

NGHIÊN CỨU QUY TRÌNH CHUYỂN GEN VÀO NẤM *Monascus purpureus*

Trần Thảo Nguyên¹, Phạm Thị Thùy Dung¹, Nguyễn Thị Thìn¹,
Nguyễn Thị Khuyến¹, Trần Thị Thùy Anh^{1,2}, Hoàng Hải Yến¹,
Nguyễn Thị Hồng Vân^{1,2}, Phạm Thị Lương Hằng^{1,2},
Tô Thanh Thúy^{1,2}, Trần Văn Tuấn^{1,2}, Trần Đức Long^{1,2}

TÓM TẮT

Monascus purpureus là loài nấm sợi tạo ra nhiều sản phẩm giá trị như chất màu thực phẩm và lovastatin, được chất có tác dụng làm giảm lượng cholesterol trong máu. Tuy nhiên, *M. purpureus* còn tổng hợp citrinin, độc tố tác động lên thận và gan, cần phải loại bỏ khỏi các sản phẩm. Nhằm cải biến di truyền nấm *M. purpureus*, plasmid được biến nạp vào tế bào trần và sau đó được loại bỏ khỏi tế bào nấm. Trong nghiên cứu này, quy trình tạo tế bào trần và chuyển gen vào nấm *M. purpureus* đã được tối ưu hóa và đạt hiệu quả biến nạp cao, gen trên plasmid được phiên mã và plasmid bị đào thải khỏi tế bào nấm sau bốn thế hệ cấy chuyển.

Từ khóa: Biến nạp, citrinin, chuyển gen, *Monascus*, tế bào trần

II. ĐẶT VẤN ĐỀ

Nấm *Monascus purpureus* Went 1895 thuộc họ Monacaceae, bộ Eurotiales, lớp Eurotiomycetes, ngành Ascomycota (Chen *et al.*, 2015). Từ hàng trăm năm trước, nấm *Monascus* đã được dùng trong các sản phẩm truyền thống như gạo mốc đỏ, đậu phụ đỏ, rượu đỏ... (Chen *et al.*, 2015; Feng *et al.*, 2016; Srianta *et al.*, 2014). Các sản phẩm từ *Monascus* thường giàu các chất trao đổi chất thứ cấp như lovastatin, gamma-aminobutyric acid (GABA), polysaccharide, sắc tố và enzyme như α -amylase, β -amylase, glucoamylase, protease, and lipase và có tác dụng sinh lý tốt như làm giảm cholesterol, triglyceride trong máu, giảm huyết áp, giảm glucose máu, chống oxi hóa, chống ung thư (Chen and Liu, 2006; Endo, 2012; Feng *et al.*, 2012; Hsieh and Tai, 2003; Lee *et al.*, 2006; Su *et al.*, 2003; Wang & Lin, 2007). Các sản phẩm từ *Monascus* đang được sản xuất ở quy mô công nghiệp (Srianta *et al.*, 2014). Tuy nhiên, *M. purpureus* sinh tổng hợp citrinin gây độc tế bào, ảnh hưởng đến gan và thận ở nhiều động vật (Blanc *et al.*, 1995a; Blanc *et al.*, 1995b; Flajs and Peraica, 2009; Liu *et al.*, 2005). Do đó, biến đổi di truyền để nấm *Monascus* không sinh tổng hợp citrinin sẽ giúp tạo ra các sản phẩm an toàn. Một số nhóm nghiên cứu đã phá hủy thành công gen liên quan đến sinh tổng hợp citrinin nhờ tái tổ hợp tương đồng (Li *et al.*, 2013; Shimizu *et al.*, 2005; Shimizu *et al.*, 2007). Nhưng nấm tạo nên mang DNA ngoại lai và là nấm chuyển gen, hạn chế khả năng ứng dụng thực tế. Trong khi đó, sinh vật biến đổi gen nhờ CRISPR-Cas9 không mang DNA ngoại lai. Hiện nay, plasmid mã hóa đồng thời gRNA và Cas9 đã được ứng dụng rộng rãi trên nấm sợi

(Nodvig *et al.*, 2015; Schuster *et al.*, 2016). Trong đó, plasmid của Nodvig và cộng tác viên mang gen *hph* tạo tính kháng kháng sinh hygromycin cho nấm biến nạp và trình tự AMA1 cho phép plasmid tồn tại độc lập ngoài hệ gen của nấm *Aspergillus* (Gems *et al.*, 1991; Nodvig *et al.*, 2015). Sau khi gây biến đổi trong hệ gen nhờ gRNA và Cas9, plasmid tồn tại độc lập có thể được loại bỏ khỏi tế bào, tạo ra nấm hoàn toàn không chứa DNA ngoại lai. Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã thiết kế lại trình tự gRNA của Nodvig và cộng tác viên để tạo nên plasmid pTL04, chuyển plasmid pTL04 vào nấm bằng phương pháp biến nạp tế bào trần và theo dõi tồn tại của plasmid trong nấm chuyển gen qua nhiều thế hệ.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Chủng nấm *M. purpureus* NBRC 32316 được nhập từ NITE Biological Resource Center - NBRC, Nhật Bản.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Nuôi cấy nấm

