



(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)



2-0003288

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

(13) **Y**

(21) 2-2020-00572

(22) 12/11/2020

(45) 25/08/2023 425

(43) 25/01/2021 394

(73) **VIỆN CÔNG NGHỆ SINH HỌC (VN)**
18 Hoàng Quốc Việt, Cầu Giấy, Hà Nội

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

(54) **CHŨNG VI KHUẨN BACILLUS THURINGIENSIS SEROVAR AIZAWAI TRC5.4
THUẦN KHIẾT VỀ MẶT SINH HỌC MANG GEN MÃ HÓA PROTEIN ĐỘC TỔ
CRY1BE DIỆT SÂU ĐỤC QUẢ ĐẬU TƯƠNG**

(57) Giải pháp hữu ích đề cập đến chủng vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* serovar *aizawai* TrC5.4 thuần khiết về mặt sinh học phân lập tại Việt Nam, có khả năng sinh tổng hợp tinh thể độc tố Cry1Be diệt côn trùng bộ cánh vẩy - Lepidoptera (*Etiella zinkenella*). Chủng *Bacillus thuringiensis* serovar *aizawai* TrC5.4 theo giải pháp hữu ích mang cấu trúc đoạn gen *cry1Be* có kích thước 2106bp mã hóa protein tinh thể độc tố Cry1Be diệt sâu đục quả đậu tương *Etiella zinkenella*. Giải pháp hữu ích cũng đề cập đến trình tự ADN mã hóa protein tinh thể độc tố Cry1Be từ chủng *Bacillus thuringiensis* serovar *aizawai* TrC5.4 có kích thước 2106bp, mã hóa 702 axit amin sản sinh một protein tinh thể độc tố 79 kDa đã được đăng ký trên ngân hàng gen Quốc tế với mã số MN725075.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Giải pháp hữu ích đề cập đến chủng vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* serovar *aizawai* TrC5.4 thuần khiết về mặt sinh học phân lập từ đất tại Trại Cau tỉnh Thái Nguyên, Việt Nam có khả năng sinh tổng hợp protein độc tố Cry1Be diệt ấu trùng bộ cánh vẩy (Lepidoptera), cụ thể là sâu đục quả đậu tương (loài *Etiella zinckenella*) và mang trình tự gen *cry1Be* mã hóa protein độc tố từ chủng này.

Tình trạng kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Trong các loài sâu hại đậu tương thì sâu đục quả (*Etiella zinckenella*) phân bố rộng rãi và gây hại trên nhiều loài ký chủ như: các cây họ đậu, cây linh lăng, v.v., trong đó đậu tương là ký chủ ưa thích của chúng. Đây là loài sâu hại quan trọng trên đậu tương ở nhiều vùng trồng đậu trên thế giới và phổ biến ở Đông Nam. Ở Iran, thiệt hại do sâu đục quả đến 40%, Đài Loan là 10-15%, trong khi đó ở Indonesia lên tới 80%, ở Philippines là 57%. Tại Việt Nam, thiệt hại do sâu đục quả tới năng suất lên đến 70-80% nếu không được phòng trừ hợp lý. Tùy điều kiện địa lý, khí hậu mà sâu hại đậu tương ở mỗi một nước có đặc trưng về loài và mức độ phá hoại riêng. Vùng Đông nam nước Mỹ, đậu tương bị phá hại bởi 4 loài sâu chính: sâu đo *Pseudoplusia includens*, sâu xanh *Helicoverpa zea*, sâu đục thân *Elasmopalpus lignosellus*, sâu ăn lá *Anticarsia gemmatilis* (Walker và cộng sự, 2000). Vùng Đông và Đông nam Châu Á, đậu tương bị tấn công bởi nhiều loài sâu chính: *Helicoverpa armigera*, *Spodoptera litura*, *S. exigua* phá hại lá giai đoạn đầu vụ; rệp *Bemisia tabaci*, *Megalurothrips usitatus* và *Edwardsiana avescens* chích hút lá; sâu cuốn lá *Omiodes indicata* gây hỏng lá nghiêm trọng; và sâu đục quả *Etiella zinckenella*, *Maruca vitrata* phá hại nghiêm trọng năng suất đậu vào cuối vụ (Srinivasan và cộng sự, 2009). Ở Việt Nam, theo thống kê thì có 3 nhóm sâu chính: sâu bộ cánh vẩy (Sâu đục quả *Etiella zinckenella*, *Maruca vitrata*; sâu ăn lá hoa: sâu xanh *Helicoverpa armigera*, sâu xanh da láng *Spodoptera exigua*, sâu khoang *Spodoptera litura*, sâu cuốn lá *Omiodes indicata*), sâu bộ hai cánh (dòi đục gốc *Ophiomyia phaseoli*, dòi đục thân *Melanagromyza sojae*) và bộ cánh ngửa (rệp *Aphis craccivora* Koch, *Aphis glycines* Matsumura).

Triệu chứng gây hại của sâu đục quả rất rõ, thậm chí khi không có sự hiện diện của sâu non. Quả đậu xuất hiện đốm nâu, đây là vị trí mà sâu đục vào quả. Trong quá trình gây hại sâu non thải ra phân làm cho quả đậu trở nên xốp và bị thối từng đám.

Hạt bị ăn hết từng phần hoặc cả hạt, chỉ còn lại những màng như sợi tơ ở trong quả. Tỷ lệ bị hại càng tăng khi quả phát triển, mức độ thiệt hại trên hạt do sâu đục quả đậu tương không bị ảnh hưởng bởi số lần phun thuốc trừ sâu của nông dân.

