

ĐẠI HỌC THÁI NGUYÊN  
TRƯỜNG ĐẠI HỌC SƯ PHẠM

LÊ THỊ NGỌC THƯƠNG

TUYỂN CHỌN, TÁCH DÒNG VÀ XÁC ĐỊNH TRÌNH TỰ GEN  
*cry1C* MÃ HÓA PROTEIN TINH THỂ DIỆT CÔN TRÙNG BỘ CÁNH  
VẢY TỪ VI KHUẨN *Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai* PHÂN LẬP  
TỪ MỘT SỐ MẪU ĐẤT TỈNH THÁI NGUYÊN

LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC

Thái Nguyên - 2012

ĐẠI HỌC THÁI NGUYÊN  
TRƯỜNG ĐẠI HỌC SƯ PHẠM

LÊ THỊ NGỌC THƯƠNG

TUYỂN CHỌN, TÁCH DÒNG VÀ XÁC ĐỊNH TRÌNH TỰ GEN  
*cry1C* MÃ HÓA PROTEIN TINH THỂ DIỆT CÔN TRÙNG BỘ CÁNH  
VẢY TỪ VI KHUẨN *Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai* PHÂN LẬP  
TỪ MỘT SỐ MẪU ĐẤT TỈNH THÁI NGUYÊN

Chuyên ngành: Sinh học thực nghiệm

Mã số: 60.42.30

LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC

NGƯỜI HƯỚNG DẪN KHOA HỌC: PGS.TS NGÔ ĐÌNH BÌNH

Thái Nguyên - 2012

## ***LỜI CAM ĐOAN***

Tôi xin cam đoan đây là công trình nghiên cứu khoa học của tôi. Các số liệu và kết quả trong luận văn là trung thực và chưa từng được ai công bố trong các công trình nghiên cứu khác.

**Tác giả luận văn**

***Lê Thị Ngọc Thương***

## ***LỜI CẢM ƠN***

Trong quá trình học tập và thực hiện luận văn, tôi đã nhận được nhiều sự giúp đỡ, hỗ trợ của thầy cô, bạn bè, đồng nghiệp và gia đình. Tôi xin trân trọng cảm ơn tất cả những tình cảm quý báu đó.

Trước tiên, tôi xin gửi lời cảm ơn tới PGS. TS Ngô Đình Bính, người thầy đã tận tình hướng dẫn tôi hoàn thành luận văn này.

Tôi cũng xin bày tỏ lòng cảm ơn tới CN Đặng Văn Tiến cùng toàn thể cán bộ phòng Di truyền Vi sinh, Viện công nghệ Sinh học, Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam, đã nhiệt tình giúp đỡ tôi trong suốt thời gian dài thực tập.

Bên cạnh đó, sự tạo điều kiện và hỗ trợ của Khoa Sau đại học, BCN Khoa và các đồng nghiệp tại Khoa Sinh – KTNN, Trường Đại học Sư phạm Thái Nguyên cũng là động lực rất lớn giúp tôi hoàn thành tốt luận văn của mình.

Cuối cùng tôi xin cảm ơn bạn bè và gia đình, những người đã luôn ủng hộ tôi trong suốt thời gian qua!

**Tác giả luận văn**

***Lê Thị Ngọc Thương***

## MỤC LỤC

*Trang*

Trang bìa phụ	
Lời cam đoan	
Lời cảm ơn	
Mục lục.....	i
Danh mục các chữ viết tắt.....	iii
Danh mục các bảng.....	iv
Danh mục các hình.....	v
<b>MỞ ĐẦU .....</b>	<b>1</b>
<b>Chương 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU .....</b>	<b>3</b>
1.1. Lịch sử nghiên cứu, ứng dụng vi khuẩn <i>Bacillus thuringiensis</i> .....	3
1.1.1. Lịch sử nghiên cứu vi khuẩn <i>Bacillus thuringiensis</i> trên thế giới.....	3
1.1.2. Những nghiên cứu về <i>Bacillus thuringiensis</i> ở Việt Nam.....	5
1.2. Những đặc điểm của vi khuẩn <i>Bacillus thuringiensis</i> .....	7
1.2.1. Vị trí phân loại.....	7
1.2.2. Phân loại vi khuẩn <i>Bacillus thuringiensis</i> .....	8
1.2.3 Đặc điểm hình thái, sinh lý, hóa sinh của vi khuẩn <i>Bacillus thuringiensis</i> .....	9
1.3. Độc tố của vi khuẩn <i>Bacillus thuringiensis</i> .....	10
1.3.1. Độc tố Cry.....	11
1.3.2. Độc tố Cyt.....	11
1.3.3. Độc tố Vip.....	12
1.3.4. Cấu trúc của các nhóm độc tố tinh thể .....	12
1.3.5. Cơ chế tác động của protein độc tố tinh thể .....	14
1.4. Gen mã hóa protein độc tố tinh thể .....	16
1.4.1. Vị trí của các gen mã hóa độc tố của vi khuẩn <i>Bacillus thuringiensis</i> ....	17
1.4.2. Phân nhóm gen mã hóa độc tố.....	17
1.5. Tổng quan về dưới loài <i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>aizawai</i> và gen <i>cryIC</i> .....	19
1.5.1. Một số đặc điểm của dưới loài <i>Bta</i> .....	19
1.5.2. Gen <i>cryIC</i> .....	20
1.6. Tổng quan về côn trùng thử nghiệm .....	22

