

Đánh giá hiệu quả của RNA silencing ở nấm sợi *Aspergillus niger* sử dụng vector nhị thể tích hợp công nghệ tái tổ hợp Gateway

Trần Văn Tuấn^{1,2*}, Đỗ Thị Bình Xuân Lộc², Bùi Thị Khánh Linh², Đinh Thị Mùi², Lê Hồng Diệp¹,
Mai Thị Đàm Linh¹, Trần Thị Thanh Huyền¹, Phạm Đức Ngọc¹

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 Enzyme 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 20/4/2023; ngày chuyển phản biện 24/4/2023; ngày nhận phản biện 15/5/2023; ngày chấp nhận đăng 18/5/2023

Tóm tắt:

Nấm sợi *Aspergillus niger* được sử dụng rộng rãi trong sản xuất công nghiệp axit citric và một số enzyme quan trọng như phytase, glucoamylase, glucose oxidase. Một số công cụ về cải biến di truyền đã được phát triển và ứng dụng ở loài nấm này, tuy nhiên, kỹ thuật RNA silencing vẫn còn ít được sử dụng ở *A. niger*. Trong nghiên cứu này, một vector nhị thể tích hợp công nghệ tái tổ hợp Gateway được sử dụng để đánh giá hiệu quả của RNA silencing ở *A. niger*. Việc tích hợp công nghệ tái tổ hợp Gateway trong vector nhị thể giúp tạo nhanh cấu trúc RNA kiểu kẹp tóc (RNA hairpin) cho phép đánh giá sự ức chế biểu hiện gen mục tiêu thông qua phân hủy mRNA. Cấu trúc ức chế biểu hiện gen theo cơ chế RNA silencing được chuyển thành công vào nấm *A. niger* nhờ vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens*. Kết quả cho thấy, các cấu trúc có hiệu quả trong việc ức chế sự biểu hiện của gen huỳnh quang *DsRed* và gen điều hòa *stuA*. Đặc biệt, ức chế sự biểu hiện của gen *stuA* nhờ RNA silencing đã tạo ra các chủng đột biến suy giảm mạnh về khả năng hình thành bào tử. Nghiên cứu này cho thấy, vector nhị thể RNA silencing tích hợp công nghệ tái tổ hợp Gateway là công cụ tiềm năng phục vụ cho nghiên cứu chức năng gen ở *A. niger*.

Từ khóa: *Agrobacterium tumefaciens*, *Aspergillus niger*, gen *DsRed*, gen *stuA*, RNA silencing, tái tổ hợp Gateway.

Chỉ số phân loại: 1.6

1. Đặt vấn đề

A. niger là một trong những loài phổ biến và quan trọng nhất thuộc chi *Aspergillus*. Loài nấm này phân bố rộng rãi trong tự nhiên, như trong đất, thức ăn, các sản phẩm nông nghiệp và ngay cả trong không khí. *A. niger* đã được Cục Quản lý Thực phẩm và Dược phẩm Hoa Kỳ (FDA) công nhận là vi sinh vật an toàn và được sử dụng phổ biến trong công nghiệp thực phẩm và đồ uống [1]. *A. niger* có khả năng tiết nhiều loại enzyme vào môi trường nuôi cấy, do đó loài nấm này được ứng dụng rộng rãi trong sản xuất các axit hữu cơ và enzyme ngoại bào, điển hình là axit citric, axit gluconic, các enzyme quan trọng như phytase, amylase, protease, α -galactosidase và hàng loạt các enzyme khác. *A. niger* được sử dụng làm “nhà máy tế bào” để sản xuất nhiều loại enzyme phục vụ công nghiệp chế biến thực phẩm. Tuy nhiên, năng lực sinh tổng hợp các sản phẩm trao đổi chất như enzyme, axit hữu cơ của các chủng *A. niger* phân lập từ tự nhiên thường khá thấp. Do đó, để tăng cường khả năng sinh tổng hợp sản phẩm ở *A. niger*, nhiều kỹ thuật gây đột biến hoặc cải biến di truyền đã được phát triển và áp dụng [1, 2].

Hiện nay, cải biến di truyền nấm sợi nói chung và nấm *A. niger* nói riêng vẫn chủ yếu dựa trên kỹ thuật như xóa gen theo cơ chế tái tổ hợp tương đồng, CRISPR/Cas9 và RNA silencing (hay RNA interference-RNAi) [1-3]. RNA silencing là kỹ thuật cho phép ức chế sự biểu hiện của một gen thông qua việc phân hủy các phân tử mRNA của gen đó mà không ảnh hưởng đến trình tự của gen trong hệ

