

紅麴菌 *Monascus purpureus* NTU 568 電轉型基因操作平台開發

潘意凌¹、林志輝^{*2}

摘要

絲狀真菌因其能合成多種對人類有益的蛋白質和次級代謝物，而成為高商業價值的工業生產者。紅麴菌是亞洲發酵食品的重要菌種，其產品廣泛用於膳食補充品和食品著色劑。隨著全基因體序列的揭露，紅麴菌的次級代謝物生合成基因研究逐漸深入，為功能性基因研究奠定了基礎。然而過去紅麴菌基因的主流操作工具—農桿菌轉型法，由於其隨機嵌入的特性，並不適合進行需要精確操作的功能基因體研究。因此在深入探討紅麴菌基因機制之前，開發一個精確有效的基因操作平台是必要的。本研究構建了同源重組剔除質體 pHRL，針對紅麴菌 NTU 568 中的 *pksCT* 基因進行同源重組剔除，成功降低了 89% 的 citrinin 產量。研究結果顯示，去除細胞壁、使用線型質體以及電轉後的再生培養時間是 NTU568 電轉型效率的關鍵因素，未來可進一步探討替換啟動子或更有效的篩選標記基因，以提高穩定轉型株的篩選效率。

關鍵詞：紅麴菌、次級代謝物、同源重組、電轉型效率

潘意凌，國立臺東大學生命科學系學生

林志輝 (通訊作者)，國立臺東大學生命科學系副教授，E-mail：chlin@nttu.edu.tw

Development of *Monascus purpureus* NTU 568 Gene Manipulation Platform Using Electroporation Method

Yi-Ling Pan¹, Chih-Hui Lin^{*2}

Abstract

Filamentous fungi have become important industrial producers with high commercial value due to their ability to synthesize various beneficial proteins and secondary metabolites. Among them, *Monascus* is a key strain in Asian fermented foods, with its products widely used as dietary supplements and food coloring agents. As the whole genome sequence has been deciphered, research into the biosynthesis genes of secondary metabolites in *Monascus* has gradually deepened, laying the foundation for precise genetic studies. However, the current gene manipulation tool for *Monascus* - *Agrobacterium* transformation method has limitations due to its random insertion characteristics, making it unsuitable for functional genomic research that requires precision. Therefore, developing an effective gene manipulation platform is essential before delving into the genetic mechanisms of *Monascus*. This study constructed a homologous recombination deletion plasmid, pHRL, targeting the *pksCT* gene in *Monascus* NTU 568, successfully reducing citrinin yield by 89%. The results indicate that cell wall removal, the use of linear plasmids, and regeneration culture time post-electroporation are key factors influencing the electroporation efficiency of NTU 568. Future research may explore alternative promoters or more effective selection markers to enhance the screening efficiency of stable transformants.

Keywords: *Monascus*, Secondary metabolites, Gene manipulation, Electroporation efficiency

Yi-Ling Pan, Student, Department of Life Science, National Taitung University.
Chih-Hui Lin (Corresponding Author), Associate professor, Department of Life Science, National Taitung University. E-mail: chlin@nttu.edu.tw

壹、前言

紅麴菌(*Monascus purpureus*)是一種廣泛存在於穀類、澱粉、新鮮牧草、泥土、魚乾及松樹根組織中的絲狀真菌。這一菌種於 1884 年由法國學者 van Tieghem 首次分離，並建立了紅麴菌屬(陳等, 2003)。紅麴菌的特徵包括無色、褐色或紅色的菌絲，且具有橫隔菌絲(septate hypha)，其末端可產生有性的厚壁子囊。作為雌雄同體(homothallic)的生物，紅麴菌能以不規則的方式進行有性和無性繁殖，這使其在自然環境中具備良好的適應能力(蘇等, 1970)。

一、重要次級代謝物

紅麴菌的次級代謝物對人類健康有著重要影響，其中主要包括以下三種：

(一) Monacolin K (MK)

Monacolin K 是紅麴米的主要活性成分，最早由日本學者遠藤教授於 1979 年從 *Monascus ruber* 中分離出來(Endo, 1979)。MK 是一種膽固醇合成抑制劑，具有顯著的降血脂效果，並被認為有助於預防和治療癌症、具備神經保護、抗發炎及抗菌作用(Xiong et al., 2019)。

(二) 紅麴色素 (Monascus pigments, MPs)

紅麴菌中已知有 25 種紅麴色素，這些色素不僅在食品著色上應用廣泛，還被發現具有降血脂、抗癌和抗疲勞等多重功效(Zhu et al., 2019)。主要的紅麴色素包括紅色素(monascorubramine 和 rubropunctamine)、橘色素(monascorubrin 和 rubropunctatin) 與黃色素 (ankaflavin 和 monascin)，它們的化學結構屬於真菌次級代謝物的 azaphilones 類。紅麴色素的安全性高，近年來的研究表明，其在多個領域的應用潛力不容忽視，尤其是黃色素 monascin 與 ankaflavin (Feng et al., 2012)。

(三) 橘黴素 (Citrinin)

