

THIẾT KẾ VECTOR BIỂU HIỆN THỰC VẬT MANG GEN *cry2Ab3* CÓ HOẠT TÍNH KHÁNG SÂU ĐỤC QUẢ ĐẬU TƯƠNG *Etiella zinkenella*

Nguyễn Hữu Kiên¹, Nguyễn Thị Hòa¹, Lê Thị Mai Hương¹,
Nguyễn Trung Anh¹, Đinh Thị Mai Thu¹, Tống Thị Hương¹,
Đinh Thị Thu Ngân¹, Lê Thị Minh Thành², Nguyễn Văn Đồng^{1*}

TÓM TẮT

Sâu đục quả đậu tương *Etiella zinkenella* Treitschke là một trong những nguyên nhân gây thiệt hại nghiêm trọng đến năng suất, chất lượng đậu tương. Mặc dù việc tạo giống cây trồng biến đổi gen kháng sâu mang các gen *cry* được phân lập từ các chủng vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* (Bt) đã được nghiên cứu thành công trên nhiều đối tượng cây trồng khác nhau nhưng trên cây đậu tương còn hạn chế. Nghiên cứu này được thực hiện với mục tiêu là thiết kế các vector biểu hiện thực vật mang gen *cry2Ab3* dạng đại và cải biến được phân lập từ chủng Bt BD8.2 bản địa của Việt Nam. Kết quả của nghiên cứu cung cấp các vật liệu di truyền phục vụ cho việc chuyển các gen này vào cây đậu tương nhằm tăng khả năng kháng sâu đục quả *Etiella zinkenella*.

Từ khóa: *Bacillus thuringiensis*, *cry2Ab3*, đậu tương, *Etiella zinkenella*, vector pZY101-Asc.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Sâu đục quả *Etiella zinkenella* Treitschke là côn trùng thuộc bộ cánh vảy (Lepidoptera) được biết tới là đối tượng phân bố rộng khắp trên thế giới và gây hại trên nhiều loài cây trồng khác nhau, đặc biệt quả đậu tương non là nguồn thức ăn ưa thích của chúng. Cụ thể, năng suất đậu tương ở Iran đã bị thiệt hại do sâu đục quả đến 40%, Đài Loan là 10-15%, Philippines là 57%, trong khi đó Indonesia lên tới 80% (Berg *et al.*, 1998). Để hạn chế tác hại của sâu đục quả đối với cây trồng, thì một số biện pháp phòng trừ sâu hại được sử dụng phổ biến như thuốc trừ sâu hóa học, sinh học và côn trùng thiên (Kumar *et al.*, 2008; Tabata *et al.*, 2008; USDA, 2012). Trong đó, thuốc trừ sâu hóa học là biện pháp đem lại hiệu quả cao nhất. Tuy nhiên, việc lạm dụng thuốc trừ sâu hóa học đã làm ảnh hưởng tới ô nhiễm môi trường, các loài thiên địch có ích và đặc biệt là sức khỏe con người. Để cải thiện vấn đề này, việc phát triển các giống cây trồng có khả năng kháng sâu đục quả bằng các kỹ thuật di truyền và chuyển gen vào thực vật là một hướng đi đầy hứa hẹn.

Hiện nay, có rất nhiều gen kháng/điệt côn trùng gây hại được chuyển vào cây trồng có nguồn gốc từ động vật, thực vật và vi sinh vật. Trong đó, các chủng vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* (Bt) là đối tượng được nghiên cứu nhiều nhất trong số các tác nhân vi sinh vật gây bệnh cho côn trùng. Khoảng 800 gen mã hóa cho các độc tố Bt và chúng được phân loại thành 80 họ chính. Các loại độc tố của Bt có sự khác nhau về tính đặc hiệu đối với từng loại côn trùng thuộc bộ Cánh vảy, Hai cánh, Cánh cứng, Cánh nửa, Tuyến trùng,... (Crickmore *et al.*, 2013). Từ khi gen mã hóa protein độc tố của Bt lần đầu tiên được tách dòng và giải trình tự năm 1981 thì hàng loạt gen mã hóa protein độc tố của Bt như Cry (crystal δendotoxin), Cyt (Cytolysin), Vip (Vegetative Insecticidal Protein) và một số độc tố khác như hemolysin, enterotoxin, chitin... đã được nghiên cứu đặc tính diệt côn trùng của chúng. Trong đó, Cry là họ độc tố quan trọng và được ứng dụng nhiều nhất trong sản xuất thuốc trừ sâu Bt và chuyển gen vào cây trồng để kháng sâu. Các gen *cry* được phân loại dựa trên hoạt tính diệt côn trùng đặc hiệu và sự tương đồng của chuỗi nucleotide. Trên cơ sở này, gen *cry* và protein tinh thể độc tố diệt sâu được chia làm 6 nhóm chính: (1) Gen *cry1* mã hóa protein *cry1* có trọng lượng phân tử 130140 kDa độc đối với côn trùng bộ cánh vảy; (2) Gen *cry2* mã hóa tiền độc tố có khối lượng phân tử 6971 kDa có hoạt lực với ấu trùng của bộ cánh vảy (Cry2B) và bộ hai cánh (Cry2A); (3) Gen *cry3* mã

¹ Viện Di truyền Nông nghiệp, Viện Khoa học Nông nghiệp Việt Nam

² Viện Công nghệ Sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

*Email: dongjircas@yahoo.com

hoá tổng hợp protein 73-74 kDa diệt côn trùng cánh cứng; (4) Gen *cry4* mã hoá tổng hợp protein có khối lượng phân tử 135, 128, 74 và 72 kDa diệt ấu trùng thuộc bộ hai cánh; (5) Gen *cry5* tổng hợp độc tố 80 kDa diệt cả côn trùng cánh vảy và cánh cứng; (6) Gen *cry6* được xếp vào nhóm gen diệt tuyến trùng (Crickmore *et al.*, 2013).

