



(12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ

(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN) (11)
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ



1-0035826

(51)⁷ C12N 15/10; C12N 15/113; A01N 63/02 (13) B

(21) 1-2019-01835

(22) 28/09/2017

(86) PCT/EP2017/074697 28/09/2017

(87) WO/2018/065303 12/04/2018

(30) 62/404,249 05/10/2016 US

(45) 25/05/2023 422

(43) 25/09/2019 378A

(73) 1. SYNGENTA PARTICIPATIONS AG (CH)

Schwarzwaldallee 215, CH-4058 Basel, Switzerland

2. DEVGEN NV (BE)

Technologiepark 30, Zwijnaarde, 9052 Gent (BE)

(72) FELDMANN, Pascale (BE); FOWLER, Jeffrey, David (US); JHURRY, Nema, Devi (MU); MAILLET, Isabelle (BE); OMEDES PUJOL, Marta (ES).

(74) Công ty TNHH Ban Ca (BANCA)

(54) PHƯƠNG PHÁP BẢO TOÀN HOẠT TÍNH SINH HỌC CỦA AXIT
RIBONUCLEIC

(57) Sáng chế đề xuất phương pháp cơ bản duy trì hoặc nếu không thì bảo toàn hoạt tính sinh học của dsARN, có mặt trong tế bào, để làm chậm sau phiên mã biểu hiện của gen trong sinh vật đích, bao gồm bước bổ sung vào chế phẩm tế bào hợp chất có chức năng của tác nhân liên kết chéo protein hoặc amin và/hoặc axit. Sáng chế còn bao gồm chế phẩm chứa tế bào chứa dsARN, và tác nhân liên kết chéo protein và/hoặc axit.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến kiểm soát biểu hiện gen bằng ARN sợi đôi. Cụ thể là sáng chế đề cập đến phương pháp tăng cường khả năng của ARN sợi đôi được dùng ngoại sinh – tức là bên ngoài sinh vật đích và dưới các điều kiện môi trường tương đối khó chịu - để làm câm biểu hiện gen ở sinh vật đó. Sáng chế còn đề cập đến chế phẩm để dùng trong phương pháp này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Hiện tượng ARN can thiệp một cách tiềm năng để làm câm biểu hiện gen là đã biết.

ARN tương đối không ổn định và có thể bị suy biến nhanh do, ví dụ, ribonucleaza mà có mặt ở khắp nơi bên ngoài tế bào. Vấn đề với việc dùng dsARN hoặc là trực tiếp nhắm đích sinh vật, hoặc thông qua dùng ngoại sinh lên vị trí mà tại đó chúng tồn tại liên quan đến tính ổn định kém của ARN. Thuật ngữ dùng ngoại sinh có nghĩa là được áp dụng lên sinh vật đích theo cách mà sinh vật đích có thể kết hợp với nó, hoặc dsARN được tạo ra trong sinh vật thứ nhất mà khác với sinh vật đích và sinh vật đích kết hợp với sinh vật thứ nhất, hoặc một phần của chúng bao gồm dsARN sao cho dsARN này có khả năng tác động đến sự làm câm sau phiên mã gen bao gồm trình tự nucleotit tương ứng với trình tự chứa trong dsARN. Dùng ngoại sinh phân biệt với tạo ra nội sinh – thuật ngữ này có nghĩa là việc tạo ra (thông thường thông qua biểu hiện từ trình tự khác loại thích hợp) trong tế bào của sinh vật đích của ARN sợi đôi có khả năng làm câm sau phiên mã gen được nhắm đích.

Mặc dù dsARN được dùng ngoại sinh thường có khả năng tạo ra hiệu ứng sinh học có liên quan trong thời gian ngắn, thậm chí có thể lên đến vài ngày sau khi dùng, hiệu quả thường giảm nhanh với dsARN thường có thời gian bán hủy chỉ khoảng 12 đến 24 giờ trong đất ví dụ, và còn tùy thuộc vào điều kiện môi trường chính xác mà nó được dùng. Các giải pháp khác nhau cho vấn đề này đã được đề xuất, bao gồm làm ổn định dsARN bằng cách đóng gói hoặc nếu không thì liên kết nó với polyme giúp tăng cường

tính ổn định của nó, do đó tạo ra thời gian tác động tăng lên. Có 2 khía cạnh về thời gian tác động. Bản thân việc làm câm gen sẽ mất hiệu lực tùy thuộc vào tốc độ quay vòng của protein liên quan. Trong quá trình ủ với đất ở điều kiện môi trường, dsARN bị suy biến trong khoảng thời gian khoảng 2 ngày. Mặc dù dsARN có thể có tác động cơ bản lâu hơn so với như thế, lợi ích của sáng chế là làm tăng sự duy trì trong môi trường của dsARN.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Do đó, sáng chế liên quan đến giải pháp cho vấn đề bất hoạt tương đối nhanh của dsARN mà đã dùng cho sinh vật bằng cách ngoại sinh, thường là dưới điều kiện đồng ruộng mà thường có lợi cho sự thoái biến hoặc bất hoạt nhanh của nó.