1.6.1. Sâu tơ ( <i>Plutella xylostella</i> ) .....	22
1.6.2. Sâu xanh da láng ( <i>Spodoptera exigua</i> ) .....	23
<b>Chương 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP .....</b>	<b>26</b>
2.1. Vật liệu .....	26
2.2. Hóa chất và thiết bị .....	26
2.3. Phương pháp nghiên cứu .....	28
2.3.1. Phương pháp phân loại hình dạng tinh thể của các chủng <i>Bt</i> .....	28
2.3.2. Phương pháp phân loại <i>Bacillus thuringiensis</i> bằng phản ứng huyết thanh ..	28
2.3.3. Phương pháp định lượng mật độ bào tử .....	29
2.3.4. Phương pháp thử hoạt tính trên đối tượng sâu xanh và sâu tơ .....	29
2.3.5. Phương pháp tách DNA plasmid .....	30
2.3.6. Phương pháp PCR để khuếch đại gen <i>cryIC</i> .....	31
2.3.7. Phương pháp tách dòng gen <i>cryIC</i> .....	31
2.3.8. Phương pháp xác định trình tự nucleotid của đoạn gen tách dòng .....	34
2.4. Địa điểm nghiên cứu .....	35
<b>Chương 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN .....</b>	<b>36</b>
3.1. Tuyển chọn chủng vi khuẩn <i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>aizawai</i> mang gen <i>cryIC</i> có hoạt tính diệt sâu tơ ( <i>Plutella xylostella</i> ) và sâu xanh da láng ( <i>Spodoptera exigua</i> ) .....	36
3.1.1. Phân loại hình dạng tinh thể của các chủng <i>Bacillus thuringiensis</i> nghiên cứu .....	36
3.1.2. Phân loại <i>Bacillus thuringiensis</i> bằng phương pháp huyết thanh .....	38
3.1.3. Thử hoạt tính của các chủng <i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>aizawai</i> trên sâu tơ ( <i>Plutella xylostella</i> ) và sâu xanh da láng ( <i>Spodoptera exigua</i> ) .....	40
3.1.4. Kết quả khuếch đại gen <i>cryIC</i> ở các chủng <i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>aizawai</i> bằng phương pháp PCR .....	43
3.2. Tách dòng và đọc trình tự gen <i>cryIC</i> .....	44
3.2.1. Tách dòng gen <i>cryIC</i> .....	44
3.2.2. Xác định trình tự đoạn gen <i>cryIC</i> .....	49
<b>KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ .....</b>	<b>49</b>
<b>TÀI LIỆU THAM KHẢO .....</b>	<b>51</b>

## DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU, TỪ VIẾT TẮT

STT	Viết tắt	Viết đầy đủ
1	Amp	Ampicillin
2	bp	Base pair
3	<i>Bt</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i>
4	<i>Bta</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i> subspecies <i>aizawai</i>
5	DNA	Deoxyribonucleotide acid
6	<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
7	EDTA	Ethylene diamine tetra- acetic acid
8	OD	Optical density- mật độ quang học
9	PCR	Polymerase chain reaction- phản ứng chuỗi
10	SDS	Sodium dodecyl sulphate
11	Sol	Solution
12	TE	Tris EDTA
13	X- gal	5- Bromo- 4 Cloro- 3 indolyl $\beta$ - d galactoside
14	kDa	Kilo Dalton
15	dH <sub>2</sub> O	Nước deion
16	cs	cộng sự

**DANH MỤC CÁC BẢNG**

	<i>Trang</i>
Bảng 3.1. Hình dạng tinh thể của các chủng <i>Bacillus thuringiensis</i> nghiên cứu.....	37
Bảng 3.2. Kết quả phân loại dưới loài của các chủng <i>Bt</i> sinh tinh thể .....	39
Bảng 3.3: Kết quả thử hoạt tính diệt sâu tơ của các chủng <i>Bta</i> sau 3 ngày thử nghiệm.....	41
Bảng 3.4. Kết quả thử hoạt tính diệt sâu xanh da láng của các chủng <i>Bta</i> .....	42
sau 3 ngày thử nghiệm .....	42



