

Xác định đặc điểm sinh học và bước đầu nghiên cứu chuyển gen vào nấm sợi *Penicillium chrysogenum* có nguồn gốc Việt Nam

Vũ Xuân Tạo^{1,2,*}, Trần Văn Tuấn^{1,2}

¹Phòng thí nghiệm Trọng điểm Công nghệ Enzym và Protein

²Khoa Sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQGHN,
334 Nguyễn Trãi, Thanh Xuân, Hà Nội, Việt Nam

Nhận ngày 16 tháng 8 năm 2017

Chỉnh sửa ngày 20 tháng 9 năm 2017; Chấp nhận đăng ngày 10 tháng 10 năm 2017

Tóm tắt: *Penicillium chrysogenum* là loài nấm sợi được sử dụng trong sản xuất kháng sinh penicillin và một số sản phẩm trao đổi chất bậc hai có giá trị. Hai chủng nấm VTCC-F1170 và VTCC-F1172 được định danh là *P. chrysogenum* bởi Bảo tàng giống chuẩn Vi sinh vật (Viện Vi sinh vật và Công nghệ sinh học, ĐHQGHN) có khả năng sinh chất kháng sinh ức chế vi khuẩn kiểm định *Staphylococcus aureus*. Các phân tích bổ sung về đặc điểm hình thái và giải trình tự vùng ITS của rDNA cũng xác nhận rằng việc định danh hai chủng nêu trên thuộc loài *P. chrysogenum* là hoàn toàn chính xác. Những bằng chứng này đảm bảo rằng chủng VTCC-F1170 và VTCC-F1172 đủ tin cậy để sử dụng cho các nghiên cứu cải biến di truyền *P. chrysogenum*. Kết quả khảo sát về sự mẫn cảm kháng sinh cho thấy sinh trưởng của cả chủng VTCC-F1170 và VTCC-F1172 đều bị ức chế hoàn toàn bởi nourseothricin ở nồng độ 50 µg/ml và phleomycin ở nồng độ 150 µg/ml. Sử dụng phương pháp chuyển gen nhờ vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens*, bước đầu chúng tôi đã chuyển thành công marker kháng nourseothricin vào hệ gen của chủng VTCC-F1170.

Từ khoá: *Penicillium chrysogenum*, sinh kháng sinh, chuyển gen nhờ vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens*, marker kháng nourseothricin.

1. Đặt vấn đề

Penicillium chrysogenum là loài nấm sợi sinh kháng sinh penicillin được phát hiện lần đầu tiên vào năm 1928 bởi Alexander Fleming [1]. Loài nấm này được ứng dụng rộng rãi hơn 80 năm qua trong sản xuất công nghiệp penicillin, một kháng sinh thuộc nhóm β-lactam. Việc phát hiện ra penicillin đã góp

phần nâng cao hiệu quả điều trị bệnh cho con người và đẩy mạnh sự phát triển của công nghiệp dược phẩm. Nhiều chủng *P. chrysogenum* được xử lý đột biến cho khả năng sinh kháng sinh penicillin với hiệu suất cao. Từ những chủng tự nhiên với hiệu suất 60 µg/ml, đến nay các chủng công nghiệp đã đạt hiệu suất tới 85000 µg/ml [2]. Theo các nghiên cứu trước đây, nhiều chủng *P. chrysogenum* tiết ra một số loại protein bất hoạt sự sinh trưởng của nấm gây bệnh cơ hội trên động vật và thực vật như protein PAF, PgAFP và PgChP [3-5]. Chính vì vậy mà nấm *P. chrysogenum* trở thành

* Tác giả liên hệ. ĐT.: 84-24-35575492.

Email: taovx.tsa@gmail.com

<https://doi.org/10.25073/2588-1140/vnunst.4544>

đối tượng nghiên cứu với nhiều tiềm năng ứng dụng. Việc can thiệp vào hệ gen nấm có thể giúp tăng hiệu suất sinh tổng hợp kháng sinh hoặc các chất có hoạt tính sinh học mong muốn. Phương pháp chuyển gen thông qua vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens* đã được chứng minh là hiệu quả và có nhiều ưu thế đối với nấm sợi [6]. Trong nghiên cứu này hai chủng *P. chrysogenum* có nguồn gốc Việt Nam được điều tra đầy đủ về đặc điểm sinh học và bước đầu nghiên cứu chuyển gen vào hai chủng nấm này đã thành công nhờ sử dụng vi khuẩn *A. tumefaciens* và marker kháng nourseothricin.

