



(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)



2-0003297

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

(13) **Y**

(21) 2-2020-00574

(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); CHU HOÀNG HÀ (VN).**

(54) **CHŨNG VI KHUẨN BACILLUS THURINGIENSIS SEROVAR KURSTAKI BD8.2
THUẦN KHIẾT VỀ MẶT SINH HỌC MANG GEN MÃ HÓA PROTEIN ĐỘC TỔ
CRY1NA DIỆT SÂU ĐỤC QUẢ ĐẬU TƯƠNG**

(57) Giải pháp hữu ích đề cập đến chủng *Bacillus thuringiensis* serovar *kurstaki* BD8.2 thuần khiết về mặt sinh học phân lập tại Việt Nam, có khả năng sinh tổng hợp protein tinh thể độc tố Cry1Na diệt côn trùng bộ cánh vẩy - Lepidoptera (*Etiella zinkenella*). Chủng *Bacillus thuringiensis* serovar *kurstaki* BD8.2 theo giải pháp hữu ích mang cấu trúc đoạn gen *cry1Na* có kích thước 1920 bp mã hóa protein tinh thể độc tố Cry1Na 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 Cry1Na từ chủng *Bacillus thuringiensis* serovar *kurstaki* BD8.2 có kích thước 1920 bp, mã hóa 640 axit amin sản sinh một protein tinh thể độc tố 71 kDa đã được đăng ký trên ngân hàng gen Quốc tế với mã số MN725076.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Giải pháp hữu ích đề cập đến chủng vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* serovar *kurstaki* BD8.2 thuần khiết về mặt sinh học phân lập ở Việt có khả năng sinh tổng hợp protein độc tố Cry1Na diệt ấu trùng bộ cánh vẩy (Lepidoptera), cụ thể là sâu đục quả đậu tương (loài *Etiella zinkenella*) và mang trình tự gen *cry1Na* mã hóa protein độc tố từ chủng này.

Tình trạng kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Đậu tương là một trong những nhóm cây trồng quan trọng hàng đầu trên thế giới. Đây cũng là loại cây trồng có tác dụng trong việc luân xen canh, cải tạo đất rất hiệu quả. Trong khi sản lượng đậu tương giảm đi đáng kể trong 10 năm trở lại đây, từ mức xấp xỉ 0,3 triệu tấn năm 2005 xuống dưới 0,2 triệu tấn năm 2014 thì nhu cầu đậu tương trong nước lại tăng đột biến, chủ yếu phục vụ sản xuất thức ăn chăn nuôi, khiến lượng đậu tương nhập khẩu tăng cao (khoảng 1,2-1,5 triệu tấn trong 3 năm gần đây). Những con số này cho thấy thị trường tiềm năng cho sản xuất đậu tương trong nước còn rất cao. Tuy nhiên do hình thức sản xuất nhỏ lẻ, thiếu tập trung, khó cơ giới hoá, tự động hoá nên giá thành đậu tương trong nước khó cạnh tranh với đậu tương thế giới. Năng suất đậu tương trung bình của Việt Nam còn thấp, dao động trong khoảng 14-15 tạ/ha, so với thế giới (Hoa kỳ ~24 tạ/ha). Các yếu tố ảnh hưởng đến năng suất bao gồm cỏ dại, năng suất giảm 37%, 11% do các loại mầm bệnh, 1% do virus và 11% do sâu hại. Mức thiệt hại do mầm bệnh và sâu hại khá cao, tương ứng dao động ở 7-16% đối với mầm bệnh và 4-20% đối với sâu hại vì sự khác biệt về sâu hại giữa các vùng, miền (Oerke, 2006). Thiệt hại do sâu bệnh và chi phí bảo vệ thực vật hạn chế đáng kể năng suất và khả năng cạnh tranh của đậu tương sản xuất trong nước.

Sâu hại đậu tương có nhiều loại, có thể kể đến một số sâu hại chính ở đậu tương: Sâu đục quả (*Etiella zinkenella*) gây hại trên nhiều loài ký chủ như các cây họ đậu, cây linh lăng, v.v., *Maruca vitrata* cũng là sâu đục quả gây hại nghiêm trọng trên nhiều cây trồng họ đậu, *Heliothis armigera* phân bố rộng rãi và gây hại nhiều loài thực vật, dòi đục thân đậu tương *Heliothis armigera*, rệp đậu tương (*Aphis glycines*), v.v.. Trong các loài sâu hại đậu tương thì sâu đục quả (*Etiella zinkenella*) phân bố rộng rãi và gây hại ở nhiều vùng trồng đậu trên thế giới: ở Iran, thiệt hại do sâu đục quả đến 40%. Thiệt hại do sâu đục quả gây ra 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).

