

THIẾT KẾ VECTOR BIỂU HIỆN THỰC VẬT MANG GEN *cry2Ah1-wt* VÀ *cb* 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

Đậu tương (*Glycine max* L.) là một nguồn cung cấp dầu thực vật và protein quan trọng. Tuy nhiên, năng suất và sản lượng đậu tương đang bị ảnh hưởng bởi côn trùng gây hại, đặc biệt là sâu đục quả *Etiella zinkenella* Treitschke. Các cây trồng chuyển gen kháng sâu đang được sử dụng rộng rãi trên thế giới, nhưng cây đậu tương chuyển gen kháng sâu đục quả vẫn còn hạn chế. Nghiên cứu này được tiến hành để cải biến và thiết kế vector biểu hiện thực vật mang gen *cry2Ah1* dạng đại và cải biến nhằm cung cấp vật liệu di truyền cho công tác chọn tạo cây đậu tương chuyển gen có khả năng kháng sâu đục quả thông qua vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens*.

Từ khóa: *Bacillus thuringiensis*, *cry2Ah1*, *Etiella zinkenella*, tách dòng, đậu tương, vector pZY101-Asc.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Đậu tương (*Glycine max* L.) là một trong những cây trồng họ đậu quan trọng trong việc cung cấp dầu thực vật và protein. Ngoài ra, hạt đậu tương cũng chứa nhiều vitamin thiết yếu cho sức khỏe (Mourtzinis *et al.*, 2017; Abdel-Wahab, 2019). Hơn nữa, cây đậu tương là cây trồng có khả năng cố định đạm cao, rất thích hợp trong việc cải tạo đất và luân phiên cây trồng (Morrison *et al.*, 2017; Mourtzinis *et al.*, 2017). Bởi vậy, đậu tương được coi là một trong những cây trồng quan trọng trong hệ thống nông nghiệp Việt Nam. Tuy nhiên, sản lượng đậu tương trong nước không đủ cho nhu cầu trong nước, hàng năm phải nhập khẩu đậu tương với số lượng lớn. Để giảm thiểu sự phụ thuộc vào nguồn đậu tương nhập khẩu, thì việc tăng năng suất nhằm nâng cao sản lượng đậu tương là giải pháp chủ yếu, vì diện tích sản xuất đậu tương khó có thể mở rộng (Trần Thị Cúc Hòa và cs, 2016; Gain, 2018; FAOSTAT, 2019). Nhưng sâu hại là một trong những yếu tố làm giảm năng suất cây đậu tương; trong đó, sâu đục quả đậu tương *Etiella zinkenella* Treitschke là nguyên nhân chính. Khoảng 20% sản lượng đậu tương trên thế giới

hàng năm bị ảnh hưởng trực tiếp hoặc gián tiếp bởi sâu đục quả đậu tương (Abdel-Wahab, 2019).

Để đối phó với sâu hại trên cây đậu tương nói chung và sâu đục quả nói riêng, sử dụng các giống kháng là biện pháp tối ưu nhất. Tuy nhiên, các phương pháp truyền thống nhằm tạo ra giống đậu tương kháng sâu không đạt hiệu quả cao (Boethel, 1999), nên việc chuyển gen kháng sâu vào các giống đậu tương được áp dụng rộng rãi trên thế giới. Trong đó, các gen kháng sâu có nguồn gốc từ các chủng vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) là được sử dụng nhiều nhất. Các gen *Bt* mã hóa cho các protein độc tố Cry (crystal δ -endotoxin), Cyt (cytolysin) và Vip (vegetative insecticidal protein) được biết là có khả năng diệt ấu trùng bộ Cánh vảy, Hai cánh, Cánh cứng, Cánh ngựa, Tuyến trùng... (Crickmore *et al.*, 2013).

Kết quả nghiên cứu của chúng tôi (số liệu chưa công bố) đã chỉ ra rằng, protein Cry2Ah1 thuộc nhóm độc tố Cry thu được khi biểu hiện gen *cry2Ah1* (được phân lập từ chủng *Bt*BD8.2 bản địa ở Việt Nam) trong vi khuẩn *Escherichia coli* có thể tiêu diệt sâu đục quả đậu tương trong điều kiện nhân tạo. Trên cơ sở này, chúng tôi đã thiết kế vector biểu hiện thực vật pZY101-Asc mang gen *cry2Ah1-wt* (dạng đại) và *cb* (cải biến) nhằm phục vụ cho việc biến nạp các gen này vào cây đậu tương để tăng cường khả năng kháng sâu đục quả.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

