(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) **2-0001781**

(51)[7] **A01N 63/00**

(13) **Y**

(21) 2-2014-00358
(22) 24.12.2014
(45) 27.08.2018 365
(43) 27.06.2016 339
(73) VIỆN CÔNG NGHỆ SINH HỌC (VN)
18 Hoàng Quốc Việt, quận Cầu Giấy, thành phố Hà Nội
(72) Lê Thị Minh Thành (VN), Ngô Đình Bính (VN), Trịnh Thị Thu Hà (VN), Đặng Văn Tiến (VN)

(54) CHỦNG VI KHUẨN BACILLUS THURINGIENSIS SEROVAR GALLERIAE MHB11.3 MANG GEN MÃ HÓA PROTEIN TINH THỂ ĐỘC TỐ DIỆT CÔN TRÙNG BỘ CÁNH CỨNG COLEOPTERAN VÀ CHẾ PHẨM SINH HỌC DIỆT ẤU TRÙNG BỘ CÁNH CỨNG COLEOPTERAN CHỨA DỊCH NUÔI CẤY CỦA CHỦNG VI KHUẨN NÀY

(57) Giải pháp hữu ích đề cập đến chủng vi khuẩn Bacillus thuringiensis serovar galleriae MHB11.3 mang gen mã hóa protein tinh thể độc tố diệt côn trùng bộ cánh cứng Coleopteran phân lập tại Việt Nam, có khả năng sinh tổng hợp độc tố tinh thể Cry8Da diệt côn trùng bộ cánh cứng Coleopteran. Chủng Bacillus thuringiensis serovar galleriae MHB11.3 theo giải pháp hữu ích mang cấu trúc đoạn gen cry8Dat có kích thước 2031 bp mã hóa protein tinh thể độc tố Cry8Da diệt ấu trùng các loài bọ hung: Cotinis nitida, Anomala cuprea. Giải pháp hữu ích cũng đề cập đến chế phẩm diệt ấu trùng bộ cánh cứng Coleopteran chứa dịch nuôi cấy của chủng vi khuẩn này.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Giải pháp hữu ích thuộc lĩnh vực công nghệ vi sinh vật học, cụ thể là đề cập đến chủng vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* serovar *galleriae* MHB11.3 mang gen mã hóa protein tinh thể độc tố diệt côn trùng bộ cánh cứng Coleopteran phân lập tại Việt Nam có khả năng sinh tổng hợp protein tinh thể độc tố diệt ấu trùng bộ cánh cứng (Coleopteran), loài *Cotinis nitida, Anomala cuprea* và trình tự ADN mã hóa protein tinh thể độc tố từ chủng này. Giải pháp hữu ích cũng đề cập đến chế phẩm sinh học diệt ấu trùng bộ cánh cứng Coleopteran chứa dịch nuôi cấy của chủng vi khuẩn này.

Tình trạng kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Trong các loài côn trùng, côn trùng thuộc bộ cánh cứng là nhóm côn trùng được biết đến với số lượng loài lớn nhất (khoảng 400.000 loài). Trong đó, có rất nhiều loài gây hại nghiêm trọng cho cây trồng. Côn trùng bộ cánh cứng hại cây trồng có thể tấn công tất cả các bộ phận khác của cây, nhiều loài ăn phá lá, đục thân, cành, trái, rễ, bông, v.v., dẫn đến làm giảm năng suất, chất lượng thành phẩm cây trồng, có nơi làm cây chết trên diện rộng dẫn đến mất mùa hoàn toàn. Có thể kể đến rất nhiều loài thuộc một số họ phá hại nghiêm trọng cây trồng như: Họ Bọ hung (Scarabaeidae) - bọ hung đục gốc mía *Alissonotum pauper* Burm; *Anomala* sp., *Cotinis nitida* hại đậu tương, lạc, khoai tây, nho, lê, dẻ, v.v.; *Oryctes rhinoceros, Xylotrupes gideon* phá hại dừa; Họ Xén tóc (Cerambycidae) - xén tóc đục thân, cành xoài *Plocaderus ruficornis*, bọ hại cà phê *Celosterna pollinosa sulphurea.*; Họ Ánh kim – họ bọ nhẩy hại rau cải (*Phyllotreta striolata* Fabr.), sâu gai hại lúa (*Hispa armigera* Olivier), bọ hại khoai lang (*Cassida circumdata* Herbst), bọ dừa *Brontispa longissima* hại dừa.

Có nhiều tác nhân diệt ấu trùng bọ hung hiệu quả đã được nghiên cứu. Một số tác nhân là các hợp chất hóa học có tính độc với bọ hung. Những tác nhân khác là các vi sinh vật có hoạt tính diệt ấu trùng bọ hung. Việc sử dụng các chất hóa học diệt bọ hung không những độc đối với sức khỏe con người, môi trường mà còn tạo ra những loài bọ hung kháng thuốc. Để duy trì hiệu quả, đòi hỏi phải tăng liều lượng hóa chất

độc hại. Chính sự gia tăng sử dụng các hóa chất diệt bọ hung có khả năng làm tổn hại các quần thể sinh vật có ích khác trong môi trường. Các tổ chức như Tổ chức Nông lương thế giới, Tổ chức Y tế thế giới và Tổ chức Môi trường thế giới đã khuyến cáo hạn chế đến mức tối đa việc sử dụng các hoá chất và tăng cường sử dụng thuốc trừ sâu sinh học. Trong số các loại thuốc trừ sâu sinh học đã và đang được sử dụng thì loại thuốc có nguồn gốc từ vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) là có hiệu quả diệt sâu cao nhất và rất an toàn với người và động vật bậc cao. Các nghiên cứu đã chỉ ra rằng *Bt* được sử dụng làm thuốc trừ sâu sinh học và chuyển gen diệt côn trùng vào cây trồng để tiêu diệt các loài côn trùng, trong đó: nhóm gen *cry1* diệt sâu bộ Cánh Vảy (Lepidoptera); nhóm gen *cry2, cry4* diệt côn trùng bộ Hai Cánh (Diptera); nhóm *cry3, cry7, cry8* diệt côn trùng bộ Cánh Cứng (Coleoptera); nhóm gen *cry5* tổng hợp độc tố diệt cả côn trùng cánh vảy và cánh cứng; nhóm gen *cry6* được xếp vào nhóm gen diệt tuyến trùng. Hiện nay thuốc trừ sâu sinh học BT chiếm hơn 90% thị phần thuốc trừ sâu sinh học trên thế giới. Đối tượng ban đầu mà thuốc trừ sâu BT tác động chủ yếu là côn trùng bộ cánh vảy và hai cánh. Chỉ đến năm 1983, khi Kriege phân lập được dưới loài *B. thuringiensis tenebrionis* (*Bt.t*) mang gen *cry3* từ bọ cánh cứng *Tenebrio monitar* thì thuốc trừ sâu BT có hoạt tính diệt côn trùng cánh cứng mới được quan tâm nghiên cứu. Côn trùng bộ cánh cứng rất khó diệt, mặt khác hiện nay hiện tượng côn trùng kháng thuốc trừ sâu ngày càng tăng. Vì vậy, muốn diệt được chúng cần phải sử dụng các loại thuốc trừ sâu BT có phổ diện sâu rộng và đặc hiệu cho từng loài côn trùng khác nhau.

