



(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)



2-0003131

(51) **C12N 1/00**
2020.01

(13) **Y**

(21) 2-2022-00023

(22) 14/01/2020

(67) 1-2020-00239

(45) 27/03/2023 420

(43) 25/03/2020 384ASC

(73) Viện Nghiên cứu hệ gen, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam (VN)
18 Hoàng Quốc Việt, Nghĩa Đô, Cầu Giấy, Hà Nội

(72) Lê Thị Thu Hiền (VN); Đinh Thúy Hằng (VN); Phạm Lê Bích Hằng (VN); Nguyễn Văn Đồng (VN).

(54) **CHŨNG VI KHUẨN BACILLUS THURINGIENSIS TH19 PHÂN LẬP TỪ ĐẤT RỪNG
THANH HÓA SINH CÓ KHẢ NĂNG SINH PROTEIN ĐỘC DIỆT SÂU ĐỤC QUẢ ĐẬU
TƯƠNG**

(57) Sáng chế đề cập đến chủng vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* TH19 với trình tự 16S rARN được đăng ký trên Ngân hàng gen quốc tế (GenBank) với mã số MN832932 có khả năng sinh protein tinh thể độc tố đặc hiệu diệt sâu đục quả *Etiella zinckenella* ở mức cao. Các gen sinh tổng hợp tinh thể độc ở chủng TH19 là *cry1Aa4* và *cry1Ia34* được xác định thông qua phân tích toàn bộ hệ gen và được đăng ký trình tự trên ngân hàng gen quốc tế (GenBank) với mã số MN729490 và MN729491. Protein tái tổ hợp Cry1Aa4 và Cry1Ia34 được biểu hiện từ vectơ pET-32a-cry1Aa4 và pET-32a-cry1Ia34 cũng cho hoạt tính diệt sâu đục quả cao, trong đó dạng kết hợp theo tỷ lệ 1:1 cho hiệu quả cao nhất với các giá trị LC_{50} tương ứng là 59,80ng/cm², 89,99ng/cm² và 38,33ng/cm². Điều này cho thấy chủng *Bacillus thuringiensis* TH19 có tiềm năng ứng dụng trong việc chế tạo sản phẩm sinh học phòng chống sâu đục quả đậu tương, có tính đặc trị cao và thân thiện với môi trường. Bên cạnh đó, các gen sinh tổng hợp tinh thể độc là nguồn gen tốt phục vụ công tác chuyển gen tạo giống đậu tương chống chịu sâu đục quả ở Việt Nam, giúp giảm thiểu việc sử dụng thuốc bảo vệ thực vật trong nông nghiệp.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế thuộc lĩnh vực công nghệ sinh học vi sinh vật ứng dụng trong nông nghiệp, cụ thể là sáng chế đề cập đến chủng vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* TH19 thuần khiết về mặt sinh học, sinh protein độc dạng tinh thể hình thoi kháng sâu đục quả, làm nguồn gen kháng sâu phục vụ công tác chuyển gen vào cây trồng, tạo giống chống chịu sâu bệnh, giảm thiểu việc sử dụng thuốc bảo vệ thực vật trong nông nghiệp.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Trong canh tác nông nghiệp, sâu bệnh thường được kiểm soát bằng các loại thuốc trừ sâu hóa học hoặc sinh học. Thuốc trừ sâu hóa học có hoạt lực mạnh, phổ kháng rộng, tiêu diệt cả các loại côn trùng có ích, đồng thời có tính độc cao đối với con người và động vật. Trong khi đó, thuốc trừ sâu sinh học tuy có hoạt lực thấp hơn nhưng thường tập trung vào đối tượng sâu đích và không độc hại đối với các loài sinh vật khác.

Thuốc trừ sâu sinh học được sử dụng rộng rãi nhất là vi khuẩn *B. thuringiensis*. Đây là các trực khuẩn Gram dương có mặt rộng rãi trong tự nhiên, đặc biệt trong đất. Trong quá trình hình thành bào tử, *B. thuringiensis* sản sinh ra các tinh thể độc tiêu diệt các loại ấu trùng sâu bệnh. Các tinh thể độc ở các chủng *B. thuringiensis* khác nhau về hình dạng, thành phần và số lượng trong tế bào. Thành phần của các tinh thể độc này là δ -endotoxin có kích thước trong khoảng 27-140kDa, được mã hóa bởi các gen *cry*, chia thành 6 nhóm (Bảng 1) dựa trên mức độ tương đồng về trình tự axit amin và đối tượng sâu đích (Hofte, Whiteley, 1989).

Bảng 1. Các nhóm độc tố của *B. thuringiensis* và đối tượng sâu đích

TT	Nhóm độc tố	Đối tượng sâu đích	Tài liệu tham khảo
1	CryI	Bộ Cánh vảy (Lepidoptera)	Hofte, Whiteley (1989)
2	CryII	Bộ Cánh vảy và Hai cánh (Lepidoptera và Diptera)	
3	CryIII	Bộ Cánh cứng (Coleoptera)	
4	CryIV	Bộ Hai cánh (Diptera)	
5	CryV	Bộ Cánh cứng và Cánh vảy (Coleoptera và Lepidoptera)	Tailor <i>et al.</i> (1992)
6	CryV, CryVI	Tuyến trùng (Nematode)	Feitelson <i>et al.</i> (1992)

Hiện nay, chế phẩm sinh học *B. thuringiensis* diệt côn trùng chiếm tới 90% thị trường thuốc trừ sâu sinh học. Protein tinh thể độc của *B. thuringiensis* thường tồn tại ở dạng tiền độc tố và có cấu trúc đặc thù, bao gồm các vùng bảo thủ nằm xen kẽ các vùng biến đổi. Cơ chế hoạt động của protein tinh thể độc tố của *B. thuringiensis* liên quan tới sự hòa tan của tinh thể trong ruột giữa của sâu dưới tác động của proteaza có tính kiềm ($\text{pH} > 10$) trong ruột sâu. Kết quả là tinh thể độc bị hòa tan và hình thành nhân độc tố có khối lượng phân tử 60-65kDa bám vào các phân tử cảm thụ đặc biệt nằm trên màng vi thể của tế bào thành ruột sâu. Sự gắn kết này ở ruột sâu làm thay đổi gradien điện hóa tạo thành các lỗ rò (kênh ion), phá hủy cân bằng áp suất thẩm thấu của màng tế bào, làm cho tế bào phồng lên, bị phân hủy dẫn đến sâu chết. Trong khi đó, dạ dày của người và động vật máu nóng có độ $\text{pH} \leq 2$, protein tinh thể không bị hòa tan nên được thải ra ngoài. Vì vậy, *B. thuringiensis* được xem là một tác nhân diệt côn trùng có tính đặc hiệu cao và rất an toàn với người và động vật bậc cao (Knowles *et al.*, 1993).

Trong số sâu hại đậu tương ở nước ta, sâu đục quả đậu tương *Etiella zinckenella* Treitschke (Lepidoptera: Pyralidae) là đối tượng gây hại nghiêm trọng và khó phòng trừ. Sâu non gặm vỏ quả, đục vào trong ăn hạt, làm cho quả bị khuyết từng phần hoặc đục rỗng bên trong hạt. Sâu phát triển qua 4 pha: trứng, sâu non, nhộng và trưởng thành. Thời gian phát triển tùy vào điều kiện thời tiết: trứng dao động 4-7 ngày; sâu non 11-21 ngày; nhộng 15-20 ngày, tiền đẻ trứng 2-3 ngày. Vòng đời của sâu đục quả đậu tương dao động từ 32-51 ngày. Về tập tính sống, trưởng thành hoạt động ban đêm, ban ngày ẩn trong tán cây, tránh ánh sáng.