Sáng chế đề xuất phương pháp cơ bản duy trì hoặc nếu không thì bảo toàn hoạt tính sinh học của dsARN, có mặt trong tế bào, để làm câm sau phiên mã biểu hiện của gen trong sinh vật đích, bao gồm bước bổ sung vào chế phẩm chứa tế bào hợp chất có chức năng của tác nhân liên kết chéo protein hoặc amin và/hoặc axit.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Hình 1: Thể hiện của phương pháp làm bất hoạt.

Hình 2: Kính hiển vi TEM của tế bào được bất hoạt.

Hình 3: So sánh tỷ lệ chết của ấu trùng ở 7 ngày sau khi tàn phá đất được xử lý với mẫu bất hoạt nhiệt (cột màu đen) hoặc với mẫu được xử lý với (A) metanol hoặc (B) isopropanol (cột sọc). Trong tất cả các mẫu gen đích tương ứng với đích Dvs006.5. Các mẫu được dùng cho đất 0 ngày, 3 ngày và 7 ngày trước khi tàn phá bởi ấu trùng.

Hình 4: So sánh tỷ lệ chết của ấu trùng ở 7 ngày sau khi tàn phá đất được xử lý với mẫu bất hoạt nhiệt (cột màu đen) hoặc với mẫu được xử lý với (A) axit xitric hoặc (B) axit formic hoặc (C) axit lactic (cột sọc). Trong tất cả các mẫu gen đích tương ứng với đích Dvs006.5. Các mẫu được dùng cho đất 0 ngày, 3 ngày và 7 ngày trước khi tàn phá bởi ấu trùng.

Hình 5: So sánh tỷ lệ chết của ấu trùng ở 7 ngày sau khi tàn phá đất được xử lý với mẫu bất hoạt nhiệt (cột màu đen) hoặc với mẫu được xử lý với (A) 0,1% glutaraldehyt hoặc (B) 0,5% glutaraldehyt (cột sọc). Trong tất cả các mẫu gen đích tương ứng với đích

Dvs006.5. Các mẫu được dùng cho đất 0 ngày, 3 ngày và 7 ngày trước khi tàn phá bởi ấu trùng.

Mô tả chi tiết sáng chế

Theo một khía cạnh của sáng chế, polyamin hoặc protein được bổ sung vào chế phẩm tế bào trước khi bổ sung tác nhân liên kết chéo protein hoặc amin, sao cho polyamin hoặc protein sẽ liên kết với nhóm axit carboxylic trên bề mặt tế bào và sẽ tạo thành lớp làm ổn định bên ngoài sau khi liên kết chéo, tạo ra sự bảo toàn lớn hơn hoạt tính sinh học của dsARN có trong tế bào.

Tác nhân liên kết chéo và/hoặc axit có thể được bổ sung vào chế phẩm chứa tế bào trước khi dùng chế phẩm lên vị trí. Thuật ngữ vị trí có nghĩa là một vị trí mà tại đó chế phẩm tế bào chứa tác nhân được dùng, và bao gồm cánh đồng mà cây đang trồng, hoặc trong đó hạt giống của cây trồng được gieo, hoặc đất mà các hạt giống hoặc cây được đặt vào đó, hoặc thực sự là cánh đồng, đất, hạt giống, và/hoặc cây về bản chất.

Trong phương án được ưu tiên của phương pháp, vị trí là đất, và chế phẩm được dùng cho nó trong vùng xung quanh cây mà được mong muốn để bảo vệ bằng cách nhắm đích dsARN vào gen thiết yếu trong sinh vật gây hại là côn trùng, như ví dụ sâu cắn rễ ngô.

Tác nhân liên kết chéo có thể được chọn từ nhóm bao gồm polyaldehyt, dialdehyt, di-epoxit, poly epoxit, pyridyl disulfua, carbodiimide, di- hoặc poly-isoxyanat, maleimide đa chức, di- hoặc poly-imidoeste, bis-diazonium, n-hydroxysuccinimide este và haloaxetal và thực tế bất kỳ tác nhân liên kết chéo đã biết khác mà chứa ít nhất hai nhóm chức – mà có thể hoặc là giống hoặc khác nhau. Một số tác nhân liên kết chéo hòa tan nhẹ trong nước, trong trường hợp đó chúng có thể được sử dụng một cách thuận tiện trong các dung dịch trong dung môi thích hợp, hoặc hỗn hợp nước và dung môi đó. Tốt hơn là, tác nhân được chọn từ nhóm bao gồm polyaldehyt và dialdehyt, và còn tốt hơn nữa là dialdehyt. Dialdehyt được ưu tiên nhất là glutaraldehyt, việc sử dụng cụ thể thể nó trong phương pháp theo sáng chế được minh họa dưới đây. Glutaraldehyt được ưu tiên bởi vì khả năng phản ứng của nó sao cho phản ứng nhanh một cách thuận lợi, nhưng không nhanh đến mức khó xử lý. Nó tương đối không độc hại, dễ hòa tan trong nước, sẵn có và không tốn kém.