Nhóm gen *cry8* mã hóa cho các protein tinh thể độc tố diệt côn trùng hại nông nghiệp bộ cánh cứng. Gen *cry8* được phát hiện đầu tiên vào năm 1992, bởi Narva và các cộng sự từ chủng *Bt* subsp. *kumamotoensis* mang gen *cry8Aa1* có độc tính đặc hiệu với riêng ấu trùng loài Scarabaeid. Cho đến 4/2014, đã xác định được nhóm gen này gồm 38 gen từ *cry8Aa1* đến *cry8Qa1* thuộc các dưới loài *Bt* khác nhau; Gen *cry8Aa1, cry8Ba1* được tách dòng từ *Bt* var. k*umamotoensis*; Gen *cry8Ea1, cry8Fa1, cry8Ha1* được tách dòng từ *Bt*185; Gen *cry8Da* được tách dòng từ *Bt* var. *galleriae*, v.v.. Các gen này đều đặc hiệu cho một hay nhiều loài côn trùng như gen *cry8Ca* diệt được ấu trùng loài *Anomala exoleta, A. corpulenta*; gen *cry8Ea* diệt ấu trùng loài *Holotrichia parallela*; gen *cry8Aa* và *cry8Ba* kháng lại ấu trùng *Cotinis* sp (*Cotinis nitida*, June beetle); gen *cry8Db* diệt được cả ấu trùng và trưởng thành loài *Popillia japonica.* Hầu hết các gen *cry8* mã hóa các protein độc tố có khối lượng phân tử là 130 kDa. Tinh thể protein *cry8* được hình thành và phát triển trong suốt quá trình hình thành của bào tử và nằm bên ngoài bào tử. Cấu trúc của protein tinh thể diệt sâu của gen *cry8* đang là vấn đề đáng quan tâm của các nhà khoa học. Mỗi gen *cry8* thuộc họ gen *cry8* khác nhau thì cấu trúc tinh thể cũng có những điểm khác nhất định, phần lớn

các protein tinh thể của các gen *cry8* đều có dạng hình cầu (*galleriae*, *Bt*185, *BBT*2-5, v.v.), một số ít có dạng hình lưỡng tháp (*Bt* HF-1, v.v.). Gen *cry8* là một nhóm gen rất khó có thể phân lập được. Vì vậy, những nghiên cứu cơ bản về gen *cry8* cũng như ứng dụng chúng trong sản xuất thuốc trừ sâu sinh học và chuyển gen vào cây trồng vẫn còn rất mới mẻ và chưa được đầy đủ. Một số ít gen: *cry8Ca2, cry8Da, cry8Ea1*, *cry8Ga1* được chuyển vào thuốc lá và một vài loài cỏ chăn nuôi như cỏ ống *Agrotis palustris*, cỏ *Lolium perenne* để kháng lại các loài bọ hung hại cây trồng. Các nghiên cứu về thuốc trừ sâu BT từ các chủng mang gen *cry8* mới chỉ bắt đầu. Theo thống kê, ở Công ty American Mycogen (Mỹ), ở Trung Quốc - những nơi rất mạnh về nghiên cứu và ứng dụng thuốc trừ sâu BT trong sản xuất nông nghiệp, mặc dù trong sản xuất nông nghiệp đang sử dụng rất nhiều sản phẩm thuốc trừ sâu BT (Trung Quốc có 276 loại) diệt côn trùng bộ cánh vảy, hai cánh và cánh cứng, nhưng các nghiên cứu về chế phẩm BT diệt côn trùng cánh cứng từ nguồn gen *cry8* mới chỉ trong giai đoạn nghiên cứu tạo chế phẩm và tiến hành thử nghiệm chế phẩm sinh học BT diệt một số bọ hung hại cây trồng. Vì vậy, các nghiên cứu về gen *cry8* đang được các nhà khoa học trên thế giới rất quan tâm nghiên cứu để tìm ra được các gen mới kháng các loài côn trùng cánh cứng đặc hiệu và đặc biệt là khai thác được ứng dụng rất lớn của chúng trong sản xuất thuốc trừ sâu BT và chuyển gen vào cây trồng nhằm giảm thiểu những thiệt hại do côn trùng bộ cánh cứng gây ra.

Gen *cry8Da* được Asano và cộng sự phát hiện năm 2003 từ chủng *Bacillus thuringiensis* serovar *galleriae* SDS502 phân lập tại Nhật Bản, có kích thước 3435 bp, mã hóa protein tinh thể độc tố 130 kDa diệt được cả ấu trùng và trưởng thành của bọ cánh cứng. Gen *cry8Da* có phổ diệt sâu rộng và hiệu quả, tính đến nay nó đã được các nhà khoa học Nhật Bản và Mỹ (Asano và cộng sự 2003, 2005 và Paula M. Pijut 2010) chứng minh là có hoạt tính diệt được 04 loài côn trùng cánh cứng (Coleoptera) hại cây trồng như: *Anomala cuprea, Anomala orientalis, Popillia japonica* (họ bọ hung - *Scarabaeidae*); *Agrilus planipennis* (họ Bổ củi - Elateridae) và đoạn mã hóa protein độc tố đã được chuyển vào cây cỏ voi và cây gỗ tần bì để tạo cây có khả năng kháng lại các loài côn trùng cánh cứng nói trên.

Ở Việt Nam, các nghiên cứu về vi khuẩn *Bt* (phân lập, phân loại, sản xuất thuốc trừ sâu, chuyển gen vào cây trồng) mới chỉ tập trung nhiều vào các loại gen *cry1, vip* diệt sâu bộ cánh vẩy; gen *cry2, cry4* diệt ruồi muỗi và gen *cry3* diệt mọt thóc đỏ. Tuy nhiên, một số nghiên cứu về sản xuất thuốc trừ sâu BT và chuyển gen *Bt* vào cây trồng chủ yếu là gen *Bt* nhập ngoại (Ngô Đình Bính và cộng sự, 2010; Võ Thị Thứ và cộng sự, 20; Lê Thu Hiền và cộng sự, 2002; Phan Đình Pháp và cộng sự, 2000; Nguyễn Hữu Hổ và cộng sự, 2007, v.v.). Cũng cần nhấn mạnh rằng, ở nước ta chưa có một

công trình nào nghiên cứu về gen *cry8* nhập ngoại cũng như *bản địa* và gần đây nhóm gen này mới được nhóm tác giả nghiên cứu từ năm 2006. Nhóm tác giả đã phân lập thành công một số chủng mang gen *cry8Da,* trong đó có chủng *Bacillus thuringiensis* serovar *galleriae* MHB11.3 mang gen *cry8Dat* có khả năng diệt được ấu trùng hai loài bọ hung *Cotinis nitida* và *Anomala cuprea,* đoạn gen mã hóa protein độc tố của chủng MHB11.3 có kích thước 2031 bp đã được đăng ký trên Ngân hàng gen quốc tế, mã số FN796428.1 và bước đầu đã được chuyển thành công vào cây mô hình là thuốc lá.

Bản chất kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Giải pháp hữu ích đề xuất chủng vi sinh vật tự nhiên được phân lập tại Việt Nam có khả năng tạo protein tinh thể độc tố diệt côn trùng cánh cứng. Cụ thể, giải pháp hữu ích đề cập đến chủng vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* serovar *galleriae* MHB11.3 mang gen *cry8Dat* mã hóa protein tinh thể độc tố Cry8Dat có hoạt tính diệt ấu trùng côn trùng bộ cánh cứng cao, loài *Cotinis nitida, Anomala cuprea* và trình tự ADN mã hóa protein tinh thể độc tố Cry8Dat từ chủng này.