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

9	2Ah1cb-NcoI-F	TATA _____ CCATGG ATGAATAATGTCCTTAACCTCTGGA	Cặp mỗi cho tách dòng gen <i>cry2Ah1-cb</i>
10	2Ah1cb-SmaI-R	GATG CCCGGG TTAGTATAACGGAGAGAT	
11	35S-F	CTTCGCAAGACCCTTCCTC	Mỗi xuôi từ vùng promoter
12	pRTL2-R	ACTGGTGATTTTTGCGGACT	35S và mỗi ngược từ vùng kết thúc pRTL2 được sử dụng cho giải trình tự
13	Seq_2Ah1wt-R	CTACATTATACGCATCACCATTAGTAGCTC	Cặp mỗi cho giải trình tự gen <i>cry1Ia-wt</i> trong vector pRTL2
14	Seq_2Ah1wt-F	AATTCGGGTACTCAATTTGAGCTTATGAA	
15	Seq_2Ah1cb-R	ATTTGTAGCCCTTCCAGAGTTAAGGAC	Cặp mỗi cho giải trình tự gen <i>cry1Ia-cb</i> trong vector pRTL2
16	Seq_2Ah1cb-F	TTAAACAGTGGCACACAGTTCGAGCTAAT	

2.2.3. Thiết kế vector biểu hiện thực vật mang gen *cry2Ah1-wt* và *cb*

Ghép nối gen *cry2Ah1-wt* và *cb* vào vector pRTL2

Để thiết kế vector biểu hiện thực vật chứa đoạn gen *cry2Ah1* quan tâm, các đoạn gen *cry2Ah1-wt* và *cb* được khuếch đại bằng PCR từ DNA plasmid của các vector tách dòng chứa các đoạn gen *cry2Ah1-wt* và *cb* với các cặp mỗi đặc hiệu cho gen *cry2Ah1-wt* (2Ah1wt-NcoI-F/2Ah1wt-SmaI-R) và *cb* (2Ah1cb-NcoI-F/2Ah1cb-SmaI-R) (Bảng 1) sử dụng Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Sau đó, sản phẩm PCR của *cry2Ah1-wt* và *cb* được cắt bằng 2 enzyme giới hạn *NcoI* và *SmaI* (ThermoFisher Scientific, Hoa Kỳ) và chạy điện di trên gel agarose 1%. Đoạn gen của *cry2Ah1-wt* và *cb* trên băng điện di được thu nhận và tinh sạch bằng kit QIAquick Gel Extraction (Qiagen, Đức). Sản phẩm tinh sạch của đoạn gen *cry2Ah1-wt* và *cb* được sử dụng để ghép nối với vector pRTL2 (đã được cắt và xử lý bởi 2 enzyme giới hạn *NcoI* và *SmaI* trước đó) bằng T4 DNA ligase (ThermoFisher Scientific, Hoa Kỳ) theo hướng dẫn của nhà cung cấp.

Chọn lọc các vector tái tổ hợp mang gen *cry2Ah1-wt* và *cb* bằng PCR

Sản phẩm tái tổ hợp 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 biến nạp được cấy trải và nuôi trên đĩa môi trường LB đặc có bổ sung 100 mg/L kháng sinh Ampicillin ở 37°C qua đêm. Các khuẩn lạc mang vector tái tổ hợp pRTL2:*cry2Ah1-wt* và *cb* mọc trên đĩa LB có chứa kháng sinh được lựa chọn để kiểm tra bằng PCR với

các cặp mỗi đặc hiệu cho gen *cry2Ah1-wt* (2Ah1wt-NcoI-F/2Ah1wt-SmaI-R) và *cb* (2Ah1cb-NcoI-F/2Ah1cb-SmaI-R) (Bảng 1) sử dụng kit PCR EZ Mix-Tracking Dye. Sản phẩm PCR được kiểm tra bằng điện di trên gel agarose 1%.

Giải trình tự gen

Các khuẩn lạc dương tính với các cặp mỗi đặc hiệu cho gen *cry2Ah1-wt* và *cb* tiếp tục được lựa chọn cho nuôi tăng sinh khối trong môi trường LB lỏng có bổ sung 100 mg/L kháng sinh Ampicillin ở 37°C qua đêm và tách chiết DNA plasmid sử dụng kit Fast-n-Easy Plasmid Mini-Prep. Các DNA plasmid tinh sạch của vector tái tổ hợp pRTL2:*cry2Ah1-wt* và *cb* được sử dụng cho giải trình tự với cặp mỗi 35S-F/pRTL2-R; thêm vào đó, đối với vector tái tổ hợp pRTL2:*cry2Ah1-wt* sử dụng thêm cặp mỗi Seq_2Ah1wt-F/Seq_2Ah1wt-R và pRTL2:*cry2Ah1-wt* sử dụng cặp mỗi Seq_2Ah1cb-F/Seq_2Ah1cb-R (Bảng 1).

Ghép nối đoạn gen *cry2Ah1-wt* và *cb* vào vector biểu hiện thực vật pZY101-Asc

Sau kiểm tra bằng giải trình tự, DNA plasmid của vector pRTL2:*cry2Ah1-wt* và *cb* được cắt và xử lý với enzyme giới hạn *HindIII*. Sản phẩm cắt của cấu trúc 35S:*cry2Ah1-wt* và *cb* được xử lý tạo đầu bằng với T4 DNA polymerase (ThermoFisher Scientific, Hoa Kỳ). Tiếp theo, các cấu trúc 35S:*cry2Ah1-wt* và *cb* được sử dụng cho phản ứng ghép nối vào vector biểu hiện thực vật pZY101-Asc (đã được cắt với enzyme giới hạn *HindIII* và xử lý tạo đầu bằng) bằng enzyme T4 DNA ligase.

