



(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)



2-0003011

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

(13) **Y**

(21) 2-2020-00575

(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) **TRỊNH THỊ THU HÀ (VN); LÊ THỊ MINH THÀNH (VN); NGÔ ĐÌNH BÌNH
(VN); CHU HOÀNG HÀ (VN).**

(54) **CHỦNG VI KHUẨN BACILLUS THURINGIENSIS KT10 THUẦN KHIẾT VỀ MẶT
SINH HỌC MANG GEN MÃ HÓA PROTEIN ĐỘC TỔ CRY1CA9 DIỆT SÂU ĐỤC QUẢ
ĐẬU TƯƠNG**

(57) Giải pháp hữu ích đề cập đến chủng *Bacillus thuringiensis* KT10 thuần khiết về mặt sinh học được phân lập từ đất tại tỉnh Kon Tum - Việt Nam, có khả năng sinh tổng hợp tinh thể độc tố Cry1Ca9 diệt côn trùng bộ cánh vẩy - Lepidoptera (*Etiella zinkenella*). Chủng *Bacillus thuringiensis* KT10 theo giải pháp hữu ích mang cấu trúc đoạn gen *cry1Ca9* có kích thước 2025 bp mã hóa 675 axit amin sản sinh một protein tinh thể độc tố 76 kDa diệt sâu đục quả đậu tương *Etiella zinkenella*. Trình tự ADN của đoạn gen *cry1Ca9* đã được đăng ký trên ngân hàng gen Quốc tế với mã số MN725077.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Giải pháp hữu ích đề cập đến chủng vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* KT10 thuần khiết về mặt sinh học phân lập từ đất tại tỉnh Kon Tum - Việt Nam có khả năng sinh tổng hợp protein độc tố Cry1Ca9 diệt ấu trùng bộ cánh vẩy (Lepidoptera), cụ thể là sâu đục quả đậu tương (loài *Etiella zinckenella*) và mang trình tự gen mã hóa protein độc tố từ chủng này.

Tình trạng kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Đậu tương (*Glycine max*) là cây lương thực có giá trị kinh tế cao, thuộc họ đậu (*Fabaceae*) giàu protein, được trồng làm thức ăn cho người và gia súc. Sản phẩm từ cây đậu tương được sử dụng rất đa dạng như dùng trực tiếp hạt thô hoặc chế biến thành đậu phụ, ép thành dầu đậu nành, nước tương, làm bánh kẹo, sữa đậu nành, v.v. đáp ứng một nửa nhu cầu về dầu thực vật và protein toàn cầu. Ngoài ra, trồng cây đậu tương còn có tác dụng cải tạo đất, tăng năng suất các cây trồng khác.

Sâu hại đậu tương là nhóm đối tượng thường xuyên gây ra những thiệt hại đáng kể đối với sản xuất đậu tương. Có tới 360 loài sâu hại đậu tương, trong số đó sâu đục quả *Etiella zinckenella* (côn trùng thuộc Bộ cánh vẩy) là loài phân bố rộng rãi, khó phòng trừ và gây hại nghiêm trọng trên đậu tương 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 cs, 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 hỏng lá nghiêm trọng; và sâu đục quả *Etiella zinckenella*, *Maruca vitrata* phá hại nghiêm trọng năng suất đậu vào cuối vụ (Srinivasan và cs, 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).

Để phòng trừ sâu đục quả có thể dùng biện pháp luân canh cây trồng, đặc biệt là trồng cây lúa nước hoặc ngâm nước 2-3 ngày để tiêu diệt nhộng trong đất. Ngoài ra có thể dùng biện pháp hóa học, nhưng đây là đối tượng sâu hại khó phòng trừ bằng biện

pháp hóa học vì giai đoạn sâu non sống trong quả đậu. Mặt khác, sử dụng thuốc hóa học gây ra tính kháng thuốc, ảnh hưởng đến môi trường sinh thái cũng như sức khỏe con người. Vì vậy, việc sử dụng các tác nhân sinh học như virus, vi khuẩn, vi nấm hay các hợp chất tự nhiên có hoạt tính sinh học mạnh để phòng trừ sâu đục quả cho cây đậu tương là rất hữu ích và cần thiết, trong đó thuốc trừ sâu vi sinh đã và đang được lựa chọn. 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 vi khuẩn *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. Biện pháp sử dụng cây đậu tương chuyển gen kháng sâu đã được ứng dụng rộng rãi ở nhiều nước trên thế giới.

Trong vòng 100 năm qua, vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* là đối tượng được nghiên cứu nhiều nhất trong số các tác nhân vi sinh vật gây bệnh cho côn trùng. Hiện nay, chế phẩm sinh học BT diệt côn trùng chiếm tới 90% thị trường thuốc trừ sâu sinh học. Từ khi gen mã hoá protein tinh thể diệt sâu *Bacillus thuringiensis* đầu tiên được tách dòng và đọc trình tự năm 1981 thì hàng loạt gen mã hóa protein độc tố của *Bt* (*cry*, *vip*, *cyt*) đã được nghiên cứu đặc tính của chúng. Năm 1985, cây trồng đầu tiên trên thế giới được chuyển gen *cry* của vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* để diệt sâu hại thuốc lá đã mở ra kỷ nguyên chọn tạo giống cây trồng biến đổi gen mang các tính trạng mong muốn (Barton và cs., 1987). Hiện nay, độc tố *Bacillus thuringiensis* bao gồm khoảng 800 gen mã hoá, chúng được phân loại thành 80 họ chính.