Nhiều biện pháp khác nhau đã thực hiện nhằm hạn chế sự tàn phá của sâu bệnh. Một trong những biện pháp được sử dụng rộng rãi đó là sử dụng thuốc trừ sâu hóa học. Bên cạnh những lợi ích của thuốc trừ sâu hóa học đem lại như khả năng trừ sâu bệnh nhanh chóng ở phạm vi rộng lớn thì nó còn bộc lộ những hạn chế như: chúng có thể tiêu diệt cả côn trùng có ích và vi sinh vật ký sinh trên sâu bọ có hại, gây độc cho con người, động vật, phá hủy cân bằng sinh thái, môi trường. Xa hơn nữa sâu bệnh có thể kháng lại khi ta sử dụng một loại thuốc hóa học nhiều lần. Do vậy một biện pháp an toàn và hiệu quả nhất là dùng thuốc trừ sâu sinh học, chúng có tác dụng tiêu diệt hiệu quả mầm bệnh, lại vừa thân thiện với con người, môi trường sinh thái. Vì vậy, việc sử dụng các tác nhân sinh học như vi rút, vi khuẩn, vi nấm hay các hợp chất tự nhiên có hoạt tính sinh học mạnh để phòng trừ sâu bệnh cho cây trồng là rất hữu ích và cần thiết, trong đó thuốc trừ sâu vi sinh đã và đang được lựa chọn. Trong số thuốc trừ sâu vi sinh hiện nay thì thuốc trừ sâu BT (thuốc có nguồn gốc từ vi khuẩn *Bacillus thuringiensis*), với những ưu điểm an toàn đối với cây trồng, môi trường, động vật và con người nên được lựa chọn. Chế phẩm sinh học BT diệt côn trùng chiếm tới 90% thị trường thuốc trừ sâu sinh học. Mặc dù được coi là thuốc trừ sâu vi sinh hiệu quả nhưng có một số hạn chế nhất định về phương diện sinh học như thời gian ảnh hưởng ngắn, không tiếp xúc được côn trùng ẩn sâu dưới lá, đất, đặc biệt đối với sâu đục quả... nên đã làm giảm mức độ sử dụng chế phẩm BT. Những điểm bất lợi này hoàn toàn được loại trừ khi chuyển gen từ vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* vào cây trồng. Vì vậy, sự phát triển các cây trồng chuyển gen kháng sâu có ý nghĩa rất lớn. Các nhà khoa học trên thế giới rất quan tâm nghiên cứu tìm ra gen mới kháng đặc hiệu đối với các loại côn trùng khó tiếp xúc như sâu đục quả để khai thác ứng dụng trong chuyển gen vào cây trồng nhằm giảm thiểu những thiệt hại do sâu đục quả gây ra.

Hầu hết các gen kháng côn trùng trong công nghệ gen thực vật có nguồn gốc từ vi khuẩn, trong đó, gen *cry* mã hóa protein tinh thể độc có hoạt tính diệt côn trùng của vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* được sử dụng phổ biến nhất để chuyển và biểu hiện hiệu quả ở hàng loạt cây trồng quan trọng. 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 *Bacillus thuringiensis* (*cry*, *vip*, *cyt*) đã được nghiên cứu. Năm 1985, cây thuốc lá đầu tiên trên thế giới được chuyển gen *cry* của vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* để diệt sâu đã mở ra kỷ nguyên chọn tạo giống cây trồng biến đổi gen mang các tính trạng mong muốn. Hiện nay, độc tố *Bacillus thuringiensis* bao gồm khoảng 800 gen mã hoá, chúng được phân loại thành 80 họ chính. Các loại độc tố

của *Bacillus thuringiensis* khác nhau về tính đặc hiệu đối với từng loại côn trùng thuộc bộ cánh vảy (Lepidoptera), bộ hai cánh (Diptera), bộ cánh cứng (Coleoptera), tuyến trùng (Nematoda), v.v., (Crickmore, 2020).

Trong quá trình sinh trưởng và phát triển, vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* có khả năng sinh ra 3 loại protein độc tố diệt côn trùng chính là Cry (crystal δ endotoxin), Cyt (Cytolysin), Vip (Vegetative Insecticidal Protein) và một số độc tố khác như hemolysin, enterotoxin, chitin, v.v.. Các protein độc tố này diệt côn trùng bằng cách gây độc hệ tiêu hóa của côn trùng mẫn cảm. Trong đó, độc tố Cry là họ độc tố quan trọng và ứng dụng nhiều nhất trong sản xuất thuốc trừ sâu BT và chuyển gen kháng sâu vào cây trồng. Độc tố Cry của *Bacillus thuringiensis* được mã hoá bởi các gen cry nằm trên các plasmit. Các plasmit này có mặt trong hầu hết các chủng *Bacillus thuringiensis* với số lượng dao động từ 2 đến 12 trong các chủng nghiên cứu. Ngoài ra, các gen cry cũng có thể nằm trên nhiễm sắc thể ở một số chủng *Bacillus thuringiensis* như chủng kustaki HD1, aizawai 7.29, v.v.. Các gen cry được phân loại dựa trên hoạt tính diệt côn trùng đặc hiệu và sự tương đồng của chuỗi nucleotide. Trên cơ sở này, gen cry và protein tinh thể độc tố diệt sâu được chia làm 6 nhóm chính, trong đó nhóm gen cry1 là nhóm gen được nghiên cứu kỹ nhất. Có đến 20 gen cry1 đã được phân tích trình tự nucleotid, tất cả đều mã hoá tổng hợp protein có trọng lượng phân tử từ 130-140 kDa có độc tính đối với côn trùng cánh vảy (Lepidoptera), điển hình là ấu trùng bướm ngài, côn trùng keo, côn trùng tơ, v.v.. Nhóm gen này được phân thành các nhóm phụ sau: cry1A, cry1B, cry1C, cry1D, cry1E, cry1G, cry1H. Dựa trên độ tương đồng của trình tự axit amin, nhóm cry1B bao gồm các gen cry: 1Ba, 1Bb, 1Bc, 1Bd, 1Be, v.v.. 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 vảy *Maruca vitrata*, *Spodoptera exigua*; gen cry1Ac có thể diệt các loài *Spodoptera exigua*, *Spodoptera litura*, *Omiodes indicata*, *Helicoverpa armigera*, *Helicoverpa zea*, *Pseudoplusia includens*; gen vip3C có thể diệt *Spodoptera litura*, *Helicoverpa armigera*... (Estruch và cộng sự, 1996; Strizhov và cộng sự, 1997; Walker và cộng sự, 2000; Guo Hong Nian và cộng sự, 2003; Ibargutxi và cộng sự, 2008; HernándezMartínez và cộng sự, 2008; Onstad và cộng sự, 2012; Palma và cộng sự, 2012). Tuy nhiên, hiện nay các công bố về gen cry kháng sâu đục quả đậu tương (*Etiella zinkenella*) là chưa có.

