



(12) **BẢN MÔ TẢ GIẢI PHÁP HỮU ÍCH THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN
GIẢI PHÁP HỮU ÍCH**

(19) **Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN)
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ**

(11)



2-0003010

(51) **C12N 1/14**
2020.01

(13) **Y**

(21) 2-2020-00573

(22) 12/11/2020

(45) 26/12/2022 417

(43) 25/01/2021 394

(73) **VIỆN CÔNG NGHỆ SINH HỌC (VN)**

18 Hoàng Quốc Việt, quận Cầu Giấy, thành phố Hà Nội

(72) **LÊ THỊ MINH THÀNH (VN); TRỊNH THỊ THU HÀ (VN); NGÔ ĐÌNH BÌNH
(VN); ĐÔNG VĂN QUYỀN (VN).**

(54) **CHŨNG VI KHUẨN BACILLUS THURINGIENSIS SEROVAR AIZAWAI Đ6.1 THUẦN
KHIẾT VỀ MẶT SINH HỌC MANG GEN MÃ HÓA PROTEIN ĐỘC TỔ CRY2AH1
DIỆT SÂU ĐỤC QUẢ ĐẬU TƯƠNG**

(57) Giải pháp hữu ích đề cập đến chủng vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* serovar *aiwazai* Đ6.1 thuần khiết về mặt sinh học phân lập tại Việt Nam, có khả năng tạo bào tử và sinh tổng hợp protein tinh thể độc tố Cry2Ah1 diệt côn trùng bộ cánh vẩy (Lepidoptera), cụ thể là sâu đục quả đậu tương (*Etiella zinkenella*). Chủng *Bacillus thuringiensis* serovar *aiwazai* Đ6.1 thuần khiết về mặt sinh học theo giải pháp hữu ích mang cấu trúc đoạn gen *cry2Ah1* có kích thước 1899bp, mã hóa 633 axit amin sản sinh protein độc tố Cry2Ah1, protein Cry2Ah1 có trọng lượng 71 kDa và diệt sâu đục quả đậu tương *Etiella zinkenella*. Cấu trúc đoạn gen *cry2Ah1* đã được đăng ký trên ngân hàng gen Quốc tế với mã số: MN725074.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Giải pháp hữu ích đề cập đến các lĩnh vực liên quan đến chủng vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* serovar *aizawai* Đ6.1 thuần khiết về mặt sinh học phân lập từ đất tại tỉnh Tuyên Quang - Việt Nam có khả năng sinh tổng hợp protein độc tố Cry2A_{h1} diệt ấu trùng bộ cánh vẩy (Lepidoptera), cụ thể là sâu đục quả đậu tương (loài *Etiella zinkenella*) và mang trình tự gen *cry2A_{h1}* mã hóa protein độc tố từ chủng này.

Tình trạng kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Đậu tương là một trong những nhóm cây trồng quan trọng hàng đầu trên thế giới. Đây cũng là loại cây trồng có tác dụng trong việc luân xen canh, cải tạo đất rất hiệu quả. Mặc dù nhu cầu đậu tương trong nước rất cao nhưng diện tích gieo trồng và sản lượng đậu tương tại Việt Nam đang giảm khá mạnh, do năng suất thấp. Mặc dù nước ta đã bắt đầu tiến hành sản xuất trên quy mô công nghiệp từ năm 2011 nhưng Việt Nam vẫn tiếp tục phải nhập khẩu phần lớn lượng đậu tương nhằm bù đắp sự thiếu hụt về thực phẩm protein trong nước và đáp ứng nhu cầu ngày càng tăng của ngành công nghiệp thức ăn chăn nuôi và nuôi trồng thủy sản. Theo Cục Chăn nuôi Việt Nam, hàng năm Việt Nam phải nhập nguồn nguyên liệu để chế biến dầu thực vật và thức ăn gia súc với tổng giá trị lên đến 3,7 tỷ USD, trong đó riêng khô dầu đậu tương đã có 2,7 triệu tấn (tương đương 5,4 triệu tấn hạt, gấp 30 lần so với sản lượng sản xuất được tại Việt Nam), đây là sự nghịch lý của một quốc gia với ngành nông nghiệp là chính và có truyền thống sản xuất đậu tương.

Một trong những nguyên nhân làm ảnh hưởng lớn đến năng suất đậu tương là sâu bệnh. Sâu hại đậu tương là nhóm đối tượng thường xuyên gây ra những thiệt hại đáng kể đối với sản xuất đậu tương. Sâu hại đậu tương gồm nhiều nhóm: nhóm sâu hại tất cả các bộ phận của cây, nhóm sâu hại lá, thân, quả, sâu hại trong đất. Có tới 360 loài sâu hại đậu tương ở các vùng trồng đậu tương trên thế giới. Trong các loài sâu hại đậu tương thì sâu đục quả (*Etiella zinkenella*) phân bố rộng rãi và gây hại ở nhiều vùng trồng đậu trên thế giới. Ở Việt Nam, thiệt hại do sâu đục quả tới năng suất lên đến 70-80% nếu không được phòng trừ hợp lý. Tùy điều kiện địa lý, khí hậu mà sâu hại đậu tương ở mỗi một nước có đặc trưng về loài và mức độ phá hoại riêng. Vùng Đông nam nước Mỹ, đậu tương bị phá hại bởi 4 loài sâu chính: sâu đo *Pseudoplusia includens*, sâu xanh *Helicoverpa zea*, sâu đục thân *Elasmopalpus lignosellus*, sâu ăn lá *Anticarsia gemmatilis* (Walker và cộng sự, 2000). Vùng Đông và Đông nam Châu Á, đậu tương bị tấn công bởi nhiều loài sâu chính: *Helicoverpa armigera*, *Spodoptera litura*, *S. exigua* phá hại lá giai đoạn đầu vụ; rệp *Bemisia tabaci*, *Megalurothrips usitatus* và *Edwardsiana avescens* chích hút lá; sâu cuốn lá *Omiodes indicata* gây

hồng lá nghiêm trọng; và sâu đục quả *Etiella zinckenella*, *Maruca vitrata* phá hại nghiêm trọng năng suất đậu vào cuối vụ (Srinivasan và cộng sự, 2009). Ở Việt Nam, theo thống kê thì có 3 nhóm sâu chính: sâu bộ cánh vẩy (Sâu đục quả *Etiella zinckenella*, *Maruca vitrata*; sâu ăn lá hoa: sâu xanh *Helicoverpa armigera*, sâu xanh da láng *Spodoptera exigua*, sâu khoang *Spodoptera litura*, sâu cuốn lá *Omiodes indicata*), sâu bộ hai cánh (dòi đục gốc *Ophiomyia phaseoli*, dòi đục thân *Melanagromyza sojae*) và bộ cánh ngửa (rệp *Aphis craccivora* Koch, *Aphis glycines* Matsumura).

