

Nghiên cứu tạo cấu trúc mang promoter *rpb1* nhằm tăng cường biểu hiện protein tái tổ hợp ở nấm dược liệu *Cordyceps militaris*

Trần Văn Tuấn^{1,2*}, Nguyễn Minh Thư¹, Bùi Thị Khánh Linh¹, Phạm Thị Thu Hương^{1,2},
Phạm Thanh Hiền², Lê Thị Hồng Nhung^{1,2}, Hoàng Thị Mỹ Nhung^{1,2}

¹Khoa Sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội, 334 Nguyễn Trãi, phường Thanh Xuân Trung, quận Thanh Xuân, Hà Nội, Việt Nam

²Phòng Thí nghiệm trọng điểm công nghệ Enzym và Protein, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội, 334 Nguyễn Trãi, phường Thanh Xuân Trung, quận Thanh Xuân, Hà Nội, Việt Nam

Ngày nhận bài 3/10/2022; ngày chuyển phản biện 7/10/2022; ngày nhận phản biện 31/10/2022; ngày chấp nhận đăng 4/11/2022

Tóm tắt:

Cordyceps militaris là loài nấm dược liệu chứa nhiều hoạt chất có lợi cho sức khỏe như cordycepin, adenosine, pentostatin, polysaccharide, carotenoid. Tuy nhiên, hàm lượng của các hợp chất này ở các chủng nấm tự nhiên tương đối thấp. Gần đây, hệ gen của *C. militaris* đã được giải trình tự hoàn toàn và các gen liên quan đến sinh tổng hợp các chất có lợi đã được xác định. Do đó, việc nghiên cứu tăng cường sinh tổng hợp các hoạt chất quý ở *C. militaris* nhờ công nghệ DNA tái tổ hợp có nhiều thuận lợi. Trong nghiên cứu này, các tác giả đã tạo thành công vector nhệ thể với vùng T-DNA mang cấu trúc tăng cường biểu hiện gen dưới sự điều hòa bởi promoter *rpb1* từ chính loài *C. militaris*. Cấu trúc T-DNA từ vector nhệ thể được chuyển vào hệ gen nấm nhờ phương pháp chuyển gen thông qua vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens*. Phân tích ngẫu nhiên một số thể chuyển gen bằng PCR với các cặp mồi đặc hiệu chứng minh cấu trúc T-DNA đã được tích hợp thành công vào hệ gen *C. militaris*. Quan sát các thể chuyển gen dưới kính hiển vi huỳnh quang xác nhận sự biểu hiện mạnh của gen mã hóa protein huỳnh quang đỏ DsRed dưới sự điều hòa của promoter *rpb1*. Vector nhệ thể mang promoter *rpb1* tạo được trong nghiên cứu này có thể được sử dụng để tăng cường sự biểu hiện của các gen mong muốn ở nấm dược liệu *C. militaris*.

Từ khóa: chuyển gen nhờ vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens*, *Cordyceps militaris*, protein huỳnh quang DsRed, vector nhệ thể mang promoter *rpb1*.

Chỉ số phân loại: 1.6

1. Đặt vấn đề

Ước tính, có hơn 500 loài thuộc chi *Cordyceps* đã được thu thập và phân loại. Trong đó, *C. militaris* là loài được sử dụng phổ biến trong y học cổ truyền ở các nước châu Á. Hiện nay, loài nấm này đang được nuôi trồng dạng quả thể ở quy mô công nghiệp. Nấm *C. militaris* chứa nhiều hoạt chất có khả năng chống lại tế bào ung thư, kháng viêm và điều hòa tăng cường miễn dịch [1-3]. Tuy nhiên, hàm lượng thành phần có hoạt tính sinh học như cordycepin, adenosine, pentostatin, polysaccharide và carotenoid ở các chủng tự nhiên thường tương đối thấp. Vì vậy, nghiên cứu tăng cường sự biểu hiện của các gen liên quan nhờ công nghệ DNA tái tổ hợp có thể giúp tăng hàm lượng hoạt chất có lợi ở nấm *C. militaris* [4].

