



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

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

(11)



1-0037733

(51)^{2020.01} C12N 1/14

(13) B

(21) 1-2020-06575

(22) 12/11/2020

(45) 25/12/2023 429

(43) 25/01/2021 394

(73) VIỆN CÔNG NGHỆ SINH HỌC (VN)

Số 18 Hoàng Quốc Việt, quận Cầu Giấy, thành phố Hà Nội

(72) LÊ THỊ MINH THÀNH (VN); TRỊNH THỊ THU HÀ (VN); NGÔ ĐÌNH BÌNH (VN); CHU HOÀNG HÀ (VN); PHẠM BÍCH NGỌC (VN); LÊ THU NGỌC (VN).

(54) CHỦNG VI KHUẨN *BACILLUS THURINGIENSIS* SEROVAR *CANADENSIS* SP14.2 THUẦN KHIẾT VỀ MẶT SINH HỌC MANG GEN MÃ HÓA PROTEIN ĐỘC TỔ CRY2AB39 DIỆT SÂU ĐỤC QUẢ ĐẬU TƯƠNG

(57) Sáng chế đề cập đến chủng vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* serovar *canadensis* SP14.2 thuần khiết về mặt sinh học phân lập tại Việt Nam, có khả năng tạo bào tử và sinh tổng hợp protein tinh thể độc tố Cry2Ab39 diệt côn trùng bộ cánh vẩy (Lepidoptera), cụ thể là sâu đục quả đậu tương (*Etiella zinkenella*). Chủng *Bacillus thuringiensis* serovar *canadensis* SP14.2 thuần khiết về mặt sinh học theo sáng chế mang cấu trúc đoạn gen *cry2Ab39* có kích thước 1899 bp, mã hóa 633 axit amin sản sinh protein độc tố Cry2Ab39 có trọng lượng 70.79 kDa và diệt sâu đục quả đậu tương *Etiella zinkenella*, gen *cry2Ab39* đã được đăng ký trên ngân hàng gen Quốc tế với mã số: MN319700, protein độc tố Cry2Ab39 với mã số QIQ19560 trong cơ sở dữ liệu của Trung tâm Tài nguyên protein vi khuẩn kháng sâu (The Bacterial Pesticidal Protein Resource Center - BPPRC).

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến chủng vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* serovar *canadensis* SP14.2 thuần khiết về mặt sinh học phân lập từ đất tại Sa Pa tỉnh Lào Cai, Việt Nam có khả năng sinh tổng hợp protein độc tố Cry2Ab39 diệt ấu trùng bộ cánh vẩy (Lepidoptera), cụ thể là sâu đục quả đậu tương (loài *Etiella zinckenella*) và mang trình tự gen *cry2Ab39* mã hóa protein độc tố từ chủng này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

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. Mặc dù nhu cầu đậu tương trong nước rất cao nhưng diện tích gieo trồng và sản lượng đậu tương tại Việt Nam đang giảm khá mạnh, do năng suất thấp. Mặc dù nước ta đã bắt đầu tiến hành sản xuất trên quy mô công nghiệp từ năm 2011 nhưng Việt Nam vẫn tiếp tục phải nhập khẩu phần lớn lượng đậu tương nhằm bù đắp sự thiếu hụt về thực phẩm protein trong nước và đáp ứng nhu cầu ngày càng tăng của ngành công nghiệp thức ăn chăn nuôi và nuôi trồng thủy sản. Theo Cục Chăn nuôi Việt Nam, hàng năm Việt Nam phải nhập nguồn nguyên liệu để chế biến dầu thực vật và thức ăn gia súc với tổng giá trị lên đến 3,7 tỷ USD, trong đó riêng khô dầu đậu tương đã có 2,7 triệu tấn (tương đương 5,4 triệu tấn hạt, gấp 30 lần so với sản lượng sản xuất được tại Việt Nam), đây là sự nghịch lý của một quốc gia với ngành nông nghiệp là chính và có truyền thống sản xuất đậu tương.

Một trong những nguyên nhân làm ảnh hưởng lớn đến năng suất đậu tương là sâu bệnh. Sâu hại đậu tương là nhóm đối tượng thường xuyên gây ra những thiệt hại đáng kể đối với sản xuất đậu tương. Sâu hại đậu tương gồm nhiều nhóm: nhóm sâu hại tất cả các bộ phận của cây, nhóm sâu hại lá, thân, quả, sâu hại trong đất. Có tới 360 loài sâu hại đậu tương ở các vùng trồng đậu tương trên thế giới. Trong các loài sâu hại đậu tương thì sâu đục quả (*Etiella zinckenella*) phân bố rộng rãi và gây hại ở nhiều vùng trồng đậu trên thế giới. Ở Việt Nam, thiệt hại do sâu đục quả tới năng suất lên đến 70-80% nếu không được phòng trừ hợp lý. Tùy điều kiện địa lý, khí hậu mà sâu hại đậu tương ở mỗi một nước có đặc trưng về loài và mức độ phá hoại riêng. Vùng Đông nam nước Mỹ, đậu tương bị phá hại bởi 4 loài sâu chính: sâu đo *Pseudoplusia includens*, sâu xanh *Helicoverpa zea*, sâu đục thân *Elasmopalpus lignosellus*, sâu ăn lá *Anticarsia gemmatilis* (Walker và cs, 2000). Vùng Đông và Đông nam Châu Á, đậu tương bị tấn công bởi nhiều loài sâu chính: *Helicoverpa armigera*, *Spodoptera litura*, *S. exigua* phá hại lá giai đoạn đầu vụ; rệp *Bemisia tabaci*, *Megalurothrips usitatus* và *Edwardsiana avescens* chích hút lá; sâu cuốn lá *Omiodes indicata* gây hỏng lá nghiêm trọng; và sâu đục quả *Etiella zinckenella*, *Maruca vitrata* phá hại nghiêm trọng năng