Nấm *M. purpureus* NBRC 32316 được nuôi cấy lắc trong môi trường lỏng PDBY (bột khoai tây 24 g/l, D-glucose 20 g/l, cao nấm men 2 g/l, pH 6,0) hoặc môi trường rắn PDAY (bột khoai tây 24 g/l, D-glucose 20 g/l, cao nấm men 2 g/l, agarose 2%, pH 6,0) ở 30°C.

2.2.2. Chuyển gen vào tế bào trần

Tế bào trần được tạo theo quy trình của Hoppenau và cộng tác viên (2014). Khoảng 5×10^7 bào tử nấm

¹ Khoa Sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội

² Phòng thí nghiệm trọng điểm Công nghệ enzym và protein, Trường ĐHKHTN, ĐHQGHN

được nuôi lắc qua đêm ở 30°C trong môi trường PDBY. Bào tử phát triển thành những sợi nấm nhỏ, sợi nấm được thu nhận, rửa trong 40 ml đệm citrat (natri citrat 50 mM, KCl 150 mM, NaCl 580 mM, pH 5,5) và sau đó được ủ lắc trong đệm citrat có bổ sung Glucanex (Sigma-Aldrich, hỗn hợp các enzyme β -glucanase, cellulase, protease, and chitinase) đến nồng độ 20 mg/ml trong bốn giờ để tạo tế bào trần. Tế bào trần được thu nhận và biến nạp plasmid theo phương pháp của Li và cộng tác viên (2013) với một số thay đổi nhỏ. Khoảng 10^6 tế bào trần được hòa trong 200 μ l đệm STC (sorbitol 1 M, Tris-HCl 50 mM, CaCl_2 50 mM, pH 8,0), cùng với 50 μ l đệm PTC (polyethylene glycol 4000 40%, Tris-HCl 50 mM, CaCl_2 50 mM, pH 8,0) và 8 μ g plasmid pTL04 (mang gen kháng kháng sinh hygromycin B). Dung dịch chứa tế bào trần được ủ trong nước đá 30 phút, bổ sung 900 μ l đệm PTC và tiếp tục ủ thêm 20 phút nữa. Sau đó, dung dịch này được chia vào năm ống nhỏ với thể tích 250, 500, 750, 1000 μ l và phần còn lại. Mỗi ống được bổ sung 5 ml môi trường top-agar (potato extract 4 g/l, D-glucose 20 g/l, sobitol 1 M, agar 8 g/l) chứa hygromycin B 50 μ g/ml đã làm nguội đến \sim 38°C, trộn đều và đổ tràn trên mặt đĩa thạch PDAS (bột khoai tây 24 g/l, D-glucose 20 g/l, sorbitol 1 M, agarose 2%) chứa hygromycin B 100 μ g/ml để chọn lọc tế bào nấm có plamid. Tế bào nấm chứa plasmid có khả năng kháng kháng sinh hygromycin B và sẽ mọc thành cụm nấm nhỏ sau ba ngày. Các tế bào này được sử dụng trực tiếp cho PCR với cặp mồi AMA1_46F và Ptef_35R để khẳng định sự có mặt của plasmid pTL04.

2.2.3. Tách DNA tổng số

DNA tổng số của nấm *M. purpureus* được tách theo phương pháp của Zhang và cộng tác viên (2010). Một lượng nhỏ sợi nấm được thu vào ống 1,5 ml đã có sẵn 100 μ l nước cất, trộn kỹ bằng vortex để rửa sợi nấm rồi ly tâm 13.000 vòng/phút trong một phút. Sau đó, nước trong ống được loại bỏ và 100 μ l đệm chiết GEZ (sodium phosphate 50mM pH 7,4; EDTA 1 mM và glycerol 5%) được bổ sung vào ống. Mẫu nấm được ủ trong đệm chiết ở 85°C trong 30 phút và có thể dùng cho PCR hoặc cất giữ ở -20°C.