Các vector tái tổ hợp pZY101:35S:*cry2Ah1-wt* và *cb* của phản ứng ghép nối được sử dụng cho biến nạp vào vi khuẩn *E. coli* Top10 bằng phương pháp sốc nhiệt. Dịch khuẩn được cấy trải và nuôi trên đĩa môi trường LB đặc có bổ sung 50 mg/L kháng sinh

Spectinomycin và 50 mg/L Streptomycin qua đêm ở 37°C. Các khuẩn lạc của vector tái tổ hợp *pZY101:35S:cry2Ah1-wt* và *cb* mọc trên đĩa môi trường LB có chứa kháng sinh được lựa chọn để kiểm tra bằng PCR với các cặp mồi đặc hiệu cho gen *cry2Ah1-wt* (2Ah1wt-NcoI-F/2Ah1wt-SmaI-R) và *cb* (2Ah1cb-NcoI-F/2Ah1cb-SmaI-R) (Bảng 1) sử dụng kit PCR EZ Mix-Tracking Dye. Cuối cùng, sản phẩm PCR được kiểm tra bằng điện di trên gel agarose 1%.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Cải biến gen *cry2Ah1*

Bảng 2. Kết quả cải biến trình tự gen *cry2Ah1*

Codon	2Ah1-wt	2Ah1-cb	Codon	2Ah1-wt	2Ah1-cb	Codon	2Ah1-wt	2Ah1-cb	Codon	2Ah1-wt	2Ah1-cb
GCA (A)	11	10	GCC (A)	3	7	GCG (A)	4	2	GCT (A)	14	13
TGC (C)	0	1	TGT (C)	2	1	GAC (D)	2	9	GAT (D)	22	15
GAA (E)	15	14	GAG (E)	7	8	TTC (F)	4	14	TTT (F)	32	22
GGA (G)	17	14	GGC (G)	5	9	GGG (G)	5	6	GGT (G)	16	14
CAC (H)	4	4	CAT (H)	8	8	ATA (I)	13	9	ATC (I)	4	9
ATT (I)	15	14	AAA (K)	9	4	AAG (K)	1	6	TTA (L)	36	3
TTG (L)	7	14	CTA (L)	4	8	CTC (L)	1	12	CTG (L)	3	11
CTT (L)	14	17	ATG (M)	11	11	AAC (N)	8	40	AAT (N)	61	29
CCA (P)	8	8	CCC (P)	1	3	CCG (P)	4	2	CCT (P)	11	11
CAA (Q)	23	20	CAG (Q)	7	10	AGA (R)	21	10	AGG (R)	2	12
CGA (R)	6	6	CGC (R)	0	2	CGG (R)	2	3	CGT (R)	6	4
AGC (S)	4	8	AGT (S)	16	6	TCA (S)	15	11	TCC (S)	3	9
TCG (S)	4	7	TCT (S)	12	13	ACA (T)	20	14	ACC (T)	6	14
ACG (T)	5	6	ACT (T)	23	20	GTA (V)	14	4	GTC (V)	1	10
GTG (V)	8	14	GTT (V)	19	14	TGG (W)	7	7	TAC (Y)	4	11
TAT (Y)	22	15	TAA (Y)	1	1	TGA (Y)	0	0	TAG (Y)	0	0

(Chú thích: *: thay đổi Purines <-> Pyrimidines;
#: thay đổi Purine <-> Purine hoặc Pyrimidine <-> Pyrimidine; Aa: amino acid; 2Ah1-wt: *cry2Ah1-wt*; 2Ah1-cb: *cry2Ah1-cb*)

Để cải biến gen *cry2Ah1* ngoại lai cho tương thích với hệ gen của cây đậu tương nhưng không làm mất chức năng của protein Cry2Ah1, trong nghiên cứu này đã sử dụng công cụ OPTIMIZER