Ngày nay, có nhiều phương pháp phòng chống sâu đục quả đậu tương khác nhau mà con người áp dụng. Biện pháp diệt sâu đục quả được sử dụng phổ biến nhất là dùng các loại thuốc hóa học. Tuy nhiên, những loại thuốc này có nguồn gốc từ hóa chất nên dễ gây ô nhiễm môi trường và ảnh hưởng đến sức khỏe của con người, động vật, khó diệt trừ tận gốc mầm bệnh, dễ gây tính kháng thuốc đối với côn trùng. Để khắc phục những tồn tại của thuốc diệt sâu hóa học và các phương pháp trồng xen canh truyền thống, cần phải tạo ra những chế phẩm sinh học vừa có tác dụng tiêu diệt hiệu quả mầm bệnh, lại vừa thân thiện với con người và môi trường.

Chế phẩm BT được sử dụng lần đầu tiên vào năm 1930 để kiểm soát loài sâu đục thân có tên *Angasta kuehneli* ở Châu Âu. Sau đó người ta tiếp tục nghiên cứu và phát hiện thấy vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* có khả năng diệt các loài côn trùng thuộc các bộ cánh cứng, cánh vẩy và hai cánh, v.v.. Các chế phẩm thương mại của BT đã được sản xuất với quy mô khác nhau ở nhiều nơi trên thế giới. Trong nhiều năm qua, Việt Nam cũng đạt được nhiều thành tựu trong nghiên cứu, sản xuất các chế phẩm sinh học của *Bacillus thuringiensis* và đưa những kết quả nghiên cứu đó ứng dụng vào đời sống. 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 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 cũng như ở Việt Nam 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. Theo thống kê kết quả công bố trên thế giới, các gen độc tố từ vi khuẩn Bt diệt các loại sâu hại đậu tập trung chủ yếu ở các nhóm gen: *cry1*, *cry2*, *vip*. Có gen có phổ diệt sâu khá rộng. Gen *cry1Ab* có thể diệt được các loài sâu cánh vẩy *Maruca vitrata*, *Spodoptera exigua*; gen *cry1Ac* có thể diệt các loài *Spodoptera exigua*, *Spodoptera litura*, *Omiodes indicata*, *Helicoverpa armigera*, *Helicoverpa zea*, *Pseudoplusia includens*; gen *vip3C* có thể diệt *Spodoptera litura*, *Helicoverpa armigera*... (Estruch và cộng sự, 1996; Strizhov và cộng sự, 1997;

Walker và cộng sự, 2000; Guo Hong Nian và cộng sự, 2003; Ibargutxi và cộng sự, 2008; 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.

Nhóm gen *cry1Na* được các nhà khoa học trên thế giới phát hiện chưa lâu. Gen *cry1Na1* được Sampson và đồng nghiệp phát hiện vào năm 2012 từ chủng *Bacillus thuringiensis* ARP009, gen có kích thước 1890 bp, mã hóa protein gồm 629 axit amin, gen *cry1Na1* đã được đăng ký trên Ngân hàng gen quốc tế với mã số KC156648. Năm 2013, tác giả Liu và đồng nghiệp đã phát hiện ra gen *cry1B-like protein* từ chủng *Bacillus thuringiensis* T03B001, gen có kích thước 1803 bp, mã hóa 601 axit amin, gen *cry1B-like protein* được Ủy ban danh pháp quốc tế Bt - toxin (http://www.lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt/) đặt tên là gen *cry1Na2* và đã đăng ký trên Ngân hàng gen quốc tế với mã số HM439637. Đến năm 2015, Dai và cộng sự đã phân lập được gen *cry1N-like protein* từ chủng *Bacillus thuringiensis* BRC-ZYR2, gen có kích thước 1806 bp, mã hóa 601 axit amin, gen *cry1N-like protein* được Ủy ban danh pháp quốc tế đặt là gen *cry1Na3*. Các gen *cry1Na1*, *cry1Na2* và *cry1Na3* đều mã hóa các protein độc tố diệt côn trùng. Như vậy, các nhà khoa học trên thế giới đã và đang rất quan tâm nghiên cứu về gen *cry1Na* nhằm ứng dụng trong công tác chuyển gen tạo cây trồng biến đổi gen có khả năng kháng sâu bệnh.

Ở nước ta, chưa có một công bố nào nghiên cứu về gen *cry1Na* phân lập ở Việt Nam cũng như nhập ngoại.

Bản chất kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Mục đích của giải pháp hữu ích là giải quyết các vấn đề nêu trên. Để đạt được mục đích đó, giải pháp hữu ích đề cập đến chủng vi khuẩn tự nhiên phân lập tại Việt Nam có khả năng tạo protein tinh thể độc tố diệt côn trùng bộ cánh vẩy. Cụ thể, giải pháp hữu ích đề cập đến chủng vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* serovar *kurstaki* BD8.2 thuần khiết về mặt sinh học mang gen *cry1Na* mã hóa protein tinh thể độc tố Cry1Na có hoạt tính diệt côn trùng bộ cánh vẩy cao, loài *Etiella zinkenella* và trình tự ADN mã hóa protein tinh thể độc tố Cry1Na từ chủng này.