2. Vật liệu và phương pháp

2.1. Vật liệu

Hai chủng nấm sợi *P. chrysogenum* VTCC-F1170 và VTCC-F1172 do Viện Vi sinh vật học và Công nghệ sinh học, ĐHQGHN cung cấp, chủng vi khuẩn *Staphylococcus aureus* ATCC25923 dùng làm vi sinh vật kiểm định và chủng vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens* AGL1 dùng để chuyển gen vào *P. chrysogenum* được lưu giữ trong bộ sưu tập chủng giống của nhóm nghiên cứu. Vector nhị thể pPK2-nat mang gen kháng nourseothricin dưới sự điều khiển của *gpdA* promoter được cung cấp bởi Phòng Genomic, Phòng thí nghiệm Trọng điểm Công nghệ Enzym và Protein, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQGHN.

2.2. Phương pháp

2.2.1. Phân tích đặc điểm hình thái và giải trình tự vùng ITS của rDNA

Hai chủng *P. chrysogenum* được nuôi trên đĩa Petri chứa môi trường PDA (potato dextrose agar) quan sát hệ sợi và sắc tố nấm hoặc nuôi trực tiếp trên tiêu bản chứa một giọt môi trường PDA để quan sát hình thái hệ sợi nấm dưới kính hiển vi. Đĩa và tiêu bản được ủ ở 28°C trong 2-3 ngày.

Bào tử nấm được thu từ đĩa nuôi cấy sử dụng nước vô trùng và màng lọc Miracloth.

DNA hệ gen được chiết từ hệ sợi nấm theo quy trình đã được công bố của nhóm nghiên cứu [7]. PCR khuếch đại vùng ITS từ DNA hệ gen sử dụng cặp mồi ITS1 (TCCGTAGGTGAACCTGCGG)/ITS4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC) đặc hiệu cho nấm [8]. Sản phẩm PCR được điện di trên gel 0,7% và tinh sạch bằng kit tinh sạch của hãng Promega. Mẫu DNA tinh sạch được giải trình tự bởi công ty 1st BASE (Singapore) và trình tự ITS được phân tích so sánh với dữ liệu của GenBank. Cây phát sinh chủng loại được xây dựng bằng phần mềm MEGA6.

2.2.2. Đánh giá khả năng sinh trưởng và sinh penicillin của các chủng *P. chrysogenum*

Đánh giá khả năng sinh trưởng của hai chủng *P. chrysogenum* trên môi trường PDA, CD (Czapek-Dox) và X [9]: 10 µl dịch bào tử (10^6 bào tử/ml) được nhỏ trên các đĩa môi trường và nuôi ở 28°C trong 7 ngày.

Kiểm tra khả năng sinh penicillin của hai chủng *P. chrysogenum* ở môi trường lỏng PDA, CD và X: 1 ml dịch bào tử (10^6 bào tử/ml) được nuôi trong 50 ml môi trường, tốc độ lắc 200 vòng/phút, ở 28°C trong 7 ngày. Hút 50 µl dịch nuôi nhỏ vào lỗ thạch trên đĩa môi trường PDA đã cấy trái vi khuẩn kiểm định *S. aureus*. Đĩa được ủ qua đêm ở 37°C.

2.2.3. Đánh giá mức độ miễn cảm kháng sinh và chuyển gen vào nấm *P. chrysogenum*

Môi trường CD được bổ sung kháng sinh nourseothricin (0, 25 và 50 µg/ml) hoặc phleomycin (0, 100 và 150 µg/ml). Bào tử nấm được bổ sung lên môi trường và đĩa được ủ ở 28°C trong 5 ngày. Nồng độ kháng sinh ức chế hoàn toàn sự sinh trưởng của nấm sẽ được sử dụng cho quy trình chuyển gen.