Bảng 3. Các codon mã hóa cho gen *cry2Ah1* ở dạng đại và cải biến

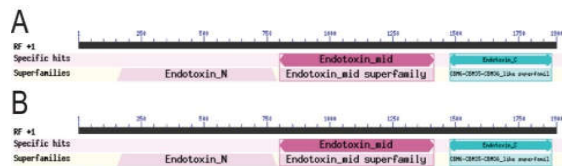
Codons	2Ah1-wt	2Ah1-cb	Codons	2Ah1-wt	2Ah1-cb	Codons	2Ah1-wt	2Ah1-cb	Codons	2Ah1-wt	2Ah1-cb
GCA (A)	11	10	GCC (A)	3	7	GCG (A)	4	2	GCT (A)	14	13
TGC (C)	0	1	TGT (C)	2	1	GAC (D)	2	9	GAT (D)	22	15
GAA (E)	15	14	GAG (E)	7	8	TTC (F)	4	14	TTT (F)	32	22
GGA (G)	17	14	GGC (G)	5	9	GGG (G)	5	6	GGT (G)	16	14
CAC (H)	4	4	CAT (H)	8	8	ATA (I)	13	9	ATC (I)	4	9
ATT (I)	15	14	AAA (K)	9	4	AAG (K)	1	6	TTA (L)	36	3
TTG (L)	7	14	CTA (L)	4	8	CTC (L)	1	12	CTG (L)	3	11
CTT (L)	14	17	ATG (M)	11	11	AAC (N)	8	40	AAT (N)	61	29
CCA (P)	8	8	CCC (P)	1	3	CCG (P)	4	2	CCT (P)	11	11
CAA (Q)	23	20	CAG (Q)	7	10	AGA (R)	21	10	AGG (R)	2	12
CGA (R)	6	6	CGC (R)	0	2	CGG (R)	2	3	CGT (R)	6	4
AGC (S)	4	8	AGT (S)	16	6	TCA (S)	15	11	TCC (S)	3	9
TCG (S)	4	7	TCT (S)	12	13	ACA (T)	20	14	ACC (T)	6	14
ACG (T)	5	6	ACT (T)	23	20	GTA (V)	14	4	GTC (V)	1	10
GTG (V)	8	14	GTT (V)	19	14	TGG (W)	7	7	TAC (Y)	4	11
TAT (Y)	22	15	TAA (Y)	1	1	TGA (Y)	0	0	TAG (Y)	0	0

(Chú thích: 2Ah1-wt, *cry2Ah1* dạng đại; 2Ah1-cb, *cry2Ah1* cải biến)

(<http://genomes.urv.es/OPTIMIZER/>) kết hợp cùng với tỷ lệ phần trăm các codon mã hóa tối ưu cho các gen trong cây đậu tương (<http://www.kazusa.or.jp/codon/cgi-bin/showcodon.cgi?species=3847>) cho cải biến gen *cry2Ah1-wt* ban đầu. Kết quả cải biến được trình bày như trong bảng 2.

Kết quả cải biến cho thấy, gen *cry2Ah1-cb* đã có sự thay đổi ở một số codon mã hóa cho các amino acid trong chuỗi trình tự gen nhưng không làm thay đổi chiều dài trình tự so với gen *cry2Ah1-wt* ban đầu là 1899 bp và cùng mã hóa cho 632 amino acid của protein Cry2Ah1. Cụ thể, gen *cry2Ah1-cb* đã có 228 sự thay đổi nucleotide của các Purines với Pyrimidines và ngược lại so với gen *cry2Ah1-wt*; trong khi đó, có 226 sự thay đổi nucleotide giữa các Purine với Purine hoặc Pyrimidine với Pyrimidine với nhau ở gen *cry2Ah1-cb* so với *wt*. Hơn nữa, sự thay đổi này diễn ra ở tất cả các vị trí trong codon (từ N₁), ví dụ như có codon thay đổi ở vị trí nucleotide đầu tiên (N₁), có codon thay đổi ở vị trí nucleotide thứ hai (N₂), có codon thay đổi ở vị trí nucleotide thứ ba (N₃), và có trường hợp sự thay đổi nucleotide xảy ra ở 2 hoặc cả 3 vị trí của trong codon. Điều đặc biệt, sự xáo trộn này đã làm thay đổi về tỷ lệ % GC giữa gen *cry2Ah1-cb* so với *wt*. Cụ thể, tỷ lệ % GC của gen *cry2Ah1-wt* ban đầu chỉ chiếm 34%, sau khi cải biến tỷ lệ này đã tăng lên 43% ở *cry2Ah1-cb* (Bảng 2); trong khi, tỷ lệ % GC tối thiểu của các gen trong hệ gen của cây đậu tương đạt ít nhất là 40% (Hudson *et al*, 2011). Điều này cho thấy, gen *cry2Ah1-cb* có thể phù hợp với hệ gen của cây đậu tương.

Thêm vào đó, sự thay đổi của các nucleotide trong các codon cũng đã dẫn tới sự xáo trộn về số lượng các codon mã hóa cho các amino acid của gen *cry2Ah1-cb* so với *wt*. Cụ thể, codon TTA mã hóa cho Leucine (L) và codon AAT mã hóa cho Asparagine (N) đã giảm nhiều nhất với lần lượt là 33 và 32 lần, ngược lại codon AAC cũng mã hóa cho Asparagine lại tăng nhiều nhất với 32 lần từ 8 ở gen *cry2Ah1-wt* lên 40 ở *cry2Ah1-cb*. Trong khi đó, codon ATG (11 lần) mã hóa cho Methionine (M), CAC (4 lần) và CAT (8 lần) cùng mã hóa cho Histidine (H), CCA (8) và CCT (11 lần) mã hóa cho Proline (P), CGA (6 lần) mã hóa cho Serine (R), TGG (7 lần) mã hóa cho Tryptophan (W), và bộ ba kết thúc TAA (1 lần) là giữ nguyên không có sự thay đổi giữa gen *cry2Ah1-wt* và *cb* (Bảng 3).



