



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

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

(11)



1-0041734

(51)^{2020.01} C12N 15/11

(13) B

(21) 1-2021-02735

(22) 14/05/2021

(45) 25/11/2024 440

(43) 27/09/2021 402

(73) NGUYỄN BẢO QUỐC (VN)

160/10/16 Phạm Văn Đồng, phường 3, quận Gò Vấp, thành phố Hồ Chí Minh

(72) NGUYỄN BẢO QUỐC (VN); Nguyễn Ngọc Bảo Châu (VN).

(74) Công ty TNHH Dịch thuật sáng chế PROINVEN (PROINVEN CO.,LTD.)

(54) CẤP ĐOẠN MỖI ĐẶC HIỆU ĐỂ PHÁT HIỆN VÀ ĐỊNH DANH VI KHUẨN
BACILLUS SUBTILIS

(57) Sáng chế đề cập đến cấp đoạn mỗi đặc hiệu để phát hiện và định danh loài vi khuẩn *Bacillus subtilis*, trong đó đoạn mỗi xuôi nêu trong SEQ ID NO. 1 có trình tự GGATTCGGGAGACCATTTG và đoạn mỗi mỗi ngược nêu trong SEQ ID NO. 2 có trình tự GGGGCATACGGATAATAGGG.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế thuộc lĩnh vực công nghệ sinh học. Cụ thể, sáng chế đề cập đến cặp đoạn môi đặc hiệu để phát hiện nhanh và định danh chính xác loài vi khuẩn *Bacillus subtilis*.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Vi khuẩn *Bacillus subtilis* là trực khuẩn nhỏ, hai đầu tròn, Gram dương, kích thước 0,5 - 0,8 μm x 1,5 - 3 μm , đứng đơn lẻ hoặc thành chuỗi ngắn. Vi khuẩn có khả năng di động, có 8 - 12 lông, sinh bào tử hình bầu dục nhỏ hơn tế bào vi khuẩn và nằm giữa tế bào, kích thước từ 0,8 - 1,8 μm . Bào tử phát triển bằng cách nảy mầm do sự nứt của bào tử, không kháng axit, có khả năng chịu nhiệt, chịu ẩm, tia tử ngoại, tia phóng xạ.

Hiện nay, *Bacillus subtilis* được ứng dụng rất nhiều trong thức ăn chăn nuôi, thủy sản nhờ khả năng sản xuất nhiều enzym tiêu hóa của loài vi khuẩn này như amylaza, proteaza, lipaza v.v.. Bên cạnh đó, vi khuẩn *Bacillus subtilis* còn được xem là một tác nhân sinh học đầy tiềm năng trong việc phòng trừ bệnh hại cây trồng. Chúng có khả năng đối kháng các loại vi nấm gây bệnh với phổ tác động rộng, không gây hại cho con người và cây trồng. Mặt khác, vi khuẩn *Bacillus subtilis* còn tham gia vào quá trình chuyển hóa các chất hữu cơ khó phân hủy thành những chất hữu cơ đơn giản cho cây trồng dễ sử dụng, giúp cải tạo đất, khống chế và tiêu diệt một số loại vi sinh vật gây bệnh cho cây trồng bởi các chức năng sinh học chuyên biệt của chúng.

Cùng chung nhóm với vi khuẩn *Bacillus subtilis* còn có những loài vi khuẩn khác có kiểu hình giống nhau như *Bacillus licheniformis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus atrophaeus*, *Bacillus mojavensis*, *Bacillus vallismortis*, *Bacillus sonorensis*, *Bacillus tequilensis*, *Bacillus siamensis*, *Bacillus pumilus*. Điều này dẫn đến khó phân biệt các loài này bằng các phương pháp định danh truyền thống dựa trên việc xác định hình thái, sinh lý, các phản ứng sinh hóa và thậm chí là giải trình tự dựa trên trình tự

vùng 16S rRNA vốn rất mất thời gian, công sức, tiền bạc và độ chính xác không cao. Chính vì vậy, việc tìm ra phương pháp nhanh, chính xác, ít tốn kém và có độ nhạy cao để xác định và định danh *Bacillus subtilis* là một nhu cầu rất cần thiết không chỉ giúp cho việc định danh nhanh các loài *Bacillus subtilis* trong quá trình sàng lọc mà còn là công cụ hữu ích cho việc kiểm tra và phát hiện nhanh các sản phẩm, chế phẩm sinh học có nguồn gốc vi sinh vật đang được lưu hành trên thị trường hiện nay.