Hệ gen của loài *C. militaris* đã được giải trình tự hoàn toàn và các gen/nhóm gen liên quan đến quá trình sinh tổng hợp các chất có lợi đã cơ bản được xác định. Cơ sở dữ liệu hệ gen nấm *C. militaris* (<https://mycocosm.jgi.doe.gov/Cormi1/Cormi1.home.html>) có thể được khai thác cho các nghiên cứu biểu hiện gen tái tổ hợp nhằm tăng cường sự biểu hiện của các gen mong muốn [4, 5]. Nhiều loại promoter mạnh đã được ứng dụng rộng rãi trong nghiên cứu biểu hiện tái tổ hợp ở nấm sợi. Tuy nhiên, việc sử dụng các

promoter để điều hòa biểu hiện gen ở *C. militaris* vẫn còn tương đối hạn chế [4-6]. Năm 2014, T. Lian và cs [7] sử dụng kỹ thuật real-time PCR đã chỉ ra một số gen biểu hiện mạnh ở các giai đoạn phát triển khác nhau của *C. militaris*. Trong số đó, gen *rpb1* liên quan đến sinh tổng hợp enzyme RNA polymerase II được đặc biệt chú ý, vì gen này biểu hiện mạnh và ổn định qua các giai đoạn phát triển của *C. militaris*. Vùng trình tự 5' của gen *rpb1* có thể được khai thác làm promoter cho nghiên cứu điều hòa biểu hiện gen tái tổ hợp ở nấm *C. militaris*.

Để chuyển gen vào nấm, nhiều phương pháp chuyển gen đã được phát triển. Tuy nhiên, phương pháp chuyển thông qua vi khuẩn *A. tumefaciens* được chứng minh là có hiệu quả đối với nhiều loài nấm sợi khác nhau, trong đó có cả *C. militaris* [8-10]. Đến nay, việc chuyển gen vào *C. militaris* vẫn chủ yếu sử dụng gen kháng kháng sinh hoặc gen kháng chất diệt cỏ [4]. Việc sử dụng các vector mang gen kháng thuốc để tạo chủng chuyển gen thường không đáp ứng được các tiêu chuẩn về an toàn trong lĩnh vực sản xuất thực phẩm. Do đó, chủng tái tổ hợp được tạo ra nhờ sử dụng vector mang marker trợ dưỡng *pyrG* sẽ có tiềm năng cao để ứng dụng vào thực tiễn, đồng thời giúp loại bỏ việc sử dụng các gen kháng thuốc.

*Tác giả liên hệ: Email: tuantran@vnu.edu.vn

Generating a construct harboring the *rpb1* promoter for enhancing recombinant protein expression in the medicinal mushroom *Cordyceps militaris*

Van Tuan Tran^{1,2*}, Minh Thu Nguyen¹,
Thi Khanh Linh Bui¹, Thi Thu Huong Pham^{1,2},
Thanh Hien Pham², Thi Hong Nhung Le^{1,2},
Thi My Nhung Hoang^{1,2}

¹Faculty of Biology, University of Science, Vietnam National University - Hanoi,
334 Nguyen Trai Street, Thanh Xuan Trung Ward, Thanh Xuan District, Hanoi, Vietnam

²National Key Laboratory of Enzyme and Protein Technology,
University of Science, Vietnam National University - Hanoi,
334 Nguyen Trai Street, Thanh Xuan Trung Ward, Thanh Xuan District, Hanoi, Vietnam

Received 3 October 2022; revised 31 October 2022; accepted 4 November 2022

Abstract:

Cordyceps militaris is a valuable medicinal mushroom that contains numerous bioactive ingredients such as cordycepin, adenosine, pentostatin, polysaccharides, and carotenoids. However, the contents of these substances in wild-type strains of *C. militaris* are relatively low. Recently, the genome of *C. militaris* has been fully sequenced, and genes involved in the biosynthesis of beneficial constituents have been identified. Therefore, research on enhancing the biosynthesis of the bioactive compounds in this fungus by recombinant DNA technology has advantages. In the present study, the authors have successfully generated a binary vector with a T-DNA region carrying a construct regulated by the native *rpb1* promoter that can enhance gene expression in *C. militaris*. The T-DNA structure from the binary vector was then transferred into the *C. militaris* genome by *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation. Analysis of some fungal transformants by PCR using the specific primer pairs indicated that the T-DNA structure was successfully integrated into the fungal genome. Observation of the transformants under fluorescence microscopy confirmed the overexpression of the DsRed fluorescent protein under the regulation of the *rpb1* promoter. The binary vector carrying the *rpb1* promoter constructed in this study can be employed to promote the expression of target genes in the medicinal mushroom *C. militaris*.

Keywords: *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation, binary vector carrying promoter *rpb1*, *Cordyceps militaris*, DsRed fluorescent protein.