gen nấm. Do đó, vai trò của gen đích có thể được nghiên cứu nhanh chóng ngay cả khi thông tin về trình tự gen bị hạn chế. RNAi đã được chứng minh là có hiệu quả trên nhiều loài nấm sợi khác nhau như *Magnaporthe oryzae*, *Colletotrichum lagenarium*, *Penicillium chrysogenum*, *Aspergillus fumigatus*, *Neurospora crassa*... [3, 4]. Mặc dù đã có một số công trình báo cáo về hiệu quả của RNA silencing ở nấm sợi *A. niger* thông qua phương pháp chuyển gen sử dụng tế bào trần [5, 6]. Tuy nhiên, kỹ thuật RNA silencing sử dụng vector nhị thể và phương pháp chuyển gen thông qua vi khuẩn *A. tumefaciens* vẫn chưa được ứng dụng ở *A. niger*. Trong nghiên cứu này, vector nhị thể mang cấu trúc RNA silencing tích hợp công nghệ tái tổ hợp Gateway bước đầu được sử dụng để đánh giá khả năng ức chế sự biểu hiện của gen chỉ thị huỳnh quang đỏ *DsRed* và gen *stuA* liên quan đến điều hòa hình thành bào tử ở *A. niger*.

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu

Các chủng vi sinh vật gồm *A. niger* N402, *A. niger* N402Red, *A. tumefaciens* AGL1, *E. coli* DB3.1 và vector pGS1-nat, pGS2-nat, pDONR/Zeo được cung cấp bởi Phòng Genomic, Phòng Thí nghiệm Trọng điểm Công nghệ Enzyme và Protein, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội.

Các cặp mồi sử dụng trong nghiên cứu này được tổng hợp bởi Công ty IDT (Singapore) và được liệt kê ở bảng 1.

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

Evaluation of the effectiveness of RNA silencing in the filamentous fungus *Aspergillus niger* using a binary vector integrated with Gateway recombination cloning technology

Van Tuan Tran^{1,2*}, Thi Binh Xuan Loc Do²,
Thi Khanh Linh Bui², Thi Mui Dinh², Hong Diep Le¹,
Thi Dam Linh Mai¹, Thi Thanh Huyen Tran¹, Duc Ngoc Pham¹

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

²Key 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 20 April 2023; revised 15 May 2023; accepted 18 May 2023

Abstract:

The filamentous fungus *Aspergillus niger* is widely employed in the production of citric acid and some industrial enzymes such as phytase, glucoamylase, and glucose oxidase. Currently, several genetic modification tools have been developed and applied to this fungal species. However, the RNA silencing technique is less used for *A. niger*. In the present study, an RNA silencing binary vector integrated with the Gateway recombination cloning technology was evaluated in *A. niger*. The integration of Gateway recombination cloning technology in binary vectors for rapid generation of hairpin RNA structure allowed the assessment of inhibition of target gene expression through mRNA degradation. The RNA silencing constructs were successfully transferred into *A. niger* via *Agrobacterium tumefaciens*. Results showed that the RNA silencing vectors were effective in downregulating the expression of the *DsRed* fluorescent reporter gene and the *stuA* regulatory gene. Interestingly, the silenced mutants of *stuA* exhibited a significant reduction in fungal sporulation. This finding revealed that the RNA silencing technique with the examined Gateway binary vector represents a potential genetic tool for functional studies of target genes in *A. niger*.

Keywords: *Agrobacterium tumefaciens*, *Aspergillus niger*, *DsRed* fluorescent reporter gene, Gateway recombination cloning, RNA silencing, *stuA* regulatory gene.

Classification number: 1.6

Bảng 1. Các môi sử dụng trong nghiên cứu.

Tên môi	Trình tự (5'-3')	Kích thước sản phẩm (bp)
DsRed-gwF	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCCGA GGACGTCATCAAGGAG	450
DsRed-gwR	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGTGGGTCCCTCC CAGCCCATAGTCTT	
AnstuA-gwF	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTTCAGT AATGGGCACGTTGGAAG	503
AnstuA-gwR	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGTGGGTCTGTCT TACGGCGCTTGCTATC	
NAT-gpdA-F	AAAGAGCTCACTAGTGACGTCAGCGCTAGATCTT GGCATCGGAGAGACGG	1500
NAT-gpdA-R	AAATCTAGAAGGCCTCTCGAGGGGCCCGATCCT CAGGGGCAGGCATGCT	

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Thu bào tử nấm: Các chủng nấm *A. niger* được nuôi cấy trên môi trường thạch Czapek-Dox (CD) ở nhiệt độ 28°C. Sau 5 ngày, bào tử nấm trên bề mặt đĩa được hòa vào nước cất vô trùng và lọc qua màng Miracloth vô trùng. Dịch bào tử được xác định nồng độ nhờ buồng đếm Thoma và pha loãng đến nồng độ bào tử thích hợp để sử dụng cho các thí nghiệm tiếp theo. Dịch bào tử được sử dụng ngay, hoặc giữ ở 4°C để sử dụng trong vòng 1-2 tuần hoặc được bảo quản lâu dài trong 20% glycerol sau khi được làm đông bằng nitơ lỏng và giữ ở -30°C.