Hiện nay, trên thế giới việc xác định loài *Bacillus subtilis* chủ yếu vẫn dựa vào trình tự của gen 16S rRNA, gen *gyrA* (helicase gene), gen *ytcP* (hypothetical ABC type transporter) và gen *endoglucanase* bằng phương pháp PCR và PCR thời gian thực (Wattiau và các đồng tác giả, 2001; Ashe và các đồng tác giả, 2014; Kwon và các đồng tác giả, 2009; Chun and Bae, 2000).

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Do đó, nhằm mục đích xác định nhanh và định danh chính xác với ít chi phí và có độ nhạy cao đối với vi khuẩn *Bacillus subtilis*, mục đích của sáng chế là đề xuất cặp đoạn mồi đặc hiệu để phát hiện nhanh và định danh chính xác loài vi khuẩn *Bacillus subtilis*, trong đó cặp đoạn mồi theo sáng chế bao gồm:

đoạn mồi xuôi : 5' GGATTCGGGAGACCATTTG 3' (SEQ ID NO. 1)

đoạn mồi ngược: 5' GGGGCATACGGATAATAGGG 3' (SEQ ID NO. 2)

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Hình 1: Phản ứng PCR để phát hiện nhanh và định danh chính xác các chủng vi khuẩn *Bacillus subtilis* so với các chủng *Bacillus* khác. Trong đó M: Thang DNA 1 kb; giếng 1-4: *Bacillus subtilis* (Bs1, Bs2, Bs3, Bs4); giếng 5-8: *Bacillus amyloliquefaciens* (Bamy1, Bamy2, Bamy3, Bamy4); giếng 9: *Bacillus megaterium* (Bme); giếng 10: *Bacillus pumilus* (Bp); giếng 11: *Bacillus licheniformis* (Bli); giếng 12: *Bacillus infantis* (Bin); giếng 13: *Bacillus thuringiensis* (Bt); giếng 14: *Bacillus clausii* (Bcl); giếng 15: *Bacillus halodurans* (Bha); giếng 16: *Bacillus pseudofirmus* (Bps); giếng 17:

Bacillus cellulosilyticus (Bce); giếng 18: *Bacillus coagulans* (Bco); giếng 19: *Bacillus cereus* (Bce); giếng 20: *Bacillus atrophaeus* (Bat); giếng 21: đối chứng âm (-)

Hình 2. Sản phẩm khuếch đại của trình tự 16S rRNA trên tất cả các mẫu vi khuẩn *Bacillus* sp. phân lập trong đất. M: Thang DNA 1 kb; +: đối chứng dương; -: đối chứng âm

Hình 3. Sản phẩm khuếch đại trình tự của cặp mồi đặc hiệu cho việc phát hiện nhanh và chính xác vi khuẩn *Bacillus subtilis*. M: Thang DNA 1 kb; +: đối chứng dương; -: đối chứng âm

Mô tả chi tiết sáng chế

Mục đích của sáng chế là đề xuất cặp đoạn mồi đặc hiệu để phát hiện nhanh và định danh chính xác loài vi khuẩn *Bacillus subtilis*, trong đó cặp đoạn mồi theo sáng chế bao gồm:

đoạn mồi xuôi : 5' GGATTCGGGAGACCATTTG 3' (SEQ ID NO. 1)

đoạn mồi ngược: 5' GGGGCATACGGATAATAGGG 3' (SEQ ID NO. 2)