Biện pháp sử dụng cây đậu tương chuyển gen kháng sâu đã được ứng dụng rộng rãi ở nhiều nước trên thế giới. Trong một thời gian dài việc sử dụng thuốc trừ sâu có nguồn gốc *Bacillus thuringiensis* có hiệu quả phòng trừ sâu cao và thân thiện với môi trường. Cùng với việc sử dụng thuốc trừ sâu có chứa *Bacillus thuringiensis*, thì việc sử dụng cây trồng chuyển gen *Bacillus thuringiensis* đã làm giảm lượng thuốc trừ sâu sử dụng đối với cây trồng. Mặt khác, côn trùng cũng đã phát triển khả năng kháng đối với một hoặc một vài protein Cry, cho nên điều chỉnh liều lượng là giải pháp khả thi để kéo dài hiệu lực của cây chuyển gen *Bacillus thuringiensis* (Kumar và cộng sự, 2008; Brindha và cộng sự, 2013). Nguồn gen kháng côn trùng có giá trị để biến nạp vào cây trồng có nguồn gốc từ động vật, thực vật, vi sinh vật hoặc gen tổng hợp nhân tạo cũng được chuyển vào cây trồng. Trong những năm gần đây, rất nhiều nhà khoa học đã tập trung nghiên cứu chuyển gen và biểu hiện độc tố Bt (từ vi khuẩn *Bacillus thuringiensis*) vào thực vật.

Trong quá trình sinh trưởng và phát triển, vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* có khả năng sinh ra 3 loại protein độc tố diệt côn trùng chính là Cry, Cyt và Vip. Trong đó, độc tố Cry là họ độc tố quan trọng và ứng dụng nhiều nhất trong sản xuất thuốc trừ sâu BT và chuyển gen kháng sâu vào cây trồng. Độc tố Cry (do các gen *cry* mã hóa) được chia thành 6 nhóm chính: Cry1, Cry2, Cry3, Cry4, Cry5 và Cry6. Theo thống kê kết quả công bố trên thế giới, các gen độc tố từ vi khuẩn Bt diệt các loại sâu hại đậu tập trung chủ yếu ở các nhóm gen: *cry1*, *cry2*, *vip*. Có gen có phổ diệt sâu khá rộng. Gen *cry1Ab* có thể diệt được các loài sâu cánh vẩy *Maruca vitrata*, *Spodoptera exigua*; gen *cry1Ac* có thể diệt các loài *Spodoptera exigua*, *Spodoptera litura*, *Omiodes indicata*, *Helicoverpa armigera*, *Helicoverpa zea*, *Pseudoplusia includens*; gen *vip3C* có thể diệt *Spodoptera litura*, *Helicoverpa armigera*... (Estruch và cộng sự, 1996; Strizhov và cộng sự, 1997; Walker và cộng sự, 2000; Guo Hong Nian và cộng sự, 2003; Ibargutxi và cộng sự, 2008; Hernández Martínez và cộng sự, 2008; Onstad và cộng sự, 2012; Palma và cộng sự, 2012). Tuy nhiên, hiện nay các công bố về gen *cry* kháng sâu đục quả đậu tương (*Etiella zinckenella*) là chưa có.

Nhóm gen *cry2Ah* được chia làm 6 lớp chính bao gồm: *cry2Ah1*, *cry2Ah2*, *cry2Ah3*, *cry2Ah4*, *cry2Ah5* và *cry2Ah6*. Các gen này được phát hiện trong khoảng thời gian từ năm 2009 – 2016 và đều mã hóa protein độc tố diệt côn trùng. Năm 2011, gen *cry2Ah1* được Zhang và cộng sự phân lập từ chủng *Bacillus thuringiensis* SC6H8. Gen *cry2Ah1* có kích thước 1899bp, mã hóa protein Cry2Ah1 gồm 632 axit amin,

trình tự gen *cry2Ah1* đã được tác giả đăng ký trên Ngân hàng gen quốc tế với mã số EU939453. Cho đến năm 2017, Li và cộng sự đã thành công trong việc chuyển gen *cry2Ah1* vào cây thuốc lá. Kết quả cho thấy, tất cả những cây thuốc lá chuyển gen *cry2Ah1* đều có độc tính cao đối với ấu trùng sâu bướm. Như vậy, gen *cry2Ah1* rất hữu ích trong kiểm soát sinh học côn trùng và có tiềm năng ứng dụng trong việc tạo cây trồng chuyển gen kháng côn trùng.

Như vậy, các kết quả nghiên cứu về gen *cry2Ah1* trên thế giới còn rất ít và chưa có nghiên cứu nào về gen *cry2Ah1* mã hóa protein độc tố diệt sâu đục quả đậu tương. Ở nước ta, cũng chưa có một công bố nào nghiên cứu về gen *cry2Ah1* phân lập ở Việt Nam.