Classification number: 1.6

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu

Các chủng vi sinh vật, gồm *C. militaris* G12, *C. militaris* Δ pyrG, *A. tumefaciens* AGL1 và *Escherichia coli* DH5 α do 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 cung cấp. Vector nhĩ thể nguyên bản pEX2 dùng trong nghiên cứu được tạo ra bởi K.T. Nguyen và cs (2016) [9]. Môi trường dịch chiết khoai tây (PDA hoặc PDB) và Czapek-Dox (CD) được sử dụng cho nuôi nấm *C. militaris*. Môi trường Luria Bertani (LB) được sử dụng để nuôi các chủng vi khuẩn. Chủng nấm *C. militaris* Δ pyrG được nuôi trên môi trường đĩa thạch PDA có bổ sung 0,1% uridine và 0,1% uracil trong 8-10 ngày, ở 25°C dưới điều kiện chiếu sáng nhằm kích thích sự hình thành của bào tử. Bào tử nấm được thu hồi theo mô tả của K.T. Nguyen và cs (2016) [9]. Dịch bào tử được điều chỉnh về nồng độ 10⁶ bào tử/ml và được giữ ở 4°C cho các thí nghiệm tiếp theo.

Các cặp mồi sử dụng trong nghiên cứu này được liệt kê ở bảng 1. Cặp mồi CMrpb1-F2/CMrpb1-R2 đặc hiệu cho vùng promoter của gen *rpb1* (mã số GenBank: KC242729) được thiết kế bằng phần mềm Primer3 (<https://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0>). Trình tự vùng promoter của *rpb1* được trích xuất từ dữ liệu hệ gen nấm *C. militaris* tại <https://mycocosm.jgi.doe.gov/Cormil1/Cormil1.home.html>. Hai cặp mồi còn lại do 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 cung cấp.

Bảng 1. Các cặp mồi dùng cho PCR.

STT	Tên mồi	Trình tự mồi (5'-3')	Kích thước sản phẩm PCR (bp)
1	CMrpb1-F2	GGGACTAGTGTCTGAGGCTGTACC ACCAA (<i>SpeI</i>)	958
2	CMrpb1-R2	GGGCTCGAGGATATGGCGATGAC GGATT (<i>XhoI</i>)	
3	DsRed-F	AACTCGAGCACGTGCTTAAGGAT ATC ATGGCTCCTCCGAGG	730
4	DsRed-R	AAGGATCCCCGCGGAGCTCGAT AT CCTACAGGAACAGGTGGTGGC	
5	pyrG-orf-F	ATGTCTTCAAGTCGAATT	899
6	pyrG-orf-R	TATTGCGACCAACACG	

2.2. Tách chiết DNA tổng số từ hệ sợi nấm *C. militaris*

Các chủng *C. militaris* được nuôi trong môi trường dịch chiết khoai tây PDB (Potato dextrose broth). Riêng đối với chủng *C. militaris* khuyết đường uridine/uracil (Δ pyrG) thì môi trường PDB cần bổ sung thêm 0,1% uridine và 0,1% uracil. Nấm được nuôi trên máy lắc ổn nhiệt ở 25°C, tốc độ 200 vòng/phút trong 3 ngày. Hệ sợi nấm được thu lại bằng cách lọc dịch nuôi qua màng Miracloth để phục vụ tách chiết DNA tổng số. Việc tách chiết DNA tổng số được thực hiện theo quy trình đã công bố trước đây với một số điều chỉnh phù hợp [9]. Một lượng 0,15 g hệ sợi nấm được chia