Gen cry1Be được Payne và cộng sự phát hiện năm 1998 từ chủng *Bacillus thuringiensis* PS158C2 có kích thước 3684bp, mã hóa protein tinh thể độc tố Cry1Be trọng lượng 130kDa, có khả năng diệt sâu khoang (tỷ lệ chết trên 80%) và sâu tơ (tỷ lệ chết trên 90%). Dựa trên kết quả nghiên cứu này, các tác giả đã xây dựng sáng chế bảo

hệ gen mới mã hóa độc tố diệt côn trùng bộ cánh vẩy và việc sử dụng vật chủ khác để thể hiện độc tố đối với côn trùng bộ cánh vẩy.

Ở Việt Nam, các nghiên cứu về vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* như phân lập, phân loại, sản xuất thuốc trừ sâu, trừ sâu trùng muỗi, diệt một thóc đỏ chủ yếu tập trung vào gen *cry1A*, *cry2*, *cry3*, *cry4* và *cry8*. Ở nước ta chưa có một công trình nào nghiên cứu về gen *cry1Be* nhập ngoại cũng như bản địa.

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 sinh vật tự nhiên phân lập tại Việt Nam có khả năng tạo protein tinh thể độc tố diệt côn trùng bộ cánh vẩy. Cụ thể, giải pháp hữu ích đề cập đến chủng vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* serovar *aizawai* TrC5.4 thuần khiết về mặt sinh học mang gen *cry1Be* mã hóa protein tinh thể độc tố Cry1Be có hoạt tính diệt côn trùng bộ cánh vẩy cao, loài *Etiella zinkenella* và trình tự ADN mã hóa protein tinh thể độc tố Cry1Be 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* serovar *aizawai* TrC5.4 thuần khiết về mặt sinh học có khả năng tạo bào tử và sinh tinh thể độc tố Cry1Be diệt sâu đục quả đậu tương với hoạt tính cao đạt 96,67%. Chủng *Bacillus thuringiensis* serovar *aizawai* TrC5.4 thuần khiết về mặt sinh học mang trình tự ADN của gen *cry1Be* mã hóa protein độc tố Cry1Be diệt sâu đục quả đậu tương.

Theo khía cạnh thứ hai, trình tự ADN mã hóa protein tinh thể độc tố Cry1Be từ chủng *Bacillus thuringiensis* serovar *aizawai* TrC5.4 có kích thước 2106 bp được nêu trong SEQ ID NO:1, mã hóa 702 axit amin sản sinh một protein tinh thể độc tố có trọng lượng 79 kDa đã được đăng ký trên ngân hàng gen Quốc tế, mã số: MN725075.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Hình 1 là hình ảnh mô tả hình thái bào tử và tinh thể độc tố của chủng *Bacillus thuringiensis* serovar *aizawai* TrC5.4 thuần khiết về mặt sinh học chụp dưới kính hiển vi quang học (C: Tinh thể, S: Bào tử). Tinh thể hình lưỡng tháp, bào tử hình elip.

Hình 2 là hình ảnh mô tả điện di protein độc tố tái tổ hợp Cry1Be của chủng *Bacillus thuringiensis* serovar *aizawai* TrC5.4 trên gel SDS - PAGE 12,5% (Cột 1, 2, 3, 4 và 5: Protein tinh thể của chủng TrC5.4; Cột M: protein chuẩn).

Hình 3 là hình ảnh thử khả năng diệt sâu đục quả đậu tương của protein độc tố tái tổ hợp Cry1Be trên môi trường tổng hợp.

Mô tả chi tiết giải pháp hữu ích

Giải pháp hữu ích đề cập đến chủng vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* serovar *aizawai* TrC5.4 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 Cry1Be từ chủng này sẽ được bộc lộ rõ ràng ở đây thông qua các phương án thực hiện giải pháp hữu ích.

- Chủng TrC5.4 thuần khiết về mặt sinh học được phân lập từ mẫu đất vùng trồng chè không sử dụng thuốc trừ sâu BT của khu vực Trại Cau – Thái Nguyên 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^{-7} . Hút 100 μ l dịch pha loãng ở các nồng độ 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} cho vào đĩa petri chứa môi trường MPA (0,5% cao thịt; 1% pepton; 0,5% NaCl và 2% agar; độ pH 7,0-7,2) rồi trải đều dung dịch trên mặt thạch bằng que gạt vô trùng, ở mỗi nồng độ pha loãng cấy lên 3 đĩa môi trường dinh dưỡng, nuôi ở 28°C trong 72 đến 96 giờ. Đã xác định chủng TrC5.4 sinh tinh thể hình lưỡng tháp.

- Chủng vi khuẩn thuần khiết về mặt sinh học được phân loại dưới loài theo 60 typ huyết thanh và đã có phản ứng ngưng kết với typ huyết thanh H7. Như vậy, chủng TrC5.4 thuộc dưới loài *aizawai*.

- Hỗn hợp bào tử và tinh thể của chủng TrC5.4 được thử nghiệm hoạt tính kháng sâu đục quả đậu tương (*Etiella zinckenella*). Đã xác định chủng TrC5.4 thuần khiết về mặt sinh học có hoạt tính diệt sâu đục quả đậu tương cao (96,67%).