Bản chất kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Mục đích của giải pháp hữu ích là giải quyết các vấn đề nêu trên. Để đạt được mục đích đó, giải pháp hữu ích đề cập đến chủng vi khuẩn tự nhiên phân lập tại Việt Nam có khả năng tạo protein tinh thể độc tố diệt côn trùng bộ cánh vẩy. Cụ thể, giải pháp hữu ích đề cập đến chủng vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* serovar *aizawai* Đ6.1 thuần khiết về mặt sinh học mang gen *cry2Ah1* mã hóa protein tinh thể độc tố Cry2Ah1 có hoạt tính diệt côn trùng bộ cánh vẩy cao, đặc biệt là sâu đục quả đậu tương (loài *Etiella zinkenella*).

Chủng vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* serovar *aizawai* Đ6.1 thuần khiết về mặt sinh học mang trình tự ADN mã hóa protein tinh thể độc tố Cry2Ah1.

Theo khía cạnh thứ nhất, giải pháp hữu ích đề cập đến chủng *Bacillus thuringiensis* serovar *aizawai* Đ6.1 thuần khiết về mặt sinh học phân lập tại Việt Nam có hoạt tính diệt sâu đục quả đậu tương cao. Chủng Đ6.1 có khả năng tạo bào tử và sinh tinh thể độc tố Cry2Ah1 diệt sâu đục quả đậu tương với hoạt tính cao đạt 93,33%.

Theo khía cạnh thứ hai, chủng *Bacillus thuringiensis* serovar *aizawai* Đ6.1 thuần khiết về mặt sinh học mang trình tự ADN của gen *cry2Ah1* mã hóa protein độc tố Cry2Ah1 diệt sâu đục quả đậu tương. Trình tự ADN mã hóa protein tinh thể độc tố Cry2Ah1 có kích thước 1899bp được nêu trong SEQ ID NO:1, mã hóa 633 axit amin sản sinh một protein tinh thể độc tố có trọng lượng 71kDa đã được đăng ký trên ngân hàng gen Quốc tế với mã số: MN725074.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Hình 1 là hình ảnh thể hiện khuẩn lạc chủng *Bacillus thuringiensis* serovar *aizawai* Đ6.1 trên môi trường thạch dinh dưỡng (A). Khuẩn lạc hình tròn, màu trắng đục, không nhăn mép; Hình dạng tinh thể từ chủng *Bacillus thuringiensis* serovar *aizawai* Đ6.1 (B) chụp dưới kính hiển vi quang học (độ phóng đại 100 lần). Tinh thể hình cầu.

Hình 2 là hình ảnh thể hiện kết quả thử nghiệm hoạt tính diệt sâu đục quả đậu tương của hỗn hợp bào tử và tinh thể từ chủng *Bacillus thuringiensis* serovar *aizawai* Đ6.1. Sâu chết do độc tố từ chủng Đ6.1 có màu đen.

Hình 3 là hình ảnh thể hiện kết quả khuếch đại gen *cry2Ah1* từ chủng *Bacillus thuringiensis* serovar *aizawai* Đ6.1 (1) và thang ADN chuẩn (M). Gen *cry2Ah1* có kích thước xấp xỉ 2000 bp.

Hình 4 là hình ảnh thể hiện kết quả biểu hiện protein tái tổ hợp Cry2Ah1 (1), các phân đoạn sau tinh sạch của protein tái tổ hợp Cry2Ah1 (2, 3, 4 và 5) và thang protein chuẩn (M). Protein tái tổ hợp Cry2Ah1 có trọng lượng khoảng 71 kDa.

Mô tả chi tiết giải pháp hữu ích

Giải pháp hữu ích đề cập đến chủng vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* serovar *aizawai* Đ6.1 thuần khiết về mặt sinh học, được phân lập từ các mẫu đất thu thập ở tỉnh Tuyên Quang, Việt Nam. Chủng Đ6.1 có hoạt tính diệt sâu đục quả đậu tương cao và trình tự ADN mã hóa protein độc tố Cry2Ah1 từ chủng này sẽ được bộc lộ rõ ràng thông qua các phương án thực hiện giải pháp hữu ích.

- Chủng *Bacillus thuringiensis* serovar *aizawai* Đ6.1 được phân lập từ mẫu đất qua các bước: Lấy 1 g đất hòa trong 9 ml nước cất vô trùng, lắc 150 vòng/phút trong 15 phút. 1 ml dịch huyền phù được ủ ở nhiệt độ 70°C trong 15 phút để loại bỏ tế bào sinh dưỡng. Dịch đã xử lý nhiệt được pha loãng với nước cất vô trùng ở các nồng độ từ 10^{-1} đến 10^{-6} . Hút 100 μ l dịch pha loãng vào đĩa petri chứa môi trường MPA (0,5% cao thịt; 1% pepton; 0,5% NaCl và 2% agar; độ pH 7,0-7,2) rồi trải đều dung dịch trên mặt thạch bằng que gạt vô trùng, ở mỗi nồng độ pha loãng cấy lên 3 đĩa môi trường dinh dưỡng, nuôi ở 28°C trong 72 đến 96 giờ. Đã xác định chủng Đ6.1 sinh tinh thể hình cầu.

- Chủng *Bacillus thuringiensis* serovar *aizawai* Đ6.1 được phân loại dưới loài theo 60 typ huyết thanh và đã có phản ứng ngưng kết với typ huyết thanh H7, chủng Đ6.1 thuộc dưới loài *aizawai*.

- Thử nghiệm hoạt tính diệt sâu đục quả đậu tương (*Etiella zinkenella*) của hỗn hợp bào tử và tinh thể tự nhiên của chủng *Bacillus thuringiensis* serovar *aizawai* Đ6.1. Đã xác định chủng Đ6.1 có hoạt tính diệt sâu đục quả đậu tương cao đạt 93,33%.

- Tách chiết ADN plasmid của chủng *Bacillus thuringiensis* serovar *aizawai* Đ6.1 làm khuôn, kết hợp sử dụng cặp mồi đặc hiệu của gen *cry2Ah1* có trình tự: 5'-ATGAATAATGTATTGAATAGCGGAAG-3' và 5'-ATAAAGTGGTGAAATATTAGTTGGAA-3' để khuếch đại gen *cry2Ah1*. Kết quả thu được đoạn gen mã hóa protein tinh thể độc tố của chủng *Bacillus thuringiensis* serovar *aizawai* Đ6.1 có kích thước 1899bp.