Sâu đục quả đậu tương rất khó diệt do giai đoạn sâu non sống trong quả đậu, mặt khác hiện nay hiện tượng côn trùng kháng thuốc trừ sâu ngày càng tăng. Vì vậy, muốn diệt được chúng cần phải chuyển gen độc tố vào cây trồng hoặc sử dụng các loại thuốc trừ sâu BT có phổ diện sâu rộng và đặc hiệu cho từng loài côn trùng khác nhau. Trong các loại protein độc tố của *Bacillus thuringiensis* (*Cry*, *Cyt*, *Vip*) thì protein 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* được mã hoá bởi các gen *cry* nằm trên các plasmit, gen *cry* được chia làm 6 nhóm chính, trong đó nhóm gen *cry1* là nhóm gen được nghiên cứu kỹ nhất. 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 cs, 1996; Strizhov và cs, 1997; Walker và cs, 2000; Guo Hong Nian và cs, 2003; Ibargutxi và cs, 2008; HernándezMartínez và cs, 2008; Onstad và cs, 2012; Palma và cs, 2012). Tuy nhiên, hiện nay các công bố về gen *cry* kháng sâu đục quả đậu tương (*Etiella zinkenella*) là chưa có.

Những nghiên cứu về gen *cry1Ca* và ứng dụng trong sản xuất thuốc trừ sâu sinh học hoặc tạo cây trồng chuyển gen *cry1Ca* kháng côn trùng còn rất ít. Năm 2005, Zeng

và cộng sự đã tạo được cây củ cải đường chuyển gen *cry1Ca* kháng giun. Gen *cry1Ca9* được Kao và cộng sự nhân dòng và đọc trình tự từ chủng *Bacillus thuringiensis* G10-01A phân lập ở Đài Loan, bao gồm một khung đọc mở kích thước 3567 bp, mã hóa protein gồm 1189 axit amin, protein có trọng lượng phân tử dự đoán là 134,7 kDa. Khi protein độc tố Cry1Ca9 được biểu hiện trong chủng *Bacillus thuringiensis* âm tính (*cryB*-), các tinh thể hình elip đã được tạo ra. Dịch chiết tế bào từ chủng tái tổ hợp này có hoạt tính diệt côn trùng cao chống lại ấu trùng bộ cánh vẩy Lepidopteran (*Plutella xylostella*). Tinh thể protein Cry1Ca được hình thành và phát triển trong suốt quá trình tạo bào tử. Mỗi gen *cry1Ca* thuộc họ gen *cry1* khác nhau thì cấu trúc tinh thể cũng có những điểm khác nhất định, phần lớn các protein tinh thể của các gen *cry1* đều có dạng hình lưỡng tháp (*kurstaki*, *aizawai*, v.v.), một số ít có dạng hình elip (*cry1Ca*). Như vậy, cấu trúc của protein tinh thể diệt sâu của gen *cry1Ca* đang là vấn đề đáng quan tâm của các nhà khoa học. Các nhà khoa học trên thế giới đang rất quan tâm, nghiên cứu về khả năng kháng côn trùng của gen *cry1Ca9*, khai thác ứng dụng trong sản xuất thuốc trừ sâu sinh học cũng như tạo cây trồng chuyển gen nhằm giảm thiểu thiệt hại do côn trùng bộ cánh vẩy gây ra.

Các nghiên cứu về vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* ở Việt Nam như phân lập, phân loại, sản xuất thuốc diệt côn trùng chủ yếu tập trung vào gen *cry1A*, *cry2*, *cry3*, *cry4*, *cry8*. Ở nước ta chưa có một công trình nào nghiên cứu về gen *cry1Ca9* bản địa. Gần đây nhóm tác giả đã phân lập thành công gen *cry1Na* từ một số chủng *Bacillus thuringiensis*, trong đó chủng *Bacillus thuringiensis* KT10 mang gen *cry1Ca9* có khả năng diệt sâu đục quả đậu tương (*Etiella zinkenella*), đoạn gen mã hóa của chủng KT10 có kích thước 2025 bp đã được đăng ký trên Ngân hàng gen quốc tế với mã số MN725077 mã hóa protein độc tố Cry1Ca9 gồm 675 axit amin, cung cấp nguyên liệu cho công tác chuyển gen kháng sâu đục quả vào cây đậu tương.

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 *Bacillus thuringiensis* KT10 thuần khiết về mặt sinh học phân lập tại Việt Nam mang gen *cry1Ca9* mã hóa protein tinh thể độc tố Cry1Ca9 có hoạt tính diệt côn trùng bộ cánh vẩy cao, loài *Etiella zinkenella* và trình tự ADN mã hóa protein tinh thể độc tố Cry1Ca9 từ chủng này.