Kết quả nghiên cứu (số liệu chưa công bố) của chúng tôi đã chỉ ra rằng, gen *cry2Ab3* khi được biểu hiện trong vi khuẩn *Escherichia coli* (*E. coli*) thì protein Cry2Ab3 sản sinh ra có thể tiêu diệt được sâu đục quả đậu tương ở trong điều kiện nhân tạo. Dựa trên cơ sở đó, trong nghiên cứu này đã chỉnh sửa gen *cry2Ab3-wt* (dạng dại) ban đầu nhằm tạo ra gen *cry2Ab3-cb* (cải biến) có khả năng tương thích với hệ gen của cây đậu tương tốt hơn; sau đó, đã thiết kế các cấu trúc vector biểu hiện thực vật mang gen *cry2Ab3-wt* và *cb* để phục vụ cho việc chuyển gen các gen này vào cây đậu tương nhằm tăng cường khả năng kháng sâu đục quả của các cây chuyển gen *cry2Ab3-wt* và *cb*.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Gen *cry2Ab3-wt* được nhóm nghiên cứu của Viện Nghiên cứu Hệ gen phân lập từ chủng vi khuẩn *Bt* BD8.2 của Việt Nam và nhân dòng trong Vector pJET1.2. Vector pRTL2 và pZY101-Asc do Trung tâm Quốc gia Công nghệ sinh học – Trường Đại học Missouri, Hoa Kỳ cung cấp. Các vật liệu nghiên cứu được lưu giữ tại Phòng thí nghiệm Trọng điểm Công nghệ tế bào thực vật – Viện Di truyền Nông nghiệp.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Cải biến gen *cry2Ab3*

Để cải biến gen *cry2Ab3*, công cụ OPTIMIZER (<http://genomes.urv.es/OPTIMIZER/>) được sử dụng kết hợp cùng với tỷ lệ phần trăm các bộ ba mã hóa tối ưu cho các gen trong cây đậu tương trên trang web ([http://www.kazusa.or.jp/codon/cgi-](http://www.kazusa.or.jp/codon/cgi-bin/showcodon.cgi?species=3847)

[bin/showcodon.cgi?species=3847](http://www.kazusa.or.jp/codon/cgi-bin/showcodon.cgi?species=3847)) để chỉnh sửa các bộ ba mã hóa của gen *cry2Ab3-wt* ban đầu.

2.2.2. Tổng hợp nhân tạo và tách dòng gen *cry2Ab3-cb*

Gen *cry2Ab3-cb* có kích thước 1902 bp được chia thành những đoạn ngắn ~75 nucleotide và được tổng hợp trên nền frit tổng hợp gen theo công nghệ của Công ty Sinh hóa Phù Sa (Cần Thơ, Việt Nam). Đoạn DNA của gen *cry2Ab3-cb* được khuếch đại bằng PCR sử dụng cặp mồi 2Ab3cb-Syt-F/2Ab3cb-Syt-R có chứa 25 nucleotide tương đồng với 2 đầu biên (đã được gắn vào 2 đầu 5' và 3' của đoạn gen *cry2Ab3-cb* trong khi tổng hợp) của vector pUC19 (Bảng 1) bằng enzyme Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific, Hoa Kỳ) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Tiếp theo, sản phẩm PCR được tinh sạch trực tiếp bằng kit PCR Purification (Jena Bioscience, Đức) và sử dụng cho phản ứng nối vào vector pUC19 (đã xử lý bằng enzyme giới hạn *Sma*I trước đó) theo quy trình eClone của Công ty Sinh hóa Phù Sa, với thành phần phản ứng: Vector pUC19 100 ng, sản phẩm PCR 300 ng, dung dịch đệm eClone 1,5 µl, enzyme eClone 1,0 µl, và nước cất 2 lần với tổng thể tích 15 µl. Phản ứng được ủ ở 37°C 15 phút và đặt trên đá để sử dụng cho biến nạp vào vi khuẩn *E. coli* Top10 bằng phương pháp sốc nhiệt. Sau đó, dịch khuẩn được cấy trải và nuôi qua đêm trên đĩa môi trường LB đặc có bổ sung 100 mg/L kháng sinh Ampicillin ở 37°C. Các khuẩn lạc của vector tái tổ hợp *pUC19:cry2Ab3-cb* mọc trên đĩa môi trường có chứa kháng sinh được lựa chọn để kiểm tra bằng PCR bằng cặp mồi pUC19-F/R (Bảng 1) sử dụng kit PCR EZ mix-tracking dye (Công ty Sinh hóa Phù Sa, Việt Nam) theo hướng dẫn nhà sản xuất. Các khuẩn lạc dương tính với PCR được lựa chọn đem nuôi tăng sinh khối trong môi trường LB lỏng có bổ sung 100 mg/L Ampicillin qua đêm ở 37°C và tách chiết DNA plasmid sử dụng kit Fast-n-Easy Plasmid Mini-Prep (Jena Bioscience, Đức). Các DNA plasmid của *pUC19:cry2Ab3-cb* được giải trình tự với các cặp mồi pUC19-F/R và 2Ab3cb-Seq1/2 (Bảng 1).