- Đoạn gen 1899bp mã hóa protein tinh thể độc tố của chủng Đ6.1 được tách dòng trong vectơ pBT và biến nạp vào vi khuẩn *E. coli* DH5 α . Plasmid tái tổ hợp thu được đặt tên là pBT-cry2Ah1.

- Đoạn gen *cry2Ah1* được xác định trình tự theo phương pháp của Sanger và đồng tác giả trên máy xác định trình tự ADN tự động ALP Express sử dụng các đoạn mồi gắn huỳnh quang và bộ hóa chất chuẩn để nhân gen bằng PCR của hãng Amersham Pharmacia Biotech. Các số liệu được xử lý trên phần mềm PC GENE (Thụy Sĩ). Trình tự nucleotit của gen *cry2Ah1* được phân tích bằng phần mềm PC

GENE, đã xác định đoạn gen *cry2Ah1* có kích thước 1899 bp mã hóa 633 axit amin với trọng lượng phân tử 71 kDa. Trình tự nucleotit của gen *cry2Ah1* từ chủng Đ6.1 đã được đăng ký trên ngân hàng gen Quốc tế với mã số MN725074.

- Để khẳng định protein do gen *cry2Ah1* mã hóa vẫn duy trì hoạt tính diệt sâu đục quả đậu tương khi thay đổi vật chủ, tiến hành biểu hiện protein Cry2Ah1 do gen *cry2Ah1* mã hóa trong vi khuẩn *E. coli* nhằm thu được protein độc tái tổ hợp có hoạt tính. Đoạn gen 1899bp được cắt khỏi plasmit tái tổ hợp pBT-cry2Ah1 và gắn vào vector biểu hiện pET21a bởi 2 enzym giới hạn *Bam*HI và *Xho*I. Vector tái tổ hợp pET21a- *cry2Ah1* được biến nạp vào tế bào *E. coli* chủng BL21(DE3). Các khuẩn lạc mang vector tái tổ hợp được biểu hiện trong môi trường có chất cảm ứng là IPTG nồng độ 0,1 mM, 28°C trong 16 giờ. Khả năng biểu hiện gen *cry2Ah1* trong chủng *E. coli* tái tổ hợp được kiểm tra trên gel polyacrylamit 12,5%. Protein tái tổ hợp được tinh chế bằng cột sắc ký ái lực ProbondTM Nickel-Chelating Resin (hãng Invitrogen) và được định lượng theo phương pháp Bradford (1976). Kết quả thu được protein tái tổ hợp tinh sạch có trọng lượng phân tử khoảng 71 kDa và lượng protein Cry2Ah1 tái tổ hợp tinh sạch có nồng độ trung bình là 377 µg/ml.

- Thử nghiệm hoạt tính kháng sâu đục quả đậu tương của protein tái tổ hợp Cry2Ah1 được tiến hành đối với prorein tái tổ hợp trước tinh sạch và protein tái tổ hợp sau tinh sạch ở các nồng độ protein thay đổi. Kết quả hoạt tính được xử lý số liệu và phân tích bởi phương pháp thống kê, phân tích phương sai (ANOVA), thu được liều lượng gây chết 50% (LC₅₀) với sâu đục quả đậu tương của protein tái tổ hợp Cry2Ah1 sau tinh sạch là 342,6 µg/ml. Protein độc tố Cry2Ah1 trước tinh sạch có hoạt tính diệt sâu đục quả đậu tương cao đạt 80%.

Chủng *Bacillus thuringiensis* serovar *aizawai* Đ6.1 là chủng tự nhiên được phân lập tại Việt Nam mang trình tự ADN đoạn gen *cry2Ah1* mã hóa protein tinh thể độc tố diệt sâu đục quả đậu tương *Etiella zinkenella*. Cho đến nay, chưa có một công bố nào về gen *cry2Ah1* có khả năng diệt sâu đục quả đậu tương được công bố ở Việt Nam. Đoạn gen *cry2Ah1* có kích thước 1899 bp mã hóa cho một trình tự 633 axit amin để tạo thành một protein có trọng lượng phân tử là 71 kDa. Khi protein Cry2Ah1 được biểu hiện trong vật chủ khác (vi khuẩn *E. coli*) thì protein độc tố vẫn thể hiện hoạt tính diệt sâu đục quả đậu tương với tỷ lệ gây chết sâu tương đối cao đạt 80%. Kết quả này mở ra một hướng mới là ứng dụng nguồn gen diệt côn trùng từ vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* bản địa trong sản xuất thuốc trừ sâu BT và tạo giống cây trồng biến đổi gen ở Việt Nam nhằm tiến tới một nền sản xuất nông nghiệp xanh - sạch - bền vững.

Chủng *Bacillus thuringiensis* serovar *aizawai* Đ6.1 nêu trong giải pháp hữu ích hiện đang được lưu giữ tại Trung tâm Giống và Bảo tồn nguồn gen vi sinh vật – Viện Công nghệ sinh học – Viện Hàn lâm KHCVN ở các điều kiện khác nhau như: trong điều kiện lạnh sâu -80°C, trong nitơ lỏng và đông khô.

Ví dụ thực hiện giải pháp hữu ích

Các ví dụ dưới đây chỉ nhằm minh họa các phương án thực hiện giải pháp hữu ích mà không làm hạn chế phạm vi yêu cầu bảo hộ của giải pháp hữu ích.