## DANH MỤC CÁC HÌNH

	Trang
Hình 1.1. Hình thái khuẩn lạc nhóm <i>B.cereus</i> (nguồn: Phòng DTVS) .....	7
Hình 1.2. Phản ứng ngưng kết của vi khuẩn <i>Bacillus thuringiensis</i> với kháng nguyên lông roi H [6] .....	8
Hình 1.3. Bào tử và tinh thể của <i>Bacillus thuringiensis</i> [24].....	9
Hình 1.4. Bào tử và tinh thể <i>Bacillus thuringiensis</i> dưới kính hiển vi quang học khi nhuộm với fuchsin base (nguồn: Phòng DTVS) .....	10
Hình 1.8. Cây phân loại của hai họ độc tố Cyt và Vip [42].....	12
Hình 1.6. Các block bảo thủ có mặt ở các loại độc tố Cry [26].....	14
Hình 1.7. Mô hình cấu trúc chung của độc tố Cry [26] .....	14
Hình 1.5. Cơ chế tác động của protein tinh thể độc tố tới côn trùng đích [24].....	16
Hình 1.9. Hình ảnh sâu tơ và ( <i>Plutella xylostella</i> ) thiệt hại do sâu tơ gây ra [10].....	23
Hình 1.10. Vòng đời của sâu xanh da láng ( <i>Spodoptera exigua</i> ) [10].....	25
Hình 3.1. Hình dạng khuẩn lạc vi khuẩn <i>Bacillus thuringiensis</i> trên môi trường MPA sau 72 giờ nuôi cấy ở 28 <sup>0</sup> C.....	36
Hình 3.2. Hình dạng bào tử và tinh thể của chủng TN1.12 và TN 36.3 .....	37
Hình 3.3. Hình ảnh ngưng kết của chủng 4J4 (A) và TN 6.12 (B) với typ huyết thanh H7 dưới kính hiển vi quang học .....	39
Hình 3.4. Thử hoạt tính diệt sâu tơ của các chủng <i>Bta</i> nghiên cứu .....	41
Hình 3.5. Hình ảnh thử hoạt tính diệt sâu xanh da láng của các chủng <i>Bta</i> nghiên cứu .....	42
Hình 3.6. Hình ảnh điện di sản phẩm PCR của các chủng <i>Bta</i> nghiên cứu .....	44
Hình 3.7. Khuẩn lạc xanh và trắng trên đĩa thạch LBA sau 14 giờ nuôi cấy .....	45
Hình 3.8. Hình ảnh điện di sản phẩm colony - PCR với môi M13.....	46
Hình 3.9. Hình ảnh điện di sản phẩm cắt DNA plasmid tách chiết từ một số dòng khuẩn lạc trắng .....	47
Hình 3.10. Hình ảnh điện di sản phẩm PCR gen <i>cryIC</i> từ DNA plasmid tái tổ hợp pGEM-T Easy – <i>cryIC</i> – TN28.6 - p3, pGEM-T Easy – <i>cryIC</i> – TN 36.3 - p1 và pGEM-T Easy – <i>cryIC</i> – TN 6.12 – p7.....	48

## MỞ ĐẦU

### 1. Đặt vấn đề

Thái Nguyên là tỉnh trung du miền núi phía Bắc, nông nghiệp chiếm tỷ trọng lớn trong cơ cấu kinh tế. Cũng như nhiều vùng nông nghiệp khác, sâu hại cây trồng, đặc biệt là các loài thuộc bộ Cánh vảy như sâu tơ (*Plutella xylostella*), sâu xanh da láng (*Spodoptera exigua*)... là một trong những nhân tố gây thiệt hại lớn tới năng suất và phẩm chất nông sản. Việc sử dụng thuốc trừ sâu hóa học để diệt côn trùng bộ Cánh vảy (Lepidoptera) là biện pháp có hiệu quả tức thời nhưng lại gây ra những tác hại rất lâu dài cho môi trường sinh thái, đồng thời việc tồn dư thuốc trừ sâu trong nông sản gây ngộ độc cho người và động vật, là những nguyên nhân khiến thuốc trừ sâu sinh học được coi như một giải pháp hiệu quả để dần thay thế thuốc trừ sâu hóa học trong nông nghiệp. Trên thị trường thuốc trừ sâu sinh học hiện nay, các chế phẩm có nguồn gốc từ vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* chiếm thị phần gần như tuyệt đối [8], [39].

*Bacillus thuringiensis* là vi khuẩn Gram dương, trong giai đoạn sinh bào tử có khả năng tạo ra các protein tinh thể gây độc một cách đặc hiệu với các côn trùng thuộc bộ Cánh vảy (Lepidoptera), bộ Hai cánh (Diptera), bộ Cánh cứng (Coleoptera) .... Các tinh thể là hỗn hợp của một hay nhiều loại protein thuộc 2 nhóm độc tố Cry và độc tố Cyt. Các độc tố có tính đặc hiệu với côn trùng đích nhưng không gây độc cho người, động vật có xương sống, thực vật. Các độc tố tinh thể được mã hóa bởi các gen *cry* nằm trên các plasmid [39].

*Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai* (*Bta*) là một trong 82 dưới loài của vi khuẩn *Bacillus thuringiensis*, có khả năng sinh nhiều loại protein tinh thể có tác dụng diệt côn trùng thuộc nhiều bộ khác nhau. Protein tinh thể độc Cry1C là một loại protein do *Bta* sinh ra trong quá trình hình thành bào tử, có hoạt tính chống lại côn trùng bộ Cánh vảy rất mạnh.

Việc sàng lọc và tuyển chọn dưới loài *Bacillus thuringiensis* có khả năng tiêu diệt nhiều loại côn trùng đích cũng như tiếp tục nghiên cứu về trình tự các gen *cry*