2.2.4. Tách và tinh sạch RNA tổng số

Một trăm miligam nấm được cho vào ống eppendorf 1,5 ml và nghiền nhỏ trong một mililit TRIsure (Bioline). Dịch nghiền được ly tâm 12000 g, 10 phút, 4°C sau đó dịch nổi được chuyển sang ống eppendorf mới và ủ ở nhiệt độ phòng 5 phút. Sau đó, 200 μ l chloroform được bổ sung vào ống và trộn đều,

nhẹ nhàng trong 15 giây. Hỗn hợp tiếp tục được ủ 3 phút ở nhiệt độ phòng sau đó ly tâm ở 12000 g, 15 phút, 4°C. Dung dịch trong ống được phân tách ra thành các pha phân biệt: pha xanh, pha nước và pha trung gian. Pha nước được thu cẩn thận sang ống mới, không lẫn với các pha khác. RNA được kết tủa với 500 μ l 2-propanol lạnh, ủ trong 10 phút ở nhiệt độ phòng, sau đó ly tâm ở 12000 g, 10 phút, 4°C. Kết tủa RNA ở đáy ống được giữ lại sau khi loại bỏ dịch nổi, được rửa bằng 1000 μ l ethanol 75%, ly tâm, loại bỏ ethanol, phơi khô trong tủ an toàn sinh học. RNA tổng số được hòa tan trong 30 μ l nước không chứa RNase, được điện di kiểm tra trên gel agarose 1% và bảo quản ở -80°C.

Để loại bỏ DNA nhiễm, RNA tổng số được xử lý với enzyme DNase I (Thermo Scientific) ở 37°C trong 30 phút. Sau đó EDTA 50 mM được bổ sung vào dung dịch và ủ ở 65°C trong 10 phút để bất hoạt DNase I. Các mẫu RNA tổng số sau khi xử lý với DNase I sẽ được tinh sạch bằng kit Qiagen RNeasy Mini (QIAGEN). RNA tổng số được bổ sung thêm nước không chứa RNase đến 100 μ l và thêm 350 μ l đệm RLT, trộn đều bằng pipet. Tiếp tục thêm 250 μ l ethanol 100% vào ống và trộn đều hỗn hợp bằng pipet. Bảy trăm microlit hỗn hợp được chuyển vào cột RNeasy lỏng trong ống thu dịch, ly tâm 8000 g, 15 giây và loại bỏ dung dịch chảy qua cột. Cột RNeasy được rửa hai lần bằng 500 μ l đệm RPE, ly tâm loại bỏ dịch rửa. Sau đó, cột RNeasy được chuyển vào ống thu mới, ly tâm trong 2 phút để loại bỏ hoàn toàn dịch thừa. Cột RNeasy được chuyển sang ống eppendorf 1,5 ml mới, 30 μ l nước không chứa RNase được nhỏ vào giữa cột, ly tâm 10000 g, 2 phút, 25°C để thu RNA. RNA tổng số đã tinh sạch được điện di kiểm tra trên gel agarose 1% và được bảo quản ở -80°C.

2.2.5. Tổng hợp cDNA bằng phản ứng phiên mã ngược

DNA bổ sung với RNA (cDNA) được tổng hợp từ RNA đã tinh sạch nhờ enzyme phiên mã ngược M-MLV (Enzynomics). Đầu tiên, 5,3 μ l RNA tổng số (1 μ g) được trộn với 0,3 μ l mồi hexamer, 0,4 μ l dNTP 10 mM và 6,5 μ l nước rồi ủ ở 65°C trong 5 phút, sau đó ủ trong nước đá 5 phút. Tiếp đó, 2 μ l đệm enzyme phiên mã ngược M-MLV 10x và 0,5 μ l chất ức chế RNase được bổ sung vào hỗn hợp. Ở ống +RT (có xảy ra phản ứng phiên mã ngược), 4 μ l nước và 1 μ l enzyme phiên mã ngược M-MLV được bổ sung vào phản ứng. Còn ở ống -RT (không xảy ra phản ứng phiên mã ngược), 5 μ l nước được bổ sung vào phản ứng. Phản ứng phiên mã ngược được thực hiện theo quy trình nhiệt 25°C trong 10 phút, 37°C trong 60 phút và 95°C trong 5 phút.