Ví dụ 1: Phân lập vi khuẩn *Bacillus thuringiensis*

Hòa 1 g đất trong 9 ml nước cất vô trùng, lắc 150 vòng/phút trong 15 - 20 phút. Lấy 1 ml dịch huyền phù vào ống eppendorf sạch ủ ở nhiệt độ 70°C trong 15 phút. Dịch đã xử lý nhiệt được pha loãng với nước cất vô trùng ở các nồng độ từ 10^{-1} đến 10^{-6} . Hút 100 μ l dịch pha loãng cho vào đĩa petri chứa môi trường MPA rồi trải đều dung dịch trên mặt thạch bằng que gạt vô trùng, ở mỗi nồng độ pha loãng cấy lên 3 đĩa môi trường dinh dưỡng, nuôi ở 28°C trong 72 đến 96 giờ. Sau đó, quan sát khả năng hình thành tinh thể trên kính hiển vi đôi pha hoặc kính hiển vi quang học. Đã xác định chủng *Bacillus thuringiensis* serovar *aizawai* Đ6.1 sinh tinh thể hình cầu.

Thành phần môi trường MPA (gram/lít): NaCl 5g, cao thịt 5g, pepton 10g, agar 20g, độ pH 7.

Ví dụ 2: Xác định dưới loài của chủng *Bacillus thuringiensis* serovar *aizawai* Đ6.1 bằng phản ứng huyết thanh

Các chủng vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* sau khi phân lập có tinh thể hình cầu được cấy vào trong ống Craige, ống Craige là ống thủy tinh nhỏ, được cắm thẳng đứng vào môi trường Craige (Môi trường Craige: NaCl 5g; pepton 5g; bacto agar 10g; độ pH 7; nước cất 1 lít) chứa trong ống nghiệm to. Thời gian nuôi là 18 giờ đến 24 giờ và nhiệt độ nuôi là 28°C. Những tế bào *Bacillus thuringiensis* di chuyển lên phía trên bề mặt môi trường giữa ống Craige và ống nghiệm sẽ được cấy chuyển vào ống Craige một lần nữa. Khi vi khuẩn phát triển trên ống Craige với thời gian chuyển động là 16-18 giờ thì cấy được vào ống nghiệm chứa khoảng 2ml môi trường MPB (NaCl 5g; cao thịt 5g; pepton 10g; nước cất 1 lít; độ pH 7) rồi nuôi lắc với tốc độ 70 vòng/phút từ 8-12 giờ.

Phản ứng ngưng kết giữa vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* với typ huyết thanh H7 được quan sát trên kính hiển vi: nhỏ 2 μ l dịch nuôi lên phiến kính lõm để kiểm tra khả năng chuyển động của vi khuẩn, sau đó nhỏ tiếp 2 μ l huyết thanh H7 chuẩn có độ pha loãng 50 lần và quan sát dưới kính hiển vi. Chủng vi khuẩn mất khả năng chuyển động hoàn toàn do huyết thanh gây ra hiện tượng ngưng kết chứng tỏ chủng đó thuộc dưới loài *aizawai*. Đã xác định chủng *Bacillus thuringiensis* serovar *aizawai* Đ6.1 thuộc dưới loài *aizawai*.

Ví dụ 3: Phân lập gen *cry2Ah1* và xác định trình tự ADN của gen *cry2Ah1* của chủng *Bacillus thuringiensis* serovar *aizawai* Đ6.1

ADN tổng số của chủng *Bacillus thuringiensis* serovar *aizawai* Đ6.1 được tách chiết theo phương pháp của Mayjonade và cộng sự (2018). Phân tử ADN tách từ chủng Đ6.1 được sử dụng làm khuôn để khuếch đại đoạn gen *cry2Ah1* bằng kỹ thuật PCR sử dụng cặp mồi đặc hiệu của gen *cry2Ah1* (5'-ATGAATAATGTATTGAATAGCGGAAG-3' và 5'-ATAAAGTGGTGAAATATTAGTTGGAA-3'). Phản ứng PCR được thực hiện theo các phương pháp chuẩn được mô tả bởi Sambrook và Russell (2001), với chu trình nhiệt: 98°C 30 giây, 98°C 10 giây, 60°C 20 giây, 72°C 1 phút, 72°C 5 phút, từ bước 2 đến bước 4 lặp lại 30 chu kỳ. Kết quả thu

được một đoạn gen có kích thước khoảng 1,9 kb. Đoạn gen 1,9 kb được gắn vào vector tách dòng pBT tạo vector tái tổ hợp gọi là pBT-cry2Ah1, vector tái tổ hợp này được biến nạp vào vi khuẩn *E. coli* DH10B. Khuẩn lạc được dự đoán có mang vector tái tổ hợp được nuôi trong môi trường LB có bổ sung Ampicilin nồng độ 100 µg/ml và tách ADN plasmid để kiểm tra sự có mặt của gen bằng cách xử lý với cặp enzym giới hạn *Bam*HI, *Xho*I. Trình tự ADN của gen *cry2Ah1* được xác định theo phương pháp của Sanger và cộng sự trên máy xác định trình tự ADN tự động ALP Express sử dụng các đoạn mồi gắn huỳnh quang và bộ hóa chất chuẩn để nhân gen bằng PCR của hãng Amersham Pharmacia Biotech. Các số liệu được xử lý trên phần mềm PC GENE (Thụy Sĩ), đã xác định đoạn gen *cry2Ah1* có kích thước 1899bp mã hóa trình tự 633 axit amin với trọng lượng phân tử là 71 kDa. Kết quả cho thấy, trình tự đoạn gen *cry2Ah1* được tách từ chủng *Bacillus thuringiensis* serovar *aizawai* Đ6.1 có mã khởi đầu và mã kết thúc. Gen *cry2Ah1* có độ tương đồng 99,53% so với gen tham chiếu trên Ngân hàng gen.

Ví dụ 4: Biểu hiện gen *cry2Ah1* của chủng *Bacillus thuringiensis* serovar *aizawai* Đ6.1 trong *E. coli* BL21(DE3).

