau 3 ngày ở 30°C. (C) Xác nhận sự có mặt của gen *phyA* trong hệ gen của *A. oryzae* nhờ PCR. M là DNA marker 1 kb (Thermo Fisher Scientific, Mỹ), (-) là đối chứng âm, (+) là đối chứng dương.

3.5.2. Xác định số bản sao gen *phyA* của các chủng chuyển gen và xác định hoạt tính enzyme phytase ở các chủng chuyển gen

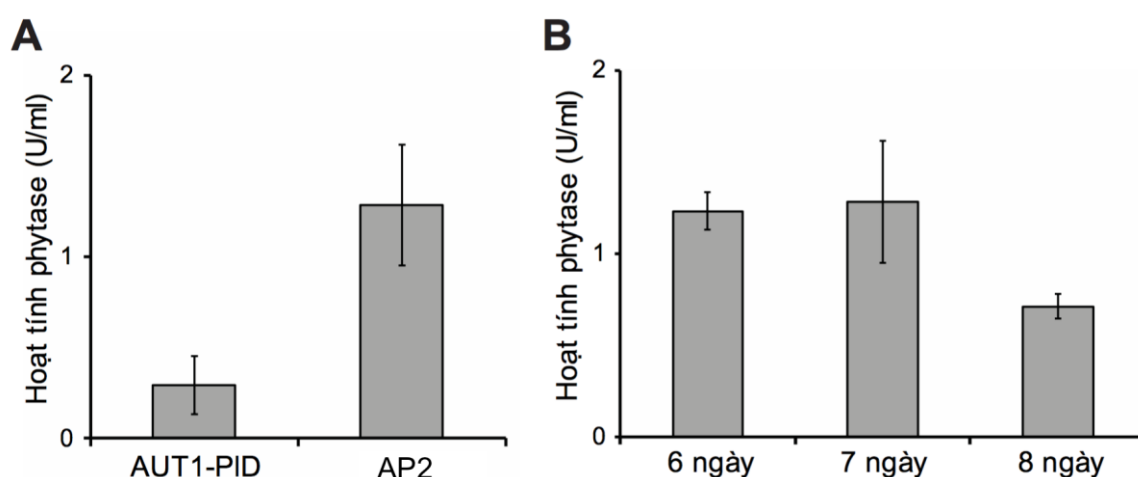
Do 2 gen *pyrG* và *phyA* luôn đi cùng nhau trong cấu trúc T-DNA được chuyển vào tế bào nấm nên việc xác định số bản sao của gen *phyA* chỉ cần dựa vào số bản sao của gen *pyrG*. Dựa trên cơ sở dữ liệu hệ gen của nấm sợi *A. oryzae* RIB40, gen *pyrG* chỉ có 1 bản sao duy nhất (accession number: AO090011000868) trên nhiễm sắc thể số 7. Do đó, chủng RIB40 được chọn làm đối chứng tham chiếu cho việc xác định số lượng bản sao của gen *phyA* ở các chủng chuyển gen (AP1, AP2, AP3). Cặp mồi *pyrG*-RT-F/*pyrG*-RT-R được thiết kế để khuếch đại một đoạn của gen *pyrG* với kích thước 196 bp. Kết quả phân tích real-time PCR với chỉ số Ct (cycle threshold) và quy đổi ra số bản sao gen *phyA* ở 3 chủng chuyển gen được trình bày trong Bảng 3.3.

Bảng 3.3. Kết quả xác định số bản sao quy đổi của một số chủng chuyển gen *phyA* ở *A. oryzae*

Chủng	Ct	Số bản sao quy đổi ($2^{-\Delta Ct}$)
AUT1-PID	-	0
RIB40	17,68	1
AP1	16,47	2
AP2	16,07	3
AP3	16,75	2

Mức độ biểu hiện một gen được chứng minh là phụ thuộc vào số bản sao mà gen đó được tích hợp vào hệ gen tế bào chủ [85]. Trong nghiên cứu này, chúng tôi thu được 3 thể chuyển gen đã tích hợp trong hệ gen từ 2 đến 3 bản sao cấu trúc biểu hiện gen *phyA*. Chủng AP2 có số lượng bản sao của gen *phyA* cao nhất (Bảng 3.3) và có hoạt tính phytase trên đĩa sàng lọc đủ tốt (Hình 3.36B) được chọn cho phân tích tiếp theo.

Dịch chiết enzyme thô được từ chủng *A. oryzae* AUT-PID (đối chứng) và chủng AP2 thu hồi từ môi trường nuôi cấy xốp được dùng cho khảo sát hoạt tính phytase. Môi trường nuôi cấy xốp được bổ sung 2% maltose làm nguồn cacbon duy nhất để cảm ứng hoạt động của promoter *amyB*. Chủng chuyển gen AP2 cho hoạt tính phytase cao gấp 4,3 lần so với chủng AUT1-PID (Hình 3.37A). Thời gian cần cho nuôi cấy chủng AP2 vào khoảng 6-7 ngày ở 30°C là phù hợp để thu được hoạt tính phytase cao nhất (Hình 3.37B).



Hình 3.37. Kết quả đánh giá hoạt tính phytase của *A. oryzae* AUT1-PID và AP2
 (A) Hoạt tính phytase của chủng AUT1-PID và chủng AP2 được so sánh trong môi trường nuôi cấy xốp sau 7 ngày ở 30°C. (B) Kết quả khảo sát số ngày nuôi cấy ở môi trường lên men xốp để thu enzyme đối với chủng AP2.

Tiềm năng sử dụng chủng chuyển gen mới tạo này trong ứng dụng công nghiệp là rất lớn. Tuy nhiên, phytase tái tổ hợp thu được từ các chủng này cần phải được phân tách với phytase do bản thân *A. oryzae* tiết ra mặc dù enzyme phytase được mã hóa bởi gen *phyA* từ *A. fumigatus* có thể phân biệt dễ dàng với phytase của *A. oryzae* về khả năng bền nhiệt khi xử lý ở nhiệt độ cao và khác biệt về trọng lượng phân tử [53, 103, 120]. Hơn nữa, các kỹ thuật di truyền hiện đại cũng cho phép thiết kế thêm cấu trúc mới cho gen *phyA* nhằm mang lại đặc tính nổi bật hoặc không có ở *A. oryzae*. Song, trong sản xuất công nghiệp, việc tìm kiếm các nguyên liệu rẻ hơn và dễ xử lý hơn là một trong những ưu tiên hàng đầu. Bên cạnh đó, promoter *amyB* là một

promoter biểu hiện mạnh nhưng chỉ thích hợp với các quy trình lên men rắn. Ngoài ra, promoter cảm ứng *alcA* từ *A. nidulans* và *amyB* từ *A. oryzae* có nhược điểm chung là sự biểu hiện gen bị kiểm soát bởi nguồn cacbon trong môi trường. Hình thái của nấm sợi, chẳng hạn như mật độ sợi nấm và tốc độ điều hòa, có thể dễ dàng thay đổi để đáp ứng với các chất dinh dưỡng, đặc biệt là các nguồn cacbon và nitơ (*A. nidulans* phát triển nhiều sợi nấm khí sinh trong môi trường có ethanol hơn trong môi trường glucose). Như vậy, thành phần của môi trường có thể gây ra những thay đổi không mong muốn và không thể đoán trước trong sinh lý tế bào. Do đó, việc sử dụng một promoter không phụ thuộc vào nguồn cacbon hoặc nitơ và có ảnh hưởng tối thiểu đến các điều kiện sinh lý sẽ có lợi cho các nghiên cứu biểu hiện gen [135].

Song song với cải biến di truyền, tối ưu hóa các điều kiện môi trường cũng là một phương pháp hữu ích để giảm sản xuất protease ở *A. niger*. Khi phát triển trên môi trường glucose và ure ở pH 8, sự phiên mã của *PepA* và *PepB* ở chủng *A. niger* N400 (CBS120.49) hầu như bị ức chế hoàn toàn [67]. Phân tích trình tự đã chỉ ra rằng các promoter của 2 protease chứa các vị trí liên kết *AreA*, các vị trí liên kết *CreA* và các vị trí điều hòa tiềm năng liên quan tới pH. Trên thực tế, loại bỏ *CreA* làm tăng quá trình phiên mã *PepA* và *PepB* khi glucose được sử dụng làm nguồn cacbon. Tất cả những liên kết này cho thấy vai trò quan trọng của quá trình ức chế chuyển hóa cacbon/nitơ và môi trường pH trong quá trình ức chế protease. Tuy nhiên, sử dụng nồng độ glucose cao, sự biểu hiện của protein được điều hòa bởi các promoter hydrolase phân giải tinh bột cũng sẽ bị ức chế do sự kìm hãm chất dị hóa cacbon [149]. Lựa chọn các promoter không bị ức chế bởi glucose, chẳng hạn như *gpdA*, *mbfA* và promoter dựa trên Tet-On, có thể giải quyết mâu thuẫn này. Chủng nấm tái tổ hợp *Penicillium griseoroseum* T73 biểu hiện *P. chrysogenum* CCT1273 phytase cho hoạt tính phytase tăng gấp 5,1 lần so với chủng tự nhiên bằng cách sử dụng promoter *gpdA* của *A. nidulans* [37]. Ngoài ra, cũng cần phải xem xét các điều kiện nuôi cấy khác như pH đối với sự phát triển của tế bào. Sản xuất protein hiệu quả ở *A. niger* cần đạt được bằng sự cân bằng tốt giữa sự phát triển của tế bào và sự ức chế protease. Chúng tôi đề xuất sử dụng một promoter mạnh phổ biến khác, biểu hiện liên

tục có nguồn gốc từ *A. nidulans* – *gpdA* để có thể thu được lượng lớn enzyme và biểu hiện quá mức *phyA* từ *A. niger* bởi chính *A. niger*.

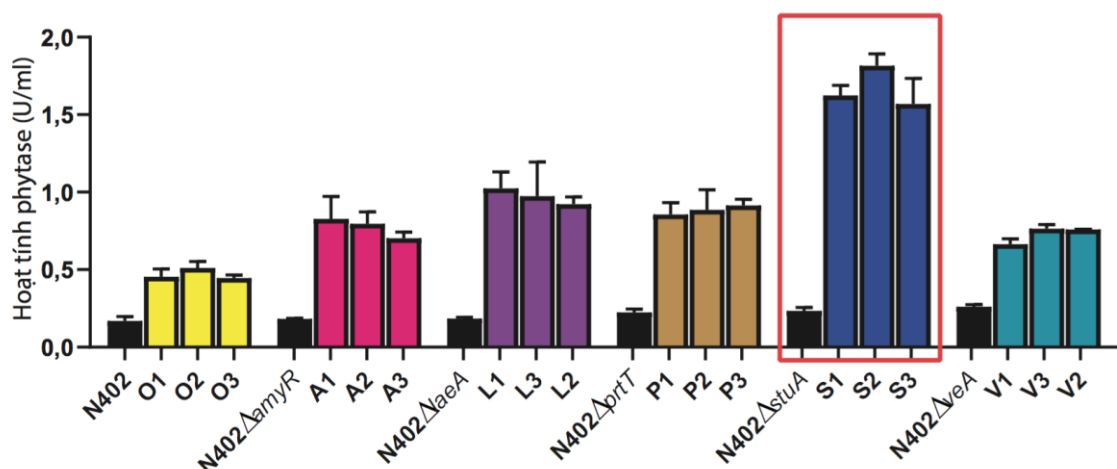
3.5.3. Áp dụng hệ thống chuyển gen mới để tuyển chọn các chủng nấm sợi *A. niger* đột biến phục vụ biểu hiện enzyme tái tổ hợp hiệu suất cao

Hiện nay, các chiến lược cải thiện sản xuất protein đã được đề xuất, bao gồm việc sử dụng các promoter mạnh, tăng số lượng bản sao gen và dung hợp gen, phương thức glycosyl hóa và các vấn đề liên quan đến quá trình xử lý trong lưới nội chất [105]. Việc nghiên cứu quá trình trao đổi chất có thể giúp cải thiện sản xuất protein tái tổ hợp. *A. niger* có thể biểu hiện xylanase, mannase và asparaginase tái tổ hợp ở mức độ cao, nhưng một số protein nền vẫn còn được tiết mạnh, chẳng hạn như α -amylase và α -glucosidase [162]. Tỷ lệ protein cần biểu hiện thấp hơn so với protein tổng số không chỉ hạn chế quá trình sản xuất protein đích mà còn làm cho độ tinh khiết của các sản phẩm lên men thấp, làm tăng chi phí tinh sạch protein cần biểu hiện. Do đó, một phương pháp khả thi có thể hiệu quả để giải quyết vấn đề này là chỉnh sửa các gen biểu hiện cao ở mức độ phiên mã và sau đó giảm số lượng của các protein tiết trong toàn bộ hệ thống biểu hiện [162].

Để biểu hiện tái tổ hợp phytase, các chủng N402 mang đột biến hỏng gen điều hoà và khuyết dưỡng uridine/uracil (Δ *pyrG*) sẽ được dùng làm nguyên liệu cho chuyển gen. Các thể chuyển gen sau khi được xác nhận có chứa marker *pyrG* từ *A. oryzae* với cặp môi *pyrG*-orf-F/*pyrG*-orf-R thành công được đặt tên lần lượt là O1, O2, O3 (đối với N402 biểu hiện quá mức *phyA*); A1, A2, A3 (đối với N402 Δ *amyR* biểu hiện quá mức *phyA*); L1, L2, L3 (đối với N402 Δ *laeA* biểu hiện quá mức *phyA*); P1, P2, P3 (đối với N402 Δ *priT* biểu hiện quá mức *phyA*); S1, S2, S3 (đối với N402 Δ *stuA* biểu hiện quá mức *phyA*); V1, V2, V3 (đối với N402 Δ *veA* biểu hiện quá mức *phyA*). Các chủng chuyển gen mới tạo được kiểm tra hoạt tính enzyme phytase thô theo quy trình của kit K-phytase (Megazyme, Ireland).

Kết quả định lượng hoạt tính cho thấy, các chủng đột biến hỏng gen điều hoà *amyR*, *laeA*, *priT*, *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 biểu

hiện quá mức *phyA* trên nền chủng xoá gen *stuA* cho hoạt tính cao hơn tới 6,6-8,5 lần (Hình 3.38).



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

Hoạt tính phytase (U/ml) của các chủng N402, N402ΔamyR, N402ΔaeA, N402ΔprtT, N402ΔstuA, N402ΔveA và các chủng chuyển gen biểu hiện quá mức *phyA* tương ứng được so sánh khi nuôi lắc trong môi trường PSM lỏng sau 3 ngày ở 30°C.

Cụ thể, chủng đột biến xoá gen *amyR* và biểu hiện quá mức *phyA* cho hoạt tính cao gấp 3,72-5,13 lần so với chủng nền. Dữ liệu transcriptome cho thấy mức phiên mã của enzyme amylolytic, glucoamylase, glucosidase và amylase đã giảm rõ rệt trong chủng xoá gen *amyR* [162]. Do amylase và glucosidase là những enzyme được tiết với số lượng lớn ở cả *A. niger* và *A. oryzae*, sự giảm biểu hiện của các enzyme này giúp giảm chi phí cho quá trình tinh chế protein tái tổ hợp cần biểu hiện và tạo điều kiện thuận lợi để chủng đột biến hỏng gen *amyR* trở thành một trong những chủng nền tiềm năng nhất. Hơn nữa, số lượng protein tiết đã giảm đáng kể ở chủng xoá gen *amyR*. Cùng với sự giảm tổng lượng protein tiết ra, một số các gen vận chuyển đường cũng bị giảm điều hòa và mức độ biểu hiện protease cũng giảm [162]. So với chủng hoang dại, hoạt động của protease thấp hơn từ 2 đến 10 lần ở chủng xoá gen *amyR* [162]. Như vậy, không chỉ chủng xoá gen *amyR* ở *A. niger* mà còn cả ở *A.*

oryzae đều có thể được khai thác là chủng nền tốt cho biểu hiện nhiều loại protein tái tổ hợp khác nhau.

Ngoài ra, pH môi trường cũng là yếu tố quan trọng ảnh hưởng đến sự biểu hiện của các enzyme ngoại bào. Ở pH 4,0 và thấp hơn, hoạt tính của protease cao. Hoạt tính protease giảm ở pH 5,0 và giảm hơn nữa ở pH 6,0 [27]. Các gen mã hóa các protease ngoại bào chính là *pepA* và *pepB* được tạo ra trong điều kiện axit [147]. Các chủng L1, L2, L3 cho hoạt tính enzyme phytase cao gấp 5,42-6,27 lần so với chủng ban đầu. Chủng đột biến xóa gen *laeA* ở *A. niger* cũng thích hợp để biểu hiện tái tổ hợp các protein ưa pH trung tính. Ngoài ra, hai hợp chất BMS-192548 và aspernigrin A được tạo ra với số lượng cao hơn nhiều ở các chủng đột biến *laeA* so với các chủng hoang dại, cho thấy rằng *laeA* có chức năng kìm hãm sự biểu hiện của các gen liên quan đến việc sản xuất các chất chuyển hóa thứ cấp [111]. Ba hợp chất asperrubrol, atromentin và JBIR86 yêu cầu sự có mặt của protein LaeA, cho thấy rằng LaeA tham gia vào việc kích hoạt biểu hiện của các cụm gen chịu trách nhiệm tổng hợp các hợp chất này [111]. Ở *A. oryzae*, người ta đã chỉ ra rằng việc loại bỏ *laeA* dẫn đến mất khả năng sản xuất axit kojic [115]. Cụm gen có khả năng tham gia vào quá trình tổng hợp sản xuất axit kojic (AO09113000136, oxidoreductase phụ thuộc FDA; AO09113000137, yếu tố phiên mã; và AO09113000138, protein vận chuyển) bị giảm điều hòa nghiêm trọng ở chủng đột biến xóa gen *laeA* ở *A. oryzae* [115]. Biểu hiện *phyA* ở *A. oryzae* với chủng nền là chủng đột biến xóa gen *laeA* cũng cho hoạt tính khá tốt. Cụ thể, các chủng biểu hiện quá mức cho hoạt tính cao hơn 3,48-4,59 lần so với chủng RIB40 ban đầu (Hình 3.40).

Cũng giống như *laeA*, bên cạnh việc điều hòa sự phân hóa hình thái, *veA* còn điều hòa chuyển hóa thứ cấp. Ví dụ: *veA* kích hoạt sản xuất một số chất chuyển hóa thứ cấp, bao gồm rilatocystin và penicilin ở *A. nidulans* và *P. chrysogenum*, aflatoxin ở *A. parasiticus*, axit cyclopiazonic, aflatrem và aflatoxin ở *A. flavus*, cephalosporin C ở *A. chrysogenum*, fumonisin và fusarin ở *F. verticillioides*, gibberellin, bikaverin, fusarin C ở *F. fujikuroi*, melanin trong *Mycosphaerella graminicola* và *B. cinerea*, deoxynivalenol trong *F. graminearum*, alternariol và alternariol monomethyl ete ở *A. alterta* [46]. Hỏng gen *veA* ở *A. niger* gần như loại bỏ việc sản xuất OT β , OT α , và

OTA 3-9, trong khi các hợp chất này có mặt trong chủng hoang dại trong cả điều kiện ánh sáng và bóng tối. Hơn nữa, mức độ biểu hiện pks đã giảm mạnh ở chủng ΔveA bằng phân tích real-time PCR, song song với sự thiếu hụt trong sản xuất OTA ở chủng ΔveA [163]. Như vậy, các chủng đột biến xóa gen *laeA* và *veA* góp phần tạo ra các chủng nền “sạch” cho biểu hiện protein tái tổ hợp: giảm sinh tổng hợp các chất chuyển hóa thứ cấp bao gồm kháng sinh và độc tố.

Tương tự với *LaeA* và *VeA*, các yếu tố điều hoà khác cũng liên quan chặt chẽ tới quá trình sản xuất các chất chuyển hóa thứ cấp. Ở *A. fumigatus*, sự biểu hiện của 6 cụm gen chuyển hóa thứ cấp khác nhau liên quan tới quá trình tổng hợp fumitremorgen, pseurotin A và một loại chất chuyển hóa chưa biết tên phụ thuộc vào *StuAp* [146]. Nhìn chung, *StuA* được đánh giá là yếu tố điều hoà chính của quá trình điều hoà và chuyển hóa ở *A. fumigatus* và *A. flavus* [35]. Biểu hiện tái tổ hợp *phyA* trên nền đột biến xóa gen *stuA* đã cho các chủng có khả năng biểu hiện tốt hơn 6,6-8,5 lần so với chủng ban đầu.

Yếu tố phiên mã đặc hiệu với protease, *PrtT* kiểm soát sự biểu hiện của một số gen mã hóa protease chính. Theo van den Hombergh và cộng sự, các protease axit PEPA và PEPB lần lượt chiếm 84 và 6% hoạt động phân giải protein ngoại bào của *A. niger* [147]. Hồng gen *prtT* ở *A. niger* dẫn đến giảm sự biểu hiện 4 protease (*pepA*, *pepB*, *pepD* và *pepF*). Ở *A. oryzae*, protease serine kiềm (*AlpA*) và metalloprotease trung tính M36 (*Np1*) được biểu hiện ở mức thấp hơn trong chủng đột biến *prtR* so với chủng hoang dại [128]. Xóa *prtT* là cách đơn giản hơn và cách hiệu quả hơn để giảm tác dụng của protease trên các protein khác nguồn. Chủng $N402\Delta prtT$ cũng tương tự với chủng *A. niger* D15, vừa chứa đột biến trong gen điều hoà *prtT*, sản xuất rất ít protease ura axit mà còn là chủng đột biến không có sự biến đổi về kiểu hình [128]. Do đó, đây là chủng rất được ưa thích trong sản xuất protein tái tổ hợp [111].

Bên cạnh việc sử dụng các thể đột biến thiếu protease, giảm mức độ protease tự nhiên cũng có thể được thực hiện bằng cách áp dụng các chiến lược thao tác tăng trưởng khác nhau, bao gồm cả hình thái học cũng như tối ưu hóa thành phần và quy trình lên men [27]. Tuy nhiên, việc lựa chọn các điều kiện nuôi cấy để giảm hoạt động của protease không đơn giản vì một số yếu tố liên quan có mối quan hệ với nhau và

có thể có tác dụng đối kháng hoặc hiệp đồng không mong muốn [27]. Mặc dù có thể khắc phục sự phân giải protein của các protein khác nguồn trong quá trình bảo quản bằng cách thêm các loại hỗn hợp enzyme ức chế protease để cải thiện độ ổn định của protein, tuy nhiên, chiến lược này tốn kém và không có lợi về mặt kinh tế đối với sản xuất quy mô lớn [125]. Do đó, việc sử dụng chủng đột biến *pvtT* có hoạt tính protease ngoại bào thấp làm vật chủ để tạo ra các protein tái tổ hợp có thể là một cách thay thế so với việc sử dụng các chất ức chế protease trong việc giảm thiểu sự phân hủy và kéo dài thời gian sử dụng của các protein tái tổ hợp trong quá trình bảo quản.

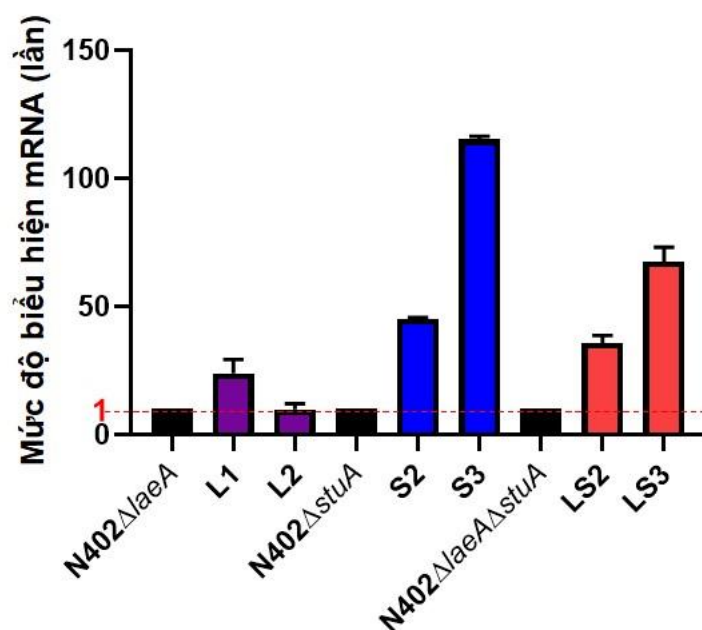
Ngoài ra, số lượng bản sao gen *phyA* được tích hợp vào hệ gen nấm cũng có vai trò quan trọng trong sự biểu hiện enzyme phytase. Thông thường, khi số bản sao được tích hợp vào hệ gen càng cao (dưới 10 bản sao) thì khả năng biểu hiện gen được tích hợp càng tốt [50]. Trong nghiên cứu này, phương pháp real-time PCR đã được sử dụng để đánh giá số lượng bản sao của một số thể chuyển gen có đặc tính tốt (Bảng 3.4). Các chủng S1, S2, S3 cho hoạt tính cao hơn 6,6-8,5 lần so với chủng nền đều là các chủng được tích hợp 5-7 bản sao vào hệ gen nấm.

Bảng 3.4. Kết quả xác định số bản sao quy đổi của một số chủng chuyển gen *phyA* ở *A. niger*

Chủng nấm	Giá trị Ct	Số bản sao (quy đổi)	Số bản sao (làm tròn)
N402	12,31	1	1
O1	11,55	1,69	2
O2	11,07	2,36	2
O3	9,73	6,00	6
N402 Δ <i>laeA</i>	12,30	1	1
L1	10,75	2,9	3
L2	11,26	2,05	2
L3	11,38	1,89	2

Chủng nấm	Giá trị Ct	Số bản sao (quy đổi)	Số bản sao (làm tròn)
N402 Δ <i>prtT</i>	12,02	1	1
P1	10,09	3,81	4
P2	10,30	3,29	3
P3	10,01	4,02	4
N402 Δ <i>stuA</i>	12,62	1	1
S1	10,32	4,92	5
S2	10,14	5,58	6
S3	9,82	6,96	7

Bên cạnh đó, mức độ biểu hiện gen *phyA* ở một số chủng cũng được đánh giá thông qua real-time PCR. Real-time PCR đã được sử dụng phổ biến trong so sánh mức độ biểu hiện gen. Trong quá trình định lượng tương đối, những thay đổi trong biểu hiện gen được đo dựa trên các mẫu tham chiếu. Các gen được cho là có biểu hiện ổn định thường được sử dụng làm gen tham chiếu. Gen *cox5* biểu hiện liên tục ở *A. niger* được sử dụng làm gen tham chiếu để đánh giá mức độ biểu hiện của gen *phyA*. Hiện nay, có rất nhiều mô hình toán học đã có sẵn cho tính toán và quy đổi mức độ biểu hiện gen trung bình. Trong đó, phương pháp so sánh Ct đã được chứng minh là rất hữu ích khi tiến hành thử nghiệm với một số lượng lớn mẫu. Mức độ biểu hiện của gen *phyA* ở các chủng khảo sát được đánh giá thông qua so sánh Ct [87]. Với các chủng được tích hợp nhiều bản sao và có hoạt tính enzyme phytase tốt, mức độ biểu hiện mRNA tăng 20-116 lần so với chủng nền. Đặc biệt, ở chủng S3, với 7 bản sao của gen *phyA* được tích hợp trong hệ gen, mức độ biểu hiện RNA thông tin đã tăng 114,56-116,16 lần so với chủng N402 Δ *stuA* tham chiếu (Hình 3.39).