橘黴素是一種黴菌毒素，通常存在於 *Penicillium*、*Aspergillus* 及 *Monascus* 屬中(Kováč et al., 1961)。這種毒素對肝臟和腎臟有毒性，能引發一系列健康問題，包括血管擴張、血壓急降等。由於紅麴色素與橘黴素的合成過程存在關聯，因此如何在生產紅麴色素的同時控制橘黴素的產生成為研究的重點。

二、轉型研究

紅麴菌的轉型研究自 2003 年以來逐步展開，當時研究者首次成功應用染色體媒介轉型法(genomic DNA-mediated transformation, GDMT)進行紅麴菌的基因改造。隨後，基因槍法、PEG-原生質體轉型法(PEG-protoplast mediated transformation, PEG-PMT)、農桿菌轉型法(*Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation, ATMT)和限制酶媒介整合方法(restriction enzyme-mediated integration)等技術相繼被引入，進一步推進了紅麴菌的轉型研究(Lakrod et al., 2003; Campoy et al., 2003; Chen et al., 2008)。然而，這些方法各有其局限性，例如隨機插入基因的特性影響了基因操作的精確性，且轉型效率參差不齊。

因此，發展高效且精確的基因操作平台對於紅麴菌的研究至關重要。未來的研究方向將集中在如何提高 MK 和 MPs 的產量，同時降低橘黴素的生成，以促進紅麴菌在食品和醫療領域的應用潛力。透過這些研究，紅麴菌有望在健康食品及藥物開發中發揮更大的作用，滿足市場對天然產品的需求。

貳、材料與方法

一、供試菌種

本研究所使用之紅麴菌株 *Monascus purpureus* NTU 568 (DSM 28072) 由國立台灣大學生化科技系潘子明教授實驗室所提供。*E. coli* pCAMBIA1380 購自 pCambia Labs (Canberra, Australia)。

二、培養

紅麴菌 *M. purpureus* NTU 568 接種於 PDA 平板培養基並培養在 28°C。*E. coli* pCAMBIA 1380：取 5 µL 保存於 -80°C 甘油冷凍菌保管之解凍菌液接種至 5 mL LB 培養基，於 37°C，150 rpm，培養 18 小時活化菌株。再接種於含 25 µg/mL kanamycin 之 LA 平板培養基並培養在 37°C。

三、實驗方法

(一) 抽取質體 DNA

在本實驗中，*E. coli* 在含有 25 µg/mL ampicillin (質體 pHRL) 或 25 µg/mL kanamycin (質體 pCAMBIA 1380) 的 LB 培養基中培養 14-16 小時。使用 FavorPrep™ Plasmid Extraction Mini Kit 抽取質體，並以 Qubit® dsDNA BR Assay Kit 測定質體 DNA 濃度，最後將其保存於 -20°C。

(二) 構築質體

本研究針對橘黴素生合成核心基因 *pksCT* 進行剔除。質體構築使用 pCAMBIA 1380 作為篩選標記，*pyT&A* 作為骨架，並連接來自 *Monascus purpureus* NTU 568 的 *pksCT* 同源重組片段 (*pksCT-L* 和 *pksCT-R*)。快速篩選轉型株使用抗生素 hygromycin B phosphotransferase gene (*hph*) 抗性基因作為篩選標記。首先將 *pksCT* 基因的 5' 片段 (*pksCT-L*) 和 3' 片段 (*pksCT-R*) 與從 *E. coli* pCAMBIA 1380 擴增出的 35ST-*Hph*-35SP 片段進行 overlapping PCR 連接。接著，利用 T-A cloning 將該片段接入 *yT&A* vector，並通過熱休克處理將其轉型至 *E. coli* JM109 菌株，以進行保存和定序。表 1 列出了本研究設計的引子資訊。

表 1. 本研究設計的引子。

Table 1. Primers designed in this study.

Oligo ID	Target gene	Sequence (5'→3')	Amplicon size
<i>pksCT-L R</i>	<i>pksCT</i>	CAGTCCGCTATCTATCCATG	654 bp
<i>pksCT-L F</i>		AGATCTCGACCCGTTTAAAG	

Oligo ID	Target gene	Sequence (5'→3')	Amplicon size
<i>pksCT</i> -R R		TTGGCATAGACATCAGTGAC	656 bp
<i>pksCT</i> -R F		CATTGACAATCAGGAGGACA	
<i>Hph</i> OE F		CATGGATAGATAGCGGACTGCTTAGA	2598 bp
<i>Hph</i> OE R	<i>hph</i>	CAACTTAATAACACATTGC	
1380 <i>hph</i> F		TGTCCTCCTGATTGTCAATGTCTAATA	2585 bp
1380 <i>hph</i> R		AACGCTCTTTTCTCTTAG	
1380 <i>hph</i> F		CTTAGACAACCTTAATAACACATTGC	2585 bp
1380 <i>hph</i> R		TCTAATAAACGCTCTTTTCTCTTAG	
GML F	<i>GML</i>	AGGGCAAGTTTCCACCTATGTT	416 bp
GML R		TAGGGTTTCGCTCATGTGTTGA	
<i>pkCT</i> -M F	<i>pksCT</i>	TTGGTTATCAAGACGCATCCCA	855 bp
<i>pksCT</i> -M R		CCTCACGAGCATCAAAGCAAA	