vào ống eppendorf vô trùng và được giặt bằng đầu thủy tinh vô trùng trong khoảng 1 phút. Bổ sung 600 μ l đệm chiết (2,5% SDS, 200 mM Tris-HCl pH 8, 250 mM NaCl, 25 mM EDTA, 0,2% β -mercaptoethanol) và 3 μ l proteinase K vào ống chứa mẫu. Mẫu được trộn đều bằng máy vortex. Ủ mẫu ở 60°C trong 30 phút. Bổ sung 300 μ l 3 M sodium acetate (pH 5,2) và đảo đều ống. Mẫu được ly tâm ở 4°C, tốc độ 12.000 vòng/phút trong 20 phút. Hút dịch nổi chuyển sang ống eppendorf mới và bổ sung thêm 1 thể tích isopropanol lạnh để kết tủa DNA. Đảo nhẹ ống và tiến hành ly tâm lạnh ở tốc độ 12.000 vòng/phút trong 10 phút. Bỏ phần dịch nổi và thu kết tủa. Bổ sung 700 μ l ethanol 70% vào ống để rửa kết tủa. Ly tâm ống ở 12.000 vòng/phút trong 5 phút. Kết tủa được làm khô bằng máy SpeedVac của Hãng Thermo Scientific (Mỹ). Bổ sung 50 μ l TE (Tris- EDTA, pH 8) và 3 μ l RNase A (10 mg/ml) để hòa tan mẫu và mẫu được ủ ở 60°C trong 30 phút để loại bỏ RNA. Mẫu DNA tổng số được kiểm tra trên gel agarose 0,7% bằng phương pháp điện di. Mẫu được bảo quản ở 4°C cho các thí nghiệm tiếp theo.

2.3. Tạo vector nhĩ thể pEX2-rpb1

Vùng trình tự promoter (940 bp) của gen *rpb1* được khuếch đại bằng PCR sử dụng khuôn là DNA tổng số tách chiết từ *C. militaris* và cặp mồi đặc hiệu CMrpb1-F2/CMrpb1-R2 (bảng 1). Để đảm bảo tính chính xác của quá trình sao chép DNA, enzyme PhusionTM high-fidelity DNA polymerase của Hãng Thermo Scientific (Mỹ) đã được sử dụng. Quy trình PCR gồm 94°C (6 phút); 35 chu kỳ lặp của 94°C (30 giây), 58°C (30 giây), 72°C (1 phút) và 72°C (10 phút). Sản phẩm PCR được kiểm tra trên gel agarose 0,7% và được cắt với enzyme giới hạn *SpeI* và *XhoI*. Sản phẩm được tinh sạch bằng MEGAquick-spinTM Plus Total Fragment DNA Purification Kit của Hãng iNtRON Biotechnology (Hàn Quốc) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Sản phẩm tinh sạch được nối vào vector nhĩ thể pEX2 cũng đã được cắt bằng cùng 2 enzyme *SpeI* và *XhoI*. Việc ghép nối được thực hiện với enzyme T4 DNA ligase (Thermo Scientific, Mỹ). Hỗn hợp lai được biến nạp vào vi khuẩn *E. coli* DH5 α bằng phương pháp sốc nhiệt. Các khuẩn lạc xuất hiện trên đĩa môi trường chọn lọc (môi trường LB chứa 100 mg/l kháng sinh kanamycin) được kiểm tra bằng kỹ thuật PCR khuẩn lạc (colony PCR) sử dụng cặp mồi đặc hiệu (bảng 1). GoTaq[®] Green Master Mix của Hãng Promega (Mỹ) được sử dụng cho colony PCR. Những khuẩn lạc với kết quả PCR xác nhận sự có mặt của đoạn chèn được nuôi để tách plasmid. Plasmid tái tổ hợp được xác nhận bằng cắt với enzyme giới hạn *BamHI* và giải trình tự một phần plasmid.

2.4. Chuyển gen vào nấm *C. militaris* thông qua vi khuẩn *A. tumefaciens*

Quy trình chuyển gen vào nấm *C. militaris* nhờ vi khuẩn *A. tumefaciens* được tiến hành dựa theo quy trình của K.T. Nguyen và cs (2016) [9] và Z. Zheng và cs (2011) [10]. Vector nhĩ thể được biến nạp vào vi khuẩn *A. tumefaciens*

AGL1 nhờ hệ thống chuyển gen bằng xung điện Gene Pulse XcellTM Electroporation System của Hãng Bio-Rad (Mỹ). Các khuẩn lạc vi khuẩn mang vector nhĩ thể được xác nhận bằng PCR với cặp mồi đặc hiệu CMrpb1-F2/CMrpb1-R2. Vi khuẩn được nuôi trong môi trường LB lỏng có bổ sung kanamycin (100 mg/l) ở 28°C, 200 vòng/phút, khoảng 18 đến 20 giờ. Hút 0,5 ml dịch nuôi cho vào ống falcon chứa 4,5 ml môi trường cảm ứng IM có bổ sung acetosyringone (AS) [9]. Nuôi lắc trong tối ở 28°C, 200 vòng/phút, cho tới khi dịch nuôi có OD₆₀₀ đạt 0,6 đến 0,8 (khoảng 5-6 giờ). Trộn 100 μ l dịch nuôi đã cảm ứng với 100 μ l bào tử nấm (nồng độ 10⁶ bào tử/ml). Hỗn hợp được trải đều lên màng cellulose đã đặt sẵn trên môi trường IM (có bổ sung 0,01% uridine, 0,01% uracil, 200 μ M AS). Đĩa được ủ trong hộp tối ở 22°C trong 2,5 ngày. Để chọn lọc thể chuyển gen, màng cellulose được chuyển sang đĩa môi trường thạch Czapek Dox (CD) có bổ sung kháng sinh cefotaxime (600 mg/l) để diệt vi khuẩn *A. tumefaciens*. Ủ đĩa ở nhiệt độ 25°C trong 5 ngày.