Hình 3.39. Mức độ biểu hiện gen *phyA* ở *A. niger* được đánh giá nhờ real-time PCR.

Mức độ biểu hiện mRNA của gen *phyA* ở *A. niger* N402ΔlaeA, N402ΔstuA, N402ΔstuAΔlaeA và một số chủng biểu hiện quá mức gen *phyA* tương ứng được phân tích thông qua so sánh với gen tham chiếu *cox5*.

Mặc dù mức độ biểu hiện RNA thông tin có mối tương quan với sự biểu hiện protein, các quá trình biến đổi sau dịch mã như glycosyl hóa, chuyển vị, đóng gói và cuộn gập protein, sự phân hủy protein ngoại lai đóng vai trò quan trọng trong sản lượng protein tiết.

Hơn nữa, 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 [32]. Hình thái học có thể ảnh hưởng đến độ nhớt của môi trường nuôi cấy, năng suất, sự khuếch tán cơ chất và quá trình dị hóa. *A. niger* CICC2462 là chủng được sử dụng trong công nghiệp sản xuất glucoamylase. Đây là một đột biến hình thái của *A. niger* không tạo bào tử, có sợi nấm ngắn, dày, ít làm nhớt môi trường trong quá trình lên men [162]. Chủng này sản xuất enzyme mạnh, có mức độ hoạt động protease thấp, khả năng đáp ứng với các yếu tố stress thẩm thấu tốt và phù hợp

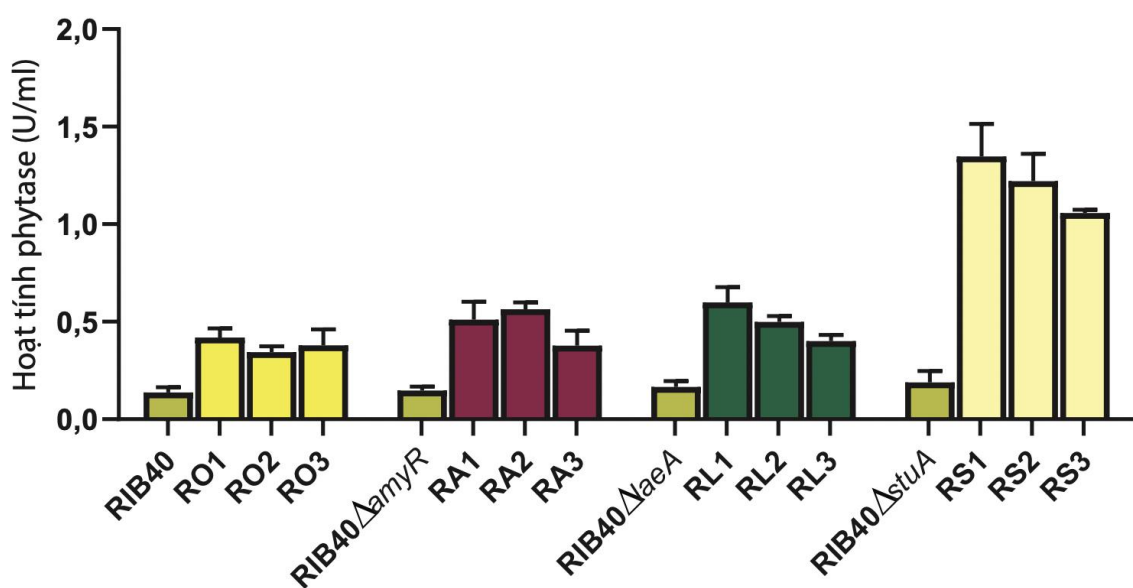
với mật độ cao các thành phần lên men lỏng và lên men chìm [162]. Biểu hiện quá mức *phyA* trên các chủng nên là đột biến xoá gen *stuA* ở *A. niger* đã giúp tăng hiệu quả biểu hiện lên tới 8,5 lần. Cho đến nay, sự biểu hiện gen *A. niger phyA* đã được chứng minh bằng cách sử dụng một số vật chủ bao gồm *S. cerevisiae*, *P. pastoris* và *A. niger* [148].

phyA từ *A. niger* cũng được biểu hiện tái tổ hợp trên *E. coli* dưới sự điều hoà của promoter T7-*lac*, tuy nhiên, phytase tái tổ hợp này chỉ ổn định trong khoảng 55 – 60°C, ở nhiệt độ cao hơn enzyme này không hoạt động. Bên cạnh đó, phytase tái tổ hợp được biểu hiện ở *E. coli* không được glycosyl hoá, cuộn gập không hoàn chỉnh và thiếu quá trình biến đổi sau dịch mã. Mặc dù enzyme này vẫn giữ được hoạt tính xúc tác và hầu hết các tính chất động học vẫn tương tự với phytase ở *A. niger* nhưng đường cong hoạt tính pH của phytase tái tổ hợp có cực đại là ở pH 5,1; trong khi phytase của *A. niger* có cực đại sơ cấp ở pH 5,5 và cực đại thứ cấp ở pH 2,2. Có thể việc thiếu quá trình glycosyl hoá và không biến đổi sau dịch mã là nguyên nhân chính làm giảm khả năng chịu nhiệt và sự ổn định pH của phytase tái tổ hợp. Do đó, việc biểu hiện *phyA* từ *A. niger* ở *E. coli* chỉ được dùng làm mô hình nghiên cứu để tăng cường các đặc tính lý hoá của enzyme [124]. Vi khuẩn được cho là lựa chọn cuối cùng để biểu hiện phytase của nấm sợi do sự hiện diện của các codon hiếm, sự hình thành thể vùi và không có quá trình biến đổi sau dịch mã ở vi khuẩn.

Biểu hiện quá mức *phyA* có nguồn gốc *A. niger* ở nấm men *P. pastoris* cho các kết quả khả quan khi enzyme tái tổ hợp có tính bền nhiệt khá tốt. Enzyme phytase từ *A. niger* có thể giữ được 70% hoạt tính khi xử lý ở 90°C trong 5 phút và 65% hoạt tính khi thời gian xử lý ở 90°C lên tới 30 phút. Tuy nhiên, việc thu hồi enzyme khá khó khăn khi cần phải sử dụng môi trường phức hợp BMMY có chứa methanol để cảm ứng và giúp tiết phytase dưới dạng ngoại bào [167]. Các nghiên cứu biểu hiện quá mức gen *phyA* mà không gây đột biến gen nào khác ở *A. niger* cũng đã được thực hiện. Trong điều kiện môi trường nuôi cấy bình thường, hoạt tính của dịch enzyme thô thu từ chủng đột biến quá mức có tăng so với chủng tự nhiên nhưng không có sự khác biệt quá lớn. Cụ thể, khi nuôi cấy trong môi trường có pH là 5, hoạt tính của enzyme phytase thu được chỉ cao hơn 4 lần so với chủng gốc và khi nuôi cấy ở môi

trường có pH đạt 2,5 thì hoạt tính của enzyme phytase thu được cao hơn gấp 6 lần so với chủng gốc [148]. 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*, *prtT*, *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.

Hiện nay, sản lượng enzyme thu được đã tăng gấp nhiều lần khi sử dụng *A. awamori*, *A. oryzae* và *Trichoderma* làm vật chủ [130]. Sử dụng cấu trúc pEX2-*AnphyA* để biểu hiện tái tổ hợp phytase từ *A. niger* ở *A. oryzae*, hoạt tính enzyme phytase thu được cũng rất triển vọng. Đặc biệt, chủng RIB40 Δ *stuA* biểu hiện quá mức *phyA* (RS1, RS2, RS3) cho hoạt tính enzyme phytase cao gấp 6,71-12,21 lần so với chủng hoang dại RIB40 (Hình 3.40).

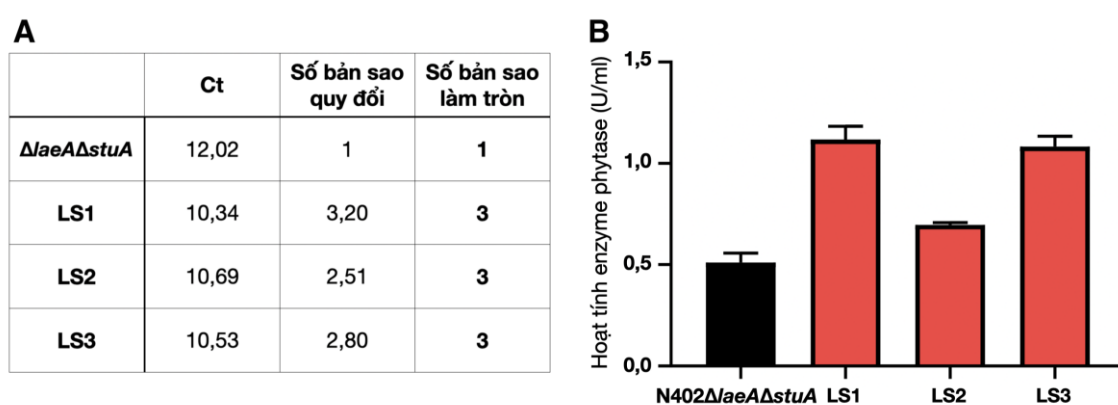


Hình 3.40. Hoạt tính phytase của các chủng biểu hiện quá mức *phyA* từ *A. niger* ở *A. oryzae* RIB40.

Hoạt tính phytase (U/ml) của các chủng RIB40, RIB40 Δ *amyR*, RIB40 Δ *laeA*, RIB40 Δ *stuA* và các chủng chuyển gen biểu hiện tái tổ hợp *phyA* từ *A. niger* tương ứng được so sánh khi nuôi cấy trong môi trường PSM lỏng sau 3 ngày ở 30°C.

A. oryzae cũng đã được sử dụng làm vật chủ để sản xuất nhiều loại chất chuyển hóa thứ cấp của nấm, ví dụ như axit cyclopiazonic và 1,3,6,8-tetrahydroxynaphthalene, chủ yếu là do *A. oryzae* hiếm khi tạo ra các chất chuyển hóa thứ cấp và có thể dễ dàng loại bỏ các gen mã hoá cho các chất chuyển hoá thứ cấp do *A. oryzae* sinh ra để tránh gây nhiễu sản phẩm trong quá trình sản xuất. Nhiều loại terpen từ nấm đảm đã được sản xuất thành công ở *A. oryzae* bằng cách biểu hiện tái tổ hợp các gen sinh tổng hợp tương ứng [104].

Mặc dù sử dụng các chủng nền là chủng đột biến xoá đơn gen đều cho các kết quả ban đầu khá tốt, tuy nhiên, chúng tôi khuyến nghị không sử dụng chủng đột biến xoá kép gen điều hoà làm chủng nền cho biểu hiện tái tổ hợp. Sử dụng hệ thống mới phát triển và phương pháp tái sử dụng marker chọn lọc *pyrG*, chúng tôi đã tạo được chủng đột biến khuyết dưỡng $N402\Delta laeA\Delta stuA\Delta pyrG$ sẵn sàng cho các thí nghiệm xoá gen và biểu hiện gen tiếp theo (Phụ lục 34). Tuy nhiên, khi biểu hiện quá mức *phyA* trên nền chủng đột biến xoá kép $N402\Delta laeA\Delta stuA$, hoạt tính enzyme thu được ở các chủng được chèn thêm 2 bản sao gen *phyA* không đạt được hiệu quả như mong đợi, hoạt tính của các chủng biểu hiện quá mức này chỉ cao hơn 1,44-2,44 lần so với chủng nền (Hình 3.41). Ngoài ra, tác động hiệp đồng của một số nhân tố điều hoà *stuA* với *amyR*, *laeA*, *pvtT* ở cả *A. oryzae* và *A. niger* đều làm giảm nghiêm trọng khả năng sinh trưởng của các chủng đột biến, do đó, không thích hợp để khai thác trong các quy trình công nghiệp (Phụ lục 27-31).



Hình 3.41. Kết quả xác định số bản sao gen *phyA* ở các chủng biểu hiện quá mức trên nền đột biến $N402\Delta laeA\Delta stuA$ nhờ real-time PCR (A) và định lượng enzyme phytase tiết ra môi trường nuôi cấy của các chủng chuyển gen (B).

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/histidine).
- 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 xoá 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 xoá 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 xoá 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.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Tiếng Việt

1. Đỗ Thị Bình Xuân Lộc, Trần Văn Tuấn (2017), "Xác định đặc điểm sinh học và bước đầu nghiên cứu chuyển gen vào chủng nấm mốc *Aspergillus niger* TL8 phân lập được tại Việt Nam", *Tạp chí Khoa học ĐHQGHN: Khoa học Tự nhiên và Công nghệ* Tập 33(2S), tr. 8-13.
2. Nguyễn Thị Khuyến, Võ Thị Hạnh, Phạm Thị Hiền, Mai Đàm Linh, Trần Đức Long, Trần Thị Thùy Anh, Trịnh Tất Cường, Trần Văn Tuấn (2015), "Cải tiến phương pháp tách chiết ADN từ nấm sợi phục vụ chẩn đoán phân tử phân biệt *Aspergillus oryzae* và *Aspergillus flavus*", *Tạp chí Khoa học ĐHQGHN: Khoa học Tự nhiên và Công nghệ* Tập 31, tr. 167-179.

Tiếng Anh

3. Abdel-Rahim, A. M., Arbab, H. A. (1985), "Factors affecting spore germination in *Aspergillus niger*", *Mycopathologia* Vol. 89, pp. 75-79.
4. Abe, K., Gomi, K., Hasegawa, F., Machida, M. (2006), "Impact of *Aspergillus oryzae* genomics on industrial production of metabolites", *Mycopathologia* Vol. 162, pp. 143-153.
5. Adams, T., Boylan, M. T., Timberlake, W. E. (1998), "*brlA* is necessary and sufficient to direct conidiophore development in *Aspergillus nidulans* ", *Cell* Vol. 54, pp. 353-362.
6. Alberts, A. W. (1998), "Discovery, biochemistry and biology of lovastatin", *American Journal of Cardiology* Vol. 62, pp. 10J-15J.
7. Andersen, M. R., Salazar, M. P., Schaap, P. J., van de Vondervoort, P. J., Culley, D., Thykaer, J., Frisvad, J. C., Nielsen, K. F., Albang, R., Albermann, K., *et al.* (2011), "Comparative genomics of citric-acid-producing *Aspergillus niger* ATCC 1015 versus enzyme-producing CBS 513.88", *Genome Research* Vol. 21, pp. 885-897.
8. Andrianopoulos, A., Timberlake, W. E. (1994), "The *Aspergillus nidulans abaA* gene encodes a transcriptional activator that acts as a genetic switch to control development", *Molecular and Cellular Biology* Vol. 14, pp. 2503-2515.
9. Archer, D. B., Dyer, P. S. (2004), "From genomics to post-genomics in *Aspergillus*", *Current Opinion in Microbiology* Vol. 7, pp. 499-504.

10. Arentshorst, M., Lagendijk, E. L., Ram, A. F. (2015), "A new vector for efficient gene targeting to the *pyrG* locus in *Aspergillus niger*", *Fungal Biology and Biotechnology* Vol. 2, 2.
11. Arentshorst, M., Ram, A. F. J., Meyer, V. (2012), "Using Non-homologous End-Joining-Deficient Strains for Functional Gene Analyses in Filamentous Fungi", *Plant Pathogens: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology* Vol. 835, pp. 133-150.
12. Bahler, J., Wu, J. Q., Longtine, M. S., Shah, N. G., McKenzie, A., Steever, A. B., Wach, A., Philippsen, P., Pringle, J. R. (1998), "Heterologous modules for efficient and versatile PCR-based gene targeting in *Schizosaccharomyces pombe*", *Yeast* Vol. 14, pp. 943-951.
13. Baker, S. E., Thykaer, J., Adney, W. S., Brettin, T. S. , Brockman, F. J., D'Haeseleer, P., Martinez, A. D., Miller, R. M., Rokhsar, D. S., Schadt, C. W., *et al.* (2008), "Fungal genome sequencing and bioenergy", *Fungal Biology Reviews* Vol. 22, pp. 1-5.
14. Barbesgaard, P., Heldt-Hansen, H. P., Diderichsen, B. (1992), "On the safety of *Aspergillus oryzae*: a review", *Applied Microbiology and Biotechnology* Vol. 36, pp. 569-572.
15. Bayram, O., Braus, G. H. (2012), "Coordination of secondary metabolism and development in fungi: the velvet family of regulatory proteins", *FEMS Microbiology Reviews* Vol. 36, pp. 1-24.
16. Bennett, J. W. (2010), "An Overview of the Genus *Aspergillus*", *Aspergillus: Molecular Biology and Genomics, Caister Academic Press, Portland*, pp. 1-17.
17. Bergkessel, M., Guthrie, C. (2013), "Colony PCR", *Methods in Enzymology* Vol. 529, pp. 299-309.
18. Binh, C. T., Thai, H-D., Ha, B. T. V., Tran, V-T. (2021), "Establishment of a new and efficient *Agrobacterium*-mediated transformation system in the nematocidal fungus *Purpureocillium lilacinum*", *Microbiology Research* Vol. 249, 126773.
19. Bird, D., Bradshaw, R. (1997), "Gene targeting is locus dependent in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*", *Molecular and General Genetics* Vol. 255, pp. 219-225.

20. Blumhoff, M., Steiger, M. G., Marx, H., Mattanovich, D., Sauer, M. (2013), "Six novel constitutive promoters for metabolic engineering of *Aspergillus niger*", *Applied Microbiology and Biotechnology* Vol. 97(1), pp. 259-267.
21. Bogar, B., Szakacs, G., Pandey, A., Sabu, A., Tengerdy, R. P. (2003), "Production of phytase by *Mucor racemosus* in solid state fermentation", *Biotechnololgy Progress* Vol. 19, pp. 312-319.
22. Bohle, K., Jungebloud, A., Gocke, Y., Dalpiaz, A., Cordes, C., Horn, H., Hempel, D. C. (2007), "Selection of reference genes for normalisation of specific gene quantification data of *Aspergillus niger*", *Journal of Biotechnology* Vol. 132, pp. 353-358.
23. Bok, J. W., Balajee, S .A., Marr, K. A., Andes, D., Nielsen, K. F., Frisvad, J. C., Keller, N. P. (2005), "LaeA, a regulator of morphogenetic fungal virulence factors", *Eukaryotic Cell* Vol. 4(9), pp. 1574-1582.
24. Bok, J. W., Keller, N. P. (2004), "LaeA, a regulator of secondary metabolism in *Aspergillus* spp", *Eukaryotic cell* Vol. 3(2), pp. 527-535.
25. Booking, S. P., Wiebe, M. G., Robson, G. D., Hansen, K., Christiansen, L. H., Trinci, A. P. J. (1999), "Effect of branch frequency in *Aspergillus oryzae* on protein secretion and culture viscosity", *Biotechnology and Bioengineering* Vol. 65, pp. 638-648.
26. Bos, C. J., Debets, A. J., Swart, K., Huybers, A., Kobus, G., Slakhorst, S. M. (1988), "Genetic analysis and the construction of master strains for assignment of genes to six linkage groups in *Aspergillus niger*", *Current Genetics* Vol. 14(5), pp. 437-443.
27. Braaksma, M., Smilde, A. K., van der Werf, M. J., Punt, P. J. (2009), "The effect of environmental conditions on extracellular protease activity in controlled fermentations of *Aspergillus niger*", *Microbiology* Vol. 155, pp. 3430-3439.
28. Bundock, P., den Dulk-Ras, A., Beijersbergen, A., Hooykaas, P. J. J. (1995), "Transkingdom T-DNA transfer from *Agrobacterium tumefaciens* to *Saccharomyces cerevisiae*", *EMBO Journal* Vol. 14, pp. 3206-3214.
29. Bundock, P., Mroczek, K., Winkler, A. A., Steensma, H. Y., Hooykaas, P. J. (1999), "T-DNA from *Agrobacterium tumefaciens* as an efficient tool for gene targeting in *Kluyveromyces lactis*", *Molecular and General Genetics* Vol. 261, pp. 115-121.

30. Cairns, T. C., Feurstein, C., Zheng, X. M., Zheng, P., Sun, J. B., Meyer, V. (2019), "A quantitative image analysis pipeline for the characterization of filamentous fungal morphologies as a tool to uncover targets for morphology engineering: A case study using *aplD* in *Aspergillus niger*", *Biotechnology for Biofuels* Vol. 12(1), 149.
31. Cairns, T. C., Nai, C., Meyer, V. (2018), "How a fungus shapes biotechnology: 100 years of *Aspergillus niger* research", *Fungal Biology and Biotechnology* Vol. 5, 13.
32. Calvo, A. M., Wilson, R. A., Bok, J. W., Keller, N. P. (2002), "Relationship between secondary metabolism and fungal development", *Microbiology and Molecular Biology Reviews* Vol. 66(3), pp. 447-459.
33. Chacón-Vargas, K., McCarthy, C. O., Choi, D., Wang, L., Yu, J-H., Gibbons, J. G. (2021), "Comparison of Two *Aspergillus oryzae* Genomes From Different Clades Reveals Independent Evolution of Alpha-Amylase Duplication, Variation in Secondary Metabolism Genes, and Differences in Primary Metabolism ", *Frontiers in Microbiology* Vol. 12, 691296.
34. Chang, P. -K., Scharfenstein, L. L., Ehrlich, K. C., Wei, Q., Bhatnagar, D., Ingber, B. F. (2012), "Effects of *laeA* deletion on *Aspergillus flavus* conidial development and hydrophobicity may contribute to loss of aflatoxin production", *Fungal Biology* Vol. 116(2), pp. 298-307.
35. Cho, H-J., Son, S-H., Chen, W., Son, Y-E., Lee, I., Yu, J-H., Park, H-S. (2022), "Regulation of Conidiogenesis in *Aspergillus flavus*", *Cells* Vol. 11, 2796.
36. Christensen, T., Woeldike, H., Boel, E., Mortensen, S. B., Hjortshøj, K., Thim, L., Hansen, M. T. (1988), "High level expression of recombinant genes in *Aspergillus oryzae*", *Bio/Technology* Vol. 6, pp. 1419-1422.
37. Corrêa, T. L. R., Queiroz, M. V., Araújo, E. F. (2015), "Cloning, recombinant expression and characterization of a new phytase from *Penicillium chrysogenum*", *Microbiological Research* Vol. 170, pp. 205-212.
38. Currie, J. N. (1917), "The citric acid fermentation of *Aspergillus niger*", *Journal of Biological Chemistry* Vol. 31, pp. 15-37.
39. Daba, G. M., Mostafa, F. A., Elkhateeb, W. A. (2021), "The ancient koji mold (*Aspergillus oryzae*) as a modern biotechnological tool", *Bioresources and Bioprocessing* Vol. 8, 52.

40. de Boer, P., Bronkhof, J., Dukić, K., Kerkman, R., Touw, H., van den Berg, M., Offringa, R. (2013), "Efficient gene targeting in *Penicillium chrysogenum* using novel *Agrobacterium*-mediated transformation approaches", *Fungal Genetics and Biology* Vol. 61, pp. 9-14.
41. de Groot, M. J., Bundock, P., Hooykaas, P. J., Beijersbergen, A. G. (1998), "*Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of filamentous fungi", *Nature Biotechnology* Vol. 16, pp. 839-842.
42. de Vries, R. P., Riley, R., Wiebenga, A., Aguilar-Osorio, G., Amillis, S., Uchima, C. A., Anderluh, G., Asadollahi, M., Askin, M., Barry, K., *et al.* (2017), "Comparative genomics reveals high biological diversity and specific adaptations in the industrially and medically important fungal genus *Aspergillus*", *Genome Biology* Vol. 18, 28.
43. Delmas, S., Llanos, A., Parrou, J-L., Kokolski, M., Pullan, S. T., Shunburne, L., Archer, D. B. (2014), "Development of an unmarked gene deletion system for the filamentous fungi *Aspergillus niger* and *Talaromyces versatilis*", *Applied And Environmental Microbiology* Vol. 80(11), pp. 3484-3487.
44. den Brink, H. M., Petersen, S. G., Rahbek-Nielsen, H., Hellmuth, K., Harboe, M. (2006), "Increased production of chymosin by glycosylation", *Journal of Biotechnology* Vol. 125(2), pp. 304-310.
45. Dijksterhuis, J., Wosten, H. (2013), "Development of *Aspergillus niger*", *Studies in Mycology* Vol. 74.
46. Estiarte, N., Lawrence, C. B., Sanchis, V., Ramos, A. J., Crespo Sempere, A. (2016), "LaeA and VeA are involved in growth morphology, asexual development, and mycotoxin production in *Alternaria alternata*", *International Journal of Food Microbiology* Vol. 238, pp. 153-164.
47. Fiedler, M. R. M., Barthel, L., Kubisch, C., Nai, C., Meyer, V. (2018), "Construction of an improved *Aspergillus niger* platform for enhanced glucoamylase secretion", *Microbial Cell Factories* Vol. 17, 95.
48. Fiedler, M. R. M., Cairns, T. C., Koch, O., Kubisch, C., Meyer, V. (2018), "Conditional expression of the small GTPase ArfA impacts secretion, morphology, growth, and actin ring position in *Aspergillus niger*", *Frontiers in microbiology* Vol. 9, 878.
49. Fiedler, M. R. M., Gensheimer, T., Kubisch, C., Meyer, V. (2017), "*HisB* as novel selection marker for gene targeting approaches in *Aspergillus niger*", *BMC Microbiology* Vol. 17, 57.