Hình 2. Kết quả phân tích các vùng bảo thủ của gen *cry2Ah1-wt* và *cb*

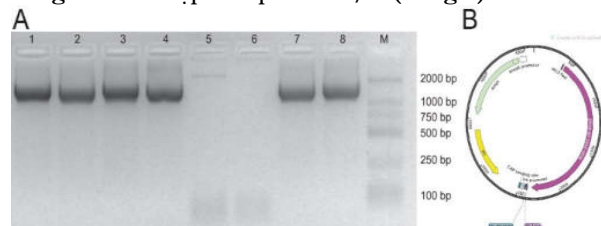
Chú thích: (A) Vùng bảo thủ của gen *cry2Ah1-wt*; (B) Vùng bảo thủ của gen *cry2Ah1-cb*

Ngoài ra, khi phân tích trình tự DNA của gen *cry2Ah1-wt* và *cb* cho thấy, cả hai gen này đều chứa 3 vùng độc tố nằm trên trình tự DNA, bao gồm một vùng nội độc tố ở đầu N- (Endotoxin-N), một vùng nội độc tố ở giữa (Endotoxin_mid superfamily) và một vùng nội độc tố (CBM6-CBM35-CBM36_like superfamily) nằm ở đầu C- (Hình 2); điều này chứng tỏ, mặc dù có sự xáo trộn nucleotide và thay đổi về số lượng các codon mã hóa cho amino acid của gen *cry2Ah1-wt* và *cb*, nhưng trình tự protein không thay đổi và vẫn giữ nguyên đặc tính cấu trúc của protein Cry2Ah1.

Các kết quả này cho thấy, gen *cry2Ah1* đã được cải biến thành công từ dạng đại; mặc dù có sự thay đổi về vị trí của các nucleotide trong các codon và số lượng các codon mã hóa nhưng vẫn giữ nguyên đặc trưng của protein Cry2Ah1 ban đầu. Như vậy, gen *cry2Ah1-cb* được lựa chọn cho thiết kế vector biểu hiện thực vật phục vụ cho chuyển gen vào cây đậu tương cùng với gen *cry2Ah1-wt* ban đầu.

3.2. Tổng hợp nhân tạo và tách dòng gen *cry2Ah1-cb*

Gen *cry2Ah1-cb* sau khi được tối ưu mã bộ ba thành công và bổ sung thêm vị trí cắt của 2 enzyme giới hạn *NcoI* và *SmaI* lần lượt ở đầu 5' và 3' của trình tự gen được tổng hợp nhân tạo theo quy trình và phương pháp của Công ty Sinh hóa Phù Sa. Sản phẩm khuếch đại của gen *cry2Ah1-cb* sau khi tổng hợp nhân tạo được gắn vào vector tách dòng pUC19. Tiếp theo, vector tái tổ hợp *pUC19:cry2Ah1-cb* được biến nạp vào chủng vi khuẩn *E. coli* Top10. Các khuẩn lạc của vector tái tổ hợp *pUC19:cry2Ah1-cb* 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 3. Kết quả tách dòng gen *cry2Ah1-cb*

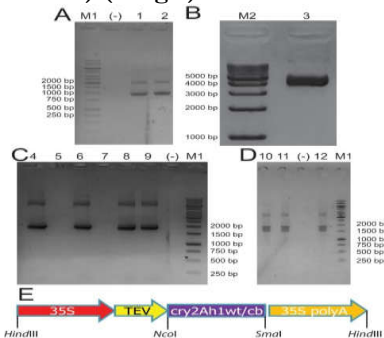
Chú thích: (A) Kết quả PCR khuẩn lạc của vector tái tổ hợp *pUC19:cry2Ah1-cb*; 1-8: sản phẩm PCR của các khuẩn lạc; M, PSA DNA Ladder. (B) Cấu trúc vector tái tổ hợp *pUC19:cry2Ah1-cb*

Kết quả kiểm tra khuẩn lạc của vector tái tổ hợp *pUC19:cry2Ah1-cb* cho thấy, một số khuẩn lạc cho kết quả dương tính với cặp mồi pUC19-F/R có kích thước khoảng 1899 bp trùng với kích thước dự đoán của gen *cry2Ah1-cb* ban đầu (Hình 3A). Với kết quả này, đoạn gen *cry2Ah1-cb* bước đầu đã được tách dòng thành công vào vector pUC19 (Hình 3B). Tiếp theo, 3 trong số 6 khuẩn lạc dương tính với PCR được lựa chọn cho giải trình tự. Kết quả giải trình tự cho thấy, cả 3 khuẩn lạc có trình tự hoàn toàn chính xác với gen *cry2Ah1-cb* đã thiết kế ban đầu (Bảng 2).

3.3. Thiết kế vector biểu hiện thực vật mang gen *cry2Ah1-wt* và *cb*

Để thiết kế vector biểu hiện thực vật chứa các gen *cry2Ah1-wt* và *cb*, đoạn gen *cry2Ah1-wt* và *cb* được khuếch đại bằng PCR từ DNA plasmid của các vector tách dòng có chứa các đoạn gen tương ứng bằng các cặp mồi đặc hiệu *cry2Ah1-wt* (2Ah1wt-*NcoI*-F/2Ah1wt-*SmaI*-R) và *cry2Ah1-cb* (2Ah1cb-*NcoI*-F/2Ah1cb-*SmaI*-R) (Bảng 1). Sản phẩm PCR của các đoạn gen *cry2Ah1-wt* và *cb* sau đó được cắt và xử lý bằng các enzyme giới hạn *NcoI* và *SmaI* (Hình 4A) và ghép nối vào vector pRLT2 (Hình 1A và 4B) (đã được cắt và xử lý với enzyme giới hạn tương ứng).