- ADN plasmit của chủng *Bacillus thuringiensis* serovar *aizawai* TrC5.4 thuần khiết về mặt sinh học đã được tách và khuếch đại gen *cry1Be* bằng cặp mồi đặc hiệu của gen *cry1Be* (5'-TGTAAGTACAACGTAAAAGGAGGAA-3' và 5'-CAAGCAGAATTCATCCGATAAAC-3'). Kết quả thu được đoạn gen mã hóa protein tinh thể độc tố của chủng TrC5.4 có kích thước 2106bp.

- Đoạn gen 2106 bp mã hóa protein tinh thể độc tố của chủng TrC5.4 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-cry1Be.

- Gen *cry1Be* trong plasmit tái tổ hợp pJET1.2-cry1Be được xác định trình tự theo phương pháp của Sanger và đồng tác giả trên máy xác định trình tự ADN tự động ALP Express sử dụng các đoạn mồi gắn huỳnh quang và bộ hóa chất chuẩn để nhân gen bằng PCR của hãng Amersham Pharmacia Biotech. Các số liệu được xử lý trên phần mềm PC GENE (Thụy Sĩ). Phần mềm PC GENE cho phép thực hiện được hơn 70 chương trình phân tích trình tự ADN và protein: cấu trúc, so sánh trình tự, giải mã, xác định điểm cắt enzym hạn chế, v.v.. Trình tự nucleotide của gen *cry1Be* được phân tích bằng phần mềm PC GENE đã xác định đoạn gen *cry1Be* có kích thước 2106 bp

mã hóa protein Cry1Be gồm trình tự 702 axit amin với trọng lượng phân tử tính toán theo lý thuyết là 79 kDa. Trình tự nucleotit của gen *cry1Be* từ chủng *Bacillus thuringiensis* serovar *aizawai* TrC5.4 thuần khiết về mặt sinh học đã được đăng ký trên ngân hàng gen Quốc tế với mã số MN725075.

- Đoạn gen *cry1Be* từ chủng TrC5.4 được biểu hiện protein trong vi khuẩn *E. coli* nhằm thu được protein độc tố tái tổ hợp có hoạt tính để khẳng định hoạt tính diệt sâu đục quả đậu tương của gen này. Đoạn gen 2,1 kb được cắt khỏi plasmid tái tổ hợp pJET1.2-cry1Be và gắn vào vectơ biểu hiện pET32a(+) bởi 2 enzym giới hạn *Bam*HI và *Hind*III. Vectơ tái tổ hợp pET32a- *cry1Be* được biến nạp vào tế bào *E. coli* chủng BL21(DE3). Các khuẩn lạc mang vectơ 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 *cry1Be* trong chủng *E. coli* tái tổ hợp được kiểm tra trên gel polyacrylamide 12,5%. Protein tái tổ hợp được tinh chế bằng cột sắc ký ái lực Probond™ Nickel-Chelating Resin (Invitrogen) và được định lượng theo phương pháp Bradford (1976) dựa vào phản ứng bắt màu giữa protein và thuốc nhuộm Coomassie Blue, sử dụng albumin huyết thanh bò (BSA) như protein chuẩn. Kết quả thu được protein tái tổ hợp tinh sạch có trọng lượng phân tử 97 kDa (79 kDa của protein Cry1Be và 18,5 kDa của protein Trx-His-Stag dung hợp của vectơ pET32a(+)) và lượng protein Cry1Be tái tổ hợp tinh sạch có nồng độ trung bình là 329 µg/ml.

- Thử nghiệm hoạt tính kháng sâu đục quả đậu tương của protein tái tổ hợp Cry1Be. Tiến hành 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 Cry1Be là 241,2 µg/ml.

Điểm khác biệt của chủng *B. thuringiensis* serovar *aizawai* TrC5.4 thuần khiết về mặt sinh học trong giải pháp hữu ích là: Đây là chủng tự nhiên được phân lập tại Việt Nam mang trình tự đoạn gen *cry1Be* 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 *cry1Be* có khả năng diệt sâu đục quả đậu tương tính đến nay. Đoạn gen mã hóa có kích thước 2106 bp mã hóa cho một trình tự 702 axit amin để tạo thành một protein có trọng lượng phân tử là 79 kDa. Khi sử dụng vật chủ khác (vi khuẩn *E. coli*) thì protein độc tố vẫn thể hiện hoạt tính diệt sâu đục quả đậu tương với tỷ lệ gây chết sâu cao đạt 96,67%. Kết quả này mở ra một hướng mới là ứng dụng nguồn gen vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* bản địa trong sản xuất thuốc trừ sâu BT và tạo giống cây trồng biến đổi gen ở Việt Nam nhằm tiến tới một nền sản xuất nông nghiệp xanh - sạch – bền vững.

Chủng *Bacillus thuringiensis* serovar *aizawai* TrC5.4 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 KHCNVN ở các điều kiện khác nhau như: trong điều kiện lạnh sâu -80°C , trong nitơ lỏng và đông khô.

Ví dụ thực hiện giải pháp hữu ích

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

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

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^{-7} . Hút 100 μl dịch pha loãng cho vào đĩa petri chứa môi trường MPA rồi trải đều dung dịch trên mặt thạch bằng que gạt vô trùng, ở mỗi nồng độ pha loãng cấy lên 3 đĩa môi trường dinh dưỡng, nuôi ở 28°C trong 72 đến 96 giờ. Sau đó, quan sát khả năng hình thành tinh thể trên kính hiển vi đôi pha hoặc kính hiển vi quang học. Đã xác định chủng *Bacillus thuringiensis* serovar *aizawai* TrC5.4 thuần khiết về mặt sinh học sinh tinh thể hình lưỡng tháp. Thành phần môi trường MPA (gram/lít): NaCl 5g, cao thịt 5g, pepton 10g, agar 20g, độ pH 7.