Bảng 1. Trình tự mồi sử dụng trong nghiên cứu

STT	Tên mồi	Trình tự (5'-3')	Mục đích
1	2Ab3cb-Syt-F	GCCAGTGAATTCGAGCTCGGTACCC	Cặp mồi sử dụng cho tổng hợp gen <i>cry2Ab3-cb</i>
2	2Ab3cb-Syt-R	TGCAGGTCGACTCTAGAGGATCCCC	
3	pUC19-F	CAAGGCGATTAAGTTGGGTAAC	Cặp mồi của vector tách dòng pUC19
4	pUC19-R	ATTTACACAGGAAACAGCTATGA	
5	2Ab3cb-Seq1	CCACTTAGCATTACCTCTAGTG	Cặp mồi sử dụng cho giải

6	2Ab3cb-Seq2	AATGGTTTTTCAGGCGCAAGAC	trình tự của gen <i>cry2Ab3-cb</i>
7	2Ab3wt-NcoI-F	TATA CCATGG ATGAATAGTGTATTGAATAGCGG	Cặp mồi cho tách dòng gen <i>cry2Ab3-wt</i>
8	2Ab3wt-SmaI-R	GATG CCCGGG TTAATAAAGTGGTGAAATATTAGT	
9	2Ab3cb-NcoI-F	TATA CCATGG ATGAACTCAGTGTGAACT	Cặp mồi cho tách dòng gen <i>cry2Ab3-cb</i>
10	2Ab3cb-SmaI-R	TAAT CCCGGG TTAGTACAGGGGTGAAATATTAGT	
11	35S-F	CTTCGCAAGACCCTTCCTC	Mồi xuôi từ vùng promoter 35S và mồi ngược từ vùng kết thúc pRTL2 được sử dụng cho giải trình tự
12	pRTL2-R	ACTGGTGATTTTTGCGGACT	
13	Seq_2Ab3wt-R	CATTATACGCATCACAAATAGTAGTTCTTCCG	Cặp mồi cho giải trình tự gen <i>cry2Ab3-wt</i>
14	Seq_2Ab3wt-F	TTTGATCTTATGAATATTATGCTTGTACCAACT	
15	Seq_2Ab3cb-R	TCACATATCGTAGTTCGACCGGAGTT	Cặp mồi cho giải trình tự gen <i>cry2Ab3-cb</i>
16	Seq_2Ab3cb-F	GTTTGATCTTATGAATATCATGCTGGTGCC	

2.2.3. Thiết kế vector biểu hiện thực vật mang gen *cry2Ab3-wt* và *cb*

2.2.3.1. Ghép nối đoạn gen *cry2Ab3-wt* và *cb* vào vector pRTL2

Để thiết kế vector chuyển gen mang gen *cry2Ab3-wt* và *cb*, các đoạn gen *cry2Ab3-wt* và *cb* được khuếch đại bằng PCR từ DNA plasmid của các vector tách dòng có chứa các đoạn gen *cry2Ab3* quan tâm sử dụng Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase với các cặp mồi đặc hiệu cho gen *cry2Ab3-wt* (2Ab3wt-NcoI-F/2Ab3wt-SmaI-R) và *cb* (2Ab3cb-NcoI-F/2Ab3cb-SmaI-R) (Bảng 1) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Sản phẩm PCR được cắt với 2 enzyme giới hạn NcoI và SmaI (Thermo Fisher Scientific, Hoa Kỳ) và kiểm tra bằng điện di trên gel agarose 1%, sau đó sản phẩm cắt được tinh sạch bằng kit QIAquick Gel Extraction (Qiagen, Đức). Các đoạn cắt của gen *cry2Ab3-wt* và *cb* được ghép nối với vector pRTL2 (đã xử lý với 2 enzyme giới hạn NcoI và SmaI) bằng T4 DNA ligase (Thermo Fisher Scientific, Hoa Kỳ) theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

2.2.3.2. Sàng lọc các vector tái tổ hợp mang gen *cry2Ab3-wt* và *cb* bằng PCR

Sản phẩm của phản ứng ghép nối được sử dụng để biến nạp vào vi khuẩn *E. coli* Top10 bằng phương pháp sốc nhiệt. Tiếp theo, dịch khuẩn được cấy trải và nuôi qua đêm trên đĩa môi trường LB đặc có bổ sung 100 mg/L kháng sinh Ampicillin ở 37°C. Các khuẩn lạc của vector tái tổ hợp *pRTL2:cry1Aa-wt* và

cb biến mọc trên đĩa môi trường có chứa kháng sinh được lựa chọn cho PCR với các cặp mồi đặc hiệu cho gen *cry2Ab3-wt* (2Ab3wt-NcoI-F/2Ab3wt-SmaI-R) và *cb* (2Ab3cb-NcoI-F/2Ab3cb-SmaI-R) (Bảng 1) sử dụng kit PCR EZ mix-tracking dye. Sản phẩm PCR được chạy điện di kiểm tra trên gel agarose 1%.

2.2.3.3. Giải trình tự gen

Các khuẩn lạc dương tính với các cặp mồi đặc hiệu cho gen *cry2Ab3-wt* và *cb* được lựa chọn cho nuôi tăng sinh khối trong môi trường LB lỏng có bổ sung 100 mg/L Ampicillin ở 37°C qua đêm và tách chiết DNA plasmid sử dụng kit Fast-n-Easy Plasmid Mini-Prep. Các DNA plasmid của vector tái tổ hợp *pRTL2:cry2Ab3-wt* và *cb* được sử dụng cho giải trình tự với cặp mồi 35S-F/pRTL2-R; thêm vào đó, đối với *pRTL2:cry2Ab3-wt* sử dụng thêm cặp mồi Seq_2Ab3wt-F/Seq_2Ab3wt-R và *pRTL2:cry2Ab3-cb* sử dụng cặp mồi Seq_2Ab3cb-F/Seq_2Ab3cb-R (Bảng 1).