2.5. Xác nhận các thể chuyển gen

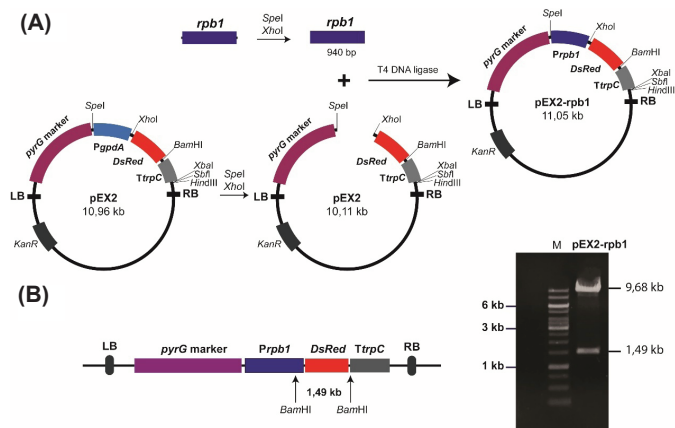
Các khuẩn lạc nấm xuất hiện trên đĩa chuyển gen được cấy chuyển sang đĩa môi trường CD mới và được tinh sạch bằng phương pháp phân lập bào tử đơn. Các thể chuyển được nuôi cấy trong môi trường PDB để thu sinh khối hệ sợi cho tách chiết DNA tổng số. Cấu trúc biểu hiện gen *DsRed* trong hệ gen các thể chuyển gen được xác nhận bằng PCR sử dụng cặp mồi đặc hiệu DsRed-F/DsRed-R (bảng 1). Khả năng biểu hiện của protein DsRed ở các thể chuyển gen được kiểm tra dưới kính hiển vi huỳnh quang Axioplan fluorescence microscope (Carl Zeiss, Đức). Các thể chuyển gen đã được xác nhận bằng PCR được nuôi trên môi trường thạch CD ở nhiệt độ 25°C, trong 3 ngày. Dùng kẹp vô trùng lấy một phần hệ sợi nấm từ đĩa nuôi cấy và chuyển lên lam kính. Nhỏ một giọt nước cất vô trùng lên giữa phần hệ sợi nấm. Đặt lamên lên phía trên mẫu cần quan sát và ép nhẹ để dàn mỏng mẫu. Tiêu bản được quan sát dưới kính hiển vi huỳnh quang ở vật kính 20X.

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Tạo vector nhĩ thể pEX2-rpb1 mang promoter *rpb1* của *C. militaris*

Promoter *rpb1* có kích thước 940 bp được khuếch đại từ hệ gen nấm *C. militaris* bằng PCR sử dụng cặp mồi đặc hiệu CMrpb1-F2/CMrpb1-R2 (bảng 1). Sản phẩm được nối thành công vào vector nhĩ thể pEX2 [9] tại vị trí *XhoI* và *SpeI* để thay thế promoter *gpdA* có nguồn gốc từ nấm sợi *Aspergillus nidulans*. Vector nhĩ thể thu được đặt tên là pEX2-rpb1 (hình 1A). Vector pEX2-rpb1 được xác nhận bằng cắt kiểm tra với enzyme giới hạn *BamHI*. Enzyme *BamHI* có 2 vị trí cắt trong vector pEX2-rpb1, gồm 1 vị trí cắt trong trình tự promoter *rpb1* (*Prbp1*) và 1 vị trí trong khung vector. Phân tích sản phẩm cắt enzyme giới hạn trên gel agarose 0,7% cho thấy 1 băng DNA có kích thước tương ứng với 1,49 kb, tương đương với kích thước tính toán dựa trên trình tự (hình 1B). Kết quả thu được khẳng định

promoter *rpb1* đã được tích hợp đúng vị trí trong vector tái tổ hợp pEX2-rpb1.