Tác giả sáng chế đã tạo ra cặp đoạn mồi đặc hiệu này dựa trên phép phân tích và so sánh trình tự các protein nhỏ có kích thước từ 80-120 axit amin và thuộc nhóm chưa xác định chức năng (hypothetical proteins) với toàn bộ cơ sở dữ liệu trong hệ gen của vi khuẩn *Bacillus subtilis* trong ngân hàng gen. Các protein đặc hiệu sẽ được chọn và trình tự nucleotit của các gen mã hoá các protein này sẽ tiếp tục được so sánh với cơ sở dữ liệu của hệ gen vi khuẩn *Bacillus subtilis* như trên. Các trình tự đặc hiệu của loài vi khuẩn *Bacillus subtilis* sau khi được chọn sẽ được thiết kế đoạn mồi PCR bằng phần mềm trực tuyến Primer 3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>) và đánh giá tính đặc hiệu của đoạn mồi bằng phần mềm trực tuyến in silico PCR amplification (<http://insilico.ehu.es/PCR/>). Theo sáng chế, trình tự protein đặc hiệu của loài *Bacillus subtilis* được lựa chọn là NP_389613.2.

Trình tự của đoạn khuếch đại PCR sẽ nằm trong khoảng 200-206 bp tùy theo chủng vi khuẩn *Bacillus subtilis* như sau:

1. Hệ gen: *Bacillus subtilis*

Mã số: NC_000964

Vị trí bắt đầu: 1865530

Vị trí kết thúc: 1865729

Kích thước đoạn khuếch đại (SEQ ID NO.3): 200 bp

GGGGCATACGGATAATAGGGGTATCCGCCATACAAATAAGGATTAAATAA
 AGCGCTTCCTATAAGCCCGCCTGCAAGGCCGCCGATAAACGGTCCTCCAAA
 AAATCCGAATGGCCGGCCAAACCCATAACCAAATCCGGGTCTTCCAAACC
 CGTAACCGAACCCGAACGGTCTTCCAAACCCAAATGGTCTCCCGAATCC

2. Hệ gen: *Bacillus subtilis* BSn5

Mã số: NC_014976

Vị trí bắt đầu: 4076020

Vị trí kết thúc: 4076225

Kích thước đoạn khuếch đại (SEQ ID NO. 4): 206 bp

GGGGCATACGGATAATAGGGGTATCCGCCATACAAATAAGGATTAAATAA
 AGCGCTTCCTATAAGCCCGCCTGCAAGGCCGCCGATAAACGGTCCTCCAAA
 AAATCCGAATGGCCGGCCAAACCCAAATCCATAACCAAATCCGGGTCTTC
 CAAACCCGTAACCGAACCCGAACGGTCTTCCAAACCCAAATGGTCTCCCG
 AATCC

Phát hiện nhanh và định danh loài vi khuẩn *Bacillus subtilis*

Việc phát hiện nhanh và định danh loài vi khuẩn *Bacillus subtilis* bằng phương pháp PCR được thực hiện theo các bước sau đây:

Bước 1: Ly trích ADN tổng số

- Hút 1ml dịch vi khuẩn tăng sinh vào ống 1,5ml, ly tâm ở tốc độ 8.000 vòng/phút trong 3 phút, loại bỏ dịch nuôi cấy để thu được chất kết tủa. Lặp lại 3 lần.

- Rửa phần tế bào vi khuẩn trong 400 μ l dung dịch đệm STE (100 mM NaCl, 10 mM Tris, 1mM EDTA), ly tâm ở tốc độ 8.000 vòng/phút trong 3 phút, loại bỏ dịch nổi. Lặp lại 3 lần.

- Hút 200 μ l dung dịch đệm TE (10 mM Tris, 1 mM EDTA) + 100 μ l PCI (phenol:cloroform:rượu isoamyllic: theo tỷ lệ 25:24:1) vào phần kết tủa thu được, tạo lốc xoáy tế bào vi khuẩn để trộn đều, ly tâm ở tốc độ 9.000 vòng/phút trong 6 phút.

- Hút 160 μ l dịch nổi phía trên cho vào ống 1,5 ml sạch mới. Thêm vào 40 μ l dung dịch đệm TE + 100 μ l cloroform, ly tâm ở tốc độ 9.000 vòng/phút trong 6 phút.

- Hút 160 μ l dịch nổi phía trên cho vào ống mới 1,5 ml sạch mới, thêm vào 40 μ l dung dịch đệm TE + 2 μ l RNaza A 10 mg/ml ủ trong 37°C trong vòng 15 phút. Sau đó, làm bất hoạt RNaza A bằng cách ủ ở 65°C trong 30 phút.