Tách chiết DNA hệ gen nấm: Các chủng nấm được nuôi trong môi trường PDB (Potato dextrose broth) ở điều kiện 28°C và lắc 200 vòng/phút. Sau 3 ngày, dịch nuôi được lọc qua màng Miracloth vô trùng. Phần hệ sợi nấm trên màng lọc được loại bỏ tối đa nước bằng giấy thấm sạch và chuyển vào ống ly tâm 2 ml. Quy trình tách chiết DNA từ hệ sợi nấm được thực hiện theo V.T. Tran và cs (2017) [7].

Tách chiết RNA tổng số: Sau 2 ngày nuôi trên môi trường tối thiểu CD, sợi nấm được thu và nghiền thành bột mịn trong nitơ lỏng dùng cho tách chiết RNA. RNA tổng số được tinh sạch nhờ kit tách chiết RNA của Hãng iNtRON Biotechnology (Hàn Quốc). RNA sau tinh sạch được xử lý bổ sung với DNase I trong 20 phút ở 37°C nhằm loại bỏ hoàn toàn DNA hệ gen nấm. Sau đó, enzyme DNase I được bất hoạt ở 75°C trong 15 phút. Sản phẩm RNA tổng số được sử dụng ngay cho tổng hợp cDNA.

Tổng hợp cDNA: RNA tổng số sau khi tinh sạch được sử dụng ngay để tổng hợp cDNA. Một lượng 800-1000 ng RNA tổng số được sử dụng cho một phản ứng tổng hợp cDNA với mỗi oligo dT và enzyme phiên mã ngược reverse transcriptase. Toàn bộ quy trình được thực hiện với ProtoScript® First Strand cDNA Synthesis Kit của Hãng New England Biolabs theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Tạo vector nhệ thể mang cấu trúc ức chế sự biểu hiện của gen đích ở nấm *A. niger*: Đoạn DNA khoảng 450 nucleotide của gen *DsRed* được khuếch đại bằng PCR với khuôn là DNA tổng số của chủng *A. niger* N402Red với cặp mồi *DsRed*-gwF/*DsRed*-gwR (bảng 1). Phản ứng PCR sử dụng enzyme Phusion high-fidelity DNA polymerase của Hãng Thermo Scientific (Mỹ) với quy trình như sau: 94°C - 6 phút; 35 chu kỳ lặp lại các bước 94°C - 30 giây, 60°C - 30 giây, 72°C - 30 giây và 72°C - 10 phút, giữ ở 4°C. Cấu trúc silencing gen *DsRed* ở *A. niger* được tạo bằng cách sử dụng bộ kit gồm 2 phần dùng cho 2 phản ứng là Gateway® BP Clonase™ II Enzyme Mix và Gateway® LR Clonase™ II Enzyme Mix (Invitrogen). Đầu tiên, đoạn gen *DsRed* khuếch đại với cặp mồi *DsRed*-gwF/*DsRed*-gwR mang trình tự tái tổ hợp đặc hiệu *attB1* và *attB2*. Sản phẩm PCR được tích hợp vào vector trung gian pDONR/Zeo nhờ phản ứng BP với sự có mặt của enzyme BP clonase. Sau đó, thực hiện phản ứng LR với sự có mặt của enzyme LR clonase để chuyển đoạn gen *DsRed* từ vector pDONR/Zeo-*DsRed* sang vector nhệ thể pGS1-nat. Kết quả là đoạn gen *DsRed* sẽ thay thế các Gateway cassette trong pGS1 ở cả chiều xuôi và chiều ngược để tạo ra cấu trúc RNA silencing dạng sợi kẹp tóc. Vector nhệ thể pGS1-*DsRed* mang cấu trúc silencing gen *DsRed* được xác nhận bằng cắt kiểm tra với enzyme giới hạn *Pst*I.

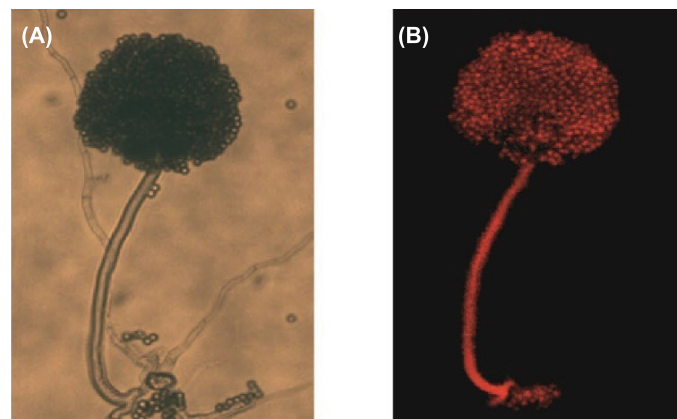
Vector nhệ thể pGS2-*stuA* mang cấu trúc ức chế biểu hiện gen *stuA* được thực hiện tương tự với cặp mồi *AnstuA*-gwF/*AnstuA*-gwR (bảng 1). Sản phẩm PCR của đoạn gen *stuA* được tích hợp vào vector nhệ thể pGS2-nat theo phương pháp như mô tả ở trên. Vector tái tổ hợp được xác nhận bằng cắt kiểm tra với enzyme giới hạn *Avr*II (*Xma*II).