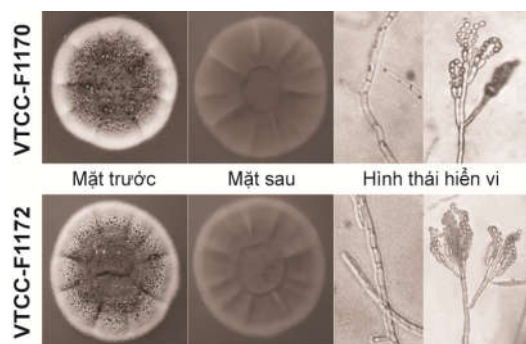
Vector nhị thể pPK2-nat được biến nạp vào chủng vi khuẩn *A. tumefaciens* AGL1 nhờ hệ thống chuyển gen bằng xung điện Bio-Rad Gene Pulse Xcell™ Electroporation System. Quy trình chuyển gen vào *P. chrysogenum* nhờ vi khuẩn *A. tumefaciens* được tiến hành theo De-Boer và cs (2013) [10] với sự thay đổi về nhiệt độ và thời gian cho bước đồng nuôi cấy là 22°C trong 2,5 ngày. Các thể chuyển gen sau đó

được thuần khiết và DNA hệ gen được tách chiết để phục vụ cho xác nhận bằng PCR với cặp mồi đặc hiệu gồm *NAT-gpdA-F*: AAAGA GCTCACTAGTGACGTCAGCGCTAGATCT TGGCATGCGGAGAGACGG và *NAT-gpdA-R*: AAATCTAGAAGGCTCTCGAGGGGCC CGGATCCTCAGGGGCAGGGCATGCT.

3. Kết quả và thảo luận

3.1. Hình thái của hai chủng *P. chrysogenum* dùng trong nghiên cứu

Khi nuôi trên môi trường CD ở 28°C trong 7 ngày, cả 2 chủng VTCC-F1170 và VTCC-F1172 đều hình thành hệ sợi chứa bào tử màu xanh lục với các rãnh khía xuất hiện ở mặt trước và mặt sau khuẩn lạc. Cả hai đều sinh sắc tố màu vàng nhạt trên môi trường thạch. Khi quan sát dưới kính hiển vi với độ phóng đại 400 lần, cuống sinh bào tử với thể bình chứa nhiều bào tử đỉnh dạng cầu tạo thành hình chổi. Hệ sợi nấm với các vách ngăn phân thành các đốt dọc theo chiều dài của sợi (Hình 1). Các đặc điểm quan sát được hoàn toàn phù hợp với các đặc điểm điển hình của loài *P. chrysogenum* đã được công bố [11].



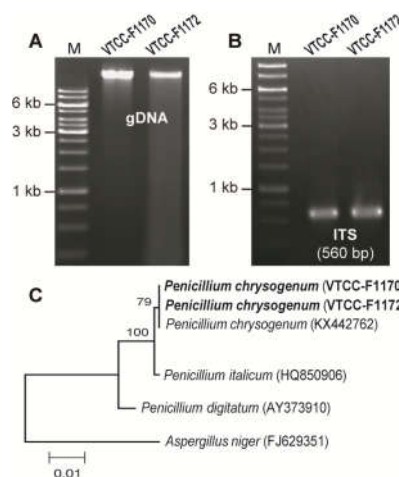
Hình 1. Hình thái của hai chủng VTCC-F1170 và VTCC-F1172 trong nghiên cứu.

3.2. Xác nhận lại hai chủng *P. chrysogenum* dựa trên trình tự vùng ITS của rDNA

Để đảm bảo độ tin cậy của chủng VTCC-F1170 và VTCC-F1172 dùng cho các nghiên cứu cải biến di truyền nấm sợi *P. chrysogenum*

trong tương lai, chúng tôi tiến hành xác nhận lại hai chủng dựa trên trình tự vùng ITS của rDNA. So với các gen 18S rRNA và 28S rRNA của rDNA, vùng ITS (gồm ITS1; 5,8S rRNA; ITS2) ở nấm có mức độ biến đổi cao hơn giữa các loài gần gũi. Do đó vùng trình tự này được sử dụng phổ biến trong nghiên cứu phân loại nấm [12].