Theo khía cạnh thứ nhất, giải pháp hữu ích đề cập đến chủng vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* mang gen mã hóa protein tinh thể độc tố diệt côn trùng bộ cánh cứng Coleopteran phân lập tại Việt Nam có hoạt tính diệt ấu trùng côn trùng cánh cứng (Coleopteran) cao. Đây là chủng *Bt.* serovar *galleriae* MHB11.3 có khả năng tạo bào tử và sinh tổng hợp tinh thể độc tố Cry8Da diệt ấu trùng bộ cánh cứng. Chủng *Bt.* serovar *galleriae* MHB11.3 mang cấu trúc trình tự ADN gen *cry8Dat* mã hóa protein tinh thể độc tố Cry8Dat diệt ấu trùng các loài bọ hung: *Cotinis nitida, Anomala cuprea.* Chủng *Bt.* serovar *galleriae* MHB11.3 theo giải pháp hữu ích có khả năng sinh tổng hợp tinh thể độc tố Cry8Da diệt ấu trùng các loài bọ hung - *Cotinis nitida, Anomala cuprea* - với hoạt tính cao: LC_{50} = 2,476 µg diệt ấu trùng loài *Anomala cuprea* và LC_{50} = 2,857 µg diệt ấu trùng loài *Cotinis nitida.*Trình tự ADN mã hóa protein tinh thể độc tố Cry8Dat từ chủng *Bt.* serovar *galleriae* MHB11.3 có kích thước 2031 bp, mã hóa 677 axit amin sản sinh một protein tinh thể độc tố 77 kDa đã được đăng ký trên Ngân hàng gen quốc tế, mã số: FN796428.1.

Theo khía cạnh thứ hai, giải pháp hữu ích đề cập đến chế phẩm sinh học diệt ấu trùng bộ cánh cứng Coleopteran, trong đó chế phẩm này chứa dịch nuôi cấy của chủng vi khuẩn này.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Hình 1 thể hiện hình thái bào tử và tinh thể độc tố của chủng *Bacillus thuringiensis* serovar *galleriae* MHB11.3 chụp trên kính hiển vi điện tử (1: Tinh thể, 2: Bào tử).

Hình 2 thể hiện protein tinh thể độc tố có hoạt tính diệt côn trùng bọ cánh cứng của chủng *Bacillus thuringiensis* serovar *galleriae* MHB11.3 trên gel PAGE-SDS 12,5% (Cột 1 và 2: Protein tinh thể của chủng MHB11.3; Cột M: protein đánh dấu - Marker protein).

Hình 3 thể hiện vị trí trình tự nucleotit sai khác trong trình tự ADN của chủng Bt MHB11.3 và SDS502 (vị trí số 26 và 1493).

Hình 4 thể hiện protein độc tố tái tổ hợp có hoạt tính diệt côn trùng cánh cứng phân lập từ chủng *B. thuringiensis* serovar *galleriae* MHB11.3 trên gel PAGE-SDS 12,5% (Cột M: protein đánh dấu - Marker protein; Cột 1-3: Protein độc tố tái tổ hợp đã được tinh sạch; Cột 4: Protein tổng số tái tổ hợp từ chủng BL21(DE3)pLysS).

Hình 5 thể hiện kết quả đăng ký trên Ngân hàng gen quốc tế của gen Cry8Da của chủng MHB11.3 (FN796428.1).

Mô tả chi tiết giải pháp hữu ích

Giải pháp hữu ích đề cập đến chủng vi khuẩn *B. thuringiensis* serovar *galleriae* MHB11.3 có hoạt tính diệt ấu trùng côn trùng bộ cánh cứng cao, loài *Cotinis nitida, Anomala cuprea* và trình tự ADN mã hóa protein tinh thể độc tố Cry8Da từ chủng này sẽ được bộc lộ rõ ràng ở đây thông qua các phương án thực hiện giải pháp hữu ích

Chủng *B. thuringiensis* serovar *galleriae* MHB11.3 được phân lập từ mẫu đất vùng trồng mía không sử dụng thuốc trừ sâu Bt của vùng Lương Sơn - Hòa Bình bằng cách: 1 g đất được hòa trong 9 ml dung dịch muối đệm phosphat (phosphate-buffered saline - PBS) vô trùng, lắc 220 vòng/phút trong 5 phút. Lấy 1 ml huyền phù vào ống Eppendorf ủ ở nhiệt độ 65^{o}C trong 30 phút. Dịch đã xử lí nhiệt được pha loãng với PBS vô trùng ở các nồng độ từ 10^{-1} đến 10^{-10}. Hút 100 µl dịch pha loãng đưa lên đĩa petri chứa môi trường MPA rồi trải đều dung dịch trên mặt thạch bằng que gạt thủy tinh vô trùng, ở mỗi nồng độ pha loãng cấy lên 3 đĩa môi trường dinh dưỡng (1% cao thịt, 1% polypepton, 0.2% NaCl và 2% aga; độ pH = 7,6), nuôi ở 28^{o}C trong 72 đến 96 giờ. Đã xác định chủng *Bt* MHB11.3 sinh tinh thể hình cầu.

Chủng *Bt* serovar *galleriae* MHB11.3 được phân loại dưới loài theo 55 typ huyết thanh và đã có phản ứng ngưng kết với typ huyết thanh H5a,5b – thuộc dưới loài Bt *galleriae*.

Hỗn hợp bào tử và tinh thể của chủng *Bt* MHB11.3 được thử nghiệm hoạt tính kháng 3 loại côn trùng: *C. nitida, A. cuprea* (họ bọ hung, bộ cánh cứng) và *Plutella xylostella* (sâu tơ, bọ cánh vẩy). Đã xác định chủng *Bt* MHB11.3 có hoạt tính diệt *C. nitida, A. cuprea* cao (90%).

ADN plasmit của chủng *Bt* MHB11.3 đã được tách và khuếch đại gen *cry8Da* bằng cặp mồi đặc hiệu của gen *cry8Da*

5'-CGGATCCATGAGTCCAAATAATCAAAATG-3'

5'-GAGCTCTCACACATCTAGGTCTTCTTCT-3 '

Kết quả thu được đoạn gen mã hóa protein tinh thể độc tố của chủng *Bt* MHB11.3 có kích thước 2031 bp.

Đoạn gen 2031 bp mã hóa protein tinh thể độc tố của chủng *Bt* MHB11.3 được tách dòng trong vector pGEM-T-Esasy và biến nạp vào vi khuẩn *E. coli* DH5α. Các plasmit tái tổ hợp được đặt tên là pGEM-*cry8Dat*.

Gen *cry8Dat* trong plasmit tái tổ hợp pGEM-*cry8Dat* được xác định trình tự theo phương pháp của Sanger và cộng sự với bộ kit xác định trình tự BigDye Terminator 3.1 và máy đọc trình tự ABI RISM 3700. Trình tự nucleotit được phân tích bằng phần mềm PCGENE đã xác định đoạn gen *cry8Dat* có kích thước 2031 bp mã hóa trình tự 677 axit amin với trọng lượng phân tử tính toán theo lý thuyết là 77 kDa . Liên kết protein đã được thực hiện bằng ClustalX với các đặc điểm của các vùng bảo tồn của protein Cry. Kết quả cho thấy, trình tự đoạn gen *cry8Dat* được tách từ chủng MHB11.3 đều có mức đồng nhất trình tự cao nhất so với trình tự đoạn tương ứng của gen *cry8Da* từ chủng *Bt* subsp. *galleriae* SDS–502 có mã số AB089299 trên ngân hàng gen, đạt 99% và có tỷ lệ đồng nhất trình tự khá thấp với trình tự nucleotit của một số gen *cry8* khác: 86% so với gen *cry8Ga* từ chủng FCD114 (mã số FJ198072.1), 83% với gen *cryIII* của chủng *Bt. kumamotoensis* PS50C(a)... Trình tự nucleotit của gen *cry8Dat* từ chủng MHB11.3 có 2 nucleotit khác với nucleotit của gen *cry8Da* từ chủng SDS502 ở vị trí nucleotit số 26 (G thay cho A) và vị trí số 1493 (T thay cho A). Sự thay đổi này dẫn đến sự thay đổi trình tự axit amin tại các vị trí codon số 9 (C thay cho Y) và số 498 (I thay cho N); trong đó, sự thay thế ở vị trí số 9 thuộc vùng bảo thủ của gen (Domain I) – vùng quyết định phổ độc tố của protein Cry8Da (Asano et al., 2003). Trình tự nucleotit của gen *cry8Dat* từ chủng Bt MHB11.3 đã được đăng ký trên Ngân hàng gen quốc tế, mã số FN796428.1.