Ví dụ 2: Xác định dưới loài của chủng *Bacillus thuringiensis* serovar *aizawai* TrC5.4 thuần khiết về mặt sinh học bằng phản ứng huyết thanh

Các chủng vi khuẩn thuần khiết về mặt sinh học sau khi phân lập có tinh thể hình lưỡng tháp được cấy vào trong ống craige, ống craige là ống thủy tinh nhỏ, được cắm thẳng đứng vào môi trường craige chứa trong ống nghiệm to. Thời gian nuôi là 18 giờ đến 24 giờ và nhiệt độ nuôi là 28°C . *Bacillus thuringiensis* là vi khuẩn có khả năng chuyển động sẽ di chuyển lên phía trên bề mặt môi trường giữa ống craige và ống nghiệm. Cấy chuyển những tế bào này vào ống craige một lần nữa. Khi vi khuẩn phát triển trên ống craige với thời gian chuyển động là 16-18 giờ thì cấy được vào ống nghiệm chứa khoảng 2ml môi trường MPB rồi nuôi lắc với tốc độ 70 vòng/phút từ 8-12 giờ.

Phản ứng ngưng kết giữa vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* với type huyết thanh H7 được quan sát trên kính hiển vi: lấy 2 μl dịch nuôi nhỏ lên phiến kính lõm để kiểm tra khả năng chuyển động của vi khuẩn, sau đó nhỏ tiếp 2 μl huyết thanh H7 chuẩn có độ pha loãng 100 lần và quan sát dưới kính hiển vi. Huyết thanh H7 sẽ gây ra hiện tượng ngưng kết với vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* làm cho vi khuẩn mất khả năng chuyển động hoàn toàn. Đã xác định chủng TrC5.4 thuần khiết về mặt sinh học thuộc dưới loài *aizawai*.

Thành phần các môi trường (gram/lít)

Thành phần	Môi trường Craige	Môi trường MPB
------------	-------------------	----------------

NaCl	5	5
Cao thịt		3-5
Pepton	3-5	10
Bacto agar	10	
Nước cất	1	1
pH	7	7

Ví dụ 3: Phân lập gen và xác định trình tự ADN của gen *cry1Be* của chủng *Bacillus thuringiensis* serovar *aizawai* TrC5.4

ADN tổng số của chủng vi khuẩn thuần khiết về mặt sinh học được tách chiết theo phương pháp của Mayjonade và cộng sự (2018). Thu tế bào vi khuẩn từ 2 ml dịch nuôi cấy qua đêm bằng cách ly tâm ở 5000 vòng/phút trong 10 phút ở nhiệt độ phòng. Bổ sung 600 µl đệm chiết (PVP 1%, Na₂S₂O₅ 1%, NaCl 0,5 M, Tris 100 mM, EDTA 50 mM, SDS 1,25%) đã được làm ấm tới 65°C và 4 µl RNase (100 mg/ml), lập tức trộn đều bằng cách hút lên xuống 10 lần bằng pipet với đầu tip to, tránh sử dụng vortex vì sẽ làm đứt gãy ADN. Ủ mẫu ở 50°C trong 30 phút, cứ 10 phút đảo ống mẫu 20 lần giúp đồng nhất dịch phá tế bào. Bổ sung 200µl Kali acetat 5M, đảo ống 20 lần, ủ mẫu ở 4°C để tủa hoàn toàn protein. Ly tâm 5000 vòng/phút trong 10 phút ở 4°C, chuyển dịch nổi sang ống 2 ml mới. Bổ sung 1 lượng thể thích tương đương đệm gắn (PEG8000 20%, NaCl 3M) và 1/18 thể tích dung dịch hạt từ Serapure (hạt từ Sera-Mag SpeedBead đã được carboxyl hóa (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, USA) 2%, PEG8000 18%, NaCl 1M, Tris-HCl 10 mM pH 8, EDTA 1 mM pH 8, Tween 20 0,05%), trộn đều bằng cách đảo ống 20 lần, ủ mẫu ở nhiệt độ phòng trong 10 phút. Ly tâm nhanh trong 1 giây, đặt ống trên rack từ 3 phút đến khi dịch trong ống trở nên trong suốt. Loại bỏ dịch mà không phá vỡ tủa hạt từ. Bổ sung 1 ml đệm rửa (Etanol 75%), lấy ống khỏi rack từ và đảo ống 20 lần. Ly tâm nhanh trong 1 giây, đặt ống trên rack từ và đợi 30 giây đến khi dịch trong ống trong trở nên suốt, hút bỏ đệm rửa. Lặp lại bước rửa này thêm 1 lần nữa. Sau đó làm khô tủa hạt từ trong 1 phút. Bổ sung 150µl đệm EB đã được làm ấm 50°C, búng thành ống để hạt từ phân tán đều trong đệm. Ly tâm nhanh 1 giây và đặt ống trên rack từ, chờ đến khi dịch trở nên trong suốt, hút dịch ADN chuyển sang ống mới.

Phân tử ADN tách từ chủng TrC5.4 được sử dụng để khuếch đại đoạn 2,1 kb của gen *cry1Be* bằng kỹ thuật PCR sử dụng cặp mồi đặc hiệu của gen *cry1Be* (5'-TGTAAGTACAACGTAAAAGGAGGAA -3' và 5'-CAAGCAGAATTCATCCGATAAAC -3'). 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 2,1 kb. Phân đoạn ADN 2,1-kb được gắn

vào vector tách dòng pJET1.2/blunt và biến nạp vào vi khuẩn *E. coli* DH10B. Các plasmid tái tổ hợp được đặt tên là pJET1.2-cry1Be. Khuẩn lạc được dự đoán có mang vector tái tổ hợp được nuôi trong môi trường LB lỏng có bổ sung Ampicilin nồng độ 50µg/ml và tách ADN plasmid để kiểm tra sự có mặt của gen. ADN plasmid tái tổ hợp được kiểm tra bằng kỹ thuật PCR và xử lý với enzym giới hạn. Trình tự gen *cry1Be* được xác định theo phương pháp của Sanger và cộng sự trên máy xác định trình tự ADN tự động ALP Express sử dụng các đoạn mồi gắn huỳnh quang và bộ hóa chất chuẩn để nhân gen bằng PCR của hãng Amersham Pharmacia Biotech. Các số liệu được xử lý trên phần mềm PC GENE (Thụy Sĩ), đã xác định đoạn gen *cry1Be* có kích thước 2106 bp mã hóa trình tự 702 axit amin với trọng lượng phân tử tính toán theo lý thuyết là 79 kDa. Kết quả cho thấy, trình tự đoạn gen *cry1Be* được tách từ chủng TrC5.4 có độ tương đồng 100% so với gen *cry1Be1* được công bố trên ngân hàng gen.