(三) 分生孢子培養與計數

將紅麴菌之菌塊接種於產孢培養基(conidiation medium: 100 g sucrose、1 g KH₂PO₄、0.5 g MgSO₄·7H₂O、2 g NaNO₃、0.5 g KCl、0.01 FeSO₄·7H₂O、3 g yeast extract、5 g casamino acid and 1.5% agar per 1 L medium)中，並於 28 °C，150 rpm 下培養 5 天後，以無菌 PP 茶包袋過濾菌體。將過濾之菌液以 3,420 xg 離心 10 分鐘，去除上清液後以 5 mL 無菌水重新懸浮為孢子懸浮液。於將孢子液稀釋 10 倍，取 20 μL 在顯微鏡下以血球計數器計數，最後以無菌水將孢子數調整至接種量為 10⁶ spore/mL。

(四) 電穿孔轉型

本研究電穿孔操作方法參考 Dobrowolska and Staczek (2009)的操作步驟並加以修改。將分生孢子於室溫靜置沉澱，移除懸浮色素後，加入 20 mL YG 培養基 (0.5% yeast extract、2% glucose)，在 28°C、150 rpm 下培養 2 小時促使發芽。離心 3 分鐘收集發芽孢子，並用甘露醇清洗，再用 lysing buffer 處理 2 小時，完成原生質體的製備(圖 1)。

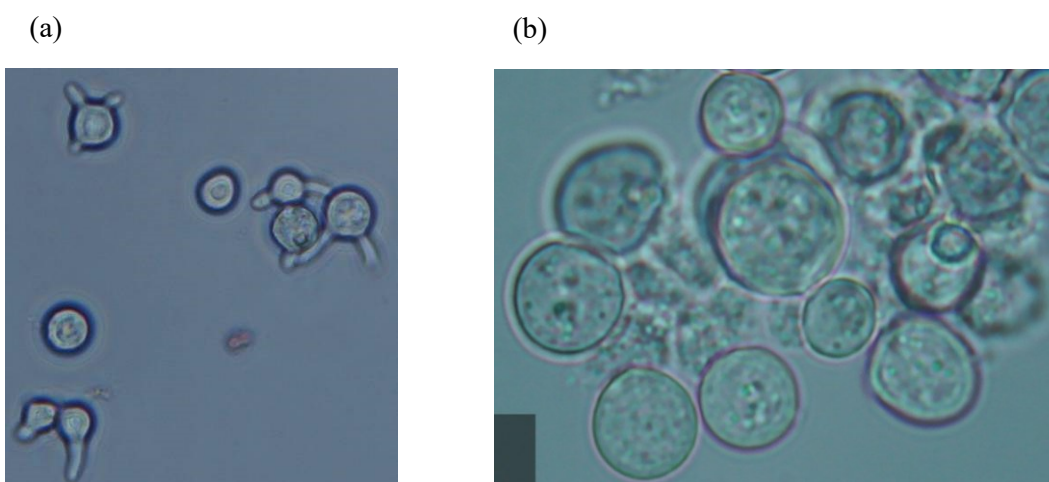


圖 1. 勝任細胞 (a)發芽分生孢子。(b)原生質體。
Figure 1. Competent cell. (a) Germinated conidia. (b) Protoplasts.

(五) 電轉型試驗流程

將電轉型緩衝液 (1 mM HEPES、0.6 M mannitol, pH 7.5) 與 1×10^9 spore/mL 的勝任細胞混合, 冰浴 15 分鐘後加入 4 μ g 質體 DNA, 總體積達 200 μ L, 再冰浴 15 分鐘。使用 BioRad MicroPulser™ 進行電轉型 (2.5 kV/cm), 電擊後立即加入 1 mL YED 培養基, 轉移至 1.5 mL 微量離心管中冰浴 30 分鐘, 再於 28°C 下旋轉震盪培養 1 小時。

(六) 轉型株確認分析

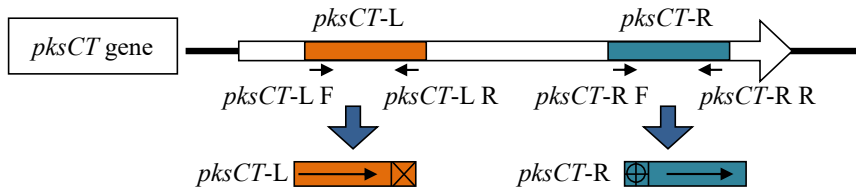
將轉型株在含有 hygromycin B 的 PDB 培養基中於 28°C 培養七天後抽取染色體 DNA。使用引子 GML-F、GML-R 和 *pkscT*-M F、*pkscT*-M R 進行 PCR, 以確認菌株是否攜帶外源基因及野生型 *pkscT* 基因。PCR 產物經電泳確認後送至基龍米克斯生物科技股份有限公司進行定序。