Axit có thể là axit hữu cơ hoặc axit vô cơ. Axit được ưu tiên là axit yếu, tốt hơn là axit hữu cơ, tốt hơn nữa là axit hữu cơ có 1 đến 5 cacbon và tốt nhất là axit lactic hoặc axit formic. Không bị giới hạn bởi bất kỳ sự giải thích cụ thể nào về cơ chế hoạt động, việc dùng axit lên các tế bào bất hoạt theo sáng chế có thể dẫn đến sự biến tính của protein dẫn đến sự duy trì lâu hơn của dsARN trong môi trường.

Trong phương án cụ thể, các tế bào là các tế bào vi khuẩn, mặc dù các tế bào khác có thể được sử dụng, bao gồm cả tảo và thậm chí thực vật hoặc các tế bào nhân thực khác.

Trong trường hợp các tế bào là tế bào vi khuẩn, tác nhân liên kết chéo và/hoặc axit có thể được dùng lên các tế bào để bất hoạt chúng. Theo đó, tác nhân liên kết chéo và axit có thể có hai chức năng. Chức năng thứ nhất là bất hoạt các tế bào và chức năng thứ hai là bảo toàn các hoạt tính sinh học của dsARN có trong tế bào.

Theo cách khác, tác nhân liên kết chéo và/hoặc axit được cung cấp cho tế bào mà đã được bất hoạt trước đó và có một chức năng - là bảo toàn hoạt tính sinh học của dsARN có trong tế bào. Các quá trình làm bất hoạt khác nhau là đã biết trong lĩnh vực, bao gồm bất hoạt bởi nhiệt (dưới các điều kiện nhiệt độ và thời gian thay đổi khá rộng), bất hoạt hóa học như các axit peraxetic, cupric ascorbat, natri hypoclorit, hydro peroxit, guanidinium thioxyanat, formadehyt và mono-aldehyt khác, và khiến chúng bị bức xạ ion hóa.

Tác nhân liên kết chéo có thể được bổ sung vào chế phẩm tế bào mà không có axit, axit này có thể được bổ sung mà không có tác nhân liên kết chéo, hoặc theo cách khác cả hai được bổ sung vào chế phẩm tế bào - tuần tự theo thứ tự bất kỳ.

Dù sử dụng quy trình nào, chế phẩm tế bào thu được không chứa bất kỳ vi khuẩn nào có thể sống được về mặt sinh học.

Tế bào, mà là nhân sơ, hoặc nhân thực, được thiết kế để chứa trình tự ADN mà khi được phiên mã tạo ra ARN sợi đôi, ít nhất một phần của nó chứa trình tự cơ bản tương đồng với trình tự của mARN của gen trong tế bào nhân sơ hoặc nhân thực, cụ thể, ví dụ là tế bào của sinh vật gây hại thực vật, như côn trùng. Ví dụ điển hình về loài gây hại côn trùng bao gồm *Diabrotica virgifera virgifera* (sâu đục rễ ngô phương Tây), *Diabrotica barberi* (sâu đục rễ ngô phương Bắc), *Diabrotica undecimpunctata howardi* (sâu đục rễ ngô phương Nam), *Diabrotica virgifera zea* (sâu đục rễ ngô Mexico) và

Diabrotica speciosa (bọ cánh cứng hại bầu bí). Sinh vật gây hại mà dsARN chống lại có thể có hiệu quả cũng bao gồm các sinh vật gây hại khác nhau đã biết đối với các nhà nông học như giun tròn, bọ bỏ củi và giòi và mầm bệnh trong đất thích hợp như vi khuẩn và nấm.

Nồng độ của tác nhân liên kết chéo có trong, hoặc được bổ sung vào, chế phẩm tế bào là tương đối đáng kể. Nếu quá nhiều hoặc quá ít tác nhân liên kết chéo có mặt, hoặc được bổ sung vào hoặc nếu không thì xuất hiện ở vị trí tại đó chế phẩm tế bào được bổ sung, dsARN có khả năng thể hiện hiệu quả làm câm gen sau phiên mã là không hiệu quả. Trong trường hợp mà tác nhân là glutaraldehyt, tác nhân có mặt trong chế phẩm tế bào/tại vị trí với lượng nằm trong khoảng từ 5 đến 0,001%, tốt hơn là từ 2,5 đến 0,005% và tốt nhất là từ 1 đến 0,01%, trong đó % là so với thể tích cuối cùng của chế phẩm tế bào. Chuyên gia trong lĩnh vực hiểu rằng để hưởng lợi từ cả việc bất hoạt tế bào và hiệu quả làm ổn định dsARN của tác nhân liên kết chéo, nồng độ cao hơn sẽ được yêu cầu so với khi tác nhân liên kết chéo được bổ sung vào tế bào mà đã được làm bất hoạt trước đó.