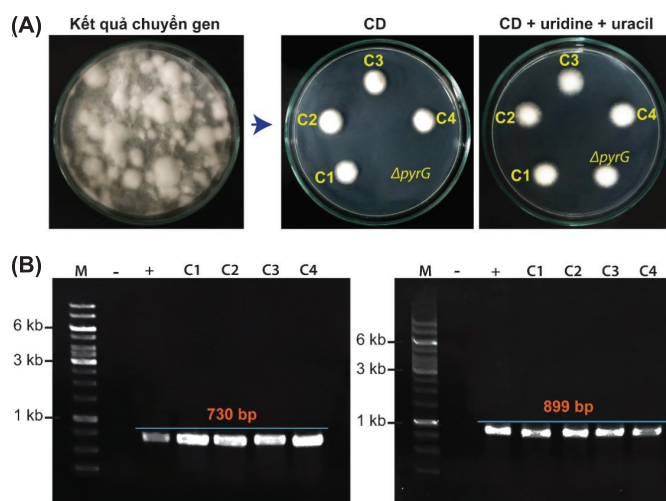


Hình 1. Vector nhệ thể pEX2-rpb1 mang cấu trúc biểu hiện protein DsRed dưới sự điều hòa của promoter *rpb1*. (A) Sơ đồ tạo vector pEX2-rpb1, trong đó promoter *rpb1* từ *C. militaris* được sử dụng để thay thế promoter *gpdA* từ *A. nidulans*; (B) Sơ đồ cắt vector pEX2-rpb1 với enzyme giới hạn *Bam*HI và kết quả phân tích sản phẩm tương ứng trên gel agarose; M là thang DNA chuẩn 1 kb.

3.2. Tích hợp cấu trúc biểu hiện protein huỳnh quang DsRed vào hệ gen của *C. militaris*

Để đánh giá hiệu quả điều hòa biểu hiện gen của promoter *rpb1*, cấu trúc T-DNA của vector pEX2-rpb1 được chuyển vào chủng *C. militaris* Δ *pyrG* khuyết dưỡng uridine/uracil sử dụng phương pháp chuyển gen thông qua vi khuẩn *A. tumefaciens*. Phương pháp chuyển gen này đã được chứng minh là hiệu quả cao ở nhiều loài nấm khác nhau [8, 9], bao gồm cả *C. militaris* [10]. Hiệu quả chuyển gen ở *C. militaris* với marker trợ dưỡng *pyrG* sử dụng vi khuẩn *A. tumefaciens* đạt 150-210 thể chuyển gen cho 10^5 bào tử nấm. Chọn ngẫu nhiên 4 thể chuyển gen độc lập (ký hiệu C1-C4) và cấy đồng thời lên môi trường tối thiểu CD và môi trường CD có bổ sung uridine và uracil (CD+uridine+uracil). Kết quả thu được cho thấy, cả 4 thể chuyển gen đều sinh trưởng được trên môi trường tối thiểu CD, trong khi chủng đối chứng Δ *pyrG* chỉ sinh trưởng được khi môi trường CD có bổ sung uridine và uracil (hình 2A). Điều này chứng tỏ, cả 4 thể chuyển gen đều đã nhận được gen *pyrG* và có khả năng tự tổng hợp uridine và uracil để đáp ứng nhu cầu sinh trưởng của tế bào.

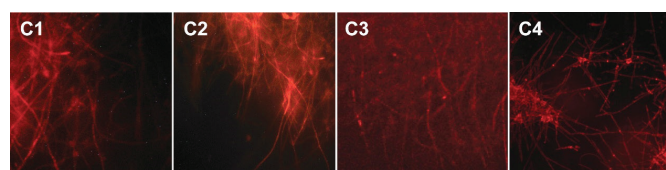
Để khẳng định chính xác khả năng phục hồi sinh trưởng của các thể chuyển gen trên môi trường khuyết uridine và uracil, DNA tổng số từ các chủng này được kiểm tra bằng PCR sử dụng cặp mồi *pyrG*-orf-F/*pyrG*-orf-R và *DsRed*-F/*DsRed*-R (bảng 1). Phân tích sản phẩm PCR trên gel agarose cho thấy, cả 4 thể chuyển gen đều xuất hiện 2 băng DNA đặc trưng với kích thước 730 và 899 bp, tương ứng với kích thước của gen *DsRed* và gen *pyrG* (hình 2B). Kết quả này chứng minh cấu trúc T-DNA của vector nhệ thể pEX2-rpb1 đã được chuyển gen thành công vào hệ gen nấm *C. militaris*.