Ví dụ 4: Biểu hiện gen *cry1Be* của chủng *Bacillus thuringiensis* serovar *aizawai* TrC5.4 trong *E. coli* BL21(DE3).

Đoạn gen 2,1 kb được cắt khỏi plasmid tái tổ hợp pJET1.2-cry1Be và gắn vào vector biểu hiện pET32a(+) bởi 2 enzym giới hạn *Bam*HI và *Hind*III. Vector tái tổ hợp pET32a-cry1Be được biến nạp vào tế bào *E. coli* chủng BL21(DE3). Sản phẩm biến nạp được nuôi cấy trên đĩa môi trường LBA có bổ sung Ampicilin 50 µg/ml, 37°C trong khoảng 14-16 giờ; sau đó được kiểm tra bằng colony-PCR. Những khuẩn lạc mang vector tái tổ hợp được biểu hiện trong môi trường có chất cảm ứng là IPTG 0,1mM, 28°C trong 16 giờ. Khả năng biểu hiện gen *cry1Be* trong chủng *E. coli* tái tổ hợp được kiểm tra trên gel polyacrylamide 12,5%. Sản phẩm thu được là protein tái tổ hợp có trọng lượng phân tử 97 kDa.

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

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

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

Ví dụ 5: Thử hoạt tính sinh học

Thử hoạt tính diệt sâu đục quả đậu tương của 2 loại protein độc tố có nguồn gốc từ chủng *Bacillus thuringiensis* serovar *aizawai* TrC5.4 thuần khiết về mặt sinh học:

Hỗn hợp bào tử và tinh thể của chủng TrC5.4, protein độc tố tái tổ hợp tinh sạch và chưa tinh sạch từ chủng *E. coli* BL21(DE3). Đối tượng côn trùng thử nghiệm là sâu đục quả đậu tương (*Etiella zinkenella* – thuộc bộ cánh vẩy).

Chủng TrC5.4 thuần khiết về mặt sinh học được nuôi lắc trong 200 ml môi trường LB, lắc 200 vòng/phút, 72 giờ. Hỗn hợp bào tử và tinh thể được ly tâm thu cặn ở 12.000 vòng/phút, 10 phút. Hòa tan cặn trong 20 ml nước cất khử trùng, thu được dung dịch chứa bào tử và tinh thể.

Chuẩn bị môi trường nhân tạo:

- a) 200g thức ăn tổng hợp + 625 ml nước cất, cho máy xay sinh tố
- b) 20g agar + 375 ml nước cất, đun nóng agar

Trộn b vào a, đảo đều trong máy xay sinh tố

Đổ thức ăn vào các hộp nhựa (dài 9 cm x rộng 6 cm x cao 3,5 cm): 20g/hộp. Để môi trường nguội, cắt môi trường thành các khối vuông nhỏ (2x2mm). Bỏ sung 2ml dịch bào tử và tinh thể của chủng TrC5.4 vào mỗi hộp môi trường (rải đều), để qua đêm cho dịch canh khuẩn thấm đều vào môi trường.

Tiến hành bắt sâu đục quả đậu tương tuổi 2-3 vào các hộp nhựa chứa môi trường đã chuẩn bị. Mỗi hộp 10 con sâu, mỗi công thức lặp lại 3 lần. Song song là đối chứng âm bỏ sung 2ml nước cất vô trùng + 10 sâu tuổi 2-3/hộp môi trường, 3 lần nhắc lại. Chủng TrC5.4 thuần khiết về mặt sinh học có hoạt tính diệt sâu đục quả đậu tương cao, đạt 96,67% sau 5 ngày thử nghiệm.

Thử hoạt tính diệt sâu đục quả đậu tương của protein tái tổ hợp Cry1Be biểu hiện trong vi khuẩn *E. coli* được tiến hành như sau: (1) Nuôi cấy và cảm ứng biểu hiện 150 ml protein tái tổ hợp sao cho OD đạt >2; (2) Ly tâm thu sinh khối protein ở 6000 v/p trong 10 phút; (3) Phá màng bằng siêu âm với 10 ml dung dịch EB trong 15 phút để thu dịch tan chứa protein; (4) Thử hoạt tính diệt sâu đục quả đậu tương của protein tái tổ hợp: 1 cốc thức ăn chứa 20g thức ăn nhân tạo + 1ml dịch protein tái tổ hợp + 10 cá thể sâu thử nghiệm; thí nghiệm được lặp lại 3 lần; song song là các công thức thí nghiệm đối chứng bao gồm: Sinh khối chủng *E. coli* BL21, dung dịch phá mẫu EB và nước vô trùng; Nuôi sâu ở điều kiện nhiệt độ phòng, kết quả sau 5 ngày thử nghiệm, hoạt tính diệt sâu đục quả đậu tương của protein tái tổ hợp đạt 96,67%; Như vậy, sau khi thay đổi vật chủ thì protein độc tố Cry1Be vẫn giữ hoạt tính cao đối với sâu đục quả đậu tương.