Theo khía cạnh thứ nhất, giải pháp hữu ích đề cập đến chủng *Bacillus thuringiensis* phân lập tại Việt Nam có hoạt tính diệt sâu đục quả đậu tương cao. Đó là chủng *Bacillus thuringiensis* KT10 thuần khiết về mặt sinh học mang gen *cry1Ca9* mã hóa protein độc tố Cry1Ca9 diệt sâu đục quả đậu tương. Chủng *Bacillus thuringiensis* KT10 thuần khiết về mặt sinh học có khả năng tạo bào tử và sinh tinh thể độc tố Cry1Ca9 diệt sâu đục quả đậu tương với hoạt tính cao đạt 96,67%.

Theo khía cạnh thứ hai, trình tự ADN mã hóa protein tinh thể độc tố Cry1Ca9 từ chủng *Bacillus thuringiensis* KT10 thuần khiết về mặt sinh học có kích thước 2025 bp được nêu trong SEQ ID NO:1, mã hóa 675 axit amin sản sinh một protein tinh thể

độc tố có trọng lượng 76 kDa đã được đăng ký trên ngân hàng gen Quốc tế, mã số: MN725077.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Hình 1 là hình ảnh thể hiện hình thái bào tử và tinh thể độc tố của chủng *Bacillus thuringiensis* KT10 thuần khiết về mặt sinh học chụp dưới kính hiển vi quang học (C: Tinh thể, S: Bào tử). Tinh thể chủng KT10 có hình dạng không xác định, bào tử hình elip.

Hình 2 là hình ảnh thể hiện điện di protein tái tổ hợp Cry1Ca9 của chủng *Bacillus thuringiensis* KT10 thuần khiết về mặt sinh học trên gel SDS - PAGE 12,5% (Cột 1, 2: Protein tái tổ hợp của chủng KT10; Cột ĐC1, ĐC2: đối chứng; Cột M: protein chuẩn).

Hình 3 là hình ảnh thể hiện khả năng diệt sâu đục quả đậu tương của protein tinh thể Cry1Ca9 và protein độc tố tái tổ hợp Cry1Ca9 trên môi trường tổng hợp (A: Khả năng diệt sâu của protein tinh thể, B: khả năng diệt sâu của protein tái tổ hợp).

Hình 4 là hình ảnh thể hiện điện di protein Cry1Ca9 tái tổ hợp tinh sạch trên gel SDS - PAGE 12,5% (Cột 1, 2, 3 và 4: Protein tinh sạch thu ở các phân đoạn khác nhau; Cột M: protein chuẩn).

Mô tả chi tiết giải pháp hữu ích

Giải pháp hữu ích đề cập đến chủng vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* KT10 thuần khiết về mặt sinh học có hoạt tính diệt sâu đục quả đậu tương cao và trình tự ADN mã hóa protein tinh thể độc tố Cry1Ca9 từ chủng này sẽ được bộc lộ rõ ràng ở đây thông qua các phương án thực hiện giải pháp hữu ích. Chủng vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* KT10 là chủng tự nhiên, được phân lập ở Việt Nam. Chủng KT10 có thể được phân lập bằng cách sử dụng phương pháp được bộc lộ trong giải pháp hữu ích hoặc phương pháp có cải tiến.

- Chủng vi khuẩn thuần khiết về mặt sinh học được phân lập từ mẫu đất ở tỉnh Kon Tum bằng cách: 1 g đất được hòa trong 9 ml nước cất vô trùng, lắc 150 vòng/phút trong 15 phút. Lấy 1 ml 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 (0,5% cao thịt; 1% peptone; 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 *Bacillus thuringiensis* KT10 sinh tinh thể hình không xác định, tinh thể có kích thước 0,7 μ m - 1,2 μ m.

- Hỗn hợp bào tử và tinh thể thu được sau khi nuôi chủng KT10 trong 96 giờ được thử nghiệm hoạt tính diệt sâu đục quả đậu tương (*Etiella zinkenella*), đã xác định được chủng KT10 có hoạt tính diệt sâu đục quả đậu tương cao đạt 96,67% sau 5 ngày thử nghiệm.

- AND tổng số của chủng *Bacillus thuringiensis* KT10 thuần khiết về mặt sinh học đã được tách và khuếch đại gen *cry1Ca9* sử dụng cặp mồi đặc hiệu của gen *cry1Ca9* có trình tự: 5'- ATGGAGGAAAATAATCAAAATCAATG-3' và 5'- CTCGGACAATTCTCGCTTTTC-3'. Kết quả thu được đoạn gen mã hóa protein tinh thể độc tố của chủng KT10 có kích thước 2025 bp.

- Đoạn gen 2025 bp mã hóa protein tinh thể độc tố Cry1Ca9 của chủng KT10 được tách dòng trong vector pJET1.2/blunt và biến nạp vào vi khuẩn *E. coli* DH10B. Các plasmit tái tổ hợp được đặt tên là pJET1.2-cry1Ca9.

- Gen *cry1Ca9* trong plasmit tái tổ hợp pJET1.2-cry1Ca9 được xác định trình tự theo phương pháp của Sanger và đồng tác giả trên máy xác định trình tự DNA 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 *cry1Ca9* có kích thước 2025 bp mã hóa trình tự 675 axit amin với trọng lượng phân tử tính toán theo lý thuyết là 76 kDa. Trình tự nucleotit của gen *cry1Ca9* từ chủng KT10 đã được đăng ký trên ngân hàng gen Quốc tế, mã số MN725077.