50. Fleissner, A., Dersch, P. (2010), "Expression and export: recombinant protein production systems for *Aspergillus*", *Applied Microbiology and Biotechnology* Vol. 87, pp. 1255-1270.
51. Forment, J. V., Ramón, D., MacCabe, A. P. (2006), "Consecutive gene deletions in *Aspergillus nidulans*: application of the Cre/loxP system", *Current Genetics* Vol. 50(3), pp. 217-224.
52. Frandsen, R. J. (2011), "A guide to binary vectors and strategies for targeted genome modification in fungi using *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation", *Journal of Microbiological Methods* Vol. 87(3), pp. 247-262.
53. Fujita, J., Shigeta, S., Yamane, Y-I., Fukuda, H., Kizaki, Y., Wakabayashi, S., Ono, K. (2003), "Production of two types of phytase from *Aspergillus oryzae* during industrial koji making", *Journal of Bioscience and Bioengineering* Vol. 95(5), pp. 460-465.
54. Gil-Serna, J., García-Díaz, M., González-Jaén, M. T., Vázquez, C., Patino, B. (2018), "Description of an orthologous cluster of ochratoxin A biosynthetic genes in *Aspergillus* and *Penicillium* species. A comparative analysis", *International Journal of Food Microbiology* Vol. 268, pp. 35-43.
55. Gil-Serna, J., García-Díaz, M., Vázquez, C., González-Jaén, M. T., Patino, B. (2019), "Significance of *Aspergillus niger* aggregate species as contaminants of food products in Spain regarding their occurrence and their ability to produce mycotoxins", *Food Microbiology* Vol. 82, pp. 240-248.
56. Goffeau, A. (2005), "Genomics: Multiple Moulds", *Nature* Vol. 438, pp. 1092-1093.
57. Gomi, K. (2019), "Regulatory mechanisms for amylolytic gene expression in the koji mold *Aspergillus oryzae*", *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* Vol. 83(8), pp. 1385-1401.
58. Grant, S. G., Jessee, J., Bloom, F. R., Hanahan, D. (1990), "Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into *Escherichia coli* methylation-restriction mutants", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* Vol. 87, pp. 4645-4649.
59. He, R., Li, C., Ma, L., Zhang, D., Chen, S. (2016), "Effect of highly branched hyphal morphology on the enhanced production of cellulase in *Trichoderma reesei* DES-15", *3 Biotech* Vol. 6, 214.
60. Hu, P., Wang, Y., Zhou, J., Pan, Y., Liu, G. (2015), "*AcstuA*, which encodes an APSES transcription regulator, is involved in conidiation, cephalosporin

- biosynthesis and cell wall integrity of *Acremonium chrysogenum*", *Fungal Genetics and Biology* Vol. 83, pp. 26-40.
61. Huang, L. G., Dong, L. B., Wang, B., Pan, L. (2020), "The transcription factor PrtT and its target protease profiles in *Aspergillus niger* are negatively regulated by carbon sources", *Biotechnology Letters* Vol. 42(4), pp. 613-624.
 62. Høge-Jensen, B., Andreasen, F., Christensen, T., Christensen, M., Thim, L., Boel, E. (1989), "*Rhizomucor miehei* triglyceride lipase is processed and secreted from transformed *Aspergillus oryzae*", *Lipids* Vol. 24, pp. 781-785.
 63. Hynes, M. J. (1996), "Genetic transformation of filamentous fungi", *Journal of Genetics* Vol. 75, pp. 297-311.
 64. Hynes, M. J., Pateman, J. A. (1970), "The genetic analysis of regulation of amidase synthesis in *Aspergillus nidulans*. I. Mutants able to utilize acrylamide.", *Molecular and General Genetics* Vol. 108, pp. 97-106.
 65. Idnurm, A., Bailey, A. M., Cairns, T. C., Elliott, C. E., Foster, G. D., Ianiri, G., Jeon, J. (2017), "A silver bullet in a golden age of functional genomics: the impact of *Agrobacterium*-mediated transformation of fungi", *Fungal Biology and Biotechnology* Vol. 4, 6.
 66. IpCho, S. V., Tan, K-C., Koh, G., Gummer, J., Oliver, R. P., Trengove, R. D., Solomon, P. S. (2010), "The transcription factor StuA regulates central carbon metabolism, mycotoxin production, and effector gene expression in the wheat pathogen *Stagonospora nodorum*", *Eukaryotic Cell* Vol. 9(7), pp. 1100-1108.
 67. Jarai, G., Buxton, F. (1994), "Nitrogen, carbon, and pH regulation of extracellular acidic proteases of *Aspergillus niger*", *Current Genetics* Vol. 26(3), pp. 238-244.
 68. Jeenes, D. J., Mackenzie, D. A., Archer, D. B. (1994), "Transcriptional and post-transcriptional events affect the production of secreted hen egg white lysozyme by *Aspergillus niger*", *Transgenic Research* Vol. 3(5), pp. 297-303.
 69. Jeong, J-Y., Yim, H-S., Ryu, J-Y., Lee, H. S., Lee, J-H., Seen, D-S., Kang, S. G. (2012), "One-step Sequence- and Ligation-Independent Cloning as a rapid and versatile cloning method for functional genomics studies", *Applied And Environmental Microbiology* Vol. 78, pp. 5440-5443.
 70. Jin, F. J., Hu, S., Wang, B. T., Jin, L. (2021), "Advances in Genetic Engineering Technology and Its Application in the Industrial Fungus *Aspergillus oryzae*", *Frontiers in microbiology* Vol. 12, 644404.

71. Kadooka, C., Nakamura, E., Mori, K., Okutsu, K., Yoshizaki, Y., Takamine, K., Goto, M., Tamaki, H., Futagami, T. (2020), "LaeA Controls Citric Acid Production through Regulation of the Citrate Exporter-Encoding *cexA* Gene in *Aspergillus luchuensis* mut. *kawachii*", *Applied And Environmental Microbiology* Vol. 86(5), e01950-19.
72. Kato, N., Brooks, W., Calvo, A. M. (2003), "The expression of sterigmatocystin and penicillin genes in *Aspergillus nidulans* is controlled by *veA*, a gene required for sexual development", *Eukaryotic cell* Vol. 2, pp. 1178-1186.
73. Kawauchi, M., Nishiura, M., Iwashita, K. (2013), "Fungus-specific sirtuin HstD coordinates secondary metabolism and development through control of LaeA", *Eukaryotic Cell* Vol. 12, pp. 1087-1096.
74. Keller, N. P., Turner, G., Bennett, J. W. (2005), "Fungal secondary metabolism: from biochemistry to genomics", *Nature Reviews Microbiology* Vol. 3, pp. 937-947.
75. Kim, H., Han, K., Kim, K., Han, D., Jahng, K., Chae, K. (2002), "The *veA* gene activates sexual development in *Aspergillus nidulans*", *Fungal Genetics and Biology* Vol. 37, pp. 72-80.
76. Krappmann, S., Bayram, O., Braus, G. H. (2005), "Deletion and allelic exchange of the *Aspergillus fumigatus* *veA* locus via a novel recyclable marker module", *Eukaryotic cell* Vol. 4(7), pp. 1298-1307.
77. Krijghsheld, P., Bleichrodt, R., van Veluw, G. J., Wang, F., Muller, W. H., Dijksterhuis, J., Wosten, H. A. B. (2013), "Development in *Aspergillus*", *Studies in Mycology* Vol. 74, pp. 1-29.
78. Krijghsheld, P., Nitsche, B. M., Post, H., Levin, A. M., Muller, W. H., Heck, A. J. R., Ram, A. F. J., Altelaar, A. F. M., Wosten, H. A. B. (2013), "Deletion of *flbA* results in increased secretome complexity and reduced secretion heterogeneity in colonies of *Aspergillus niger*", *Journal of Proteome Research* Vol. 12(4), pp. 1808-1819.
79. Lazo, G. R., Stein, P. A., Ludwig, R. A. (1991), "A DNA transformation-competent *Arabidopsis* genomic library in *Agrobacterium*", *Nature Biotechnology* Vol. 9, pp. 963-967.
80. Lee, J. Y., Kim, L. H., Kim, H. E., Park, J. S., Han, K. H., Han, D. M. (2013), "A putative APSES transcription factor is necessary for normal growth and

- development of *Aspergillus nidulans*", *Journal of Microbiology* Vol. 51, pp. 800-806.
81. Lee, L-Y., Gelvin, S. B. (2008), "T-DNA Binary Vectors and Systems", *Plant Physiology* Vol. 146, pp. 325-332.
 82. Leong, S. L., Hien, L. T., An, T. V., Trang, N. T., Hocking, A. D., Scott, E. S. (2007), "Ochratoxin A-producing *Aspergilli* in Vietnamese green coffee beans", *Letter in Applied Microbiology* Vol. 45, pp. 301-306.
 83. Li, C., Zhou, J., Du, G., Chen, J., Takahashi, S., Liu, S. (2020), "Developing *Aspergillus niger* as a cell factory for food enzyme production", *Biotechnology Advances* Vol. 44, 107630.
 84. Li, D., Tang, Y., Lin, J., Cai, W. (2017), "Methods for genetic transformation of filamentous fungi", *Microbial Cell Factories* Vol. 16, 168.
 85. Li, M., Zhou, L., Liu, M., Huang, Y., Sun, X., Lu, F. (2013), "Construction of an engineering strain producing high yields of α -transglucosidase via *Agrobacterium tumefaciens* - mediated transformation of *Aspergillus niger*", *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* Vol. 77, pp. 1860-1866.
 86. Liu, G., Casqueiro, J., Banuelos, O., Cardoza, R. E., Gutierrez, S., Martin, J. F. (2001), "Targeted inactivation of the *mecB* gene, encoding cystathionine-gamma-lyase, shows that the reverse transsulfuration pathway is required for high-level cephalosporin biosynthesis in *Acremonium chrysogenum* C10 but not for methionine induction of the cephalosporin genes", *Journal of Bacteriology* Vol. 183, pp. 1765-1772.
 87. Livak, K. J., D., Schmittgen T. (2001), "Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method", *Methods* Vol. 25, pp. 402-408.
 88. Lv, Y., Lv, A., Zhai, H., Zhang, S., Li, L., Cai, J., Hu, Y. (2018), "Insight into the global regulation of *laeA* in *Aspergillus flavus* based on proteomic profiling", *International Journal of Food Microbiology* Vol. 284, pp. 11-21.
 89. Machida, M., Asai, K., Sano, M., Tanaka, T., Kumagai, T., Terai, G., Kusumoto, K., Arima, T., Akita, O., Kashiwagi, Y., *et al.* (2005), "Genome sequencing and analysis of *Aspergillus oryzae*", *Nature* Vol. 438, pp. 1157-1161.
 90. Machida, M., Yamada, O., Gomi, K. (2008), "Genomics of *Aspergillus oryzae*: learning from the history of koji mold and exploration of its future", *DNA Research* Vol. 15(4), pp. 173-183.

91. Magaña-Ortíz, D., Coconi-Linares, N., Ortiz-Vazquez, E., Fernández, F., Loske, A. M., Gómez-Lim, M. A. (2013), "A novel and highly efficient method for genetic transformation of fungi employing shock waves", *Fungal Genetics and Biology* Vol. 56, pp. 9-16.
92. Malik, M., Nitiss, K. C., Enriquez-Rios, V., Nitiss, J. L. (2006), "Roles of nonhomologous end-joining pathways in surviving topoisomerase II-mediated DNA damage", *Molecular Cancer Therapeutics* Vol. 5, pp. 1405-1414.
93. Maor, U., Barda, O., Sadhasivam, S., Bi, Y., Levin, E., Zakin, V., Prusky, D. B., Sionov, E. (2020), "Functional roles of LaeA, polyketide synthase, and glucose oxidase in the regulation of ochratoxin A biosynthesis and virulence in *Aspergillus carbonarius*", *Molecular Plant Pathology* Vol. 22(1), pp. 117-129.
94. McClenny, N. (2005), "Laboratory detection and identification of *Aspergillus* species by microscopic observation and culture: the traditional approach", *Medical Mycology* Vol. 43, pp. 125-128.
95. Meyer, V., Arentshorst, M., El-Ghezal, A., Drews, A. C., Kooistra, R., van den Hondel, C. A., Ram, A. F. (2007), "Highly efficient gene targeting in the *Aspergillus niger kusA* mutant", *Journal of Biotechnology* Vol. 128, pp. 770-775.
96. Meyer, V., Wanka, F., van Gent, J., Arentshorst, M., van den Hondel, C. A. M. J. J., Ram, A. F. J. (2011), "Fungal gene expression on demand: An inducible, tunable, and metabolism-independent expression system for *Aspergillus niger*", *Applied And Environmental Microbiology* Vol. 77, pp. 2975-2983.
97. Meyer, V., Wu, B., Ram, A. F. J. (2010), "*Aspergillus* as a multi-purpose cell factory: current status and perspectives", *Biotechnology Letters* Vol. 33, pp. 469-476.
98. Michielse, C. B., Arentshorst, M., Ram, A. F. J., van den Hondel, C. A. M. J. J. (2005), "*Agrobacterium*-mediated transformation leads to improved gene replacement efficiency in *Aspergillus awamori*", *Fungal Genetics and Biology* Vol. 42, pp. 9-19.
99. Michielse, C. B., Hooykaas, P. J. J., van den Hondel, C. A. M. J. J., Ram, A. F. J. (2005), "*Agrobacterium*-mediated transformation as a tool for functional genomics in fungi", *Current Genetics* Vol. 48, pp. 1-17.

100. Miller, K. Y., Toennis, T. M., Adams, T. H., Miller, B. L. (1991), "Isolation and transcriptional characterization of a morphological modifier: the *Aspergillus nidulans* stunted (*stuA*) gene", *Molecular and General Genetics* Vol. 227(2), pp. 285-292.
101. Miller, K. Y., Wu, J., Miller, B. L. (1992), "StuA is required for cell pattern formation in *Aspergillus*", *Genes & Development* Vol. 6(9), pp. 1770-1782.
102. Mizutani, O., Kudo, Y., Saito, A., Matsuura, T., Inoue, H., Abe, K., Gomi, K. (2008), "A defect of LigD (human Lig4 homolog) for nonhomologous end joining significantly improves efficiency of gene-targeting in *Aspergillus oryzae*", *Fungal Genetics and Biology* Vol. 45, pp. 878-889.
103. Mullaney, E. J., Daly, C. B., Sethumadhavan, K., Rodriguez, E., Lei, X. G., Ullah, A. H. (2000), "Phytase activity in *Aspergillus fumigatus* isolates", *Biochemical and biophysical research communications* Vol. 275(3), pp. 759-763.
104. Nagamine, S., Liu, C., Nishishita, J., Kozaki, T., Sogahata, K., Sato, Y., Minami, A., Ozaki, T., Schmidt-Dannert, C., Maruyama, J. I., Oikawa, H. (2019), "Ascomycete *Aspergillus oryzae* Is an Efficient Expression Host for Production of Basidiomycete Terpenes by Using Genomic DNA Sequences", *Applied And Environmental Microbiology* Vol. 85(15), e00409-19.
105. Nevalainen, H., Peterson, R. (2014), "Making recombinant proteins in filamentous fungi- are we expecting too much?", *Frontiers in microbiology* Vol. 5, 75.
106. Nguyen, T. K., Ho, N. Q., Do, T. B. X. L., Mai, T. D. L., Pham, D. N., Tran, T. T. H., Le, H. D., Nguyen, Q. H., Tran, V. T. (2017), "A new and efficient approach for construction of uridine/uracil auxotrophic mutants in the filamentous fungus *Aspergillus oryzae* using *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation", *World Journal of Microbiology and Biotechnology* Vol. 33, 107.
107. Nguyen, T. K., Ho, N. Q., Pham, H. T., 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 Journal of Microbiology and Biotechnology* Vol. 32, 204.

108. Nielsen, M. L., Albertsen, L., Lettier, G., Nielsen, J. B., Mortensen, U. H. (2006), "Efficient PCR-based gene targeting with a recyclable marker for *Aspergillus nidulans*", *Fungal Genetics and Biology* Vol. 43(1), pp. 54-64.
109. Nierman, W. C., Pain, A., Anderson, M. J., Wortman, J. R., Kim, H. S., Arroyo, J., Berriman, M., Abe, K., Archer, D. B., Bermejo, C., *et al.* (2005), "Genomic sequence of the pathogenic and allergenic filamentous fungus *Aspergillus fumigatus*", *Nature* Vol. 438, pp. 1151-1156.
110. Ninomiya, Y., Suzuki, K., Ishii, C., Inoue, H. (2004), "Highly efficient gene replacements in *Neurospora* strains deficient for nonhomologous end-joining", *Proceedings of the National Academy of Sciences* Vol. 101, pp. 12248-12253.
111. Niu, J., Arentshorst, M., Nair, P. D., Dai, Z., Baker, S. E., Frisvad, J. C., Nielsen, K. F., Punt, P. J., Ram, A. F. (2016), "Identification of a classical mutant in the industrial host *Aspergillus niger* by systems genetics: *laeA* is required for citric acid production and regulates the formation of some secondary metabolites", *G3* Vol. 6, pp. 193-204.
112. Niu, J., Arentshorst, M., Seelinger, F., Ram, A. F. J., Ouedraogo, J. P. (2016), "A set of isogenic auxotrophic strains for constructing multiple gene deletion mutants and parasexual crossings in *Aspergillus niger*", *Archives of Microbiology* Vol. 198, pp. 861-868.
113. Nødvig, C. S., Hoof, J. B., Kogle, M. E., Jarczynska, Z. D., Lehmbeck, J., Klitgaard, D. K., Mortensen, U. H. (2018), "Efficient oligo nucleotide mediated CRISPR-Cas9 gene editing in *Aspergilli*", *Fungal Genetics and Biology* Vol. 115, pp. 78-89.
114. Nora, L. C., Westmann, C. A., Martins-Santana, L., de Fátima Alves, L., Monteiro, L. M. O., Guazzaroni, M-E., Silva-Rocha, R. (2019), "The art of vector engineering: towards the construction of next-generation genetic tools", *Microbial Biotechnology* Vol. 12(1), pp. 125-147.
115. Oda, K., Kobayashi, A., Ohashi, S., Sano, M. (2011), "*Aspergillus oryzae laeA* regulates kojic acid synthesis genes", *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* Vol. 75, pp. 1832-1834.
116. Pandee, P., Summpunn, P., Wiyakrutta, S., Isarangkul, D., Meevootisom, V. (2001), "A thermostable phytase from *Neosartorya spinosa* BCC 41923 and its expression in *Pichia pastoris*", *Journal of Microbiology* Vol. 49, pp. 257-264.

117. Park, B. C., Park, Y. H., Yi, S., Choi, Y. K., Kang, E. H., Park, H. M. (2014), "Transcriptional regulation of *fksA*, a beta-1,3-glucan synthase gene, by the APSES protein StuA during *Aspergillus nidulans* development", *Journal of Microbiology* Vol. 52, pp. 940-947.
118. Park, H. S., Jun, S. C., Han, K. H., Hong, S. B., Yu, J. H. (2017), "Diversity, Application, and Synthetic Biology of Industrially Important *Aspergillus* Fungi", *Advances in Applied Microbiology* Vol. 100, pp. 161-202.
119. Park, J., Wang, H. H. (2018), "Systematic and synthetic approaches to rewire regulatory networks", *Current opinion in Systems biology* Vol. 8, pp. 90-96.
120. Pasamontes, L., Haiker, M., Wyss, M., Tessier, M., van Loon, A. P. (1997), "Gene cloning, purification, and characterization of a heat-stable phytase from the fungus *Aspergillus fumigatus*", *Applied And Environmental Microbiology* Vol. 63(5), pp. 1696-1700.
121. Pasquali, M., Spanu, F., Scherm, B., Balmas, V., Hoffmann, L., Hammond-Kosack, K. E., Beyer, M., Migheli, Q. (2013), "FcStuA from *Fusarium culmorum* controls wheat foot and root rot in a toxin dispensable manner", *PLoS ONE* Vol. 8(2), e57429.
122. Pel, H. J., de Winde, J. H., Archer, D. B., Dyer, P. S., Hofmann, G., Schaap, P. J., Turner, G., de Vries, R. P., Albang, R., Albermann, K., *et al.* (2007), "Genome sequencing and analysis of the versatile cell factory *Aspergillus niger* CBS 513.88", *Nature Biotechnology* Vol. 25(2), pp. 221-231.
123. Petersen, K. L., Lehmbeck, J., Christensen, T. (1999), "A new transcriptional activator for amylase genes in *Aspergillus*", *Molecular and General Genetics* Vol. 262, pp. 668-676.
124. Phillippy, B. Q., Mullaney, E. J. (1997), "Expression of an *Aspergillus niger* phytase (*phyA*) in *Escherichia coli*", *Journal of Agricultural and Food Chemistry* Vol. 45(8), pp. 3337-3342.
125. Pillay, P., Schluter, U., van Wyk, S., Kunert, K. J., Vorster, B. J. (2014), "Proteolysis of recombinant proteins in bioengineered plant cells", *Bioengineered* Vol. 5(1), pp. 15-20.
126. Pratt, R. J., Aramayo, R. (2002), "Improving the efficiency of gene replacements in *Neurospora crassa*: a first step towards a large-scale functional genomics project", *Fungal Genetics and Biology* Vol. 37, pp. 56-71.

127. Pronk, J. T. (2002), "Auxotrophic yeast strains in fundamental and applied research", *Applied And Environmental Microbiology* Vol. 68, pp. 2095-2100.
128. Punt, P. J., Schuren, F. H., Lehmbeck, J., Christensen, T., Hjort, C., van den Hondel, C. A. M. J. J. (2008), "Characterization of the *Aspergillus niger prtT*, a unique regulator of extracellular protease encoding genes", *Fungal Genetics and Biology* Vol. 45(12), pp. 1591-1599.
129. Rocky-Salimi, K., Hashemi, M., Safari, M., Mousivand, M. (2016), "A novel phytase characterized by thermostability and high pH tolerance from rice phyllosphere isolated *Bacillus subtilis* B.S.46", *Journal of Advanced Research* Vol. 7, pp. 381-390.
130. Rodriguez, E., Mullaney, E. J., Lei, X. G. (2000), "Expression of the *Aspergillus fumigatus* phytase gene in *Pichia pastoris* and characterization of the recombinant enzyme", *Biochemical and biophysical research communications* Vol. 268(2), pp. 373-378.
131. Schmittgen, T. D., Livak, K. J. (2008), "Analyzing real-time PCR data by the comparative Ct method", *Nature Protocols* Vol. 3, pp. 1101-1108.
132. Schuster, E., Dunn-Coleman, N., Frisvad, J. C., Van Dijck, P. W. (2002), "On the safety of *Aspergillus niger* - a review", *Applied Microbiology and Biotechnology* Vol. 59(4-5), pp. 426-435.
133. Sharon, H., Hagag, S., Osherov, N. (2009), "Transcription factor PrtT controls expression of multiple secreted proteases in the human pathogenic mold *Aspergillus fumigatus*", *Infection and Immunity* Vol. 77(9), pp. 4051-4060.
134. Sheppard, D. C., Doedt, T., Chiang, L. Y., Kim, H. S., Chen, D., Nierman, W. C., Filler, S. G. (2005), "The *Aspergillus fumigatus* StuA protein governs the up-regulation of a discrete transcriptional program during the acquisition of developmental competence", *Molecular biology of the cell* Vol. 16(12), pp. 5866-5879.
135. Shoji, J., Maruyama, J., Arioka, M., Kitamoto, K. (2005), "Development of *Aspergillus oryzae thiA* promoter as a tool for molecular biological studies", *FEMS Microbiology Letters* Vol. 244(1), pp. 41-46.
136. Suleman, E., Somai, B. M. (2012), "Validation of *hisH4* and *cox5* reference genes for RT-qPCR analysis of gene expression in *Aspergillus flavus* under aflatoxin conducive and non-conducive conditions", *Microbiological Research* Vol. 167, pp. 487-492.

137. Sun, X. W., Wu, H. F., Zhao, G. H., Li, Z. M., Wu, X. H., Liu, H., Zheng, Z. M. (2018), "Morphological regulation of *Aspergillus niger* to improve citric acid production by *chsC* gene silencing", *Bioprocess and Biosystems Engineering* Vol. 41, 7.
138. Sun, Y., Niu, Y., He, B., Ma, L., Li, G., Tran, V. T., Zeng, B., Hu, Z. (2019), "A dual selection marker transformation system using *Agrobacterium tumefaciens* for the industrial *Aspergillus oryzae* 3.042", *Journal of Microbiology and Biotechnology* Vol. 29, pp. 230-234.
139. Takahashi, T., Ogawa, M., Sato, A., Koyama, Y. (2018), "Translocated duplication of a targeted chromosomal segment enhances gene expression at the duplicated site and results in phenotypic changes in *Aspergillus oryzae*", *Fungal Biology and Biotechnology* Vol. 5, 17.
140. Talhinhos, P., Muthumeenakshi, S., Neves-Martins, J., Oliveira, H., Sreenivasaprasad, S. (2008), "Agrobacterium-Mediated Transformation and Insertional Mutagenesis in *Colletotrichum acutatum* for Investigating Varied Pathogenicity Lifestyles", *Molecular Biotechnology* Vol. 39(1), pp. 57-67.
141. Tamayo-Ramos, J. A., Barends, S., de Lange, D., de Jel, A., Verhaert, R., de Graa, L. (2013), "Enhanced production of *Aspergillus niger* laccase-like multicopper oxidases through mRNA optimization of the glucoamylase expression system", *Biotechnology and Bioengineering* Vol. 110(2), pp. 543-551.
142. Tanaka, M., Ito, K., Matsuura, T., Kawarasaki, Y., Gomi, K. (2021), "Identification and distinct regulation of three di/tripeptide transporters in *Aspergillus oryzae*", *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* Vol. 85(2), pp. 452-463.
143. Thai, H. D., Tran, V-T. (2018), "Construction of a binary vector for the expression of the *Aspergillus niger* McoD laccase gene in the industrial filamentous fungus *Aspergillus oryzae*", *Vietnam Journal of Science, Technology and Engineering* Vol. 60(3), pp. 59-66.
144. Tilburn, J., Scazzocchio, C., Taylor, G. G., Zabicky-Zissman, J. H., Lockington, R. A., Davies, R. W. (1983), "Transformation by integration in *Aspergillus nidulans*", *Gene* Vol. 26, pp. 205-221.
145. Turner, G. E., Jimenez, T. J., Chae, S. K., Baasiri, R. A., Borkovich, K. A. (1997), "Utilization of the *Aspergillus nidulans* *pyrG* gene as a selectable

- marker for transformation and electroporation of *Neurospora crassa*", *Fungal Genetics Reports* Vol. 44, pp. 57-59.
146. Twumasi-Boateng, K., Yu, Y., Chen, D., Gravelat, F. N., Nierman, W. C., Sheppard, D. C. (2009), "Transcriptional profiling identifies a role for BrlA in the response to nitrogen depletion and for StuA in the regulation of secondary metabolite clusters in *Aspergillus fumigatus*", *Eukaryot Cell* Vol. 8(1), pp. 104-115.
 147. van den Hombergh, J. P., Sollewijn Gelpke, M. D., van de Vondervoort, P. J., Buxton, F. P., Visser, J. (1997), "Disruption of three acid proteases in *Aspergillus niger*: effects on protease spectrum, intracellular proteolysis, and degradation of target proteins", *European Journal of Biochemistry* Vol. 247, pp. 605-613.
 148. van Hartingsveldt, W., van Zeijl, C. M., Harteveld, G. M., Gouka, R. J., Suykerbuyk, M. E., Luiten, R. G., van Paridon, P. A., Selten, G. C., Veenstra, A. E., van Gorcom, R. F. (1993), "Cloning, characterization and overexpression of the phytase-encoding gene (*phyA*) of *Aspergillus niger*", *Gene* Vol. 127(1), pp. 87-94.
 149. vanKuyk, P. A., Benen, J. A. E., Wosten, H. A. B., Visser, J., de Vries, R. P. (2012), "A broader role for AmyR in *Aspergillus niger*: Regulation of the utilisation of D-glucose or D-galactose containing oligo- and polysaccharides", *Applied Microbiology and Biotechnology* Vol. 93(1), pp. 285-293.
 150. Varga, J., Frisvad, J. C., Samson, R. A. (2011), "Two new aflatoxin producing species, and an overview of *Aspergillus* section *Flavi*", *Studies in Mycology* Vol. 69, pp. 57-80.
 151. Ventura, L., Ramon, D. (1991), "Transformation of *Aspergillus terreus* with the hygromycin B resistance marker from *Escherichia coli*", *FEMS Microbiology Letters* Vol. 66, pp. 189-193.
 152. Vu, X. T., Ngo, T. T., Mai, T. D. L., Bui, T. T., Le, H. D., Bui, T. V. H., Nguyen, Q. H., Ngo, X. B., Tran, V. T. (2018), "A highly efficient *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation system for the postharvest pathogen *Penicillium digitatum* using DsRed and GFP to visualize citrus host colonization", *Journal of Microbiological Methods* Vol. 144, pp. 134-144.