Sâu đục quả phát sinh quanh năm, ở các tỉnh phía Bắc có tới 9 lứa/ năm, gây hại nặng trên đậu tương xuân và xuân hè (tháng 4-6), đậu tương hè (tháng 7-8), hè thu (9-10). Thiệt hại do sâu đục quả tới năng suất lên đến 70-80% nếu không được phòng trừ hợp lý. Hiện nay phòng trừ sâu đục quả chủ yếu là nhờ canh tác luân canh cây trồng như lúa, ngô, đặc biệt là lúa nước, hoặc ngâm nước 2-3 ngày để tiêu diệt nhộng trong đất. Các phương pháp phòng trừ bằng biện pháp hóa học cho thấy kém hiệu quả do giai đoạn sâu non sống trong quả đậu và được bảo vệ khỏi tiếp xúc với thuốc trừ sâu. Các nghiên cứu về *B. Thuringiensis* trong phòng trừ sâu *E. zinckenella* đục quả cây đậu tương còn rất ít, đặc biệt các nghiên cứu nhằm tiến tới ứng dụng trong thực tế chưa được quan tâm.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề xuất chủng vi khuẩn *B. thuringiensis* phân lập từ đất rừng Thanh Hóa có khả năng sinh độc tố δ -endotoxin diệt sâu đục quả đậu tương *E. zinckenella* đạt hiệu quả cao. Cụ thể là sáng chế này đề xuất chủng *B. thuringiensis* TH19 với trình tự 16S rARN của chủng TH19 được đăng ký trên Ngân hàng gen quốc tế (GenBank) với

mã số MN832932 có khả năng diệt sâu đục quả đậu tương ở tuổi 2 với tỷ lệ diệt sâu > 95%. Các gen sinh tổng hợp độc tố *cryIAa4* và *cryIIa34* được xác định ở chủng TH19 và được đăng ký trình tự tại Ngân hàng gen Quốc tế (GenBank) với mã số MN729490 và MN729491, là nguồn gen quý phục vụ công tác chuyển gen tạo giống đậu tương kháng sâu đục quả hoặc tạo sản phẩm sinh học phòng chống sâu đục quả đậu tương ở Việt Nam.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Hình 1 là hình ảnh thể hiện hình thái khuẩn lạc (A), tinh thể độc (B) và tế bào (C) của chủng *B. thuringiensis* TH19 dưới kính hiển vi phản pha.

Hình 2 là đồ thị thể hiện sự sinh trưởng của chủng TH19 trên môi trường thông thường (LB) và môi trường đặc hiệu T3 để tạo bào tử và tinh thể độc.

Hình 3 là hình ảnh thể hiện mức độ tạo tinh thể độc của chủng TH19 theo thời gian khi được nuôi trong môi trường T3 dịch thể.

Hình 4 là đồ thị thể hiện khả năng diệt sâu đục quả của chủng *B. thuringiensis* TH19 khi được bổ sung vào môi trường nuôi sâu ở các nồng độ khác nhau và hình ảnh thể hiện sâu đục quả đậu tương chết do ăn phải chủng *B. thuringiensis* TH19 có chứa protein độc tố.

Hình 5 là cây phân loại dựa trên trình tự gần đủ của 16S rARN của chủng *B. thuringiensis* TH19 so với các loài gần gũi trên ngân hàng dữ liệu Ngân hàng gen quốc tế.

Hình 6 là hình ảnh thể hiện bản đồ nhiễm sắc thể của chủng TH19 sau khi lắp ráp *de novo*.

Hình 7 là ảnh điện di tạo dòng toàn bộ trình tự gen *cryIAa4* và *cryIIa34* vào vectơ biểu hiện pET-32a(+). (A) Sản phẩm khuếch đại 2 gen *cryIAa4* và *cryIIa34* của chủng *B. thuringiensis* TH19. (B) Vectơ tái tổ hợp chứa các gen *cryI*, trong đó giếng 1 là vectơ pET-32a(+) trống; giếng 2, 3 là vectơ tái tổ hợp pET-32a-cryIAa và pET-32a-cryIIa; giếng 4 là vectơ pET-32a(+) được xử lý với enzym giới hạn *Bam*HI; giếng 5 là vectơ pET-32a-cryIAa được xử lý với cặp enzym *Eco*RI and *Xho*I; giếng 6 là vectơ pET-32a-cryIIa được xử lý với cặp enzym *Bam*HI and *Not*I. M là thang HyperLadder™ 1kb (Bioline).

Hình 8 là ảnh điện di biểu hiện và tinh sạch các protein tái tổ hợp CryIAa4 và CryIIa34. (A) Phân tích các protein trên gel SDS-PAGE, trong đó giếng 1 là thang protein GangNam-STAIN™, giếng 2 là dịch ly giải tế bào *E. coli* BL21 (DE3) chứa vectơ pET-32a(+) trống, giếng 3 là dịch ly giải tế bào *E. coli* BL21 (DE3) chứa vectơ

pET-32a-cry1Aa, giếng 4 là dịch ly giải tế bào *E. coli* BL21 (DE3) chứa vector pET-32a-cry1Ia, giếng 5 và 6 là protein Cry1Aa4 and Cry1Ia34 sau khi tinh sạch. (B) Xác nhận các protein tái tổ hợp Cry1Aa4 and Cry1Ia34 bằng phân tích Western blot.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế đề cập tới chủng vi khuẩn *B. thuringiensis* TH19 với trình tự 16S rARN của chủng TH19 được đăng ký trên Ngân hàng gen quốc tế (GenBank) với mã số MN832932 sinh độc tố diệt sâu đục quả đậu tương *E. zinckenella* có khả năng tiêu diệt sâu đục quả ở tuổi sinh trưởng 2 với tỷ lệ sâu chết đạt >95%. Các gen tổng hợp độc tố δ -endotoxin *cry1Aa4* và *cry1Ia34* ở chủng TH19 được xác định thông qua giải trình tự toàn bộ hệ gen và đã được đăng ký trình tự tại GenBank với số hiệu lần lượt là MN729490 và MN729491.

Chủng vi khuẩn *B. thuringiensis* TH19 được phân lập từ mẫu đất rừng trồng cây tái sinh thu thập tại huyện Vĩnh Lộc, tỉnh Thanh Hóa vào tháng 1 năm 2015. Mẫu đất được lấy từ lớp đất sâu dưới 5 cm tại vị trí có bóng râm và có lá rụng che phủ. Trước khi phân lập, mẫu đất được hòa trong môi trường dịch thể LB (10 g/L trypton, 5 g/L cao nấm men và 5 g/L NaCl) có bổ sung natri axetat 2M tạo thành dịch huyền phù và được xử lý nhiệt ở 80°C trong 10 phút để loại các loài vi khuẩn không sinh bào tử. Sau đó dịch huyền phù được pha loãng trong đệm PBS 1× vô trùng rồi cấy trang trên đĩa môi trường thạch LB (10 g/L trypton, 5 g/L cao nấm men, 5 g/L NaCl và 15 g/L agar), ủ ở 30°C trong 48 giờ. Khuẩn lạc có hình dạng của vi khuẩn *Bacillus* spp. (màu trắng đục, dẹt, bề mặt nhám, mép răng cưa) được lựa chọn tách riêng và cấy ria trên môi trường thạch LB nhiều lần cho tới khi thu nhận được chủng thuần khiết.

Chủng vi khuẩn thuần khiết đã phân lập, sau đó được xác định hình thái tinh thể độc bằng cách đưa tế bào từ một khuẩn lạc đơn lên lam kính, cố định bằng cách để khô rồi nhuộm với thuốc nhuộm fuchsin và quan sát dưới kính hiển vi phản pha. Tinh thể độc và tế bào bắt màu đỏ (tinh thể màu đậm hơn), bào tử không bắt màu.

Chủng *B. thuringiensis* TH19 có hoạt tính kháng sâu đục quả đậu tương ở mức cao thể hiện trong thí nghiệm sàng lọc sơ bộ (kháng sâu ở tuổi 2 với tỷ lệ > 95%) được nghiên cứu chi tiết về các đặc điểm hình thái (khuẩn lạc, tế bào, tinh thể độc) (Hình 1). Khả năng diệt sâu đục quả đậu tương được khảo sát và đánh giá chi tiết (Hình 4).

Tách chiết ADN tổng số của chủng TH19 phục vụ cho việc giải trình tự toàn bộ hệ gen và tìm kiếm các gen tổng hợp độc tố diệt sâu. Gen mã hóa cho 16S rARN được khuếch đại với cặp mồi đặc hiệu, giải trình tự và đăng ký trên GenBank với mã số MN832932. Dữ liệu so sánh độ tương đồng của trình tự 16S rARN của chủng TH19 với các trình tự liên quan trên GenBank/DDBJ được sử dụng để dựng cây phân loại bằng

phần mềm ClustalX 1.8 và thuật toán Neighbour-Joining (Hình 5) (Saitou, Neil, 1987). Trình tự toàn bộ hệ gen của chủng TH19 được xác định bằng phương pháp giải trình tự gen thế hệ mới sử dụng hệ thống Illumina HiSeq 2500 (Hình 6). Các gen mã hóa cho protein kháng sâu được tìm kiếm từ dữ liệu trình tự hệ gen bằng công cụ BLAST trên cơ sở dữ liệu tổng hợp bởi Crickmore và cộng sự (http://www.lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt/). Các gen tổng hợp độc tố δ -endotoxin được tìm thấy là *cry1Aa4* và *cry1Ia34* và sau đó được đăng ký trên GenBank với mã số MN729490 và MN729491.

