

ĐẠI HỌC THÁI NGUYÊN
TRƯỜNG ĐẠI HỌC KHOA HỌC

NGUYỄN VĂN NAM

**TÁCH DÒNG GEN *cry4A*, *cry4B* MÃ HOÁ PROTEIN
DIỆT CÔN TRÙNG BỘ HAI CÁNH TỪ CÁC CHỦNG
Baccillus thuringiensis PHÂN LẬP TỪ MỘT SỐ MẪU ĐẤT
THUỘC THÀNH PHỐ NHA TRANG**

LUẬN VĂN THẠC SĨ CÔNG NGHỆ SINH HỌC

THÁI NGUYÊN - 2012

ĐẠI HỌC THÁI NGUYÊN
TRƯỜNG ĐẠI HỌC KHOA HỌC

NGUYỄN VĂN NAM

**TÁCH DÒNG GEN *cry4A*, *cry4B* MÃ HOÁ PROTEIN
DIỆT CÔN TRÙNG BỘ HAI CÁNH TỪ CÁC CHỦNG
Baccillus thuringiensis PHÂN LẬP TỪ MỘT SỐ MẪU ĐẤT
THUỘC THÀNH PHỐ NHA TRANG**

**Chuyên ngành: Công nghệ sinh học
Mã số: 60 42 02 01**

LUẬN VĂN THẠC SĨ CÔNG NGHỆ 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 nêu trong luận văn là trung thực và chưa từng được ai công bố trong công trình nghiên cứu khác.

Thái Nguyên, ngày 18 tháng 10 năm 2012

Tác giả

Nguyễn Văn Nam

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 chân thành cảm ơn PGS. TS Ngô Đình Bình, người thầy đã tận tình hướng dẫn, giúp đỡ và tạo mọi điều kiện để tôi hoàn thành luận văn này.

Tôi cũng xin chân thành cảm ơn 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.

Tôi cũng xin chân thành cảm ơn Tiến sĩ Nguyễn Vũ Thanh Thanh, các giảng viên cùng các thầy cô giáo trường Đại học Khoa học đã nhiệt tình giúp đỡ tôi trong suốt thời gian học tập tại trường và 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!

Thái Nguyên, ngày 18 tháng 10 năm 2012

Học viên

Nguyễn Văn Nam

MỤC LỤC

	<i>Trang</i>
MỞ ĐẦU	1
Chương 1: TỔNG QUAN TÀI LIỆU	3
1.1. Đại cương về <i>Bacillus thuringiensis</i>	3
1.1.1. Lịch sử nghiên cứu <i>Bacillus thuringiensis</i>	3
1.1.2. Vị trí, đặc điểm hình thái và sinh thái học <i>Bacillus thuringiensis</i>	4
1.1.3. Phân biệt Bt với các loài khác trong nhóm <i>Bacillus cereus</i>	6
1.1.4. Đặc điểm sinh lý, sinh hóa	7
1.1.5. Protein tinh thể của vi khuẩn <i>Bacillus thuringiensis</i>	7
1.1.6. Đặc điểm phân loại của <i>Bacillus thuringiensis</i>	8
1.1.7. Đặc điểm phân loại loài phụ <i>Bti</i>	8
1.1.8. Hệ gen của vi khuẩn <i>Bacillus thuringiensis</i>	8
1.2. Lịch sử nghiên cứu và ứng dụng của <i>Bti</i>	15
1.2.1. Tinh thể độc của <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>israelensis</i>	16
1.2.2. Cấu trúc phân tử nhân độc tố của <i>Bti</i>	17
1.2.3. Hoạt tính diệt côn trùng của <i>Bti</i>	18
1.2.4. Tác động của <i>Bti</i> đến các sinh vật khác	19
1.3. Tình hình nghiên cứu ứng dụng trong nước và trên thế giới	19
1.3.1. Tình hình nghiên cứu, ứng dụng trên thế giới	19
1.3.2. Tình hình nghiên cứu trong nước.....	20
1.4. Tổng quan về côn trùng thử nghiệm	21
1.4.1. Phân loại khoa học của muỗi	21
1.4.2. Vòng đời của muỗi.....	23
1.4.3. Khả năng gây bệnh của muỗi.....	24
1.4.4. Sơ lược về côn trùng thử nghiệm:.....	24
Chương 2: VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP.....	29
2.1. Vật liệu	29
2.1.1. Sinh phẩm.....	29