參、結果

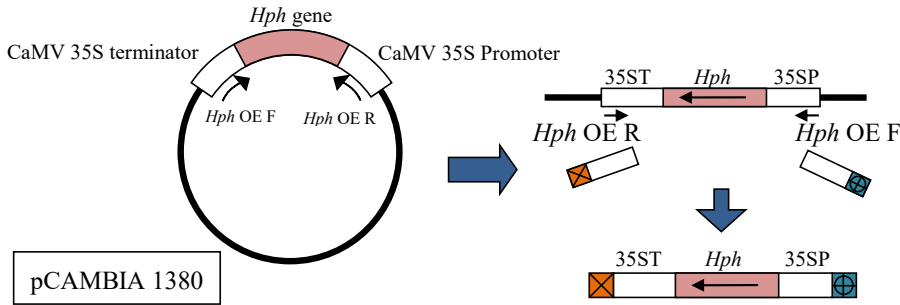
一、*pkscT* 基因剔除 cassette 構築

對橘黴素生合成核心基因 *pkscT* 進行了兩段序列擴增, 分別為 *pkscT*-R (654 bp) 和 *pkscT*-L (656 bp), 結果顯示符合預期的單一條帶。PCR 產物純化後與 pyT&A 選殖載體連接, 轉型至 *E. coli* JM109 進行定序。針對 pCAMBIA 1380 質體進行 35ST-*Hph*-35SP 序列擴增, 產物 2638 bp 並伴隨約 200 bp 副產物。經 1% 瓊脂糖凝膠分離, 切膠純化 2638 bp 目標片段, 與 pyT&A 選殖載體連接後轉型至 *E. coli* JM109 並定序。將 35ST-*Hph*-35SP 序列與 *pkscT*-R 及 *pkscT*-L 片段進行連接 PCR, 結果顯示 OE HR (3253 bp) 和 OE HL (3251 bp) 出現約 700 bp 的條帶, 可能因未純化的連接產物影響專一性。切膠純化後再次連接, 轉型至 *E. coli* JM109 並進行定序。最終, OE HR 及 OE HL 的純化產物與 *pkscT*-R 及 *pkscT*-L 進行連接 PCR, 成功獲得 HRL 產物, 序列全長 3908 bp, 並進行切膠純化、連接及轉型至 *E. coli* JM109 進行保存和定序 (圖 2)。

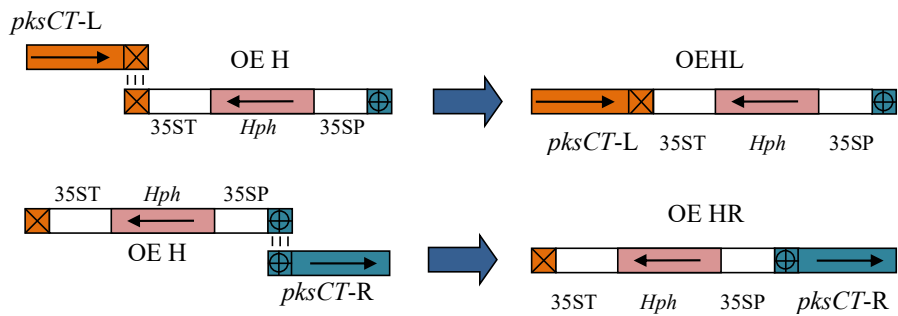
Step 1. amplification of *pksCT-L* and *pksCT-R* sequence.



Step 2. amplification of 35ST-*Hph*-35SP sequence.



Step 3. ligation of OE H on *pksCT-L* or *pksCT-R* sequence.



Step 4. ligation of OE HR and *pksCT-L*.

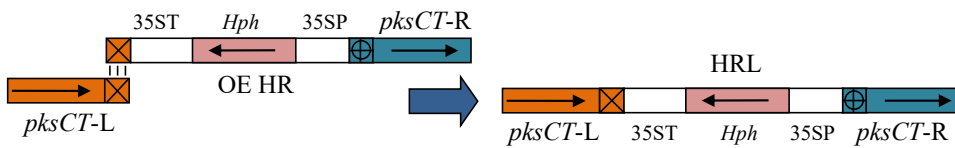


圖 2. 本研究基因剔除 cassette 構築步驟。

Figure 2. Gene knockout cassette construction steps in this study.

二、電轉型條件測試

本研究的電轉型最適條件旨在達到最高轉型效率（每 μg DNA 的轉型株數量）。起初使用發芽分生孢子作為宿主細胞，並使用環形的 pHRL 質體進行電轉型試驗。起始轉型條件為發芽分生孢子密度 1×10^6 、 $4 \mu\text{g}$ 載體 DNA、總體積 $200 \mu\text{L}$ 和再生培養時間 1 小時。電轉型電場條件包含 2.5、5、7.5、10、12.5 和 15 kV，轉型株於含有 $40 \mu\text{g/mL}$ hygromycin B 的 PDA 篩選培養基培養七天，結果無法獲得任何轉型株。隨後改用經 *XbaI* 剪切過的 pHRL 線形質體進行電轉型，轉型條件同上，結果仍無法獲得轉型株。考慮紅麴菌細胞壁可能阻礙外源 DNA 進入細胞內，改用原生質體作為宿主細胞，並將勝任細胞數量調整為 1×10^8 。結果於電場 2.5 kV/cm、使用經 *XbaI* 剪切的 $4 \mu\text{g}$ 載體 DNA、原生質體 1×10^8 、總體積 $200 \mu\text{L}$ 和再生培養時間 1 小時的條件下成功獲得轉型株，轉型效率為每 μg DNA 可產生 77 ± 10.2 個轉型株，顯示細胞壁為 NTU 568 主要的電轉型阻礙。