Các gen mã hóa cho protein kháng sâu được tạo dòng và biểu hiện protein độc tố tái tổ hợp Cry1Aa4 và Cry1Ia34 (Hình 7, 8). Khả năng diệt sâu đục quả đậu tương của hai protein độc tố này được khảo sát và chế phẩm dạng kết hợp Cry1Aa4 và Cry1Ia34 cho hiệu quả diệt sâu cao nhất.

Chủng vi khuẩn thuần khiết *B. thuringiensis* TH19 đã phân lập được lưu giữ tại Trung tâm Nguồn gen vi sinh vật quốc gia (VTCC), Viện Vi sinh vật và công nghệ sinh học, Đại học quốc gia Hà Nội. Mã VTCC của chủng: VTCC 60022.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1: Phân lập chủng *B. thuringiensis* TH19 từ môi trường đất rừng trồng

A. Thu và xử lý mẫu

Mẫu đất rừng trồng tái sinh tại huyện Vĩnh Lộc, tỉnh Thanh Hóa ở vị trí có lá cây rụng che phủ được lấy từ độ sâu 5 cm trở xuống và giữ trong các ống falcon vô trùng rồi đưa về phòng thí nghiệm để phân lập *B. thuringiensis*.

B. Phân lập vi khuẩn *B. thuringiensis*

Các bước tiến hành như sau: 0,25 g đất được đưa vào 10 mL môi trường LB có chứa 1,25 mL natri axetat 2M, lắc mạnh trên máy vortex tạo hỗn dịch đồng nhất và nuôi lắc qua đêm ở 30°C, 180 vòng/phút. Sau đó, hỗn dịch được ủ 10 phút ở 80°C trong bể ổn nhiệt để loại các tế bào sinh dưỡng của các loài vi khuẩn khác và bào tử đã nảy mầm rồi để nguội ở nhiệt độ phòng.

Các mẫu sau khi xử lý nhiệt được pha loãng đến nồng độ 10^{-4} . Lượng thể tích 100 μ L dịch pha loãng ở các nồng độ 10^{-3} và 10^{-4} được cấy trang lên đĩa petri có chứa môi trường thạch LB, ủ ở 30°C trong 48 giờ. Các khuẩn lạc có hình thái trắng đục, phẳng, bề mặt nhám, mép răng cưa (Hình 1A) được cấy chuyển sang các đĩa LB mới thêm 1-2 lần để đảm bảo thu được chủng thuần khiết đồng nhất về hình dạng tế bào khi được quan sát dưới kính hiển vi.

Bảng 2. Môi trường phân lập và nuôi cấy tạo tinh thể độc của vi khuẩn *B. thuringiensis* (Travers *et al.*, 1987)

Môi trường thạch LB		Môi trường T3	
Thành phần	Hàm lượng (g/L)	Thành phần	Hàm lượng (g/L)
Trypton	10	Trypton	3
Cao nấm men	5	Cao nấm men	1,5
NaCl	5	Tryptone	2
Agar	15	MnCl ₂	0,005
		Na-phosphat (pH 6,8)	0,05 M

Ví dụ 2: Nghiên cứu đặc điểm hình thái của chủng TH19

Thuốc nhuộm fuchsin nồng độ gốc được chuẩn bị bằng cách hòa tan 0,3 g fuchsin trong 10 mL etanol 95% và 5 mL phenol tinh thể đã tan chảy hòa trong 95 mL nước cất. Sau đó, 2 dung dịch trên được trộn lẫn và bảo quản nơi thoáng mát, tránh sáng. Thuốc nhuộm fuchsin này được pha loãng 10 lần khi sử dụng để nhuộm mẫu.

Khuẩn lạc chủng *B. thuringiensis* TH19 được cấy trên đĩa thạch LB sau 3-5 ngày, đưa tế bào lên lam kính và cố định, sau đó nhuộm bằng thuốc nhuộm fuchsin đã chuẩn bị như trên trong 90 giây, rửa sạch bằng nước cất, để khô. Tế bào và tinh thể độc bắt màu đỏ, bào tử không bắt màu (Hình 1B). Chủng TH19 có bào tử hình trứng, tinh thể độc hình thoi, kích thước dao động phụ thuộc vào điều kiện nuôi cấy và kỳ sinh trưởng.

Quan sát dưới kính hiển vi phản pha (×) cho thấy, tế bào chủng TH19 có hình que, tròn hai đầu, đơn hoặc xếp chuỗi, kích thước rộng (1-1,5 µm) × dài (3- 3,5 µm), nhuộm Gram dương (Hình 1C).

Ví dụ 3: Nghiên cứu điều kiện nuôi và thu tinh thể độc tố đối với chủng TH19

Vi khuẩn được nuôi trong môi trường dịch thể LB và môi trường T3 (Bảng 2) tại 30°C, lắc 120 vòng/phút. Dịch nuôi được thu 1 lần vào mỗi 24 giờ để xác định mật độ quang tại bước sóng 600 nm, qua đó xây dựng đường cong sinh trưởng của chủng trong mỗi loại môi trường. Song song với việc xác định mật độ tế bào trong dịch nuôi cấy, số lượng tinh thể độc do chủng *B. thuringiensis* tạo ra được xác định thông qua làm tiêu bản và nhuộm fuchsin (xem Ví dụ 2).

Kết quả thu được cho thấy, chủng TH19 sinh trưởng tốt hơn trong môi trường LB so với môi trường T3 (Hình 2). Tuy nhiên với mục đích nuôi vi khuẩn và thu nhận tinh thể độc tố thì môi trường T3 phù hợp hơn. Khi nuôi trên môi trường T3, lượng tinh thể độc tố do chủng TH19 sinh ra tăng theo thời gian nuôi, đạt mức cao nhất sau 5 ngày (Hình 3). Như vậy, quy trình nuôi sử dụng môi trường T3 trong thời gian 5 ngày tại

30°C, lắc 120 vòng/phút được xác định để nuôi chủng TH19 thu tinh thể độc cho các thí nghiệm đánh giá khả năng diệt sâu của chủng này.

Ví dụ 4: Nghiên cứu khả năng diệt sâu đục quả của chủng TH19

A. Chuẩn bị cốc thử sâu đựng thức ăn nhân tạo:

Chuẩn bị cốc nuôi sâu chứa thức ăn nhân tạo và dịch nuôi chủng TH19 như sau:

- Chủng *B. thuringiensis* TH19 được nuôi lắc trên môi trường T3 (Bảng 2) để kích thích tạo bào tử và tinh thể trong thời gian 5 ngày ở 30°C. Dịch nuôi được ly tâm ở 5000 vòng/phút trong 10 phút, thu sinh khối rồi hòa trong cùng thể tích nước cất (hoặc nước muối sinh lý) vô trùng.
- Hòa 90 g hỗn hợp bột đậu tương và thạch agar với tỷ lệ 1:5 trong 2500 mL nước cất rồi đun sôi cho tan thạch. Hỗn hợp thức ăn nhân tạo này được làm nguội đến 60-65°C rồi chia 15 mL vào mỗi cốc nhựa thí nghiệm tạo lớp thức ăn trong cốc dày khoảng 1 cm (Dulmage *et al.*, 1971).
- Dịch tế bào *B. thuringiensis* đã chuẩn bị ở trên được bổ sung vào thức ăn nuôi sâu theo 3 tỷ lệ khác nhau là 3, 10 và 20% (v/v). Sử dụng que cấy để khuấy đều hỗn hợp và làm đông ở nhiệt độ phòng. Sau khi thức ăn đông và ổn định, dùng que tạo các vạch đều trên mặt thức ăn để làm chỗ trú cho sâu. Đối chứng âm là cốc thức ăn không bổ sung tế bào *B. thuringiensis*.
- Dùng kim châm đều trên nắp cốc để tạo điều kiện thoáng khí, đậy cốc và để thức ăn khô mặt qua đêm ở điều kiện nhiệt độ thường (25-28°C).