153. Vu, X. T., Vu, H. H., Nguyen, T. G., Vu, T. H., Mai, T. D. L., Pham, D-N., Le, H. D., Nguyen, Q. H., Tran, V-T. (2019), "A newly constructed *Agrobacterium*-mediated transformation system revealed the influence of nitrogen sources on the function of the LaeA regulator in *Penicillium chrysogenum*", *Fungal Biology* Vol. 123, pp. 830-842.
154. Wach, A., Brachat, A., Pohlmann, R., Philippsen, P. (1994), "New heterologous modules for classical or PCR-based gene disruptions in *Saccharomyces cerevisiae*", *Yeast* Vol. 10, pp. 1793-1808.
155. Wang, F., Dijksterhuis, J., Wyatt, T., Wosten, H. A., Bleichrodt, R. -J. (2015), "VeA of *Aspergillus niger* increases spore dispersing capacity by impacting conidiophore architecture", *Antonie Van Leeuwenhoek* Vol. 107(1), pp. 187-199.
156. Wang, Y. C., Xue, W., Sims, A. H., Zhao, C. T., Wang, A. Q., Tang, G. M., Qin, J. C., Wang, H. M. (2008), "Isolation of four pepsin-like protease genes from *Aspergillus niger* and analysis of the effect of disruptions on heterologous laccase expression", *Fungal Genetics and Biology* Vol. 45(1), pp. 17-27.
157. Ward, M., Wilson, J. F., Carmore, C. L., Turner, G. (1988), "The *oliC3* gene of *Aspergillus niger*: isolation, sequence and use as a selectable marker for transformation", *Current Genetics* Vol. 14, pp. 37-42.
158. Xiao, X., Feng, J., Li, Y., Chen, Z., Shi, M., Xi, L., Mylonakis, E., Zhang, J. (2017), "*Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation: an efficient tool for targeted gene disruption in *Talaromyces marneffei*", *World Journal of Microbiology and Biotechnology* Vol. 33, 183.
159. Yamada, M., Yawata, K., Orino, Y., Ueda, S. , Isogai, Y., Taguchi, G., Shimosaka, M., Hashimoto, S. (2009), "*Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of antifungal lipopeptide producing fungus *Coleophoma empetri* F-11899", *Current Genetics* Vol. 55, pp. 623-630.
160. Yao, G., Zhang, F., Nie, X., Wang, X., Yuan, J., Zhuang, Z., Wang, S. (2017), "Essential APSES transcriptional factors for mycotoxin synthesis, fungal development, and pathogenicity in *Aspergillus flavus*", *Frontiers in microbiology* Vol. 8, 2277.
161. Yoon, J., Maruyama, J. I., Kitamoto, K. (2011), "Disruption of ten protease genes in the filamentous fungus *Aspergillus oryzae* highly improves

- production of heterologous proteins", *Applied Microbiology and Biotechnology* Vol. 89, pp. 747-759.
162. Zhang, H., Wang, S., Zhang, X. X., Ji, W., Song, F., Zhao, Y., Li, J. (2016), "The amyR-deletion strain of *Aspergillus niger* CICC2462 is a suitable host strain to express secreted protein with a low background", *Microbial Cell Factories* Vol. 15, 68.
 163. Zhang, J., Chen, H., Sumarah, M. W., Gao, Q., Wang, D., Zhang, Y. (2018), "veA Gene Acts as a Positive Regulator of Conidia Production, Ochratoxin A Biosynthesis, and Oxidative Stress Tolerance in *Aspergillus niger*", *Journal of Agricultural and Food Chemistry* Vol. 66(50), pp. 13199-13208.
 164. Zhang, P., Xu, B., Wang, Y., Li, Y., Qian, Z., Tang, S., Huan, S., Ren, S. (2008), "*Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation as a tool for insertional mutagenesis in the fungus *Penicillium marneffeii*", *Mycological Research* Vol. 112, pp. 943-949.
 165. Zhang, Y., Li, G., He, D., Yu, B., Yokoyama, K., Wang, L. (2011), "Efficient insertional mutagenesis system for the dimorphic pathogenic fungus *Sporothrix schenckii* using *Agrobacterium tumefaciens*", *Journal of Microbiological Methods* Vol. 84(3), pp. 418-422.
 166. Zhang, Y., Ouyang, L., Nan, Y., Chu, J (2019), "Efficient gene deletion and replacement in *Aspergillus niger* by modified in vivo CRISPR/ Cas9 systems", *Bioresources and Bioprocessing* Vol. 6, 4.
 167. Zhao, D. M., Wang, M., Mu, X. J., Sun, M. L., Wang, X. Y. (2007), "Screening, cloning and overexpression of *Aspergillus niger* phytase (*phyA*) in *Pichia pastoris* with favourable characteristics", *Letter in Applied Microbiology* Vol. 45(5), pp. 522-528.
 168. Zhao, Y., Su, H., Zhou, J., Feng, H., Zhang, K. Q., Yang, J. (2015), "The APSES family proteins in fungi: characterizations, evolution and functions", *Fungal Genetics and Biology* Vol. 81, pp. 271-280.
 169. Zhu, L., Maruyama, J. I., K., Kitamoto (2013), "Further enhanced production of heterologous proteins by double-gene disruption ($\Delta AosedD \Delta Aovps10$) in a hyper-producing mutant of *Aspergillus oryzae*", *Applied Microbiology and Biotechnology* Vol. 97, pp. 6347-6357.

PHỤ LỤC 1. Các vector nhị thể được tạo trong nghiên cứu

Tên vector	Mô tả
pAnH	Vector dùng cho xoá <i>hisB</i> ở <i>A. niger</i> Δ <i>pyrG</i>
pAoH	Vector dùng cho xoá <i>hisB</i> ở <i>A. oryzae</i> Δ <i>pyrG</i>
pAnHG	Vector dùng cho tạo đột biến khuyết dưỡng kép Δ <i>hisB</i> Δ <i>pyrG</i> ở <i>A. niger</i>
pAoHG	Vector dùng cho tạo đột biến khuyết dưỡng kép Δ <i>hisB</i> Δ <i>pyrG</i> ở <i>A. oryzae</i>
pE Δ An <i>pyrG</i>	Vector loại marker <i>pyrG</i> ở chủng <i>A. niger</i> Δ <i>laeA</i>
pKH1	Vector trung gian chứa marker chọn lọc là <i>hisB</i> từ <i>A. niger</i>
pKH- Δ An <i>amyR</i>	Vector dùng cho xoá <i>amyR</i> ở <i>A. niger</i> Δ <i>hisB</i>
pKH- Δ An <i>laeA</i>	Vector dùng cho xoá <i>laeA</i> ở <i>A. niger</i> Δ <i>hisB</i>
pKH- Δ An <i>prtT</i>	Vector dùng cho xoá <i>prtT</i> ở <i>A. niger</i> Δ <i>hisB</i>
pKH- Δ An <i>stuA</i>	Vector dùng cho xoá <i>stuA</i> ở <i>A. niger</i> Δ <i>hisB</i>
pKHG- Δ An <i>stuA</i>	Vector chứa <i>pyrG</i> là marker chọn lọc thứ hai và được sử dụng cho xoá <i>stuA</i> ở <i>A. niger</i> Δ <i>hisB</i> và Δ <i>hisB</i> Δ <i>pyrG</i>
pKH- Δ An <i>veA</i>	Vector dùng cho xoá <i>veA</i> ở <i>A. niger</i> Δ <i>hisB</i>
pKHG- Δ An <i>veA</i>	Vector chứa <i>pyrG</i> là marker chọn lọc thứ hai và được sử dụng cho xoá <i>veA</i> ở <i>A. niger</i> Δ <i>hisB</i> và Δ <i>hisB</i> Δ <i>pyrG</i>
pKHG- Δ Ao <i>amyR</i>	Vector chứa <i>pyrG</i> là marker chọn lọc thứ hai và được sử dụng cho xoá <i>amyR</i> ở <i>A. oryzae</i> Δ <i>hisB</i> và Δ <i>hisB</i> Δ <i>pyrG</i>
pKH- Δ Ao <i>laeA</i>	Vector dùng cho xoá <i>laeA</i> ở <i>A. oryzae</i> Δ <i>hisB</i>

Tên vector	Mô tả
pKHG- ΔA_{laeA}	Vector chứa <i>pyrG</i> là marker chọn lọc thứ hai và được sử dụng cho xoá <i>laeA</i> ở <i>A. oryzae</i> $\Delta hisB$ và $\Delta hisB\Delta pyrG$
pKH- ΔA_{stuA}	Vector dùng cho xoá <i>stuA</i> ở <i>A. oryzae</i> $\Delta hisB$
pKHG- ΔA_{stuA}	Vector chứa <i>pyrG</i> là marker chọn lọc thứ hai và được sử dụng cho xoá <i>stuA</i> ở <i>A. oryzae</i> $\Delta hisB$ và $\Delta hisB\Delta pyrG$
pKO2 ΔA_{nveA}	Vector dùng cho xoá <i>veA</i> ở <i>A. niger</i> với marker chọn lọc là gen kháng kháng sinh nourseothricin
pEX2D	Vector chứa marker chọn lọc là gen <i>hisB</i> từ <i>A. oryzae</i> , dùng cho biểu hiện gen mã hoá huỳnh quang đỏ DsRed dưới sự điều hoà của promoter <i>gpdA</i> từ <i>A. nidulans</i>
pEX2E	Vector chứa marker chọn lọc là gen <i>hisB</i> từ <i>A. niger</i> , dùng cho biểu hiện gen mã hoá huỳnh quang đỏ DsRed dưới sự điều hoà của promoter <i>gpdA</i> từ <i>A. nidulans</i>
pEX2 <i>laeA</i>	Vector dùng để phục hồi/biểu hiện quá mức gen <i>laeA</i> ở <i>A. oryzae</i> dưới sự điều hoà của promoter <i>gpdA</i> từ <i>A. nidulans</i> và <i>pyrG</i> là marker chọn lọc
pEX2B- <i>AfphyA</i>	Vector dùng để biểu hiện quá mức gen <i>phyA</i> từ <i>A. fumigatus</i> dưới sự điều hoà của promoter cảm ứng <i>amyB</i> từ <i>A. oryzae</i> và <i>pyrG</i> là marker chọn lọc
pEX2- <i>AnphyA</i>	Vector dùng để biểu hiện quá mức gen <i>phyA</i> từ <i>A. niger</i> dưới sự điều hoà của promoter cảm ứng <i>gpdA</i> từ <i>A. nidulans</i> và <i>pyrG</i> là marker chọn lọc

PHỤ LỤC 2. Các cặp mồi sử dụng trong nghiên cứu

Tên mồi	Trình tự (5'-3')	Kích thước sản phẩm PCR	Nguồn gốc
AnhisB-P1	AGCTATGACATGATTACGAATTCGTTTGA CCTTGCGAACATA	1011	Nghiên cứu này
AnhisB-P2	CTCGATATCTTAATTAAGAATTTGAGAGT AGGGAGGGTGGTG		
AnhisB-P3	CACGGGTAGTCTACCCTTCTAGGGCGTCT AGATGGTTCGGTA	969	
AnhisB-P4	CACAGTACACGAGGACTTCTAGGCGCTGT CCCTGTTGATAAT		
AnhisB-P5	AAAAACACCGGTCATGAAGC	1673	
AnhisB-P6	CATGGTTCCTGACCACACAG		
AnhisB-P7	ACCAACGAGACCAAATCCA	607	
AnhisB-P8	GGCAAACCTCTGCAATCCAT		
AnhisB-F	GGGGAATTCGAGCTC GCCGAACTACACT GCTGTCA (<i>EcoRI</i> , <i>SacI</i>)	1638	
AnhisB-R	GGGACTAGT CTGAGCCTCCATCTGGTCAT (<i>SpeI</i>)		
AnhisB-F1	GGGGTTGAGATCAGTGGAGA	1892	
AnpyrG-R1	TAATGCGGGAATGGAAAGAG		
AnamyR-P1	GGGGAATTC GATTGGCTCTCATCCCGATA (<i>EcoRI</i>)	1076	
AnamyR-P2	GGGGAGCTC AGTTTCGGTGGTCAAGATG G (<i>SacI</i>)		

AnamyR-P3	GGG <u>GGATCCT</u> TCATCTCCCCGTTCTTGTC (<i>Bam</i> HI)	1194	
AnamyR-P4	GGG <u>AAGCTT</u> CCTCATATTTTCGCCTTCCA (<i>Hind</i> III)		
AnamyR-orf-F	GGG <u>CACGTG</u> CCCTTCCCCAGATTTCTCTC (<i>Pml</i> I)	624	
AnamyR-orf-R	AATTGGTTGAGTCGGGTGAG		
AnhisB-M	ATTAGGACGGCGTGTACGAG	1731	
AnamyR-P6	GACGTGGGTCATGGAGAGTT		
AnlaeA-P1	GGG <u>GAATTC</u> GGTGCTAGGGAAGCCATGT A (<i>Eco</i> RI)	1407	***
AnlaeA-P2	GGG <u>ACTAGT</u> TGAAGTCCAAGGATCGGTTC (<i>Spe</i> I)		
AnlaeA-P3	GGG <u>TCTAGA</u> AAGGGCCATCCTACCTGTTCT (<i>Xba</i> I)	1163	
AnlaeA-P4	GGG <u>AAGCTT</u> CGACGTTCTCACAATCGAAC (<i>Hind</i> III)		
AnlaeA-P5	CCTATACAGCCTCCCAACCA	788	
AnlaeA-orf-R	CGTCAAGGAGATGGAATTGG		
AnphyA-orf-F	GGG <u>CACGTG</u> AATTGCTGCTGTGCAAGAA A (<i>Pml</i> I)	1729	Nghiên cứu này
AnphyA-orf-R	GGG <u>GCGCGC</u> AAGGGAATTGGGTTTGATT G (<i>Bss</i> HII)		
AnprtT-P1	GGG <u>GAATTC</u> GCTGCTGTTGTGGAAGACAC (<i>Eco</i> RI)	1202	
AnprtT-P2	GGG <u>GAGCTC</u> GGCAGGCAATCTGGAGAGT		

	A (<i>SacI</i>)		
AnprtT-P3	GGG<u>ACTAGTTACGTAG</u>CGGGACCTTGACT ATGAGGA (<i>SpeI, SnaBI</i>)	1257	
AnprtT-P4	GGGA<u>AAGCTT</u>TGCTGCCTTGGAAAAGAAA C (<i>HindIII</i>)		
AnprtT-P5	GATAAGCAGGGAACCGAACA	1067	
AnprtT-P6	ACCTGGGGAGTGATCTAGCA		
AnhisB-M	ATTAGGACGGCGTGTACGAG	1728	
AprtT-P7	TAATAATTCTCGGCGGCATC		
AnstuA-P1	AAG<u>AATTC</u>TGTGTCCTGCTTTCATGG (<i>EcoRI</i>)	1245	***
AnstuA-P2	GGG<u>AGCTC</u>AGTCAGATTCGGGGTGCAG (<i>SacI</i>)		
AnstuA-P3	AAGGAT<u>CC</u>CTGGTTCCCTTTCCTTGGAG (<i>BamHI</i>)	1102	
AnstuA-P4	GGT<u>CTAGAC</u>GGTCAGCCTTCAACTATG (<i>XbaI</i>)		
AnstuA-orf-F2	AAACGATCCCGTCTCATCCTTA	704	
AnstuA-orf-R	GGCTTAAGCCGACGACGCCATGAC		
AnstuA-orf-F	ATGAACCAAACACAATCCTACATCG	2340	
AnstuA-P5	ATACCCTGCCGTGCTGAAT		
AnhisB-M	ATTAGGACGGCGTGTACGAG	1756	Nghiên cứu này
AnstuA-R3	ATCCCAATCTGCACTTCCAC		
AnveA-P1	GGG<u>GAATTC</u>GCCTTTCCTGGGTTGGATTT (<i>EcoRI</i>)	1441	***

AnveA-P2	GGG <u>ACTAGT</u> ATTGACCTGCTGTGGCATT (<i>SpeI</i>)		Nghiên cứu này
AnveA-P3	AAAGGATCCGATCGACAGAAGGGAAACC A (<i>BamHI</i>)	1072	
AnveA-P4	GGGAAGCTTCGCAAGGGAGAAAAAGAGT G (<i>HindIII</i>)		
AnveA-orf-F	GGACTGGCTAAGGAGGAGGA	1033	
AnveA-cf-R	GCGTTCCTCATCAAAGTCGT		
AnhisB-M	ATTAGGACGGCGTGTACGAG	1761	
AnveA-P5	CCCGTAGTCGTGGTAGTCGT		
AoamyR-P1	GAGTCAGAGCCTAGCCAGAGCTGGTTTTTC CACGCCATCTCTA	1088	
AoamyR-P2	TGTAGTTCGGCACTAGTGAGCTTTCCTTTT CGGATGTTGAGG		
AoamyR-P3	GGGGGATCCTCACAACCCTATCCCGAATC (<i>BamHI</i>)	1102	
AoamyR-P4	GGGAAGCTTGCTACGTGCTGGAAGACTCC (<i>HindIII</i>)		
AoamyR-F	GGGGAGCTCTTCGCTATCCCTCGCTTTTA (<i>SacI</i>)	1157	
AoamyR-R	GGGACTAGTTTTTTGGTACGTGGTGGTGA (<i>SpeI</i>)		
AnhisB-M	ATTAGGACGGCGTGTACGAG	1829	
AoamyR-R1	GACGTGGGTCATGGAGAGTT		
AohisB-P1	ATTAAGATATCGAGCTCACTAGGGCTTCT CGCGTCTTGTAAC	1414	

AohisB-P2	GTAGAAGCTGCCCCGCGGACTAGGCTGATG GAGGATGGTGTTT		
AohisB-P3	CACGGGTAGTCTACCCTTCTAGAAAAGGA GGGCCAATTCTGT	1374	
AohisB-P4	CACAGTACACGAGGACTTCTAGGAACGGG ACTTTCCACTTCA		
AohisB-P5	CGAAAACCGTACATCGGACT	1630	
AohisB-P6	CCGGCTTTCAACTCCAAATA		
AohisB-P7	GGGGAATTC GCTGCGATCTGGAGAAAA C (<i>EcoRI</i>)	2463	
AohisB-P8	GGGAAGCTTACTAGTC GTACCGGGACAA GGAAGTA (<i>HindIII</i> , <i>SpeI</i>)		
AohisB-F	GCGTACAGCCTCCCTCACTA	625	
AohisB-R	AGAGTCACACCCGCTTCTTG		
AolaeA-P1	GGGGAATTC CCCCACTGCCCAGACATCTAT (<i>EcoRI</i>)	1221	
AolaeA-P2	GGGGAGCTC GAGGATTCAGGGGGAGAAT C (<i>SacI</i>)		
AolaeA-P3	GGGGGATCCT GTGGAAGTGTGATGGGAT G (<i>BamHI</i>)	1268	
AolaeA-P4	GGGAAGCTT ACTCACCCAAAACGCCATA A (<i>HindIII</i>)		
AolaeA-P5	CTGGTCACCGTCTTGGTTTT	1515	
AolaeA-P6	GCAACCTTTCTTTCGTGCTC		
AolaeA-P8	CCGAACCTCCTACCAGTACC	1667	
AnhisB-R1	CCTCGGATCAGCGACATAAT		

AostuA-del-F	GGG <u>GATATCCACGTG</u> TACCGGCTCTCAG TTTACCG (<i>EcoRV</i> , <i>PmlI</i>)	628	
AostuA-del-R	GGG <u>TCTAGAGCGCGC</u> ACGGCCAGAAAG AAGTACCA (<i>XbaI</i> , <i>BssHII</i>)		
AostuA-O5	ACGCTGCATAGCGATTTTCT	1761	
AnhisB-M	ATTAGGACGGCGTGTACGAG		
pyrG-orf-F	ATGTCTTCCAAGTCGCAATT	899	[106]
pyrG-orf-R	TATTGCGCACCAACACG		
AnpyrG-P4	GTCTTCTCATCCGCCATGTT	2083	***
AnpyrG-orf-R	ACTACCCGTGCTCGACATT		
AnpyrG-orf-F	TCTTTCCATTCCCGCATTA	1047	
AnpyrG-orf-R	ACTACCCGTGCTCGACATT		
AnpyrG-P5T	GGACTAGT <u>CCGCGG</u> GCAGCTTCTACTTGC TTGCAC (<i>SacII</i>)	1616	
AnpyrG-P6T	GG <u>TCTAGATA</u> TCGTAGACTACCCGTGCTCG ACATT (<i>XbaI</i>)		
AnpyrG-M1	GGG <u>GAATTC</u> GCAGCTTCTACTTGCTTGCA C (<i>EcoRI</i>)	1634	Nghiên cứu này
AnpyrG-M2	GGG <u>GAATTC</u> GACTACCCGTGCTCGACATT (<i>EcoRI</i>)		
DsRed-F	AA <u>CTCGAGCACGTGCTTAAGGATATCAT</u> GGCCTCCTCCGAGG (<i>XhoI</i> , <i>PmlI</i> , <i>AflII</i> , <i>EcoRV</i>)	729	[106]
DsRed-R	AA <u>GGATCCCCGCGGAGCTCGATATCC</u> TACAGGAACAGGTGGTGGC (<i>BamHI</i> , <i>SacII</i> , <i>SacI</i> , <i>EcoRV</i>)		

DsRed-cf-F	ATGGCCTCCTCCGAGG	678	Nghiên cứu này
DsRed-cf-R	CTACAGGAACAGGTGGTGGC		
GFP-F	ATGGTGAGCAAGGGCGAG	720	[106]
GFP-R	TCACTTGTACAGCTCGTCCATGC		
AfphyA-F	GGG <u>CACGTG</u> ATGAAAAAGCTATATAATG GCCGG (<i>PmlI</i>)	1510	Nghiên cứu này
AfphyA-R	GGG <u>GATCCT</u> CAACTAAAGCACTCTCCCA (<i>BamHI</i>)		
ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	597	***
ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC		
NAT-F	ACTGGATGGGTCCTTCACC	483	
NAT-R	CTCATGTAGAGCGCCTGCT		
NAT-F1	GAGCAGGCGCTCTACATGA	1574	
AnveA-P5	CCCGTAGTCGTGGTAGTCGT		
pyrG-RT-F	CGGAAACACAGTCCAAAAGC	196	Nghiên cứu này
pyrG-RT-R	CAAAGATCCCTTGGAGGTCA		
AnphyA-RT-F	GCGTCAAGTTCTACCAGCGATA	187	
AnphyA-RT-R	TCTGAAATGACCACGTGCATCT		
AngpdA-RT-F	TACGAGGAGGGTCTGATTGTCA	188	
AngpdA-RT-R	GAAGGAGCAGAGATGACGACCT		
AnabaA-RT-F	TATGTGGGTAAACGAGCCAGAC	194	
AnabaA-RT-R	AGATAATGTCGCAGTCCAACGA		
AnbrlA-RT-F	CTACCTCTGGGACCGATACACC	198	

AnbrlA-RT-R	ATTGGACTTGCTTGATGATGGA		
AnstuA-RT-F	AAACGATCCCGTCTCATCCTTA	177	
AnstuA-RT-R	CATACTCGGTCTCATGCTCTGG		
RT-HAL_nigF	GCACGAGACAGTCCCGTCTTA	138	[54]
RT-HAL_nigR	GGTTACCGCATCGAGTACCT		
RT-BZip_nigF	CTTCACATCATCTTCTGTGCTA	146	
RT-BZip_nigR	CACAGTCGGCGAGCCTAGAA		
RT-P450_nigF	GCAAGGGATCACGCCAGTGT	134	
RT-P450_nigR	GTCACCATGTAGCTGGACATCA		
RT-NRPS_nigF	CGAACATGCTCGAGCACGCTT	143	
RT-NRPS_nigR	CCACTCTTGCAACTGCTGTTGA		
RT-PKS_nigF	GTCCTGTCCGAGATTCGACGA	124	
RT-PKS_nigR	CTCCAATGAGAAGGTATGACGCA		
qFUM1nigF	CTCAGCATGTGGAGGTATTGGA	139	[55]
qFUM1nigR	GATGCTGGCACGCGGAATGT		
RT-Anact-F	CTGCTCTTGCTCCTTCTTCCAT	138	

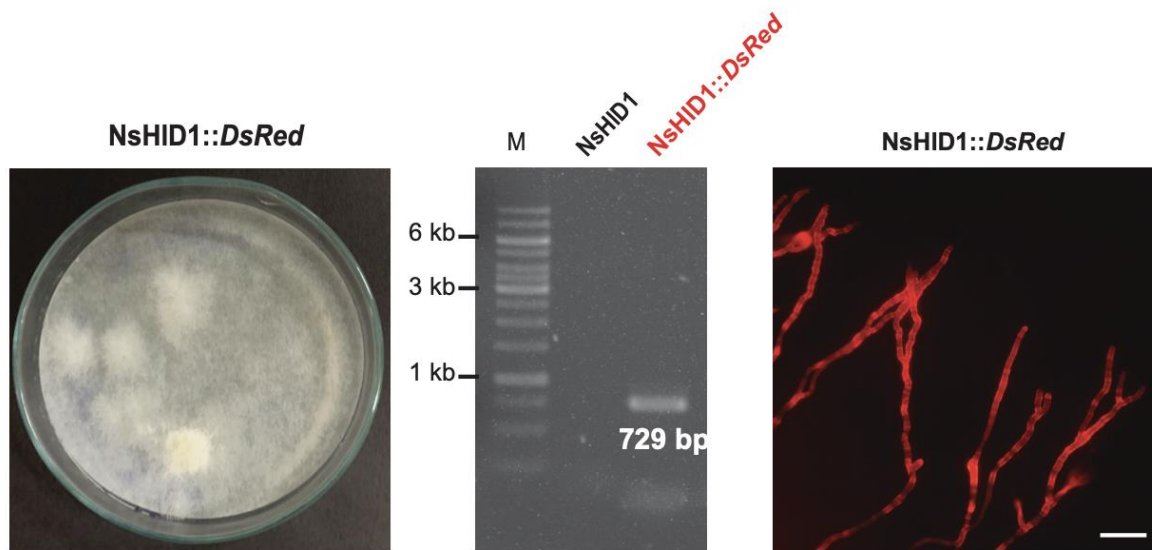
RT-Anact-R	CGTCGTA ^{CT} CCTGCTTGGAGAT		Nghiên cứu này
RT-AnsarA-F	CTCGTCGTCTGTGGAAGGACTA	164	
RT-AnsarA-R	GATCTTGTTTCCGAGGATCAGG		
RT-Ancox5-F	GGTGTGCAGTGGATGGGTAGTA	123	
RT-Ancox5-R	GTAGAACAGAGGCGAAGGATCG		

Chú thích: *** Các cặp mồi được cung cấp bởi Phòng Genomic, Phòng Thí nghiệm Trọng điểm Công nghệ Enzym và Protein (KLEPT), Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội.