測試在不同電場下(1、4.5、8、11.5 和 15 kV/cm)使用 *XbaI* 和 *KpnI* 剪切的 pHRL 線性質體的轉型效率，原生質體數量 1×10^8 、 $4 \mu\text{g}$ DNA、總體積 $200 \mu\text{L}$ 和再生培養時間 1 小時。轉型株於含有 $60 \mu\text{g/mL}$ hygromycin B 及 1.2 M sucrose 的 PDA 篩選培養基培養七天後，計算菌落數並將其轉移至含有 $50 \mu\text{g/mL}$ hygromycin B 的 PDA 抗生素培養基進行繼代培養。

經由 *XbaI* 及 *KpnI* 剪切 pHRL 線性質體試驗組於電場 1、4.5、8、11.5 和 15 kV/cm 皆可獲得候選轉型株，但在 15 kV/cm 電場下因電弧自動保護啟動而沒有完成放電過程。使用 *XbaI* 剪切的質體轉型在電場 15 kV/cm 下有最高的轉型效率(205.2 ± 108.6 transformants/ μg DNA)，但電場強度和轉型效率之間無顯著的趨勢。經由 *KpnI* 剪切的質體在電場 1 kV/cm 下有最高的轉型效率(183.2 ± 27.9 transformants/ μg DNA)，但與其餘電場的轉型效率相比無顯著差異，顯示不同的剪切位置會顯著的影響電場和轉型效率間的關連 (圖 3)。

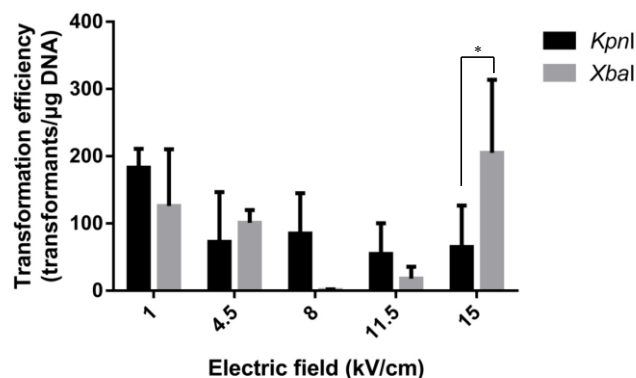


圖 3. 限制酶 *KpnI* 和 *XbaI* 剪切的質體於不同電場下的 NTU 568 轉型效率。

Figure 3. The transformation efficiency of restriction enzymes *KpnI* and *XbaI* under different electric fields on NTU 568.

本研究使用經 *KpnI* 剪切的質體 pHRL 測試不同的原生質體數量、質體 DNA 濃度、緩衝液體積和再生時間對轉型效率的影響。電轉型基本條件為原生質體數量 1×10^9 、4 μg 質體 DNA、總體積 200 μL 和再生培養時間 1 小時。Hygromycin B 篩選濃度 70 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 可達到最高轉型效率(0.50 ± 0.36 個轉型株/ μg DNA)；200 μL 緩衝液體積獲得最高轉型效率(0.58 ± 0.66 個轉型株/ μg DNA)，但各體積間無顯著差異；添加 4 μg pHRL DNA 可得最高轉型效率(0.58 ± 0.51 個轉型株/ μg DNA)，但各組間無顯著差異(表 2)；於再生培養時間的研究中，經過 4 小時再生培養可得最高的轉型效率(0.42 ± 0.24 個轉型株/ μg DNA)，顯著高於培養 0 小時和 3 小時(表 3)。

同樣地，本研究也使用經 *XbaI* 剪切的質體 pHRL 分析不同的原生質體數量、質體 DNA 濃度、緩衝液體積和再生時間對轉型效率的影響。電轉型基本條件保持不變，為原生質體數量 1×10^9 、4 μg DNA、總體積 200 μL 和再生培養時間 1 小時。Hygromycin B 篩選濃度為 60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 時，原生質體數量 1×10^7 cells 時可獲得最高轉型效率(2.20 ± 2.55 個轉型株/ μg DNA)，但組間無顯著差異；緩衝液體積 400 μL 可得最高轉型效率(5.00 ± 5.32 個轉型株/ μg DNA)，但各體積間無顯著差異；添加 4 μg pHRL DNA 質體 DNA 可得最高轉型效率(8.50 ± 7.04 個轉型株/ μg DNA)，但各組間無顯著差異(表 4)；再生培養時間方面，以 6 小時有顯著最高的轉型效率(448.08 ± 28.91 個轉型株/ μg DNA)(表 5)。

表 2. 在篩選抗生素濃度 70 µg/mL hygromycin B 下測試不同原生質體數量、緩衝液體積、質體 DNA 濃度對於由 *KpnI* 剪切的 pHRL 線形質體電轉型 NTU 568 轉型效率的影響。

Table 2. Effects of different protoplast number, buffer volume and plasmid DNA concentration on the transformation efficiency of pHRL linearized plasmid by *KpnI* electroporation on NTU 568 was tested at the screening antibiotic concentration of 70 µg/mL hygromycin B.