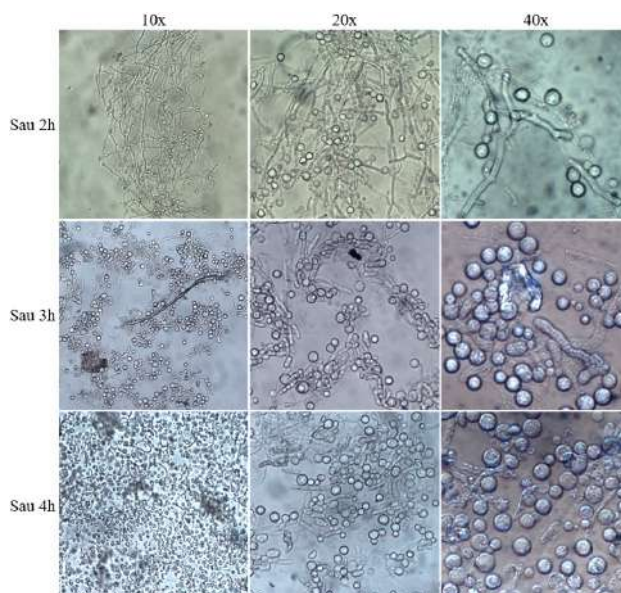
2.2.6. Nhân bản DNA/cDNA bằng PCR

DNA đích được nhân bản bằng PCR với GoTaq® Green Master Mix (Promega) với chu trình nhiệt: 95°C trong năm phút; 30 chu kỳ (95°C trong 10 giây, 55°C trong 10 giây, 72°C trong 50 giây) và 72°C trong bảy phút. Để kiểm tra sự có mặt của plasmid pTL04 trong tế bào nấm đã biến nạp, cụm nấm non được dùng cho PCR nhân bản một đoạn trình tự trên plasmid với cặp mỗi AMA1_46F CGTATGGCAGAGCTCCAGTC và Ptef_35R TTCGAGAGCATGATCAGCAC (sản phẩm PCR 1099 bp). Để kiểm tra biểu hiện gen, cặp mỗi Spy.cas9 + 964F TCAAGCGGTATGATGAGCAC và Spy.cas9 + 1407R CACGGAGTGATGGTTTCCTC được dùng để nhân bản cDNA của gen *cas9* trên plasmid pTL04 (sản phẩm PCR 463 bp) và cặp mỗi Mpu.pksCT+161F ACAACTTTGCCGCCAGTGAC và Mpu.pksCT+873R GCAAGTCTGGATCAAGTCCAC (sản phẩm PCR 734 bp) được dùng để nhân bản cDNA của gen *pksCT* trong hệ gen nấm *M. purpureus*. Để kiểm tra thời gian tồn tại của plasmid trong tế bào nấm, cặp mỗi Spy.cas9-72F ACTTCTCTGCTCAGCACCTC và Spy.cas9 + 437R GTCGCAAATCAGCCTTGTC được dùng để nhân bản gen *cas9* trên plasmid pTL04 (sản phẩm PCR 549 bp) và cặp mỗi Mpu.pksCT + 161F ACAACTTTGCCGCCAGTGAC và Mpu.pksCT + 516R TCCAACCAACATCGCCAGTC nhân bản gen *pksCT* trong hệ gen của nấm (sản phẩm PCR 356 bp). Sản phẩm PCR được điện di kiểm tra trên gel agarose 1%.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

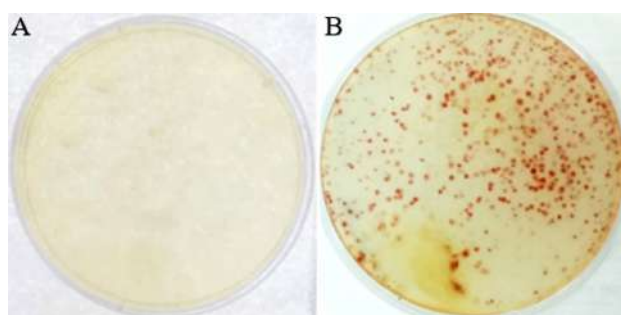
3.1. Chuyển gen vào *M. purpureus* qua tế bào trần

Ban đầu, chúng tôi áp dụng quy trình của Hoppenau và cộng tác viên (2014) đã tối ưu cho nấm *Aspergillus* trong phòng Genomic, Phòng thí nghiệm trọng điểm Công nghệ enzyme và protein để biến nạp vector pTL04 mang gen kháng kháng sinh hygromycin B và gen mã hóa enzyme Cas9 vào nấm *M. purpureus*. Bào tử nấm được nuôi lắc qua đêm ở 30°C, sợi nấm được thu nhận và xử lý trong Glucanex để phá thành tế bào. Quá trình hình thành tế bào trần được theo dõi liên tục dưới kính hiển vi với vật kính 10x, 20x và 40x (Hình 1). Sau hai giờ, chỉ ít tế bào trần (tế bào tròn trong Hình 1) quan sát thấy ở gần sợi nấm. Số lượng tế bào trần tăng nhiều sau ba giờ và bốn giờ. Sau năm giờ xử lý số lượng tế bào trần không tăng thêm nhiều và tế bào bắt đầu bị biến dạng do đó chúng tôi thu tế bào trần sau bốn giờ.