PHỤ LỤC 3. Danh mục thiết bị sử dụng trong nghiên cứu

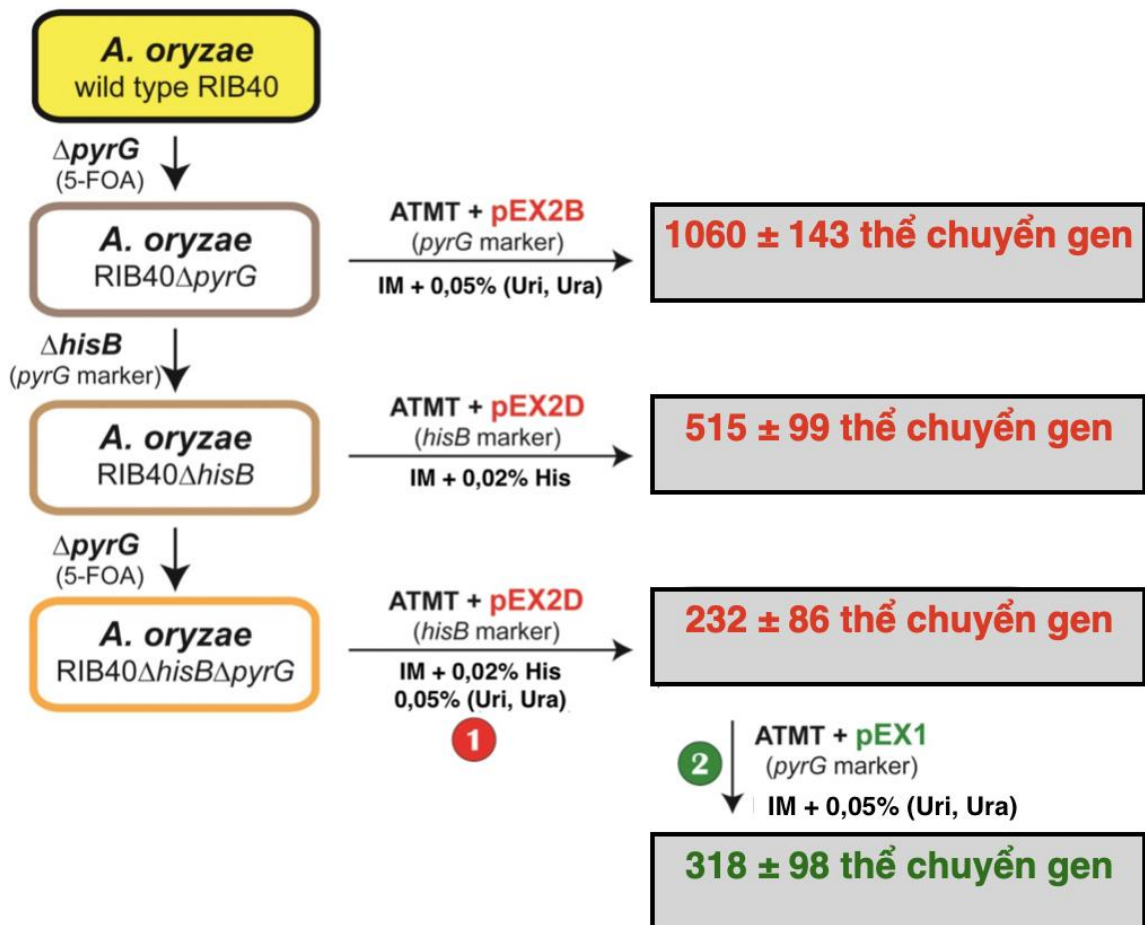
Tên thiết bị	Xuất xứ
Bể điện di nằm ngang Bio-Rad	Mỹ
Cân kỹ thuật điện tử Precisa	Thụy Sĩ
Kính hiển vi quang học Olympus	Nhật Bản
Kính hiển vi huỳnh quang Carlzeiss	Đức
Lò vi sóng Panasonic	Nhật Bản
Máy chuyển gen bằng xung điện Bio-Rad	Mỹ
Máy đo pH Meter F-51	Thụy Sĩ
Máy đo quang phổ Thermo	Mỹ
Máy heat-block Corning	Mỹ
Máy lắc	Trung Quốc
Máy ly tâm lạnh Eppendorf	Đức
Máy ly tâm Sigma	Mỹ
Máy ly tâm thường Eppendorf	Đức
Máy PCR Bio-Rad MyCycler	Mỹ
Máy soi gel Bio-Rad	Mỹ
Máy vortex Cyclone	Anh
Nồi khử trùng ALP	Nhật Bản
Pipetman, Gilson	Pháp
Thiết bị khuấy từ IKA RET basic	Đức
Tủ âm Sanyo	Nhật Bản
Tủ cấy vi sinh an toàn cấp 2 Nuair	Mỹ
Tủ lạnh Hitachi	Nhật Bản
Tủ ổn nhiệt Memmert	Đức
Tủ sấy Memmert	Đức

PHỤ LỤC 5. Kết quả biểu hiện protein phát huỳnh quang đỏ DsRed ở chủng NsHID1 khuyết dưỡng histidine

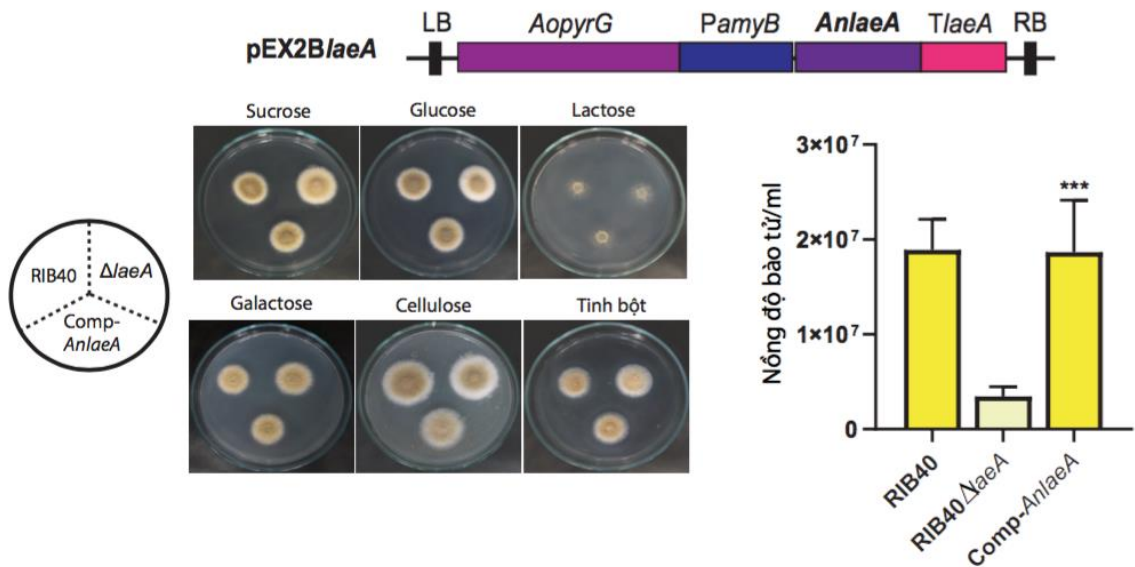


Chú thích: Khuẩn lạc nấm xuất hiện trên môi trường chọn lọc M+Met có bổ sung cefotaxime (300 mg/l) sau 5 ngày ở 30°C. Kết quả xác nhận sự tích hợp của gen *DsRed* vào hệ gen nấm nhờ PCR với cặp mồi đặc hiệu DsRed-F/DsRed-R và sự phát quang của chủng chuyển gen ở bước sóng thích hợp. Vector pEX2D được sử dụng cho chuyển gen. M là DNA marker 1 kb (Thermo Fisher Scientific, Mỹ).

PHỤ LỤC 6. Sơ đồ tóm tắt hiệu suất chuyển gen với các marker trợ dưỡng khác nhau ở *A. oryzae*



PHỤ LỤC 7. Kết quả bổ trợ chéo gen *laeA* từ *A. niger* vào *A. oryzae* RIB40



Chú thích: Cấu trúc pEX2*BlaeA* chứa toàn bộ vùng ORF của gen *laeA* từ *A. niger* được sử dụng để chuyển gen vào chủng RIB40Δ*laeA*Δ*pyrG*. Khả năng sinh trưởng trên một số nguồn cacbon khác nhau của chủng bổ trợ chéo so với chủng hoang dại RIB40 và chủng đột biến xoá gen *laeA* (RIB40Δ*laeA*). Các đĩa được ủ ở 30°C trong 4 ngày. Khả năng phục hồi sự hình thành bào tử của chủng bổ trợ chéo *laeA* từ *A. niger*. Nồng độ bào tử trung bình ± SD và sự khác biệt có ý nghĩa thống kê được kiểm định Student's t-test, *** p < 0,001.

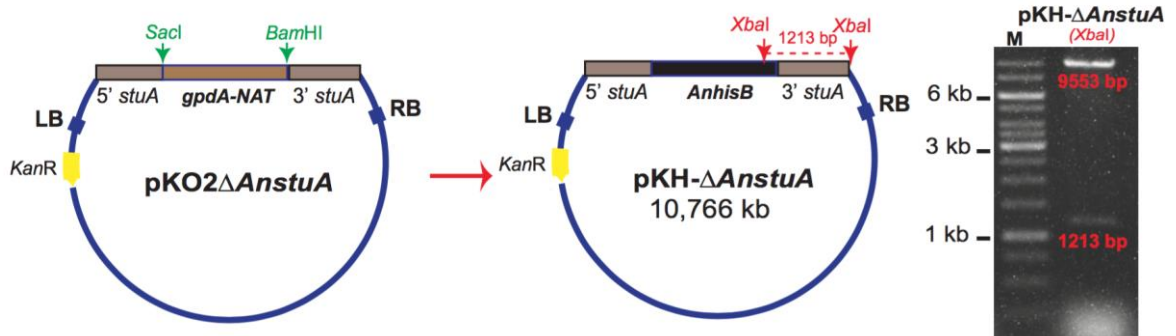
PHỤ LỤC 8. Mức độ tương đồng của protein LaeA ở một số loài nấm sợi

<i>P. chrysogenum</i>	MSYRESSGSPAPDRSTSLPKMFTNGDSRLRHLPPISSPPPKRYKSESTPGSDAGHSRY	60
<i>A. niger</i>	-----MFEISRLL--HQPITMASPNRN-----NYSY	24
<i>A. nidulans</i>	-----MFEMGPVG--TRLPAMTSPAHN-----HYSY	24
<i>A. oryzae</i>	-----MFGNGQGTG--QRLPAMASPPHD-----SYY-	23
<i>A. fumigatus</i>	-----MFLNGQGG--QRPPMVAFPPLN-----VRGS	24
<i>P. chrysogenum</i>	SHSVASDRTRSRQPS SAMDLYTLIDRDPVDKDP--RNARFTSNGSVATQASHASNASQI	118
<i>A. niger</i>	QGIESYDSGRSRQNSDAMD IHVITAQEPPREPP--DNNDPYDGHGGPAGT-----	72
<i>A. nidulans</i>	HSPTSSDRGRSRQNSDAMD IQSITEREPATRYAVAGGPAPWNRNGSPSMS-----	74
<i>A. oryzae</i>	--SQSLASSRSRNSDAMD IYAITDRDPPAREP--SGYSQWYRNGSPSVN-----	69
<i>A. fumigatus</i>	ISSGFNALGRSRNNSDAMD IYITDRGPAERD--PAAGRWHANGSPSIN-----	72
<i>P. chrysogenum</i>	SRSSPIIISDRKIPKYPNHKENGMYHGYRKG IYPLPCDEEQDRLDIFHKLFTVARAE	178
<i>A. niger</i>	-----SHYSKPPNRWLFYEENGRTYHG YRRGVYPLPCDEQEQRDLDFHKLFTVARMS	125
<i>A. nidulans</i>	-----PMYSNNSERNQFHEENGRTYHGFR RGMYP LPCDEQEQRDLDFHKLFTVARVS	127
<i>A. oryzae</i>	-----SIHSKSSEKQPFYEENGRMYHAYR KGVYMLPCDEQEQRDLDFHKLFTVARVS	122
<i>A. fumigatus</i>	-----STSSKNPDRYPCYQENGRTYHG YRKG IYMLPCDEQEQRDLDFHKLFTVARVS	125
<i>P. chrysogenum</i>	DGLIYAPHPGSRILDLGCGGTGIWS IEVANKFPGSFVVGVDLAPIQPTNTPKNCDFYAPF	238
<i>A. niger</i>	ESLIYAPHPNNGRFLDLGCGGTGIWA IDVAHKYPNAFVAGVDLAPIQPPNHPDNCFYAPF	185
<i>A. nidulans</i>	ESLIYAPHTNGRFLDLGCGGTGIWA IEVANKYPDAFVAGVDLAPIQPPNHPKNCDFYAPF	187
<i>A. oryzae</i>	DGLMYAPHPNNGRFLDLGCGGTGIWA IDVANKYPDAFVVGVDLAPIQPSNHPKNCDFYAPF	182
<i>A. fumigatus</i>	DGLIYAPHTNGRFLDLGCGGTGIWA IDVANKYPEAFVVGVDLAPIQPPNHPKNCDFYAPF	185
<i>P. chrysogenum</i>	DFEAPWTMGEDSWDI IHMQMCGGSVAS WPSLYRRVFQHLKPGGWFEQVE IDFRPRVEDKD	298
<i>A. niger</i>	DFEAPWTLGENSWDLIHLQMGCGSVLGW QNLYKRI LRHLQPGAWFEQVE IDFEPRCDDRS	245
<i>A. nidulans</i>	DFEAPWAMGEDSWDLIHLQMGCGSVMGWPNLYRRI FAHLRPGAWFEQVE IDFEPRCDDRS	247
<i>A. oryzae</i>	DFESPWAMGEDSWDLIHLQMGCGSVMGWPNLYRRI FAHLRPGAWFEQVE IDFEPRCDDRP	242
<i>A. fumigatus</i>	DFESLWALGEDSWDLIHMQMCGGSVAS WPNLYRRI YSHLRPGAWFEQVE IDFEPRCDDRS	245
<i>P. chrysogenum</i>	GEPGRAMANWYSTLKHATEATMRPLAHS NETIRNLQEAGFTE IDHQIVGLPMNPWHPDS	358
<i>A. niger</i>	-LNGLALREWYQYLKQATQDTRPIAHS SRDTIRHLEAGFTQIDHQVMGLPLNPWHRDE	304
<i>A. nidulans</i>	-LDGTALRHWDCLKQATAETMRPIAHS SRDTIKDLQDAGFTE IDHQIVGLPLNPWHQDE	306
<i>A. oryzae</i>	-LEGLAIRQWYQYLKQATQDAMRPIHN SRDTIRDLQEAGFTDIDHQVMGLPLNPWHQDE	301
<i>A. fumigatus</i>	-LEGLAIRQWYQLKQATEETMRPVAHNS RETIRNLQEAGFTE IDHQVMGLPLNPWHEDE	304
<i>P. chrysogenum</i>	HEQKVARWYNLAI SEVQPMCLAPFSRVL SWTREQIDRIAFDVKQEA FDKRIKTYNLHI	418
<i>A. niger</i>	HEQKVARWYNLAI SESIETLSLAPFSRIF HWDLDRIRQITAEVKSQAFNKE IHAYNILHI	364
<i>A. nidulans</i>	HERKVARWYNLAVSESIENLSLAPFSR VYRWPLERIQQLAADVKSEAFNKE IHAYNILHI	366
<i>A. oryzae</i>	HERKVARWYNLAVSESIESLSMAPFSRIF NWDLDRIRRI SSEVKSEAFNKE IHAYNILHI	361
<i>A. fumigatus</i>	HERRVARWYNLAI SESIETMSLAPFSR VFGWPIERIKQIAADVKSEAFNKE IHTYNILHI	364
<i>P. chrysogenum</i>	YQARKPVEE--	427
<i>A. niger</i>	YQARKPGGPSL	375
<i>A. nidulans</i>	YQARKPLR---	374
<i>A. oryzae</i>	YQARKPAN---	369
<i>A. fumigatus</i>	YQARKPLAN--	373

Độ tương đồng (%)

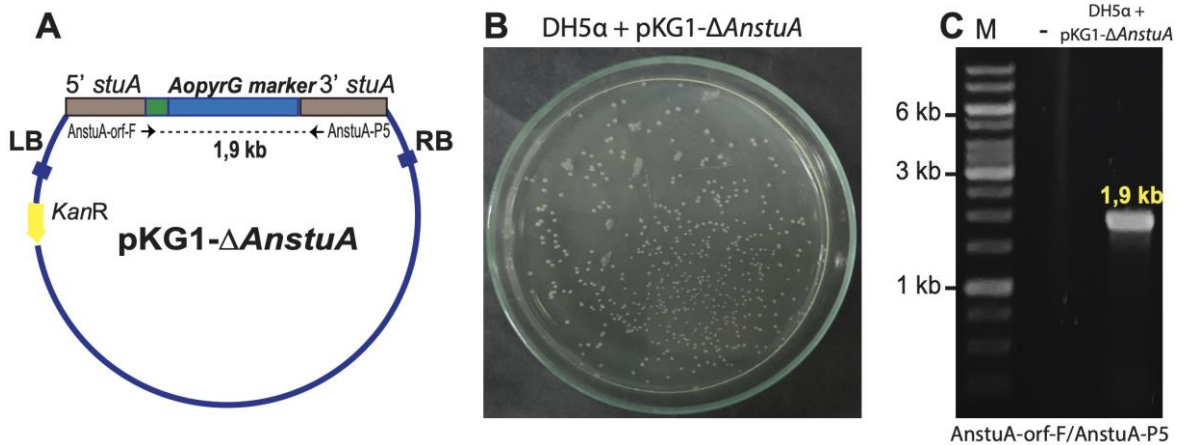
<i>A. oryzae</i> LaeA	100%
<i>A. fumigatus</i> LaeA	77,03%
<i>A. nidulans</i> LaeA	76,61%
<i>A. niger</i> LaeA	75,21%
<i>P. chrysogenum</i> LaeA	62,16%

PHỤ LỤC 9. Cấu trúc xoá gen *stuA* ở *A. niger*



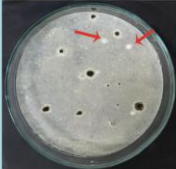
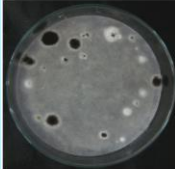
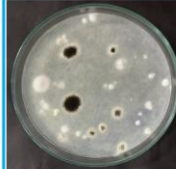
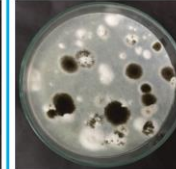
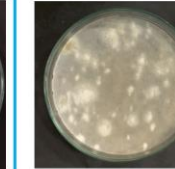
Chú thích: Vector pKH- Δ AnstuA dùng để xoá *stuA* ở *A. niger* với marker chọn lọc là gen *hisB* được tạo nhờ thay thế gen kháng kháng sinh nourseothricin ở vector pKO2 Δ AnstuA. Vector pKH- Δ AnstuA mới tạo được kiểm tra nhờ xử lý với enzyme cắt giới hạn *XbaI*. M là DNA marker 1 kb (Thermo Fisher Scientific, Mỹ).

PHỤ LỤC 10. Cấu trúc xoá gen *stuA* ở *A. niger* sử dụng marker chọn lọc *pyrG*

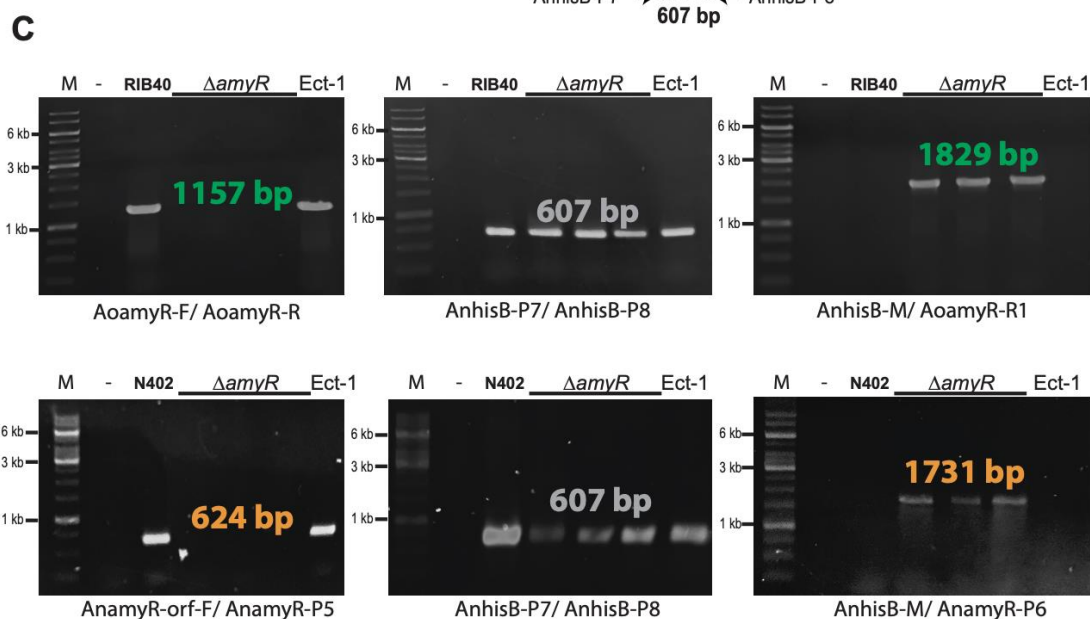
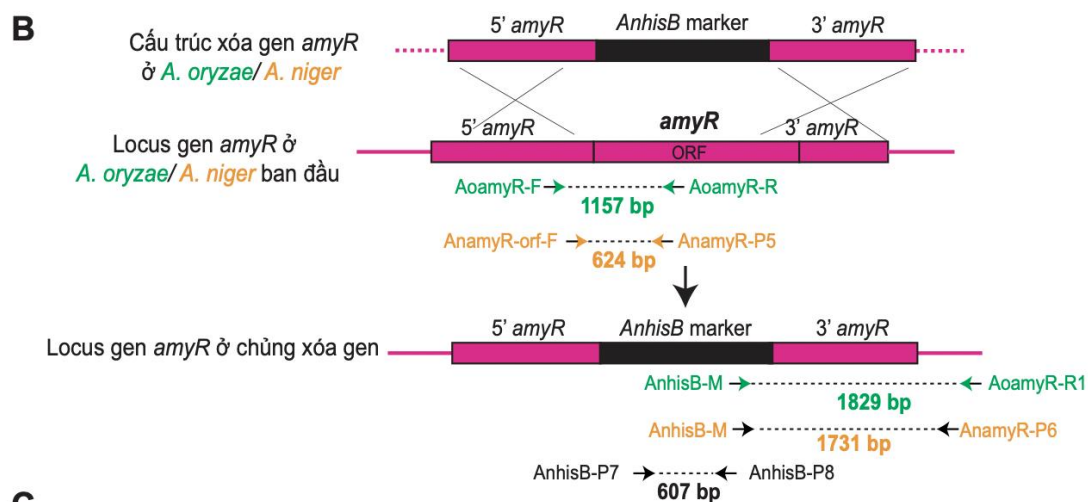
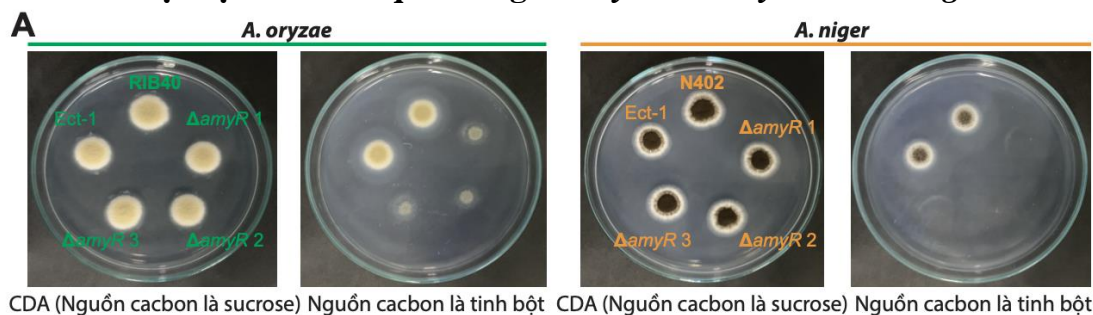


Chú thích: (A) Vector xoá *stuA* ở *A. niger* (pKG1- Δ AnstuA) được cung cấp bởi Phòng Genomic, Phòng Thí nghiệm Trọng điểm Công nghệ Enzym và Protein, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội. (B) Kết quả biến nạp vector pKG1- Δ AnstuA vào *E. coli* DH5 α . (C) Xác nhận cấu trúc pKG1- Δ AnstuA nhờ PCR với cặp mồi AnstuA-orf-F/AnstuA-P5. M là DNA marker 1 kb (Thermo Fisher Scientific, Mỹ).

