

ĐẠI HỌC THÁI NGUYÊN  
TRƯỜNG ĐẠI HỌC KHOA HỌC

=====

TRƯƠNG PHÚC HÙNG

**NGHIÊN CỨU TÁCH DÒNG GEN *cry1Ab*,  
*cry1Ac* MÃ HÓA PROTEIN DIỆT CÔN TRÙNG  
BỘ CÁNH VẢY TỪ CÁC CHỦNG *Bacillus  
thuringiensis* PHÂN LẬP TỪ MỘT SỐ MẪU ĐẤT  
THUỘC TỈNH THÁI NGUYÊN**

**Chuyên ngành: Công nghệ Sinh học**

**Mã số: 60.42.80**

**LUẬN VĂN THẠC SĨ CÔNG NGHỆ SINH HỌC**

**Thái Nguyên - 2010**

## MỞ ĐẦU

### 1. Đặt vấn đề

Thái Nguyên là một tỉnh miền núi trung du, nằm trong vùng trung du và miền núi Bắc Bộ, có diện tích tự nhiên là 3.562,82 km<sup>2</sup>. Với địa hình thấp dần từ núi cao xuống núi thấp, trung du, đồng bằng theo hướng Bắc – Nam làm cho khí hậu Thái Nguyên chia thành ba vùng rõ rệt trong mùa đông: vùng lạnh, vùng lạnh vừa, vùng ấm và hai mùa rõ rệt mùa mưa và mùa khô. Do ảnh hưởng của địa hình, đất đai ở Thái Nguyên được chia thành ba loại chính, trong đó, đất núi chiếm diện tích lớn nhất (48,4%) hình thành do sự phong hoá trên các đá Macma, đá biến chất và trầm tích, độ cao trên 200m, tạo điều kiện cho phát triển lâm nghiệp, trồng rừng, cây đặc sản...đất đồi chiếm 31,4% chủ yếu hình thành trên cát kết, bột kết phiến sét và một phần phù sa cổ kiến tạo, độ cao từ 150 – 200m, phù hợp với cây ăn quả lâu năm, cây công nghiệp và đất ruộng chỉ chiếm 14,4%. Thái Nguyên còn có một diện tích lớn đất chưa sử dụng. Kết cấu của đất, điều kiện khí hậu và đặc điểm về địa hình đã tạo ra cho Thái Nguyên sự đa dạng về thực vật, động vật, cũng như các loài vi sinh vật trong đó có vi khuẩn *Bacillus thuringiensis*[23].

*B. thuringiensis* là vi khuẩn gram dương, mang các gen *cry* sinh tổng hợp bào tử và protein tinh thể độc tố có hiệu quả diệt đối với nhiều loài côn trùng thuộc các bộ cánh vảy, cánh cứng và hai cánh. Trong những năm gần đây các chủng *Bt* đã được các nhà khoa học phân lập với số lượng rất phong phú [3]. Tuy nhiên, mỗi chủng chỉ chứa một số nhóm gen *cry* gây độc với một số loài côn trùng nhất định. Vì vậy việc sàng lọc các chủng *B. thuringiensis* có chứa gen *cry* mong muốn, tạo dòng và xác định trình tự gen độc tố đó là vấn đề rất cần thiết, nó làm cơ sở cho các nghiên cứu đi sâu tiếp theo đối với những gen *cry* này như: nhằm tạo ra các chủng *B. thuringiensis* tái tổ hợp mới

có phổ diệt sâu rộng, hoạt lực diệt sâu cao hơn đối với nhiều loài côn trùng quan trọng; việc biến nạp các gen độc tố *cry* thích hợp vào từng loại cây trồng để bảo vệ chúng trước sự tấn công của côn trùng. Protein tinh thể độc cry1Ab, cry1Ac là một trong nhiều protein có hoạt tính cao chống lại côn trùng bộ cánh vảy. Xuất phát từ mục đích này, chúng tôi tiến hành nghiên cứu đề tài:

**“Nghiên cứu Tách dòng và đọc trình tự gen cry1Ab, cry1Ac mã hóa protein tinh thể diệt côn trùng bộ cánh vảy phân lập từ một số mẫu đất thuộc tỉnh Thái Nguyên”.**

## **2. Mục tiêu của đề tài**

- Sàng lọc được các chủng *Bacillus thuringiensis* có hoạt tính diệt côn trùng bộ cánh vảy.
- Tách dòng và đọc trình tự được các chủng *Bt* nghiên cứu mang gen *cry1Ab* và gen *cry1Ac*.