DNA hệ gen của hai chủng nấm dùng trong nghiên cứu được tách chiết và kiểm tra trên gel agarose 0,7%. Kết quả cho thấy chất lượng DNA đủ tốt cho các nghiên cứu tiếp theo (Hình 2A). PCR khuếch đại vùng ITS với cặp mồi ITS1/ITS4 chỉ cho một băng duy nhất kích thước khoảng 560 bp (Hình 2B). Kết quả so sánh trình tự ITS với dữ liệu trong GenBank và phân tích phát sinh chủng loại sử dụng phần mềm MEGA6 cho thấy hai chủng VTCC-F1170 và VTCC-F1172 chính xác thuộc loài *P. chrysogenum* với độ tương đồng về trình tự ITS là 100% (Hình 2C).

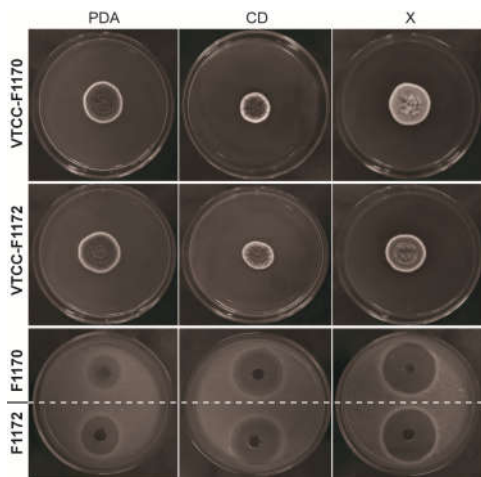


Hình 2. Xác nhận hai chủng *P. chrysogenum*. (A) DNA hệ gen (gDNA) (B) Sản phẩm PCR vùng ITS trên gel agarose 0,7%, (C) Cây phát sinh chủng loại dựa trên trình tự vùng ITS của rDNA.

3.3. Khả năng sinh trưởng và sinh kháng sinh penicillin của hai chủng *P. chrysogenum*

Cả hai chủng nghiên cứu đều có khả năng sinh trưởng và tiết sắc tố màu vàng nhạt trên các môi trường PDA, CD và X. Tuy nhiên, trên môi trường PDA và CD, bề mặt hệ sợi nấm

hình thành các giọt tiết đặc trưng của loài *P. chrysogenum* (Hình 3).



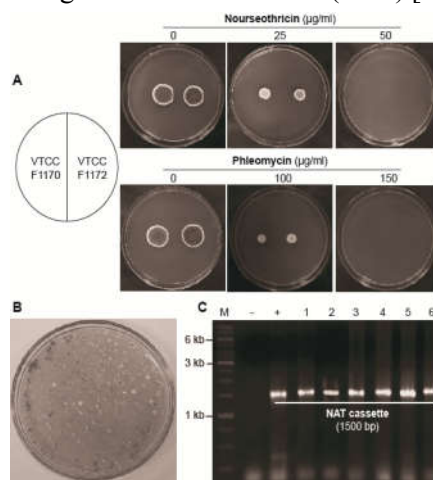
Hình 3. Sinh trưởng và sinh penicillin của hai chủng *P. chrysogenum*.

Hai chủng *P. chrysogenum* VTCC-F1170 và VTCC-F1172 đều có khả năng sinh kháng sinh penicillin tốt để chống lại vi khuẩn kiểm định *S. aureus* (Hình 3). Kết quả này cũng cho thấy sự tương đồng của hai chủng nghiên cứu so với các chủng *P. chrysogenum* trên thế giới đã được công bố [13]. Kết quả thu được cũng cho thấy môi trường X là môi trường tốt nhất để cảm ứng sinh kháng sinh ở cả hai chủng *P. chrysogenum*.

3.4. Mức độ mẫn cảm kháng sinh và bước đầu chuyển gen vào nấm sợi *P. chrysogenum*

Cả hai chủng *P. chrysogenum* đều bị ức chế hoàn toàn bởi kháng sinh nourseothricin ở nồng độ 50 µg/ml và nồng độ này thấp hơn rất nhiều so với nồng độ 500 µg/ml ở công bố trước đây cho loài *P. chrysogenum* [10]. Đối với kháng sinh phleomycin, sinh trưởng của hai chủng bị ức chế hoàn toàn ở nồng độ 150 µg/ml (Hình 4A). Hiện nay, chưa có bất kỳ công bố chính thức nào về mức độ mẫn cảm của *P. chrysogenum* đối với kháng sinh phleomycin. Tuy nhiên kháng sinh này có giá rất cao trên thị trường, do đó sử dụng phleomycin cho nghiên cứu chuyển gen ở *P. chrysogenum* cần được cân nhắc.