Hình 2. Xác nhận các thể chuyển gen ở *C. militaris*. (A) Các thể chuyển gen được nuôi trên môi trường chọn lọc CD và CD + uridine + uracil. Chủng *C. militaris* khuyết dưỡng uridine/uracil được sử dụng để đánh giá khả năng sinh trưởng của các thể chuyển gen; (B) Cặp mồi *pyrG*-orf-F/*pyrG*-orf-R đặc hiệu cho marker chọn lọc *pyrG* và *DsRed*-F/*DsRed*-F đặc hiệu cho gen huỳnh quang đỏ *DsRed* được sử dụng để xác nhận sự tích hợp của cấu trúc T-DNA vào hệ gen của các thể chuyển gen; M: thang DNA chuẩn 1 kb; (-): đối chứng âm sử dụng nước cất vô trùng; (+): đối chứng dương sử dụng vector pEX2-rpb1.

3.3. Xác nhận sự biểu hiện của gen *DsRed* dưới sự điều hòa của promoter *rpb1*

Gen chỉ thị huỳnh quang đỏ *DsRed* được sử dụng rất phổ biến trong chuyển gen vào nấm sợi để chứng minh vai trò của các promoter, cũng như tạo ra chủng nấm biểu hiện protein DsRed cho các mục đích nghiên cứu cụ thể [9, 11]. Trong nghiên cứu này, cấu trúc biểu hiện gen *DsRed* được chuyển thành công vào nấm dược liệu *C. militaris*. Kết quả phân tích định tính dưới kính hiển vi huỳnh quang cho thấy hệ sợi của các thể chuyển gen đều có tín hiệu huỳnh quang đỏ rất rõ nét (hình 3). Kết quả thu được cũng khẳng định gen *DsRed* có thể sử dụng làm gen mô hình để đánh giá khả năng điều hòa biểu hiện gen của các promoter ở nấm *C. militaris*.



Hình 3. Quan sát sự biểu hiện của protein DsRed trong hệ sợi nấm *C. militaris* chuyển gen. Hệ sợi nấm được quan sát dưới kính hiển vi huỳnh quang Axioplan fluorescence microscope. Tín hiệu huỳnh quang đỏ *DsRed* ở 4 thể chuyển gen độc lập (C1-C4) dưới sự điều hòa của promoter *rpb1*. Chủng C1, C2 và C4 cho mức độ tín hiệu mạnh hơn chủng C3.

Một nghiên cứu gần đây của T. Lian và cs (2014) [7] chỉ ra rằng, gen *rpb1* biểu mạnh và ổn định ở các giai đoạn khác nhau trong quá trình phát triển của nấm *C. militaris*. Điều này gợi ý rằng, promoter của gen *rpb1* có thể giữ vai trò

quan trọng trong điều hòa biểu hiện gen ở *C. militaris*. Gen *rpb1* mã hóa tiểu phần lớn (large subunit) của enzyme RNA polymerase II và có mức độ bảo thủ cao ở động vật, thực vật và nấm. Do đó trình tự gen này được sử dụng phổ biến trong phân loại sinh vật [12]. Tuy nhiên, vai trò của promoter *rpb1* trong điều hòa biểu hiện gen ở nấm vẫn chưa được điều tra. Các kết quả thu được từ nghiên cứu này chỉ ra rằng, sự biểu hiện của gen huỳnh quang *DsRed* được kích hoạt mạnh ở *C. militaris* nhờ promoter *rpb1* (hình 3). Đây là nghiên cứu đầu tiên chứng minh promoter *rpb1* có thể được sử dụng để điều hòa biểu hiện gen tái tổ hợp ở nấm được liệu *C. militaris*. Nghiên cứu cũng bước đầu cho thấy, việc chuyển gen vào *C. militaris* sử dụng marker trợ dưỡng *pyrG* và vi khuẩn *A. tumefaciens* là hoàn toàn khả thi và hỗ trợ cho phương pháp chuyển gen sử dụng gen kháng hygromycin B làm marker chọn lọc [11].