## **3. Nhiệm vụ của đề tài**

- Thu thập các chủng *Bt* đã được phân lập chưa qua tuyển chọn từ đất Thái Nguyên;
- Phân loại các chủng *Bt* var *kurstaki* bằng phương pháp huyết thanh;
- Phát hiện gen *cry1Ab* và gen *cry1Ac* bằng phương pháp PCR;
- Sàng lọc các chủng *Bt* var *kurstaki* có hoạt tính diệt sâu to;
- Tách dòng gen *cry1Ab* và gen *cry1Ac*;
- Xác định trình tự đoạn gen *cry1Ab* và đoạn gen *cry1Ac* đã được tách dòng từ các chủng *Bt* nghiên cứu và so sánh với trình tự gen ở Ngân hàng Gen quốc tế.

## CHƯƠNG 1: TỔNG QUAN TÀI LIỆU

### 1.1. Lược sử nghiên cứu và ứng dụng của vi khuẩn *Bacillus thuringiensis*

#### 1.1.1. Lịch sử nghiên cứu và ứng dụng *Bacillus thuringiensis* (Bt) trên thế giới

Năm 1901, nhà khoa học Nhật Bản Sigetane Ishiwata đã phát hiện ra một loại vi khuẩn gây bệnh sotto ở trên tằm và ông đặt tên là *Bacillus sotto*. Năm 1911, nhà khoa học Đức E. Berline cũng đã phân lập được một loại vi khuẩn tương tự từ xác ấu trùng bướm phân Địa Trung Hải, *Anagasta kaenniella*. Mãi đến năm 1915, vi khuẩn này mới chính thức được mang tên *Bacillus thuringiensis* do vi khuẩn này được phân lập từ vùng Thuringen của Đức. Đến năm 1930, Bt đã được thử nghiệm chống sâu đục thân ở Châu Âu. Năm 1938, chế phẩm Bt đã được sản xuất lần đầu tiên để diệt sâu hại lúa mì tại Pháp. Năm 1953, Hannay và Fitzjame đã phát hiện ra thể vùi và công bố tinh thể có bản chất protein. Năm 1956, Angus đã chứng minh hoạt tính diệt sâu là do tinh thể tách ra từ tế bào và bào tử. Năm 1957, công ty Sandoz (Thụy Sĩ) đã sản xuất ra một số lượng lớn thuốc trừ sâu Thuricide từ chủng *Bt. var. kurstaki*. Đến năm 1962, de Barjac và Bonnfoi đã đưa ra một phương pháp phân loại mới cho các chủng Bt và *Bacillus sphaericus* (Bs) bằng phương pháp huyết thanh. Vào những năm 1960 – 1976, nhiều chủng Bt có hoạt tính diệt sâu cao đã được phân lập và ứng dụng. Năm 1977, Goldberg và Margarit đã phát hiện ra *Bt var. israelensis* diệt ấu trùng muỗi và ruồi thuộc bộ hai cánh. Năm 1981, Schnepf và Whiteley đã lần đầu tiên phân lập và tách dòng gen độc tố mã hoá protein tinh thể diệt sâu của chủng *Bt. var kurstaki* HD-1 gọi là gen *cryI* và biểu hiện ở *E. coli*. Từ đó, một số lượng lớn các gen đã được tách dòng và đọc trình tự. Năm 1983, Krieg và cộng sự đã phân lập ra loài phụ *Bt var. tenebrionit* diệt bọ cánh cứng hại lá khoai tây vùng Colorado, Hoa Kỳ từ sâu *tenebrio molitor*. Sau đó, công ty Mycogen phát

hiện ra một chủng tương tự *Bt. var. tenebrionit* tên là *Bt. var. sandiego* và đã tổng hợp được chuỗi gen độc tố của chúng. Năm 1985, gen *cry* của *Bt* đã được chuyển vào cây trồng để diệt sâu. Năm 1987, phát hiện ra *Bt* diệt giun tròn thực vật. Năm 1991, phát hiện ra *Bt* diệt ve bét, mặt thuộc bộ Trematoda. Năm 1995, cây chuyển gen thương phẩm đầu tiên đã được đưa và sản xuất. Năm 2003, saikai và cộng sự đã công bố protein tinh thể của *Bt* diệt tế bào ung thư. Năm 2005, Ohba đã phát hiện ra protein của 4 dưới loài *Bt* phân lập ở Việt Nam có khả năng chống tế bào ung thư cổ tử cung của người [3].