Hình 1. Số lượng tế bào trần tăng theo thời gian

Tế bào trần được biến nạp plasmid theo phương pháp của Hoppenau và cộng tác viên (2014) nhưng kết quả không tốt. Chúng tôi thử nghiệm theo phương pháp của Li và cộng tác viên (2013) để biến nạp plasmid vào tế bào *M. purpureus* trần và thu được kết quả tốt. Có rất nhiều cụm nấm mọc trên đĩa PDAS bổ sung hygromycin B 100 µg/ml sau bốn ngày (Hình 2B). Không có cụm nấm nào mọc ở mẫu biến nạp không có plasmid (Hình 2A). Nhóm nghiên cứu của Li và cộng tác viên nuôi bào tử nấm ở 30°C trong 35 giờ để thu sợi nấm. Chúng tôi thử nghiệm và thấy rằng số lượng tế bào trần thu được từ sợi nấm nuôi 35 giờ ít hơn và được tạo thành chậm hơn so với sợi nấm nuôi qua đêm (16 h), do đó chúng tôi phối hợp phương pháp của Hoppenau và cộng tác viên (2014) và của Li và cộng tác viên (2013) để tạo tế bào trần và chuyển gen vào tế bào trần.

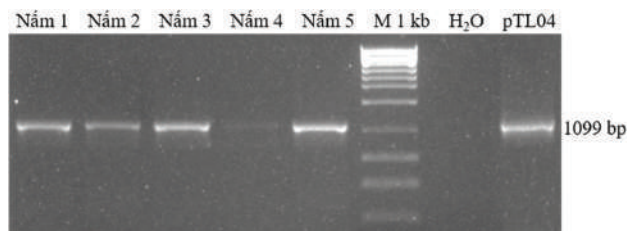


Hình 2. Kết quả biến nạp plasmid vào tế bào trần

Ghi chú: A. không plasmid, B. tế bào biến nạp plasmid cấy trên đĩa PDAS bổ sung hygromycin B 100 µg/ml.

Để đảm bảo chắc chắn tế bào nấm đã nhận được plasmid pTL04, 05 cụm nấm được lựa chọn ngẫu nhiên cho PCR với cặp mỗi AMA1_46F/Ptef_35R

để nhân bản một đoạn DNA trên plasmid pTL04. Kết quả PCR cho thấy có bốn trong năm cụm nấm cho sản phẩm PCR đậm nét, mẫu còn lại có băng DNA mờ, trong khi mẫu đối chứng âm (H₂O) không có băng và đối chứng dương (plasmid pTL04) có băng cùng kích thước (Hình 3). Như vậy, plasmid đã được biến nạp thành công vào nấm *M. purpureus*.

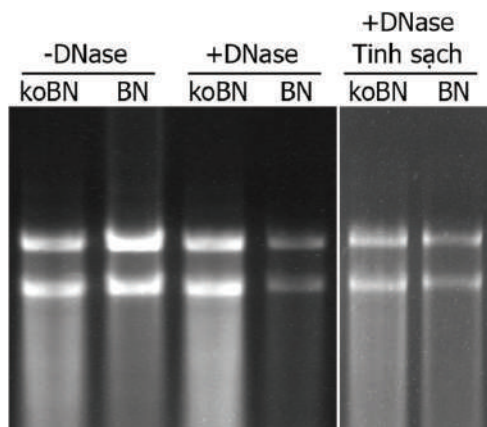


Hình 3. Plasmid đã được biến nạp vào tế bào nấm *M. purpureus*

Chúng tôi ước tính hiệu quả biến nạp ~ 400 tế bào biến nạp/1 µg plamid, cao hơn so với kết quả của Shimizu và cộng tác viên (2006) là 17 tế bào biến nạp/1 µg plamid đối với chủng *M. purpureus* IFO30873 và nằm trong khoảng hiệu quả của Campoy và cộng tác viên (2003) với 870 tế bào biến nạp/1 µg plamid đối với chủng *M. purpureus* NRRL 1596 và 43 tế bào biến nạp/1 µg plamid đối với chủng *M. purpureus* IBCCI.

3.2. Phiên mã của gen trên plasmid biến nạp

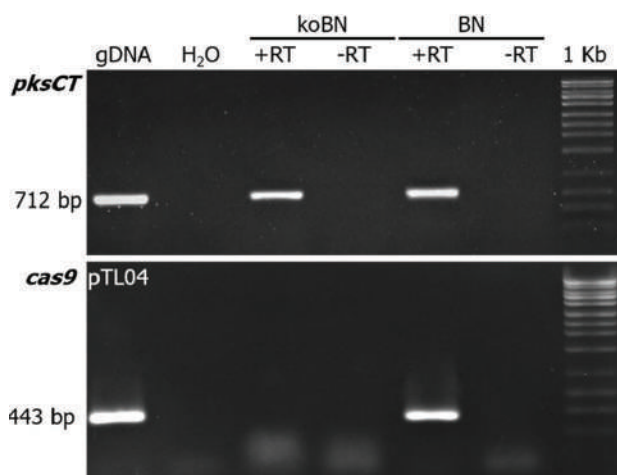
RNA được tách chiết từ nấm *M. purpureus* biến nạp (BN) và không biến nạp (koBN) và xử lý với DNase I rồi tinh sạch (Hình 4). DNase I đã loại bỏ được vệt DNA nhiễm ở mẫu biến nạp. RNA tổng số sau tinh sạch có hai băng sáng tương ứng với rRNA 28S và rRNA 18S, chứng tỏ RNA ít bị phân hủy và có thể dùng để tổng hợp cDNA.