Đoạn gen *cry2Ah1* được cắt khỏi plasmid tái tổ hợp pBT-cry2Ah1 và gắn vào vector biểu hiện pET21a bởi 2 enzym giới hạn *Bam*HI và *Xho*I, tạo vector tái tổ hợp pET21a-cry2Ah1. Vector tái tổ hợp pET21a-cry2Ah1 được biến nạp vào tế bào *E. coli* chủng BL21(DE3). Khuẩn lạc vi khuẩn BL21 chứa vector tái tổ hợp pET21a-cry2Ah1 được nuôi cấy trong 5 ml môi trường LB lỏng có bổ sung kháng sinh Ampicilin 100 µg/ml, nuôi ở 37°C, lắc 200 vòng/phút qua đêm. Cấy chuyển 1 ml dịch khuẩn đã nuôi qua đêm sang 100 ml môi trường LB mới và nuôi ở 37°C, lắc 200 vòng/phút đến khi giá trị OD₆₀₀ = 0,6 thì bổ sung chất cảm ứng IPTG nồng độ 100 µM và chuyển sang nuôi lắc 200 vòng/phút ở 28°C trong 16 giờ để biểu hiện protein ngoại lai. Ly tâm dịch nuôi cấy ở 6000 vòng/phút trong 15 phút để thu cặn tế bào, cặn tế bào được hòa trong dung dịch đệm PBS 1X (8 g NaCl; 0,2 g KCl; 1,44 g Na₂HPO₄·2H₂O; 0,24 g KH₂PO₄; độ pH 7,4; nước cất đến 1 lít). Bổ sung lysozym tới nồng độ 0,1 mg/ml, ủ trên đá 1 giờ và tiến hành siêu âm phá tế bào, sau đó ly tâm 13000 vòng/phút trong 30 phút, thu cả dịch nổi và cặn để kiểm tra bằng phương pháp điện di SDS-PAGE. Sản phẩm thu được là protein tái tổ hợp có trọng lượng phân tử 71 kDa.

Protein tái tổ hợp Cry2Ah1 được tinh sạch bằng cột sắc ký ái lực Probond™ Nickel-Chelating Resin theo hướng dẫn của hãng Invitrogen. Sau tinh sạch, protein tái tổ hợp được định lượng theo phương pháp Bradford (1976) dựa vào phản ứng bắt màu giữa protein và thuốc nhuộm Coomassie Blue, sử dụng albumin huyết thanh bò (BSA) như protein chuẩn. Dựng đường cong chuẩn biểu diễn nồng độ protein chuẩn. Hàm lượng protein có trong 1ml dịch ban đầu được xác định theo công thức:

$$M \text{ (mg)} = c.v.a$$

(Trong đó: c: nồng độ protein theo đồ thị 1mg/ml, v: là thể tích dung dịch mẫu cho vào, a: là độ pha loãng dung dịch).

Ví dụ 5: Thử hoạt tính sinh học

Hoạt tính diệt sâu đục quả đậu tương *Etiella zinkenella* (Sâu bộ cánh vẩy) được tiến hành trên 2 đối tượng: Hỗn hợp bào tử và tinh thể của chủng *Bacillus thuringiensis* serovar *aizawai* Đ6.1 và protein độc tố tái tổ hợp Cry2Ah1 từ chủng *E. coli* BL21(DE3).

Thử khả năng diệt sâu đục quả đậu tương của hỗn hợp bào tử và tinh thể của chủng *Bacillus thuringiensis* serovar *aizawai* Đ6.1: Chủng Đ6.1 được nuôi lắc trong 200 ml môi trường LB với tốc độ 150 vòng/phút, 96 giờ. Hỗn hợp bào tử và tinh thể được ly tâm thu cặn ở 12000 vòng/phút, 10 phút. Hòa tan cặn trong 20 ml nước cất khử trùng, thu được dung dịch chứa bào tử và tinh thể. 2ml dịch bào tử và tinh thể của chủng Đ6.1 được rải đều vào mỗi hộp môi trường thức ăn nhân tạo (20% thức ăn tổng hợp, 2% agar, nước cất), để qua đêm cho dịch bào tử và tinh thể thấm đều vào môi trường.

Mỗi hộp thí nghiệm thả vào 10 con sâu đục quả đậu tương tuổi 2-3, đối chứng âm thay dịch bào tử và tinh thể bằng nước cất vô trùng và được tiến hành song song với lô thí nghiệm, mỗi công thức lặp lại 3 lần. Sau 5 ngày thử nghiệm, hoạt tính diệt sâu đục quả đậu tương của chủng Đ6.1 được ghi nhận là 93,33%.

Thử hoạt tính diệt sâu đục quả đậu tương của protein tái tổ hợp Cry2Ah1 biểu hiện trong vi khuẩn *E. coli* được tiến hành như sau: Nuôi cấy và cảm ứng biểu hiện 150 ml protein tái tổ hợp; Ly tâm thu sinh khối protein ở 6000 vòng/phút trong 15 phút; Phá màng bằng siêu âm với 10 ml dung dịch đệm PBS 1X (8 g NaCl; 0,2 g KCl; 1,44 g Na₂HPO₄·2H₂O; 0,24 g KH₂PO₄; độ pH7,4; nước cất đến 1 lít) có bổ sung lysozym tới nồng độ 0,1 mg/ml trong 15 phút để thu dịch chứa protein; Thử hoạt tính diệt sâu đục quả đậu tương của protein tái tổ hợp: 1 cốc thức ăn chứa 20g thức ăn nhân tạo + 1ml dịch protein tái tổ hợp Cry2Ah1 + 10 cá thể sâu đục quả đậu tương tuổi 2-3; Các công thức thí nghiệm đối chứng bao gồm: Sinh khối chủng *E. coli* BL21 không chứa vector tái tổ hợp, dung dịch phá mẫu PBS 1X và nước vô trùng được tiến hành đồng thời, mỗi công thức lặp lại 3 lần; Nuôi sâu ở điều kiện nhiệt độ phòng, kết quả sau 5 ngày thử nghiệm, hoạt tính diệt sâu đục quả đậu tương của protein tái tổ hợp Cry2Ah1 đạt 80%. Như vậy, sau khi thay đổi vật chủ thì hoạt tính diệt sâu đục quả đậu tương của protein độc tố Cry2Ah1 vẫn cao hơn 75%.