Đoạn gen *cry8Dat* từ chủng Bt MHB11.3 được biểu hiện protein trong vi khuẩn *E. coli* nhằm thu được protein độc tố tái tổ hợp để khẳng định phổ hoạt tính của gen này. Đoạn gen 2,0 kb được cắt khỏi plasmit tái tổ hợp và gắn vào vector biểu hiện pET32a(+) bởi 2 enzym giới hạn *Bam*HI và *Sac*I. Vector tái tổ hợp pET32a- *cry8Dat* biến nạp vào tế bào *E. coli* chủng BL21(DE3)pLysS. Các khuẩn lạc mang vectơ tái tổ hợp được biểu hiện trong môi trường có chất cảm ứng là IPTG 1mM, 37^0C trong 4 giờ. Khả năng biểu hiện gen *cry8Da* 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 Bradford (1976) dựa vào phản ứng bắt màu giữa protein và thuốc nhuộm Coomassi 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 96 kDa và lượng protein Cry8Dat tái tổ hợp tinh sạch có nồng độ trung bình là 45 µg/ml.

Thử nghiệm hoạt tính kháng 3 loại côn trùng: *C. nitida, A. cuprea* (họ bọ hung, bộ cánh cứng) và *Plutella xylostella* (sâu tơ, bọ cánh vẩy) của protein tái tổ hợp Cry8Dat và protein tinh thể độc tố tinh chế từ hỗn hợp bào tử và tinh thể chủng Bt MHB11.3 (có định lượng 54.4 µg/ml). Cả hai dạng protein đều có hoạt tính diệt côn trùng cánh cứng *C. nitida, A. cuprea* cao, trong khi không có hoạt lực với *P. xylostella*. Hoạt tính ở các nồng độ protein khác nhau (từ 0,625 đến 10 µg/ml) được xử lý số liệu trên phần mềm Probit, kết quả LC50 của protein tinh thể độc tố tinh sạch là 2,476 với *A. cuprea* và 2,857 µg/ml với *C. nitida*; LC50 của protein tái tổ hợp tinh sạch với *A. cuprea* là 2,391 và 2,710 µg/ml với *C. nitida*.

Chủng *B. thuringiensis* serovar *galleriae* MHB11.3 trong giải pháp hữu ích khác biệt ở chỗ: Chủng này là chủng tự nhiên được phân lập tại Việt Nam mang trình tự đoạn gen *cry8Dat* mã hóa protein tinh thể độc tố diệt côn trùng cánh cứng và chủng này có khả năng diệt được ấu trùng loài bọ hung *C. nitida* – tính đến nay, chưa có một công bố nào về gen *cry8Da* có khả năng diệt ấu trùng *C. nitida*. Đoạn gen mã hóa có kích thước 2031 bp mã hóa cho một trình tự 677 axit amin để tạo thành một protein có trọng lượng phân tử là 77 kDa. Trong trình tự gen *cry8Dat* (là biến thể của gen *cry8Da*) có 2 điểm khác biệt là sự thay thế 2 (số 26 - G thay cho A và số 1493 - T thay cho A) dẫn đến thay thế 2 axit amin (codon số 9 - C thay cho Y và số 498 - I thay cho N), trong đó có một vị trí axit amin nằm trong vùng bảo thủ quyết định phổ độc tố của gen *cry8Da* (codon số 9). Sự thay đổi này giúp cho chủng Bt MHB11.3 tăng phổ diệt sâu cho gen *cry8Da* - không những diệt được *A. cuprea* mà còn diệt được cả ấu trùng loài *C. nitida*. Gen *cry8Da* từ chủng *Bt* SDS502 đã được cấp patent số US6962977B2 được xác định là mới diệt được 04 loại côn trùng đích: *Anomala cuprea, Anomala orientalis, Popillia japonica* (họ bọ hung - *Scarabaeidae*); *Agrilus planipennis* (họ Bổ củi - Elateridae); việc gen *cry8Dat* từ chủng *Bt* MHB11.3 diệt được ấu trùng loài bọ hung *C. nitida* là một kết quả ứng dụng có tính mới trong và ngoài nước. Kết quả này mở ra một hướng mới là ứng dụng nguồn gen *Bt* 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 *B. thuringiensis* serovar *galleriae* MHB11.3 thuần khiết về mặt sinh học theo giải pháp hữu ích hiện đang được lưu giữ tại Phòng Di truyền Vi sinh vật – Viện Công nghệ sinh học – Viện Hàn lâm KHCNVN trong môi trường MPA có bổ sung 30% glycerol trong điều kiện lạnh sâu -86^{o}C, trong nitơ lỏng và đông khô.

Giải pháp hữu ích cũng đề cập đến chế phẩm diệt ấu trùng bộ cánh cứng Coleopteran chứa dịch nuôi cấy của chủng vi khuẩn *B. thuringiensis* serovar *galleriae* MHB11.3. Trong đó, nồng độ dịch nuôi cấy của chủng vi khuẩn này trong chế phẩm là 16 000 IU/mg chế phẩm. Dịch nuôi cấy của chủng vi khuẩn *B. thuringiensis* serovar *galleriae* MHB11.3 được trộn với chất mang là diatomit, galatoza, v.v., và các phụ gia thông thường trong lĩnh vực. Độ ẩm của chế phẩm nằm trong khoảng 9-11%.

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 chủng *Bacillus thuringiensis* serovar *galleriae* MHB11.3

Chủng MHB11.3 được phân lập từ mẫu đất vùng trồng mía không sử dụng thuốc trừ sâu Bt của vùng Lương Sơn - Hòa Bình theo phương pháp sau: 1 g đất được hòa trong 9 ml dung dịch muối đệm phosphat (phosphate buffered saline - PBS) vô trùng, lắc 220 vòng/phút trong 5 phút. Lấy 1 ml huyền phù vào ống Eppendorf ủ ở nhiệt độ 65^{o}C trong 30 phút. Dịch đã xử lí nhiệt được pha loãng với PBS vô trùng ở các nồng độ từ 10^{-1} đến 10^{-10}. Hút 100 µl dịch pha loãng đưa lên đĩa petri chứa môi trường MPA rồi trải đều dung dịch trên mặt thạch bằng que gạt thủy tinh vô trùng, ở mỗi nồng độ pha loãng cấy lên 3 đĩa môi trường dinh dưỡng (1% cao thịt, 1% polypepton, 0.2% NaCl và 2% aga; độ pH = 7,6), nuôi ở 28^{o}C trong 72 đến 96 giờ. Các khuẩn lạc có hình thái đặc trưng của nhóm *Bacillus cereus* được kiểm tra dưới kính hiển vi đối pha hoặc quang học và chọn những khuẩn lạc có khả năng sinh tinh thể. Kết quả là đã phân lập được chủng MHB11.3.

Sử dụng phương pháp phân loại *Bt* dựa trên đặc tính huyết thanh học. Đặc tính huyết thanh học của chủng *Bt* được xác định chủ yếu dựa trên kháng nguyên tiên mao H và được tiến hành bằng phản ứng ngưng kết các tế bào sinh đưỡng với kháng huyết thanh tương ứng.