Hình 4. RNA tổng số từ tế bào nấm *M. purpureus* biến nạp

Ghi chú: RNA được tách từ nấm không biến nạp (koBN), nấm biến nạp plasmid pTL04 (BN) trước khi xử lý DNase I (-DNase) hoặc sau khi xử lý DNase I (+DNase).

Để kiểm tra chất lượng cDNA, gen *pksCT* (nằm trên nhiễm sắc thể của nấm *M. purpureus*) được nhân bản từ cDNA. Kết quả PCR (Hình 5) cho thấy mẫu không bổ sung khuôn (H₂O) và các mẫu -RT (không bổ sung enzyme phiên mã ngược trong phản ứng tổng hợp cDNA) không có sản phẩm nhân bản, chứng tỏ mẫu RNA tinh sạch và không bị nhiễm DNA hệ gen. Hai mẫu +RT của nấm biến nạp và không biến nạp đều có băng DNA với kích thước mong đợi, giống với băng từ mẫu đối chứng dương (gDNA, DNA tổng số từ nấm không biến nạp), chứng tỏ gen *pksCT* được biểu hiện ở cả nấm biến nạp và không biến nạp. Phản ứng nhân bản gen *cas9* (trên plasmid pTL04) cũng không bị nhiễm DNA hệ gen và cho sản phẩm đặc hiệu ở mẫu nấm biến nạp, giống với đối chứng dương (plasmid pTL04), chứng tỏ gen *cas9* trên plasmid pTL04 được phiên mã trong tế bào nấm biến nạp (Hình 5). Như vậy, gen trên plasmid biến nạp được biểu hiện trong tế bào nấm *M. purpureus*.



Hình 5. RNA tổng số từ tế bào nấm *M. purpureus* biến nạp

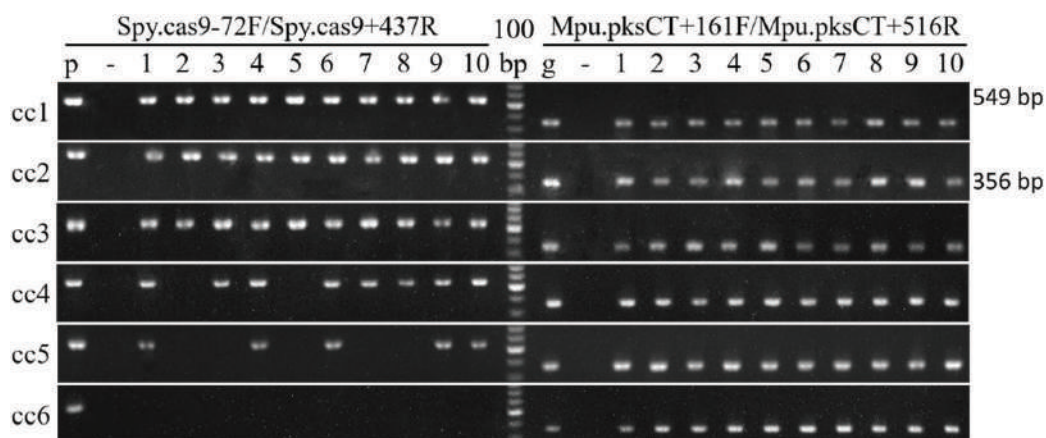
Ghi chú: RNA từ nấm không biến nạp (koBN), nấm biến nạp plasmid pTL04 (BN) được dùng để tổng hợp cDNA trong phản ứng có enzyme phiên mã ngược (+RT) và phản ứng không có enzyme phiên mã ngược (-RT); cDNA được dùng để nhân bản *pksCT* (đối chứng dương là DNA tổng số, gDNA) và *cas9* (đối chứng dương plasmid là plasmid pTL04).