Theo đó, khi được sử dụng để vừa làm bất hoạt tế bào và làm ổn định dsARN, nồng độ của tác nhân liên kết chéo (cụ thể là glutaraldehyt) bằng ít nhất khoảng 0,1% và tốt hơn là tác nhân có mặt trong chế phẩm tế bào/tại vị trí với lượng nằm trong khoảng từ 1 đến 0,1%. Tuy ý, khi tác nhân liên kết chéo được dùng để làm ổn định dsARN và tế bào được làm bất hoạt trước, nồng độ của tác nhân liên kết chéo (cụ thể là glutaraldehyt) bằng ít nhất khoảng 0,01% và tốt hơn là tác nhân có mặt trong chế phẩm tế bào/tại vị trí với lượng nằm trong khoảng từ 1 đến 0,01%.

Theo phương án được ưu tiên của phương pháp, tế bào là tế bào vi khuẩn, và tác nhân là glutaraldehyt mà có mặt trong chế phẩm tế bào với lượng nằm trong khoảng từ 1 đến 0,01% theo thể tích cuối của chế phẩm. Không bị giới hạn bởi bất kỳ sự giải thích cụ thể nào về cơ chế động, tác nhân liên kết chéo dư được hiểu là làm giảm tính sinh khả dụng của dsARN trong khi đó quá ít tác nhân liên kết chéo không tạo ra sự cải thiện mong muốn về tính ổn định và nó không làm bất hoạt tế bào.

Theo phương án được ưu tiên của phương pháp, tế bào là tế bào vi khuẩn, và axit là axit formic hoặc axit lactic mà có mặt trong chế phẩm tế bào với lượng nằm trong khoảng từ 1M đến 0,1M trong chế phẩm.

Sử dụng phương pháp theo sáng chế kéo dài khá đáng kể thời gian hoạt tính sinh học liên quan đến dsARN có trong tế bào - thường duy trì hoạt tính trong môi trường đất ở nhiệt độ trên khoảng 12 độ C trong khoảng thời gian lên đến hơn 21 ngày so với dsARN dùng cho đất nhưng trong đó không có tác nhân liên kết chéo nào được sử dụng.

Sáng chế còn bao gồm chế phẩm theo sáng chế chứa tế bào và tác nhân liên kết chéo protein, khác biệt ở chỗ chế phẩm bao gồm đất, tế bào bao gồm dsARN, và tác nhân là glutaraldehyt.

Sáng chế còn bao gồm chế phẩm theo sáng chế chứa tế bào và axit, khác biệt ở chỗ chế phẩm bao gồm đất, tế bào bao gồm dsARN, và axit là axit lactic hoặc axit formic.

Sáng chế còn bao gồm chế phẩm tế bào chứa tác nhân liên kết chéo protein và/hoặc axit được bổ sung nhằm mục đích duy trì hoạt tính sinh học của dsARN được biểu hiện khác loại trong tế bào cũng như sử dụng tác nhân liên kết chéo protein và/hoặc axit để cơ bản làm ổn định hoặc nếu không thì bảo toàn hoạt tính sinh học của dsARN có mặt trong tế bào.

Sáng chế sẽ được minh họa bằng các ví dụ không giới hạn sau đây.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Tạo mẫu thử - Lên men

Plasmid chứa cat-xet biểu hiện dsARN điều khiển T7 đã được biến nạp vào tế bào *E. coli* HT115 (DE3).

Để sản xuất dsARN, nuôi cấy được chủng ngừa từ khuẩn lạc duy nhất và được trồng qua đêm trong môi trường LB có chứa các kháng sinh thích hợp.

Nuôi cấy qua đêm sau đó được pha loãng thành OD600 = 1 bằng cách sử dụng LB có chứa kháng sinh thích hợp. Để tạo ra sự phiên mã của dsARN, IPTG được bổ sung đến nồng độ cuối bằng 1,0mM. Dịch nuôi cấy sau đó được ủ trong 3,5 giờ ở 37°C trong khi lắc ở 250rpm.

Sau khi cảm ứng, nuôi cấy được ly tâm, được tạo huyền phù lại ở OD600 liên quan, thường ở khoảng từ 50 đến 100 đơn vị/ ml (trong đó 1 đơn vị tương ứng với 1ml tế bào ở OD600=1) và dịch nổi được loại bỏ. Các viên này sau đó được làm bất hoạt cho các thử nghiệm khác.

Bất hoạt nhiệt. Vi khuẩn bị diệt bằng cách xử lý nhiệt, thường là xử lý HTST, quá trình “nhiệt độ cao trong thời gian ngắn”, bao gồm gia nhiệt dịch nuôi vi khuẩn trong dòng chảy qua, là đã biết đối với phương pháp thanh trùng. Khả năng không sống sót của vi khuẩn được xác nhận bằng cách cấy phân ước của nước xuýt lên tấm LB và ủ qua đêm ở 37°C.

Chế phẩm để tăng độ ổn định của đất (Hình 1).

1) Xử lý rượu: các viên vi khuẩn được tạo huyền phù lại trong 100% metanol hoặc 100% isopropanol và được bảo quản ở 4°C. Trước khi thiết lập các thử nghiệm sinh học, các mẫu được sấy khô trong máy speedvac và được tạo huyền phù lại trong nước, ở OD600 liên quan.