2.1.2. Hoá chất và môi trường.....	29
2.1.3. Dụng cụ và thiết bị thí nghiệm.....	31
2.2. Phương pháp nghiên cứu.....	32
2.2.1. Phương pháp phân lập vi khuẩn <i>Bacillus thuringiensis</i>	32
2.2.2. Phương pháp xác định nồng độ bào tử	33
2.2.3. Phương pháp thử hoạt tính sinh học	34
2.2.4. Kỹ thuật định typ huyết thanh	35
2.2.5. Khuyếch đại gen mã hóa độc tố bằng phản ứng PCR.....	35
2.2.6. Phương pháp tách chiết DNA plasmid từ vi khuẩn	37
2.2.7. Phương pháp điện di trên gel agarose	38
2.2.8. Phương pháp thổi gel	39
2.2.9. Phương pháp tách dòng gen <i>cry4A</i> , <i>cry4B</i>	40
Chương 3: KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN	43
3.1. Phân lập vi khuẩn <i>Bacillus thuringiensis</i> từ các mẫu lá	43
3.2. Sự đa dạng tinh thể của các chủng phân lập	44
3.3. Phân loại dưới loài của các chủng <i>Bacillus thuringiensis</i>	45
3.4. Thử nghiệm hoạt tính diệt ấu trùng muỗi <i>Culex quinquefasciatus</i> của các chủng <i>Bacillus thuringiensis</i>	46
3.4.1. Xác định nồng độ bào tử	46
3.4.2. Thử nghiệm hoạt tính	46
3.5. Phát hiện gen mã hóa protein diệt ấu trùng muỗi của chủng <i>Bacillus thuringiensis</i> phân lập	49
3.6. Tách dòng, đọc trình tự gen <i>cry4A</i> và <i>cry4B</i>	52
3.6.1. Tách dòng gen <i>cry4A</i> và gen <i>cry4B</i>	52
KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ	63
TÀI LIỆU THAM KHẢO	65

DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU, CÁC CHỮ VIẾT TẮT

STT	Chữ viết tắt	Chữ viết đầy đủ
	Bp	Base pair – Cặp Base
	<i>Bt</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i>
	dH ₂ O	Deion water – Nước khử ion
	DNA	Deoxyribonucleotide acid – Axit Nucleic
	ĐC	Đối chứng
	<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
	h	Giờ
	kDa	Kilo Dalton
	OD	Optical density – mật độ quang học
	PCR	Polymerase Chain Reaction – phản ứng chuỗi trùng hợp
	SDS	Sodium dodecyl sulphate
	Sol	Solution – Dung dịch tách chiết DNA plasmid
	TE	Tris EDTA
	X-gal	5-Bromo-4 Cloro-3 indolyl β -D galactoside

DANH MỤC BẢNG

	<i>Trang</i>
Bảng 1.1. Một số đặc điểm phân biệt các loài trong nhóm 1 chi <i>Bacillus</i>	6
Bảng 1.2: Phân loại gen cry mã hóa các protein độc tố Cry diệt côn trùng	11
Bảng 1.2. Đặc điểm của một số protein độc tố Cry	13
Bảng 3.1. Thống kê số lượng chủng Bt phân lập được và hình dạng tinh thể của chủng phân lập.	44
Bảng 3.2. Kết quả thử hoạt tính diệt ấu trùng muỗi <i>Culex quinquefasciatus</i> của các chủng phân lập sau các khoảng thời gian khác nhau, ở các nồng độ khác nhau.	46
Bảng 3.3. Kết quả khuếch đại gen độc tố thuộc nhóm <i>cry4</i> của các chủng phân lập.....	50
Bảng 3.5. So sánh trình tự ĐNT5.4-4B1 với các trình tự đã công bố trên ngân hàng gen quốc tế bằng phần mềm Blast	60