B. Đánh giá khả năng diệt sâu đục quả đậu tương *E. zinckenella*

- Sâu đục quả được nuôi trên môi trường tự nhiên là quả đậu tương, ở độ tuổi 2 (dài khoảng 5 mm).
- Nhẹ nhàng tách quả đậu tương và dùng chổi lông loại nhỏ, mềm, mảnh để gạt sâu vào cốc thí nghiệm có thức ăn đã chuẩn bị trước đó theo mật độ 10 con/cốc (3 cốc cho mỗi nồng độ dịch tế bào *B. thuringiensis* thử nghiệm).
- Đặt cốc thí nghiệm trong các hộp carton để tránh ánh sáng, nuôi ở tủ ẩm có nhiệt độ ổn định 28°C.
- Theo dõi số lượng sâu chết ở các cốc thí nghiệm và đối chứng, ghi nhận tỷ lệ sâu chết sau mỗi 24 giờ. Mỗi thí nghiệm được theo dõi trong 5 ngày.
- Tỷ lệ sâu chết được tính theo công thức Abbott:

$$A = [(C - T)/C] \times 100$$

Trong đó: A: Tỷ lệ sâu chết (%);

C: Số sâu sống ở mẫu đối chứng;

T: Số sâu sống ở mẫu thí nghiệm.

Kết quả đánh giá khả năng diệt sâu đục quả đậu tương ở chủng *B. thuringiensis* TH19 cho thấy trong 24 giờ đầu tỷ lệ sâu chết còn thấp. Tuy nhiên, sâu đã có biểu hiện bỏ ăn, lơ dờ. Ở mốc thời gian 48 giờ, hoạt lực diệt sâu của chủng vi khuẩn *B. thuringiensis* TH19 tăng lên rõ rệt, đạt 90-95% ở hai lô thí nghiệm có bổ sung độc tố theo tỷ lệ 10% và 20%. Sau 72 giờ theo dõi, tỷ lệ sâu chết đạt 95-100% (Hình 4A). Sâu chết có màu đen, toàn thân trương (Hình 4B). Một số con có xuất hiện màu đen ở bụng trước sau đó lan ra toàn thân, hiện tượng đặc trưng của tác dụng do độc tố *B. thuringiensis* làm thủng ruột, khiến sâu bỏ ăn và chết (Höfte, Whiteley, 1989).

Ví dụ 5: Xác định vị trí phân loại của chủng TH19 dựa trên trình tự 16S rARN

A. Tách ADN hệ gen của chủng TH19

Sử dụng bộ E.Z.N.A Bacterial DNA Kit của Hãng Omega (Hoa Kỳ) để tách ADN hệ gen của chủng TH19. Các bước tách chiết được thực hiện theo đúng hướng dẫn của nhà sản xuất để thu được ADN hệ gen đảm bảo các chỉ tiêu:

- Độ tinh sạch: $A_{260}/A_{280} > 1,7$
- Nồng độ: $> 100 \text{ ng}/\mu\text{L}$
- Lượng mẫu: $> 20 \mu\text{L}$
- Tổng lượng ADN: $> 2,0 \mu\text{g}$.

B. Khuếch đại đoạn 16S rARN trong phản ứng PCR

ADN hệ gen sau đó được sử dụng làm khuôn để khuếch đại đoạn 16S rARN dùng cho việc xác định vị trí phân loại. Các cặp mồi đặc hiệu và chu trình nhiệt tương ứng được trình bày trong Bảng 3.

Bảng 3. Các cặp mồi và chu trình nhiệt sử dụng để khuếch đại các đoạn gen cho mục đích xác định vị trí phân loại của chủng TH19

Tên gen	Tên mồi	Trình tự mồi/ chu trình nhiệt	Sản phẩm PCR	Tài liệu tham khảo
16S rARN	27F	5'–AGAGTTTGATCCTGG CTCAG–3'	1500 bp	Weisburg <i>et al.</i> , 1991
	1492R	5'–GGTTACCTTGTTACGACTT–3'		
Chu trình nhiệt		94°C 3 phút, (94°C 30 giây, 55°C 45 giây, 72°C 1,5 phút) × 35 chu kỳ, 72°C 7 phút, kết thúc 4°C.		

Sản phẩm PCR của 16S rARN (1500 bp) sau đó được tinh sạch bằng PCR Purification Kit (Bioneer, Hàn Quốc) rồi tiến hành phản ứng đọc trình tự gen với ABI

Prism Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit và đọc trình tự trên máy xác định trình tự tự động ABI 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Hoa Kỳ).

Trình tự gen sau đó được phân tích, so sánh với trình tự 16S rARN của các loài có liên quan hiện đã công bố trên Ngân hàng dữ liệu GenBank/DDJB sử dụng công cụ BLASTN. Cây phân loại được dựng theo phương pháp Neighbour-Joining (Hình 5) (Saitou, Nei, 1987), trong đó định dạng cây được tiến hành dựa trên 1000 phép so sánh đa chiều (Felsenstein, 1985).

So sánh trình tự gần đủ của gen 16S rARN (1439 bp) cho thấy loài gần gũi nhất với TH19 là *Bacillus thuringiensis* với độ tương đồng là 100%. Dựa trên các phân tích về trình tự gen, chủng TH19 được định danh khoa học là *Bacillus thuringiensis* TH19. Trình tự 16S rARN của chủng TH19 được đăng ký trên GenBank với mã số MN832932.

Ví dụ 6: Giải trình tự hệ gen của chủng TH19 và xác định các gen sinh tổng hợp độc tố kháng sâu

A. Chuẩn bị thư viện và giải trình tự toàn bộ hệ gen

ADN tổng số của mẫu TH19 được tiến hành phân mảnh để thu được thư viện gồm các đoạn có kích thước khoảng 300 bp đến 400 bp. Nồng độ và kích thước của các phân đoạn ADN được đo bằng Bioanalyzer DNA High Sensitivity Chip (Agilent, Hoa Kỳ). Sau đó, TruSeq DNA PCR-Free Kit được sử dụng để lập thư viện giải trình tự từ các phân đoạn ADN đã chọn lọc kích thước. Cuối cùng, thư viện được sử dụng để tiến hành giải trình tự toàn bộ hệ gen bằng hệ thống giải trình tự gen thế hệ mới Illumina HiSeq 2500 với độ bao phủ là 80×.

B. Lắp ráp, chú giải hệ gen và tìm kiếm các gen mã hóa protein kháng sâu

Dữ liệu từ quá trình giải trình tự gen thế hệ mới được lắp ráp *de novo* bằng công cụ SOAP *de novo* (Li *et al.*, 2010) kết hợp với BWA (Li, 2013) và chú giải theo pipeline Prokka (Seemann, 2014) để xác định số lượng và vị trí các trình tự mã hóa protein, các gen mã hóa tARN và rARN. Việc chú giải được thực hiện dựa trên các cơ sở dữ liệu eggNOG (Huerta-Cepas *et al.*, 2015), GO (Ashburner *et al.*, 2000), InterPro (Hunter *et al.*, 2008) và PFAM (Finn *et al.*, 2013). Bản đồ hệ gen của chủng TH19 được vẽ bằng phần mềm CGview (Grant, Stothard, 2008).

Sau khi chú giải toàn bộ hệ gen, các gen mã hóa cho protein kháng sâu được so sánh bằng công cụ BLAST trên cơ sở dữ liệu tổng hợp bởi Crickmore và cộng sự (http://www.lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt/).

Kết quả cho thấy nồng độ của mẫu sau khi phân mảnh đạt 9,26 ng/μL và kích thước nằm trong khoảng 300 bp đến 400 bp. Thư viện thu được từ mẫu ADN đầu vào có kích thước trung bình là 470 bp. Kết quả giải trình tự toàn bộ hệ gen thu được 9.290.272 đoạn đọc, tạo thành 199 contig với độ dài trung bình của contig là 29.006 bp. Sau khi lắp ráp *de novo*, hệ gen của chủng TH19 có kích thước 5.827.350 bp và tỷ lệ GC trung bình đạt 34,91%. Quá trình lắp ráp sau cùng cho kích thước nhiễm sắc thể có chiều dài 5.627.121 bp, phần còn lại là các plasmid (Hình 6).

Kết quả chú giải toàn bộ hệ gen cho thấy hệ gen có 6.051 gen, trong đó 5.974 gen có chức năng mã hóa protein và 77 gen mã hóa ARN (bao gồm 73 gen tARN và 4 gen rARN). Toàn bộ dữ liệu thô của hệ gen chủng TH19 được đăng ký tại Ngân hàng gen Quốc tế GenBank với mã số SZVT00000000. Phiên bản hệ gen được lắp ráp và chú giải lần thứ nhất có ký hiệu SZVT01000000.