2.2.3.4. Ghép nối đoạn gen *cry2Ab3-wt* và *cb* vào vector biểu hiện thực vật pZY101-Asc

Sau khi giải trình tự kiểm tra, các DNA plasmid của vector *pRTL2:cry2Ab3-wt* và *cb* sau được cắt bằng enzyme giới hạn HindIII. Sản phẩm cắt của cấu trúc 35S:*cry2Ab3-wt* và *cb* được xử lý tạo đầu bằng với T4 DNA polymerase (Thermo Fisher Scientific, Hoa Kỳ) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Tiếp theo, các cấu trúc 35S:*cry2Ab3-wt* và *cb* sau khi tinh sạch được ghép nối với vector pZY101-Asc (đã được cắt

với enzyme giới hạn HindIII và xử lý đầu bằng) sử dụng enzyme T4 DNA ligase. Sản phẩm ghép nối của vector pZY101-Asc và các đoạn cấu trúc *35S:cry2Ab3-wt* và *cb* được sử dụng để biến nạp vào vi khuẩn E. Coli Top10 bằng phương pháp sốc nhiệt. Dịch khuẩn được nuôi qua đêm trên đĩa môi trường LB đặc có bổ sung kháng sinh Spectinomycin 50 mg/L và Streptomycin 50 mg/L ở 37°C. Các khuẩn lạc mang vector tái tổ hợp *pZY101:35S:cry2Ab3-wt* và *cb* mọc trên đĩa môi trường LB có chứa kháng sinh được lựa chọn cho kiểm tra bằng PCR với các cặp mồi đặc hiệu *cry2Ab3-wt* (2Ab3wt-NcoI-F/2Ab3wt-SmaI-R) và *cb* (2Ab3cb-NcoI-F/2Ab3cb-SmaI-R) (Bảng 1) sử dụng kit PCR EZ mix-tracking dye. Cuối cùng, sản phẩm PCR được kiểm tra bằng chạy điện di trên gel agarose 1%.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Cải biến gen *cry2Ab3*

Hiện nay, một protein chức năng để biểu hiện được ở bên ngoài vật chủ tự nhiên của nó thì gặp rất nhiều trở ngại. Trong đó, các thông tin di truyền mã hóa trong khung đọc mở không đơn giản chỉ là thứ tự của các amino acid trong một protein mà các sinh vật khác nhau thường thể hiện sự ưa thích đặc biệt với một số bộ ba khác nhau mã hóa khi mã hóa cho một protein chức năng. Đây gọi là sự sai lệch về bộ ba mã hóa và được xác định là một yếu tố quan trọng trong biểu hiện gen. Tỷ lệ các bộ ba nhất định xuất hiện trong mã di truyền có sự khác nhau đáng kể giữa các sinh vật. Điều này thực tế là do các bộ ba ưa thích có liên quan tới sự dư thừa của các tRNA nhận diện có sẵn trong tế bào. Một khi gen ngoại lai được biểu hiện trong một sinh vật không phải là vật chủ, các trình tự tRNA có thể chứa các yếu tố kìm hãm sự biểu hiện đối với các bộ ba có tần suất thấp trong vật chủ dẫn tới chúng sẽ bị đào thải. Có một mối tương quan nhất định giữa tần suất xuất hiện của các bộ ba hiếm gặp và mức độ biểu hiện protein ngoại lai. Do vậy, chúng ta có thể hiểu rằng sự xuất các bộ ba hiếm, đặc biệt tại đầu N- của protein nên được tránh trong việc thiết kế các gen ngoại lai. Để làm được điều đó, chúng ta có thể cải biến một gen ngoại lai quan tâm bằng việc thay thế các bộ ba ít được sử dụng thường xuyên bởi các bộ ba được ưa thích trong cây trồng mà không làm thay đổi chức năng cũng như trình tự của protein (Hudson *et al.*, 2011; Murray *et al.*, 1989; Zhang *et al.*, 2011).

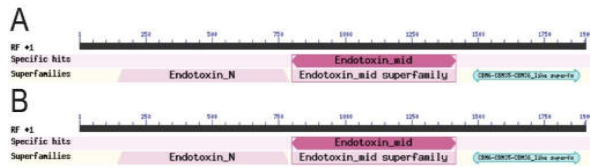
Trong nghiên cứu này, để có thể cải biến gen *cry2Ab3* phù hợp cho việc chuyển gen vào cây đậu tương, đã sử dụng công cụ OPTIMIZER (<http://genomes.urv.es/OPTIMIZER/>) kết hợp với tỷ lệ phần trăm các bộ ba mã hóa tối ưu cho các gen trong cây đậu tương (<http://www.kazusa.or.jp/codon/cgi-bin/showcodon.cgi?species=3847>) cho chỉnh sửa gen *cry2Ab3-wt* ban đầu.