PHỤ LỤC 11. Kết quả so sánh hiệu suất xóa gen *stuA* ở nấm sợi *A. niger* N402 với các marker chọn lọc khác nhau

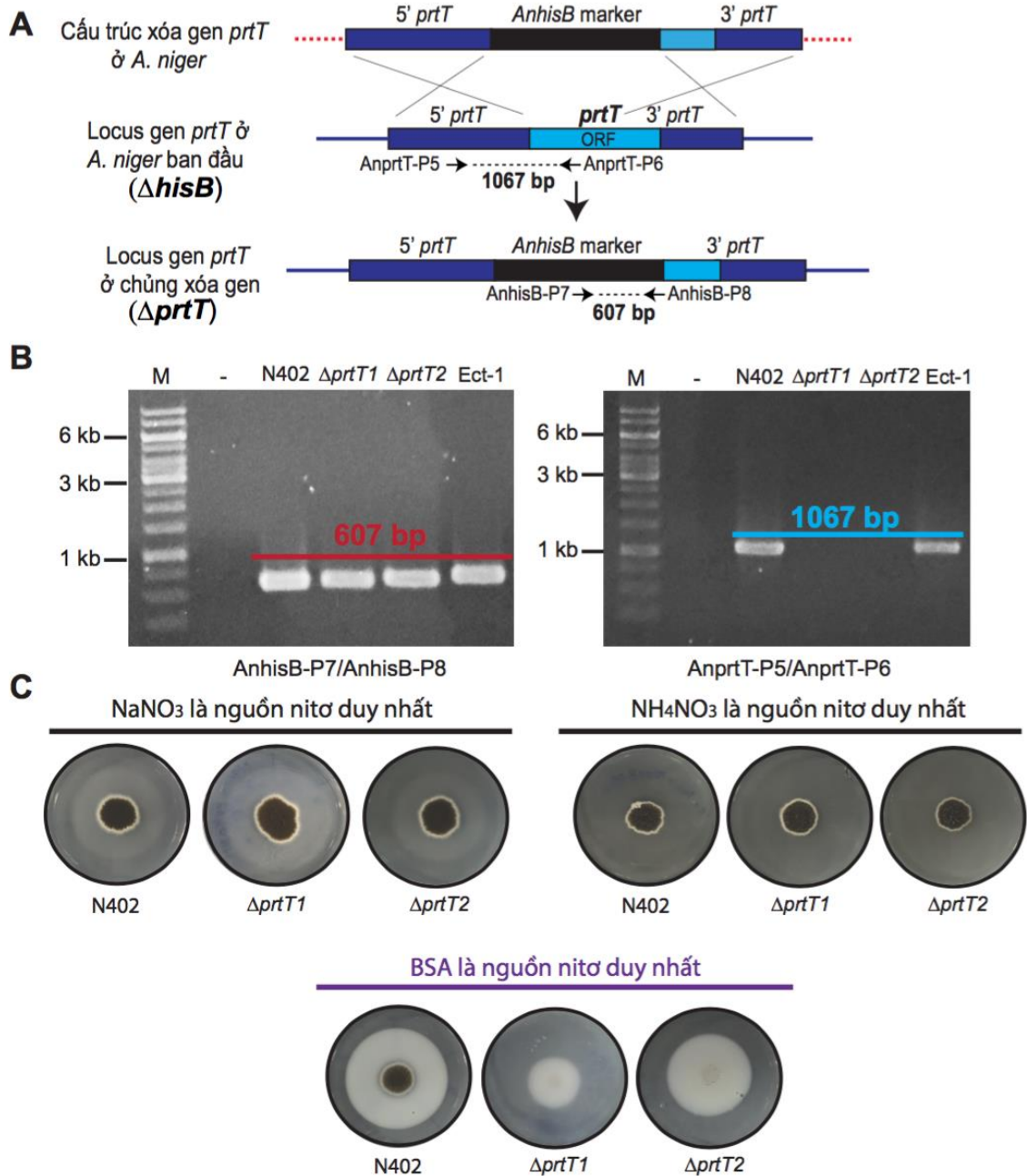
Chủng nền dùng cho chuyển gen	N402	N402Δ<i>pyrG</i>	N402Δ<i>hisB</i>	N402Δ<i>hisB</i>Δ<i>pyrG</i>	N402Δ<i>hisB</i>Δ<i>pyrG</i>
Marker chọn lọc	Gen kháng kháng sinh Nourseothricin	<i>pyrG</i>	<i>hisB</i>	<i>hisB</i>	<i>hisB</i> (Có thêm marker <i>pyrG</i> để sàng lọc)
Kết quả chuyển gen					
Tỷ lệ xóa gen thành công	6,52%	12,5%	37,6%	39,46%	80,13%

PHỤ LỤC 12. Kết quả xoá gen *amyR* ở *A. oryzae* và *A. niger*



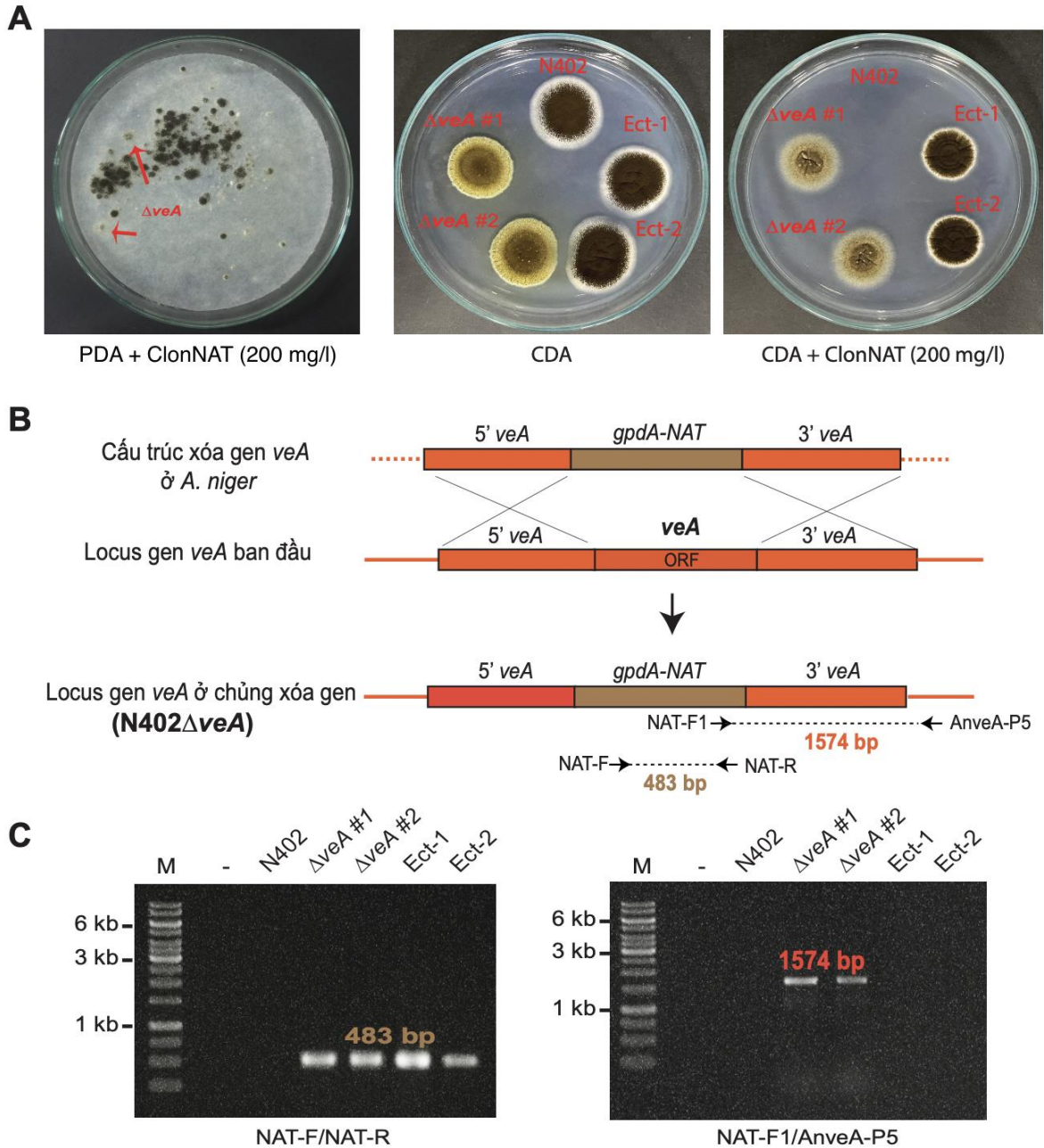
Chú thích: (A) Kết quả sàng lọc các chủng chuyển gen xoá *amyR* trên môi trường CDA và môi trường CDA với tinh bột là nguồn cacbon duy nhất. Các đĩa được ủ ở 30°C trong 4 ngày. (B) Sơ đồ xác nhận xoá *amyR* nhờ PCR với các vị trí bám môi đặc hiệu. (C) Kết quả xác nhận xoá gen *amyR* nhờ PCR với các cặp môi đặc hiệu (-) là đối chứng âm. M là DNA marker 1 kb (Thermo Fisher Scientific, Mỹ).

PHỤ LỤC 13. Kết quả xóa gen *prtT* ở *A. niger*



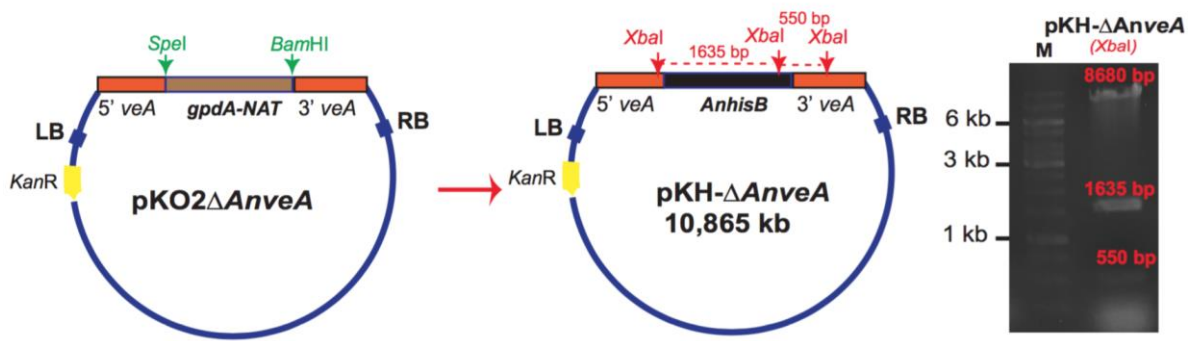
Chú thích: (A) Sơ đồ xác nhận xóa *prtT* nhờ PCR với các vị trí bám mồi đặc hiệu. (B) Kết quả xác nhận xóa gen *prtT* nhờ PCR với các cặp mồi AnhisB-P7/AnhisB-P8 và AnprtT-P5/AnprtT-P6. (-) là đối chứng âm. M là DNA marker 1 kb (Thermo Fisher Scientific, Mỹ). (C) Kết quả kiểm tra các chủng xóa gen *prtT* trên môi trường CDA sử dụng các nguồn nitơ khác nhau. Các đĩa được ủ ở 30°C trong 4 ngày.

PHỤ LỤC 14. Kết quả xoá gen *veA* ở *A. niger* N402 sử dụng marker chọn lọc là gen kháng kháng sinh nourseothricin (NAT)



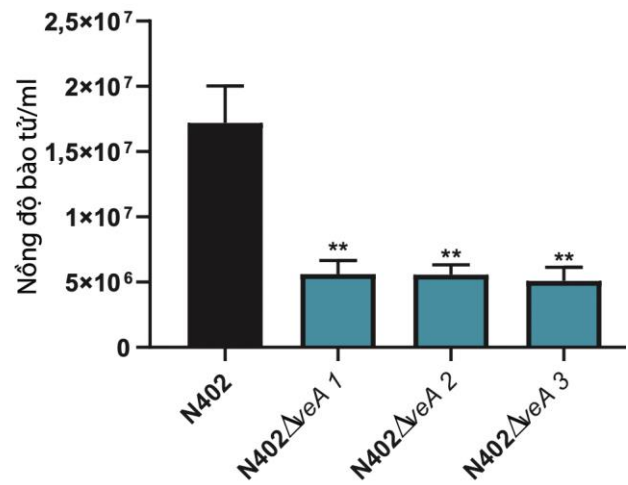
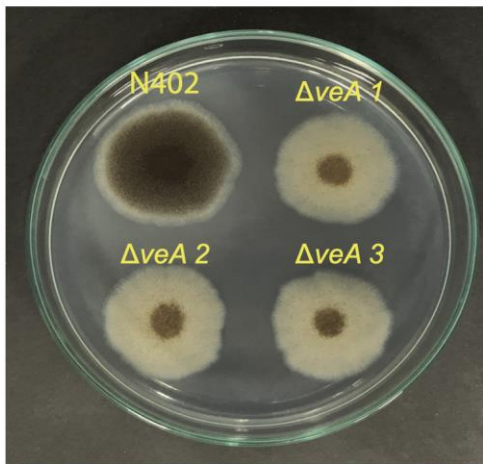
Chú thích: (A) Kết quả xoá gen *veA* ở *A. niger* N402 sử dụng phương pháp ATMT và marker chọn lọc là gen kháng kháng sinh nourseothricin. Các đĩa được ủ ở 30°C trong 5 ngày. (B) Sơ đồ xác nhận xoá *veA* nhờ PCR với các vị trí bám mồi đặc hiệu. (C) Kết quả xác nhận xoá gen *veA* nhờ PCR với các cặp mồi NAT-F/NAT-R và NAT-F1/AnveA-P5. (-) là đối chứng âm. M là DNA marker 1 kb (Thermo Fisher Scientific, Mỹ).

PHỤ LỤC 15. Cấu trúc xoá gen *veA* ở *A. niger*



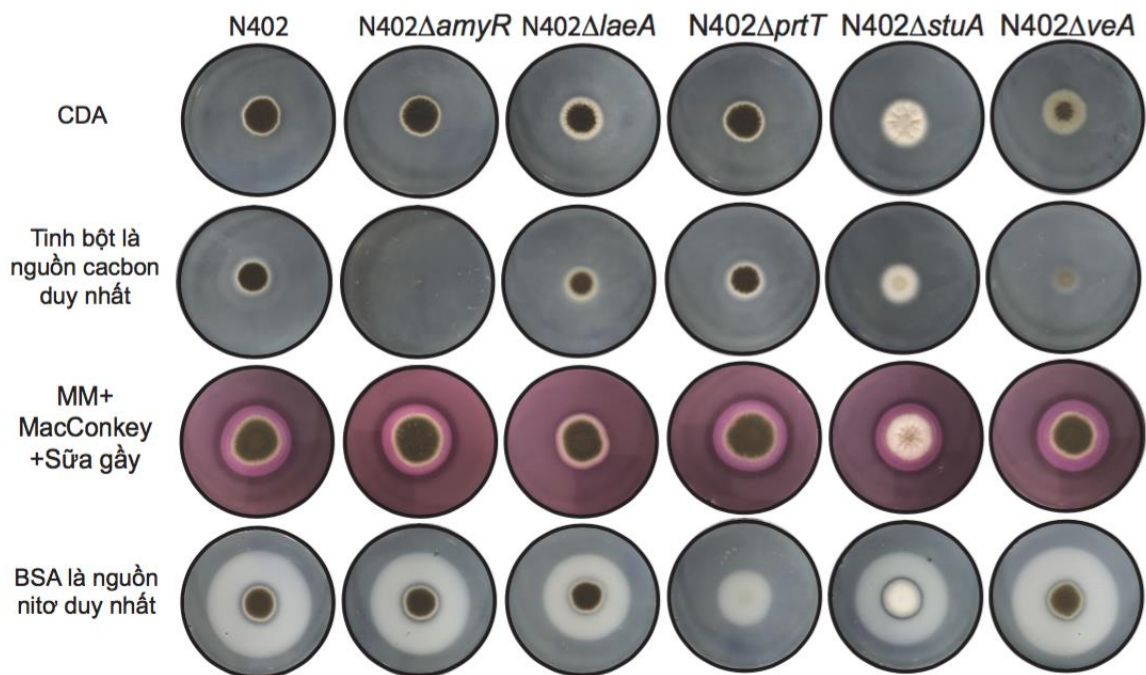
Chú thích: Vector pKH- Δ AnveA dùng để xoá *veA* ở *A. niger* với marker chọn lọc là gen *hisB* được tạo nhờ thay thế gen kháng kháng sinh nourseothricin ở vector pKO2 Δ AnveA. Vector pKH- Δ AnveA mới tạo được kiểm tra nhờ xử lý với enzyme cắt giới hạn *Xba*I. M là DNA marker 1 kb (Thermo Fisher Scientific, Mỹ).

PHỤ LỤC 16. Khả năng hình thành bào tử của chủng xoá gen *veA* ở *A. niger*



Chú thích: 10 μ l bào tử (10^6 bào tử/ml) được cấy điểm trên các đĩa môi trường PDA. *A. niger* N402 được sử dụng làm đối chứng. Các đĩa được ủ ở 30°C trong 4 ngày.

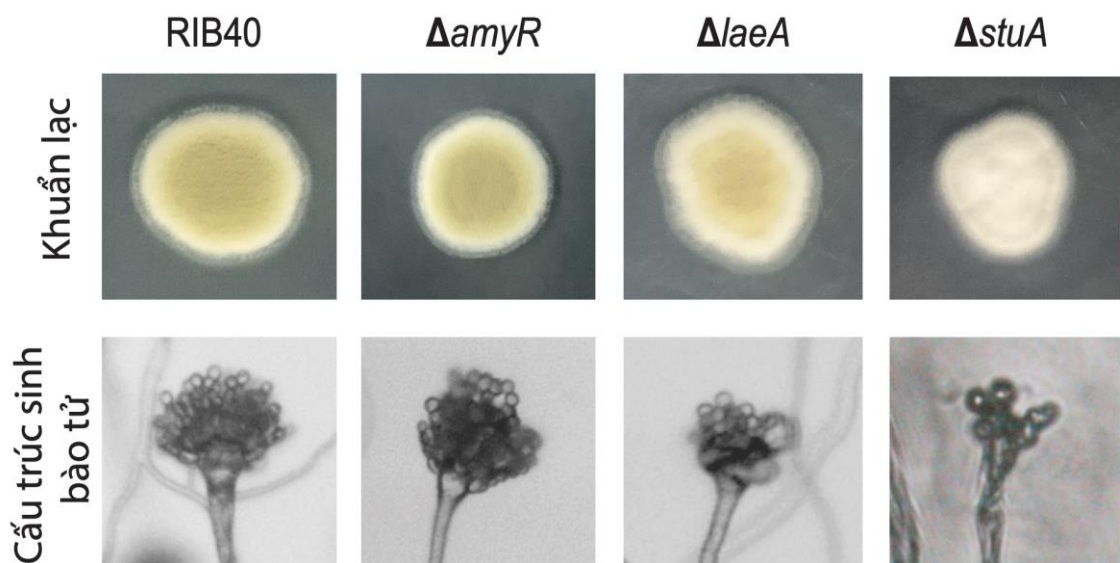
PHỤ LỤC 17. Đặc điểm hình thái của các chủng đột biến xóa gen trên các môi trường đặc hiệu



Chú thích: 10 μ l bào tử (10^6 bào tử/ml) được cấy điểm trên các đĩa môi trường khác nhau. *A. niger* N402 được sử dụng làm đối chứng. Các đĩa được ủ ở 30°C trong 4 ngày; đối với môi trường MM+MacConkey+Sữa gầy, các đĩa được ủ ở 30°C trong 3 ngày.

PHỤ LỤC 18. Đặc điểm hình thái và cấu trúc cuống sinh bào tử của các chủng

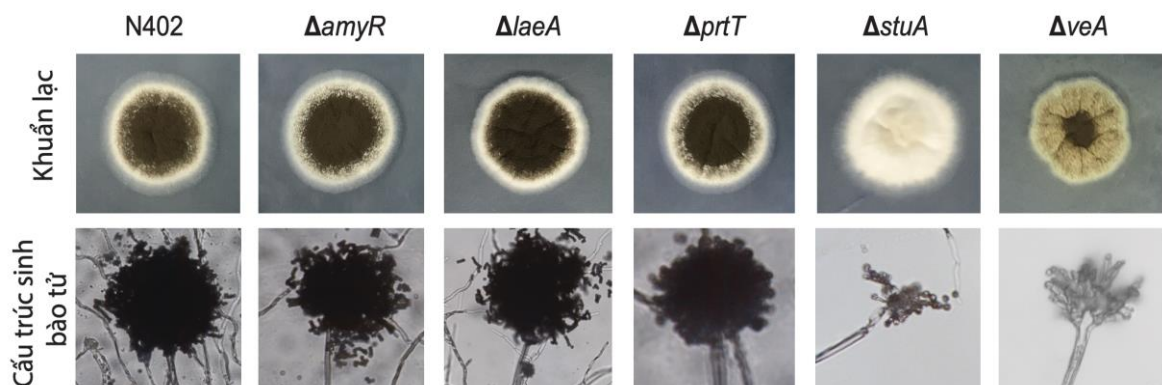
A. oryzae



Chú thích: Các chủng *A. oryzae* được nuôi cấy trên môi trường CDA ở 30°C trong 4 ngày và nuôi cấy trên CDA bằng phương pháp nuôi cấy trên tiêu bản trong 3 ngày ở 30°C. Tiêu bản được sử dụng để quan sát trực tiếp dưới kính hiển vi Olympus với độ phóng đại 400 lần.

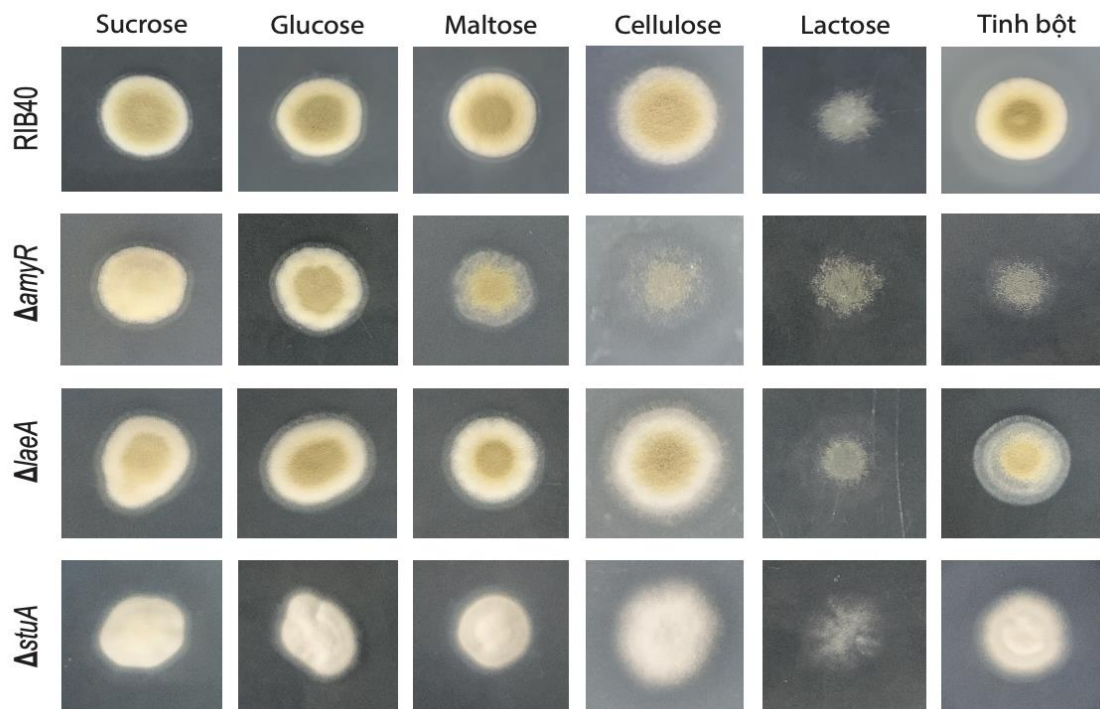
PHỤ LỤC 19. Đặc điểm hình thái và cấu trúc cuống sinh bào tử của các chủng

A. niger



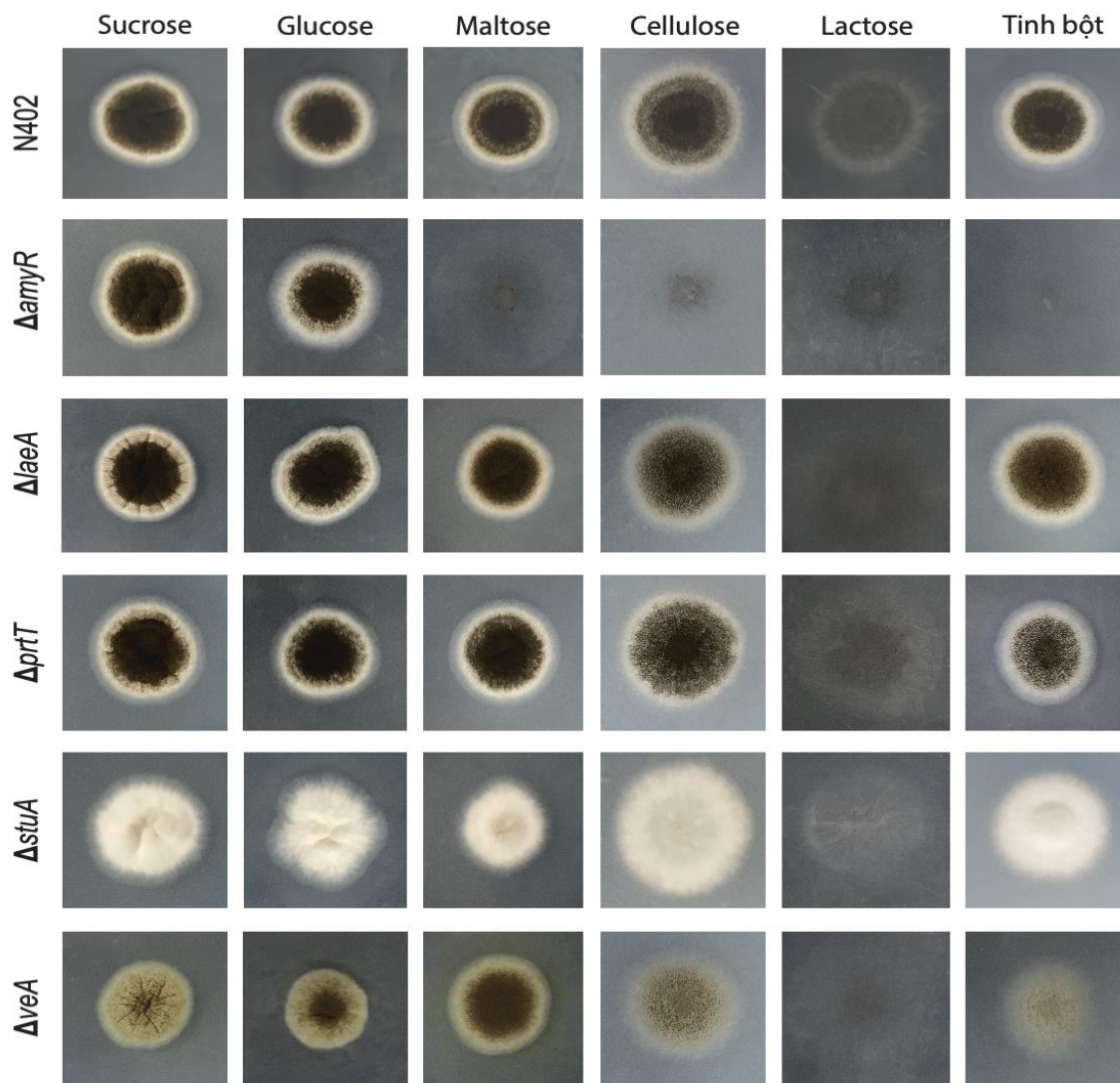
Chú thích: Các chủng *A. niger* được nuôi cấy trên môi trường CDA ở 30°C trong 4 ngày và nuôi cấy trên CDA bằng phương pháp nuôi cấy trên tiêu bản trong 3 ngày ở 30°C. Tiêu bản được sử dụng để quan sát trực tiếp dưới kính hiển vi Olympus với độ phóng đại 400 lần.