Theo khía cạnh thứ nhất, giải pháp hữu ích đề cập đến chủng *Bacillus thuringiensis* serovar *kurstaki* BD8.2 thuần khiết về mặt sinh học phân lập từ đất tỉnh Điện Biên, Việt Nam có hoạt tính diệt sâu đục quả đậu tương cao. Chủng BD8.2 có khả năng tạo bào tử và sinh tinh thể độc tố Cry1Na diệt sâu đục quả đậu tương với hoạt tính cao đạt 100%. Chủng *Bacillus thuringiensis* serovar *kurstaki* BD8.2 mang trình tự ADN của gen *cry1Na* mã hóa protein độc tố Cry1Na diệt sâu đục quả đậu tương.

Theo khía cạnh thứ hai, trình tự ADN mã hóa protein tinh thể độc tố Cry1Na từ chủng *Bacillus thuringiensis* serovar *kurstaki* BD8.2 có kích thước 1920bp được nêu trong SEQ ID NO:1, mã hóa 640 axit amin sản sinh một protein tinh thể độc tố có trọng lượng 71kDa đã được đăng ký trên ngân hàng gen Quốc tế với mã số: MN725076.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Hình 1 là hình ảnh thể hiện khuẩn lạc chủng *Bacillus thuringiensis* serovar *kurstaki* BD8.2 trên môi trường thạch dinh dưỡng (A), khuẩn lạc hình tròn, màu trắng đục, nhẵn mép; Hình dạng tinh thể từ chủng *Bacillus thuringiensis* serovar *kurstaki* BD8.2 (B) chụp dưới kính hiển vi quang học với độ phóng đại 100 lần, tinh thể hình cầu.

Hình 2 là hình ảnh thử nghiệm hoạt tính diệt sâu đục quả đậu tương của hỗn hợp bào tử và tinh thể từ chủng *Bacillus thuringiensis* serovar *kurstaki* BD8.2.

Hình 3A là hình ảnh điện di sản phẩm khuếch đại gen *cry1Na* trên gel agarosa 0,8% (1), thang ADN chuẩn (M), gen *cry1Na* có kích thước gần 2000 bp; Hình 3B là hình ảnh cắt mở vòng plasmid tái tổ hợp pET32a/*cry1Na* sử dụng cặp enzym giới hạn *HindIII* và *XhoI* (2), Sản phẩm khuếch đại gen *cry1Na* (1) làm đối chứng và thang ADN chuẩn), cắt mở vòng plasmid tái tổ hợp pET32a/*cry1Na* thu được 1 băng kích thước xấp xỉ 2 kb và 1 băng xấp xỉ 6 kb.

Hình 4 là hình ảnh kiểm tra khả năng biểu hiện của protein tái tổ hợp Cry1Na trên gel SDS – PAGE 12,5% (Cột ĐC: đối chứng, M: thang protein chuẩn, T: Protein dạng tan, KT: protein dạng không tan).

Mô tả chi tiết giải pháp hữu ích

Giải pháp hữu ích đề cập đến chủng vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* serovar *kurstaki* BD8.2 tự nhiên, được phân lập từ mẫu đất tỉnh Điện Biên, Việt Nam. Chủng BD8.2 có hoạt tính diệt sâu đục quả đậu tương cao và trình tự ADN mã hóa protein độc tố Cry1Na từ chủng này sẽ được bộc lộ rõ ràng ở đây thông qua các phương án thực hiện giải pháp hữu ích.

- Chủng *Bacillus thuringiensis* serovar *kurstaki* BD8.2 thuần khiết về mặt sinh học được phân lập từ mẫu đất thu thập từ khu vực Điện Biên 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 để loại bỏ tế bào sinh dưỡng. Dịch đã xử lý nhiệt được pha loãng với nước cất vô trùng ở các nồng độ từ 10^{-1} đến 10^{-7} . Hút 100 μ l dịch pha loãng ở nồng độ 10^{-6} và 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 BD8.2 sinh tinh thể hình cầu.

- Chủng *Bacillus thuringiensis* serovar *kurstaki* BD8.2 được phân loại dưới loài theo 60 typ huyết thanh và đã có phản ứng ngưng kết với typ huyết thanh H3a3b – thuộc dưới loài *kurstaki*.

- Hỗn hợp bào tử và tinh thể tự nhiên của chủng *Bacillus thuringiensis* serovar *kurstaki* BD8.2 được thử nghiệm hoạt tính kháng sâu đục quả đậu tương (*Etiella zinkenella*). Đã xác định chủng *Bacillus thuringiensis* serovar *kurstaki* BD8.2 có hoạt tính diệt sâu đục quả đậu tương cao (100%).