suất đậu vào cuối vụ (Srinivasan và cs, 2009). Ở Việt Nam, theo thống kê thì có 3 nhóm sâu chính: sâu bộ cánh vẩy (Sâu đục quả *Etiella zinckenella*, *Maruca vitrata*; sâu ăn lá hoa: sâu xanh *Helicoverpa armigera*, sâu xanh da láng *Spodoptera exigua*, sâu khoang *Spodoptera litura*, sâu cuốn lá *Omiodes indicata*), sâu bộ hai cánh (dòi đục gốc *Ophiomyia phaseoli*, dòi đục thân *Melanagromyza sojae*) và bộ cánh ngửa (rệp *Aphis craccivora* Koch, *Aphis glycines* Matsumura).

Biện pháp sử dụng cây đậu tương chuyển gen kháng sâu đã được ứng dụng rộng rãi ở nhiều nước trên thế giới. Trong một thời gian dài việc sử dụng thuốc trừ sâu có nguồn gốc *Bacillus thuringiensis* có hiệu quả phòng trừ sâu cao và thân thiện với môi trường. Cùng với việc sử dụng thuốc trừ sâu có chứa *Bacillus thuringiensis*, thì việc sử dụng cây trồng chuyển gen *Bacillus thuringiensis* đã làm giảm lượng thuốc trừ sâu sử dụng đối với cây trồng. Mặt khác, côn trùng cũng đã phát triển khả năng kháng đối với một hoặc một vài protein Cry, cho nên điều chỉnh liều lượng là giải pháp khả thi để kéo dài hiệu lực của cây chuyển gen *Bacillus thuringiensis* (Kumar và cs, 2008; Brindha và cs, 2013). Nguồn gen kháng côn trùng có giá trị để biến nạp vào cây trồng có nguồn gốc từ động vật, thực vật, vi sinh vật hoặc gen tổng hợp nhân tạo cũng được chuyển vào cây trồng. Trong những năm gần đây, rất nhiều nhà khoa học đã tập trung nghiên cứu chuyển gen và biểu hiện độc tố Bt (từ vi khuẩn *Bacillus thuringiensis*) vào thực vật.

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, Cyt và Vip. 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 (do các gen *cry* mã hóa) được chia thành 6 nhóm chính: Cry1, Cry2, Cry3, Cry4, Cry5 và Cry6. Theo thống kê kết quả công bố trên thế giới, các gen độc tố từ vi khuẩn Bt diệt các loại sâu hại đậu tập trung chủ yếu ở các nhóm gen: *cry1*, *cry2*, *vip*. Có gen có phổ diệt sâu khá rộng. Gen *cry1Ab* có thể diệt được các loài sâu cánh vẩy *Maruca vitrata*, *Spodoptera exigua*; gen *cry1Ac* có thể diệt các loài *Spodoptera exigua*, *Spodoptera litura*, *Omiodes indicata*, *Helicoverpa armigera*, *Helicoverpa zea*, *Pseudoplusia includens*; gen *vip3C* có thể diệt *Spodoptera litura*, *Helicoverpa armigera*... (Estruch và cs, 1996; Strizhov và cs, 1997; Walker và cs, 2000; Guo Hong Nian và cs, 2003; Ibargutxi và cs, 2008; HernándezMartínez và cs, 2008; Onstad và cs, 2012; Palma và cs, 2012). Tuy nhiên, hiện nay các công bố về gen *cry* kháng sâu đục quả đậu tương (*Etiella zinckenella*) là chưa có.

Gen *cry2Ab* do Chen và đồng tác giả phát hiện đầu tiên vào năm 1999 từ chủng *Bacillus thuringiensis* serovar *kurstaki* Btc002, gen mã hóa protein độc tố Cry2Ab gồm 632 axit amin, trọng lượng phân tử 71 kDa, gen *cry2Ab* đã được tác giả đăng ký trên Ngân hàng gen với mã số AAG36762.1. Sau đó, một số nghiên cứu về gen *cry2Ab* đã được công bố: Jain (2006) đã biểu hiện thành công gen *cry2Ab* thu được protein độc tố có trọng lượng phân tử 65 kDa diệt sâu hại cà chua (*Helicoverpa armigera*); Năm 2014, Pan và cộng sự đã phân lập được gen *cry2Ab* từ chủng *Bacillus*

thuringiensis FJAT12 và được Ủy ban danh pháp quốc tế Bt-toxin đặt tên là *cry2Ab30*, gen mã hóa protein độc tố Cry2Ab30 có khả năng diệt sâu tơ (*Plutella xylostella*) cao.