3.3. Plasmid bị loại bỏ khỏi tế bào nấm sau bốn thế hệ

Nhằm tăng khả năng ứng dụng của nấm cải biến di truyền, plasmid cần phải bị loại bỏ khỏi tế bào nấm biến nạp để tránh hình thành nấm chuyển gen. Plasmid pTL04 mang trình tự AMA1 cho phép plasmid tồn tại độc lập ngoài hệ gen và mất đi sau một vài thế hệ ở nấm *Aspergillus* (Gems et al., 1991;

Nodvig *et al.*, 2015). Nấm *M. purpureus* biến nạp được cấy chuyển (cc) một vài thế hệ trên môi trường không có hygromycin B. DNA tổng số được tách từ sợi nấm sau mỗi lần cấy chuyển và PCR kiểm tra sự có mặt gen *cas9* nằm trên plasmid pTL04. Kết quả PCR (Hình 6) cho thấy gen *pksCT* nằm trên nhiễm sắc thể của nấm được nhân bản từ tất cả các mẫu

nấm, chứng tỏ DNA có chất lượng đảm bảo cho PCR. Kết quả nhân bản gen *cas9* cho thấy plasmid pTL04 bị mất khỏi cụm nấm số 2 và 5 sau bốn thế hệ cấy chuyển, mất khỏi cụm nấm số 3, 7 và 8 sau thế hệ và mất khỏi cụm nấm số 1, 4, 6, 9 và 10 sau sáu thế hệ. Như vậy, plasmid pTL04 bị loại bỏ khỏi tế bào nấm *M. purpureus* biến nạp.



Hình 6. Plasmid bị loại khỏi tế bào nấm *M. purpureus* biến nạp sau bốn thế hệ cấy chuyển

Ghi chú: Plasmid pTL04 (p), nước (-), DNA tổng số của nấm không biến nạp (g) và DNA tổng số của các cụm nấm biến nạp 1 - 10 sau 6 lần cấy chuyển (cc1-6) được dùng làm khuôn cho PCR với hai cặp mồi *Spy.cas9-72F/Spy.cas9+437R* và *Mpu.pksCT+161F/Mpu.pksCT+516R*.

IV. KẾT LUẬN

Quy trình chuyển gen vào nấm *M. purpureus* đã được thiết lập với hiệu quả cao, gen trên plasmid được phiên mã trong tế bào nấm và plasmid bị đào thải khỏi tế bào biến nạp sau bốn thế hệ. Đây là cơ sở quan trọng cho chuyển gen nhằm cải biến di truyền nấm *M. purpureus*.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được tài trợ bởi Đại học Quốc gia Hà Nội trong đề tài mã số KLEPT.16.02.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Blanc, P. J., Laussac, J. P., Le Bars, J., Le Bars, P., Loret, M. O., Pareilleux, A., Prome, D., Prome, J. C., Santerre, A. L. and Goma, G., 1995a. Characterization of monascidin A from *Monascus* as citrinin. *Int. J. Food Microbiol.*, 27 (2-3): 201-213.

Blanc, P. J., Loret, M. O. and Goma, G., 1995b. Production of citrinin by various species of *Monascus*. *Biotechnol. Lett.*, 17 (3):291-294.

Campoy, S., Pérez, F., Martín, J. F., Gutiérrez, S. and Liras, P., 2003. Stable transformants of the azaphilone pigment-producing *Monascus purpureus* obtained by protoplast transformation and *Agrobacterium*-

mediated DNA transfer. *Curr. Genet.*, 43 (6): 447-452.

Chen, C. C. and Liu, I. M., 2006. Release of acetylcholine by Hon-Chi to raise insulin secretion in Wistar rats. *Neurosci. Lett.*, 404 (1-2): 117-121.

Chen, W., He, Y., Zhou, Y., Shao, Y., Feng, Y., Li, M. and Chen, F., 2015. Edible Filamentous Fungi from the Species *Monascus*: Early Traditional Fermentations, Modern Molecular Biology, and Future Genomics. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.*, 14 (5): 555-567.

ENDO, A., 2012. Monacolin K, a new hypocholesterolemic agent produced by a *Monascus* species. *J. Antibiot. (Tokyo)*, 32 (8): 852-854.

Feng, Y., Shao, Y. and Chen, F., 2012. *Monascus* pigments. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 96 (6): 1421-1440.

Feng, Y., Shao, Y., Zhou, Y., Chen, W. and Chen, F., 2016. *Monascus* Pigments. In *Industrial Biotechnology of Vitamins, Biopigments, and Antioxidants*, Eds. E.J. Vandamme & J.L. Revuelta. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. pp.497-535.

Flajs, D. and Peraica, M., 2009. Toxicological properties of citrinin. *Arh. Hig. Rada Toksikol.*, 60 (4): 457-464.

Gems, D., Johnstone, I. L. and Clutterbuck, A. J., 1991. An autonomously replicating plasmid transforms *Aspergillus nidulans* at high frequency. *Gene.*, 98 (1): 61-67.