- ADN plasmit của chủng *Bacillus thuringiensis* serovar *kurstaki* BD8.2 đã được tách chiết và sử dụng làm khuôn để khuếch đại gen *cry1Na* bằng cặp môi đặc hiệu của gen *cry1Na* (5'- GGATCCAGCCTCATTTTAAAATTATTCCTTTTAAATG -3' và 5'- CTCGAGTTCAACAGGAATAAATTCAATTTTATCC -3'). Kết quả thu được đoạn gen mã hóa protein tinh thể độc tố của chủng *Bacillus thuringiensis* serovar *kurstaki* BD8.2 có kích thước 1920 bp.

- Đoạn gen 1920 bp mã hóa protein tinh thể độc tố của chủng *Bacillus thuringiensis* serovar *kurstaki* BD8.2 được tách dòng trong vector pBT và biến nạp vào vi khuẩn *E. coli* DH5 α . Các plasmit tái tổ hợp được đặt tên là pBT-cry1Na.

- Gen *cry1Na* trong plasmit tái tổ hợp pBT-cry1Na 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 môi gắn huỳnh quang và bộ hóa chất chuẩn để nhân gen bằng PCR của hãng Amersham Pharmacia Biotech. Các số liệu được xử lý trên phần mềm PC GENE (Thụy Sĩ). Trình tự nucleotit của gen *cry1Na* được phân tích bằng phần mềm PC GENE đã xác định đoạn gen *cry1Na* có kích thước 1920 bp mã hóa trình tự 640 axit amin với trọng lượng phân tử tính toán theo lý thuyết là 71 kDa. Trình tự nucleotit của gen *cry1Na* từ chủng *Bacillus thuringiensis* serovar *kurstaki* BD8.2 đã được đăng ký trên ngân hàng gen Quốc tế với mã số MN725076.

- Đoạn gen *cry1Na* từ chủng *Bacillus thuringiensis* serovar *kurstaki* BD8.2 được biểu hiện protein trong vi khuẩn *E. coli* nhằm thu được protein độc tố tái tổ hợp có hoạt tính để kháng định protein do gen *cry1Na* mã hóa vẫn có hoạt tính diệt sâu đục quả đậu tương ngay cả khi thay đổi vật chủ. Đoạn gen 1920 bp được cắt khỏi plasmit tái tổ hợp pBT-cry1Na và gắn vào vector biểu hiện pET32a(+) bởi 2 enzym giới hạn *Hind*III và *Xho*I. Vector tái tổ hợp pET32a-cry1Na được biến nạp vào tế bào *E. coli* chủng BL21(DE3). Các khuẩn lạc mang vector tái tổ hợp pET32a-cry1Na được biểu hiện trong môi trường có chất cảm ứng là IPTG 0,1mM, 28 $^{\circ}$ C trong 16 giờ. Khả năng biểu hiện gen *cry1Na* 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 ProbondTM Nickel-Chelating Resin (Invitrogen) và được định lượng theo Bradford (1976). Kết quả thu được protein tái tổ hợp tinh sạch có trọng lượng phân tử khoảng 90 kDa và lượng protein Cry1Na tái tổ hợp tinh sạch có nồng độ trung bình là 336 μ g/ml.

- Thử nghiệm hoạt tính kháng sâu đục quả đậu tương của protein tái tổ hợp Cry1Na. Tiến hành ở các nồng độ protein thay đổi (từ 100 đến 500 μ g/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 Cry1Na là 285,4 μ g/ml.

Điểm khác biệt của chủng *Bacillus thuringiensis* serovar *kurstaki* BD8.2 trong giải pháp hữu ích là: Đây là chủng tự nhiên được phân lập tại Việt Nam mang trình tự đoạn gen *cry1Na* mã hóa protein tinh thể độc tố diệt sâu đục quả đậu tương *Etiella zinkenella*. Cho đến nay, chưa có một công bố nào về gen *cry1Na* có khả năng diệt sâu

đục quả đậu tương được công bố ở Việt Nam. Đoạn gen mã hóa có kích thước 1920 bp mã hóa cho một trình tự 640 axit amin để tạo thành một protein có trọng lượng phân tử là 71 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 86,67%. 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 *kurstaki* BD8.2 nêu trong giải pháp hữu ích hiện đang được lưu giữ tại Trung tâm Giống và Bảo tồn nguồn gen vi sinh vật – Viện Công nghệ sinh học – Viện Hàn lâm KHCVN ở các điều kiện khác nhau như: trong điều kiện lạnh sâu -80°C, trong nitơ lỏng và đông khô.