2) Xử lý axit: các viên vi khuẩn được tạo huyền phù lại trong 0,5 M nồng độ cuối của axit, bao gồm axit xitric, formic hoặc lactic, pH 3,5. Các mẫu được ủ trong 4 giờ ở nhiệt độ phòng, trong khi lắc ở 35 vòng/phút trên các con lăn, sau đó các mẫu được ly tâm, rửa hai lần bằng nước và được tạo huyền phù lại ở OD600 liên quan. Các mẫu được lưu trữ ở 4°C cho đến khi thiết lập thử nghiệm sinh học.

3) Xử lý glutaraldehyt: các viên vi khuẩn được tạo huyền phù lại trong 0,1% hoặc 0,5% nồng độ cuối của glutaraldehyt. Các mẫu được ủ trong 2 giờ, 4 giờ hoặc 72 giờ ở nhiệt độ phòng, trong khi lắc ở 35 vòng/phút trên các con lăn, sau đó các mẫu được ly tâm, rửa hai lần và được tạo huyền phù lại ở OD600 liên quan. Các mẫu được lưu trữ ở 4°C cho đến khi thiết lập thử nghiệm sinh học.

Đối với mỗi phương pháp bất hoạt, khả năng không sống sót của vi khuẩn được xác nhận bằng cách cấy phân ước của dịch đã xử lý nêu trên lên tấm LB và ủ qua đêm ở 37°C.

Kính hiển vi TEM

Tính toàn vẹn của màng tế bào và khía cạnh chung của các tế bào sau bước khử hoạt tính được kiểm tra bằng kính hiển vi TEM. Tóm lại, các mẫu được cố định trong chất đệm natri cacodylat, chứa 2% paraformaldehyt và 2% glutaraldehyt, trong 2 giờ ở nhiệt độ phòng. Các mẫu sau đó được rửa và cố định lần thứ hai với OsO₄ nước 1% và rửa thêm. Sau khi ủ qua đêm với dung dịch nhuộm chặn, uranyl axetat nước 0,5%, các mẫu được rửa thêm, sau đó khử nước bằng etanol và nhúng trong nhựa Spurr, sau đó ủ

10 giờ trong lò để cho phép polyme hóa. Các mẫu được trực quan hóa bởi TEM (Hình 2).

Kết quả chỉ ra rằng các tế bào nguyên vẹn trong các mẫu bị bất hoạt bởi axit formic, axit lactic và glutaraldehyt, trong khi trong các mẫu khác, được xử lý bằng metanol, isopropanol và axit xitric, cấu trúc tế bào và thành tế bào cho thấy bị phá vỡ.

Thử nghiệm hoạt tính sinh học trong đất. Thử nghiệm được thiết lập bằng cách sử dụng cùng mẫu. Một cách ngắn gọn, các phân ước khác nhau của thành phần hoạt tính được điều chế bằng cách trộn mẫu bất hoạt, biểu hiện sự kiểm soát GFP dsARN của chúng hoặc Dvs006.5 dsARN hoạt tính. Các mẫu được kiểm tra bao gồm các mẫu vi khuẩn bị bất hoạt bằng xử lý nhiệt, xử lý glutaraldehyt, xử lý axit hoặc xử lý cồn. Các lượng mẫu khác nhau được dùng cho đất trong các đĩa 48 giếng để đạt được nồng độ cuối cùng của dsARN tương đương với 2,5µg, 25µg hoặc 50µg. Các đĩa được ủ ở 25°C trong 0, 3 và 7 ngày, trước khi đếm khuẩn phage.

Sau 24 giờ ủ trên đĩa đất, ít nhất 30 ấu trùng mỗi xử lý đã được chuyển sang tấm ăn nhân tạo (1 ấu trùng mỗi giếng). Tỷ lệ chết của ấu trùng được đánh giá hàng ngày trong 7 ngày. Dữ liệu về tỷ lệ chết của ấu trùng ở 7 ngày sau khi phá hoại được thể hiện (Hình 3, 4 và 5). Khi thành phần hoạt tính được thêm vào các tấm đất vào ngày phá hoại bằng ấu trùng (Ngày 0), tỷ lệ chết đáng kể tạo ra bởi tất cả các mẫu, bao gồm sự bất hoạt bằng xử lý nhiệt (HTST), xử lý bằng rượu, xử lý bằng axit hoặc xử lý bằng glutaraldehyt. Điều này chỉ ra rằng các phương pháp làm bất hoạt khác nhau không ảnh hưởng đến tính sinh khả dụng của dsARN.

Sau 3 hoặc 7 ngày ủ trong đất, và như mong đợi, sự giảm rõ ràng về hoạt tính được quan sát thấy đối với mẫu HTST (tỷ lệ chết <60% vào ngày 3 và tỷ lệ chết <25% vào ngày 7). Đối với xử lý bằng rượu, metanol và isopropanol tương ứng, không thấy sự cải thiện nào so với kiểm soát HTST (Hình 3). Thú vị là, đối với các mẫu được xử lý bằng axit lactic và formic quan sát thấy sự cải thiện rõ rệt so với đối chứng HTST, khoảng 80% tỷ lệ chết vẫn được quan sát thấy sau 3 và 7 ngày ủ trong đất. Axit xitric không thể hiện sự cải thiện so với đối chứng (Hình 4).