### **1.1.2. Lịch sử nghiên cứu và ứng dụng *Bacillus thuringiensis* tại Việt Nam**

Ở Việt Nam thuốc trừ sâu sinh học *Bt* được ứng dụng đầu tiên tại Viện Bảo vệ Thực vật năm 1971. Nguyễn Văn Cẩm và cs, đã khảo nghiệm 5 loại thuốc trừ sâu sinh học *Bt* nhập nội từ Liên Xô, Trung Quốc... đã cho kết quả rất khả quan. Tuy nhiên, những nghiên cứu, sản xuất và ứng dụng *Bt* đầu tiên được Nguyễn Công Bình và cs thực hiện lần đầu tiên vào năm 1973 tại Viện Sinh vật, Viện Khoa học (nay là Viện Khoa học và Công nghệ). Có thể chia lịch sử 30 năm phát triển *Bt* của thành 3 thời kỳ như sau:

#### **1.1.2.1. Thời kỳ mở đầu nghiên cứu**

Nguyễn Công Bình, Phạm Bá Nhạ, Ngô Đình Bính là những người đầu tiên mở đường nghiên cứu *Bt* tại Việt Nam. Năm 1973, Viện Sinh vật đã tiến hành sản xuất *Bt* bằng phương pháp thủ công và bán công nghiệp trong phòng thí nghiệm. Năm 1973-1976, *Bt* đã được sản xuất chủ yếu trên môi trường đặc với giá thể là agar tự chế tạo từ rong câu và các nguyên liệu khác như: bã khô lạc, bột đậu tương, bột cá,... các chủng *Bt* được sử dụng để sản xuất ở thời kỳ này do Nguyễn Công Bình mang từ Trung Quốc về có loài phụ *Bacillus thuringiensis* var *thuringiensis*, *B. thuringiensis* var *kurstaki*. Các chế phẩm này đã được sử dụng cho vùng rau ngoại thành Hà Nội và đã thu được các kết

quả tốt đẹp. Năm 1975, chế phẩm *Bt* đã được sản xuất theo phương pháp lên men chìm trong nồi lên men tự tạo tại Phòng Sinh học thực nghiệm thuộc phân viện Viện Khoa học đống tại thành phố Hồ Chí Minh. Năm 1982, Viện Công nghệ thực phẩm cũng sản xuất chế phẩm *Bt* theo phương pháp lên men chìm với dung tích nồi lên men là 5m<sup>3</sup>. Từ năm 1984-1993, việc sản xuất chế phẩm *Bt* đã bị giảm sút vì các chế phẩm *Bt* sản xuất ra có chất lượng không cao nên tốc độ tiêu thụ giảm. Nhìn chung, trong thời kỳ này đã bắt đầu sản xuất và áp dụng thành công chế phẩm *Bt* đã khiến cho các nghiên cứu *Bt* mở đầu khá thuận lợi và tốt đẹp.

#### ***1.1.2.2. Thời kỳ sản xuất và ứng dụng (1984-1994)***

Các chế phẩm *Bt* sản xuất theo phương pháp dịch thể được áp dụng rộng rãi, có hiệu quả phòng trừ rất rõ rệt, hơn nữa giá bán không cao (khoảng 6000 đồng/lít) nên phù hợp với thu nhập của nông dân. Việc sản xuất chế phẩm *Bt* theo phương pháp lên men hở không cần vô trùng đã được một số đơn vị thuộc các trường đại học đề xuất nhưng đã không thu được kết quả tốt.