Như vậy, trên thế giới chưa có nghiên cứu nào về gen *cry2Ab39* mã hóa protein độc tố Cry2Ab39 diệt sâu đục quả đậu tương. Ở nước ta, cũng chưa có một công bố nào nghiên cứu về gen *cry2Ab39* phân lập ở Việt Nam. Gần đây, nhóm tác giả đã phân lập thành công một số gen *cry* từ một số chủng *Bacillus thuringiensis* có khả năng sâu đục quả đậu tương (*Etiella zinkenella*), trong đó chủng *Bacillus thuringiensis* serovar *canadensis* SP14.2 mang gen *cry2Ab39* có khả năng diệt sâu đục quả đậu tương (*Etiella zinkenella*), đoạn gen mã hóa protein độc tố Cry2Ab39 của chủng SP14.2 có kích thước 1899 bp và đã được đăng ký trên Ngân hàng gen quốc tế với mã số MN319700.1, độc tố Cry2Ab39 đã được Ủy ban danh pháp độc tố kháng sâu của vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* (*Bacillus thuringiensis* toxin nomenclature - www.lifesci.sussex.ac.uk), nay là Trung tâm Tài nguyên protein vi khuẩn kháng sâu (The Bacterial Pesticidal Protein Resource Center - BPPRC) công nhận là độc tố mới năm 2020 với mã số QIQ19560. Đây là nguồn nguyên liệu phục vụ cho công tác chuyển gen kháng sâu đục quả vào cây đậu tương cũng như trong sản xuất thuốc trừ sâu sinh học BT.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Mục đích của sáng chế là giải quyết các vấn đề nêu trên. Để đạt được mục đích đó, sáng chế 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, sáng chế đề cập đến chủng vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* serovar *canadensis* SP14.2 thuần khiết về mặt sinh học mang gen *cry2Ab39* mã hóa protein tinh thể độc tố Cry2Ab39 có hoạt tính diệt côn trùng bộ cánh vẩy cao, cụ thể là sâu đục quả đậu tương (loài *Etiella zinkenella*).

Chủng vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* serovar *canadensis* SP14.2 thuần khiết về mặt sinh học mang trình tự ADN mã hóa protein tinh thể độc tố Cry2Ab39.

Theo khía cạnh thứ nhất, sáng chế đề cập đến chủng *Bacillus thuringiensis* serovar *canadensis* SP14.2 thuần khiết về mặt sinh học phân lập từ đất tại Sa Pa tỉnh Lào Cai, Việt Nam có hoạt tính diệt sâu đục quả đậu tương cao. Chủng SP14.2 có khả năng tạo bào tử và sinh tinh thể độc tố Cry2Ab39 diệt sâu đục quả đậu tương với hoạt tính cao, đạt 93,33%.

Theo khía cạnh thứ hai, chủng *Bacillus thuringiensis* serovar *canadensis* SP14.2 thuần khiết về mặt sinh học mang trình tự ADN của gen *cry2Ab39* mã hóa protein độc tố Cry2Ab39 diệt sâu đục quả đậu tương. Trình tự ADN mã hóa protein tinh thể độc tố Cry2Ab39 có kích thước 1899 bp được nêu trong SEQ ID NO:1, mã hóa 633 axit amin sản sinh một protein tinh thể độc tố có trọng lượng 70,79 kDa đã được đăng ký trên ngân hàng gen Quốc tế với mã số MN319700.1 và đã được Ủy ban danh pháp độc tố kháng sâu của vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* (*Bacillus thuringiensis* toxin nomenclature - www.lifesci.sussex.ac.uk), nay là Trung tâm Tài nguyên protein vi

khuẩn kháng sâu (The Bacterial Pesticidal Protein Resource Center - BPPRC) công nhận là độc tố mới năm 2020 với mã số QIQ19560.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Hình 1 là hình ảnh thể hiện khuẩn lạc chủng *Bacillus thuringiensis* serovar *canadensis* SP14.2 trên môi trường thạch dinh dưỡng (A). Khuẩn lạc hình tròn, màu trắng đục, không nhăn mép; Hình dạng tinh thể từ chủng *Bacillus thuringiensis* serovar *canadensis* SP14.2 (B) chụp dưới kính hiển vi quang học (độ phóng đại 100 lần). Tinh thể hình cầu.

Hình 2 là hình ảnh thể hiện kết quả thử nghiệm hoạt tính diệt sâu đục quả đậu tương của hỗn hợp bào tử và tinh thể từ chủng *Bacillus thuringiensis* serovar *canadensis* SP14.2. Sâu chết do độc tố từ chủng SP14.2 có màu đen.

Hình 3 là hình ảnh thể hiện kết quả khuếch đại gen *cry2Ab39* từ chủng *Bacillus thuringiensis* serovar *canadensis* SP14.2 (1) và thang DNA chuẩn (M). Gen *cry2Ab39* có kích thước xấp xỉ 1900 bp.

Hình 4 là hình ảnh thể hiện kết quả biểu hiện protein tái tổ hợp Cry2Ab39 dạng tan (1), dạng không tan (2) và thang protein chuẩn (M). Protein tái tổ hợp Cry2Ab39 có trọng lượng khoảng 90kDa.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế đề cập đến chủng vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* serovar *canadensis* SP14.2 thuần khiết về mặt sinh học, được phân lập từ mẫu đất thu thập ở Sa Pa tỉnh Lào Cai, Việt Nam. Chủng SP14.2 có hoạt tính diệt sâu đục quả đậu tương cao và mang trình tự ADN mã hóa protein độc tố Cry2Ab39 từ chủng này sẽ được bộc lộ rõ ràng thông qua các phương án thực hiện sáng chế.