- Loại bỏ RNaza bằng cách thêm vào 100 μ l cloroform, ly tâm ở tốc độ 9.000 vòng/phút trong 6 phút, hút 160 μ l dịch nổi phía trên cho vào ống mới.

- Thêm vào 16 μ l dung dịch CH₃COONa 3M + 480 μ l và ở -20°C trong 1-2 giờ.

- Ly tâm ở tốc độ 13.000 vòng/phút trong 15 phút, loại bỏ dịch nổi và để khô ở nhiệt độ phòng. Sau đó, thêm 50 μ l dung dịch TE hoặc nước cất ion.

- Kiểm tra chất lượng ADN bằng quang phổ kế Biodrop (được sản xuất tại Anh). Có thể đánh giá chất lượng ADN ly trích bằng cách thực hiện phản ứng khuếch đại PCR sử dụng cặp mồi 16S rRNA. Nếu tất cả các mẫu xuất hiện vạch ADN cùng kích thước thì điều đó có nghĩa là chất lượng ADN tổng số của vi khuẩn đạt yêu cầu cho các phản ứng PCR với cặp đoạn mồi đặc hiệu phát hiện nhanh và định danh chính xác loài *Bacillus subtilis*. Ngược lại, thì chất lượng ADN tổng số không được tốt và cần ly trích lại cho đến khi khuếch đại được bằng cặp mồi 16S rRNA trên vi khuẩn.

- Bảo quản lạnh ADN tổng số ở -20°C

Bước 2: Quy trình phản ứng PCR

Thành phần phản ứng PCR cho việc phát hiện nhanh và xác định chính xác loài vi khuẩn *Bacillus subtilis* được thể hiện trong bảng 1.

Bảng 1. Thành phần phản ứng PCR

Thành phần	Nồng độ	Thể tích (μl)
Go <i>Taq</i> hỗn hợp		
cái	1x	6
Đoạn mồi F	1 pmol/μl	0,6
Đoạn mồi R	1 pmol/μl	0,6
Khuôn ADN	20 ng	1
H ₂ O		3,8
Tổng thể tích		12 μl

Quy trình nhiệt của phản ứng PCR với cặp mồi đặc hiệu của *Bacillus subtilis* được thể hiện trong bảng 2.

Bảng 2. Quy trình nhiệt của phản ứng PCR

Giai đoạn	Nhiệt độ(°C)	Thời gian	Số chu kỳ
Tiền biến tính	94°C	2 phút	
Biến tính	94°C	30 giây	
Bắt cặp	50 °C		35
Kéo dài	72 °C	1 phút	
Hậu kéo dài	72 °C	5 phút	

Các chủng vi khuẩn *Bacillus* sp. được sử dụng trong nghiên cứu này được thể hiện trong bảng 3. Cặp đoạn mồi được sử dụng để phát hiện nhanh và định danh chính xác loài vi khuẩn *Bacillus subtilis* bao gồm đoạn mồi xuôi nêu trong SEQ ID NO. 1 và đoạn mồi mồi ngược nêu trong SEQ ID NO. 2.

Bảng 3. Các chủng vi khuẩn *Bacillus* được sử dụng trong nghiên cứu này

Loài vi khuẩn	Tên chủng
<i>Bacillus subtilis</i>	Bs1, Bs2, Bs3, Bs4
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	Bamy1, Bamy2, Bamy3,

	Bamy4
<i>Bacillus megaterium</i>	Bme
<i>Bacillus pumilus</i>	Bp
<i>Bacillus licheniformis</i>	Bli
<i>Bacillus infantis</i>	Bin
<i>Bacillus thuringiensis</i>	Bt
<i>Bacillus clausii</i>	Bcl
<i>Bacillus halodurans</i>	Bha
<i>Bacillus pseudofirmus</i>	Bps
<i>Bacillus cellulosilyticus</i>	Bce
<i>Bacillus coagulans</i>	Bco
<i>Bacillus cereus</i>	Bce
<i>Bacillus atrophaeus</i>	Bat