Sản phẩm của vector tái tổ hợp *pRTL2:cry2Ah1-wt* và *cb* được biến nạp vào vi khuẩn *E. coli* Top10 và nuôi qua đêm ở 37°C trên đĩa môi trường LB có bổ sung 100 mg/L kháng sinh Ampicillin. Các khuẩn lạc của vector tái tổ hợp *pRTL2:cry2Ah1-wt* và *cb* mọc trên đĩa môi trường LB được lựa chọn để kiểm tra bằng PCR với cặp mồi đặc hiệu cho gen *cry2Ah1-wt* (2Ah1wt-NcoI-F/2Ah1wt-SmaI-R) và *cb* (2Ah1cb-NcoI-F/2Ah1cb-SmaI-R) (Bảng 1).



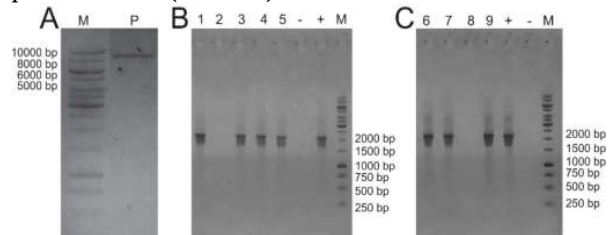
Hình 4. Kết quả thiết kế vectơ *pRTL2:cry2Ah1-wt* và *cb*

Chú thích: (A) Kết quả PCR gen *cry2Ah1-wt* từ DNA plasmid *pJET1.2:cry2Ah1-wt* và gen *cry2Ah1-cb* từ DNA plasmid *pUC19:cry2Ah1-cb*. (B) Kết quả cắt vectơ *pRTL2* bằng 2 enzyme giới hạn *NcoI* và *SmaI*. (C) Kết quả PCR gen *cry2Ah1-wt* từ khuẩn lạc của vector *pRTL2:cry2Ah1-wt*. (D) Kết quả PCR gen *cry2Ah1-cb* từ khuẩn lạc của vector *pRTL2:cry2Ah1-cb*. (E) Cấu trúc cassette của *35S:cry2Ah1-wt* và *cb*. Chú thích: M1, GeneRuler 1kb DNA ladder; -, đối chứng âm H_2O ; 1, DNA plasmid của vector *pJET1.2:cry2Ah1-wt*; 2, DNA plasmid của vector *pUC19:cry2Ah1-cb*; M2, 1Kb DNA Ladder; 3, sản phẩm cắt DNA plasmid của vector *pRTL2*; 4-8, Khuẩn lạc của vector *pRTL2:cry2Ah1-wt*; 9, Đối chứng dương từ DNA plasmid của vector *pJET1.2:cry2Ah1-wt*; 10-11, Khuẩn lạc của vector *pRTL2:cry2Ah1-cb*; 12, Đối chứng dương từ DNA plasmid của vector *pUC19:cry2Ah1-cb*

Kết quả điện di sản phẩm PCR cho thấy, một số khuẩn lạc của *pRTL2:cry2Ah1-wt* dương tính với cặp mồi đặc hiệu của gen *cry2Ah1-wt* và cả 2 khuẩn lạc của *pRTL2:cry2Ah1-cb* đều dương tính với gen *cry2Ah1-cb* (Hình 4C-D). Như vậy, việc ghép nối đoạn gen *cry2Ah1-wt* và *cb* vào vector *pRTL2* bước đầu đã thành công. Các khuẩn lạc dương tính đã được lựa chọn đem nuôi tăng sinh khối, tách chiết DNA plasmid và sử dụng cho giải trình tự với cặp mồi 35S-F/pRTL2-R, thêm vào đó đối với các khuẩn lạc của *pRTL2:cry2Ah1-wt* sử dụng thêm cặp mồi

Seq_2Ah1wt-R/Seq_2Ah1wt-F và *pRTL2:cry2Ah1-cb* với cặp mồi Seq_2Ah1cb-R/Seq_2Ah1cb-F (Bảng 1).

Kết quả giải trình tự các khuẩn lạc của vector tái tổ hợp *pRTL2:cry2Ah1-wt* và *cb* cho thấy, trình tự của gen *cry2Ah1-wt* và *cb* hoàn toàn không có sự sai khác so với trình tự ban đầu (Bảng 2). Hơn nữa, các gen *cry2Ah1-wt* và *cb* cho thấy là cùng chiều với promoter 35S (Hình 4E).