- Chủng *Bacillus thuringiensis* serovar *canadensis* SP14.2 được phân lập từ mẫu đất qua các bước: Lấy 1 g đất hòa trong 9 ml nước cất vô trùng, lắc 150 vòng/phút trong 15 phút. 1 ml dịch huyền phù được ủ ở nhiệt độ 70°C trong 15 phút để loại bỏ tế bào sinh dưỡng. Dịch đã xử lý nhiệt được pha loãng với nước cất vô trùng ở các nồng độ từ 10^{-1} đến 10^{-6} . Hút 100 μ l dịch pha loãng vào đĩa petri chứa môi trường MPA (0,5% cao thịt; 1% peptone; 0,5% NaCl và 2% agar; độ pH 7,0-7,2) rồi trải đều dung dịch trên mặt thạch bằng que gạt vô trùng, ở mỗi nồng độ pha loãng cấy lên 3 đĩa môi trường dinh dưỡng, nuôi ở 28°C trong 72 đến 96 giờ. Đã xác định chủng SP14.2 sinh tinh thể hình cầu.

- Chủng *Bacillus thuringiensis* serovar *canadensis* SP14.2 được phân loại dưới loài theo 60 typ huyết thanh và đã có phản ứng ngưng kết với typ huyết thanh H5a,5c nên chủng SP14.2 thuộc dưới loài *canadensis*.

- Thử nghiệm hoạt tính diệt sâu đục quả đậu tương (*Etiella zinkenella*) của hỗn hợp bào tử và tinh thể tự nhiên của chủng *Bacillus thuringiensis* serovar *canadensis* SP14.2. Đã xác định chủng SP14.2 có hoạt tính diệt sâu đục quả đậu tương cao đạt 93,33%.

- Tách chiết ADN plasmid của chủng *Bacillus thuringiensis* serovar *canadensis* SP14.2 làm khuôn, kết hợp sử dụng cặp mồi nhân gen *cry2Ab* có trình tự: 5'-ATGAATAGTGTATTGAATAGCGGAA -3' và 5'-ATAAAGTGGTGAAATATTAGTTGGTA -3' để khuếch đại gen *cry2Ab39*. Kết quả thu được đoạn gen mã hóa protein tinh thể độc tố Cry2Ab39 (1899 bp) của chủng *Bacillus thuringiensis* serovar *canadensis* SP14.2.

- Đoạn gen 1899 bp mã hóa protein tinh thể độc tố của chủng SP14.2 được tách dòng trong vector pJET1.2/blunt (Thermo Scientific™) và biến nạp vào vi khuẩn *E. coli* DH5α. Plasmid tái tổ hợp thu được đặt tên là pJET-cry2Ab39.

- Đoạn gen *cry2Ab39* được xác định trình tự theo phương pháp của Sanger và đồng tác giả trên máy xác định trình tự DNA tự động Applied Biosystems 3500 (Thermo Fisher Scientific) sử dụng các đoạn mồi gắn huỳnh quang và bộ hóa chất chuẩn để nhân gen bằng PCR của hãng Amersham Pharmacia Biotech. Trình tự nucleotide của gen *cry2Ab39* được phân tích bằng phần mềm PC GENE (Thụy Sĩ), đã xác định đoạn gen *cry2Ab39* có kích thước 1899 bp mã hóa 633 axit amin với trọng lượng phân tử 70,79 kDa đã được đăng ký trên ngân hàng gen Quốc tế với mã số MN319700.1 và đã được Trung tâm Tài nguyên protein vi khuẩn kháng sâu (The Bacterial Pesticidal Protein Resource Center - BPPRC) công nhận là độc tố mới năm 2020 với mã số QIQ19560.

- Để khẳng định các protein do gen *cry2Ab39* mã hóa vẫn duy trì hoạt tính diệt sâu đục quả đậu tương khi thay đổi vật chủ, tiến hành biểu hiện protein Cry2Ab39 do gen *cry2Ab39* mã hóa trong vi khuẩn *E. coli* nhằm thu được các protein độc tố tái tổ hợp có hoạt tính. Đoạn gen 1899 bp được cắt khỏi plasmid tái tổ hợp pJET-cry2Ab39 và gắn vào vector biểu hiện pET32a(+) bởi 2 enzym giới hạn *Bam*HI và *Xho*I. Vector tái tổ hợp pET32a- *cry2Ab39* được biến nạp vào các tế bào *E. coli* chủng BL21(DE3). Các khuẩn lạc mang vector tái tổ hợp được biểu hiện trong môi trường có chất cảm ứng là IPTG nồng độ 0,1 mM, 4°C trong 72 giờ. Khả năng biểu hiện gen *cry2Ab39* 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 Ni-NTA (Cube Biotech, Germany) và được định lượng theo phương pháp Bradford (1976). Kết quả thu được protein tái tổ hợp tinh sạch có trọng lượng phân tử khoảng 90 kDa (70,79 kDa của protein Cy1Be và 18,5 kDa của protein Trx-His-Stag dung hợp của vector pET32a(+)) với nồng độ trung bình là 32 µg/ml.

- Thử nghiệm hoạt tính kháng sâu đục quả đậu tương của protein tái tổ hợp Cry2Ab39 được tiến hành đối với các prorein tái tổ hợp trước tinh sạch và protein tái tổ hợp sau tinh sạch ở các nồng độ protein khác nhau. Kết quả hoạt tính được xử lý số liệu và phân tích bởi phương pháp thống kê, phân tích phương sai (ANOVA) bằng phần mềm IBM SPSS Statistics 20.0, thu được liều lượng gây chết 50% (LC₅₀) với sâu đục quả đậu tương của protein tái tổ hợp Cry2Ab39 sau tinh sạch là 1,74 µg/g thức ăn và protein độc tố Cry2Ab39 trước tinh sạch có hoạt tính diệt sâu đục quả đậu tương cao, đạt 96,67%.