#### ***1.1.2.3. Thời kỳ nghiên cứu cơ bản, ứng dụng và phát triển (1994-nay)***

Cuối thời kỳ sản xuất và ứng dụng 1984-1993, chế phẩm *Bt* kém chất lượng không tiêu thụ được. Sản xuất và ứng dụng *Bt* bước vào thời kỳ thoái trào, các nhà nghiên cứu lại phải quay lại nghiên cứu cơ bản để phục vụ cho xây dựng công nghệ sản xuất và cơ sở ứng dụng. Do vậy, khoảng 10 năm trở lại đây, các nhà khoa học đã chuyển việc nghiên cứu *Bt* sang hướng mới là tìm ra các chủng *Bt* có phổ diệt sâu rộng, hoạt tính diệt sâu cao để phục hồi lại việc sản xuất thuốc trừ sâu *Bt* và ứng dụng công nghệ chuyển gen *Bt* phục vụ sản xuất.

Các chủng *Bt* phân lập tại Việt Nam rất đa dạng về thành phần loài và đa dạng về gen. Năm 1998, có 34 chủng chuẩn mang kháng nguyên tiêu mao H và đã chế tạo được 34 bộ sinh phẩm (kit) phục vụ cho phân loại *Bt* bằng

phương pháp huyết thanh. Bằng phương pháp PCR với hỗn hợp các cặp mồi đặc hiệu cho 7 gen thuộc nhóm gen *cry* typ 1 cho thấy có 102 chủng *Bt* trong tổng số 115 chủng có chứa 311 gen *cryI* (chiếm 88.7%), đáng chú ý là các chủng chứa 5 gen *cryIAa*, *cryIAb*, *cryIAc*, *cryIC* và *cryID* - chiếm 6,8% [1].

Trên cơ sở phát hiện, tách dòng và đọc trình tự gen có trong các chủng *Bt* phân lập tại Việt Nam, Ngô Đình Bình và cs đã tách dòng và biểu hiện gen mã hóa tổng hợp protein Cry1C và Cry1D diệt sâu khoang trong *E. coli* từ các chủng *Bt aizawai* phân lập từ các mẫu đất của Hà Nội và Hà Tĩnh, các protein tái tổ hợp thu được đã cho hiệu quả diệt sâu cao hơn so với đối chứng. Năm 2000, Võ Thị Thứ và cs đã tách dòng và biểu hiện gen mã hóa protein *cry4A* diệt ấu trùng muỗi. Năm 2003, Lê Thị Thu Hiền đã thiết kế thành công vectơ chuyển gen *cryIA* vào cây bông [1].

Ở Việt Nam, những nghiên cứu về lĩnh vực chuyển gen kháng côn trùng vào cây trồng để tạo ra các cây có khả năng kháng các sâu bệnh mới đã được bắt đầu từ cuối thế kỷ 20. Trong đó, đã có rất nhiều nghiên cứu chuyển gen *cryIA* kháng sâu vào cây trồng thông qua vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens* để tạo ra các giống cây trồng mới có khả năng kháng sâu như: cây đậu xanh, cây cải bông...[4,5,6,9,10]. Năm 2003, Phan Đình Pháp và cs đã chuyển gen *cryIB* vào cây lúa thông qua phương pháp sử dụng súng bắn gen, đến năm 2005, gen kháng sâu trên được chuyển vào cây cà tím thông qua vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens* [11].