Ví dụ thực hiện giải pháp hữu ích

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

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

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 nồng độ 10^{-6} và 10^{-7} cho vào đĩa petri chứa môi trường MPA rồi trải đều dung dịch trên mặt thạch bằng que gạt vô trùng, ở mỗi nồng độ pha loãng cấy lên 3 đĩa môi trường dinh dưỡng, nuôi ở 28°C trong 72 đến 96 giờ. Sau đó, quan sát khả năng hình thành tinh thể trên kính hiển vi đối pha hoặc kính hiển vi quang học. Đã xác định chủng *Bacillus thuringiensis* serovar *kurstaki* BD8.2 sinh tinh thể hình cầu.

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

Ví dụ 2: Xác định dưới loài của chủng *Bacillus thuringiensis* serovar *kurstaki* BD8.2 bằng phản ứng huyết thanh

Các chủng vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* sau khi phân lập có tinh thể hình cầu được cấy vào trong ống Craige, ống craige là ống thủy tinh nhỏ, được cắm thẳng đứng vào môi trường Craige 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 typ huyết thanh H3a3b được quan sát trên kính hiển vi: lấy 2 μ l dịch nuôi nhỏ lên phiến kính lõm để kiểm tra khả năng chuyển động của vi khuẩn, sau đó nhỏ tiếp 2 μ l huyết thanh H3a3b chuẩn có độ pha loãng 100 lần và quan sát dưới kính hiển vi. Chủng vi khuẩn mất khả

năng chuyển động hoàn toàn do huyết thanh gây ra hiện tượng ngưng kết chứng tỏ chủng đó thuộc dưới loài *kurstaki*. Đã xác định chủng *Bacillus thuringiensis* BD8.2 thuộc dưới loài *kurstaki*.

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 *cry1Na* của chủng *Bacillus thuringiensis* serovar *kurstaki* BD8.2

ADN tổng số của chủng *Bacillus thuringiensis* serovar *kurstaki* BD8.2 được tách chiết theo phương pháp của Mayjonade và cộng sự (2018). Phân tử ADN tách từ chủng BD8.2 được sử dụng để khuếch đại đoạn gen *cry1Na* bằng kỹ thuật PCR sử dụng cặp mồi đặc hiệu của gen *cry1Na* (5'-GGATCCAGCCTCATTTTAAAATTATTCCTTTTAAATG -3' và 5'-CTCGAGTTCAACAGGAATAAATTCAATTTTATCC -3'). Phản ứng PCR được thực hiện theo các phương pháp chuẩn được mô tả bởi Sambrook và Russell (2001), với nhiệt độ gắn mồi là 59°C. Kết quả thu được một phân đoạn gen có kích thước khoảng 1,9kb. Phân đoạn ADN 1,9kb được gắn vào vectơ tách dòng pBT và biến nạp vào vi khuẩn *E. coli* DH5 α . Các plasmit tái tổ hợp được đặt tên là pBT-cry1Na. Khuẩn lạc được dự đoán có mang vectơ tái tổ hợp được nuôi trong môi trường LB có bổ sung Ampicilin nồng độ 50 μ g/ml và tách ADN plasmit để kiểm tra sự có mặt của gen bằng cách xử lý với cặp enzym giới hạn *Hind*III, *Xho*I. Trình tự gen *cry1Na* 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 *cry1Na* có kích thước 1920bp mã hóa trình tự 640 axit amin với trọng lượng phân tử tính toán theo lý thuyết là 71kDa. Kết quả cho thấy, trình tự đoạn gen *cry1Na* được tách từ chủng BD8.2 có mã khởi đầu tại vị trí axit amin thứ 12 và không có mã kết thúc. So với gen tham chiếu, gen *cry1Na* có độ tương đồng 100% so với gen *Cry1Na13* và hơn protein tham chiếu 39 axit amin dẫn đầu.

Ví dụ 4: Biểu hiện gen *cry1Na* của chủng *Bacillus thuringiensis* serovar *kurstaki* BD8.2 trong *E. coli* BL21(DE3).

Đoạn gen 1,9 kb được cắt khỏi plasmit tái tổ hợp pBT-cry1Na và gắn vào vectơ biểu hiện pET32a(+) bởi 2 enzym giới hạn *Hin*III và *Xho*I. Vectơ tái tổ hợp pET32a/cry1Na được biến nạp vào tế bào *E. coli* chủng BL21(DE3). Khuẩn lạc BL21 chứa

plasmid tái tổ hợp pET32a/cry1Na được nuôi cấy trong 5 ml môi trường LB lỏng có bổ sung kháng sinh Ampicilin 100 µg/ml ở 37°C, lắc 200 vòng/phút qua đêm. Cấy chuyển 1 ml dịch khuẩn đã nuôi qua đêm sang 100 ml môi trường LB mới và nuôi ở 37°C, lắc 200 vòng/phút đến khi giá trị OD₆₀₀ = 0,6 thì bổ sung IPTG tới nồng độ 100 µM và chuyển sang nuôi lắc 200 vòng/phút ở 28°C trong 16 giờ để cảm ứng biểu hiện protein ngoại lai. Tế bào được thu lại bằng cách ly tâm dịch nuôi cấy ở 6000 vòng/phút trong 15 phút và hòa trong dung dịch đệm PBS 1X. Bổ sung lysozym tới nồng độ 0,1 mg/ml, ủ trên đá 1 giờ và tiến hành siêu âm phá tế bào, sau đó ly tâm 13000 vòng/phút trong 30 phút, thu cả dịch nổi và cặn để kiểm tra bằng phương pháp điện di SDS-PAGE. Sản phẩm thu được là protein tái tổ hợp dạng không tan có trọng lượng phân tử 90 kDa.