Sử dụng cột sắc ký ái lực HiTrap để tinh sạch protein tái tổ hợp Cry2Ah1, sau đó định lượng protein theo phương pháp Bradford. Protein độc tố Cry2Ah1 tinh sạch được pha về các nồng độ 100, 200, 300, 400 và 500 µg/ml để thử nghiệm hoạt tính diệt sâu theo phương pháp LC₅₀: 1 ml dịch protein Cry2Ah1 được trộn đều với 20 g thức ăn nhân tạo + 10 sâu tuổi 2-3/cốc; các công thức đối chứng: sinh khối chủng *E. coli* BL21, dung dịch EB và nước vô trùng được tiến hành song song với thí nghiệm, mỗi công thức được nhắc lại 3 lần. Số liệu thống kê được xử lý, tính toán LC₅₀ theo phương pháp thống kê và phân tích phương sai (ANOVA). Kết quả thu được nồng độ gây chết 50% (LC₅₀) của protein tinh thể độc tố Cry2Ah1 đối với sâu đục quả đậu tương là 342,6 µg/ml.

Hiệu quả đạt được của giải pháp hữu ích

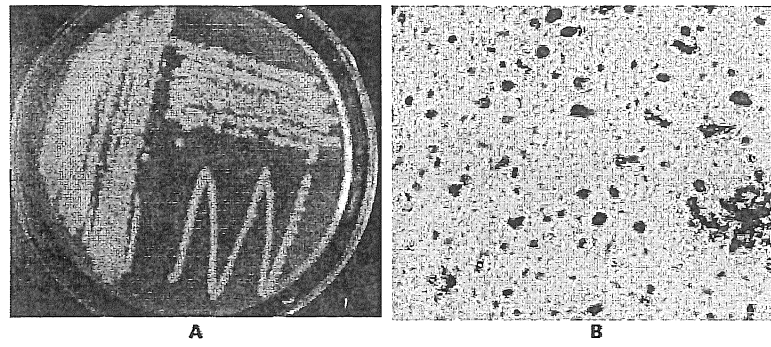
Chủng vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* serovar *aiwazai* Đ6.1 thuần khiết về mặt sinh học là chủng đầu tiên được phân lập tại Việt Nam mang gen *cry2Ah1*, có khả năng tạo bào tử và sinh tổng hợp protein tinh thể độc tố Cry2Ah1 diệt sâu đục quả đậu tương (*Etiella zinkenella*) – là loại côn trùng khó phòng trừ và gây hại nghiêm trọng cho sản xuất các cây họ đậu nói riêng và nền nông nghiệp Việt Nam nói chung.

Cho đến nay, ở Việt Nam chưa có công trình nghiên cứu nào về gen *cry2Ah1* kháng sâu đục quả đậu tương (*Etiella zinkenella*). Chủng *Bacillus thuringiensis* serovar *aizawai* Đ6.1 là một trong 5 chủng được nhóm nghiên cứu phân lập tại Việt Nam mang gen *cry* có khả năng sinh protein tinh thể độc tố diệt sâu đục quả đậu tương (*Etiella zinkenella*).

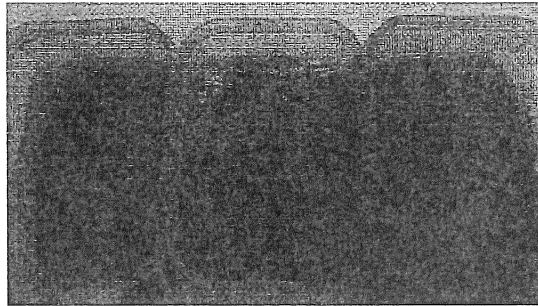
Chủng vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* serovar *aiwazai* Đ6.1 thuần khiết về mặt sinh học có tiềm năng ứng dụng làm nguyên liệu trong sản xuất chế phẩm diệt sâu sinh học và trong công tác tạo giống cây trồng chuyển gen kháng côn trùng cánh vẩy (cụ thể là sâu đục quả đậu) tại Việt Nam, dần thay thế thuốc trừ sâu hóa học, nhằm tiến tới nền nông nghiệp hữu cơ, đảm bảo an toàn môi trường sinh thái và sức khỏe cho người, vật nuôi.

YÊU CẦU BẢO HỘ

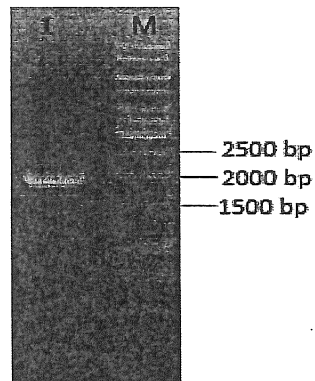
1. Chủng vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* serovar *aiwazai* Đ6.1 thuần khiết về mặt sinh học được phân lập từ đất tại tỉnh Tuyên Quang -Việt Nam, mang gen mã hóa protein độc tố Cry2Ah1 diệt sâu đục quả đậu tương có khả năng tạo bào tử và sinh tổng hợp protein tinh thể độc tố diệt sâu đục quả đậu tương *Etella zinckenella*, trong đó chủng này có trình tự nucleotit của đoạn gen *cry2Ah1* được thể hiện trong SEQ ID NO:1 có kích thước 1899bp, mã hóa 633 axit amin tạo protein độc tố Cry2Ah1 được thể hiện trong SEQ ID NO:2 và đã được đăng ký trên Ngân hàng gen quốc tế với số hiệu MN725074.