Đối với các mẫu được xử lý bằng 0,1 hoặc 0,5% glutaraldehyt, hiệu quả thậm chí còn lớn hơn, và tỷ lệ chết đạt được ở ngày 3 và 7 vẫn trên 90%, cao hơn đáng kể so với kiểm soát HTST (Hình 5).

Dữ liệu thể hiện dsARN trong các mẫu vi khuẩn được xử lý bằng axit formic hoặc axit lactic 0,5 M (Hình 4.B và C) hoặc glutaraldehyt ở nồng độ bằng 0,1 hoặc 0,5% (Hình 5.A và B), ổn định trong đất lên đến 7 ngày; các xử lý này tạo ra phương pháp mà bảo vệ thành phần hoạt tính chống lại thoái biến là đất, do đó kéo dài sự duy trì của dsARN.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phương pháp bao gồm:

điều chế chế phẩm chứa tế bào vi khuẩn có dsARN có trong tế bào mà làm câm biểu hiện của gen sau phiên mã ở sinh vật đích;

bổ sung vào chế phẩm glutaraldehyt nằm trong khoảng từ 0,01 đến 1% tương ứng với thể tích cuối của chế phẩm để liên kết chéo với tế bào vi khuẩn; và

dùng chế phẩm chứa tế bào vi khuẩn được liên kết chéo cho sinh vật đích để kiểm soát sinh vật đích;

trong đó tế bào vi khuẩn được liên kết chéo có hoạt tính sinh học và về cơ bản giữ lại hoặc bảo tồn hoạt tính sinh học của dsARN có trong tế bào ít nhất nhiều hơn 3 ngày so với tế bào vi khuẩn chỉ được xử lý bằng nhiệt;

trong đó phương pháp này loại trừ phương pháp ngăn ngừa và điều trị cho cơ thể người hoặc động vật.

2. Phương pháp theo điểm 1, trong đó sinh vật đích được chọn từ nhóm bao gồm *Diabrotica virgifera virgifera* (sâu đục rễ ngô phương Tây), *Diabrotica barberi* (sâu đục rễ ngô phương Bắc), *Diabrotica undecimpunctata howardi* (sâu đục rễ ngô phương Nam), *Diabrotica virgifera zea* (sâu đục rễ ngô Mexico), *Diabrotica speciosa* (bọ cánh cứng hại bầu bí), tuyến trùng, giun kim và giòi và mầm bệnh trong đất thích hợp.

3. Phương pháp theo điểm 1, trong đó tế bào vi khuẩn hầu như bị bất hoạt bằng glutaraldehyt.

4. Phương pháp theo điểm 3, trong đó tế bào vi khuẩn được thiết kế di truyền.

5. Phương pháp theo điểm 4, trong đó sinh vật đích là sinh vật gây hại thực vật.

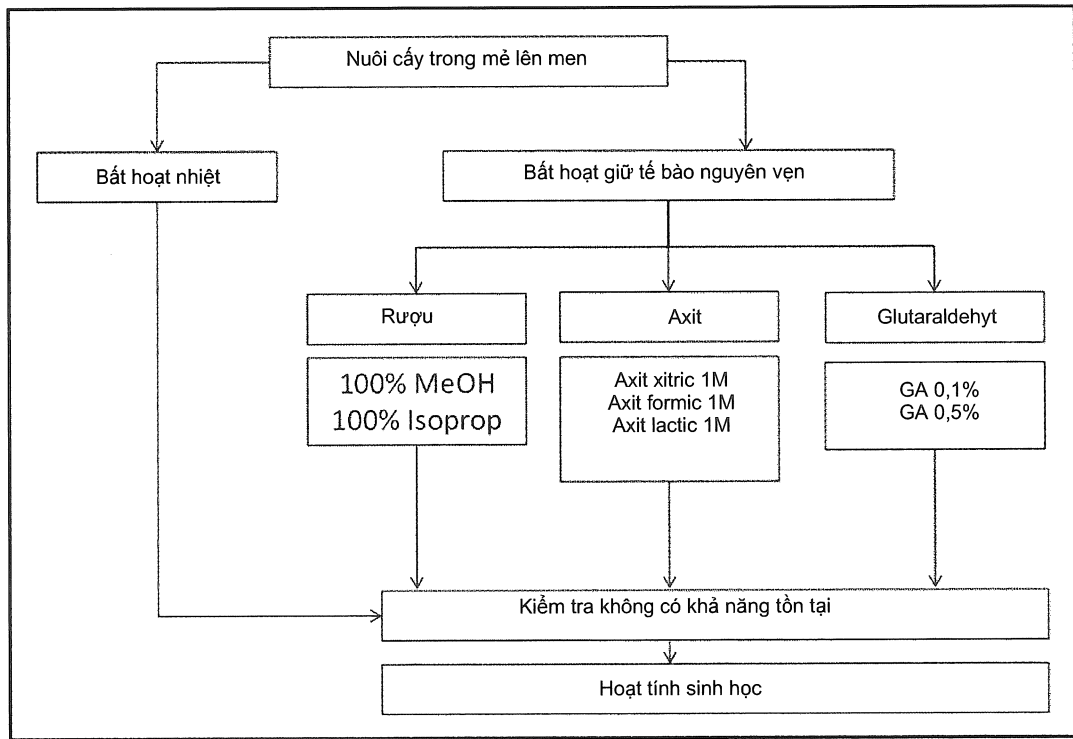
6. Phương pháp theo điểm 5, trong đó việc dùng diễn ra bằng cách áp dụng chế phẩm này cho đất.