## **1.2. Đại cương về vi khuẩn *Bacillus thuringiensis***

### **1.2.1 Đặc điểm hình thái**

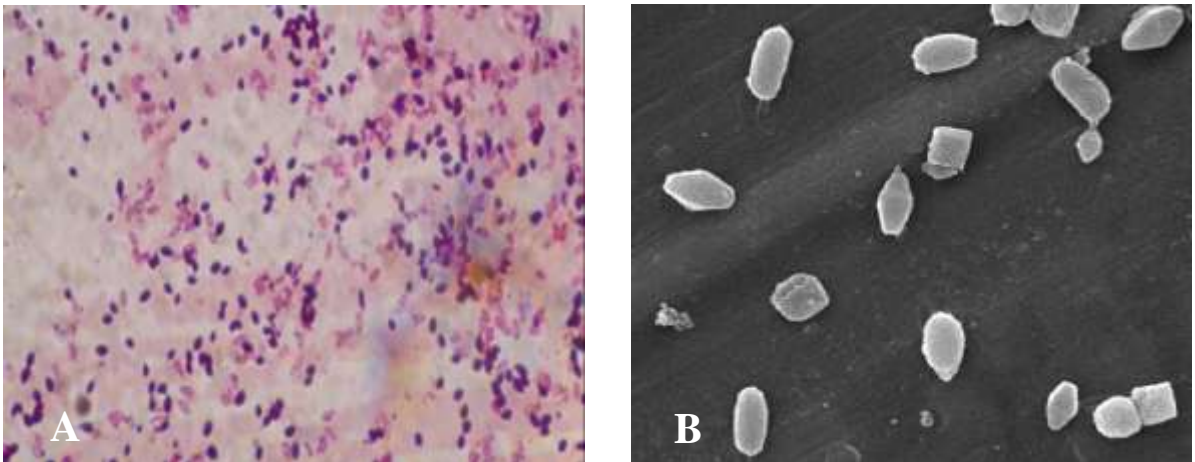
Theo các tài liệu về phân loại vi khuẩn gây bệnh côn trùng của Sneath (1986) Wistreich và Lechtman (1988), Syahly (1991) thì vi khuẩn *Bt* được xếp vào nhóm I, chi *Bacillus*, họ *Bacillaceae*, ngành *Firmicutes* [3].

*Bt* thuộc chi *Bacillus* là vi khuẩn đất, hình que, gram dương, hô hấp hiếu khí hoặc kỵ khí không bắt buộc, kích thước tế bào từ 3 – 6  $\mu\text{l}$ , có phủ tiêm mao không dày, chuyển động được. Các loài thuộc chi *Bacillus* có khả năng hình thành bào tử khi gặp những điều kiện bất lợi của môi trường, bào tử có dạng hình trứng với kích thước từ 1,5 - 2  $\mu\text{l}$  và có thể nảy mầm thành tế bào sinh dưỡng khi gặp điều kiện thuận lợi. Bào tử là dạng sống tiềm ẩn của vi khuẩn có khả năng chịu nhiệt, bức xạ, hoá chất, áp suất thẩm thấu cao. Màng ngoài nằm ở ngoài cùng đó là phần sót lại của tế bào mẹ, chiếm khoảng 2 – 10% khối lượng khô của bào tử. Thành phần chủ yếu là lipoprotein, cũng có một lượng nhỏ axit amin, có tính thẩm thấu kém. Lớp áo bào tử có cấu tạo bởi 3 – 15 lớp, chủ yếu là protein sừng. Áo bào tử có sức đề kháng cao với lizozim, proteinaza, các chất hoạt động bề mặt, có tính thẩm thấu kém đối với các cation. Dưới áo bào tử là vỏ bào tử. Vỏ bào tử chứa một lượng lớn peptidoglycan đặc biệt, ít liên kết chéo, ngoài ra còn có 7 – 10% (tính theo khối lượng khô của bào tử) chất dipicolinat canxi (DPA- Ca) không chứa axit teicoic. Áp suất thẩm thấu của lớp vỏ bào tử cao tới 20atm, lượng chứa nước là 70%. Dưới lớp vỏ bào tử là lõi bào tử còn gọi là thể chất nguyên sinh cấu tạo bởi 4 thành phần: thành bào tử, màng bào tử, bào tử chất và vùng nhân.

Đặc biệt trong quá trình hình thành bào tử vi khuẩn *Bt* có thể sinh ra những tinh thể mang tính độc đối với côn trùng. Tinh thể là một loại protein có kích thước khoảng 0,6 x 0,02  $\mu\text{m}$  có thể chiếm 25% trọng lượng khô của tế bào và có hình dạng rất đa dạng: hình tháp, hình ovan, hình lập phương hoặc có hình dạng không xác định ... Khi ở trong tế bào sinh dưỡng thì bào tử và tinh thể thường nằm kề nhau, khi tế bào tan thì bào tử và tinh thể cùng thoát ra ngoài [3,14].