Sau khi so sánh bằng công cụ BLAST trên cơ sở dữ liệu chuyên biệt, hai gen sinh tổng hợp độc tố δ-endotoxin hiện diện trong hệ gen của chủng TH19 có độ tương đồng 100% với hai gen *cry1Aa4* và *cry1Ia34*, với kích thước lần lượt là 1206 bp và 2160 bp. Hai gen này được đăng ký tại GenBank với mã số MN729490 và MN729491.

Ví dụ 7: Biểu hiện protein tái tổ hợp Cry1Aa4 và Cry1Ia34 từ chủng TH19

A. Khuếch đại và tạo dòng toàn bộ hai gen *cry1Aa4* và *cry1Ia34* mã hóa protein độc tố vào vector pET-32a(+)

ADN hệ gen sau đó được sử dụng làm khuôn để khuếch đại toàn bộ hai gen *cry1Aa4* và *cry1Ia34* mã hóa protein độc tố. Các cặp mồi đặc hiệu và chu trình nhiệt tương ứng được trình bày trong Bảng 4.

Bảng 4. Các cặp mồi và chu trình nhiệt sử dụng để khuếch đại các đoạn gen tổng hợp độc tố hiện diện trong chủng *B. thuringiensis* TH19

Tên gen	Tên mồi	Trình tự mồi/ chu trình nhiệt	Sản phẩm PCR
<i>cry1Aa4</i>	Cry1Aa-F	5'-CAGATAGA <u>AATTC</u> GTGCCAGGTACGGGTTCC-3'	1220 bp
	Cry1Aa-R	5'-CGGATC <u>CTCGAGT</u> TTCCTCCATAAGGAG-3'	
<i>cry1Ia34</i>	Cry1Ia-F	5'-GTGCAGG <u>GATCC</u> ATGAACTAAAGAATC-3'	2180 bp
	Cry1Ia-R	5'-ATATTGCGG <u>CCGC</u> CTACATGTTACGCTC-3'	
Chu trình nhiệt		95°C 3 phút, (95°C 15 giây, 56°C 30 giây, 72°C 2 phút) × 35 chu kỳ, 72°C 10 phút, kết thúc 4°C.	

Sản phẩm PCR của hai gen *cry1Aa4* và *cry1Ia34* có kích thước đúng như mong muốn, được tinh sạch bằng E.Z.N.A Cycle Pure Kit (Omega, Hoa Kỳ) (Hình 7A), sau đó được xử lý với cặp enzym giới hạn tương ứng cho từng gen là *EcoRI-XhoI*, và *BamHI-NotI* (Fermentas, Hoa Kỳ) ở 37°C trong 2 giờ. Sản phẩm cắt được nối với vector biểu hiện pET-32a(+) (Novagen, Đức) nhờ enzym T4 ligase (Themor Fisher Scientific, Hoa Kỳ), tạo thành vector tái tổ hợp pET-32a-cry1Aa4 và pET-32a-cry1Ia34 có kích thước lần lượt là 7,2 kb và 8,1 kb (Hình 7B).

B. Biểu hiện protein tái tổ hợp Cry1Aa4 và Cry1Ia34

Hai vector tái tổ hợp pET-32a-cry1Aa4 và pET-32a-cry1Ia34 được biến nạp vào tế bào khả biến *Escherichia coli* BL21 (DE3) bằng phương pháp xung điện với các thông số 2.500 V/cm², 200 Ω , 25 μ F. Chủng *E. coli* BL21 (DE3) mang vector tái tổ hợp được nuôi trong môi trường LB có bổ sung 100 μ g/mL ampicillin (Sigma, Singapore) ở 37°C, lắc với vận tốc 180 vòng/phút. Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) (Sigma-Aldrich, Hoa Kỳ) được thêm vào với nồng độ cuối cùng là 1 mM và tiếp tục nuôi trong 5 giờ ở 30°C để cảm ứng biểu hiện protein. Sau đó, vi khuẩn được thu sinh khối bằng cách ly tâm với tốc độ 6000 vòng/phút trong 10 phút. Cặn tế bào được hòa tan trong dung dịch muối đệm photphat (PBS; pH 7,4). Tế bào bị phá vỡ bằng sóng siêu âm trong 1 phút để giải phóng protein khỏi tế bào. Dịch chiết xuất được ly tâm với tốc độ 13000 vòng/phút trong 30 phút và dịch nổi trên bề mặt được chuyển sang một ống mới.

Dung dịch chứa protein mục tiêu được bổ sung đệm ly giải và cân bằng cột (50mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl và 10 mM imidazol) theo tỷ lệ 1:1 và sau đó được ủ với hạt nhựa HisPur™ Ni-NTA (Themor Fisher Scientific, Hoa Kỳ) ở 4°C. Sau 2 giờ, dòng chảy qua cột được loại bỏ và nhựa gắn protein trong cột Ni-NTA được rửa kỹ ba lần với dung dịch đệm chứa 50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl và 50 mM imidazol (Sigma-Aldrich, Hoa Kỳ). Các protein tái tổ hợp Cry1Aa4 và Cry1Ia34 thu được bằng cách rửa giải hạt nhựa trong cột Ni-NTA. Mức độ tinh sạch của protein tái tổ hợp được xác định trong điều kiện biến tính bằng cách điện di trên gel SDS-PAGE 10% (v/v) và phát hiện bằng thuốc nhuộm CoomassieBlue. Kết quả cho thấy protein được tinh sạch tốt, không bị lẫn với các protein khác trong tế bào (Hình 8A).

Sau khi điện di trên gel SDS-PAGE 10% (v/v), các protein được chuyển sang màng PVDF (Amersham, Anh). Các liên kết không đặc hiệu sẽ bị chặn với Block ACE (DS Pharma Biomedical, Nhật Bản) trong 2 giờ. Kháng thể sơ cấp kháng polyhistidin (Themor Fisher Scientific, Hoa Kỳ) được pha loãng với tỷ lệ 1:4000 và ủ với màng qua đêm ở nhiệt độ phòng. Sau khi rửa bằng PBST (PBS bổ sung 0,1% Tween 20), màng được ủ với kháng thể thứ cấp kháng chuột kết hợp HRP (Abcam, Anh) trong PBST

trong 2 giờ. Các kháng thể gắn protein tái tổ hợp được phát hiện với cơ chất AEC (Sigma-Aldrich, Hoa Kỳ). Kết quả cho thấy protein thu được đúng là Cry1Aa4 và Cry1Ia34 với kích thước tương ứng 64 kDa và 99 kDa do có gắn thêm đuôi His-tag vào đầu N của protein (Hình 8B).

Ví dụ 8: Nghiên cứu khả năng diệt sâu đục quả của protein tái tổ hợp Cry1Aa4 và Cry1Ia34

Mỗi protein Cry1Aa4 và Cry1Ia34 tinh khiết được bổ sung vào thức ăn nhân tạo với một dải các liều độc tố như sau 5, 10, 25, 50, 100, 200, 300, 400 và 500 ng/cm². Hoạt tính sinh học chống lại *E. zinckenella* của Cry1Aa4 kết hợp với Cry1Ia34 cũng được đánh giá bằng cách áp dụng từng loại protein vào chế độ ăn nhân tạo theo tỷ lệ 1:1. Nước khử ion và dịch chiết *E. coli* BL21 (DE3) không chứa vector tái tổ hợp được sử dụng làm đối chứng âm. Tất cả các thí nghiệm được tiến hành ở điều kiện 28°C, độ ẩm 60-70% và được thực hiện lặp lại ba lần với 10 ấu trùng *E. zinckenella* tuổi 2 cho mỗi nồng độ protein độc tố. Tỷ lệ tử vong của ấu trùng được đánh giá sau 7 ngày. Nồng độ gây chết trung bình (LC₅₀) của ấu trùng được ước tính bằng phần mềm R tích hợp hiệu chỉnh Abbott (Savi *et al.*, 2017).

Tỷ lệ ấu trùng sâu *E. zinckenella* chết sau 7 ngày đối với từng loại protein độc tố được trình bày trong Bảng 5. Kết quả đánh giá khả năng diệt sâu đục quả đậu tương đối với 2 protein tái tổ hợp riêng lẻ Cry1Aa4 và Cry1Ia34 và sự kết hợp của 2 protein này theo tỷ lệ 1:1 cho thấy ấu trùng *E. zinckenella* nhạy cảm với protein Cry1Aa4 hơn Cry1Ia34 do các giá trị LC₅₀ tương ứng là 59,80 ng/cm² và 89,99 ng/cm². Có thể nhận thấy rằng sự kết hợp của các độc tố Cry1Aa4 và Cry1Ia34 đã hoạt động hiệu quả nhất đối với *E. zinckenella*, với mức LC₅₀ là 38,33 ng/cm².