Tiến hành tinh sạch bằng cột sắc ký ái lực Probond™ Nickel-Chelating Resin và định lượng theo phương pháp Bradford protein tái tổ hợp Cry1Be. Thử nghiệm hoạt tính diệt sâu theo phương pháp LC₅₀. Protein độc tố được định lượng và pha về các nồng độ thích hợp: 100 – 500 µg/ml: 1 ml dịch protein được trộn đều

với 20 g thức ăn nhân tạo + 5 sâu tuổi 2-3/cốc, thí nghiệm được tiến hành nhắc lại 5 lần/công thức, mỗi lần 20 con sâu/ 4 cốc thức ăn nhân tạo; các công thức đối chứng: sinh khối chủng *E. coli* BL21, dung dịch rửa giải EB và nước vô trùng; Tỷ lệ sâu chết được tính trung bình ở các công thức thí nghiệm với 5 lần nhắc lại; Số liệu thống kê được xử lý, tính toán LC_{50} theo phương pháp thống kê và phân tích phương sai (ANOVA). Kết quả thu được LC_{50} của protein tinh thể độc tố Cry1Be đối với sâu đục quả đậu tương là 241,2 $\mu\text{g/ml}$.

Hiệu quả đạt được của giải pháp hữu ích

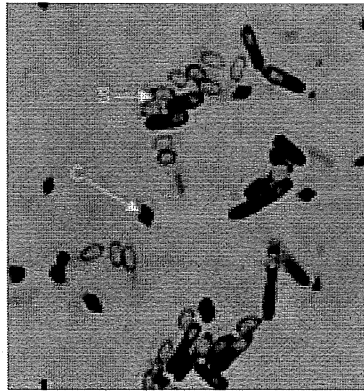
Chủng vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* serovar *aizawai* TrC5.4 thuần khiết về mặt sinh học là chủng đầu tiên được phân lập tại Việt Nam mang gen *cry1Be*, có khả năng tạo bào tử và sinh tổng hợp tinh thể độc tố Cry1Be diệt sâu đục quả đậu tương (*Etiella zinkenella*) - là loại côn trùng khó phòng trừ 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 *cry1Be* kháng sâu đục quả đậu tương (*Etiella zinkenella*). Chủng *Bacillus thuringiensis* serovar *aizawai* TrC5.4 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*).

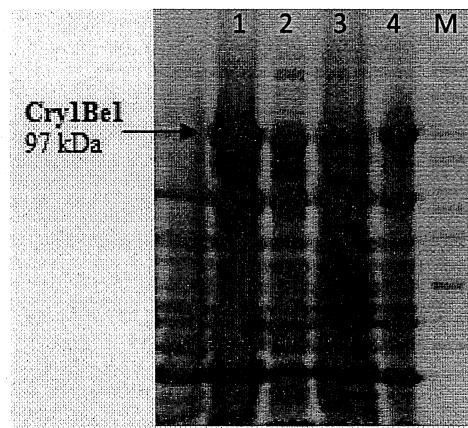
Chủng *Bacillus thuringiensis* serovar *aizawai* TrC5.4 thuần khiết về mặt sinh học có tiềm năng ứng dụng làm nguyên liệu trong sản xuất chế phẩm sinh học BT và trong công tác tạo giống cây trồng biến đổi gen kháng côn trùng cánh vẩy (cụ thể là sâu đục quả đậu) tại Việt Nam - là một thay thế khả thi cho việc kiểm soát côn trùng gây hại trong nông nghiệp, giảm thiểu lượng thuốc trừ sâu hóa học, đảm bảo an toàn môi trường sinh thái và sức khỏe cho người, vật nuôi.

YÊU CẦU BẢO HỘ

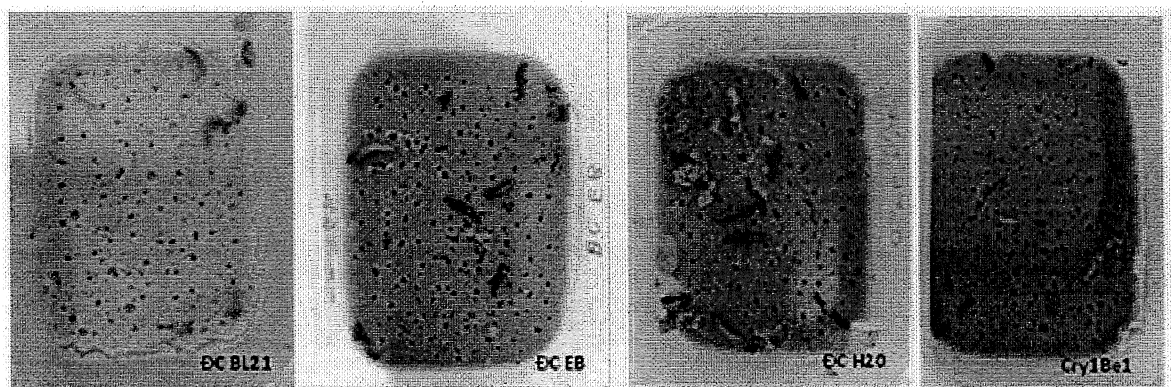
1. Chúng *Bacillus thuringiensis* serovar *aizawai* TrC5.4 thuần khiết về mặt sinh học được phân lập ở đất tại Trại Cau tỉnh Thái Nguyên, Việt Nam mang gen mã hóa protein độc tố Cry1Be diệt sâu đục quả đậu tương có khả năng tạo bào tử và sinh tổng hợp protein tinh thể độc tố diệt sâu đục quả đậu tương (*Etiella zinkenella*) - ấu trùng bộ cánh vẩy (Lepidoptera), trong đó chủng này mang trình tự nucleotit của gen *cry21Be* được thể hiện trong SEQ ID NO:1 có kích thước 2106 bp, mã hóa 702 axit amin tạo protein độc tố Cry1Be được thể hiện trong SEQ ID NO:2 và đã được đăng ký trên Ngân hàng gen quốc tế với số hiệu MN725075.