Hình 5. Kết quả thiết kế vectơ *pZY101:35S:cry2Ah1-wt* và *cb*

Chú thích: (A) Kết quả cắt vectơ *pZY101-Asc* bằng enzyme giới hạn *HindIII*. (B) Kết quả PCR gen *cry2Ah1-wt* từ khuẩn lạc của vector *pZY101:35S:cry2Ah1-wt*. (C) Kết quả PCR gen *cry2Ah1-cb* từ khuẩn lạc của vector *pZY101:35S:cry2Ah1-cb*. (M) GeneRuler 1kb DNA ladder; P, vector *pZY101-Asc* cắt; 1-5, Khuẩn lạc của vector *pZY101:35S:cry2Ah1* dạng đại; (-), Đối chứng âm H_2O ; (+), Đối chứng dương từ DNA plasmid của vector tách dòng mang gen *cry2Ah1-wt* và *cb*; 6-9, Khuẩn lạc của vector *pZY101:35S:cry2Ah1-cb*

Sau khi ghép nối thành công các đoạn gen *cry2Ah1-wt* và *cb* vào vector *pRTL2*, đã tiến hành cắt các cấu trúc cassette *35S:cry2Ah1-wt* và *cb* từ vector tái tổ hợp *pRTL2:35S:cry2Ah1-wt* và *cb* bằng enzyme giới hạn *HindIII* và sản phẩm cắt được ghép nối với vector binary *pZY101-Asc* (cũng đã cắt mở vòng và xử lý ở cùng vị trí enzyme giới hạn) (Hình 1B và 5A). Sản phẩm ghép nối của các vector tái tổ hợp *pZY101:35S:cry2Ah1-wt* và *cb* được biến nạp vào chủng vi khuẩn *E. coli* Top10 và nuôi qua đêm ở 37°C trên đĩa môi trường LB đặc có bổ sung kháng sinh Spectinomycin 50 mg/L và Streptomycin 50 mg/L. Các khuẩn lạc trắng mọc trên môi trường LB có chứa kháng sinh chọn lọc được lựa chọn để kiểm tra bằng PCR với các cặp mồi đặc hiệu cho gen *cry2Ah1-wt* (2Ah1wt-NcoI-F/2Ah1wt-SmaI-R) và *cb* (2Ah1cb-NcoI-F/2Ah1cb-SmaI-R) (Bảng 1).

Kết quả điện di cho thấy, một số khuẩn lạc của các vector tái tổ hợp *pZY101:35S:cry2Ah1-wt* và *cb* cho kết quả dương tính với các cặp mồi đặc hiệu của gen *cry2Ah1-wt* và *cb* (Hình 5B-C). Hơn nữa, khi kiểm tra

lại bằng giải trình tự, kết quả cho thấy cấu trúc *35S:cry2Ah1-wt* và *cb* đã được ghép nối vào vector biểu hiện thực vật pZY101-Asc. Như vậy, các vector *pZY101:35S:cry2Ah1-wt* và *cb* đã được thiết kế thành công và có thể sử dụng cho chuyển các gen này vào cây đậu tương thông qua vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens*.

Hiện nay, côn trùng gây hại đang là một trong những vấn đề nghiêm trọng ảnh hưởng tới nông nghiệp trên toàn thế giới. Để giảm thiểu sự phá hoại của côn trùng, các phương pháp phòng/trừ như thuốc trừ sâu hóa học, sinh học và thiên địch được áp dụng rộng rãi. Trong đó, các cây trồng chuyển gen kháng côn trùng là hướng đi đang được đặc biệt quan tâm, vì chúng có thể giải quyết được những vấn đề mà các biện pháp phòng/trừ khác không xử lý được. Một số nghiên cứu cho thấy, các gen Bt (*cry1Ac*, *cry1Ah1*, *cry2A*, *cry11a*, *cry3B*, *vip3Aa*, *cry1Aa*) có nguồn gốc từ các chủng Bt có khả năng tiêu diệt côn trùng thuộc bộ Cánh vảy và Cánh cứng trên nhiều đối tượng cây trồng khác nhau như cây bông, ngô và mía (Iannacone *et al.*, 1997; Tounsi *et al.*, 2003; Liu, Dean, 2006; Choi *et al.*, 2008; Xu *et al.*, 2008; Bergamasco *et al.*, 2013; Muzaffar *et al.*, 2015; de-Oliveira *et al.*, 2016; Silva *et al.*, 2016; Lemes *et al.*, 2017). Tuy nhiên, khả năng gây độc tố của protein Cry2Ah1 đối với sâu đục quả đậu tương vẫn còn chưa được làm sáng tỏ. Chính vì vậy, trong nghiên cứu này đã thiết kế cấu trúc vector biểu hiện thực vật mang gen *cry2Ah1-wt* và *cb* có nguồn gốc từ chủng Bt BD8.2 ở Việt Nam nhằm phục vụ cho việc nghiên cứu đánh giá khả năng kháng sâu đục quả của các cây đậu tương chuyển gen *cry2Ah1-wt* và *cb* sau này.

4. KẾT LUẬN

Các cấu trúc vector biểu hiện thực vật mang gen *cry2Ah1-wt* và *cb* đã được thiết kế thành công. Các cấu trúc *pZY101:35S:cry2Ah1-wt* và *cb* sẽ là nguồn vật liệu di truyền quan trọng để sử dụng cho việc tạo ra các dòng/giống đậu tương có khả năng kháng sâu đục quả hay các loại côn trùng gây hại khác trong tương lai không xa.