Bảng 5. Tỷ lệ ấu trùng sâu *E. zinckenella* tuổi 2 chết sau 7 ngày khi nuôi bằng thức ăn nhân tạo có bổ sung các protein tái tổ hợp Cry1Aa4 và Cry1Ia34

Liều thử nghiệm (ng/cm ²)	Tỷ lệ ấu trùng sâu <i>E. zinckenella</i> chết (%)		
	Cry1Aa4	Cry1Ia34	Cry1Aa4 : Cry1Ia34 (1:1)
0	0	0	0
5	6,7 ± 5,8	3,3 ± 0,0	13,3 ± 5,8
10	23,3 ± 5,8	16,7 ± 5,8	26,7 ± 5,8
25	26,7 ± 5,8	26,7 ± 5,8	36,7 ± 5,8
50	36,7 ± 5,8	30,0 ± 0,0	50,0 ± 10,0
100	56,7 ± 5,8	46,7 ± 5,8	66,7 ± 5,8
200	73,3 ± 5,8	66,7 ± 5,8	76,7 ± 5,8
300	83,8 ± 5,8	73,3 ± 5,8	90,0 ± 10,0

400	$90,0 \pm 10,0$	$83,8 \pm 5,8$	$96,7 \pm 5,8$
500	$96,7 \pm 5,8$	$86,7 \pm 5,8$	$100,0 \pm 0,0$
Giá trị LC_{50}	$59,80 \text{ ng/cm}^2$	$89,99 \text{ ng/cm}^2$	$38,33 \text{ ng/cm}^2$

Hiệu quả đạt được của sáng chế

Sâu đục quả đậu tương với tên khoa học *Etiella zinckenella* (Treitschke) thuộc họ Ngài sáng (Pyralidae), bộ Cánh vẩy (Lepidoptera) gây hại nghiêm trọng đến năng suất và chất lượng cây đậu tương. Sâu non gặm vỏ quả, đục vào trong ăn hạt đậu tương, làm cho hạt bị khuyết từng phần hoặc bị rỗng bên trong, làm giảm tới 20% năng suất và hạt không dùng làm giống được. Chủng vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* TH19 phân lập từ đất rừng ở Thanh Hóa có khả năng diệt sâu đục quả *E. zinckenella* rất cao, có tiềm năng sử dụng cho mục đích chế tạo sản phẩm thuốc bảo vệ thực vật phòng chống sâu đục quả. Ngoài ra, các gen sinh tổng hợp độc tố *cryIAa4* và *cryIIa34* của chủng này được xác định dựa trên giải trình tự và phân tích toàn bộ hệ gen đã được đăng ký tại Ngân hàng gen Quốc tế (GenBank) với mã số MN729490 và MN729491, là nguồn gen quan trọng để tiến hành công tác chuyển gen tạo giống cây đậu tương kháng sâu đục quả ở Việt Nam.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Chúng vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* TH19 với trình tự 16S rARN được đăng ký trên Ngân hàng gen quốc tế với mã số MN832932 được phân lập từ đất rừng tái sinh ở huyện Vĩnh Lộc, tỉnh Thanh Hóa, Việt Nam, có khả năng sinh protein Cry1Aa4 và Cry1Ia34 độc tố dạng tinh thể hình lưỡng tháp, có tính kháng đặc hiệu đối với sâu đục quả đậu tương *Etiella zinckenella*.

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Viện nghiên cứu hệ gen, Viện hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

<120> CHỦNG VI KHUẨN *BACILLUS THURINGIENSIS* TH19 PHÂN LẬP TỪ ĐẤT RỪNG THANH
HÓA CÓ KHẢ NĂNG SINH PROTEIN ĐỘC DIỆT SÂU ĐỤC QUẢ ĐẬU TƯƠNG

<170> BiSSAP 1.3.6

<210> 1

<211> 1439

<212> ADN

<213> *Bacillus thuringiensis*

<220>

<400> 1

aaggtatacc ccaccgactt cgggtgttac aaactctcgt ggtgtgacgg gcggtgtgta	60
caaggcccgg gaacgtattc accgcggcat gctgatccgc gattactagc gattccagct	120
tcatgtaggc gagttgcagc ctacaatccg aactgagaac ggttttatga gattagctcc	180
acctcgcggt cttgcagctc tttgtaccgt ccattgtagc acgtgtgtag cccaggctcat	240
aaggggcatg atgatttgac gtcacccca cttcctccg gtttgtcacc ggcagtcacc	300
ttagagtgcc caacttaatg atggcaacta agatcaaggg ttgcgctcgt tgcgggactt	360
aaccaacat ctcacgacac gagctgacga caacatgca ccacctgtca ctctgctccc	420
gaaggagaag ccctatctct agggttttca gaggatgtca agacctggta aggttcttcg	480
cgttgcttcg aattaaacca catgctccac cgcttggtgc ggccccgtc aattcctttg	540
agtttcagcc ttgcggccgt actccccagg cggagtgtt aatgcgttaa cttcagcact	600
aaagggcgga aaccctctaa cacttagcac tcatcgttta cggcgtggac taccagggtg	660
tctaactctg tttgctcccc acgctttcgc gcctcagtgt cagttacaga ccagaaagtc	720
gccttcgcca ctgggtgttc tccatatctc tacgcatttc accgctacac atgggaattcc	780
actttcctct tctgcactca agtctcccag tttccaatga ccctccacgg ttgagccgtg	840
ggctttcaca tcagacttaa gaaaccacct gcgcgcgctt tacgccaat aattccggat	900
aacgcttgcc acctacgtat taccgcggct gctggcacgt agttagccgt ggctttcttg	960
ttaggtaccg tcaaggtgcc agcttattca actagcactt gttcttccct aacaacagag	1020
ttttacgacc cgaaagcctt catcactcac gcggcggttc tccgtcagac tttcgtccat	1080
tgcggaagat tccctactgc tgcctcccgt aggagtctgg gccgtgtctc agtcccagtg	1140
tggccgatca ccctctcagg tcggctacgc atcgttgctt tggtagccg ttacctcacc	1200
aactagctaa tgcgacgcgg gtccatccat aagtgcagc cgaagccgcc tttcaatttc	1260
gaaccatgca gttcaaaatg ttatccggta ttagccccgg tttcccggag ttatcccagt	1320
cttatgggca gggtaccac gtgttactca cccgtccgcc gctaacttca taagagcaag	1380
ctcttaatcc attcgctcga cttgcatgta ttaggcacgc cgccagcgtt catcctgag	1439

<210> 2

<211> 1206

<212> ADN

<213> *Bacillus thuringiensis*

<220>

<221> CDS

<222> 1..1206

<223> /transl_table=11

<400> 1

```

gtg cca ggt acg ggt tcc tta tgg ccg ctt tca gcc caa agt cca atc      48
gga aag tgt gga gag ccg aat cga tgc gcg cca cac ctt gaa tgg aat      96
cct gac tta gat tgt tcg tgt agg gat gga gaa aag tgt gcc cat cat     144
tcg cat cat ttc tcc tta gac att gat gta gga tgt aca gac tta aat     192
gag gac cta ggt gta tgg gtg atc ttt aag att aag acg caa gat ggg     240
cac gca aga cta ggg aat cta gag ttt ctc gaa gag aaa cca tta gta     288
gga gaa gcg cta gct cgt gtg aaa aga gcg gag aaa aaa tgg aga gac     336
aaa cgt gaa aaa ttg gaa tgg gaa aca aat atc gtt tat aaa gag gca     384
aaa gaa tct gta gat gct tta ttt gta aac tct caa tat gat caa tta     432
caa gcg gat acg aat att gcc atg att cat gcg gca gat aaa cgt gtt     480
cat agc att cga gaa gct tat ctg cct gag ctg tct gtg att ccg ggt     528
gtc aat gcg gct att ttt gaa gaa tta gaa ggg cgt att ttc act gca     576
ttc tcc cta tat gat gcg aga aat gtc att aaa aat ggt gat ttt aat     624
aat ggc tta tcc tgc tgg aac gtg aaa ggg cat gta gat gta gaa gaa     672
caa aac aac caa cgt tcg gtc ctt gtt gtt ccg gaa tgg gaa gca gaa     720
gtg tca caa gaa gtt cgt gtc tgt ccg ggt cgt ggc tat atc ctt cgt     768
gtc aca gcg tac aag gag gga tat gga gaa ggt tgc gta acc att cat     816
gag atc gag aac aat aca gac gaa ctg aag ttt agc aac tgc gta gaa     864
gag gaa atc tat cca aat aac acg gta acg tgt aat gat tat act gta     912
aat caa gaa gaa tac gga ggt gcg tac act tct cgt aat cga gga tat     960
aac gaa gct cct tcc gta cca gct gat tat gcg tca gtc tat gaa gaa    1008
aaa tcg tat aca gat gga cga aga gag aat cct tgt gaa ttt aac aga    1056
ggg tat agg gat tac acg cca cta cca gtt ggt tat gtg aca aaa gaa    1104
tta gaa tac ttc cca gaa acc gat aag gta tgg att gag att gga gaa    1152
acg gaa gga aca ttt atc gtg gac agc gtg gaa tta ctc ctt atg gag    1200
gaa tag                                                                1206