Chuyển gen và xác nhận thể chuyển gen: Vector silencing được biến nạp vào chủng vi khuẩn *A. tumefaciens* AGL1 nhờ hệ thống chuyển gen bằng xung điện Bio-Rad Gene Pulse Xcell™ Electroporation System. Quy trình chuyển gen vào *A. niger* N402Red nhờ vi khuẩn *A. tumefaciens* với nhiệt độ cho bước đồng nuôi cấy là 22°C. Sau 2,5 ngày đồng nuôi cấy, màng chuyển gen được chuyển sang môi trường CD chứa kháng sinh nourseothricin (200 µg/ml) và cefotaxime (300 µg/ml). Sau 5 ngày ở 28°C, các khuẩn lạc nấm sẽ xuất hiện trên môi trường chọn lọc. Đối với gen *DsRed*, các thể chuyển gen được kiểm tra dưới kính hiển vi huỳnh quang Axioplan (Carl Zeiss, Đức) để đánh giá sự biểu hiện của gen này. Đối với gen *stuA*, các thể chuyển gen được nuôi trong môi trường CD và RNA tổng số được tách chiết để phục vụ cho đánh giá sự biểu hiện của gen nhờ reverse transcription - PCR (RT-PCR) với cặp mồi đặc hiệu *AnstuA*-gwF/*AnstuA*-gwR (bảng 1). Để xác định chính xác số lượng bào tử hình thành ở các chủng silencing gen *stuA* so với chủng gốc ban đầu, các chủng được nuôi trên môi trường CD trong 5 ngày. Bào tử nấm được thu từ đĩa nuôi cấy bằng nước cất vô trùng và được lọc qua màng Miracloth vô trùng. Dịch bào tử được đếm dưới kính hiển vi quang học sử dụng buồng đếm Thoma. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần độc lập.

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Đánh giá sự biểu hiện của gen *DsRed* ở chủng *A. niger* N402Red

Chủng nấm *A. niger* N402Red được tiến hành làm tiêu bản và quan sát dưới kính hiển vi huỳnh quang Axioplan. Kết quả cho thấy, toàn bộ hệ sợi và cấu trúc sinh bào tử của chủng nấm *A. niger* N402Red chứa tín hiệu huỳnh quang đỏ rất rõ nét (hình 1). Gen chỉ thị huỳnh quang đỏ *DsRed* đã được biểu hiện thành công và được coi là một gen chỉ thị hiệu quả ở nhiều loài nấm sợi khác nhau [6, 8]. Nghiên cứu này cũng xác nhận, gen *DsRed* có thể sử dụng làm gen chỉ thị cho nghiên cứu biểu hiện gen ở *A. niger*. Chủng nấm *A. niger* N402Red có thể sử dụng để đánh giá khả năng hoạt động của cấu trúc RNA silencing ức chế biểu hiện gen *DsRed*.



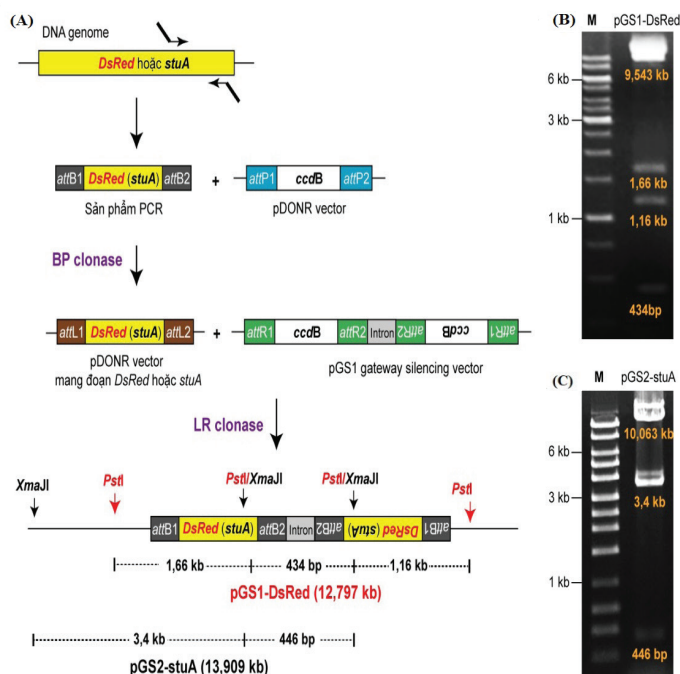
Hình 1. Biểu hiện protein huỳnh quang đỏ *DsRed* ở chủng *A. niger* N402Red. (A) Hình thái nấm dưới kính hiển vi sử dụng ánh sáng thường; (B) Sử dụng ánh sáng huỳnh quang.