- Hoppenau, C. E., Tran, V. T., Kusch, H., Afhauer, K. P., Landesfeind, M., Meinicke, P., Popova, B., Braus-Stromeyer, S. A. and Braus, G. H., 2014. Verticillium dahliae VdTHI4, involved in thiazole biosynthesis, stress response and DNA repair functions, is required for vascular disease induction in tomato. *Environ. Exp. Bot.*, 108: 14-22.
- Hsieh, P. S. and Tai, Y. H., 2003. Aqueous extract of *Monascus purpureus* M9011 prevents and reverses fructose-induced hypertension in rats. *J. Agric. Food Chem.*, 51 (14): 3945-3950.
- Lee, C. L., Tsai, T. Y., Wang, J. J. and Pan, T. M., 2006. In vivo hypolipidemic effects and safety of low dosage *Monascus* powder in a hamster model of hyperlipidemia. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 70 (5): 533-540.
- Li, Y. P., Pan, Y. F., Zou, L. H., Xu, Y., Huang, Z. B. and He, Q. H., 2013. Lower citrinin production by gene disruption of *ctnB* involved in citrinin biosynthesis in *Monascus aurantiacus* Li AS3.4384. *J. Agric. Food Chem.*, 61 (30): 7397-7402.
- Liu, B. H., Wu, T. S., Su, M. C., Ping Chung, C. and Yu, F. Y., 2005. Evaluation of citrinin occurrence and cytotoxicity in *Monascus* fermentation products. *J. Agric. Food Chem.*, 53 (1): 170-175.
- Nodvig, C. S., Nielsen, J. B., Kogle, M. E. and Mortensen, U. H., 2015. A CRISPR-Cas9 system for genetic engineering of filamentous fungi. *PLoS One.*, 10 (7): e0133085.
- Schuster, M., Schweizer, G., Reissmann, S. and Kahmann, R., 2016. Genome editing in *Ustilago maydis* using the CRISPR-Cas system. *Fungal Genet. Biol.*, 89: 3-9.
- Shimizu, T., Kinoshita, H., Ishihara, S., Sakai, K., Nagai, S. and Nihira, T., 2005. Polyketide synthase gene responsible for citrinin biosynthesis in *Monascus purpureus*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 71 (7): 3453-3457.
- Shimizu, T., Kinoshita, H. and Nihira, T., 2006. Development of transformation system in *Monascus purpureus* using an autonomous replication vector with aureobasidin A resistance gene. *Biotechnol. Lett.*, 28 (2): 115-120.
- Shimizu, T., Kinoshita, H. and Nihira, T., 2007. Identification and in vivo functional analysis by gene disruption of *ctnA*, an activator gene involved in citrinin biosynthesis in *Monascus purpureus*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 73 (16): 5097-5103.
- Srianta, I., Ristiarini, S., Nugerahani, I., Sen, S. K., Zhang, B. B., Xu, G. R. and Blanc, P. J., 2014. Recent research and development of *Monascus* fermentation products. *Int. Food Res. J.*, 21 (1): 1-12.
- Su, Y. C., Wang, J. J., Lin, T. T. and Pan, T. M., 2003. Production of the secondary metabolites γ -aminobutyric acid and monacolin K by *Monascus*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 30 (1): 41-46.
- Wang, T. H. and Lin, T. F., 2007. *Monascus* Rice Products. *Adv. Food Nutr. Res.*, 53: 123-159.
- Zhang, Y. J., Zhang, S., Liu, X. Z., Wen, H. A. and Wang, M., 2010. A simple method of genomic DNA extraction suitable for analysis of bulk fungal strains. *Lett. Appl. Microbiol.*, 51 (1): 114-118.

Establishing a procedure for *Monascus purpureus* transformation

Tran Thao Nguyen, Pham Thi Thuy Dung, Nguyen Thi Thin, Nguyen Thi Khuyen, Tran Thi Thuy Anh, Hoang Hai Yen, Nguyen Thi Hong Van, Pham Thi Luong Hang, To Thanh Thuy, Tran Van Tuan, Tran Duc Long

Abstract

Monascus purpureus is a filamentous fungus producing several valuable metabolites including food colorants and lovastatin, an important medicine to lower blood cholesterol. However, *M. purpureus* also synthesizes citrinin, a mycotoxin affecting kidney and liver functions. In order to disrupt genes involving in citrinin biosynthesis without leaving exogenous genetic material in *M. purpureus*, a plasmid was transformed into and later removed from *M. purpureus* cells. In this study, a procedure for *M. purpureus* protoplast preparation and plasmid transformation was optimized. Gene on the transformed plasmid was expressed and the plasmid was lost after four generations.

Keywords: Citrinin, *Monascus*, protoplast, transformation, transgenesis

Ngày nhận bài: 04/6/2020
Ngày phản biện: 12/6/2020

Người phản biện: PGS. TS. Trần Đăng Khánh
Ngày duyệt đăng: 19/6/2020