```

<210> 3

<211> 2160

<212> ADN

<213> *Bacillus thuringiensis*

<220>

<221> CDS

<222> 1..2160

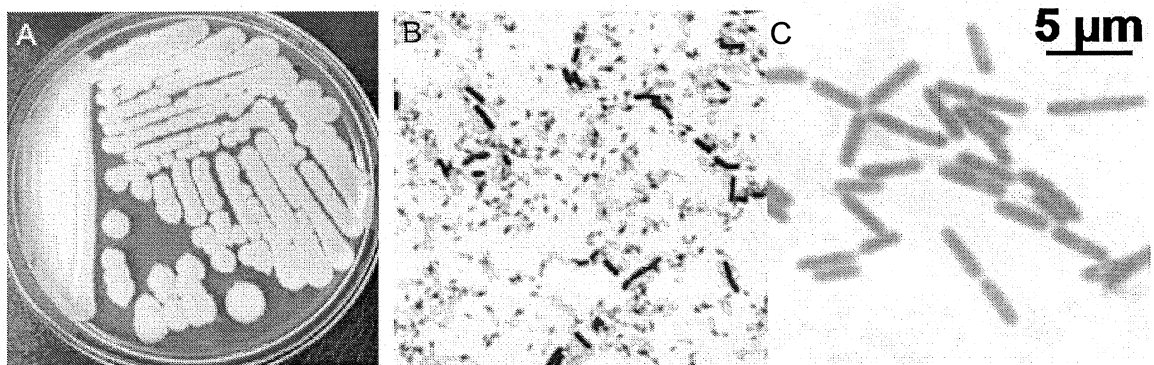
<223> /transl_table=11

<400> 2

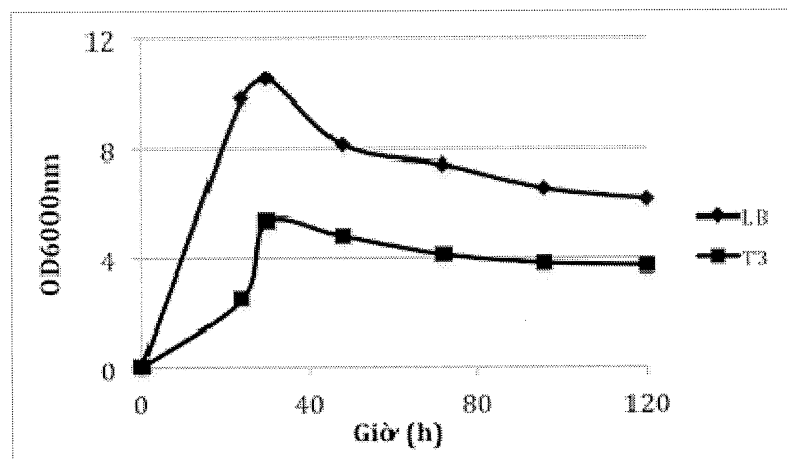
atg aaa cta aag aat caa gat aag cat caa agt ttt tct agc aat gcg	48
aaa gta gat aaa atc tct acg gat tca cta aaa aat gaa aca gat ata	96
gaa tta caa aac att aat cat gaa gat tgt ttg aaa atg tct gag tat	144
gaa aat gta gag ccg ttt gtt agt gca tca aca att caa aca ggt att	192
ggt att gcg ggt aaa ata ctt ggt acc cta ggc gtt cct ttt gca gga	240
caa gta gct agt ctt tat agt ttt atc tta ggt gag cta tgg cct aag	288
ggg aaa aat caa tgg gaa atc ttt atg gaa cat gta gaa gag att att	336
aat caa aaa ata tca act tat gca aga aat aaa gca ctt aca gac ttg	384
aaa gga tta gga gat gcc tta gct gtc tac cat gat tcg ctt gaa agt	432
tgg gtt gga aat cgt aat aac aca agg gct agg agt gtt gtc aag agc	480
caa tat atc gca tta gaa ttg atg ttc gtt cag aaa cta cct tct ttt	528
gca gtg tct gga gag gag gta cca tta tta ccg ata tat gcc caa gct	576
gca aat tta cat ttg ttg cta tta aga gat gca tct att ttt gga aaa	624
gag tgg gga tta tca tct tca gaa att tca aca ttt tat aac cgt caa	672
gtc gaa cga gca gga gat tat tcc gac cat tgt gtg aaa tgg tat agc	720
aca ggt cta aat aac ttg agg ggt aca aat gcc gaa agt tgg gta cga	768
tat aat caa ttc cgt aga gac atg act tta atg gta cta gat tta gtg	816
gca cta ttt cca agc tat gat aca caa atg tat cca att aaa act aca	864
gcc caa ctt aca aga gaa gta tat aca gac gca att ggg aca gta cat	912
ccg cat cca agt ttt aca agt acg act tgg tat aat aat aat gca cct	960
tcg ttc tct gcc ata gag gct gct gtt gtt cga aac ccg cat cta ctc	1008
gat ttt cta gaa caa gtt aca att tac agc tta tta agt cga tgg agt	1056
aac act cag tat atg aat atg tgg gga gga cat aaa cta gaa ttc cga	1104
aca ata gga gga acg tta aat atc tca aca caa gga tct act aat act	1152
tct att aat cct gta aca tta ccg ttc act tct cga gac gtc tat agg	1200
act gaa tca ttg gca ggg ctg aat cta ttt tta act caa cct gtt aat	1248
gga gta cct agg gtt gat ttt cat tgg aaa ttc gtc aca cat ccg atc	1296
gca tct gat aat ttc tat tat cca ggg tat gct gga att ggg acg caa	1344
tta cag gat tca gaa aat gaa tta cca cct gaa gca aca gga cag cca	1392
aat tat gaa tct tat agt cat aga tta tct cat ata gga ctc att tca	1440
gca tca cat gtg aaa gca ttg gta tat tct tgg acg cat cgt agt gca	1488
gat cgt aca aat aca att gag cca aat agc att aca caa ata cca tta	1536
gta aaa gct ttc aat ctg tct tca ggt gcc gct gta gtg aga gga cca	1584
gga ttt aca ggt ggg gat atc ctt cga aga acg aat act ggt aca ttt	1632
ggg gat ata cga gta aat att aat cca cca ttt gca caa aga tat cgc	1680
gtg agg att cgc tat gct tct acc aca gat tta caa ttc cat acg tca	1728
att aac ggt aaa gct att aat caa ggt aat ttt tca gca act atg aat	1776
aga gga gag gac tta gac tat aaa acc ttt aga act gta ggc ttt acc	1824
act cca ttt agc ttt tta gat gta caa agt aca ttc aca ata ggt gct	1872

tgg aac ttc tct tca ggt aac gaa gtt tat ata gat aga att gaa ttt	1920
gtt ccg gta gaa gta aca tat gag gca gaa tat gat ttt gaa aaa gcg	1968
caa gag aag gtt act gca ctg ttt aca tct acg aat cca aga gga tta	2016
aaa aca gat gta aag gat tat cat att gac cag gta tca aat tta gta	2064
gag tct cta tca gat gaa ttc tat ctt gat gaa aag aga gaa tta ttc	2112
gag ata gtt aaa tac gcg aag caa ctc cat att gag cgt aac atg tag	2160