- Đoạn gen *cry1Ca9* từ chủng KT10 được biểu hiện protein trong vi khuẩn *E. coli* nhằm thu được protein độc tố Cry1Ca9 tái tổ hợp có hoạt tính để khẳng định hoạt tính diệt sâu đục quả đậu tương của gen này. Đoạn gen *cry1Ca9* được cắt khỏi plasmit tái tổ hợp pJET1.2-cry1Ca9 và gắn vào vector biểu hiện pET32a(+) bởi 2 enzym giới hạn *Bam*HI và *Xho*I. Vector tái tổ hợp pET32a-cry1Ca9 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 0,1 mM, 28°C trong 16 giờ. Khả năng biểu hiện gen *cry1Ca9* trong chủng *E. coli* tái tổ hợp được kiểm tra trên gel polyacrylamit 12,5%. Protein tái tổ hợp được tinh sạch bằng cột sắc ký ái lực Probond™ Nickel-Chelating Resin (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 94 kDa và lượng protein Cry1Ca9 tái tổ hợp tinh sạch có nồng độ trung bình là 352 µg/ml.

- Protein tái tổ hợp Cry1Ca9 được thử nghiệm hoạt tính diệt sâu đục quả đậu tương ở các nồng độ protein thay đổi (từ 100 đến 500 µg/ml), 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 Cry1Ca9 là 297,3 µg/ml.

Điểm khác biệt của giải pháp hữu ích: Chủng *Bacillus thuringiensis* KT10 thuần khiết về mặt sinh học trong giải pháp hữu ích là chủng tự nhiên được phân lập tại Việt Nam mang trình tự đoạn gen *cry1Ca9* mã hóa protein tinh thể độc tố diệt sâu đục quả đậu tương *Etiella zinkenella*. Ở Việt Nam, chưa có một công bố nào về gen *cry1Ca9* tính đến nay. Đoạn gen mã hóa có kích thước 2025 bp mã hóa cho một trình tự 675 axit amin để tạo thành một protein có trọng lượng phân tử là 76 kDa. Khi sử dụng vật chủ khác (vi khuẩn *E. coli* BL21) thì protein độc tố Cry1Ca9 vẫn thể hiện hoạt tính diệt sâu đục quả đậu tương với tỷ lệ gây chết sâu cao đạt 86,67%. Kết quả

này mở ra một hướng mới là ứng dụng nguồn gen *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* KT10 thuần khiết về mặt sinh học 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 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*

1 g đất được hòa trong 9 ml nước cất vô trùng, lắc 150 vòng/phút trong 15 phút. Lấy 1 ml huyền phù vào ống eppendorf sạch 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 μl dịch pha loãng ở các nồng độ 10^{-5} và 10^{-6} 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 đối pha hoặc kính hiển vi quang học. Đã xác định chủng KT10 sinh tinh thể có hình dạng không xác định. Thành phần môi trường MPA (gram/lít): NaCl 5g, cao thịt 5g, pepton 10g, agar 20g, độ pH 7.

Ví dụ 2: Phân lập gen và xác định trình tự ADN của gen *cry1Ca9* của chủng *Bacillus thuringiensis* KT10 thuần khiết về mặt sinh học

Chủng *Bacillus thuringiensis* KT10 thuần khiết về mặt sinh học có mang gen *cry1Ca9* mã hóa protein tinh thể độc đối với sâu đục quả đậu tương. Để phát hiện gen *cry1Ca9* trong chủng KT10 cần tiến hành theo các bước được mô tả dưới đây.

Chủng thuần khiết về mặt sinh học được cấy vào ống nghiệm có chứa 1,5 ml môi trường LB, nuôi lắc ở tốc độ 200 vòng/phút, trong khoảng 12-16 giờ, nhiệt độ nuôi thích hợp là 28°C . Sau đó đổ dịch nuôi cấy vào ống eppendorf ly tâm tốc độ 6000 vòng/phút trong 10 phút, đổ dịch đi, thu cặn, cặn được rửa 2 lần bằng nước khử ion đã khử trùng. Sau đó hòa tan lại bằng 70 μl nước khử ion và xử lý mẫu ở 100°C trong 10 phút bằng cách thả ống chứa mẫu vào nồi nước đang sôi, giữ 10 phút. Li tâm nhanh tốc độ 6000 vòng/phút trong 3 phút, thu dịch nổi có chứa các phân tử ADN làm khuôn cho phản ứng PCR nhằm khuếch đại gen *cry1Ca9*. Phương pháp này bao gồm việc tiếp xúc của phân tử ADN tách từ chủng KT10 với cặp mồi đặc hiệu có trình tự: 5'-ATGGAGGAAAATAATCAAAATCAATG-3' và 5'-CTCGGACAATTCTCGCTTTTC-3' để tạo sản phẩm khuếch đại gen *cry1Ca9*. Phản ứng PCR được thực hiện theo các phương pháp chuẩn được mô tả bởi Sambrook và Russell (2001). Kết quả thu được một phân đoạn gen có kích thước khoảng 2,0 kb. Đoạn gen khoảng 2,0 kb được gắn vào vectơ tách dòng pJET1.2/blunt và biến nạp vào