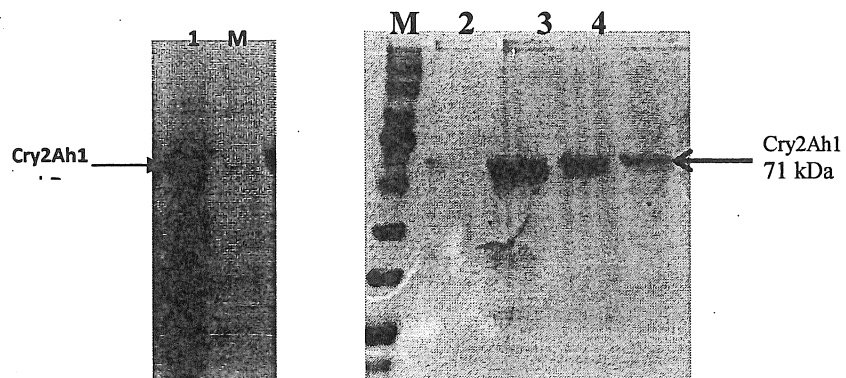
Hình 1



Hình 2



Hình 3



Hình 4

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Viện Công nghệ sinh học

<120> CHŨNG VI KHUẨN BACILLUS THURINGIENSIS SEROVAR AIZAWAI
Đ6.1 THUẦN KHIẾT VỀ MẶT SINH HỌC MANG GEN MÃ HÓA PROTEIN ĐỘC
TỔ CRY2AH1 DIỆT SÂU ĐỤC QUẢ ĐẬU TƯƠNG

<160> 1

<210> SEQ ID NO:1

<211> 1899

<212> AND

<213> *Bacillus thuringiensis* serovar *aizawai* Đ6.1

<400>

```

1 atgaataatg tattgaatag cggaagagct actaatgggtg atgcgtataa tgtagtggct
61 catgatccat ttagttttca acataaatca ttagatacca tacaagaaga atggatggag
121 tggaaaaaag ataatcatat ttatattgta gatacctattg ttggaactgt ggctagcttt
181 cttttaaga aagtggggag tcttggttga aaaagaatat taagtgaatt acggaattta
241 atatttccta gtggcagtac aaatctaatt caagataatt taagagagac agaaaaattc
301 ctgaatcaaa gacttaatac agacactctt gcccgtgtaa atgcggaatt gacagggtg
361 caagcaaatg tagaagagtt taatcgacaa gtagataatt tttgaaccc taaccgaaat
421 gctgttcctt tatcaataac ttcttcagtt aatacaatgc agcaattatt tctaaataga
481 ttaccccagt ttcagatgca aggataccaa ttgtattat tacctttatt tgcacaggca
541 gccaatctac atctttcttt tattagatgt gttattctta atgcagatga atggggaatt
601 tcagcagcaa cattacgtac gtatcaaaa cacctgagaa attatacaag agagtactct
661 aattattgta taactacgta tcaaaactgcg tttagaggtt taaacacccg ttacacgat
721 atgttagaat ttgaacata tatgttttta aatgtatttg aatatgtatc tatctggtcg
781 ttgtttaa atcaaagcct tctagtatct tctggcgtca atttatatgc aagtggtagt
841 ggaccacagc agaccacaatc atttacttca caagactggc catttttata ttctctttc
901 caagttaatt caaattatgt gtaaatggc tttagtggcg ctgacttac gcagactttc
961 cctaattattg ttggtttacc tgggtactact acaactcacg cattgcttgc tgcaagggtc
1021 aattacagtg gaggagtctt gctcgtgat ataggcgctg tgttaataca aaattttagt
1081 ttagtagcat ttctcccacc ttgttaaca ccatttgta gaagtggct agattcaggt
1141 tcagatcggg gggggattaa taccgttacc aattggcaaa cagaatcctt tgagacaact
1201 ttaggtttta ggagtgggtc tttagcagct cgaggtaatt caaactattt cccagattat
1261 ttatccgta atatttctgg agttccttta gttgttagaa atgaagattt aagaagaccg
1321 ttactata atcaataag aaatatagaa agtccttcag gaacacctgg tggattacga
1381 gcttatatgg tatctgtgca taacagaaaa aataatatct atgccgttca tgaaaatggt
1441 actatgattc atttagcgcc ggaagattat acaggattta ctatcgcg gatacatgca
1501 actcaagtga ataataaac gcgaacattt atttctgaaa aatttggaaa tcaaggtgat
1561 tccttaagat tgaacaaaag caacacgaca gtcgttata cccttagagg gaatggaaat
1621 agttacaatc ttattttaag agtatcttca ataggaaatt ccactattcg agttactata
1681 aacggtagag ttatactgc ttcaaatgtt aataactata caaataacga tggagttaat
1741 gataatggag ctggttttc agatattaat atcggtatg tagtagcaag tgataatact
1801 aatgtaccgt tagatataaa tgtgacatta aattcgggta ctcaattga gcttatgaat
1861 attatgttg ttccaactaa tattcacca cttatttaa

```

<210> SEQ ID NO:2

<211> 633

<212> Protein

<213> *Bacillus thuringiensis* serovar *aizawai* D6.1

<400>

MNNVLNSGRATNGDAYNVVAHDPFSFQHKSLDTIQEEWMEWKKDNHILYVDPIVGTVASFLLK
KVGSLVGKRILSELRNLI FPGSTNLMQDILRETEKFLNQRLNTDTLARVNAELTGLQANVEEFN
RQVDNFLNPNRNAVPLSITSSVNTMQQLFLNRLPQFQM QGYQLLLLPLFAQAANLHLSFIRDVIL
NADEWGISAATLR TYQNHLRNYTREYSNYCITTYQTAFRGLNTRLHDMLEFR TYMFLNVFEYVS
IWSLFKYQSLLVSSGANLYASGSGPQQTQSFTSQDWPFLYSLFQVNSNYVLNGFSGARLTQTFFN
IVGLPGTTTTTHALLAARVNYSGGVSSGDIGAVFNQNFSCSTFLPPLLTPFVRSWLD SGSDRGGIN T
VTNWQTESFETTLGLRSGAFTARGNSNYFPDYFIRNISGVPLVVRNEDLRRPLHYNQIRNIESPSG
TPGGLRAYMVSVHNRKNNIYAVHENGTMH LAPEDYTGFTISPIHATQVNNQTRTFISEKFGNQG
DSLRFEQSNTTARYTLRGNGNSYNLYLRVSSIGNSTIRVTINGRVYTASNVTNTTNNDGVNDNG
ARFSDINIGNVVASDNTNVPLDINVTLNSGTQFELMNIMFVPTNISPLYS