3.2. Kết quả tạo vector nhệ thể RNA silencing nhằm ức chế biểu hiện của gen *DsRed* và *stuA*

RNA silencing là quá trình ức chế sự biểu hiện của gen đích thông qua các phân tử RNA ức chế với kích thước nhỏ (siRNA) khoảng 21-22 nucleotide ở trong tế bào. Cơ chế phân tử của quá trình này được chia thành hai giai đoạn. Giai đoạn 1, phân tử RNA kép (dsRNA) được phân hủy bởi enzyme DICER (một loại enzyme endoribonuclease) thành những đoạn ngắn siRNA có chiều dài khoảng 21-22 nucleotide. Giai đoạn 2, siRNA sẽ kết hợp với phức hệ cảm ứng silencing (RISC) để dò tìm các phân tử mRNA của gen đích để phân hủy chúng [9]. Để thực hiện thành công kỹ thuật RNA silencing, cấu trúc phân hủy mRNA theo cơ chế RNA silencing đối với gen đích cần phải được tạo ra. Một trong những công nghệ hỗ trợ hiệu quả cho việc tạo cấu trúc RNA silencing là công nghệ tái tổ hợp Gateway. Công nghệ này hiệu quả và có độ chính xác cao, đặc biệt trong trường hợp cần gắn đoạn DNA theo trình tự chiều xuôi và chiều ngược để tạo cấu trúc RNA silencing dạng kẹp tóc [10].

Để tạo cấu trúc RNA silencing đối với gen đích *DsRed* hoặc *stuA*, một phần trình tự mã hóa của gen đích được khuếch đại từ DNA tổng số nhờ PCR. Đoạn gen này được chuyển vào

vector trung gian pDONR/Zeo nhờ enzyme BP clonase. Sau đó, đoạn gen *DsRed* (hoặc *stuA*) từ pDONR/Zeo được chuyển sang vector nhĩ thể pGS1-nat (đối với gen *DsRed*) hoặc pGS2-nat (đối với gen *stuA*) nhờ enzyme LR clonase. Hai vector nhĩ thể mang cấu trúc RNA silencing tạo được đều chứa gen kháng nourseothricin để phù hợp cho chuyển gen vào nấm *A. niger* (hình 2A).



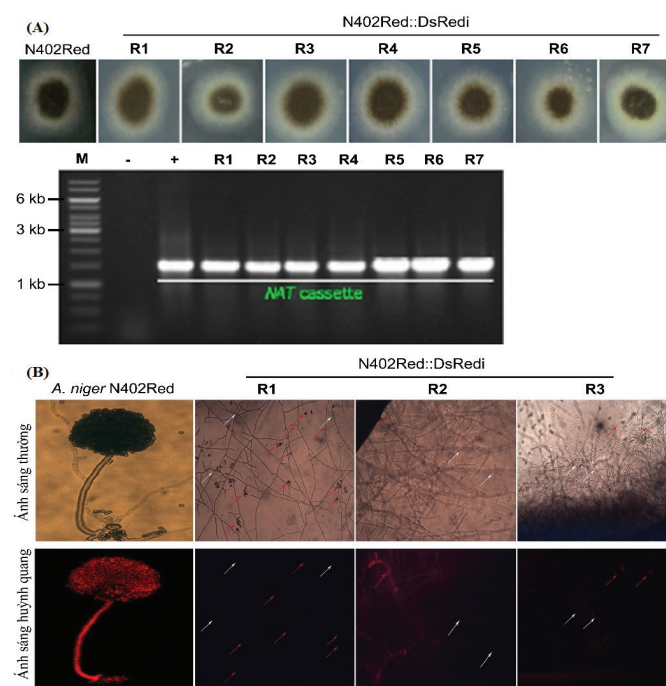
Hình 2. Quy trình tạo và kết quả cắt kiểm tra 2 vector silencing gen *DsRed* và *stuA* bằng enzyme giới hạn. (A) Quy trình tạo vector nhĩ thể mang cấu trúc RNA silencing cho gen *DsRed* và *stuA* theo công nghệ tái tổ hợp Gateway; (B) Kết quả cắt kiểm tra vector pGS1-DsRed bằng enzyme giới hạn *Pst*I; (C) Kết quả cắt kiểm tra vector pGS2-*stuA* bằng enzyme giới hạn *Xma*II; M: 1 kb DNA marker.

Cấu trúc silencing gen *DsRed* là pGS1-DsRed được cắt kiểm tra với enzyme giới hạn *Pst*I. Điện di sản phẩm cắt trên gel agarose 0,7% cho thấy 4 băng DNA với kích thước 434, 1,66, 1,16 và 9,543 kb (hình 2B). Kết quả này hoàn toàn phù hợp với kết quả tính toán lý thuyết dựa trên trình tự. Do đó có thể khẳng định cấu trúc silencing gen *DsRed* đã được tạo thành công. Tương tự, cấu trúc silencing gen *stuA* là pGS2-*stuA* được cắt kiểm tra với enzyme giới hạn *Xma*II. Kết quả phân tích sản phẩm cắt trên gel agarose cho thấy 3 băng DNA với kích thước 446, 3,4 và 10,063 kb (hình 2C), đúng với tính toán lý thuyết dựa trên trình tự. Như vậy, cấu trúc silencing gen *stuA* đã được tạo thành công. Các cấu trúc trên được chuyển vào chủng nấm *A. niger* N402Red để đánh giá khả năng ức chế sự biểu hiện của gen đích theo cơ chế RNA silencing.