Chủng *Bacillus thuringiensis* serovar *canadensis* SP14.2 là chủng tự nhiên được phân lập tại Việt Nam mang trình tự ADN đoạn gen *cry2Ab39* mã hóa hai protein tinh thể độc tố diệt sâu đục quả đậu tương *Etiella zinkenella*. Cho đến nay, chưa có một công bố nào về gen *cry2Ab39* có khả năng diệt sâu đục quả đậu tương được công bố ở Việt Nam. Đoạn gen *cry2Ab39* có kích thước 1899 bp mã hóa cho một trình tự 633 axit amin để tạo thành một protein có trọng lượng phân tử là 70,79 kDa. Khi protein Cry2Ab39 được biểu hiện trong 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 cao đạt 96,67%. Kết quả này mở ra một hướng mới là ứng dụng nguồn gen diệt côn trùng từ 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 *canadensis* SP14.2 nêu trong sáng chế 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 sáng chế

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

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

Hòa 1 g đất trong 9 ml nước cất vô trùng, lắc 150 vòng/phút trong 15 - 20 phút. Lấy 1 ml dịch huyền phù vào ống eppendorf sạch ủ ở nhiệt độ 70°C trong 15 phút. Dịch đã xử lý nhiệt được pha loãng với nước cất vô trùng ở các nồng độ từ 10^{-1} đến 10^{-6} . Hút 100 μ l dịch pha loãng cho vào đĩa petri chứa môi trường MPA (gram/lít: NaCl 5g, cao thịt 5g, pepton 10g, agar 20g, độ pH 7) 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* SP14.2 sinh tinh thể hình cầu.

Ví dụ 2: Xác định dưới loài của chủng *Bacillus thuringiensis* SP14.2 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 (Môi trường craige: NaCl 5g; pepton 5g; bacto agar 10g; độ pH 7; nước cất 1 lít) chứa trong ống nghiệm to. Thời gian nuôi là 18 giờ đến 24 giờ và nhiệt độ nuôi là 28°C. Những tế bào *Bacillus thuringiensis* di chuyển lên phía trên bề mặt môi trường giữa ống craige và ống nghiệm sẽ được cấy chuyển 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 vào ống nghiệm chứa khoảng 2ml môi trường MPB (gram/lít: NaCl 5g; cao thịt 5g; pepton 10g; nước cất 1 lít; độ pH 7) 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 H5a,5c được quan sát trên kính hiển vi: nhỏ 2µl dịch nuôi lên phiến kính lõm để kiểm tra khả năng chuyển động của vi khuẩn, sau đó nhỏ tiếp 2µl huyết thanh H5a,5c chuẩn có độ pha loãng 50 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 *canadensis*. Đã xác định chủng *Bacillus thuringiensis* SP14.2 thuộc dưới loài *canadensis*.

Ví dụ 3: Phân lập gen *cry2Ab39* và xác định trình tự ADN của gen *cry2Ab39* của chủng *Bacillus thuringiensis* serovar *canadensis* SP14.2

ADN tổng số của chủng SP14.2 được tách chiết theo phương pháp của Mayjonade và cộng sự (2018). Phân tử ADN tách từ chủng SP14.2 được sử dụng làm khuôn để khuếch đại đoạn gen *cry2Ab39* bằng kỹ thuật PCR sử dụng cặp mồi đặc hiệu của gen *cry2Ab* (5'-CGCGGATCCATGAATAGTGTATTGAATAGCGG-3' và 5'-CCGCTCGAGATAAAGTGGTGAAATATTAGTTGG-3'). Phản ứng PCR được thực hiện theo các phương pháp chuẩn được mô tả bởi Sambrook và Russell (2001), với chu trình nhiệt: 98°C 30 giây - 30 chu kỳ của 98°C 10 giây, 60°C 15 giây, 72°C 1,5 phút - 72°C 5 phút. Kết quả thu được một đoạn gen có kích thước khoảng 1,9 kb. Đoạn gen 1,9 kb được gắn vào vector tách dòng pJET1.2/blunt tạo véc tơ tái tổ hợp gọi là pJET-cry2Ab39, véc tơ tái tổ hợp này được biến nạp vào vi khuẩn *E. coli* DH5α. Khuẩn lạc được dự đoán có mang vector tái tổ hợp được nuôi trong môi trường LB có bổ sung Ampicilin nồng độ 100 µg/ml và tách ADN plasmid để kiểm tra sự có mặt của gen bằng cách xử lý với cặp enzyme giới hạn *Bam*HI, *Xho*I. Trình tự ADN của gen *cry2Ab39* được xác định theo phương pháp của Sanger và cộng sự trên máy xác định trình tự DNA tự động Applied Biosystems 3500 Genetic Analyzer (Thermo Fisher Scientific) 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 *cry2Ab39* có kích thước 1899 bp mã hóa trình tự 633 axit amin với trọng lượng phân 70,79 kDa. Kết quả cho thấy, trình tự đoạn gen *cry2Ab39* được tách từ chủng *Bacillus thuringiensis* serovar *canadensis* SP14.2 có độ tương đồng 99,21% so với gen tham chiếu trên Ngân hàng gen.

Ví dụ 4: Biểu hiện gen *cry2Ab39* của chủng *Bacillus thuringiensis* serovar *canadensis* SP14.2 trong *E. coli* BL21(DE3).