Với các kết quả thu được, chúng tôi bước đầu lựa chọn kháng sinh nourseothricin dùng cho nghiên cứu chuyển gen vào chủng *P. chrysogenum* VTCC-F1170. Vi khuẩn *A. tumefaciens* AGL1 mang vector nhũ thể pPK2-nat được sử dụng cho chuyển gen vào nấm *P. chrysogenum*. Sau 5 ngày ủ màng cellulose trên môi trường CD có bổ sung kháng sinh nourseothricin (50 µg/ml) để chọn lọc các khuẩn lạc nấm chuyển gen và bổ sung kháng sinh cefotaxime (300µg/ml) để diệt vi khuẩn *A. tumefaciens*, chúng tôi đã thu được rất nhiều khuẩn lạc mọc trên môi trường chọn lọc (Hình 4B). Sáu khuẩn lạc ngẫu nhiên được chọn để thuần khiết và tách chiết DNA. Kết quả PCR với cặp mồi *NAT-gpdA-F/NAT-gpdA-R* cho thấy cả 6 chủng nấm chuyển gen đều nhận được marker kháng nourseothricin (Hình 4C). Như vậy, chúng tôi đã thành công trong việc chuyển gen vào nấm *P. chrysogenum* sử dụng vi khuẩn *A. tumefaciens* và marker kháng kháng sinh nourseothricin. Nồng độ nourseothricin sử dụng trong nghiên cứu này là 50 µg/ml thấp hơn 10 lần so với công bố của De-Boer và cs (2013) [10].



Hình 4. Mức độ mẫn cảm kháng sinh và kết quả chuyển gen. (A) Mẫn cảm với nourseothricin và phleomycin, (B) Đĩa chuyển gen thành công, (C) Sản phẩm PCR cho marker kháng nourseothricin (NAT cassette), M: 1 kb DNA marker, 6 thể chuyển gen (1-6), (-) đối chứng âm, (+) đối chứng dương.

4. Kết luận

Hai chủng VTCC-F1170 và VTCC-F1172 có nguồn gốc Việt Nam được xác nhận chính xác là thuộc loài *P. chrysogenum* dựa trên phân tích hình thái, giải trình tự vùng ITS của rDNA và khả năng sinh kháng sinh penicillin. Môi trường X được xác định là môi trường thích hợp nhất dùng cho khảo sát sinh kháng sinh của nấm *P. chrysogenum*. Đã đánh giá được mức độ miễn cảm kháng sinh nourseothricin và phleomycin của cả hai chủng nghiên cứu và bước đầu chuyển thành công gen kháng nourseothricin vào chủng *P. chrysogenum* VTCC-F1170 nhờ sử dụng vi khuẩn *A. tumefaciens*.

Lời cảm ơn

Các tác giả xin cảm ơn PGS.TS. Bùi Thị Việt Hà (Trường ĐH Khoa học Tự nhiên, ĐHQGHN) đã cung cấp chủng vi khuẩn *S. aureus* ATCC25923, Viện Vi sinh vật học và Công nghệ sinh học (ĐHQGHN) đã cung cấp hai chủng *P. chrysogenum* và Nguyễn Thu Giang (Trường ĐH Khoa học Tự nhiên, ĐHQGHN) đã hỗ trợ kỹ thuật cho một số thí nghiệm. Công trình được hỗ trợ kinh phí từ đề tài nghiên cứu cơ bản của Quỹ phát triển Khoa học và Công nghệ Quốc gia (NAFOSTED) mã số 106-NN.04-2014.75.