Plasmid DNA (µg)	Volume(µL)	Protoplast (cells)	Voltage (kV)	Electric field (kV/cm)	Time constant (ms)	Number of transformants	Transformation efficiency (transformants/µg DNA)
4 µg	200 µL	1×10 ⁶	2.3	11.5	5.2 ± 0.05	0.3 ± 0.47	0.08 ± 0.12 ^{ab}
4 µg	200 µL	1×10 ⁷	2.3	11.5	5.2 ± 0.05	0	0 ^b
4 µg	200 µL	1×10 ⁸	2.3	11.5	5.2 ± 0.05	0	0 ^b
4 µg	200 µL	1×10 ⁹	2.3	11.5	5.1 ± 0.00	2.0 ± 1.40	0.50 ± 0.36 ^a
4 µg	100 µL	1×10 ⁹	2.3	11.5	5.3 ± 0.05	1.3 ± 1.25	0.30 ± 0.31 ^a
4 µg	200 µL	1×10 ⁹	2.3	11.5	5.0 ± 0.08	2.3 ± 2.62	0.58 ± 0.66 ^a
4 µg	300 µL	1×10 ⁹	2.3	11.5	4.8 ± 0.09	0.3 ± 0.47	0.08 ± 0.12 ^a
4 µg	400 µL	1×10 ⁹	2.3	11.5	4.6 ± 0.09	1.7 ± 1.70	0.42 ± 0.42 ^a
2 µg	200 µL	1×10 ⁹	2.3	11.5	5.2 ± 0.05	0	0 ^a
4 µg	200 µL	1×10 ⁹	2.3	11.5	5.2 ± 0.05	2.3 ± 2.05	0.58 ± 0.51 ^a
6 µg	200 µL	1×10 ⁹	2.3	11.5	5.0 ± 0.00	0.7 ± 0.94	0.10 ± 0.14 ^a
8 µg	200 µL	1×10 ⁹	2.3	11.5	4.9 ± 0.00	0	0 ^a

The data are presented as the means ± SD (n=3). Means followed by the same letter within each column do not differ significantly from each other (Tukey's multiple comparisons test, p<0.05).

表 3. 在篩選抗生素濃度 80µg/mL hygromycin B 下測試再生時間對於由 *KpnI* 剪切的 pHRL 線形質體電轉型 NTU 568 轉型效率的影響。
Table 3. Effect of recover time on the transformation efficiency of pHRL linearized plasmid by *KpnI* electroporation on NTU 568 was tested at the screening antibiotic concentration of 80 µg/mL hygromycin B.

Recover time (HR)	Plasmid DNA (µg)	Volume (µL)	Protoplast (cells)	Voltage (kV)	Electric field (kV/cm)	Time constant (ms)	Number of transformants	Transformation efficiency (transformants/µg DNA)
0	4 µg	200 µL	1×10 ⁹	2.3	11.5	4.1 ± 0.09	0	0
1	4 µg	200 µL	1×10 ⁹	2.3	11.5	4.1 ± 0.05	0	0
2	4 µg	200 µL	1×10 ⁹	2.3	11.5	4.2 ± 0.05	0	0
3	4 µg	200 µL	1×10 ⁹	2.3	11.5	4.1 ± 0.09	0	0
4	4 µg	200 µL	1×10 ⁹	2.3	11.5	4.1 ± 0.12	0	0
5	4 µg	200 µL	1×10 ⁹	2.3	11.5	4.1 ± 0.05	0	0
6	4 µg	200 µL	1×10 ⁹	2.3	11.5	4.2 ± 0.05	0	0
7	4 µg	200 µL	1×10 ⁹	2.3	11.5	4.2 ± 0.09	0	0
8	4 µg	200 µL	1×10 ⁹	2.3	11.5	4.0 ± 0.09	0	0

The data are presented as the means ± SD (n=3). Means followed by the same letter within each column do not differ significantly from each other (Tukey's multiple comparisons test, p< 0.05).

表 4. 不同原生質體數量、緩衝液體積、質體 DNA 濃度對於由 *Xba*I 剪切的 pHRL 線形質體電轉型 NTU 568 轉型效率的影響。
Table 4. Effects of different protoplast number, buffer volume and plasmid DNA concentration on the transformation efficiency of pHRL linearized plasmid by *Xba*I electroporation on NTU 568.