Đoạn gen *cry2Ab39* được cắt khỏi plasmid tái tổ hợp pBT-cry2Ab39 và gắn vào vector biểu hiện pET32a(+) bởi 2 enzym giới hạn *Bam*HI và *Xho*I, tạo véc tơ tái tổ hợp pET32a-cry2Ab39. Vector tái tổ hợp pET32a-cry2Ab39 được biến nạp vào tế bào *E. coli* chủng BL21(DE3). Khuẩn lạc vi khuẩn BL21 chứa véc tơ tái tổ hợp pET32a-cry2Ab39 được nuôi cấy trong 5 ml môi trường LB lỏng có bổ sung kháng sinh Ampicilin 100 µg/ml, nuôi 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 = 0,4-0,6 thì bổ sung chất cảm ứng IPTG nồng độ 100 µM và chuyển sang nuôi lắc 200 vòng/phút ở 4°C trong 72 giờ để biểu hiện protein

ngoại lai. Ly tâm dịch nuôi cấy ở 6000 vòng/phút trong 10 phút để thu cặn tế bào, cặn tế bào được hòa trong dung dịch đệm PBS 1X (gram/lít: 8 g NaCl; 0,2 g KCl; 1,44 g Na₂HPO₄.2H₂O; 0,24 g KH₂PO₄; độ pH7,4; nước cất đến 1 lít). Bổ sung lysozyme 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 20 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 tan và không tan có trọng lượng phân tử 90 kDa.

Protein tái tổ hợp Cry2Ab39 được tinh sạch bằng cột sắc ký ái Ni-NTA (Cube Biotech, Germany) theo hướng dẫn của hãng. Sau tinh sạch, protein tái tổ hợp 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).

Kết quả xác định được protein tái tổ hợp tinh sạch Cry2Ab39 có trọng lượng phân tử khoảng 89 kDa với nồng độ trung bình là 32 µg/ml.

Ví dụ 5: Thử hoạt tính sinh học

Hoạt tính diệt sâu đục quả đậu tương *Etiella zinkenella* được tiến hành trên 3 đối tượng: Hỗn hợp bào tử và tinh thể của chủng *Bacillus thuringiensis* SP14.2; protein độc tố tái tổ hợp Cry2Ab39 từ chủng *E. coli* BL21(DE3) trước và sau tinh sạch.

Thử khả năng diệt sâu đục quả đậu tương của hỗn hợp bào tử và tinh thể của chủng SP14.2: Chủng SP14.2 được nuôi lắc trong 200 ml môi trường LB với tốc độ 150 vòng/phút, 96 giờ. Hỗn hợp bào tử và tinh thể được ly tâm thu cặn ở 12000 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 SP14.2 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 bào tử và tinh thể thấm đều vào môi trường. Mỗi hộp thí nghiệm thả vào 10 con sâu đục quả đậu tương tuổi 2-3, đối chứng âm thay dịch bào tử và tinh thể bằng nước cất vô trùng và được tiến hành song song với lô thí nghiệm, mỗi công thức lặp lại 3 lần. Theo dõi thí nghiệm trong 7 ngày, tỷ lệ sâu chết được tính theo công thức của Abbott (1925): $A = (C - T)/C \cdot 100$ (A: % sâu chết, C: Số sâu sống ở mẫu đối chứng, T: Số sâu sống ở mẫu thí nghiệm). Sau 7 ngày thử nghiệm, hoạt tính diệt sâu đục quả đậu tương của chủng SP14.2 được ghi nhận là 93,33%.

Thử hoạt tính diệt sâu đục quả đậu tương của protein tái tổ hợp Cry2Ab39 trong vi khuẩn *E. coli* trước tinh sạch được tiến hành như sau: 1 cốc thức ăn chứa 20g thức ăn nhân tạo + 1ml dịch protein tái tổ hợp Cry2Ab39 + 10 cá thể sâu đục quả đậu tương tuổi 2-3; Các công thức thí nghiệm đối chứng bao gồm: Sinh khối chủng *E. coli* BL21 không chứa véc tơ tái tổ hợp, dung dịch phá mẫu PBS và nước vô trùng được tiến hành

đồng thời, mỗi công thức lặp lại 3 lần; Nuôi sâu ở điều kiện nhiệt độ phòng, theo dõi và tính tỷ lệ sâu chết theo công thức của Abbott (1925). Kết quả sau 7 ngày thử nghiệm, hoạt tính diệt sâu đục quả đậu tương của protein tái tổ hợp Cry2Ab39 đạt 96,67%; Như vậy, sau khi thay đổi vật chủ thì hoạt tính diệt sâu đục quả đậu tương của protein độc tố Cry2Ab39 không hề suy giảm.

Protein tái tổ hợp Cry2Ab39 tinh sạch được định lượng protein theo phương pháp Bradford. Protein độc tố Cry2Ab39 tinh sạch được thử nghiệm hoạt tính diệt sâu theo phương pháp LC_{50} : 1 ml dịch protein Cry2Ab39 được trộn đều với khoảng 20 g thức ăn nhân tạo (sao cho đạt các nồng độ 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 3,5 và 4 μ g protein/g thức ăn) + 10 sâu tuổi 2-3/cốc; Các công thức đối chứng: sinh khối chủng *E. coli* BL21, dung dịch PBS và nước vô trùng được tiến hành song song với thí nghiệm, mỗi công thức được nhắc lại 3 lần; Số liệu thống kê được xử lý, tính toán LC_{50} theo phương pháp thống kê và phân tích phương sai (ANOVA) trên phần mềm IBM SPSS Statistics 20.0. Kết quả thu được nồng độ gây chết 50% (LC_{50}) của protein tinh thể độc tố Cry2Ab39 tinh sạch đối với sâu đục quả đậu tương là 1,74 μ g/g thức ăn.