3.3. Chuyển cấu trúc silencing gen *DsRed* vào *A. niger* N402Red thông qua vi khuẩn *A. tumefaciens*

Để thực hiện chuyển cấu trúc silencing gen *DsRed* vào *A. niger* N402Red thông qua vi khuẩn *A. tumefaciens*,

vector nhĩ thể pGS1-DsRed được biến nạp vào chủng vi khuẩn *A. tumefaciens* AGL1 bằng phương pháp xung điện. Vi khuẩn *A. tumefaciens* AGL1 mang vector được sử dụng để chuyển gen vào nấm *A. niger* N402Red. Sau 3 ngày ủ màng giấy lọc cellulose (Hãng Sartorius, Đức) trên môi trường CD có bổ sung kháng sinh nourseothricin (200 µg/ml) để chọn lọc các khuẩn lạc nấm chuyển gen và bổ sung kháng sinh cefotaxime (300 µg/ml) để diệt vi khuẩn *A. tumefaciens*. 7 khuẩn lạc (ký hiệu: R1, R2, R3, R4, R5, R6, R7) được chọn ngẫu nhiên từ đĩa chuyển gen và được thuần khiết theo phương pháp nuôi cấy bào tử đơn. Kết quả phân tích cho thấy, 7 chủng silencing gen *DsRed* có hình thái hệ sợi tương đồng với chủng gốc N402Red. Phân tích PCR với cặp mồi NAT-gpdA-F/NAT-gpdA-F đặc hiệu cho gen kháng nourseothricin xác nhận cả 7 chủng đều mang cấu trúc RNA silencing trong hệ gen của chúng (hình 3A).



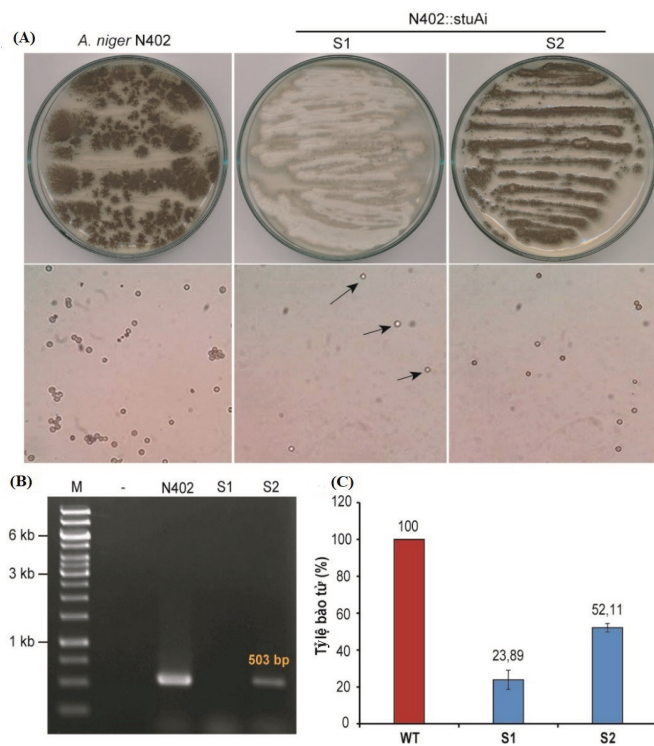
Hình 3. Sự biểu hiện của protein *DsRed* ở chủng nấm *A. niger* N402Red và ở các chủng silencing. (A) Sinh trưởng trên môi trường CD của 7 chủng silencing gen *DsRed* (R1-R7) và chủng gốc N402Red. PCR sử dụng cặp mồi đặc hiệu cho gen kháng nourseothricin (NAT cassette) xác nhận cả 7 chủng đều đã mang cấu trúc RNA silencing trong hệ gen của chúng. Đối chứng dương (+) sử dụng vector pGS1-DsRed, đối chứng âm (-) sử dụng DNA hệ gen từ chủng gốc N402Red. (B) Hình thái hệ sợi và cấu trúc cuống sinh bào tử của 3 chủng chuyển gen đại diện. Các chủng nấm được nuôi trực tiếp trên tiêu bản với môi trường CD trong 3 ngày và được quan sát dưới kính hiển vi huỳnh quang. Mũi tên màu trắng chỉ sợi nấm, mũi tên đỏ chỉ cuống sinh bào tử.