vi khuẩn *E. coli* DH5 α . Khuẩn lạc được dự đoán có mang plasmit tái tổ hợp được nuôi trong môi trường LB có bổ sung Ampicilin nồng độ 50 $\mu\text{g/ml}$ và tách ADN plasmit để kiểm tra sự có mặt của gen. ADN plasmit tái tổ hợp được kiểm tra bằng kỹ thuật PCR và xử lý với enzym giới hạn. Trình tự gen *cry1Ca9* được xác định theo phương pháp của Sanger và cộng sự trên máy xác định trình tự DNA 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 Pharmacial Biotech. Các số liệu được xử lý trên phần mềm PC GENE (Thụy Sĩ) đã xác định đoạn gen *cry1Ca9* có kích thước 2025 bp mã hóa trình tự 675 axit amin với trọng lượng phân tử tính toán theo lý thuyết là 76 kDa. Kết quả cho thấy, trình tự đoạn gen *cry1Ca9* được tách từ chủng KT10 có mã khởi đầu tại vị trí axit amin thứ 21 (TTG) và không có mã kết thúc, có độ tương đồng 100% so với gen tham chiếu.

Ví dụ 3: Biểu hiện gen *cry1Ca9* và tinh sạch protein tái tổ hợp Cry1Ca9

Đoạn gen *cry1Ca9* được cắt khỏi plasmit tái tổ hợp và gắn vào vector biểu hiện pET32a(+) bởi 2 enzym giới hạn *Bam*HI và *Xho*I. Vector tái tổ hợp pET32a- *cry1Ca9* được biến nạp vào tế bào *E. coli* chủng BL21(DE3). Sản phẩm biến nạp được nuôi cấy trên môi trường LBA có bổ sung Ampicilin nồng độ 50 $\mu\text{g/ml}$, 37°C; sau 16-18 giờ kiểm tra kết quả biến nạp bằng PCR khuẩn lạc. Những khuẩn lạc mang vector tái tổ hợp được biểu hiện trong môi trường có chất cảm ứng là IPTG 0,1 mM, 28°C trong 16 giờ. Kiểm tra khả năng biểu hiện gen *cry1Ca9* trên gel polyacrylamit 12,5%. Sản phẩm thu được là protein tái tổ hợp có trọng lượng phân tử 94 kDa (76 kDa của protein Cry1Ca9 và 18,5 kDa của protein Trx-His-Stag dung hợp của vector pET32a(+)).

Protein tái tổ hợp được tinh sạch bằng cột sắc ký ái lực Probond™ Nickel-Chelating Resin (Invitrogen), quy trình được tiến hành theo protocol của hãng. Protein tái tổ hợp tinh sạch được định lượng theo phương pháp Bradford (1976). 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 1 mg/ml, v: là thể tích dung dịch mẫu cho vào, a: là độ pha loãng dung dịch)

Ví dụ 4: Thử hoạt tính sinh học

- Thử hoạt tính diệt sâu đục quả đậu tương của protein độc tố có nguồn gốc từ chủng *Bacillus thuringiensis* KT10 thuần khiết về mặt sinh học: Chủng KT10 được nuôi lắc trong 100 ml môi trường LB, lắc 150 vòng/phút, 78 giờ. Hỗn hợp bào tử và tinh thể được ly tâm thu cặn ở 11.000 vòng/phút, 15 phút. Hòa tan cặn trong 10 ml nước cất khử trùng, thu được dung dịch chứa bào tử và tinh thể. Dịch bào tử và tinh thể được rải đều vào hộp chứa môi trường thức ăn nhân tạo (20% thức ăn tổng hợp, 2% agar). Mỗi hộp thả 10 con sâu đục quả đậu tương tuổi 2-3, song song là đối chứng âm (rải nước cất vô trùng vào hộp thức ăn), mỗi công thức lặp lại 3 lần. Sau 5 ngày thử nghiệm, tỷ lệ sâu chết đạt 96,67%. Như vậy, chủng KT10 có hoạt tính diệt sâu cao.

- Thử hoạt tính diệt sâu đục quả đậu tương của protein tái tổ hợp Cry1Ca9 biểu hiện trong vi khuẩn *E. coli*: Rải vào mỗi cốc chứa 20g thức ăn nhân tạo 1 ml protein tái tổ hợp thu được từ ví dụ 3 và 10 con sâu đục quả đậu tương tuổi 2-3, các công thức đối chứng như nước cất vô trùng, dịch nuôi chủng BL21, đệm phá mẫu EB được tiến hành đồng thời với thí nghiệm. Sau 5 ngày theo dõi ở nhiệt độ phòng thu được tỷ lệ sâu chết đạt 86,67%. Như vậy, sau khi thay đổi vật chủ thì protein độc tố Cry1Ca9 vẫn giữ hoạt tính cao đối với sâu đục quả đậu tương. Tương tự, protein tái tổ hợp sau khi được tinh sạch và định lượng ở ví dụ 3 được pha về các nồng độ thích hợp: 100 – 500 $\mu\text{g/ml}$ để xác định nồng độ gây chết 50% (LC_{50}) bằng cách: mỗi cốc 20g thức ăn + 1 ml protein tái tổ hợp tinh sạch + 10 con sâu, các công thức đối chứng như nước cất vô trùng, dịch nuôi chủng BL21, đệm phá mẫu EB cũng được tiến hành song song, mỗi công thức lặp lại 3 lần. 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% (LC_{50}) với sâu đục quả đậu tương của protein tái tổ hợp tinh sạch Cry1Ca9 là 297,3 $\mu\text{g/ml}$.