Khi nhuộm tế bào *Bt* bằng thuốc nhuộm fushin và quan sát dưới kính hiển vi ta thấy tinh thể *Bt* bắt màu hồng sẫm còn bào tử thì bắt màu hồng nhạt (hình 1.1) [3,6,7].





**Hình 1.1: Hình thái bào tử và tinh thể của một số chủng *Bacillus thuringiensis***  
(A: Kính hiển Vi quang học; B: Kính hiển vi điện tử quét)

*Bt* có đặc điểm hình thái sinh lý, sinh hoá rất giống với các nhóm trực khuẩn sinh bào tử *B. cereus*, *B. mycoides* và *B. anthracis* tuy nhiên *Bt* có khả năng sinh tinh thể còn loài khác thì không [4].

### 1.2.2 Đặc điểm sinh hoá

*Bt* không lên men sinh axit với arabinosa, xilozơ và manitol nhưng tạo axit trong môi trường có glucoza, có khả năng thuỷ phân tinh bột, khử nitrat thành nitrit, có phản ứng với lòng đỏ trứng gà, phát triển được trong môi trường thạch kị khí có chứa 1% lizozim. *Bt* có khả năng sinh trưởng và phát triển ở nhiệt độ 15 – 45<sup>0</sup>C, nhiệt độ tối ưu là 28 – 30<sup>0</sup>C, pH = 7. *Bt* không có khả năng khử amin của phenilalanin, không sử dụng axit axetic, không khử muối sunfit.

### 1.2.3. Tính chất nuôi cấy

Tính chất nuôi cấy là đặc tính vốn có của vi sinh vật, là một trong những tiêu chuẩn để định loại vi sinh vật. Tính chất nuôi cấy của các dưới loài *Bt*

khác nhau là khác nhau, đồng thời phụ thuộc vào thành phần môi trường, thời gian và nhiệt độ nuôi cấy.

Khuẩn lạc của dưới loài *Bt* var . *kurstaki* nuôi cấy trên môi trường MPA ở 30<sup>0</sup>C trong 72 giờ đa số có hình tròn, màu trắng sữa có mép nhăn đường kính có thể đạt tới 8 – 10mm. Trong khi đó khuẩn lạc loài phụ *berlinner* có dạng thảm, với các sợi hình phóng xạ, đường kính khoảng 10mm; màu vàng nhạt và trơn ướt, viền nhăn thành hình vải thô mở rộng ra xung quanh nên được gọi là dạng phóng xạ nhăn. Nếu nuôi cấy có bổ sung 2% gluco, nuôi ở 30<sup>0</sup>C trong 24 giờ có thể thấy các điểm khuẩn lạc nhỏ màu vàng trên bề mặt, sau 42 giờ thành hình vành khăn tròn dày, đường kính 3mm, giữa có một vành tròn tương đối sâu, bề mặt trắng tối, hơi ánh quang, dạng hạt thô khô, sau 72 giờ đường kính có thể đạt 2cm. Một số chủng *Bt* xuất hiện khuẩn lạc trơn nhăn [3,4].

#### **1.2.4. Phương pháp phân loại *Bacillus thuringiensis***

Có nhiều phương pháp phân loại *Bt* khác nhau. Khóa phân loại đầu tiên được thiết lập dựa trên đặc điểm hình thái và đặc điểm sinh hoá (Heimpel và Angus, 1958). Tuy nhiên phân loại theo phương pháp này không phân biệt được các chủng *Bt* một cách rõ ràng bởi vì *Bt* có các đặc điểm hình thái, sinh lý sinh hoá rất giống các đại diện trong nhóm trực khuẩn sinh bào tử *Bacillus cereus*, *B. thuringiensis*, *B. mycoides*, *B. anthracis*. Mới đây phát hiện thêm 2 loài là *B. weihenstephanensis* và *B. pseudomycooides* [3,4,14].

Ngoài ra, người ta còn phân loại vi khuẩn *Bt* theo typ huyết thanh kháng protein tinh thể, typ huyết thanh kháng nguyên – O, theo loại hình enzym lipaza, dựa trên plasmit và phân loại theo nguồn bệnh. Nhưng trong cùng một chủng có sự tồn tại của các typ gen ngoại độc tố khác nhau (Sanchis và cộng