Kết quả đánh giá sự biểu hiện của gen *DsRed* dưới kính hiển vi huỳnh quang Axioplan (Carl Zeiss, Đức) cho thấy, tín hiệu huỳnh quang đỏ giảm mạnh ở cả 7 chủng chuyển gen và được minh họa thông qua 3 chủng độc lập như trong hình 3B. Kết quả này cũng tương đồng với nghiên cứu trước đây về sự ức chế biểu hiện gen chỉ thị *DsRed* ở nấm sợi

Acremonium chrysogenum nhờ RNA silencing [11]. Như vậy, cấu trúc silencing gen *DsRed* (pGS1-*DsRed*) đã hoạt động ở nấm *A. niger* và tạo ra các chủng đột biến giảm biểu hiện gen *DsRed*. Điều này cho thấy tiềm năng của kỹ thuật RNA silencing trong nghiên cứu chức năng gen ở nấm *A. niger*.

3.4. Chuyển cấu trúc silencing gen *stuA* vào *A. niger* N402 thông qua vi khuẩn *A. tumefaciens*

Tương tự, cấu trúc silencing gen *stuA* (pGS2-*stuA*) được chuyển vào chủng nấm *A. niger* N402 thông qua vi khuẩn *A. tumefaciens*. Kết quả thu được 2 chủng chuyển gen là S1 và S2 có hệ sợi giảm sắc tố màu đen so với chủng gốc ban đầu, có thể do sự suy giảm về khả năng hình thành bào tử (hình 4A).



Hình 4. Kết quả silencing gen *stuA* ở nấm *A. niger* N402. (A) Hình thái hệ sợi và khả năng hình thành bào tử của 2 chủng S1, S2 so với chủng gốc N402. Mỗi tên chỉ ra hình dạng bào tử nấm dưới kính hiển vi. (B) RT-PCR xác nhận sự suy giảm về biểu hiện của gen *stuA* ở chủng silencing S1, S2. (C) Tỷ lệ bào tử hình thành của 2 chủng silencing S1, S2 so với chủng N402; M: 1 kb DNA marker; (-): đối chứng âm.

Trên môi trường đĩa thạch CD, hệ sợi của chủng silencing S1 và S2 giảm rõ rệt về sắc tố đen melanin (sắc tố điển hình tích lũy ở bào tử của *A. niger*), đặc biệt là chủng S1 khi so sánh với chủng tự nhiên N402. Đồng thời, khi quan sát dưới kính hiển vi cho thấy, mật độ bào tử giảm đi đáng kể ở 2 chủng silencing gen *stuA* là S1 và S2 so với chủng gốc N402 (hình 4A). Để kiểm tra mức độ biểu hiện của gen *stuA* ở 2 chủng silencing S1 và S2, RNA tổng số của 2 chủng này và chủng *A. niger* N402 được tách chiết và phiên mã

ngược thành dạng cDNA để dùng cho RT-PCR với cặp mồi AnstuA-gwF/AnstuA-gwR. Kết quả RT-PCR cho thấy, gen *stuA* gần như không được biểu hiện ở chủng S1, trong khi ở chủng S2 thì sự biểu hiện của gen này giảm đi đáng kể khi so với chủng gốc N402 (hình 4B). Kết quả đếm số lượng bào tử dưới kính hiển vi cho thấy, tỷ lệ bào tử của chủng silencing S1 giảm tới 76% và chủng S2 giảm tới 48% khi so với chủng tự nhiên *A. niger* N402 (hình 4C). Việc ức chế biểu hiện gen bằng RNA silencing có thể tạo ra các chủng đột biến ức chế biểu hiện gen đích ở các mức độ khác nhau. Do đó, tình trạng liên quan đến gen bị ức chế cũng sẽ biến đổi ở mức tương ứng [11]. Vai trò quan trọng của gen *stuA* trong điều hòa biệt hóa hình thái và hình thành bào tử đã được điều tra ở nhiều loài nấm sợi khác nhau. Ở nấm *A. nidulans*, đột biến xóa gen *stuA* dẫn đến cuồng sinh bào tử bị ngăn lại, giảm số bong bào tử và thiếu thể bình. Tuy nhiên, đột biến xóa gen *stuA* ở *A. nidulans* vẫn hình thành một số bào tử mọc trực tiếp từ cấu trúc bong [12]. Đột biến xóa gen *stuA* ở *Fusarium oxysporum* làm thay đổi sắc tố và giảm hình thành bào tử ở nấm [13]. Ở nấm *A. fumigatus* và *A. chrysogenum*, gen *stuA* giữ vai trò trung tâm trong điều hòa hình thành bào tử [13, 14]. Kết quả của nghiên cứu này cho thấy, gen *stuA* ở *A. niger* có chức năng tương đồng với gen *stuA* ở các loài nấm khác trong điều hòa quá trình hình thành bào tử. Ức chế biểu hiện gen đích ở việc ức chế biểu hiện gen *stuA* ở *A. niger* nhờ RNA silencing đã làm suy giảm mạnh khả năng hình thành bào tử ở chủng S1 và S2 (hình 4). Kết quả thu được cũng chỉ ra vai trò của gen *stuA* ở *A. niger* có thể được đánh giá sơ bộ một cách nhanh chóng nhờ kỹ thuật RNA silencing, đặc biệt là khi sử dụng vector nhệ thể có tích hợp công nghệ tái tổ hợp Gateway. Để xác định chính xác vai trò của gen đích ở nấm sợi, các kỹ thuật như xóa gen và phục hồi gen theo cơ chế trao đổi chéo tương đồng thường được sử dụng [11]. Các phương pháp cho phép loại bỏ hoặc phục hồi 100% hoạt tính của gen đích để giúp đánh giá một cách chi tiết chức năng của gen này ở nấm. Do đó, vai trò chi tiết của gen *stuA* ở *A. niger* vẫn cần được làm sáng tỏ trong các nghiên cứu tiếp theo.