7. Phương pháp theo điểm 6, trong đó tế bào vi khuẩn có hiệu quả sinh học đối với sinh vật gây hại thực vật và về cơ bản vẫn giữ được tác dụng sinh học đối với sinh vật gây hại thực vật ít nhất 7 ngày sau khi áp dụng trong đất.

8. Phương pháp theo điểm 7, trong đó sinh vật gây hại thực vật được chọn từ nhóm bao gồm *Diabrotica virgifera virgifera* (sâu đục rế ngô phương Tây), *Diabrotica barberi* (sâu đục rế ngô phương Bắc), *Diabrotica undecimpunctata howardi* (sâu đục rế ngô phương Nam), *Diabrotica virgifera zea* (sâu đục rế ngô Mexico), *Diabrotica speciosa* (bọ cánh cứng hại bầu bí), giun tròn, bọ bỏ củi và giòi.
9. Phương pháp theo điểm 8, còn bao gồm bước rửa chế phẩm tế bào vi khuẩn được liên kết chéo.
10. Phương pháp theo điểm 8, trong đó glutaraldehyt ít nhất là 0,1%.
11. Phương pháp theo điểm 8, trong đó glutaraldehyt ít nhất là 0,5%.
12. Phương pháp theo điểm 1, trong đó tế bào vi khuẩn về cơ bản là bị bất hoạt trước khi bổ sung glutaraldehyt.