Hiệu quả đạt được của sáng chế

Chủng vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* serovar *canadensis* SP14.2 thuần khiết về mặt sinh học là chủng đầu tiên được phân lập tại Việt Nam mang gen *cry2Ab39*, có khả năng tạo bào tử và sinh tổng hợp protein tinh thể độc tố Cry2Ab39 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.

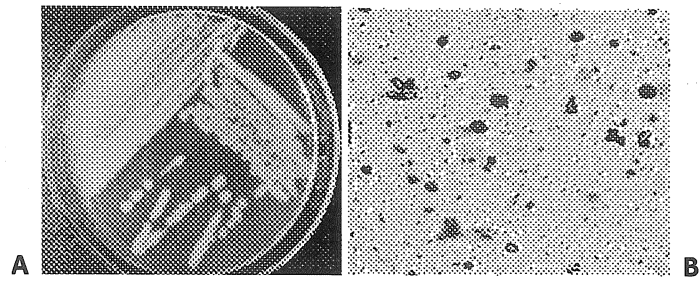
Cho đến nay, ở Việt Nam chưa có công trình nghiên cứu nào về gen *cry2Ab39* kháng sâu đục quả đậu tương (*Etiella zinkenella*) và protein độc tố Cry2Ab39 đã được Ủy ban danh pháp độc tố kháng sâu của vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* (*Bacillus thuringiensis* toxin nomenclature - www.lifesci.sussex.ac.uk), nay là Trung tâm Tài nguyên protein vi khuẩn kháng sâu (The Bacterial Pesticidal Protein Resource Center - BPPRC) công nhận là độc tố mới năm 2020 với mã số QIQ19560.

Chủng *Bacillus thuringiensis* serovar *canadensis* SP14.2 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*).

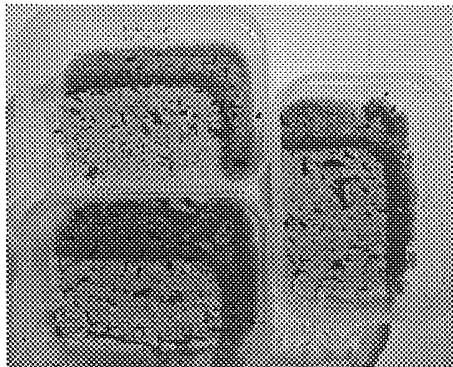
Chủng vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* serovar *canadensis* SP14.2 thuần khiết về mặt sinh học có tiềm năng ứng dụng làm nguyên liệu trong sản xuất chế phẩm diệt sâu sinh học và trong công tác tạo giống cây trồng chuyển gen kháng côn trùng cánh vẩy (cụ thể là sâu đục quả đậu) tại Việt Nam, dần thay thế thuốc trừ sâu hóa học, nhằm tiến tới nền nông nghiệp hữu cơ, đảm bảo an toàn môi trường sinh thái và sức khỏe cho người, vật nuôi.

YÊU CẦU BẢO HỘ

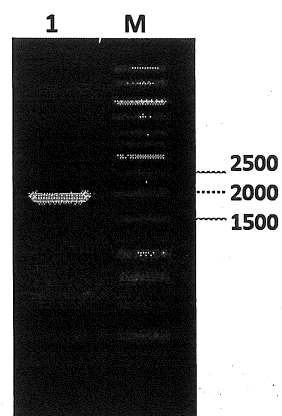
1. Chúng vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* serovar *canadensis* SP14.2 thuần khiết về mặt sinh học được phân lập từ đất tại Sa Pa tỉnh Lào Cai - Việt Nam, mang gen mã hóa protein độc tố Cry2Ab39 có khả năng tạo bào tử và sinh tổng hợp protein tinh thể độc tố diệt sâu đục quả đậu tương *Etiaella zinkenella*, trong đó chủng này mang trình tự nucleotit của gen *cry2Ab39* có kích thước 1899 bp được thể hiện trong SEQ ID NO:1 và đã được đăng ký trên Ngân hàng gen quốc tế với số hiệu MN319700, mã hóa 633 axit amin tạo protein độc tố Cry2Ab39 được thể hiện trong SEQ ID NO:2 với mã số QIQ19560 trong cơ sở dữ liệu của Trung tâm Tài nguyên protein vi khuẩn kháng sâu (The Bacterial Pesticidal Protein Resource Center - BPPRC).