4. Kết luận

Nghiên cứu đã bước đầu thành công trong việc đánh giá hiệu quả của kỹ thuật RNA silencing ở nấm sợi *A. niger*. Vector nhệ thể tích hợp công nghệ tái tổ hợp Gateway hỗ trợ tạo nhanh cấu trúc RNA silencing dạng kẹp tóc để ức chế sự biểu hiện gen chỉ thị huỳnh quang *DsRed* và gen điều hòa *stuA* ở *A. niger*.

LỜI CẢM ƠN

Các tác giả xin chân thành cảm ơn Quỹ Phát triển Khoa học và Công nghệ Quốc gia (NAFOSTED) đã tài trợ kinh phí cho nghiên cứu này thông qua đề tài mã số 106.04-2018.36.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] T.C. Cairns, L. Barthel, V. Meyer (2021), “Something old, something new: Challenges and developments in *Aspergillus niger* biotechnology”, *Essays in Biochemistry*, **65**(2), pp.213-224, DOI: 10.1042/EBC20200139.
- [2] C. Li, J. Zhou, G. Du, et al. (2020), “Developing *Aspergillus niger* as a cell factory for food enzyme production”, *Biotechnology Advances*, **44**, DOI: 10.1016/j.biotechadv.2020.107630.
- [3] U. Kück, B. Hoff (2010), “New tools for the genetic manipulation of filamentous fungi”, *Applied Microbiology and Biotechnology*, **86**(1), pp.51-62, DOI: 10.1007/s00253-009-2416-7.
- [4] H. Nakayashiki (2005), “RNA silencing in fungi: Mechanisms and applications”, *FEBS Letters*, **579**(26), pp.5950-5957, DOI: 10.1016/j.febslet.2005.08.016.
- [5] S.E. Barnes, M.J. Alcocer, D.B. Archer (2008), “siRNA as a molecular tool for use in *Aspergillus niger*”, *Biotechnology Letters*, **30**(5), pp.885-890, DOI: 10.1007/s10529-007-9614-0.
- [6] X. Sun, H. Wu, G. Zhao, et al. (2018), “Morphological regulation of *Aspergillus niger* to improve citric acid production by *chsC* gene silencing”, *Bioprocess and Biosystems Engineering*, **41**(7), pp.1029-1038, DOI: 10.1007/s00449-018-1932-1.
- [7] V.T. Tran, T.B.X.L. Do, T.K. Nguyen, et al. (2017), “A simple, efficient and universal method for the extraction of genomic DNA from bacteria, yeasts, molds and microalgae suitable for PCRbased applications”, *Vietnam Journal of Science, Technology and Engineering*, **59**(4), pp.66-74, DOI: 10.31276/VJSTE.59(4).66.
- [8] D. Janus, B. Hoff, E. Hofmann, et al. (2007), “An efficient fungal RNA-silencing system using the *DsRed* reporter gene”, *Applied and Environmental Microbiology*, **73**(3), pp.962-970.
- [9] S.M. Elbashir, W. Lendecke, T. Tuschl (2001), “RNA interference is mediated by 21-and 22-nucleotide RNAs”, *Genes & Development*, **15**(2), pp.188-200, DOI: 10.1101/gad.862301.
- [10] S.M. Traore, B. Zhao (2011), “A novel Gateway®-compatible binary vector allows direct selection of recombinant clones in *Agrobacterium tumefaciens*”, *Plant Methods*, **7**(1), pp.1-8, DOI: 10.1186/1746-4811-7-42.
- [11] A. Clutterbuck (1969), “A mutational analysis of conidial development in *Aspergillus nidulans*”, *Genetics*, **63**(2), pp.317-327, DOI: 10.1093/genetics/63.2.317.
- [12] T. Ohara, T. Tsuge (2004), “FoSTUA, encoding a basic helixloop-helix protein, differentially regulates development of three kinds of asexual spores, macroconidia, microconidia, and chlamydospores, in the fungal plant pathogen *Fusarium oxysporum*”, *Eukaryotic Cell*, **3**(6), pp.1412-1422, DOI: 10.1128/ec.3.6.1412-1422.2004.
- [13] D.C. Sheppard, T. Doedt, L.Y. Chiang, et al. (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*, **16**(12), pp.5866-5879, DOI: 10.1091/mbc.e05-07-0617.
- [14] P. Hu, Y. Wang, J. Zhou, et al. (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*, **83**, pp.26-40, DOI: 10.1016/j.fgb.2015.08.003.