Tài liệu tham khảo

- [1] Fleming A., On the antibacterial action of cultures of a penicillium, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae*, *British Journal of Experimental Pathology* 103 (1929) 226.
- [2] Talaro K.P., Chess B., *Foundations in microbiology*, McGraw-Hill, USA, 2015.
- [3] Leiter É., Szappanos H., Oberparleiter C., Kaiserer L., Csernoch L., Pusztahelyi T., Emri T., Pócsi I., Salvenmoser W., Marx F., Antifungal protein PAF severely affects the integrity of the plasma membrane of *Aspergillus nidulans* and induces an apoptosis-like phenotype, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 496 2445.
- [4] Rodríguez-Martín A., Acosta R., Liddell S., Núñez F., Benito M.J., Asensio M.A., Characterization of the novel antifungal protein PgAFP and the encoding gene of *Penicillium chrysogenum*, *Peptides* 314 (2010) 541.
- [5] Rodríguez-Martín A., Acosta R., Liddell S., Núñez F., Benito M.J., Asensio M.A., Characterization of the novel antifungal chitosanase PgChP and the encoding gene from *Penicillium chrysogenum*, *Applied Microbiology and Biotechnology* 882 (2010) 519.
- [6] Michielse C.B., Hooykaas P.J., van den Hondel C.A., Ram A.F., *Agrobacterium*-mediated transformation as a tool for functional genomics in fungi, *Current Genetics* 481 (2005) 1.
- [7] Nguyễn Thị Khuyên, Võ Thị Hạnh, Phạm Thị Hiền, Mai Thị Đàm Linh, Trần Đức Long, Trần Thị Thùy Anh, Trịnh Tất Cường, Trần Văn Tuấn, Cải tiến phương pháp tách chiết ADN từ nấm sợi phục vụ chuẩn đoán phân tử phân biệt *Aspergillus oryzae* với *Aspergillus flavus*, *Tạp chí Khoa học ĐHQGHN: Khoa học Tự nhiên và Công nghệ*, 31, 4S (2015) 167.
- [8] White T.J., Bruns T.D., Lee S.B., Taylor J.W., Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics, *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications* 181 (1990) 315.
- [9] Jarvis F., Johnson M.J., The Role of the Constituents of Synthetic Media for Penicillin Production, *Journal of the American Chemical Society* 6912 (1947) 3010.
- [10] De-Boer P., Bronkhof J., Dukić K., Kerkman R., Touw H., van den Berg M., Offringa R., Efficient gene targeting in *Penicillium chrysogenum* using novel *Agrobacterium*-mediated transformation approaches, *Fungal Genetics and Biology* 61 (2013) 9.
- [11] Peberdy J.F., *Penicillium and acremonium*, Springer Science & Business Media, Germany, 2013.
- [12] Curran J., Driver F., Ballard J.W.O., Milner R.J., Phylogeny of *Metarhizium*: analysis of ribosomal DNA sequence data, *Mycological Research* 985 (1994) 547.
- [13] Ziemons S., Koutsantas K., Becker K., Dahlmann T., Kück U., Penicillin production in industrial strain *Penicillium chrysogenum* P2niaD18 is not dependent on the copy number of biosynthesis genes, *BMC Biotechnology* 171 (2017) 16.

Identification of Biological Characteristics and Preliminary Research on Genetic Transformation of the Filamentous Fungus *Penicillium chrysogenum* Originated from Vietnam

Vu Xuan Tao^{1,2}, Tran Van Tuan^{1,2}

¹National Key Laboratory of Enzyme and Protein Technology

²Faculty of Biology, VNU University of Science, 334 Nguyen Trai, Thanh Xuan, Hanoi, Vietnam

Abstract: *Penicillium chrysogenum* is a well-known filamentous fungus for production of penicillin and some valuable secondary metabolites. In this study, we indicated that two strains VTCC-F1170 and VTCC-F1172 identified as *P. chrysogenum*, which are preserved at Vietnam Type Culture Collection (VTCC) of Vietnam National University Hanoi, exhibited the ability of antibiotic production to inhibit the tested bacterium *Staphylococcus aureus* on the agar plates by diffusion assays. Additional analyses of the morphological characteristics and the rDNA ITS (internal transcribed spacer) sequence confirmed that the identification of both strains as *P. chrysogenum* was completely accurate. These important evidences guaranteed that the fungal strains are reliable for the researches on genetic engineering of *P. chrysogenum*. Experimental assays of antibiotic susceptibility showed that the growth of both strains VTCC-F1170 and VTCC-F1172 was completely inhibited by nourseothricin at 50 µg/ml and phleomycin at 150 µg/ml. Using the *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation method, we have successfully transferred the nourseothricin resistance marker into the genome of the VTCC-F1170 strain.

Keywords: *Penicillium chrysogenum*, antibiotic production, *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation, nourseothricin resistance marker.