Protein tái tổ hợp Cry1Na được tinh sạch bằng cột sắc ký ái lực ProbondTM Nickel-Chelating Resin (hãng 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. Dựng đường cong chuẩn biểu diễn nồng độ protein chuẩn. Hàm lượng protein có trong 1ml dịch ban đầu được xác định theo công thức: $M \text{ (mg)} = c.v.a$ (Trong đó: c: nồng độ protein theo đồ thị 1mg/ml, v: là thể tích dung dịch mẫu cho vào, a: là độ pha loãng dung dịch)

Ví dụ 5: Thử hoạt tính sinh học

Tiến hành thử hoạt tính diệt sâu đục quả đậu tương của 2 loại protein độc tố có nguồn gốc từ chủng *Bacillus thuringiensis* serovar *kurstaki* BD8.2: Hỗn hợp bào tử và tinh thể của chủng BD8.2 và protein độc tố tái tổ hợp từ chủng *E. coli* BL21(DE3). Đối tượng côn trùng thử nghiệm là sâu đục quả đậu tương (*Etiella zinckenella* – thuộc bộ cánh vẩy).

Chủng *Bacillus thuringiensis* serovar *kurstaki* BD8.2 được nuôi lắc trong 200ml môi trường LB, lắc 150 vòng/phút, 96 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. 2ml dịch bào tử và tinh thể của chủng BD8.2 được rải đều vào mỗi hộp môi trường thức ăn nhân tạo (20% thức ăn tổng hợp, 2% agar, nước cất), để qua đêm cho dịch canh khuẩn thấm đều vào môi trường.

Mỗi hộp chứa môi trường đã chuẩn bị thả vào 10 con sâu đục quả đậu tương tuổi 2-3, đối chứng âm: 2ml nước cất vô trùng + 10 sâu tuổi 2-3/hộp môi trường được tiến hành song song với lô thí nghiệm, mỗi công thức lặp lại 3 lần. Sau 5 ngày thử nghiệm, hoạt tính diệt sâu đục quả đậu tương của chủng BD8.2 được ghi nhận là 100%.

Thử hoạt tính diệt sâu đục quả đậu tương của protein tái tổ hợp Cry1Na 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; (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 không chứa vectơ tái tổ hợp, 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 Cry1Na đạt 86,67%. Như vậy, sau khi thay đổi vật chủ thì hoạt tính diệt sâu đục quả đậu tương của protein độc tố Cry1Na tuy có giảm chút ít nhưng vẫn cao.

Protein tái tổ hợp Cry1Na được tinh sạch bằng cột sắc ký ái lực HiTrap và định lượng theo phương pháp Bradford. Để thử nghiệm hoạt tính diệt sâu theo phương pháp LC_{50} , protein độc tố tinh sạch được pha về các nồng độ thích hợp: 100 – 500 $\mu\text{g/ml}$: 1ml dịch protein được trộn đều với 20 g thức ăn nhân tạo + 10 sâu tuổi 2-3/cốc, thí nghiệm được nhắc lại 3 lần/công thức, các công thức đối chứng: sinh khối chủng *E. coli* BL21, dung dịch EB và nước vô trùng; 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 nồng độ gây chết 50% (LC_{50}) của protein tinh thể độc tố Cry1Na đối với sâu đục quả đậu tương là 285,4 $\mu\text{g/ml}$.