Hình 1



Hình 2



Hình 3

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Viện Công nghệ sinh học

<120> CHŨNG VI KHUẨN BACILLUS THURINGIENSIS SEROVAR AIZAWAI
TRC5.4 THUẦN KHIẾT VỀ MẶT SINH HỌC MANG GEN MÃ HÓA PROTEIN
ĐỘC TỔ CRY1BE DIỆT SÂU ĐỤC QUẢ ĐẬU TƯƠNG

<160> 1

<210> SEQ ID NO:1

<211> 2106

<212> ADN

<213> *Bacillus thuringiensis* serovar *aizawai* TrC5.4

<400>

```

1  tgaagtaca acgtaaaagg aggaattata ttgacttcaa ataggaaaa tgagaatgaa
61  attataaatg ctttatcgat tccagctgta tgaatcatt ccgcacaaat gaatctatca
121 accgatgctc gtattgagga tagcttgtgt atagccgagg ggaacaatat cgatccattt
181 gtagcgcat caacagtcga aacgggtatt aacatagctg gtagaatact aggtgtatta
241 ggcggtaccgt ttgctggaca aatagctagt tttatagtt ttctgttgg tgaattatgg
301 ccccgcgga gagatccttg ggaaatttc ctagaacatg tgaacaact tataagacaa
361 caagtaacag aaaatactag ggatacggct ctgctcgat tacaaggttt aggaaattcc
421 ttagagcct atcaacagtc acttgaagat tggctagaaa accgtgatga tgcaagaacg
481 agaagtgctc ttataccca atatagacc ttagaacttg atttcttaa tgcgatgccg
541 ctttcgcaa ttagaaacca agaagttcca ttattaatgg tatatgctca agctgcaaat
601 ttacacat tatatttag agatgcctct cttttgga gtgaattgg gcttacatcc
661 caagaaatc aacgttatta tgagcgcaa gtggaaaaa cgagagaata ttctgattat
721 tgcgcaagat ggtataatac gggtttaat aattgagag ggacaaatgc tgaagttgg
781 ttgcgatata atcaattccg tagagactta acgctaggag tattagatct agtggcacta
841 ttcccaagct atgacacgcg tgttatcca atgaatacca gtgctcaatt aacaagagaa
901 atttatacag atccaattgg gagaacaaat gcaccttcag gatttgcaag tacgaattgg
961 ttaataata atgcaccatc gtttctgcc atagaggctg ccgttattag gcctccgat
1021 ctacttgatt ttccagaaca gcttacaatt ttcagcgtat taagtcatg gagtaatact
1081 caatatatga attactgggt gggacataga ctgaaatgc gaacaataag ggggtcatta
1141 agtacctoga cacacggaaa taccatact tctattaatc ctgtaacatt acagttcaca
1201 tctcgagacg ttatagaac agaatcattt gcagggataa atatacttct aactactcct
1261 gtgaatggag tacctgggc tagatttaat tggagaaatc ccctgaattc tcttagaggt
1321 agccttctct atactatagg gtatctgga gtggggacac aactatttga ttcagaaact
1381 gaattaccac cagaacaac agaacgacca aattatgaat ctacagtca tagattatct
1441 aatataagac taatatcagg aaacactttg agagcaccag tatattcttg gacgcaccgt
1501 agtgcagatc gtacaaatac cattagtca gatagcataa cacaataacc attggtaaaa
1561 tcattcaacc ttaattcagg tacttctgta gtcagtggcc caggatttac aggaggggat
1621 ataaccgaa ctaacgttaa tggtagtga ctaagtatgg gtcttaattt taataataca
1681 tcattacagc ggtatcgctg gagagttcgt tatgctgctt ctcaacaat ggtcctgagg
1741 gtaactgtcg gagggagtac tactttgat caaggattcc ctagtactat gagtgcaaat
1801 gagtcttga catctcaatc atttagattt gcagaatttc ctgtaggat tagtgcatct

```

1861 ggcagcaaaa ctgctggaat aagtataagt aataatgcag gtagacaaac gtttcacttt
 1921 gataaaattg aattcattcc aattactgca accctcgaag cagaatatga ttagaaaaga
 1981 gcgcaagagg cgggtgaatgc tctgtttact aatacgaatc caagaagggt gaaaacaggt
 2041 gtgacagatt atcatattga tgaagtatcc aatttagtgg cgtgtttatc ggatgaattc
 2101 tgcttg

<210> SEQ ID NO:2

<211> 702

<212> Protein

<213> *Bacillus thuringiensis* serovar *aizawai* TrC5.4

<400>

CKYNVKGGIILTSNRKNENEIINALSIPAVSNHSAQMNLSTDARIEDSLCIAEGNNIDPFVSASTVQ
 TGINIAGRILGVLGVPFAGQIASFYSLV GELWPRGRDPWEIFLEHVEQLIRQQVTENTRDTALAR
 LQGLGNSFRAYQQSLEDWLENRDDARTRSVLYTQYIALELDFLNAMPLFAIRNQEVPLLMVYAQ
 AANLHLLLLRDASLFGSEFGLTSQEIQRYRQVEKTREYSDYCARWYNTGLNNLRGTNAESWL
 RYNQFRDLTLGVLDLVALFPSYDTRVYPMNTSAQLTREIYTDPIGRTNAPSGFASTNWFNNAP
 SFSAIEAAVIRPPHLLDFPEQLTIFSVLSRWSNTQYMNYWVGHRLSRTIRGSLSTHGTNTSIN
 PVTLQFTSRDVYRTESFAGINILLTPVNGVPWARFNWRNPLNSLRGSLLYTIGYTGVTQLFDSE
 TELPPETTERPNYESYSHRLSNIRLISGNTLRAPVYSWTHRSADRTNTISSDSITQIPLVKSFNLSG
 TSVVSGPGFTGGDIIRTNVNGSVLSMGLNFNNTSLQRYRVRVRYAASQTMVLRVTVGGSTTFDQ
 GFPSTMSANESLTSQSFRFAEFPVGISASGSQTAGISISNAGRQTFHFDKIEFIPITATFEAEYDLER
 AQEAVNALFTNTNPRRLKTGVTDYHIDEVSNLVACL SDEFCL