4. Kết luận

Nghiên cứu này đã tạo thành công vector nhị thể pEX2-rpb1 mang promoter *rpb1* nhằm tăng cường sự biểu hiện của gen mong muốn ở *C. militaris*. Kết quả nghiên cứu đã chứng minh rằng promoter *rpb1* có khả năng kích hoạt sự biểu hiện mạnh của gen mã hóa protein *DsRed* từ san hô đỏ *Discosoma* sp. ở nấm được liệu *C. militaris*. Vector pEX2-rpb1 tạo được từ nghiên cứu này có thể được sử dụng để tăng cường sự biểu hiện của các gen liên quan đến sinh tổng hợp các chất có lợi ở *C. militaris*.

LỜI CẢM ƠN

Các tác giả xin trân trọng cảm ơn Đại học Quốc gia Hà Nội đã cấp kinh phí cho nghiên cứu này thông qua đề tài “Nghiên cứu phát triển hệ thống biểu hiện gen mới ở nấm được liệu *C. militaris* phục vụ sản xuất enzyme tái tổ hợp và các chất có hoạt tính sinh học” (mã số KLEPT.20.03).

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] B. Shrestha, W. Zhang, Y. Zhang, et al. (2012), “The medicinal fungus *Cordyceps militaris*: Research and development”, *Mycological Progress*, **11**(3), pp.599-614, DOI: 10.1007/s11557-012-0825-y.
- [2] K.J. Jędrejko, J. Lazur, B. Muszyńska (2021), “*Cordyceps militaris*: An overview of its chemical constituents in relation to biological activity”, *Foods*, **10**(11), DOI: 10.3390/foods10112634.

- [3] P. Zheng, Y. Xia, G. Xiao, et al. (2011), “Genome sequence of the insect pathogenic fungus *Cordyceps militaris*, a valued traditional Chinese medicine”, *Genome Biology*, **12**(11), DOI: 10.1186/gb-2011-12-11-r116.
- [4] L. Wang, H. Yan, B. Zeng, et al. (2022), “Research progress on cordycepin synthesis and methods for enhancement of cordycepin production in *Cordyceps militaris*”, *Bioengineering*, **9**(2), DOI: 10.3390/bioengineering9020069.
- [5] Y. Xia, F. Luo, Y. Shang, et al. (2017), “Fungal cordycepin biosynthesis is coupled with the production of the safeguard molecule pentostatin”, *Cell Chemical Biology*, **24**(12), DOI: 10.1016/j.chembiol.2017.09.001.
- [6] J. Kluge, D. Terfehr, U. Kück (2018), “Inducible promoters and functional genomic approaches for the genetic engineering of filamentous fungi”, *Applied Microbiology and Biotechnology*, **102**(15), pp.6357-6372, DOI: 10.1007/s00253-018-9115-1.
- [7] T. Lian, T. Yang, G. Liu, et al. (2014), “Reliable reference gene selection for *Cordyceps militaris* gene expression studies under different developmental stages and media”, *FEMS Microbiology Letters*, **356**(1), pp.97-104, DOI: 10.1111/1574-6968.12492.
- [8] C.B. Michielse, P.J.J. Hooykaas, C.A.M.J.J. van den Hondel, et al. (2005), “*Agrobacterium*-mediated transformation as a tool for functional genomics in fungi”, *Current Genetics*, **48**(1), pp.1-17, DOI: 10.1007/s00294-005-0578-0.
- [9] K.T. Nguyen, Q.N. Ho, T.H. Pham, et al. (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*, **32**(12), pp.204-212, DOI: 10.1007/s11274-016-2168-3.
- [10] Z. Zheng, C. Huang, L. Cao, et al. (2011), “*Agrobacterium tumefaciens* - mediated transformation as a tool for insertional mutagenesis in medicinal fungus *Cordyceps militaris*”, *Fungal Biology*, **115**(3), pp.265-274, DOI: 10.1016/j.funbio.2010.12.011.
- [11] L. Mikkelsen, S. Sarrocco, M. Lübeck, et al. (2003), “Expression of the red fluorescent protein DsRed-Express in filamentous ascomycete fungi”, *FEMS Microbiology Letters*, **223**(1), pp.135-139, DOI: 10.1016/S0378-1097(03)00355-0.
- [12] J. Luo, N. Yoshikawa, M.C. Hodson, et al. (2007), “Duplication and paralog sorting of *RPB2* and *RPB1* genes in core eudicots”, *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **44**(2), pp.850-862, DOI: 10.1016/j.ympev.2006.11.020.