PHỤ LỤC 20. Khả năng sinh trưởng của các chủng *A. oryzae* trên các nguồn cacbon khác nhau



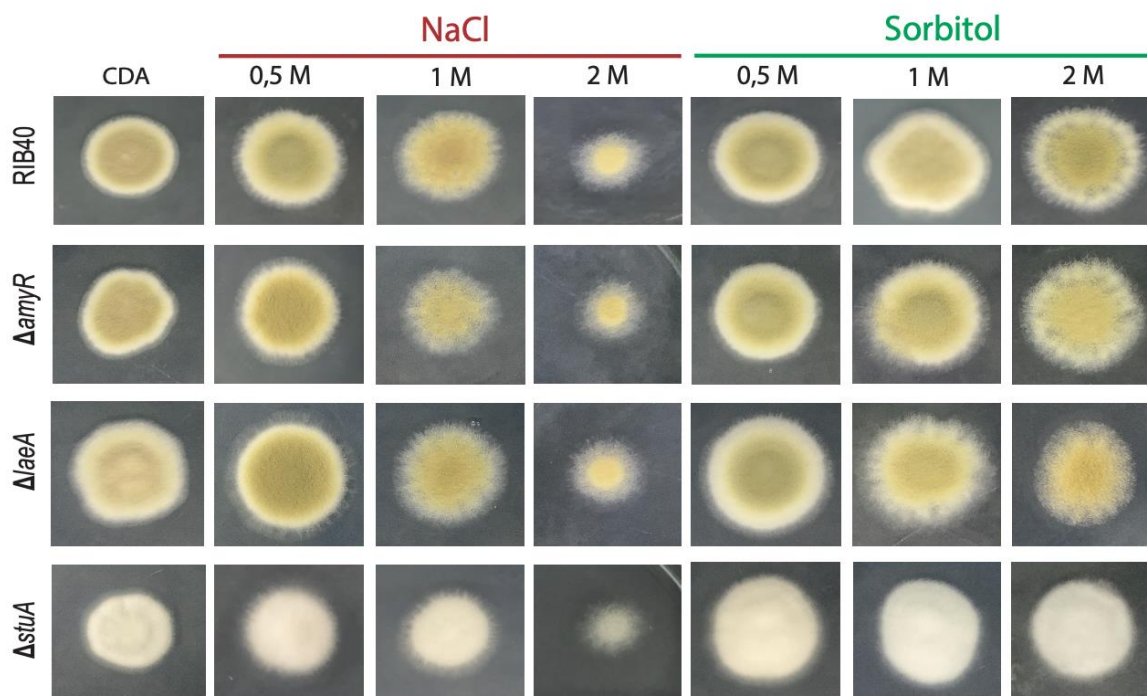
Chú thích: *A. oryzae* RIB40 được sử dụng làm đối chứng. Các đĩa được ủ ở 30°C trong 4 ngày.

PHỤ LỤC 21. Khả năng sinh trưởng của các chủng *A. niger* trên các nguồn cacbon khác nhau



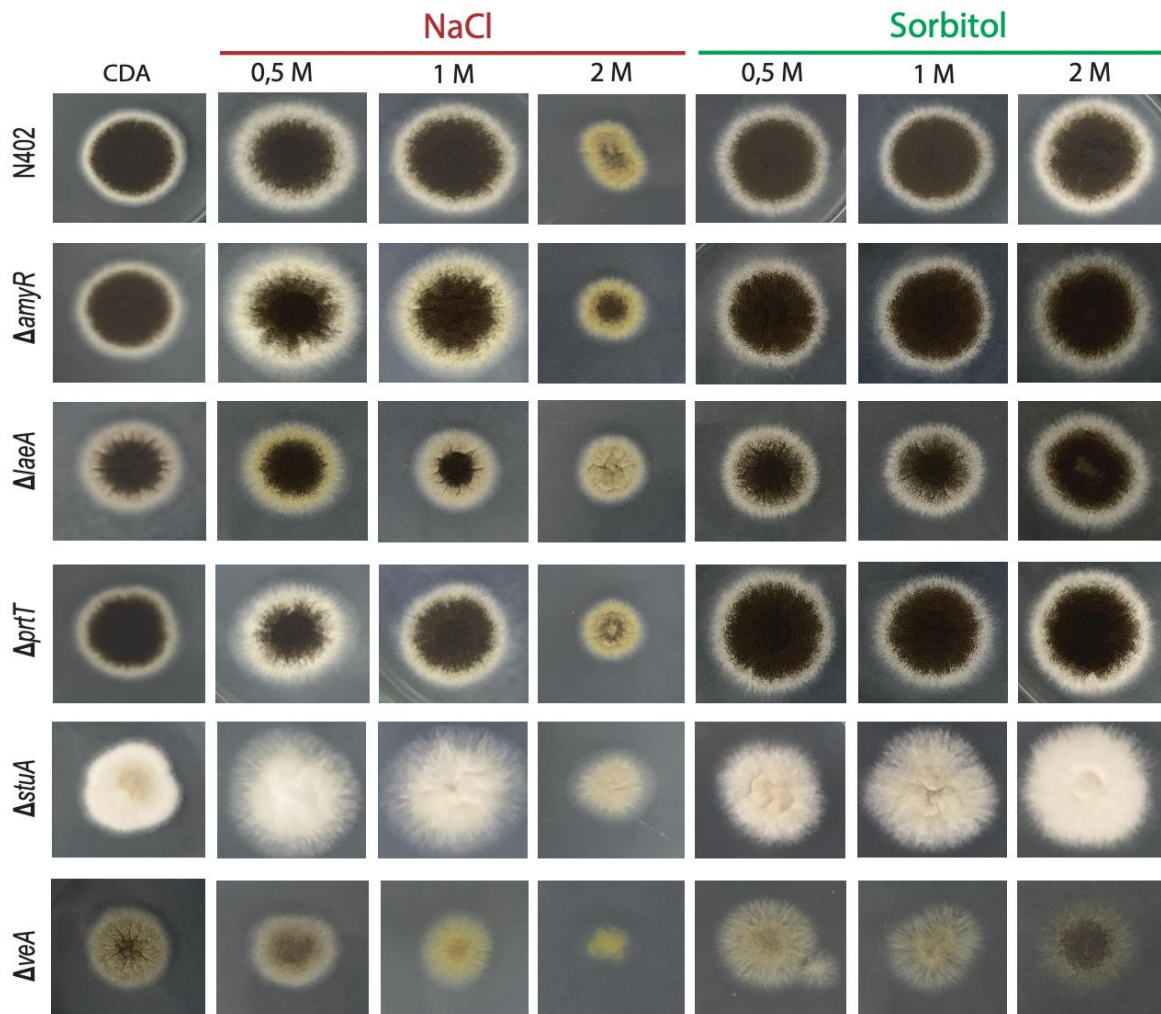
Chú thích: *A. niger* N402 được sử dụng làm đối chứng. Các đĩa được ủ ở 30°C trong 4 ngày.

PHỤ LỤC 22. Khả năng đáp ứng stress thẩm thấu NaCl và sorbitol của các chủng *A. oryzae* với các nồng độ khác nhau



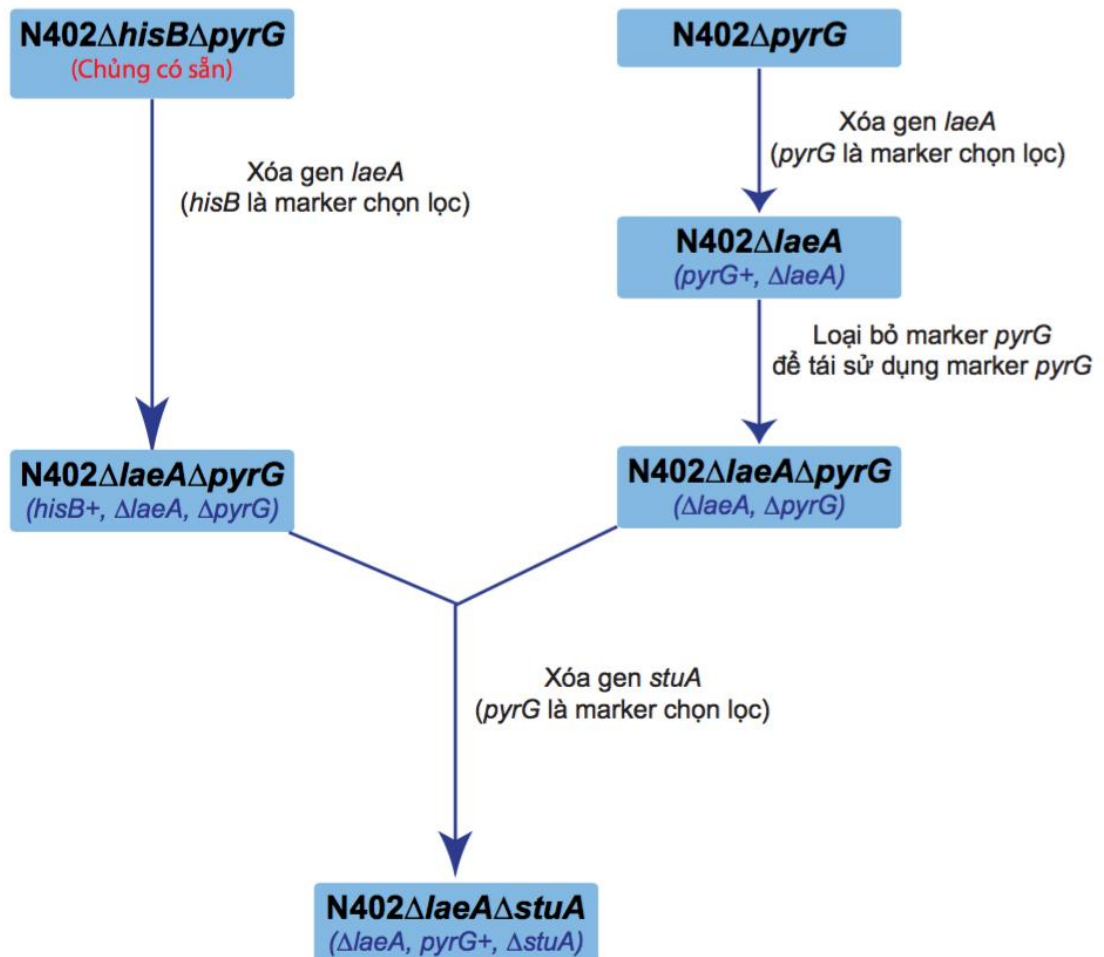
Chú thích: *A. oryzae* RIB40 được sử dụng làm đối chứng. Các đĩa được ủ ở 30°C trong 4 ngày.

PHỤ LỤC 23. Khả năng đáp ứng stress thẩm thấu NaCl và sorbitol của các chủng *A. niger* với các nồng độ khác nhau

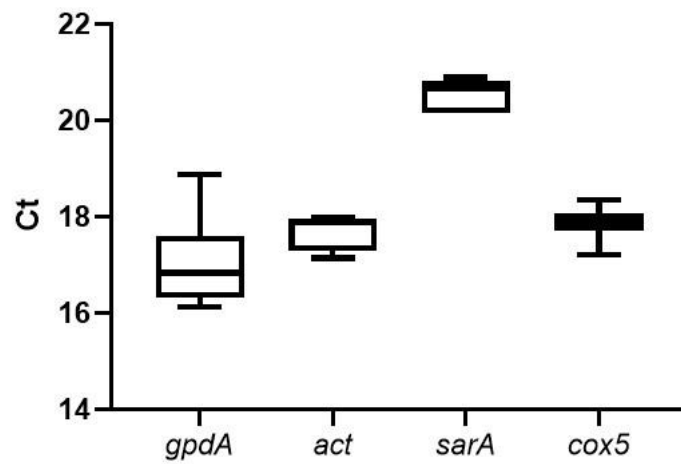


Chú thích: *A. niger* N402 được sử dụng làm đối chứng. Các đĩa được ủ ở 30°C trong 4 ngày.

PHỤ LỤC 24. Sơ đồ so sánh quá trình tạo chủng đột biến xoá kép *laeA* và *stuA* ở *A. niger* N402 ($N402\Delta laeA\Delta stuA$) với việc sử dụng 2 marker chọn lọc và tái sử dụng marker chọn lọc *pyrG*

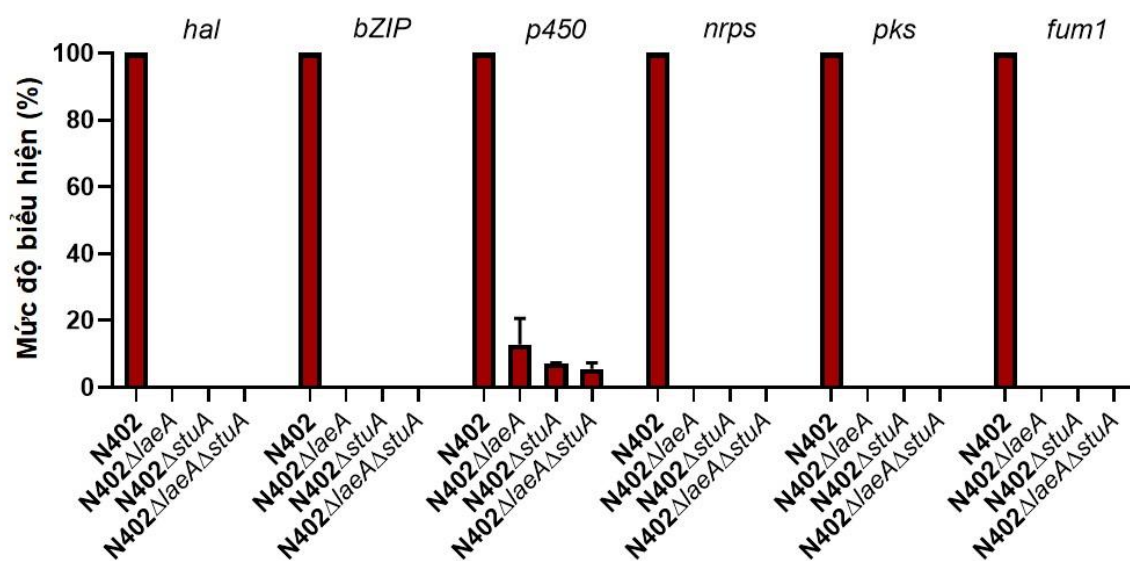


PHỤ LỤC 25. Sự phân phối các giá trị ngưỡng chu kỳ (Ct) cho các gen tham chiếu trên các mẫu thí nghiệm ở *A. niger*



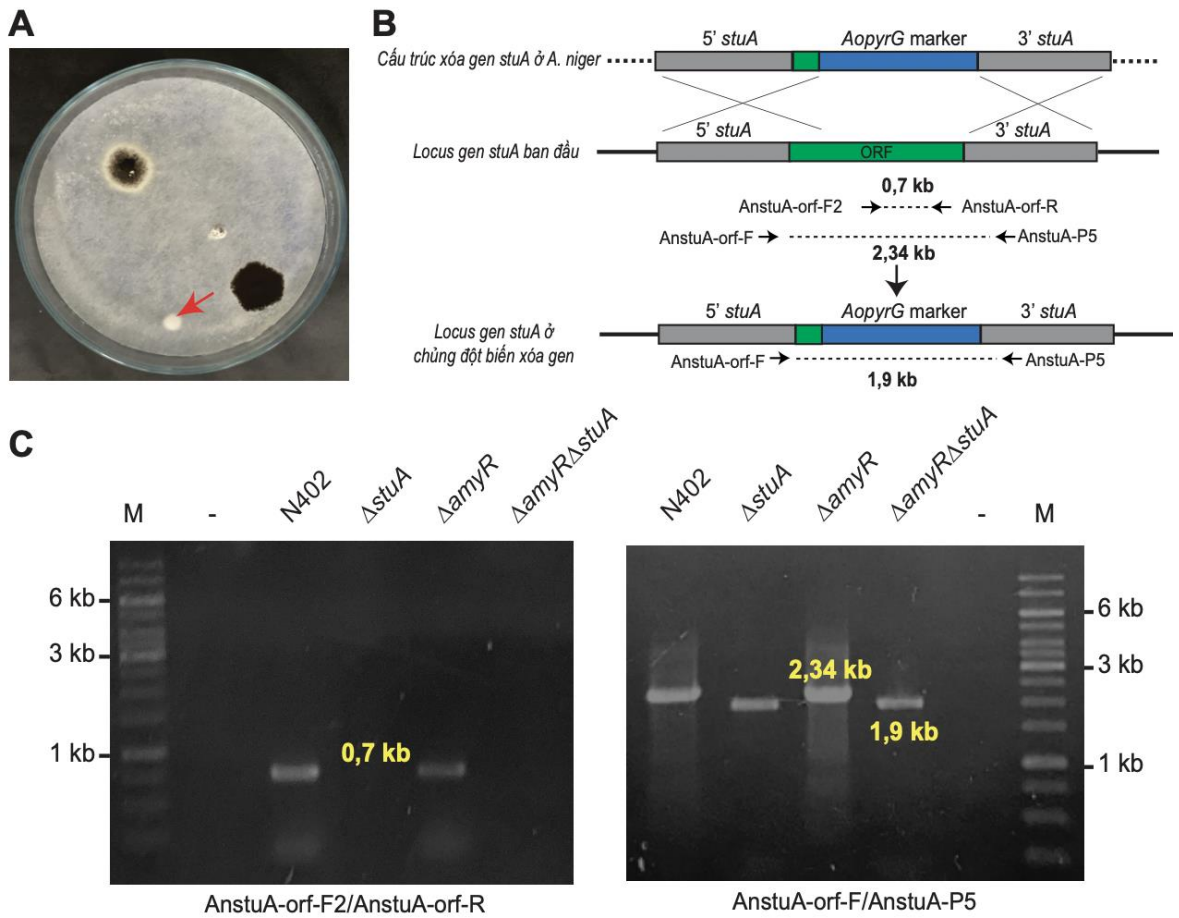
Chú thích: Đường cắt ngang qua hộp thể hiện giá trị trung vị. Hộp cho giá trị phân vị thứ 25 và 75.

PHỤ LỤC 26. Mức độ biểu hiện của các gen mã hóa cho quá trình sinh độc tố nấm ở một số chủng xóa gen thông qua định lượng real-time PCR



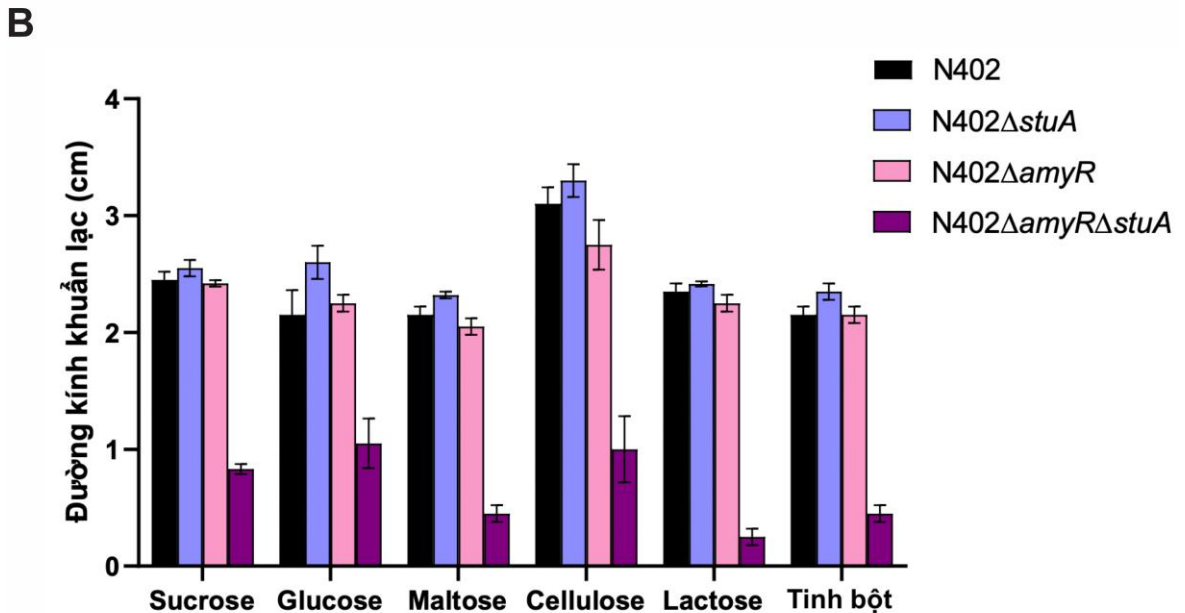
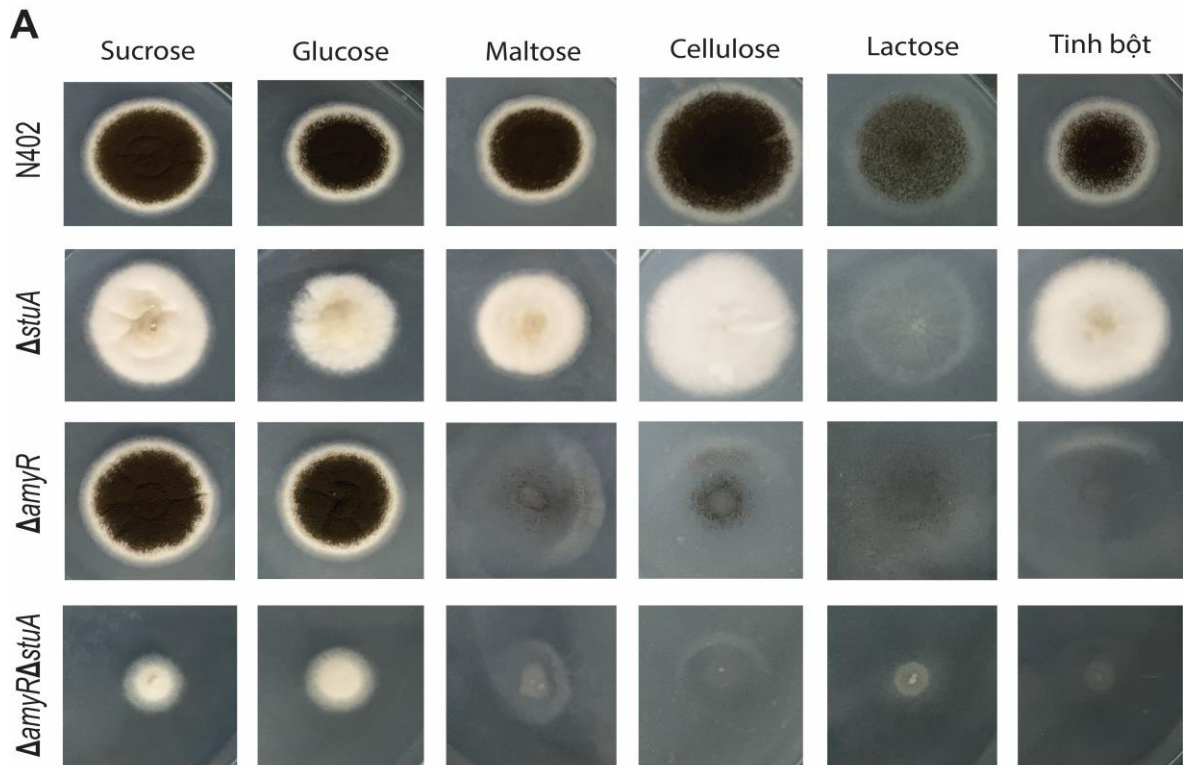
Chú thích: Mức độ biểu hiện mRNA của các gen *hal*, *bZIP*, *p450*, *nrps*, *pks* mã hoá cho quá trình sinh độc tố ochratoxin A (OTA) và *fum1* mã hoá cho quá trình sinh độc tố fumonisin B2 (FB2) ở *A. niger* N402, N402 Δ laeA, N402 Δ stuA, N402 Δ laeA Δ stuA được so sánh sử dụng gen tham chiếu *cox5*. Các chủng nấm được nuôi cấy trong môi trường CD lỏng.