Kết quả: Kết quả cho thấy các chủng vi khuẩn *Bacillus subtilis* (giếng1-4) có sản phẩm khuếch đại với kích thước là 200 bp trong khi các vi khuẩn thử nghiệm khác không có sản phẩm khuếch đại có kích thước như trên. Điều này cho thấy đoạn môi thiết kế cho phản ứng PCR này có khả năng phát hiện nhanh và định danh chính xác loài vi khuẩn *Bacillus subtilis* (Hình 1)

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1: Tiến hành phân lập vi khuẩn *Bacillus sp.* trong đất và nuôi cấy 21 mẫu phân lập *Bacillus sp.* thu thập được trên môi trường chọn lọc của vi khuẩn *Bacillus sp.* Tiến hành trích ly ADN tổng số của 21 mẫu phân lập *Bacillus sp.* như theo hướng dẫn ở Bước 1: Ly trích ADN tổng số, nêu trên. Các mẫu ADN sau khi ly trích được kiểm tra bằng máy quang phổ kế và tiến hành chạy phản ứng PCR bằng cặp mồi 16S rRNA.

Kết quả trên Hình 2 chỉ ra rằng chất lượng ADN của 21 mẫu *Bacillus subtilis* phân lập đạt yêu cầu cho các phản ứng PCR tiếp theo với đoạn mồi đặc hiệu cho việc phát hiện nhanh và định danh chính xác loài vi khuẩn *Bacillus subtilis*. Quy trình phân

ứng PCR và quy trình nhiệt của nó được thể hiện ở Bước 2: Quy trình phản ứng PCR nêu trên.

Cặp đoạn mồi được sử dụng để phát hiện nhanh và định danh chính xác loài vi khuẩn *Bacillus subtilis* bao gồm đoạn mồi xuôi nêu trong SEQ ID NO. 1 và đoạn mồi mồi ngược nêu trong SEQ ID NO. 2.

Kết quả trên Hình 3 chỉ ra rằng có hai mẫu vi khuẩn (11 và 13) là có sản phẩm khuếch đại với kích thước là 200 bp trùng với kích thước sản phẩm khuếch đại trên mẫu dương tính (*B.subtilis*). Điều này chỉ ra rằng 2/21 mẫu vi khuẩn *Bacillus sp.* phân lập trong đất là *Bacillus subtilis*.

Hiệu quả của sáng chế

Cặp mồi đặc hiệu được thiết kế trong sáng chế này có khả năng phát hiện nhanh và định danh chính xác loài vi khuẩn *Bacillus subtilis*. Cặp mồi này giúp tiết kiệm rất nhiều thời gian, công sức và tiền bạc so với các phương pháp truyền thống như các phản ứng ứng sinh lý, sinh hoá hay giải trình tự dựa trên vùng trình tự 16S rRNA.

Lợi ích của sáng chế là có thể ứng dụng cặp mồi đặc hiệu này không chỉ cho các nghiên cứu trong phòng thí nghiệm mà còn cho các công tác kiểm định chất lượng các sản phẩm phân bón, chế phẩm sinh học có nguồn gốc vi sinh; các xét nghiệm trong lĩnh vực an toàn thực phẩm và lâm sàng trong y khoa.

1. Ashe S, Maji UJ, Sen R, Mohanty S, Maiti NK (2014) Specific oligonucleotide primers for detection of endoglucanase positive *Bacillus subtilis* by PCR. *3 Biotech* 4:461-465.
2. Chun J and Bae KS (2000) Phylogenetic analysis of *Bacillus subtilis* and related taxa based on partial *gyrA* gene sequences. *Antonie van Leeuwenhoek* 78:123-127
3. Kwon GH, Lee HA, Park JY, Kim JS, Lim J, Parl CS, Kwon DY, Kim YS, Kim JH (2009) Development of a RAPD-PCR method for identification of *Bacillus* species isolated from Cheonggukjang. *International Journal of Food Microbiology*. 129:282-287.
4. Wattiau P, Renard, ME, Ledent P, Debois V, Blackman G, Agathos SN (2001) A PCR test to identify *Bacillus subtilis* and closely related species and its application to the monitoring of wastewater biotreatment. *Appl Microbiol Biotechnol* 56:816-819.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Cặp đoạn mồi để phát hiện và định danh vi khuẩn *Bacillus subtilis*, trong đó đoạn mồi xuôi nêu trong SEQ ID NO. 1 có trình tự GGATTCGGGAGACCATTTG và đoạn mồi ngược nêu trong SEQ ID NO. 2 có trình tự GGGGCATACGGATAATAGGG.