Hiệu quả đạt được của giải pháp hữu ích

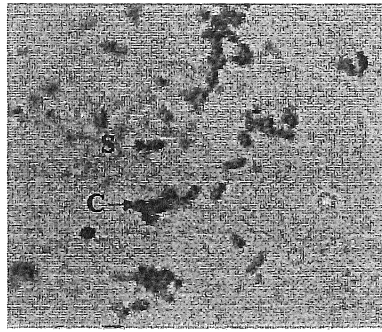
Chủng vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* KT10 thuần khiết về mặt sinh học là chủng đầu tiên được phân lập tại Việt Nam mang gen *cry1Ca9*, có khả năng sinh tổng hợp tinh thể độc tố Cry1Ca9 diệt sâu đục quả đậu tương (*Etiella zinkenella*) - là loại côn trùng khó phòng trừ và gây hại nghiêm trọng cho sản 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 *cry1Ca9* kháng sâu đục quả đậu tương (*Etiella zinkenella*). Chủng *Bacillus thuringiensis* KT10 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*).

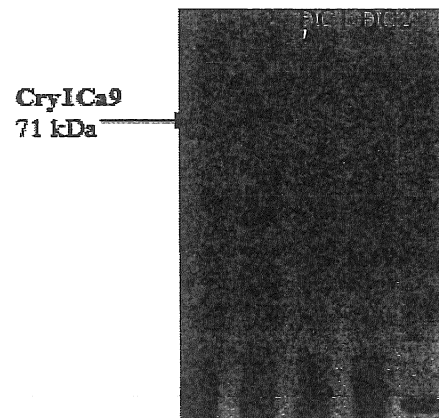
Chủng *Bacillus thuringiensis* KT10 thuần khiết về mặt sinh học có tiềm năng ứng dụng làm nguyên liệu trong sản xuất chế phẩm sinh học BT và trong công tác chọn tạo giống cây trồng biến đổi gen kháng côn trùng cánh vẩy (cụ thể là sâu đục quả đậu) tại Việt Nam, giảm thiểu thuốc trừ sâu hóa học, đảm bảo an toàn cho môi trường sinh thái cũng như sức khỏe con người.

YÊU CẦU BẢO HỘ

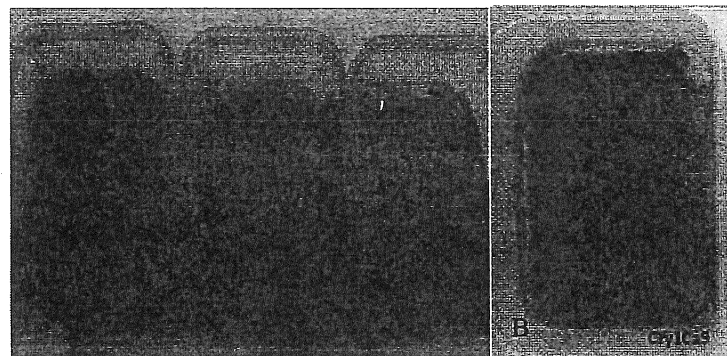
1. Chủng *Bacillus thuringiensis* KT10 thuần khiết về mặt sinh học được phân lập từ đất tại tỉnh Kon Tum - Việt Nam, mang gen mã hóa protein độc tố Cry1Ca9 diệt sâu đục quả đậu tương có khả năng tạo bào tử và sinh tổng hợp tinh thể độc hình không xác định diệt sâu đục quả đậu tương *Etiella zinkenella*, trong đó chủng này có trình tự nucleotit của đoạn gen *cry1Ca9* được thể hiện trong SEQ ID NO:1, có kích thước 2025 bp, mã hóa 675 axit amin tạo protein độc tố Cry1Ca9 được thể hiện trong SEQ ID NO:2, và đã được đăng ký trên Ngân hàng gen quốc tế với số hiệu MN725077.