Tiến hành theo Ohba and Aizawa (1978): Cấy chủng *Bt* đã phân lập được vào ống Craigie (một ống thuỷ tinh nhỏ cắm thẳng đứng vào môi trường chứa trong ống nghiệm to) chứa môi trường Craigie, nuôi ở 28^{0}C trong 24 – 48 giờ. Khi đó, những tế bào có khả năng chuyển động sẽ di chuyển lên phía trên bề mặt môi trường, giữa ống

Craige và ống nghiệm. Vi khuẩn phát triển ở bề mặt này sẽ được cấy vào ống nghiệm có chứa 2 ml môi trường MPB, lắc ở 70-75 vòng/phút trong khoảng thời gian 12 giờ. Quan sát phản ứng ngưng kết với kháng huyết thanh tương ứng bằng 2 cách: (1) Quan sát bằng mắt thường: 100 µl dịch tế bào trộn với 100 µl huyết thanh chuẩn đã pha loãng 50 lần với nước muối vô trùng, sau đó đem ủ ở 37^0C trong 1 giờ. Phản ứng ngưng kết dương tính có thể quan sát bằng mắt thường là tạo cặn dưới đáy và dịch trong suốt; (2) Quan sát trên kính hiển vi: Lấy 1 µl dịch nuôi nhỏ lên phiến kính lõm, quan sát sự chuyển động của vi khuẩn trên kính hiển vi. Nhỏ tiếp vào 1µl huyết thanh chuẩn (đã pha loãng) và quan sát. Thử lần lượt với 55 typ huyết thanh, cho đến khi vi khuẩn mất khả năng chuyển động, tức là phản ứng ngưng kết dương tính đã xảy ra → kháng huyết thanh tương ứng. Kết quả chủng MHB11.3 đã có phản ứng ngưng kết với typ huyết thanh H5a,5b – thuộc dưới loài Bt *galleriae*.

Chủng MHB11.3 được đặt tên là *B. thuringiensis* serovar *galleriae* MHB11.3. Trong phạm vi bản mô tả này, chủng này cũng được gọi chung là MHB11.3.

Ví dụ 2: Tinh sạch protein tinh thể của chủng *B. thuringiensis* serovar *galleriae* MHB11.3

Chủng được nuôi trong 20 ml mô trường LB ở 30°C bằng cách quay lắc tại 220 vòng/phút qua đêm, 1 ml của dịch nuôi được cấy chuyển vào 50 ml môi trường CYS (Yamamoto, 1990) trong bình 250 ml, nuôi lắc 220 vòng/phút ở 30°C trong 6 ngày cho đến khi hình thành bào tử và tinh thể. Hỗn hợp tinh thể và các tế bào ly giải được rửa bằng nước cất khử trùng ở 12.000 vòng/phút trong 10 phút. Hỗn hợp tinh thể và bào tử được ủ trong dung dịch 0,01% Triton X-100 và 1,0 M NaCl ở 4°C qua đêm. Tinh thể của *B. thuringiensis* đã được tách ra từ các bào tử và các mảnh vỡ tế bào bởi 30-70% NaBr Gradient và ly tâm ở 17.000 vòng/phút trong 120 phút. Phần dịch protein tinh thể (phía trên) hòa tan trong nước và rửa hai lần bằng ly tâm. Sau đó, được giữ ở -20 ° C. Định lượng protein tinh thể theo Bradford xác định được hàm lượng trung bình của protein tinh thể = 54,4 µl/ml.

Ví dụ 3: Phân lập gen và xác định trình tự ADN của gen *cry8Dat* của chủng *B. thuringiensis* serovar *galleriae* MHB11.3

Một đoạn 2,0-kb của gen *cry8Dat* được khuếch đại bằng PCR sử dụng cặp mồi đặc hiệu của gen *cry8D* là 5'-CGGATCCATGAGTCCAAATAATCAAAATG-3' và 5'GAGCTCTCACACATCTAGGTCTTCTTCT-3 ' (Asano et al., 2005). ADN từ chủng *B. thuringiensis* đã được tách từ 1 ml tế bào vi khuẩn được nuôi lắc 220

vòng/phút trong 12-16 giờ trong môi trường CYS. Dịch nuôi được ly tâm 10.000 vòng/phút trong 5 phút, thu cặn và rửa ba lần bằng dH2O vô trùng, phần cặn được hòa tan trong 100 ml dH2O vô trùng và sốc nhiệt trong 10 phút để ly giải các tế bào (Birnboim và Doly, 1979). Ly tâm thu dịch nổi và sử dụng 2 ml dịch này làm khuôn mẫu cho phản ứng PCR. Sau khuếch đại, các sản phẩm PCR được phân tích bằng điện di trên gel 0,8% agaroza.

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 2,0 kb. Phân đoạn ADN 2,0-kb được gắn vào vectơ tách dòng pGEM-T-Esasy và biến nạp vào vi khuẩn *E. coli* DH5α. Các plasmit tái tổ hợp được đặt tên là pGEM-*cry8Dat*. Plasmit tái tổ hợp được dự đoán có mang vectơ tái tổ hợp được nuôi trong môi trường LB lỏng có bổ sung Amp 50 µg/ml và tách ADN plasmit để kiểm tra sự có mặt của gen *cry8Da*. Phương thức kiểm tra ADN plasmit tái tổ hợp là bằng kỹ thuật PCR (với cặp mồi đặc hiệu *cry8Da-Bam*HI và *cry8Da-Sac*I) và xử lý với enzym giới hạn. Trình tự gen *cry8Da* được xác định theo phương pháp của Sanger và cộng sự với bộ kit xác định trình tự BigDye Terminator 3.1 và máy đọc trình tự ABI RISM 3700. Trình tự nucleotit được phân tích bằng phần mềm PC GENE. Liên kết protein đã được thực hiện bằng ClustalX với các đặc điểm của các vùng Cry-bảo tồn. Kết quả đã xác định được trình tự đoạn gen *cry8Dat* tách từ chủng MHB11.3 có kích thước 2031 bp mã hóa cho một trình tự 677 axit amin cấu thành một protein có trọng lượng phân tử là 77 kDa. Đoạn gen này có mức đồng nhất trình tự 99% so với trình tự đoạn tương ứng của gen *cry8Da* từ chủng *Bt* sub sp. *galleriae* SDS–502 có mã số AB089299 trên ngân hàng gen và có tỷ lệ đồng nhất trình tự 86% so với gen *cry8Ga* từ chủng FCD114 (mã số FJ198072.1), 83% với gen *cryIII* của chủng *Bt. kumamotoensis* PS50C(a), v.v.. Trình tự nucleotit của gen *cry8Dat* từ chủng MHB11.3 có 2 nucleotit khác với nucleotit của gen *cry8Da* từ chủng SDS502 ở vị trí nucleotit số 26 (G thay cho A) và vị trí số 1493 (T thay cho A). Sự thay đổi này dẫn đến sự thay đổi trình tự axit amin tại các vị trí codon số 9 (C thay cho Y) và số 498 (I thay cho N).

Ví dụ 4: Biểu hiện gen *cry8Dat* của chủng *B. thuringiensis* serovar *galleriae* MHB11.3 trong *E. coli* BL21(DE3)pLysS

Đoạn gen 2,0 kb được tách từ vector pGEM-*cry8Dat* và gắn vào vector biểu hiện pET32a(+) bởi các enzym *Bam*HI và *Sac*I. Vector tái tổ hợp pET32a- *cry8Dat* biến nạp vào tế bào *E. coli* chủng BL21(DE3)pLysS. Sản phẩm biến nạp được nuôi cấy trong môi trường LB có bổ sung Amp 50 µg/ml, 37°C cho tới khi OD= 0,5-0,7; sau đó được kiểm tra bằng colony-PCR. Những khuẩn lạc mang vectơ tái tổ hợp được biểu hiện trong môi trường có chất cảm ứng là IPTG 1mM, 37^0C trong 4 giờ. Khả

năng biểu hiện gen *cry8Da* trong chủng *E. coli* tái tổ hợp được kiểm tra trên gel polyacrylamit 12,5%. Sản phẩm thu được là protein tái tổ hợp có trọng lượng phân tử 96 kDa.