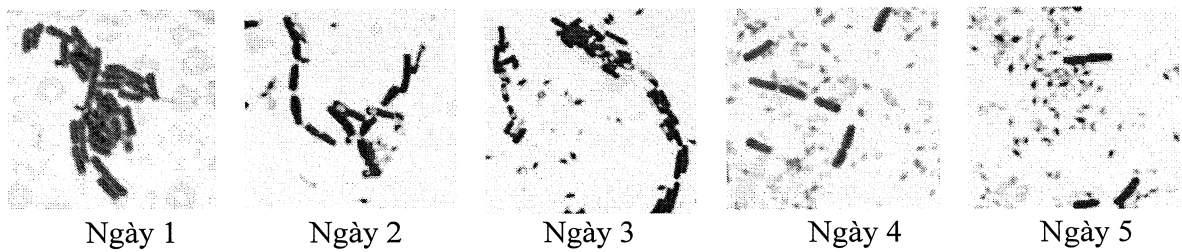
HÌNH 1



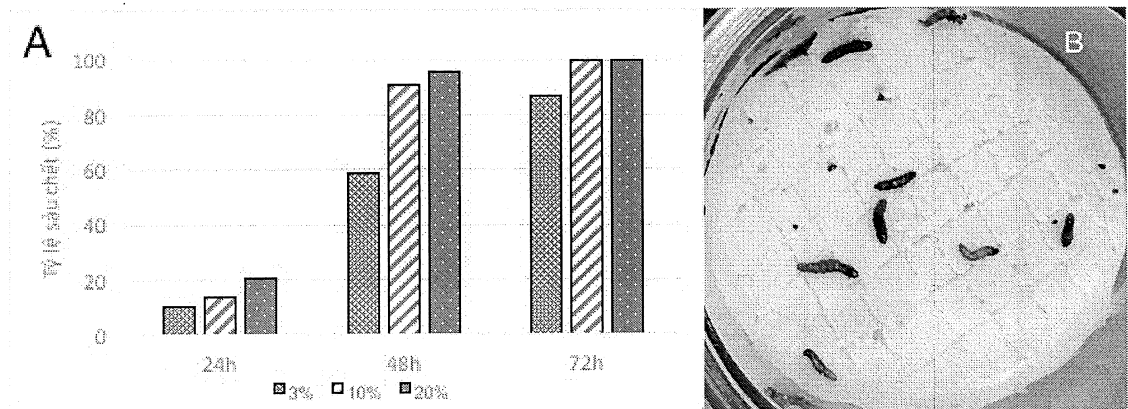
HÌNH 2



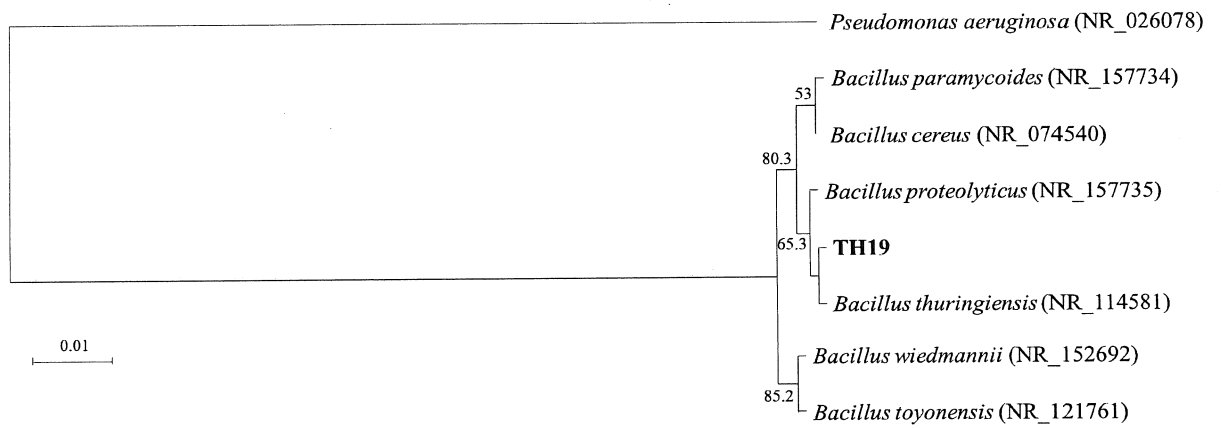
HÌNH 3



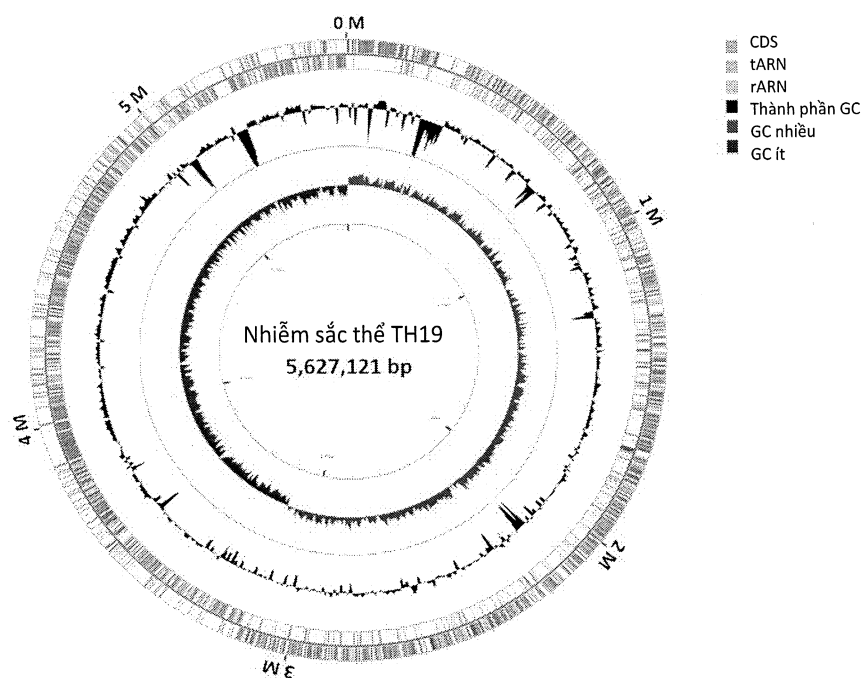
HÌNH 4



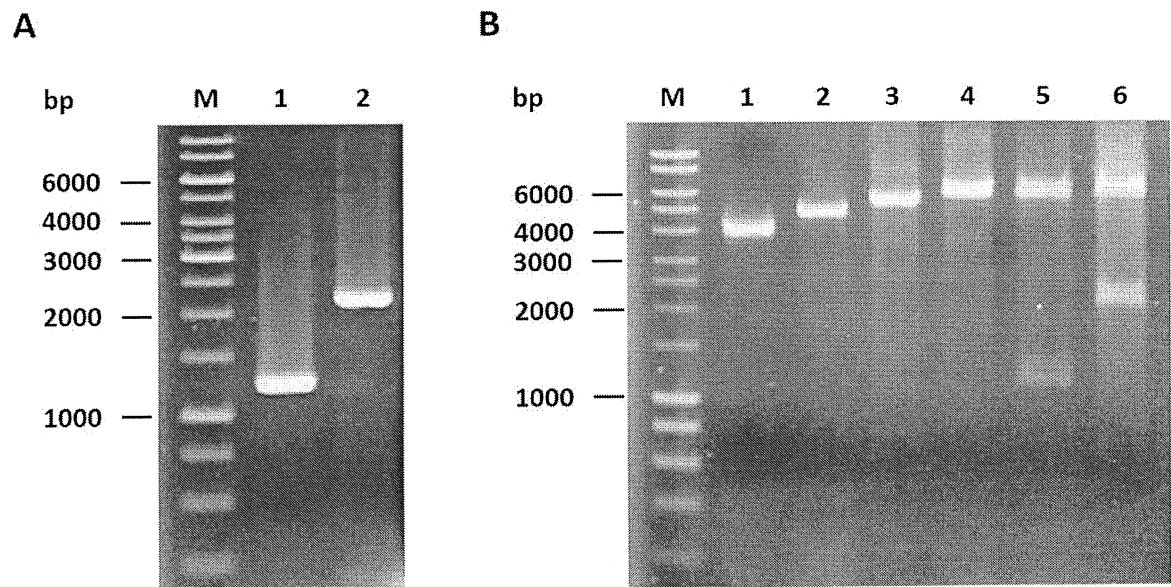
HÌNH 5



HÌNH 6



HÌNH 7



HÌNH 8