Plasmid DNA (μ g)	Volume(μ L)	Protoplast (cells)	Voltage (kV)	Electric field (kV/cm)	Time constant (ms)	Number of transformants	Transformation efficiency (transformants/ μ g DNA)
4 μ g	200 μ L	1×10^6	0.9	4.5	5.4 \pm 0.05	2.0 \pm 1.63	0.50 \pm 0.41 ^a
4 μ g	200 μ L	1×10^7	0.9	4.5	5.4 \pm 0.08	8.7 \pm 10.21	2.20 \pm 2.55 ^a
4 μ g	200 μ L	1×10^8	0.9	4.5	5.3 \pm 0.12	7.3 \pm 9.67	1.83 \pm 2.42 ^a
4 μ g	200 μ L	1×10^9	0.9	4.5	3.5 \pm 0.08	5.3 \pm 6.85	1.33 \pm 1.71 ^a
4 μ g	100 μ L	1×10^9	0.9	4.5	3.6 \pm 0.05	1.3 \pm 1.25	0.30 \pm 0.31 ^a
4 μ g	200 μ L	1×10^9	0.9	4.5	3.6 \pm 0.17	0.7 \pm 0.94	0.17 \pm 0.24 ^a
4 μ g	300 μ L	1×10^9	0.9	4.5	3.7 \pm 0.16	18.3 \pm 25.93	4.60 \pm 6.48 ^a
4 μ g	400 μ L	1×10^9	0.9	4.5	3.6 \pm 0.08	20.0 \pm 21.28	5.00 \pm 5.32 ^a
2 μ g	200 μ L	1×10^9	0.9	4.5	3.6 \pm 0.05	0.3 \pm 0.47	0.17 \pm 0.24 ^a
4 μ g	200 μ L	1×10^9	0.9	4.5	3.6 \pm 0.21	34.0 \pm 28.18	8.50 \pm 7.04 ^a
6 μ g	200 μ L	1×10^9	0.9	4.5	3.5 \pm 0.21	4.3 \pm 5.44	0.72 \pm 0.91 ^a
8 μ g	200 μ L	1×10^9	0.9	4.5	3.5 \pm 0.14	0.3 \pm 0.47	0.04 \pm 0.06 ^a

The data are presented as the means \pm SD (n=3). Means followed by the same letter within each column do not differ significantly from each other (Tukey's multiple comparisons test, $p < 0.05$).

表 5. 再生時間對於由 *XbaI* 剪切的 pHRL 線形質體電轉型 NTU 568 轉型效率的影響。
Table 5. Effect of recover time on the transformation efficiency of pHRL linearized plasmid by *XbaI* electroporation on NTU 568.

Recover time (HR)	Plasmid DNA (μg)	Volume (μL)	Protoplast (cells)	Voltage (kV)	Electric field (kV/cm)	Time constant (ms)	Number of transformants	Transformation efficiency (transformants/ μg DNA)
0	4 μg	200 μL	1×10^9	0.9	4.5	4.9 \pm 0.17	2.0 \pm 1.63	0.50 \pm 0.41 ^b
1	4 μg	200 μL	1×10^9	0.9	4.5	4.8 \pm 0.05	8.3 \pm 1.89	2.08 \pm 0.47 ^b
2	4 μg	200 μL	1×10^9	0.9	4.5	4.8 \pm 0.05	87.0 \pm 36.62	21.75 \pm 9.15 ^b
3	4 μg	200 μL	1×10^9	0.9	4.5	4.8 \pm 0.09	175.0 \pm 55.34	43.75 \pm 13.83 ^b
4	4 μg	200 μL	1×10^9	0.9	4.5	4.8 \pm 0.0	207.0 \pm 106.95	51.75 \pm 26.74 ^b
5	4 μg	200 μL	1×10^9	0.9	4.5	4.7 \pm 0.05	1189.0 \pm 541.21	297.25 \pm 135.3 ^{ca}
6	4 μg	200 μL	1×10^9	0.9	4.5	4.8 \pm 0.05	1792.3 \pm 115.64	448.08 \pm 28.91 ^{ac}
7	4 μg	200 μL	1×10^9	0.9	4.5	4.3 \pm 0.08	367.0 \pm 352.14	91.75 \pm 88.04 ^b
8	4 μg	200 μL	1×10^9	0.9	4.5	4.5 \pm 0.08	26.0 \pm 9.09	6.50 \pm 2.27 ^b

The data are presented as the means \pm SD (n=3). Means followed by the same letter within each column do not differ significantly from each other (Tukey's multiple comparisons test, $p < 0.05$).

肆、討論

綜觀本研究的結果，細胞壁的去除、使用線型質體以及電擊後再生培養時間是 NTU 568 電轉型效率的關鍵。而勝任細胞密度、質體 DNA 量、緩衝液體積與電場對於 NTU 568 電轉型效率的影響並無顯著的趨勢，也因此無法再以反應曲面法進行條件的最適化。

本研究在限制酶剪切對於 NTU 568 電轉型效率的試驗結果中發現，雖然 *KpnI* 與 *XbaI* 這兩種限制酶切處理的質體 pHRL，在 15 kV/cm 的電場下對於 NTU 568 有不錯的轉型效率，且兩種限制酶處理的質體間轉型效率有顯著的不同，但由於該電場強度下會觸發電轉型裝置的電弧保護機制，未完成整個放電程序，因此難以進一步的使用該電場條件，也無法進一步探討其中的差異。

本研究在試驗過程中發現，許多轉型株的 hygromycin B 抗性並不穩定，無法穩定繼代，且 NTU 568 對於 hygromycin B 的自然抗性有隨著環境刺激改變的現象，因此嘗試提高抗生素濃度進行轉型株的篩選。雖然在較高濃度的 hygromycin B 下篩選出的轉型株數量較少，但並沒有提高穩定轉型株的篩選效率，顯示轉型株 hygromycin B 抗性不穩定的原因並非來自於篩選抗生素的濃度不足，較有可能是暫態表現(transient expression)或是抗生素抗性基因 *hph* 表現受到 RNAi 抑制(Torres-Martínez and Ruiz-Vázquez, 2017)。過去研究中也有使用 *hph* 基因作為篩選標記，在轉型 *Podosphaera xanthii* (Vela-Corcía et al., 2015)、*Rhizoctonia solani* (Robinson and Deacon, 2001)和 *Ceriporiopsis subvermispora* (Honda et al., 2019)等真菌時也有觀察到暫態表現的問題，而本研究所使用的加強型 CaMV 35S 啟動子在基改植物中也常觀察到由 RNAi 機制所引起的基因靜默的問題，因此抗生素抗性基因與啟動子的替換與測試將是未來進一步研究的重點。