DANH MỤC HÌNH

	<i>Trang</i>
Hình 1.1. Hình thái tế bào vi khuẩn <i>Bacillus thuringiensis</i>	5
Hình 1.2. Hình thái tế bào vi khuẩn <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>israelensis</i>	7
Hình 1.3. Mô hình cấu trúc chung của một protein độc tố Cry	9
Hình 1.4. Cơ chế tác động của protein tinh thể độc lên côn trùng	12
Hình 1.5. Các giai đoạn phát triển của muỗi	23
Hình 1.6. Muỗi <i>Anopheles</i> trưởng thành(A) và vòng đời của muỗi <i>Anopheles</i> (B) ..	25
Hình 1.7. Ấu trùng(A) và muỗi <i>Aedes</i> trưởng thành (B)	26
Hình 1.8. Muỗi <i>Culex</i> trưởng thành	27
Hình 3.1. Hình thái khuẩn lạc của chủng <i>Bacillus thuringiensis</i> phát triển trên môi trường MPA sau 72 giờ nuôi cấy.	43
Hình 3.2. Hình thái bào tử và tinh thể của chủng ĐNT8.1 chụp dưới kính hiển vi điện tử quét với độ phóng đại 5000 lần.	44
Hình 3.3. Phản ứng ngưng kết của <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>israelensis</i> với kháng huyết thanh.	45
Hình 3.4. Hình ảnh thử hoạt tính diệt ấu trùng muỗi <i>Culex quinquefasciatus</i> của các chủng phân lập	49
Hình 3.5. Hình ảnh điện di sản phẩm PCR với các cặp mồi đặc hiệu cho gen Cry4A trên gel agarose 1%.	51
Hình 3.6. Hình ảnh điện di sản phẩm PCR với các cặp mồi đặc hiệu cho gen <i>cry4B</i> trên gel agarose 1%.	51
Hình 3.7. Hình ảnh khuẩn lạc xanh – trắng trên môi trường LBA	53
Hình 3.8. Hình ảnh kết quả điện di sản phẩm cắt DNA plasmid các dòng khuẩn lạc biến nạp gen <i>cry4A</i> trên gel agarose 0,8 %	54
Hình 3.9. Hình ảnh điện di sản phẩm cắt DNA plasmid trên gel agarose 0,8 %	55
Hình 3.10. Hình ảnh kết quả điện di sản phẩm PCR khuếch đại gen <i>cry4A</i> và <i>cry4B</i> từ các dòng plasmid tái tổ hợp:	56
Hình 3.11. Kết quả so sánh trình tự gen <i>cry4A</i>	59
Hình 3.12. Kết quả so sánh trình tự gen <i>cry4B</i>	62

MỞ ĐẦU

Muỗi là loài côn trùng truyền nhiều bệnh rất nguy hiểm . Các bệnh sốt rét, sốt xuất huyết , viêm não Nhật Bản , sùi chân voi , giun chỉ ... do muỗi truyền thực sự đã và đang đe dọa sinh mạng của hàng triệu người. Hàng năm có khoảng 270 triệu người mắc bệnh sốt rét , làm chết hàng triệu người. Hàng triệu mắc bệnh sốt xuất huyết và các bệnh khác. Ở Việt Nam, theo số liệu của Tổng cục Thống kê, 9 tháng đầu năm 2012 cả nước có 51,3 nghìn trường hợp mắc bệnh sốt xuất huyết , trong đó 42 ca tử vong , 16 nghìn trường hợp mắc bệnh sốt rét , 554 trường hợp mắc bệnh viêm não Nhật Bản , trong đó 15 trường hợp tử vong (64).

Có rất nhiều biện pháp hoá học và sinh học được áp dụng để khắc phục tình trạng trên. Tuy nhiên các biện pháp hoá học lại thường gây ra tính kháng thuốc trên côn trùng, cứ sau một khoảng gian rất ngắn thì thuốc hoá học lại không còn tác dụng đồng thời thuốc hoá học còn gây ảnh hưởng đến sức khỏe cộng đồng và góp phần làm mất cân bằng sinh thái. Vì vậy, các biện pháp sinh học được khuyến khích sử dụng. Một trong các vi sinh vật được quan tâm và sử dụng nhiều nhất là vi khuẩn *Bacillus thuringiensis*. Sở dĩ như vậy là do đặc tính sinh protein tinh thể độc có khả năng diệt côn trùng gây hại như: Côn trùng bộ cánh vảy, bộ hai cánh, bộ cánh cứng... Vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* được ứng dụng để diệt côn trùng gây hại theo phương pháp: thuốc diệt trừ sinh học Bt.

Việc nghiên cứu các hoạt tính diệt côn trùng của các chủng Bt phân lập ở Việt Nam đặc biệt là hoạt tính diệt muỗi, ruồi là hết sức cần thiết nhằm tìm ra những chủng mang gen tự nhiên có hoạt tính mạnh phục vụ cho việc diệt ruồi, muỗi. Protein tinh thể độc Cry4A, Cry4B là hai trong nhiều protein có hoạt tính chống lại côn trùng bộ hai cánh. Xuất phát từ mục đích này chúng tôi đã tiến hành nghiên cứu đề tài: “Tách dòng gen *cry4A*, *cry4B* mã hoá