Kết quả bảng 2 cho thấy, gen *cry2Ab3-cb* có sự thay đổi về nucleotide ở một số bộ ba mã hóa các amino acid trong chuỗi trình tự DNA nhưng không có sự thay đổi về chiều dài trình tự DNA so với gen *cry2Ab3-wt* (1902 bp) và cùng mã hóa cho 633 amino acid giống nhau. Cụ thể, gen *cry2Ab3-cb* đã có 262 sự hoán đổi vị trí của các Purines cho Pyrimidines và ngược lại so với *cry2Ab3-wt*, trong khi đó có 239 sự thay đổi giữa các Purine với Purine hoặc Pyrimidine với Pyrimidine với nhau ở *cry2Ab3-cb* so với *wt*. Sự thay đổi này xảy ra ở tất cả các vị trí nucleotide của bộ ba, ví dụ có bộ ba chỉnh sửa vị trí nucleotide đầu tiên, có bộ ba chỉnh sửa ở vị trí nucleotide thứ hai, có bộ ba chỉnh sửa ở vị trí nucleotide thứ ba, hoặc có trường hợp chỉnh sửa ở cả 2 hoặc 3 nucleotide trong cùng một bộ ba. Sự xáo trộn nucleotide này đã làm thay đổi về tỷ lệ phần trăm GC và AT trong trình tự gen *cry2Ab3-cb*. Cụ thể, tỷ lệ GC của gen được thay đổi từ 34,4% ở gen *cry2Ab3-wt* lên 44% ở gen *cry2Ab3-cb*. Sự thay đổi này hoàn toàn phù hợp với tỷ lệ phần trăm GC của gen ngoại lai muốn biểu hiện tốt trong cây đậu tương phải đạt trên 40% (Hudson *et al.*, 2011).

Ngoài ra, sự thay đổi về các nucleotide trong trình tự cũng đã dẫn tới sự biến động về số lượng các bộ ba mã hóa của gen *cry2Ab3-cb* so với *cry2Ab3-wt*. Cụ thể, bộ ba AAC mã hóa cho Asparagine (N) đã tăng nhiều nhất với 19 lần, từ có 12 ở *cry2Ab3-wt* lên 31 ở *cry2Ab3-cb*, ngược lại bộ ba TTA mã hóa cho Leucine (L) giảm nhiều nhất với 29 lần, từ có 34 ở *cry2Ab3-wt* xuống 5 ở *cry2Ab3-cb*; trong khi đó, có bộ ba ATG mã hóa cho Methionine (M), TCT mã hóa cho Serine (S), GCG mã hóa cho Alanine (A), TGG mã hóa cho Tryptophan (W), GGT mã hóa cho Glycine (G), CGT mã hóa cho Arginine (R) và bộ ba kết thúc TAA là không có sự thay đổi giữa *cry2Ab3-wt* và *cb* (Bảng 3).

[illegible]

cry2Ab3-wt và *cb* tuy có sự chỉnh sửa về các nucleotide của các bộ ba mã hóa amino acid nhưng không làm thay đổi trình tự của protein *cry2Ab3*.



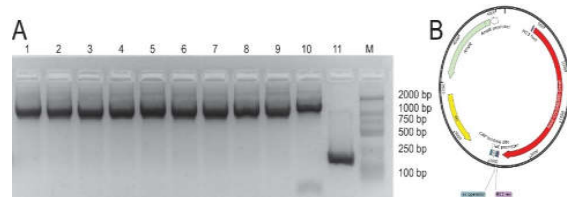
Hình 1. Kết quả phân tích các vùng bảo thủ của gen *cry2Ab3-wt* và *cb*

Chú thích: (A) Vùng bảo thủ của gen *cry2Ab3-wt*. (B) Vùng bảo thủ của gen *cry2Ab3-cb*.

Qua kết quả này cho thấy, gen *cry2Ab3* đã được cải biến thành công mà không làm thay đổi đặc trưng của protein *Cry2Ab3* ban đầu mặc dù gen *cry2Ab3-cb* sự thay đổi về vị trí của các nucleotide trong các bộ ba mã hóa và số lượng các bộ ba mã hóa ưu tiên cho các amino acid để phù hợp với hệ gen của cây đậu tương.

3.2. Tổng hợp nhân tạo và tách dòng gen *cry2Ab3-cb*

Gen *cry2Ab3* sau khi cải biến thành công và gắn thêm vị trí của enzyme giới hạn *NcoI* vào phía trước đầu 5' và *SmaI* vào đầu 3' đã được tổng hợp nhân tạo theo quy trình và phương pháp của Công ty Sinh hóa Phù Sa. Sản phẩm khuếch đại của gen *cry2Ab3-cb* được gắn vào vector pUC19 (đã được cắt và xử lý với enzyme giới hạn *SmaI*). Tiếp theo, vector tách dòng pUC19 có chứa đoạn gen *cry2Ab3-cb* được biến nạp vào vi khuẩn *E. coli*. Các khuẩn lạc mọc trên đĩa môi trường LB đặc có chứa 100 mg/L kháng sinh Ampicillin được lựa chọn để kiểm tra bằng PCR với cặp mồi pUC19-F/R (Bảng 1).



Hình 2. Kết quả tách dòng gen *cry2Ab3-cb*

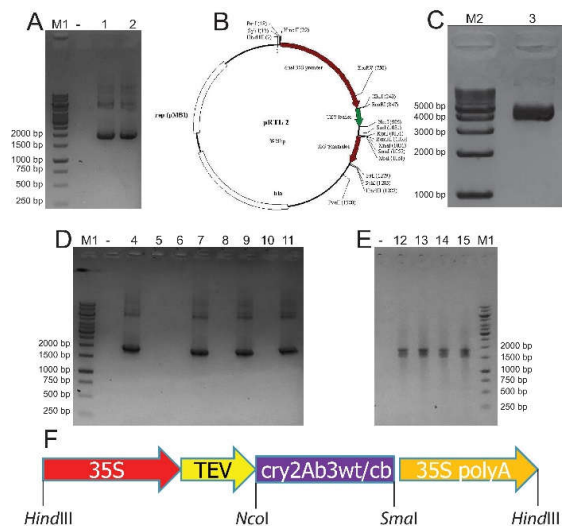
Chú thích: (A) Kết quả PCR khuẩn lạc của vector tách dòng pUC19 chứa gen *cry2Ab3-cb*. 1-11: sản phẩm PCR của 12 khuẩn lạc; M, PSA DNA Ladder. (B) Cấu trúc vector tách dòng pUC19:*cry2Ab3-cb*.