Protein tái tổ hợp được tinh chế bằng cột sắc ký ái lực Probond^{TM} Nickel-Chelating Resin (Invitrogen), quy trình được tiến hành theo protocol của hãng. Protein tái tổ hợp tinh sạch được định lượng theo Bradford (1976) dựa vào phản ứng bắt màu giữa protein và thuốc nhuộm Coomassi 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:

$$M\ (mg) = c.v.a$$

(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 kháng côn trùng của 3 loại protein độc tố có nguồn gốc từ chủng *Bt* serovar *galleriae* MHB11.3: Hỗn hợp bào tử và tinh thể của chủng MHB11.3; Protein tinh thể tinh sạch từ chủng MHB11.3 và Protein độc tố tái tổ hợp tinh sạch từ chủng *E. coli* chủng BL21(DE3)pLysS. Đối tượng côn trùng thử nghiệm là: *A. Cuprea, C. nitida* (bộ cánh cứng) và *Plutella xylostella* (bộ cánh vẩy).

Chủng MHB11.3 được nuôi lắc trong 250 ml môi trường CYS, 220 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 10 ml nước khử ion vô trùng. Lấy 1 ml dịch protein trộn đều với 5 g compost đã khử trùng đựng trong cốc nhựa vô trùng. Bắt vào mỗi cốc 5 con ấu trùng *A. cuprea* hoặc *C. nitida* tuổi 1, 2 hoặc 3 và nuôi, theo dõi trong 7 ngày ở nhiệt độ 28^0C. Thí nghiệm được tiến hành nhắc lại 3 lần, mỗi lần 2 công thức và 5 con ấu trùng/công thức tẩm hỗn hợp bào tử và tinh thể độc tố. Song song là đối chứng thí nghiệm trên ấu trùng không tẩm protein vào compost (5 con/ cốc compost) và đối chứng thử hoạt tính với sâu tơ (*Plutella xylostella*) hại cây họ cải thuộc bộ cánh vẩy (10 con sâu tơ/đĩa lá cải tẩm 1 ml hỗn hợp bào tử và tinh thể độc tố, 3 lần nhắc lại). Chủng *Bt* MHB11.3 có hoạt tính diệt *C. nitida, A. cuprea* cao , đạt 90% (27/30 con chết).

Protein tinh thể tinh sạch từ chủng MHB11.3 và Protein độc tố tái tổ hợp tinh sạch từ chủng *E. coli* chủng BL21(DE3)pLysS được định lượng theo Bradford. Tiến hành thử nghiệm hoạt tình theo phương pháp LC50. Protein độc tố trong chế phẩm sau được định lượng và pha về các nồng độ thích hợp: 0,625-10 µg/ml. Ở mỗi một nồng độ, 2 ml dịch protein được trộn đều với 10 g compost đã khử trùng trong cốc nhựa, bắt

5 con ấu trùng *A. impressicola* tuổi 2, 3 cho vào mỗi cốc. Nuôi, theo dõi số lượng ấu trùng chết trong 7 ngày ở nhiệt độ 28^{0}C. Thí nghiệm được tiến hành nhắc lại 5 lần/công thức, mỗi lần 20 con ấu trùng/4 cốc compost tẩm chế phẩm nghiên cứu. Song song là thí nghiệm đối chứng không tẩm chế phẩm (sử dụng nước cất vô trùng) với 20 con ấu trùng/4 đĩa petri/công thức và đối chứng thử hoạt tính với ấu trùng bộ cánh vẩy – loài sâu tơ (*Plutella xylostella*) hại cây họ cải - 20 con ấu trùng/4 đĩa lá cải tẩm protein nghiên cứu, nuôi 5 ngày ở 28^{0}C. Tỉ lệ sâu chết được tính trung bình ở các công thức thí nghiệm với 5 lần nhắc lại. Số liệu thống kê được được xử lý, tính toán theo phương pháp LC50 với phần mềm phân tích Probit SPSS16.0 (International Business Machines Corp. USA). Sau 7 ngày thử nghiệm và phân tích dữ liệu bằng phần mềm probit cho thấy: Cả hai dạng protein đều có hoạt tính diệt côn trùng cánh cứng *C. nitida, A. cuprea* cao, trong khi không có hoạt lực với *P. Xylostella*; trong đó: LC50 của protein tinh thể độc tố là 2,476 với *A. cuprea* và 2,857 µg/ml với *C. nitida*; LC50 của preotein tái tổ hợp tinh sạch với *A. cuprea* là 2,391 và 2,710 µg/ml với *C. nitida* (Bảng 1).

Bảng 1. Hoạt tính diệt ấu trùng bọ hung của các protein độc tố Cry8Dat

STT	Côn trùng thử nghiệm	Protein tinh thể	LC_{50} (µg)*	LC_{50} 95%	
				Thấp nhất	Cao nhất
1	*Anomala cuprea*	Protein tinh thể độc tố	2.476	1.767	3.458
		Protein Cry8Dat tái tổ hợp tinh sạch	2.391	1.688	3.355
2	*Cotinis nitida*	Protein tinh thể độc tố	2.857	1.977	4.238
		Protein Cry8Dat tái tổ hợp tinh sạch	2.710	1.839	4.066
3	*Plutella xylostella*	Protein tinh thể độc tố	KĐK	KĐK	KĐK
		Protein Cry8Dat tái tổ hợp tinh sạch	KĐK	KĐK	KĐK

Ghi chú: * P-values<0.05; KĐK: Không đáng kể do tỉ lệ ấu trùng chết thấp (1-3%) nên không tính được LC50.

Hiệu quả đạt được của giải pháp hữu ích

Chủng vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* serovar *galleriae* MHB11.3 là chủng được phân lập tại Việt Nam, có khả năng tạo bào tử và sinh tổng hợp tinh thể độc tố diệt ấu trùng bộ cánh cứng (Coleopteran), loài bọ hung: *Cotinis nitida* và *Anomala*

cuprea - cả hai đều là côn trùng thường gây thiệt hại rất lớn cho một loạt các cây trồng ở Việt Nam như mía, dừa, đậu tương, nho, thuốc lá, keo, gừng. v.v..

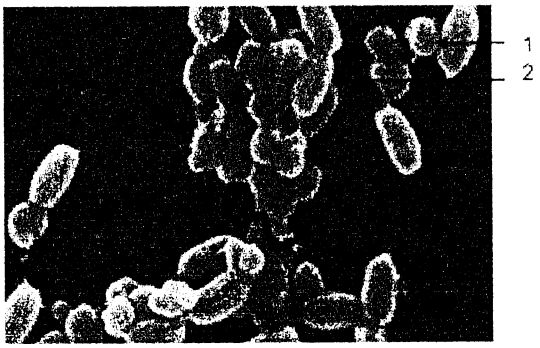
Trên thế giới, gen *cry8Da* của chủng *B. thuringiensis* serovar *galleriae* SDS502 phân lập tại Nhật Bản đã được các nhà khoa học Nhật Bản và Mỹ (Asano và cộng sự 2003, 2005 và Paula M. Pijut 2010) chứng minh là có hoạt tính diệt được 04 loài côn trùng cánh cứng (Coleoptera) hại cây trồng như: *Anomala cuprea, Anomala orientalis, Popillia japonica* (họ bọ hung - *Scarabaeidae*); *Agrilus planipennis* (họ Bổ củi – Elateridae). Tính đến nay, chưa có một công bố nào về chủng Bt mang gen *cry8Da* có khả năng diệt được ấu trùng loài *Cotinis nitida.* Chủng *B. thuringiensis* serovar *galleriae* MHB11.3 là chủng đầu tiên được phân lập tại Việt Nam mang biến thể của gen *cry8Da* nhưng lại có thêm khả năng diệt được ấu trùng loài *Cotinis nitida.*

Chủng *B. thuringiensis* serovar *galleriae* MHB11.3 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 cứng 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.