Hiệu quả đạt được của giải pháp hữu ích

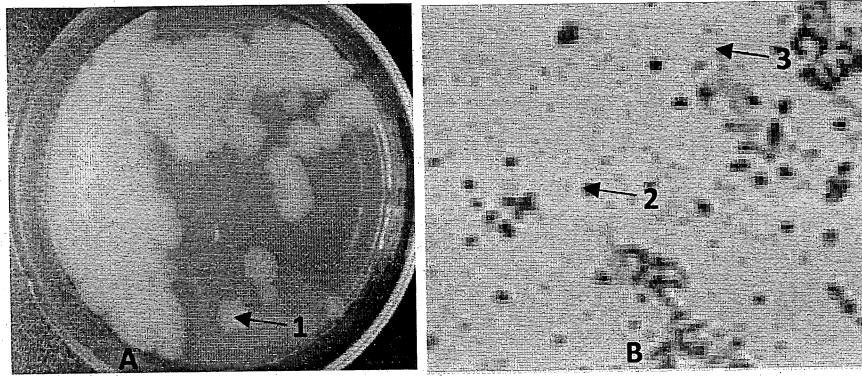
Chủng vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* serovar *kurstaki* B8.2 thuần khiết về mặt sinh học là chủng đầu tiên được phân lập từ đất tại tỉnh Điện Biên - Việt Nam, mang gen *cry1Na*, có khả năng tạo bào tử và sinh tổng hợp protein tinh thể độc tố Cry1Na diệt sâu đục quả đậu tương (*Etiella zinkenella*) - 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 *cry1Na* kháng sâu đục quả đậu tương (*Etiella zinkenella*). Chủng *Bacillus thuringiensis* serovar *kurstaki* B8.2 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*).

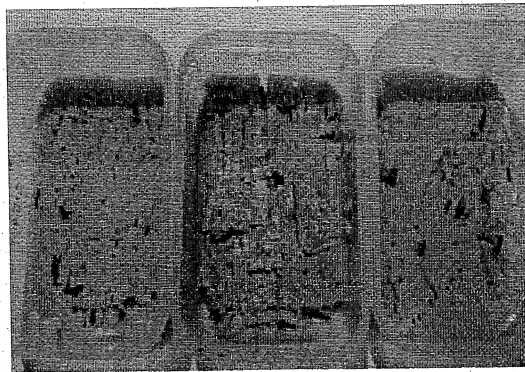
Chủng *Bacillus thuringiensis* serovar *kurstaki* B8.2 thuần khiết về mặt sinh học có tiềm năng ứng dụng làm nguyên liệu trong sản xuất chế phẩm sinh học BT và trong công tác tạo giống cây trồng biến đổi gen kháng côn trùng cánh vẩy (cụ thể là sâu đục quả đậu) tại Việt Nam - là một thay thế khả thi cho 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

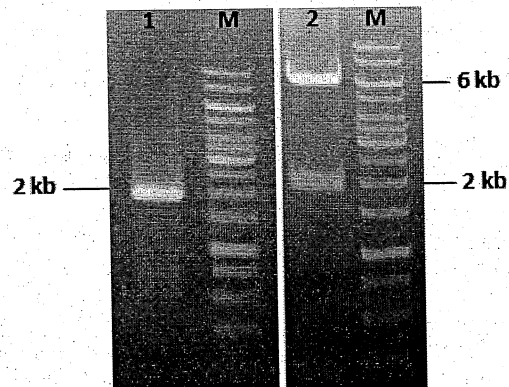
1. Chúng *Bacillus thuringiensis* serovar *kurstaki* BD8.2 thuần khiết về mặt sinh học được phân lập từ đất tại tỉnh Điện Biên - Việt Nam, mang gen mã hóa protein độc tố *cry1Na* diệt sâu đục quả đậu tương có khả năng tạo bào tử và sinh tổng hợp protein tinh thể độc tố diệt sâu đục quả đậu tương *Etiella zinkenella*, trong đó chủng này có trình tự nucleotit của đoạn gen *cry1Na* được thể hiện trong SEQ ID NO:1 có kích thước 1920 bp, mã hóa 640 axit amin tạo protein độc tố Cry1Na được thể hiện trong SEQ ID NO:2 và đã được đăng ký trên Ngân hàng gen quốc tế với số hiệu MN725076.



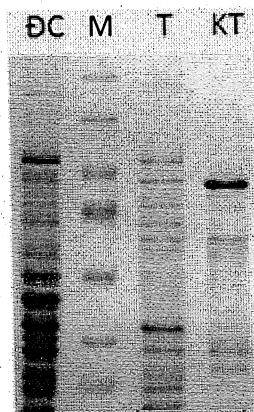
Hình 1



Hình 2



Hình 3



Hình 4

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Viện Công nghệ sinh học

<120> CHŨNG VI KHUẨN *BACILLUS THURINGIENSIS* SEROVAR *KURSTAKI*
BD8.2 THUẦN KHIẾT VỀ MẶT SINH HỌC MANG GEN MÃ HÓA PROTEIN
ĐỘC TỔ CRY1NA DIỆT SÂU ĐỤC QUẢ ĐẬU TƯƠNG