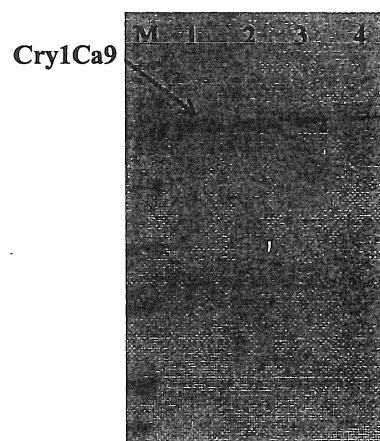
Hình 1



Hình 2



Hình 3



Hình 4

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Viện Công nghệ sinh học

<120> CHỦNG VI KHUẨN BACILLUS THURINGIENSIS KT10 THUẦN KHIẾT
VỀ MẶT SINH HỌC MANG GEN MÃ HÓA PROTEIN ĐỘC TỔ CRY1CA9 DIỆT
SÂU ĐỤC QUẢ ĐẬU TƯƠNG

<160> 2

<210> 1

<211> 2025

<212> ADN

<213> *Bacillus thuringiensis* KT10

<400> 1

```

1  gaaaataatc aaaatcaatg cataccttac aattgtttaa gtaatcctga agaagtactt
61  ttggatggag aacggatatc aactggtaat tcatcaattg atatttctct gtcacttggt
121 cagtttctgg tatctaactt tgtaccaggg ggaggatttt tagttggatt aatagatttt
181 gtatggggaa tagttggccc ttctcaatgg gatgcatttc tagtacaaat tgaacaatta
241 attaatgaaa gaatagctga atttgctagg aatgctgcta ttgctaattt agaaggatta
301 ggaaacaatt tcaatatata tgtggaagca tttaaagaat gggaagaaga tcctaataat
361 ccagcaacca ggaccagagt aattgatcgc tttcgtatac ttgatgggct acttgaaagg
421 gacattcctt cgtttcgaat ttctggattt gaagtacccc ttttatccgt ttatgctcaa
481 gcggccaatc tgcattctagc tatattaaga gattctgtaa tttttggaga aagatgggga
541 ttgacaacga taaatgtcaa tgaaaactat aatagactaa ttaggcatat tgatgaatat
601 gctgatcact gtgcaaatac gtataatcgg ggattaaata atttaccgaa atctacgtat
661 caagattgga taacatataa tcgattacgg agagacttaa cattgactgt attagatatac
721 gccgctttct ttccaaacta tgacaatagg agatatccaa ttcagccagt tgggtcaacta
781 acaaggggag tttatacggg cccattaatt aattttaatc cacagttaca gtctgtagct
841 caattaccta cttttaacgt tatggagagc agcgcaatta gaaatcctca tttatttgat
901 atattgaata atcttacaat ctttacggat tggtttagtg ttggacgcaa tttttatttg
961 ggaggacatc gagtaatatc tagccttata ggaggtggta acataacatc tcctatatat
1021 ggaagagagg cgaaccagga gcctccaaga tcctttactt ttaatggacc ggtatttagg
1081 actttatcaa atcctacttt acgattatta cagcaacctt ggccagcgcc accatttaat
1141 ttacgtggtg ttgaaggagt agaattttct acacctaca atagctttac gtatcgagga
1201 agaggtacgg ttgattcttt aactgaatta ccgcctgagg ataatagtgt gccacctcgc
1261 gaaggatata gtcattcggtt atgtcatgca acttttggtc aaagatctgg aacacctttt
1321 ttaacaactg gtgtagtatt ttcttggacg catcgtagtg caactcttac aaatacaatt
1381 gatccagaga gaattaatca aataccttta gtgaaaggat ttagagtttg ggggggcacc
1441 tctgtcatta caggaccagg atttacagga ggggatatcc ttcgaagaaa tacctttggg
1501 gattttgtat ctctacaagt caatattaat tcaccaatta cccaagata ccgtttaaga
1561 tttcgttacg cttccagtag ggatgcacga gttatagtat taacaggagc ggcatccaca
1621 ggagtgggag gccaaagttag tgtaaatatg cctcttcaga aaactatgga aataggggag
1681 aacttaacat ctagaacatt tagatatacc gattttagta atcctttttc atttagagct
1741 aatccagata taattgggat aagtgaacaa cctctatttg gtgcaggttc tattagtagc
1801 ggtgaacttt atatagataa aattgaaatt attctagcag atgcaacatt tgaagcagaa
1861 tctgatttag aaagagcaca aaaggcggtg aatgcctgtt ttacttcttc caatcaaatac
1921 ggggttaaaaa ccgatgtgac ggattatcat attgatcaag tatccaattt agtggattgt
1981 ttatcagatg aattttgtct ggatgaaaag cgagaattgt ccgag

```

<210> 2

<211> 675

<212> Protein

<213> *Bacillus thuringiensis* KT10

<400> 2

Glu Asn Asn Gln Asn Gln Cys Ile Pro Tyr Asn Cys Leu Ser Asn Pro Glu
 5 10 15

Glu Val Leu Leu Asp Gly Glu Arg Ile Ser Thr Gly Asn Ser Ser Ile Asp
 20 25 30

Ile Ser Leu Ser Leu Val Gln Phe Leu Val Ser Asn Phe Val Pro Gly Gly
 35 40 45 50

Gly Phe Leu Val Gly Leu Ile Asp Phe Val Trp Gly Ile Val Gly Pro Ser
 55 60 65

Gln Trp Asp Ala Phe Leu Val Gln Ile Glu Gln Leu Ile Asn Glu Arg Ile
 70 75 80 85

Ala Glu Phe Ala Arg Asn Ala Ala Ile Ala Asn Leu Glu Gly Leu Gly Asn
 90 95 100

Asn Phe Asn Ile Tyr Val Glu Ala Phe Lys Glu Trp Glu Glu Asp Pro Asn
 105 110 115

Asn Pro Ala Thr Arg Thr Arg Val Ile Asp Arg Phe Arg Ile Leu Asp Gly
 120 125 130 135