Kết quả PCR cho thấy, trong tổng số 11 khuẩn lạc đã được lựa chọn để kiểm tra có 10 khuẩn lạc cho kết quả dương tính với cặp mồi của vector pUC19 và có kích thước khoảng 1902 bp trùng với kích thước dựa đoán của gen *cry2Ab3-cb* như đã thiết kế ban

đầu (Hình 2A). Như vậy, với kết quả này đã thành công bước đầu trong việc tách dòng gen *cry2Ab3-cb* vào vector pUC19 (Hình 2B). Ba trong số 10 khuẩn lạc dương tính với PCR tiếp tục được sử dụng cho giải trình tự. Kết quả giải trình tự cho thấy, cả 3 khuẩn lạc có trình tự hoàn toàn chính xác với gen *cry2Ab3-cb* đã thiết kế ban đầu (Bảng 2).

3.3. Thiết kế vector biểu hiện thực vật mang gen *cry2Ab3-wt* và *cb*

Để thiết kế vector biểu hiện thực vật mang các gen *cry2Ab3-wt* và *cb* quan tâm, đoạn gen *cry2Ab3-wt* và *cb* từ DNA plasmid của vector tách dòng có chứa các đoạn gen tương ứng đã được khuếch đại bằng PCR sử dụng các cặp mồi đặc hiệu (Bảng 1). Tiếp theo, sản phẩm PCR của các đoạn gen *cry2Ab3-wt* và *cb* được cắt xử lý bằng enzyme giới hạn *NcoI* và *SmaI* (Hình 3A) và sử dụng cho ghép nối với vector pRTL2 (cũng đã được xử lý với enzyme giới hạn tương ứng) (Hình 3B-C). Các vector tái tổ hợp pRTL2: *cry2Ab3-wt* và *cb* được biến nạp vào *E. coli* và nuôi qua đêm trên đĩa môi trường LB có bổ sung 100 mg/L kháng sinh Ampicillin ở 37°C. Các khuẩn lạc mọc trên đĩa LB được lựa chọn để kiểm tra PCR với các cặp mồi đặc hiệu 2Ab3wt-*NcoI*-F/2Ab3wt-*SmaI*-R cho gen *cry2Ab3-wt* và 2Ab3cb-*NcoI*-F/2Ab3cb-*SmaI*-R cho gen *cry2Ab3-cb* (Bảng 1).



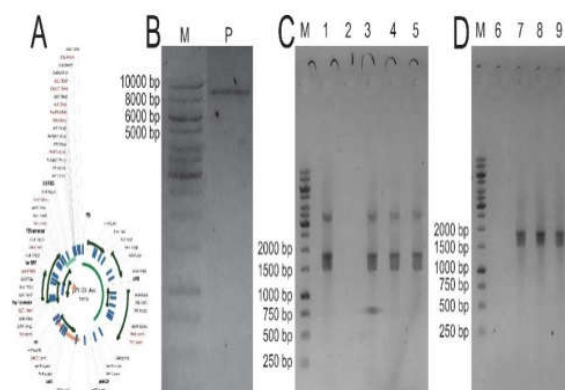
Hình 3. Kết quả khuếch đại gen *cry2Ab3-wt* và *cb* và xử lý vector pRTL2 bằng enzyme giới hạn

Chú thích: (A) Kết quả PCR gen *cry2Ab3-wt* từ DNA plasmid pJET1.2:*cry2Ab3-wt* và gen *cry2Ab3-cb* từ DNA plasmid pUC19:*cry2Ab3-cb*. (B) Cấu trúc vector pRTL2. (C) Kết quả cắt vector pRTL2 bằng 2

enzyme giới hạn *NcoI* và *SmaI*. (D) Kết quả PCR gen *cry2Ab3-wt* từ khuẩn lạc của vector *pRTL2:cry2Ab3-wt*. (E) Kết quả PCR gen *cry2Ab3-cb* từ khuẩn lạc của vector *pRTL2:cry2Ab3-cb*. (F) Cấu trúc của *35S:cry2Ab3-wt* và *cb*. M1, GeneRuler 1kb DNA ladder; -, đối chứng âm H_2O ; 1, DNA plasmid của vector *pJET1.2:cry2Ab3-wt*; 2, DNA plasmid của vector *pUC19:cry2Ab3-cb*; M2, 1Kb DNA Ladder; 3, Vector *pRTL2*; 4, Đối chứng dương từ DNA plasmid của vector *pJET1.2:cry2Ab3-wt*; 5-11, Khuẩn lạc của vector *pRTL2:cry2Ab3-wt*; 12, Đối chứng dương từ DNA plasmid của vector *pUC19:cry2Ab3-cb*; 13-15, Khuẩn lạc của vector *pRTL:cry2Ab3-cb*.

Kết quả điện di cho thấy, một số khuẩn lạc của *pRTL2:cry2Ab3-wt* cho kết quả dương tính trong khi tất cả các khuẩn lạc của *pRTL:cry2Ab3-cb* đều cho kết quả dương tính với gen *cry2Ab3-wt* và *cb* (Hình 3D-E). Như vậy, việc ghép nối đoạn gen *cry2Ab3-wt* và *cb* vào vector *pRTL2* bước đầu đã thành công. Để kiểm tra lại sản phẩm ghép nối vào vector *pRTL2*, các khuẩn lạc dương tính được nuôi tăng sinh khối, tách chiết DNA plasmid và giải trình tự.