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> NGUYỄN BẢO QUỐC

<120> CẤP ĐOẠN MÔI ĐẶC HIỆU ĐỂ PHÁT HIỆN VÀ ĐỊNH DANH VI KHUẨN *BACILLUS SUBTILIS*

<160> 1

<210> SEQ ID NO.1

<211> 19

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<400>

GGATTCGGGAGACCATTTG

<160> 2

<210> SEQ ID NO.2

<211> 20

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<400>

GGGGCATACGGATAATAGGG

<160> 3

<210> SEQ ID NO.3

<211> 200

<212> ADN

<213> *Bacillus subtilis*

<400>

GGGGCATACGGATAATAGGGGTATCCGCCATACAAATAAGGATTAAATAAAGCGCTTCC
 TATAAGCCCCGCCTGCAAGGCCGCCGATAAACGGTCCTCCAAAAAATCCGAATGGCCGGC
 CAAACCCATAACCAAATCCGGGTCTTCCAAACCCGTAACCGAACCCGAACGGTCTTCCAA
 ACCCAAATGGTCTCCCGAATCC

<160> 4

<210> SEQ ID NO.4 BSn5

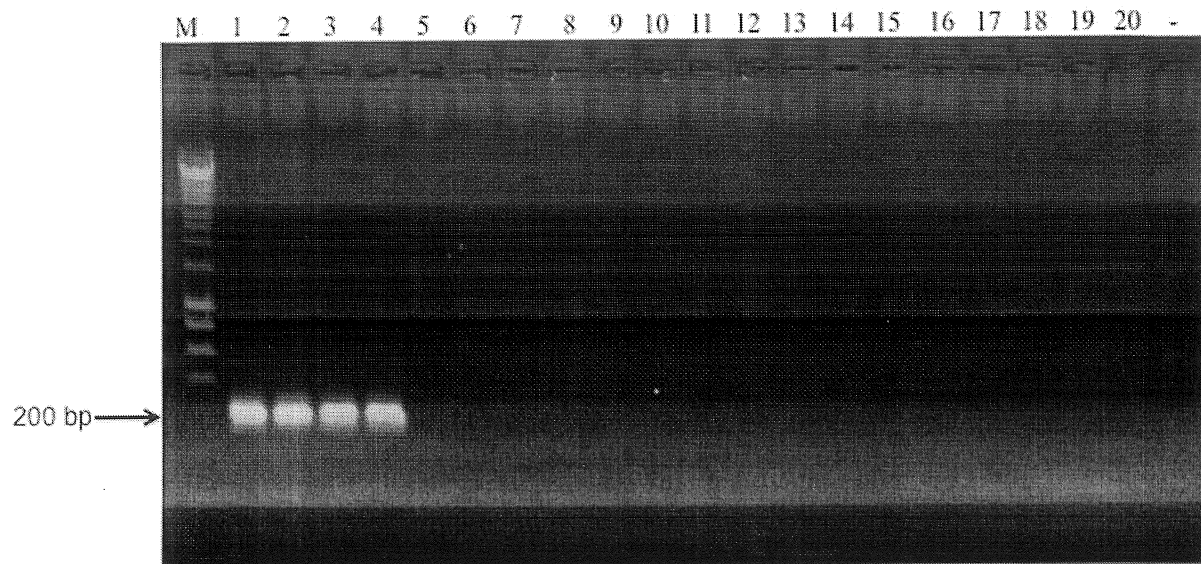
<211> 206

<212> ADN

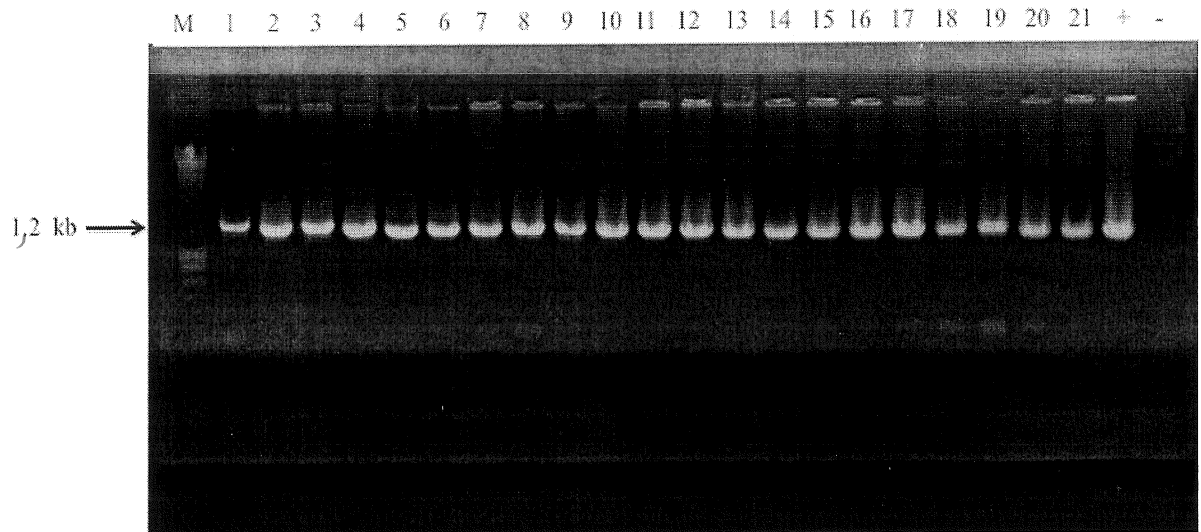
<213> *Bacillus subtilis*

<400>

GGGGCATACGGATAATAGGGGTATCCGCCATACAAATAAGGATTAAATAAAGCGCTTCC
 TATAAGCCCCGCCTGCAAGGCCGCCGATAAACGGTCCTCCAAAAAATCCGAATGGCCGGC
 CAAACCCAAATCCATAACCAAATCCGGGTCTTCCAAACCCGTAACCGAACCCGAACGGTC
 TTCCAAACCCAAATGGTCTCCCGAATCC

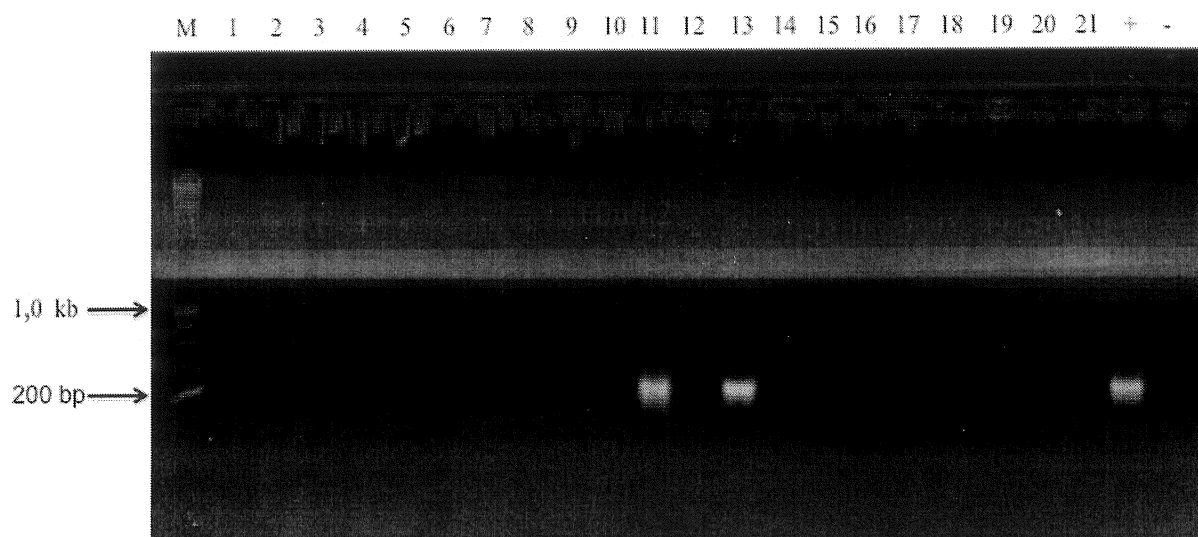


Hình 1



Hình 2

41734



Hình 3