Leu Leu Glu Arg Asp Ile Pro Ser Phe Arg Ile Ser Gly Phe Glu Val Pro
 140 145 150

Leu Leu Ser Val Tyr Ala Gln Ala Ala Asn Leu His Leu Ala Ile Leu Arg
 155 160 165 170

Asp Ser Val Ile Phe Gly Glu Arg Trp Gly Leu Thr Thr Ile Asn Val Asn
 175 180 185

Glu Asn Tyr Asn Arg Leu Ile Arg His Ile Asp Glu Tyr Ala Asp His Cys
 190 195 200

Ala Asn Thr Tyr Asn Arg Gly Leu Asn Asn Leu Pro Lys Ser Thr Tyr Gln
 205 210 215 220

Asp Trp Ile Thr Tyr Asn Arg Leu Arg Arg Asp Leu Thr Leu Thr Val Leu
 225 230 235

Asp Ile Ala Ala Phe Phe Pro Asn Tyr Asp Asn Arg Arg Tyr Pro Ile Gln
 240 245 250 255

Pro Val Gly Gln Leu Thr Arg Glu Val Tyr Thr Asp Pro Leu Ile Asn Phe
 260 265 270
 Asn Pro Gln Leu Gln Ser Val Ala Gln Leu Pro Thr Phe Asn Val Met Glu
 275 280 285
 Ser Ser Ala Ile Arg Asn Pro His Leu Phe Asp Ile Leu Asn Asn Leu Thr
 290 295 300 305
 Ile Phe Thr Asp Trp Phe Ser Val Gly Arg Asn Phe Tyr Trp Gly Gly His
 310 315 320
 Arg Val Ile Ser Ser Leu Ile Gly Gly Gly Asn Ile Thr Ser Pro Ile Tyr
 325 330 335 340
 Gly Arg Glu Ala Asn Gln Glu Pro Pro Arg Ser Phe Thr Phe Asn Gly Pro
 345 350 355
 Val Phe Arg Thr Leu Ser Asn Pro Thr Leu Arg Leu Leu Gln Gln Pro Trp
 360 365 370
 Pro Ala Pro Pro Phe Asn Leu Arg Gly Val Glu Gly Val Glu Phe Ser Thr
 375 380 385 390
 Pro Thr Asn Ser Phe Thr Tyr Arg Gly Arg Gly Thr Val Asp Ser Leu Thr
 395 400 405
 Glu Leu Pro Pro Glu Asp Asn Ser Val Pro Pro Arg Glu Gly Tyr Ser His
 410 415 420 425
 Arg Leu Cys His Ala Thr Phe Val Gln Arg Ser Gly Thr Pro Phe Leu Thr
 430 435 440
 Thr Gly Val Val Phe Ser Trp Thr His Arg Ser Ala Thr Leu Thr Asn Thr
 445 450 455
 Ile Asp Pro Glu Arg Ile Asn Gln Ile Pro Leu Val Lys Gly Phe Arg Val
 460 465 470 475
 Trp Gly Gly Thr Ser Val Ile Thr Gly Pro Gly Phe Thr Gly Gly Asp Ile
 480 485 490
 Leu Arg Arg Asn Thr Phe Gly Asp Phe Val Ser Leu Gln Val Asn Ile Asn
 495 500 505 510
 Ser Pro Ile Thr Gln Arg Tyr Arg Leu Arg Phe Arg Tyr Ala Ser Ser Arg
 515 520 525
 Asp Ala Arg Val Ile Val Leu Thr Gly Ala Ala Ser Thr Gly Val Gly Gly
 530 535 540
 Gln Val Ser Val Asn Met Pro Leu Gln Lys Thr Met Glu Ile Gly Glu Asn
 545 550 555 560

Leu	Thr	Ser	Arg	Thr	Phe	Arg	Tyr	Thr	Asp	Phe	Ser	Asn	Pro	Phe	Ser	Phe			
			565					570					575						
Arg	Ala	Asn	Pro	Asp	Ile	Ile	Gly	Ile	Ser	Glu	Gln	Pro	Leu	Phe	Gly	Ala			
	580					585					590					595			
Gly	Ser	Ile	Ser	Ser	Gly	Glu	Leu	Tyr	Ile	Asp	Lys	Ile	Glu	Ile	Ile	Leu			
				600					605					610					
Ala	Asp	Ala	Thr	Phe	Glu	Ala	Glu	Ser	Asp	Leu	Glu	Arg	Ala	Gln	Lys	Ala			
	615						620					625							
Val	Asn	Ala	Leu	Phe	Thr	Ser	Ser	Asn	Gln	Ile	Gly	Leu	Lys	Thr	Asp	Val			
630					635					640					645				
Thr	Asp	Tyr	His	Ile	Asp	Gln	Val	Ser	Asn	Leu	Val	Asp	Cys	Leu	Ser	Asp			
			650					655					660						
Glu	Phe	Cys	Leu	Asp	Glu	Lys	Arg	Glu	Leu	Ser	Glu								
	665					670					675								