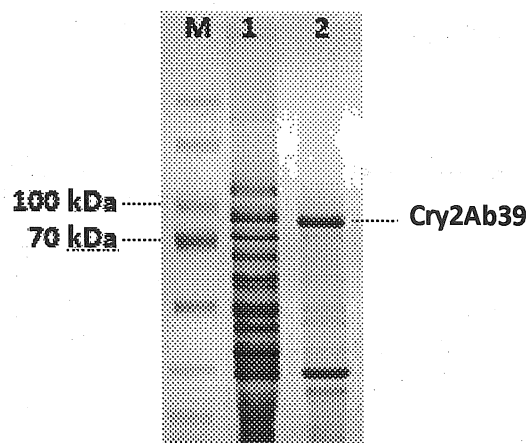
Hình 1



Hình 2



Hình 3



Hình 4

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Viện Công nghệ sinh học

<120> CHŨNG VI KHUẨN BACILLUS THURINGIENSIS SEROVAR
CANADENSIS SP14.2 THUẦN KHIẾT VỀ MẶT SINH HỌC MANG GEN MÃ
HÓA PROTEIN ĐỘC TỔ CRY2AB39 DIỆT SÂU ĐỤC QUẢ ĐẬU TƯƠNG

<160> 1

<210> SEQ ID NO:1

<211> 1899

<212> AND

<213> *Bacillus thuringiensis* serovar *canadensis* SP14.2

<400>

```

1 atgaatagtg tattgaatag cggaagaact actatattgtg atgcgtataa tgtagcggct
61 catgatccat ttagttttca acacaaatca ttagataaccg tacaaaagga atggacggag
121 tggaaaaaaaa ataatcatag tttataccta gatcctattg ttggaactgt ggctagtttt
181 ctgttaaaga aagtggggag tcttgttgga aaaaggatac taagtgaagt acggaattta
241 atatttccta gtggtagtag aaatctaatt caagatattt taagagagac agaaaaattc
301 ctgaatcaaa gacttaatac agacactctt gcccggtgaa atgcggaatt gacagggctg
361 caagcaaatg tagaagagtt taatcgacaa gtagataatt ttttgaaccc taaccgaaac
421 gctgttcctt tatcaataac ttcttcagtt aatacaatgc aacaattatt tctaaataga
481 ttacccagtt tccagatgca aggataccaa ctgttattat tacctttatt tgcacaggca
541 gccaatttac atctttcttt tattagagat gttattctaa atgcagatga atggggaatt
601 tcagcagcaa cattacgtac gtatcgagat tacttgaaaa attatacaag agattactct
661 aactattgta taaatacgtg tcaaagtgcg ttagagagtt taaacacccg tttacacgat
721 atgttagaat ttagaacata tatgttttta aatgtatttg aatatgtatc tatctggtcg
781 ttgtttaaat atcaaagcct tctagtatct tctggcgcta atttatatgc aagtggtagt
841 ggaccacagc agaccaatc atttacttca caagactggc cttttttata ttctcttttc
901 caagttaatt caaattatgt gttaaatggc ttagtgggcg ctagacttac gcagactttc
961 cctaattatt ttggtttacc tgggtactact acaactcacg cattgcttgc tgcaagggtc
1021 aattacagtg gaggagtttc gtctggtgat ataggtgcat ctccgtttaa tcaaaatttt
1081 aattgtagca ctttctccc ccattgtta acgccatttg ttaggagttg gctagattca
1141 gggtcagatc gggagggcgt tgccaccgtt acaaattggc aaacagaatc ctttgagaca
1201 actttagggg taaggagtgg tgcttttaca gctcgcggtg attcaaacta tttccagat
1261 ttttttattc gtaatatattc tggagttcct ttagttgtta gaaatgaaga tttagaaga
1321 ccgttacact ataataaat aagaaatata gcaagtcctt caggaacacc tgggtggagca
1381 cgagcttata tggatatctg gcataacaga aaaaataata tccatgctgt tcatgaaaat
1441 gggtctatga ttcatttagc gccaaatgac tatacaggat ttactatttc gccgatacat
1501 gcaactcaag tgaataatca aacacgaaca tttatttctg aaaaatttgg aaatcaaggt
1561 gattctttta gggttgaaac aaacaacacg acagctcgtt atacgcttag agggaatgga
1621 aatagttaca atctttattt aagagtttct tcaataggaa attccactat tcgagttact
1681 ataaacggta gggatatata tgctacaaat gttaatacta ctacaaataa cgatggaggt
1741 aatgataatg gagctcgttt ttcagatatt aatatcggtg atgtagtagc aagtagtaat
1801 tctgatgtac cattagatat aaatgtaaca ttaactccg gtactcaatt tgatcttatg
1861 aatattatgc ttgtaccaac taatatttca ccactttat

```

<210> SEQ ID NO:2

<211> 633

<212> Protein

<213> *Bacillus thuringiensis* serovar *canadensis* SP14.2

<400>

```
1 mnsvlnsgrt ticdaynvaa hdpfsfqhks ldtvqkewte wkknnhslyl dpivgtvasf
61 llkkvgslvg krilselrnl ifpsgstnlm qdilretekf lnqrlntdtl arvnaeltgl
121 qanveefnrq vdnflnpnrn avplsitssv ntmqqflnr lpqfqmqqyq llllplfaqa
181 anlhlsfird vilnadewgi saatlrtyrd ylknytrdys nycintyqsa frglntrlhd
241 mleftrtymfl nvfeyvsiws lfkyqsllvs sganlyasgs gpqqtqsfts qdwpflyslf
301 qvnsnyvlnq fsgarltqtf pnivglpgtt tthallaarv nysggvssgd igaspfnqnf
361 ncstflppll tpfvrswlds gsdregvatv tnwqtesfet tlglrsgaft argnsnyfpd
421 yfirnisgvp lvvrnedlrr plhyneirni aspsgtpgga raymvsvhnr knnihavhen
481 gsmihlapnd ytgftispih atqvnnqtrt fisekfgnqg dslrfeqnnt tarytlrgng
541 nsynlylrvs signstirvt ingrvyatn vntttndgv ndngarfsdi nignvvassn
601 sdvpldinvl lnsqtqfdlm nimlvptnis ply
```