PHỤ LỤC 27. Kết quả tạo chủng đột biến xóa kép N402 Δ amyR Δ stuA



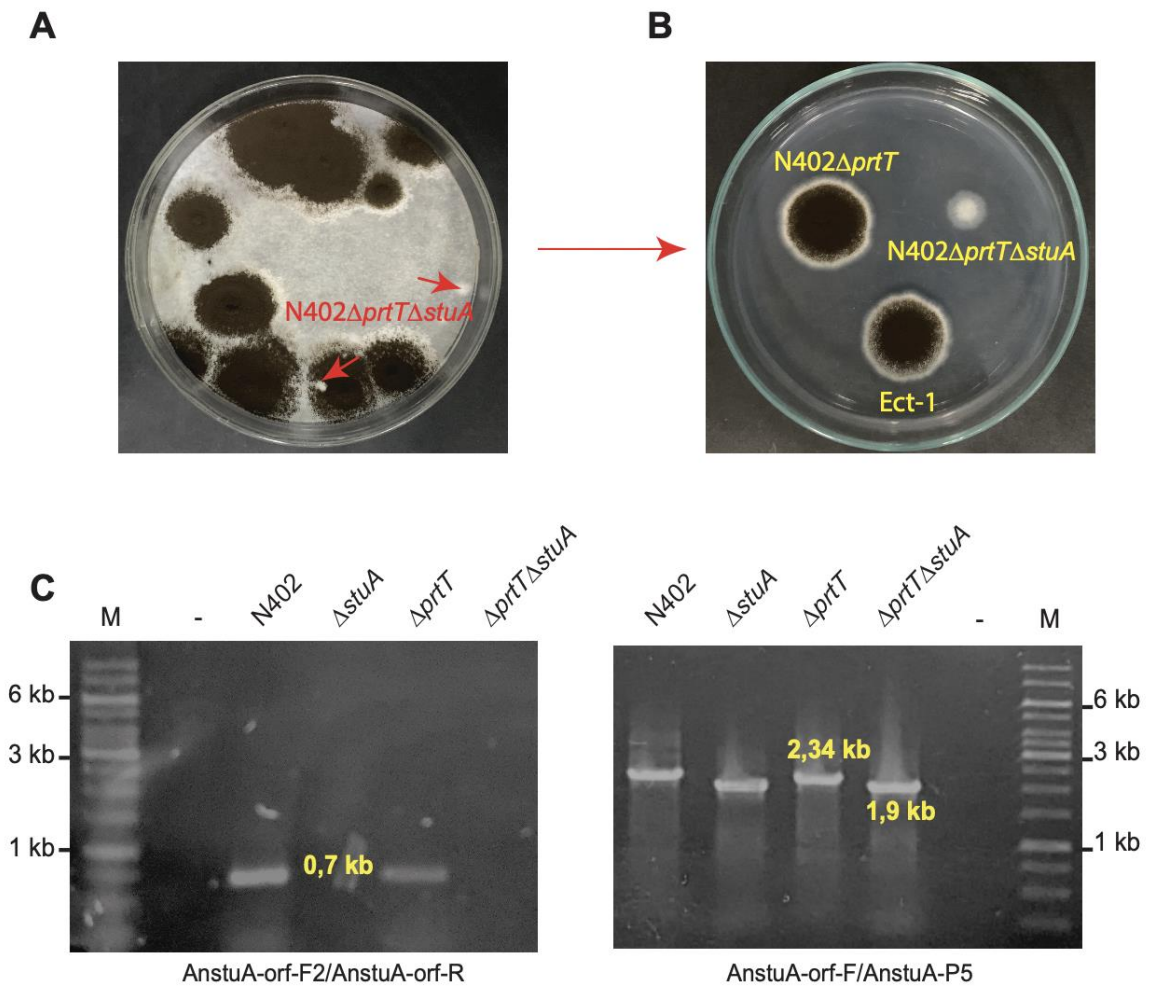
Chú thích: (A) Hình ảnh chuyển gen xóa *stuA* ở N402 Δ amyR Δ pyrG. (B) Sơ đồ xác nhận xóa *stuA* nhờ PCR với các vị trí bám mồi đặc hiệu. (B) Kết quả xác nhận xóa gen *stuA* nhờ PCR với các cặp mồi AnstuA-orf-F2/AnstuA-orf-R và AnstuA-orf-F/AnstuA-P5, (-) là đối chứng âm. M là DNA marker 1 kb (Thermo Fisher Scientific, Mỹ).

PHỤ LỤC 28. Ảnh hưởng của nguồn cacbon tới khả năng sinh trưởng của chủng xoá kép $N402\Delta amyR\Delta stuA$



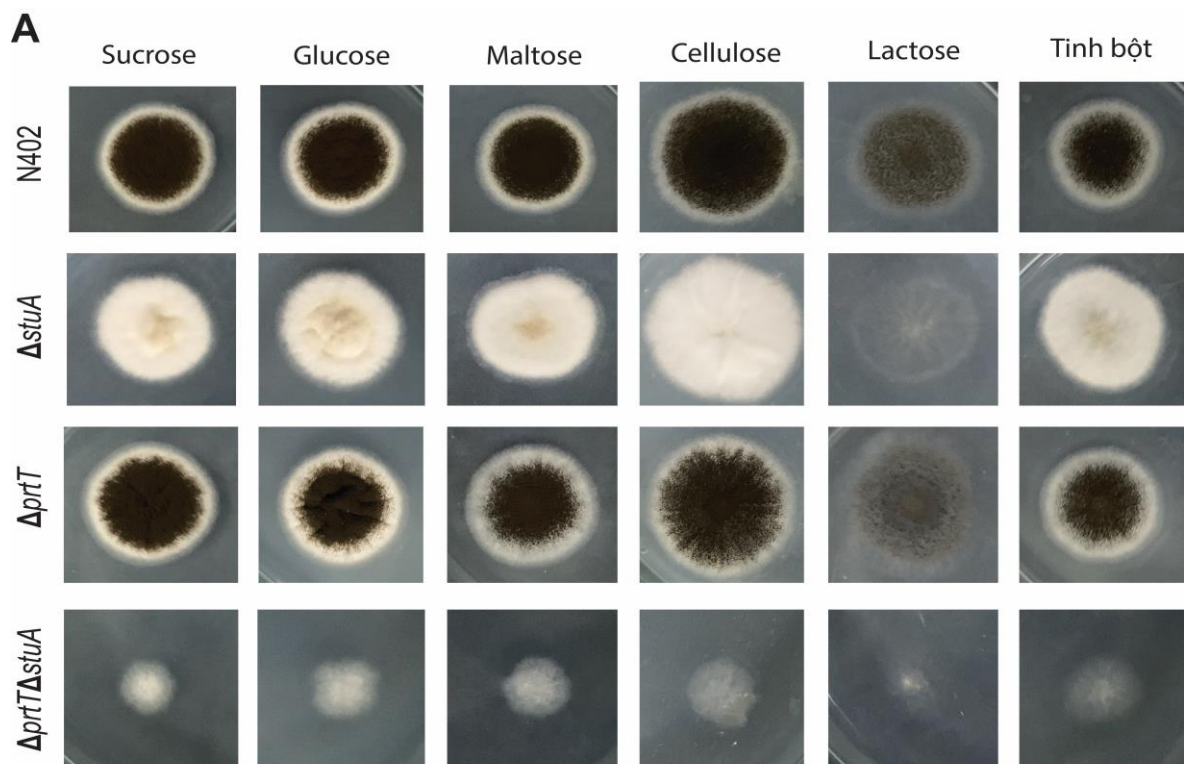
Chú thích: (A) Khả năng sinh trưởng của chủng xoá kép $N402\Delta amyR\Delta stuA$ trên các nguồn cacbon khác nhau (sucrose, glucose, maltose, cellulose, lactose, tinh bột) sau 4 ngày ở 30°C được so sánh với các chủng $N402$, $N402\Delta stuA$ và $N402\Delta amyR$. (B) Đường kính khuẩn lạc của các chủng nấm trên các nguồn cacbon khác nhau.

PHỤ LỤC 29. Kết quả tạo chủng đột biến xoá kép N402 Δ *prtT* Δ *stuA*

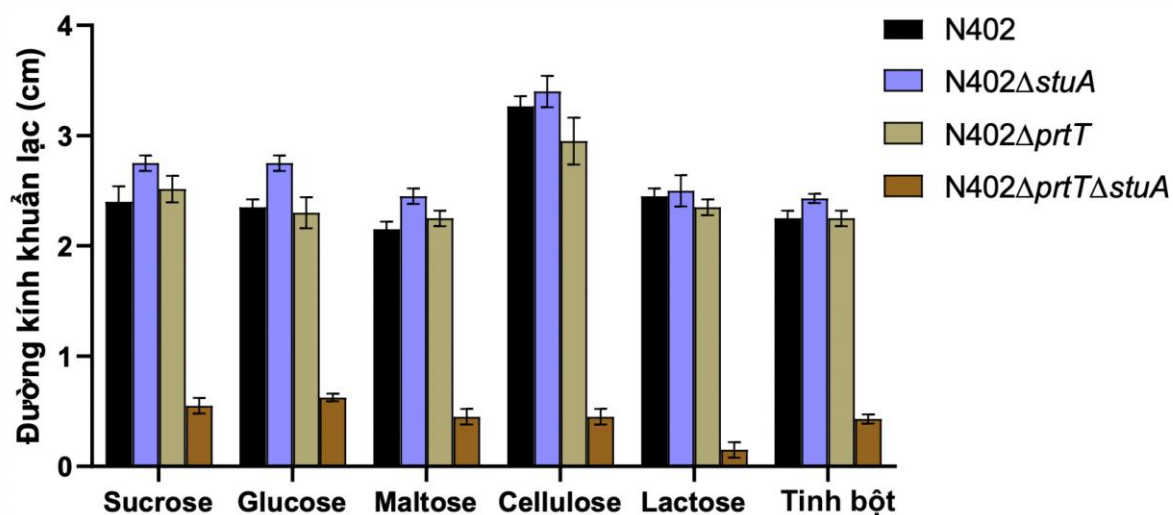


Chú thích: (A) Hình ảnh chuyển gen xoá *stuA* ở N402 Δ *prtT* Δ *pyrG*. (B) Kết quả sàng lọc chủng xoá kép N402 Δ *prtT* Δ *stuA* trên môi trường CDA. (C) Kết quả xác nhận xoá gen *stuA* nhờ PCR với các cặp mồi AnstuA-orf-F2/AnstuA-orf-R và AnstuA-orf-F/AnstuA-P5. (-) là đối chứng âm. M là DNA marker 1 kb (Thermo Fisher Scientific, Mỹ).

PHỤ LỤC 30. Ảnh hưởng của nguồn cacbon tới khả năng sinh trưởng của chủng xoá kép $N402\Delta prtT\Delta stuA$

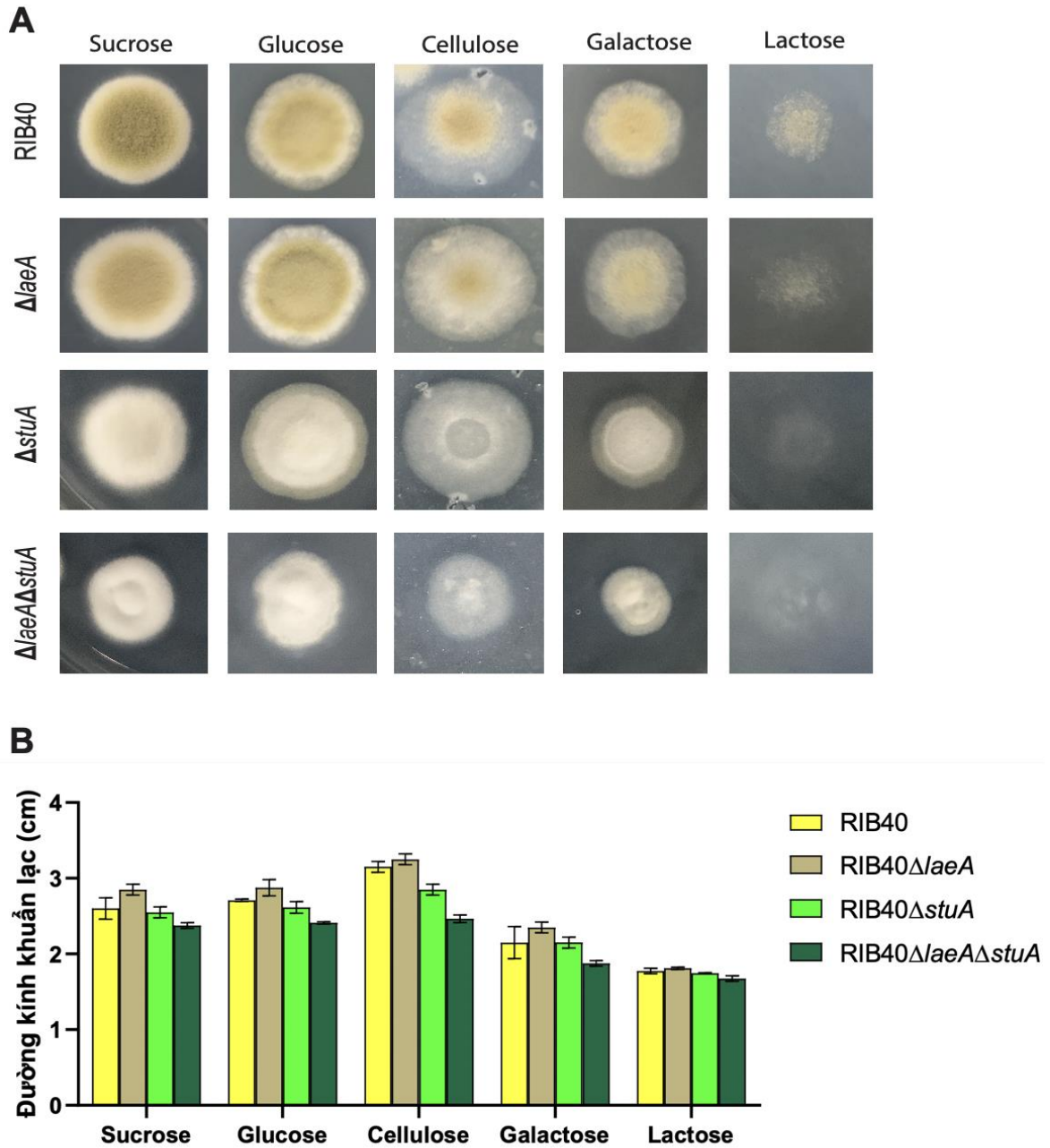


B



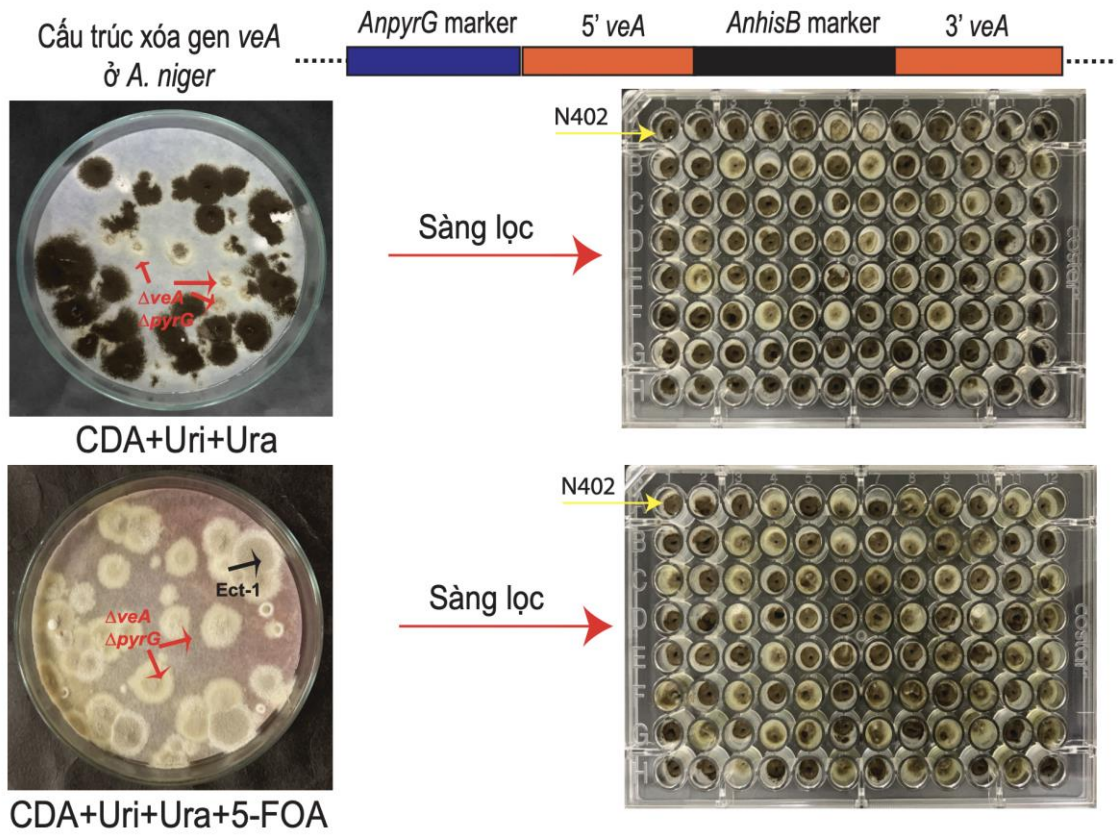
Chú thích: (A) Khả năng sinh trưởng của chủng xoá kép $N402\Delta prtT\Delta stuA$ trên các nguồn cacbon khác nhau (sucrose, glucose, maltose, cellulose, lactose, tinh bột) sau 4 ngày ở 30°C được so sánh với các chủng $N402$, $N402\Delta stuA$ và $N402\Delta prtT$. (B) Đường kính khuẩn lạc của các chủng nấm trên các nguồn cacbon khác nhau.

PHỤ LỤC 31. Ảnh hưởng của nguồn cacbon tới khả năng sinh trưởng của chủng xoá kép RIB40 Δ laeA Δ stuA

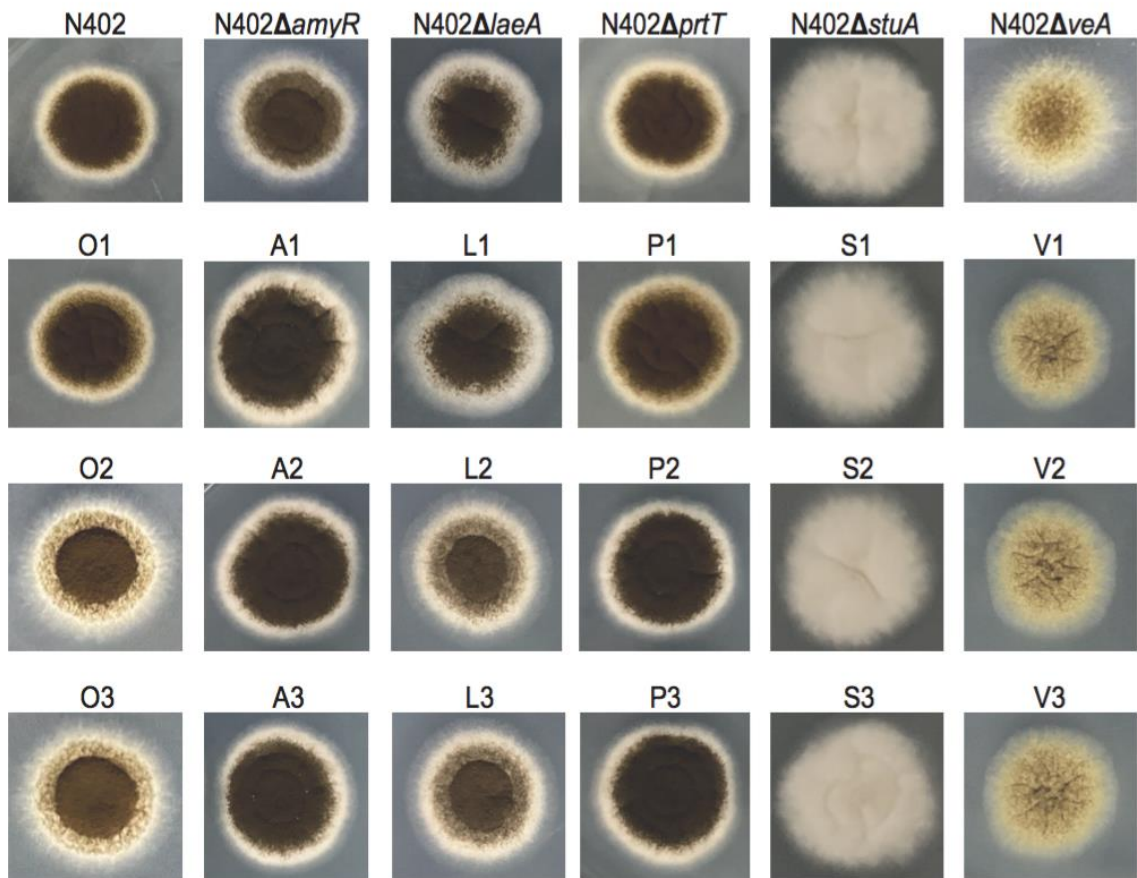


Chú thích: (A) Khả năng sinh trưởng của chủng xoá kép RIB40 Δ laeA Δ stuA trên các nguồn cacbon khác nhau (sucrose, glucose, cellulose, galactose, lactose) sau 4 ngày ở 30°C được so sánh với các chủng RIB40, RIB40 Δ laeA và RIB40 Δ stuA. (B) Đường kính khuẩn lạc của các chủng nấm trên các nguồn cacbon khác nhau.

PHỤ LỤC 32. Kết quả đánh giá tỷ lệ xóa gen *veA* ở *A. niger* khi có sự hoạt động của marker chọn lọc thứ hai (marker *pyrG*)

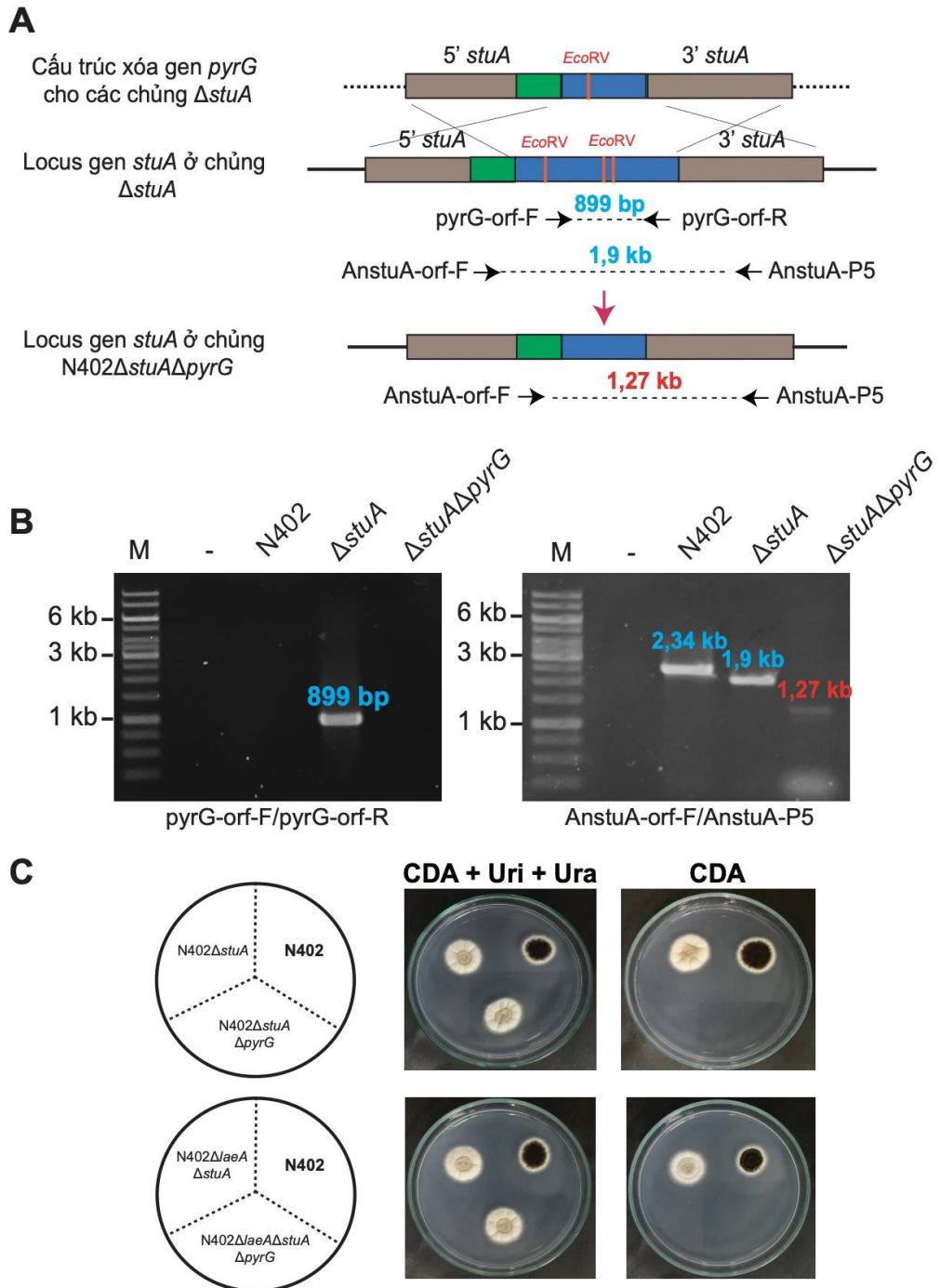


PHỤ LỤC 33. Khả năng sinh trưởng của các chủng *A. niger* biểu hiện quá mức *phyA*



Chú thích: Các chủng *A. niger* N402, N402 Δ *amyR*, N402 Δ *laeA*, N402 Δ *prtT*, N402 Δ *stuA*, N402 Δ *veA* được sử dụng làm đối chứng. Các đĩa được ủ ở 30°C trong 4 ngày.

PHỤ LỤC 34. Kết quả tạo các chủng đột biến $\Delta stuA \Delta pyrG$ phục vụ cho các thí nghiệm chuyển gen tiếp theo



Chú thích: (A) Sơ đồ xác nhận xóa *pyrG* ở các chủng đã xóa gen *stuA* nhờ PCR với các vị trí bám mỗi đặc hiệu. (B) Kết quả xác nhận xóa *pyrG* nhờ PCR với các cặp mồi *pyrG-orf-F/pyrG-orf-R* và *AnstuA-orf-F/AnstuA-P5*. (-) là đối chứng âm. M là DNA marker 1 kb (Thermo Fisher Scientific, Mỹ). (C) Kết quả kiểm tra các chủng $\Delta stuA \Delta pyrG$ trên môi trường CDA có/không bổ sung uridine/uracil. Các đĩa được ủ ở 30°C trong 4 ngày.