<160> 1

<210> SEQ ID NO:1

<211> 1920

<212> ADN

<213> *Bacillus thuringiensis* serovar *kurstaki* BD8.2

<400>

```

1 agcctcattt taaaattatt ccttttaaat gtaatgagtg aattgaaggg gaattttaag
61 aaaagtacta atcgaacttg ttgtttgcta aaaataataa atataggagg aagaggtatg
121 aattcaaagg aacatgatta tctaaaagtt tgtaatgatt taagtgcgc caatattaat
181 atggagcggt ttgataagaa tgatgcactg gaaattggta tgcattgt atctgaactt
241 attggtatga ttccaggcgg aacagcttg caatttgtt ttaatcaatt gtgtctcgt
301 ttagggtatt ctggatggaa tgcgttcag gaacatgtgg aggaattaat tgatactaaa
361 atagaagggt atgcaaaaaa taaagcctta tctgaattag caggtataca aagaacctt
421 gaaacatata tacaattacg taatgaatgg gaaaatgata ttgaaactc aaaggctcaa
481 ggtaaggtag ctaattacta tgaaagtctt gagcaggcgg ttgaaaggag tatgcctcaa
541 ttgcagtggt ggaattttga agtaccactt ttaactgtct atgtgcaagc tgctaactt
601 catttattat tattaagaga tgttcagtt tatggaaagc gttggggatg gtcggagcag
661 aaaattaaaa ttattatga taaacagatt aagtataccc atgaatacac aaatcattgt
721 gtaattggtt ataataaagg acttgagaga ttaaaaaata aaggttctt ttatcaagat
781 tggtagaatt ataactgtt ccgtagagaa atgactctta ctgttttaga tatcgttgct
841 ttattccgcg actatgatgt acaaaactat ccaataacaa ccgtgtctca gctaacaagg
901 gaagtttata cggatccttt acttaatttt aatcctaaat tacattctgt gtcctaatta
961 cctagtttta gtgacatgga aaatgcaaca attagaactc cacatctgat ggaattttta
1021 agaattgtaa caattttac agattggtat agtgtgggaa gaaactatta ttggggagga
1081 catcgctga cgtcttacca ttagaggagga gagaatataa gatcacctct ataggttaga
1141 gaggcaaatc aagaggttcc tagagatttt tattttatg gaccggttt taagacgtta
1201 tcaagccga ctctaagacc attacagcag cctgcaccag ctctccttt taattacgt
1261 agcttagagg gagtagaatt ccacactcct acaggtagtt ttatgtatcg tgaaagagga
1321 tcggttagatt cttttaatga gttaccgcct ttaatccag ttgggttacc tcataagga
1381 tacagtcacc gtttatgtca tgcaacggtt gttcgtaa atctggacccc ttatttaaca
1441 acagggtcca tctttcttg gacacatcgt agtgcagaag aaaccaatac aattgaatca
1501 aatattatta cgcaaatccc gttagtaaaa gcatatcaaa ttgggtcagg cactactgta
1561 aggaaaggac caggattcac agggagggat atacttcgaa gaacagggtc tggaacattt
1621 ggagatatga gaataaatat taatgcacca ttatctcaaa gatatcgtt aaggattcgt
1681 tatgcttcta cgacagattt acaatttgc acgagtatta atgggaccac cattaatatt
1741 ggttaactcc caaaaactat taataatcta aatactttag gttctgaggg ctatagaaca
1801 gtatcgttta gtactcatt tagtttctca aatgcacaaa gcatatttag attaggtata
1861 caagcatttt ctggagttca agaagtttat gtggataaaa tgaatttat tctgttgaa

```

<210> SEQ ID NO:2

<211> 640

<212> Protein

<213> *Bacillus thuringiensis* serovar *kurstaki* BD8.2

<400>

SLILKLFLNVMSELKGNFKKSTNRTCCLLKIINIGGRGMNSKEHDYLVKVCNDLSDANINMERFD
KNDAL EIGMSIVSELIGMIPGGTALQVFNQLWSRLGDSGWNAFMEHVEELIDTKIEGYAKNKAL
SELAGIQRNLETYIQLRNEWENDIENSKAQGKVANYYESLEQAVERSMPQFAVGNFEVPLLT VY
VQAANLHLLLLRDVSVYGKRWGWSEQKIKIYYDKQIKYTHEYTNHCVN WYNKGLERLKNKGS
SYQDWYNNRFRREMTLTVLDIVALFPHYDVQTYPIITVAQLTREVYTDPLLNFNPKLHSVSQL
PSFSDMENATIRTPHLMFLRMLTIYTDWYSVGRNYYWGGHRVTSYHVGGENIRSPLYGREAN
QEVPRDFYFYGPVFKTL SKPTLRPLQQPAPAPPFNLRSLGVEFHTPTGSFMYRERGSVDSFNELP
PFNPVGLPHKVYSHRLCHATFVRKSGTPYLTTGAIFSWTHRSAEETNTIESNIITQIPLVKAYQIGS
GTTVRKGPFGTTGGDILRRTGPGTFGDMRININAPLSQRYRVIRIYASTTDLQFVTSINGTTINIGNF
PKTINNLTNLGSEGYRTVSFSTPFSFSNAQSIFRLGIQAFSGVQEVYVDKIEFIPVE.