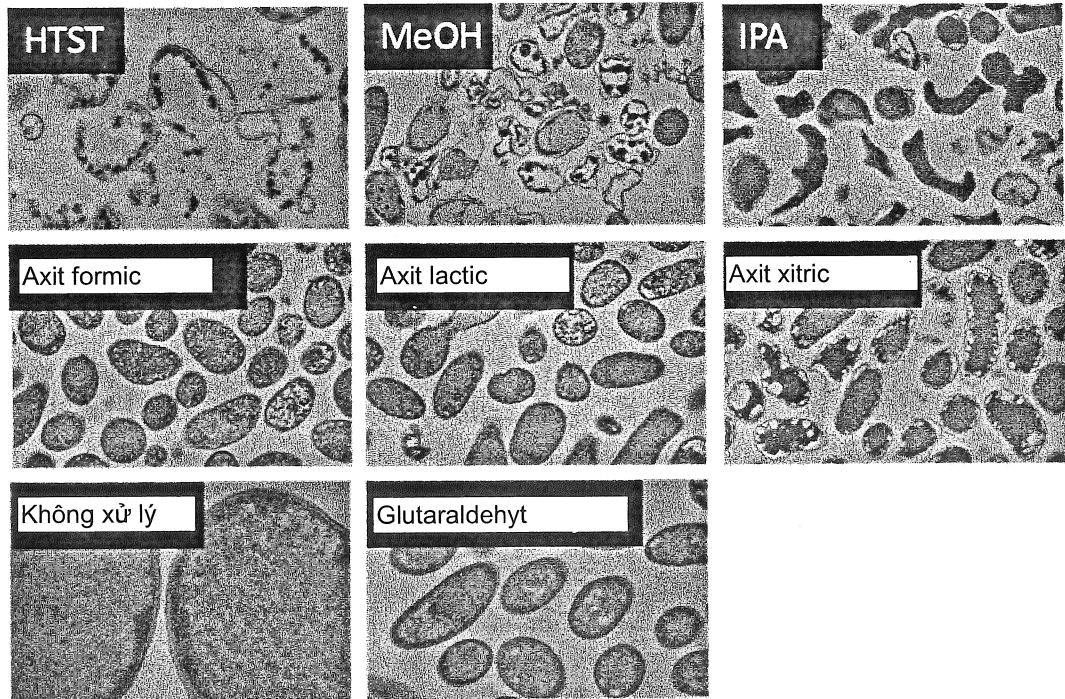
HÌNH VẼ

Hình 1

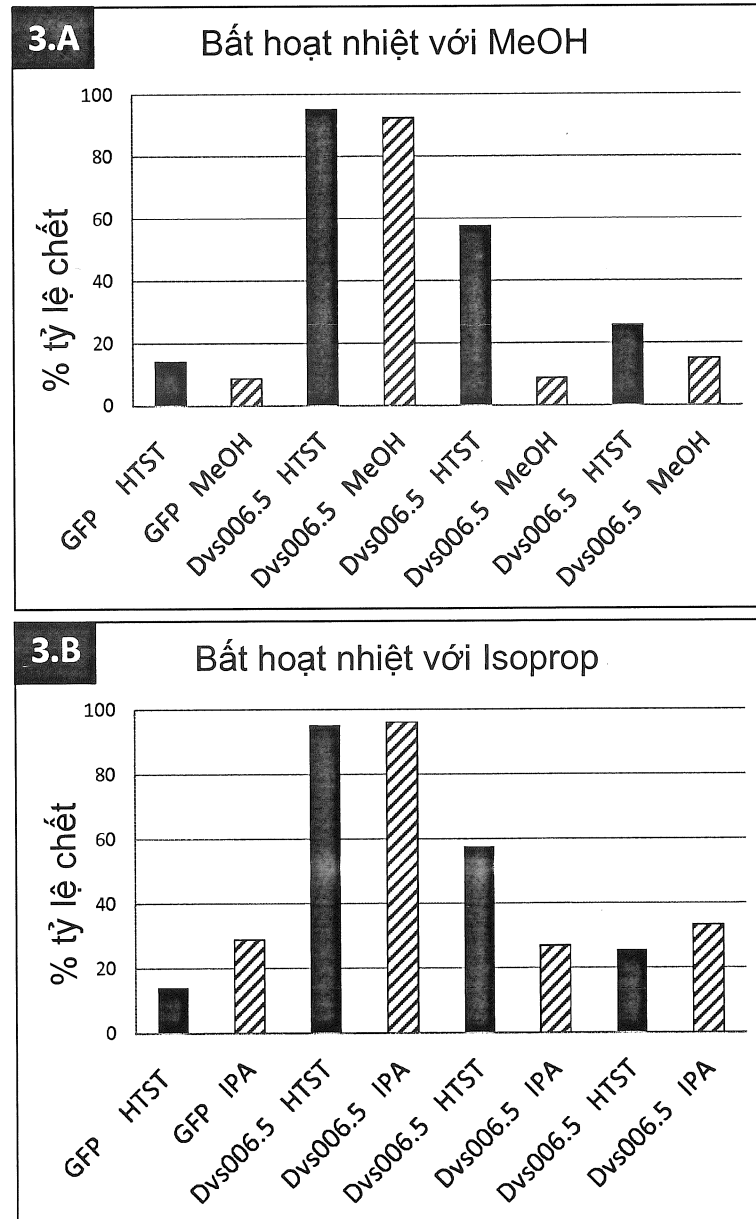


2/5

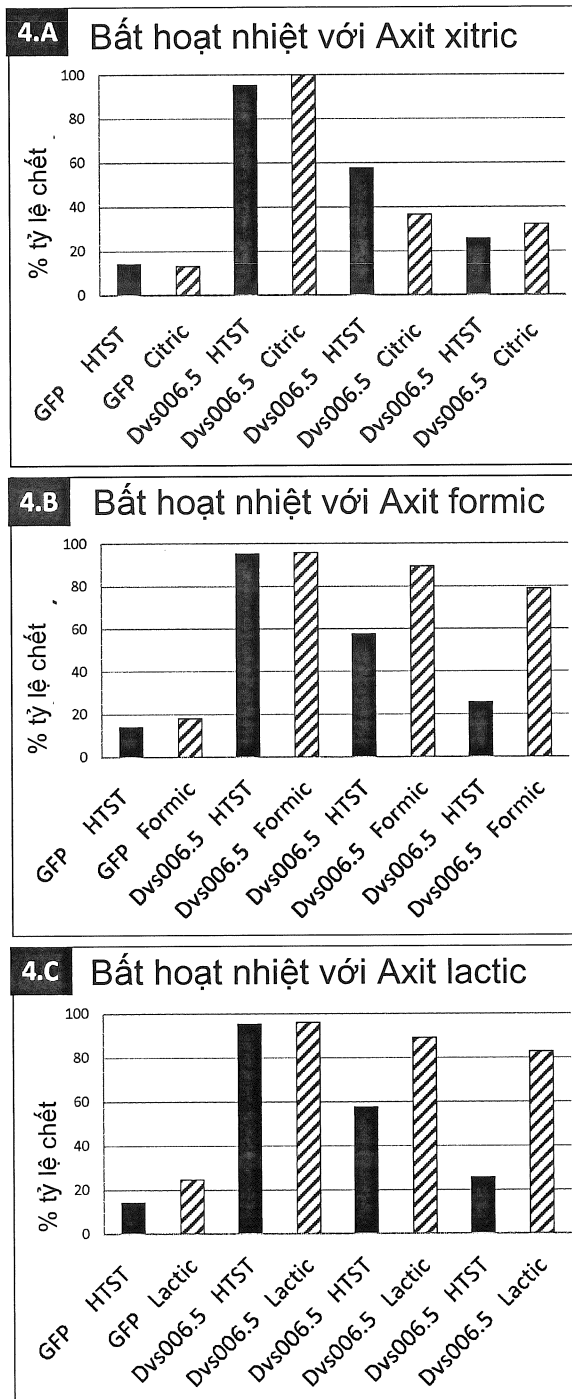
Hình 2



Hình 3



Hình 4



Hình 5