Kết quả giải trình tự cho thấy, các khuẩn lạc của vector tái tổ hợp *pRTL2:cry2Ab3-wt* và *cb* có trình tự hoàn toàn chính xác so với ban đầu và các gen này cho thấy cùng chiều và được điều khiển bởi promoter 35S (Bảng 2, Hình 3F).



Hình 4. Kết quả thiết kế vector *pZY101:35S:cry2Ab3-wt* và *cb*

Chú thích: (A) vector biểu hiện thực vật *pZY101-Asc*. (B) Kết quả cắt vector *pZY101-Asc* bằng enzyme giới hạn *HindIII*. (C) Kết quả PCR gen *cry2Ab3-wt* từ khuẩn lạc của vector *pZY101:35S:cry2Ab3-wt*. (D) Kết quả PCR gen *cry2Ab3-cb* từ khuẩn lạc của vector *pZY101:35S:cry2Ab3-cb*. M, GeneRuler 1kb DNA ladder; P, vector *pZY101-Asc* cắt; 1, Đối chứng dương

từ DNA plasmid của vector *pJET1.2:cry2Ab3-wt*; 2, Đối chứng âm H_2O ; 3-5, Khuẩn lạc của vector *pZY101:35S:cry2Ab3-wt*; 6, Đối chứng âm H_2O ; 7, Đối chứng dương từ DNA plasmid của vector *pUC19:cry2Ab3-cb*; 8-9, Khuẩn lạc của vector *pZY101:35S:cry2Ab3-cb*.

Sau khi tách dòng thành công vector *pRTL2* có chứa cấu trúc *35S:cry2Ab3-wt* và *cb*, đã tiến hành cắt cấu trúc *35S:cry2Ab3-wt* và *cb* từ vector tái tổ hợp *pRTL2:cry2Ab3-wt* và *cb* bằng enzyme giới hạn *HindIII*. Sản phẩm cắt được ghép nối với vector biểu hiện thực vật *pZY101-Asc* (cũng đã cắt mở vòng và xử lý ở cùng vị trí enzyme giới hạn) (Hình 4A-B) bằng enzyme *T4 DNA ligase*. Sản phẩm ghép nối của vector tái tổ hợp *pZY101:35S:cry2Ab3-wt* và *cb* được biến nạp vào vi khuẩn *E. coli* và nuôi qua đêm trên đĩa môi trường LB có bổ sung kháng sinh Spectinomycin 50 mg/L và Streptomycin 50 mg/L ở 37°C. Các khuẩn lạc màu trắng mọc trên môi trường LB được lựa chọn để kiểm tra bằng PCR với các cặp mồi đặc hiệu cho gen *cry2Ab3-wt* và *cb* (Bảng 1).

Kết quả PCR cho thấy, các khuẩn lạc đều cho kết quả dương tính với các cặp mồi đặc hiệu của gen *cry2Ab3-wt* và *cb* (Hình 4C-D). Kết quả này chỉ ra rằng, các vector biểu hiện thực vật *pZY101:35S:cry2Ab3-wt* và *cb* đã được thiết kế thành công.

Sâu bệnh hại cây trồng đang là một trong những nguyên nhân ảnh hưởng nghiêm trọng tới năng suất và sản lượng của cây trồng. Để đối phó với sâu bệnh hại cây trồng, đã có nhiều nghiên cứu cho thấy các gen Bt có khả năng tiêu diệt được nhiều đối tượng sâu hại khác nhau. Ví dụ, sự biểu hiện của gen *cry1Ia* ở cây bông chuyển gen đã giúp chúng có khả năng tiêu diệt một số loại sâu thuộc bộ cánh cứng đục quả và sâu keo mùa thu (de-Oliveira *et al.*, 2016; Silva *et al.*, 2016; Tounsi *et al.*, 2003). Độc tố của protein Cry1Aa có khả năng tiêu diệt được một số côn trùng thuộc bộ Cánh vảy trên nhiều cây trồng khác nhau (Liu, Dean, 2006; Choi *et al.*, 2008). Tuy nhiên, khả năng tiêu diệt sâu đục quả đậu tương của độc tố Cry2Ab3 vẫn còn chưa sáng tỏ. Chính vì vậy, trong nghiên cứu này đã thiết kế vector biểu hiện thực vật mang gen *cry2Ab3-wt* và *cb* có nguồn gốc từ chủng Bt BD8.2 được phân lập ở Việt Nam để có thể chuyển vào cây đậu tương nhằm đánh giá khả năng diệt sâu đục quả của các cây đậu tương chuyển gen *cry2Ab3-wt* và *cb*.

4. KẾT LUẬN

Gen *cry2Ab3-wt* đã được cải biến thành công bằng việc sửa đổi các bộ ba mã hóa hiếm gặp bởi các bộ ba mã hóa có tần suất xuất hiện nhiều hơn ở các gen của cây đậu tương nhưng không làm thay đổi chức năng cũng như cấu trúc của protein *Cry2Ab3* ban đầu. Các vector biểu hiện *pZY101:35S:cry2Ab3-wt* và *cb* được thiết kế thành công sẽ là nguồn vật liệu cần thiết cho chuyển nạp gen *cry2Ab3-wt* và *cb* vào cây đậu tương phục vụ cho nghiên cứu đánh giá khả năng diệt sâu đục quả của protein *Cry2Ab3* sau này.