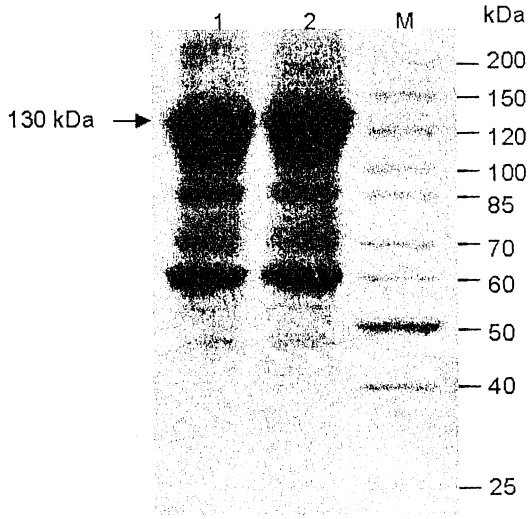
YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Chủng vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* serovar *galleriae* MHB11.3 mang gen mã hóa protein tinh thể độc tố diệt côn trùng bộ cánh cứng Coleopteran thuần khiết về mặt sinh học có khả năng tạo bào tử và sinh tổng hợp tinh thể độc tố diệt ấu trùng bộ cánh cứng Coleopteran, trong đó chủng này có trình tự nucleotit của đoạn gen *cry8Dat* mã hóa trình tự các axit amin tạo protein tinh thể độc tố Cry8Dat được thể hiện trong SEQ ID No:1 và đã được đăng ký trên Ngân hàng gen quốc tế với số hiệu FN796428.1 có kích thước 2031 bp, mã hóa 677 axit amin sản sinh một protein tinh thể độc tố 77 kDa.

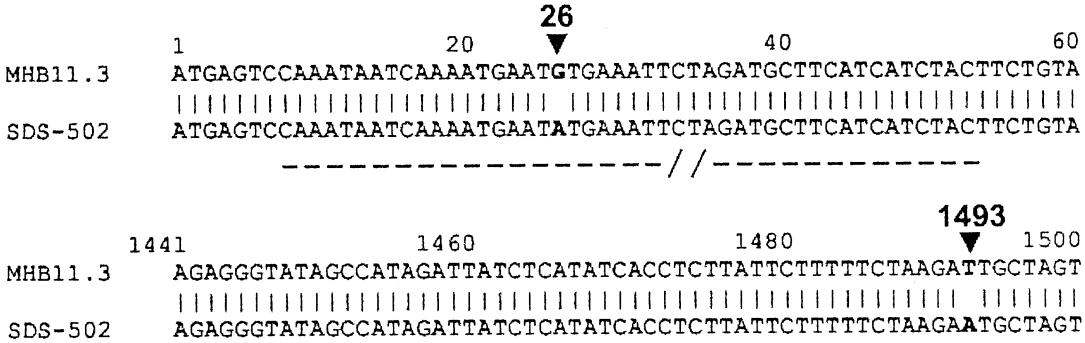
2. Chế phẩm sinh học diệt ấu trùng bộ cánh cứng Coleopteran, trong đó chế phẩm này chứa dịch nuôi cấy của chủng vi khuẩn theo điểm 1 với nồng độ 16 000 IU/mg chế phẩm.



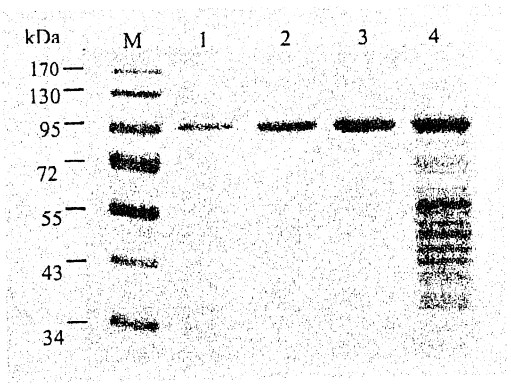
Hình 1



Hình 2



Hình 3



Hình 4

Bacillus thuringiensis serovar galleriae partial cry8Da gene, strain MHB11.3

GenBank: FN796428.1

FASTA Graphics

Go to:

```
LOCUS       FN796428               2031 bp    DNA     linear   BCT 21-APR-2010
DEFINITION  Bacillus thuringiensis serovar galleriae partial cry8Da gene,
            strain MHB11.3.
ACCESSION   FN796428
VERSION     FN796428.1  GI:295039397
KEYWORDS    .
SOURCE      Bacillus thuringiensis serovar galleriae
  ORGANISM  Bacillus thuringiensis serovar galleriae
            Bacteria; Firmicutes; Bacillales; Bacillaceae; Bacillus; Bacillus
            cereus group.
REFERENCE   1
  AUTHORS   Le Thi Minh,T., Pham Kieu,T., Dinh Duy,K. and Ngo Dinh,B.
  TITLE     Cloning and sequencing of the cry8Da gene coding for Coleopteran
            insecticidal protein from Bacillus thuringiensis subspecies
            galleriae MHB11.3
  JOURNAL   Unpublished
REFERENCE   2  (bases 1 to 2031)
  AUTHORS   Ngo,B.D.
  TITLE     Direct Submission
  JOURNAL   Submitted (06-APR-2010) Ngo B.D., Department of Microbial Genetics,
            Institute of Biotechnology, 18 Hoang Quoc Viet Road, Cau Giay,
            Hanoi, 10000, VIET NAM
FEATURES             Location/Qualifiers
     source          1..2031
                     /organism="Bacillus thuringiensis serovar galleriae"
                     /mol_type="genomic DNA"
                     /strain="MHB11.3"
                     /serovar="galleriae"
                     /db_xref="taxon:29338"
                     /identified_by="Ngo Dinh Binh"
                     /PCR_primers="fwd_name: Cry8DF, fwd_seq:
                     atgagtccaaataatcaaaatgaatg, rev_name: Cry8DR, rev_seq:
                     cacatctaggtcttcttctgcttc"
     gene            1..>2031
                     /gene="cry8Da"
     CDS             1..>2031
                     /gene="cry8Da"
                     /codon_start=1
                     /transl_table=11
                     /product="Cry8Da protein"
                     /protein_id="CBL59393.1"

/translation=
                              "MSPNNQNECEILDASSSTSVSDNSVRYPLANDQTTTLQNMNYKD
                     YLRMSEGENPELFGNPETFISSSTVQTGIGIVGQVLGALGVPFAGQIASFYSFIVGQL
                     WPSSTVSVWEMIMKQVEDLIDQKITDSVRKTALAGLQGLGDGLDVYQKSLKNWLENRN
                     DTRARSVVVTQYIALELDFVAKIPSFAISGQEVPLLSVYAQAANLHLLLLRDASIFGA
                     EWGFTPGEISTFYDRQVTRTAQYSDYCVKWYNTGLDKLKGTNAASWLKYHQFRREMTL
                     LVLDLVALFPNYDTRTYPIETTAQLTREVYTDPIVFNRETSGGFCRRWSLNSDISFSE
                     VESAVIRSPHLFDILSEIEFYTTRAGLPLNNTEYLEYWVGHSIKYKNTNASSALERNY
                     GTITSNKIKYYDLANKDIFQVRSLGADLANYYAQVYGVPYASFTLLDKNTGSGSVGGF
                     TYSKPHTTMQVCTQNYNTIDEIPPENEPLSRGYSHRLSHITSYSFSKIASSPARYGNL
                     PVFAWTHRSADVTNTVYSDKITQIPVVKAHTLVSGTTVIKGPGFTGGNILKRTSSGPL
                     AYTSVSVKSPLSQRYRARIRYASTTNLRLFVTISGTRIYSINVNKTMNKGDDLTFNTF
                     DLATIGTAFTFSNYSDSLTVGADSFASGGEVYVDKFELIPVNATFEAEEDLDV"

ORIGIN
        1 atgagtccaa ataatcaaaa tgaatgtgaa attctagatg cttcatcatc tacttctgta
       61 tccgataatt ctgttagata ccctttagca aacgatcaaa cgaccacatt acaaaacatg
      121 aactataaag attatctgag aatgtctgag ggagagaatc ctgaattatt tggaaatccg
      181 gagacgttta ttagttcatc tacggttcaa actggaattg gcattgttgg tcaagtactg
      241 ggggctttag gggttccatt tgctggacag atagctagtt tttatagttt cattgtcggt
      301 caattatggc catcaagtac cgtgagtgta tgggaaatga ttatgaaaca agtggaagat
      361 ctaattgatc aaaaaataac agattctgta aggaaaacag cgcttgcagg actacaagga
      421 ttaggagatg gcttagacgt atatcagaaa tcacttaaga attggctgga aaatcgtaat
      481 gatacaagag ctagaagtgt tgtggtgacc caatatatag ctttagagct tgattttgtt
      541 gctaaaatcc catcttttgc aatatctgga caggaagtac cattattatc agtgtatgca
      601 caagcagcga atttacattt gctattatta cgagatgctt ccatttttgg agcagagtgg
      661 ggattcacac caggaqaaat ttccacattt tatgatcgtc aggtgacacg taccgcccaa
      721 tactcggatt attgtgtaaa gtggtataac actggcttag ataaattaaa agytacgaat
      781 gctgcaagtt ggctgaagta tcaccaattc cgaagagaaa tgacattact ggtattagat
      841 ttagtagcgt tatttccaaa ctatgacaca cgtacgtatc caatcgaaac aacggcccaa
      901 cttacacggg aagtgtatac agatccaata gtatttaaca gagaaacaag tggtggattt
      961 tgtaggcgtt ggtcacttaa cagtgatatt tctttttcag aagtcgaaag cgctgtaatt
     1021 cgttcaccac acctatttga tatactcagt gaaatagaat tttatacaac aagagcgggg
     1081 cttcccttga ataatacgga ataccttgaa tattgggtag gacattctat aaaatataaa
     1141 aatacgaatg cctcatcagc attagaacgt aattacggta cgattacttc taacaaaatc
     1201 aagtattatg atttagcaaa taaggatatc tttcaggttc gatcattagg ggcggattta
     1261 gctaattact acgcacaggt atatggagtt ccgtacgcta gttttacact gcttgacaag
     1321 aatacaggat caggatcagt tggaggtttt acgtactcaa aaccacatac aactatgcaa
     1381 gtatgtacac aaaattacaa tacgattgat gaaatcoctc cagagaatga gccacttagt
     1441 agagggtata gccatagatt atctcatatc acctcttatt ctttttctaa gattgctagt
     1501 agtcctgcta gatatggcaa tctccctgta tttgcttgga cacatcggag tgcggatgtt
     1561 acaaatacag tttattcaga taaaattact cagataccag ttgtaaaggc acatacttta
     1621 gtttcaggta ctactgttat taaaggtcct ggatttacag gaggcaatat ccttaaaaga
     1681 acaagtagtg gtccgttagc ttatactagt gtctctgtaa aatcaccatt atcacaaaga
     1741 tatcgtgcaa gaatacgtta tgcttctact actaacttac gacttttgt aacaatttct
     1801 ggaactcgca tttactctat aaatgttaat aaaaccatga ataaagggga tgatttaaca
     1861 tttaatacat ttgacttagc aactattggt actgctttca cattttcaaa ttactcggat
     1921 agcttaacgg taggtgcaga ttcttttgct tcaggaggag aagtttatgt agataagttc
     1981 gaacttattc cggtaaatgc aacatttgaa gcagaagaag acctagatgt g
//
```