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. Abdel-Wahab E. (2019). The relationship between agronomic characters of certain soybean varieties and infestation resistance of *Etiella zinckenella* (Lepidoptera: Pyralidae) under natural conditions. *Journal of Entomology and Zoology Study*, 7: 69-77.
2. Bergamasco V. B., Mendes D. R., Fernandes O. A., Desiderio J. A., Lemos M. V. (2013). *Bacillus thuringiensis* Cry1Ia10 and Vip3Aa protein interactions and their toxicity in *Spodoptera* spp. (Lepidoptera). *J Invertebr Pathol*, 112(2): 152-158.
3. Boethel D. J. (1999). Assessment of soybean germplasm for multiple insect resistance. *Global plant genetic resources for insect resistant crops*. CRC, Boca Raton, 101-129.
4. 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.
5. 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/.
6. 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.
7. FAOSTAT (2019). *Food and agriculture organization of the United Nations (FAO) statistical databases*, Available at: <http://www.fao.org>, Retrieved 10 August 2019.
8. Froger A., Hall J. E. (2007). Transformation of plasmid DNA into *E. coli* using the heat shock method. *Journal of visualized experiments, JoVE*(6): 253-253.
9. Gain U (2018). Vietnam—oilseeds and products annual 2018. Global agricultural information network (Gain) report VM8018, USDA Gain, Hanoi, Vietnam.

10. Iannaccone R., Grieco P. D., Cellini F. (1997). Specific sequence modifications of a *cry3B* endotoxin gene result in high levels of expression and insect resistance. *Plant Mol Biol*, 34(3): 485-496.
11. Lemes A. R. N., Figueiredo C. S., Sebastião I., da-Silva M. L., Alves D. C. R., de-Siqueira H. Á. A., Lemos M. V. F., Fernandes O. A., Desidério J. A. (2017). Cry1Ac and Vip3Aa proteins from *Bacillus thuringiensis* targeting Cry toxin resistance in *Diatraea flavipennella* and *Elasmopalpus lignosellus* from sugarcane. *PeerJ*, 5: e2866-e2866.
12. Liu X. S., Dean D.H. (2006). Redesigning *Bacillus thuringiensis* Cry1Aa toxin into a mosquito toxin. *Protein Eng Des Sel*, 19(3): 107-111.
13. Morrison M. J., Cober E. R., Gregorich E. G., Voldeng H. D., Ma B., Topp G. C. (2017). Tillage and crop rotation effects on the yield of corn, soybean, and wheat in eastern Canada. *Can. J. Plant Sci*, 98: 183-191.
14. Mourtzinis S., Marburger D., Gaska J., Diallo T., Lauer J. G., Conley S. (2017). Corn, soybean, and wheat yield response to crop rotation, nitrogen rates, and foliar fungicide application. *Crop Sci*, 57: 983-992.
15. Muzaffar A., Kiani S., Khan M. A. U., Rao A. Q., Ali A., Awan M. F., Iqbal A., Nasir I. A., Shahid A. A., Husnain T. (2015). Chloroplast localization of Cry1Ac and Cry2A protein—an alternative way of insect control in cotton. *Biological research*, 48(1): 14-14.
16. 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 *cry1Ia* gene conferring resistance to fall armyworm and boll weevil in cotton plants. *Pest Manag Sci*, 72(8): 1549-1557.
17. Tounsi S., Zouari N., Jaoua S. (2003). Cloning and study of the expression of a novel *cry1Ia*-type gene from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*. *J Appl Microbiol*, 95(1): 23-28.
18. Trần Thị Cúc Hòa, Trần Thanh Hải, Hà Minh Luân, Nguyễn Trần Hải Bằng, Lâm Thái Duy, Đồng Thanh Liêm, Phạm Thu Dung, Hồ Thị Huỳnh Như, Phạm Thị Hương (2016). Đánh giá khả năng kháng sâu đục quả của các dòng đậu tương biến đổi gen. Hội thảo Quốc gia về Khoa học cây trồng lần thứ hai, 502-508.
19. Xue J., Liang G., Crickmore N., Li H., He K., Song F., Feng X., Huang D., Zhang J. (2008) Cloning and characterization of a novel Cry1A toxin from *Bacillus thuringiensis* with high toxicity to the Asian corn borer and other lepidopteran insects. *FEMS Microbiol Lett*, 280(1): 95-101.

CONSTRUCTION OF PLANT EXPRESSION VECTORS CONTAINING *cry2Ah1-wt* AND *cb* 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

Soybean (*Glycine max* L.) is an important source of vegetable oil and protein. However, soybean productivity and yield are seriously affected by insect pests, especially the pod borer *Etiella zinkenella* Treitschke. The insect-resistant transgenic crops have been widely using in the world, transgenic soybean plants against the pod borer are still unknown. This study was conducted to modify and design plant expression vectors containing wild- and modified-*ry2Ah1* genes with the aim to provide genetic materials for further development of pod borer resistant soybean cultivars.

Keywords: *Bacillus thuringiensis*, cloning, *cry2Ah1*, *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