LỜI CẢM ƠN

Công trình nghiên cứu được thực hiện trong khuôn khổ đề tài “Phân lập thiết kế gen kháng sâu tạo giống đậu tương biến đổi gen” theo QĐ số 4495/QĐ-BNN-KHCN ngày 31/10/2016 của Bộ trưởng Bộ Nông nghiệp và PTNT về việc Phê duyệt danh mục các nhiệm vụ khoa học và công nghệ thực hiện từ năm 2017 thuộc Chương trình CNSH Nông nghiệp – Thủy sản.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Choi Y. J., Gringorten J. L., Bélanger L., Morel L., Bourque D., Masson L., Groleau D., Míguez C. B. (2008). Production of an insecticidal crystal protein from *Bacillus thuringiensis* by the methylotroph *Methylobacterium extorquens*. *Applied and environmental microbiology*, 74(16): 5178-5182.
2. Crickmore N., Zeigler D. R., Schnepf E., van Rie J., Lereclus D., Baum J., Bravo A., Dean D. H. (2013). *Bacillus thuringiensis* Toxin Nomenclature. Available online: http://www.lifesci.sussex.ac.uk/Home/Neil_Crickmore/Bt/.
3. de-Oliveira R. S., Oliveira-Neto O. B., Moura H. F., de Macedo L. L., Arraes F. B., Lucena W. A., Lourenco-Tessutti I. T., de Deus Barbosa A. A., da Silva M. C., Grossi-de-Sa M. F. (2016). Transgenic Cotton Plants Expressing Cry1Ia12 Toxin Confer Resistance to Fall Armyworm (*Spodoptera frugiperda*) and Cotton Boll Weevil (*Anthonomus grandis*). *Front Plant Sci*, 7: 165.
4. Hudson L., Bost K., Piller K. (2011). Optimizing Recombinant Protein Expression in Soybean, Soybean - Molecular Aspects of Breeding, Aleksandra Sudaric, IntechOpen, DOI: 10.5772/15111. Available from: <https://www.intechopen.com/books/soybean-molecular-aspects-of-breeding/optimizing-recombinant-protein-expression-in-soybean>
5. Kumar S., Chandra A., Pandey K. C. (2008). *Bacillus thuringiensis* (Bt) transgenic crop: an environment friendly insectpest management strategy. *J Environ Biol*, 29(5): 64-153.
6. Liu X. S., Dean D. H. (2006). Redesigning *Bacillus thuringiensis* Cry1Aa toxin into a mosquito toxin. *Protein Eng Des Sel*, 19(3): 107-111.
7. Murray E. E., Lotzer J., Eberle M. (1989). Codon usage in plant genes. *Nucleic Acids Res*, 17(2): 477-498.
8. Silva C. R., Monnerat R., Lima L. M., Martins E. S., Melo Filho P. A., Pinheiro M. P., Santos R.C. (2016). Stable integration and expression of a cryIIa gene conferring resistance to fall armyworm and boll weevil in cotton plants. *Pest Manag Sci*, 72(8): 1549-1557.
9. Tabata J., Yokosuka T., Hattori M., Ohashi M., Noguchi H., Sugie H. (2008). Sex attractant pheromone of the limabean pod borer, *Etiella zinckenella* (Treitschke) (Lepidoptera: Pyralidae), in Japan. *Appl. Entomol. Zool*, 43 (3): 351-358.
10. Tounsi S., Zouari N., Jaoua S. (2003). Cloning and study of the expression of a novel cryIIa-type gene from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*. *J Appl Microbiol*, 95(1): 23-28.
11. USDA (2012). Field Release of *Aphelinus glycines* (Hymenoptera: Aphelinidae) for Biological Control of the Soybean Aphid, *Aphis glycines* (Hemiptera: Aphididae), in the Continental United States. Environmental Assessment.
12. Zhang L., Guo Y., Luo L., Wang Y. P., Dong Z. M., Sun S. H., Qiu L. J. (2011). Analysis of Nuclear Gene Codon Bias on Soybean Genome and Transcriptome. *Acta Agronomica Sinica*, 37(6): 965-974.

CONSTRUCTION OF PLANT EXPRESSION VECTORS CONTAINING *cry2Ab3* GENES
CONFERRING RESISTANCE TO SOYBEAN POD BORER *Etiella zinkenella*

Nguyen Huu Kien¹, Nguyen Thi Hoa¹, Le Thi Mai Huong¹,
Nguyen Trung Anh¹, Dinh Thi Mai Thu¹, Tong Thi Huong¹,
Dinh Thi Thu Ngan¹, Le Thi Minh Thanh², Nguyen Van Dong^{1*}

¹Agricultural Genetics Institute, Vietnam Academy of Agricultural Sciences

²Institute of Biotechnology, Vietnam Academy of Science and Technology

*Email: dongjircas@yahoo.com

Summary

The soybean pod borer *Etiella zinkenella* Treitschke is one of the serious pests limiting soybean productivity and yield. Whereas the breeding of genetically engineered insect-resistant plants containing cry genes cloned from *Bacillus thuringiensis* (Bt) strains have been studied on numerous crops, but soybean is still limited. The present study was performed with the aim of constructing plant expression vectors carrying native- and modified-*cry2Ab3* genes isolated from native *Bt* strain BD8.2 in Vietnam. Results of this study will provide genetic materials for introducing these genes into soybean to enhance resistance to the pod borer *Etiella zinkenella*.

Keywords: *Bacillus thuringiensis*, *cry2Ab3*, *Etiella zinkenella*, pZY101-Asc vector, soybean.

Người phản biện: PGS.TS. Hà Viết Cường

Ngày nhận bài: 02/11/2020

Ngày thông qua phản biện: 3/12/2020

Ngày duyệt đăng: 10/12/2020