Hình 5

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> **Viện Công nghệ sinh học**

<120> **CHỦNG VI KHUẨN *BACILLUS THURINGIENSIS SEROVAR GALLERIAE* MHB11.3 MANG GEN MÃ HÓA PROTEIN TINH THỂ ĐỘC TỐ DIỆT CÔN TRÙNG BỘ CÁNH CỨNG COLEOPTERAN VÀ CHẾ PHẨM SINH HỌC DIỆT ẤU TRÙNG BỘ CÁNH CỨNG COLEOPTERAN CHỨA DỊCH NUÔI CẤY CỦA CHỦNG VI KHUẨN NÀY**

<160> **1**

<210> **SEQ ID NO 1**

<211> **2031**

<212> **ADN**

<213> *Bacillus thuringiensis* serovar *galleriae*

<400>

```
   1 atgagtccaa ataatcaaaa tgaatgtgaa attctagatg cttcatcatc acttctgta
  61 tccgataatt ctgttagata ccctttagca aacgatcaaa cgaccacatt acaaaacatg
 121 aactataaag attatctgag aatgtctgag ggagagaatc ctgaattatt tggaaatccg
 181 gagacgttta ttagttcatc tacggttcaa actggaattg gcattgttgg tcaagtactg
 241 ggggctttag gggttccatt tgctggacag atagctagtt tttatagttt cattgtcggt
 301 caattatggc catcaagtac cgtgagtgta tgggaaatga ttatgaaaca agtggaagat
 361 ctaattgatc aaaaaataac agattctgta aggaaaacag cgcttgcagg actacaagga
 421 ttaggagatg gcttagacgt atatcagaaa tcacttaaga attggctgga aaatcgtaat
 481 gatacaagag ctagaagtgt tgtggtgacc caatatatag ctttagagct tgattttgtt
 541 gctaaaatcc catcttttgc aatatctgga caggaagtac cattattatc agtgtatgca
 601 caagcagcga atttacattt gctattatta cgagatgctt ccatttttgg agcagagtgg
 661 ggattcacac caggagaaat ttccacattt tatgatcgtc aggtgacacg taccgcccaa
 721 tactcggatt attgtgtaaa gtggtataac actggcttag ataaattaaa aggtacgaat
 781 gctgcaagtt ggctgaagta tcaccaattc cgaagagaaa tgacattact ggtattagat
 841 ttagtagcgt tatttccaaa ctatgacaca cgtacgtatc caatcgaaac aacggcccaa
 901 cttacacggg aagtgtatac agatccaata gtatttaaca gagaaacaag tggtggattt
 961 tgtaggcgtt ggtcacttaa cagtgatatt tctttttcag aagtcgaaag cgctgtaatt
1021 cgttcaccac acctatttga tatactcagt gaaatagaat tttatacaac aagagcgggg
1081 cttcccttga ataatacgga ataccttgaa tattgggtag gacattctat aaaatataaa
1141 aatacgaatg cctcatcagc attagaacgt aattacggta cgattacttc taacaaaatc
1201 aagtattatg atttagcaaa taaggatatc tttcaggttc gatcattagg ggcggattta
1261 gctaattact acgcacaggt atatggagtt ccgtacgcta gttttacact gcttgacaag
1321 aatacaggat caggatcagt tggaggtttt acgtactcaa aaccacatac aactatgcaa
1381 gtatgtacac aaaattacaa tacgattgat gaaatccctc cagagaatga gccacttagt
1441 agagggtata gccatagatt atctcatatc acctcttatt ctttttctaa gattgctagt
1501 agtcctgcta gatatggcaa tctccctgta tttgcttgga cacatcggag tgcggatgtt
1561 acaaatacag tttattcaga taaaattact cagataccag ttgtaaaggc acatacttta
1621 gtttcaggta ctactgttat taaaggtcct ggatttacag gaggcaatat ccttaaaaga
1681 acaagtagtg gtccgttagc ttatactagt gtctctgtaa aatcaccatt atcacaaaga
1741 tatcgtgcaa gaatacgtta tgcttctact actaacttac gacttttgt aacaatttct
1801 ggaactcgca tttactctat aaatgttaat aaaaccatga ataaagggga tgatttaaca
1861 tttaatacat ttgacttagc aactattggt actgctttca cattttcaaa ttactcggat
1921 agcttaacgg taggtgcaga ttcttttgct tcaggaggag aagtttatgt agataagttc
1981 gaacttattc cggtaaatgc aacatttgaa gcagaagaag acctagatgt g
```