伍、結論

本研究構築 citrinin 生合成關鍵基因 *pksCT* 的同源重組剔除質體 pHRL，可以成功的進行紅麴菌 NTU 568 中 *pksCT* 基因的同源重組剔除，並降低 89% 的 citrinin 產量，完成紅麴菌電轉型基因操作平台的開發，未來可進一步應用於紅麴菌的基因功能探討、進行異源蛋白表現或應用其他進階技術如 CRISPR 操作。

本研究結果顯示去除細胞壁、使用線型質體以及電擊後再生培養時間是 NTU 568 電轉型效率的關鍵，而勝任細胞密度、質體 DNA 量、反應液體積與電場對於 NTU568 電轉型效率的影響並無顯著的趨勢。本研究在限制酶 *XbaI* 剪切的 pHRL 質體、原生質體數量 1×10^7 cells、4 μ g 質體 DNA、總體積 400 μ L 和再生培養時間 6 小時條件下，可以獲得最高的轉型效率(448.08 ± 28.91 transformants/ μ g DNA)。未來可進一步朝向替換啟動子(例如紅麴菌本身的 GAPDH 啟動子)或是更有效率的篩選標記基因(例如 kanamycin 抗性基因 *ntpII*) 進行探討，提高穩定轉型株的篩選效率。

陸、參考文獻

- 陳慶源、莊淑惠(2003)。綜論紅麴產品之開發與應用。食品工業。35, 1-2。
- 蘇遠志、陳文亮、方鴻源、翁浩慶、王文祥(1970)。紅麴菌 (*Monascus anka*) 之菌學研究。中國農業化學會誌。8, 45-58。
- Campoy S, Pérez F, Martin JF, Gutiérrez S, Liras P. (2003) Stable transformants of the azaphilone pigment-producing *Monascus purpureus* obtained by protoplast transformation and *Agrobacterium*-mediated DNA transfer. *Curr Genet* 43, 447-452.
- Chen YP, Tseng CP, Liaw LL, Wang CL, Chen IC, Wu WJ, Wu MD, Yuan GF (2008) Cloning and characterization of monacolin K biosynthetic gene cluster from *Monascus pilosus*. *J Agric Food Chem* 56, 5639-5646.
- Dobrowolska A and Staczek P. (2009) Development of transformation system for *Trichophyton Rubrum* by electroporation of germinated conidia. *Curr Genet* 55(5), 537-542.
- Endo A. (1979) Monacolin K, a new hypocholesterolemic agent produced by a *Monascus* species. *J. Antibiot* 32, 852-854.
- Feng YL, Shao YC, Chen FS. (2012). *Monascus* pigment. *Appl Microbiol Biotechnol* 96, 1421-1440.
- Honda Y, Tanigawa E, Tsukihara T, Dong XN, Kawabe H, Sakatoku N, Watari J, Sato H, Yano S, Tachiki T, Irie T, Watanabe T, Watanabe T.(2019) Stable and transient transformation, and a promoter assay in the selective lignin-degrading fungus, *Ceriporiopsis subvermispora*. *AMB Expr* 9, 92-104.
- Kováč S, Nemeč P, Betina V, Balan J. (1961) Chemical structure of citrinin. *Nature* 190, 1104-1105.
- Lakrod K, Chaisrisook C, Daniel ZS. (2003) Transformation of *Monascus purpureus* to hygromycin B resistance with cosmid pMocosX reduces fertility. *Electron J Biotechnol* 6, 143-147.
- Robinson HL, Deacon James W. (2001) Protoplast preparation and transient transformation of *Rhizoctonia solani*. *Mycol. Res.* 105 (11), 1295-1303.
- Torres-Martínez S, Ruiz-Vázquez R. (2017) The RNAi Universe in Fungi: A Varied Landscape of Small RNAs and Biological Functions. *Annu Rev Microbiol* 71:371-391.
- Vela-Corcía D, Romero D, Juan Torés A, De Vicente A, Pérez-García A. (2015) Transient transformation of *Podosphaera xanthii* by electroporation of conidia. *BMC Microbiology* 15, 20-31.
- Xiong Z, Cao X, Wen Q, Chen Z, Cheng Z, Huang X, Zhang Y, Long C, Zhang Y, Huang Z. (2019) An overview of the bioactivity of monacolin K/lovastatin. *Food and Chemical Toxicology* 131, 110585.
- Zhu B, Qi FY, Wu JJ, Yin GQ, Hua JW, Zhang QY and Qin LP. (2019) Red yeast rice: a systematic review of the traditional uses, chemistry, pharmacology, and quality control of an important chinese folk medicine. *Front Pharmacol* 10, 1449-1476.