

NGHIÊN CỨU BIỂU HIỆN GEN *CRY2A* DIỆT ẤU TRÙNG RUỒI NHÀ (*MUSCA DOMESTICA*) CỦA CHỦNG *BACILLUS THURINGIENSIS* SEROVAR *KURSTAKI* MSS8.4

Phạm Thùy Dương^{1,✉}, Ngô Đình Bình², Trịnh Thị Thu Hà², Lê Đức Khánh³

¹Trường Đại học Phương Đông

²Viện Công nghệ sinh học, Viện hàn lâm khoa học và công nghệ Việt Nam

³Viện Bảo vệ thực vật

✉Người chịu trách nhiệm liên lạc. E-mail: thuyduong0582@gmail.com

Ngày nhận bài: 08.4.2016

Ngày nhận đăng: 17.8.2017

TÓM TẮT

Các độc tố Cry2A do gen *cry2A* mã hóa là đặc biệt quan trọng vì chúng có hoạt tính diệt nhiều loại côn trùng khác nhau bao gồm: côn trùng bộ Cánh vảy và côn trùng bộ Hai cánh. Mục tiêu của nghiên cứu này nhằm biểu hiện protein Cry2A tái tổ hợp trong *E. coli*, là cơ sở để nghiên cứu tạo ra chế phẩm sinh học diệt côn trùng bộ hai cánh từ vi khuẩn *Bacillus thuringiensis*. *B. thuringiensis* serovar *kurstaki* MSS8.4 là chủng được phân lập từ đất thuộc huyện Sóc Sơn – TP Hà Nội. Chủng MSS8.4 có khả năng sinh tổng hợp đồng thời 2 loại tinh thể hình lưỡng tháp và hình khối lập phương, có khả năng diệt ấu trùng thuộc bộ Cánh vảy và bộ Hai cánh. Đoạn gen mã hóa cho protein Cry2A có kích thước khoảng 1,9 kb được khuếch đại bởi cặp mồi đặc hiệu. Trình tự gen *cry2A* của chủng MSS8.4 được đăng ký trên ngân hàng gen quốc tế với mã số: KM588296 có độ tương đồng 99% và có 6 vị trí sai khác so với trình tự gen *cry2A* trên ngân hàng gen. Các vị trí đó bao gồm: 305 (G-A), 500 (G-A), 783 (T-G), 1054 (T-G), 1303 (G-A), 1575 (C-T). Tuy nhiên, trình tự amino acid của protein cry2A suy diễn có độ tương đồng 99% và chỉ có 5 vị trí sai khác (102 (S-N), 167 (R-Q), 261 (F-L), 352 (W-G), 435 (D-N)), đột biến nucleotide ở vị trí 1575 (C-T) không làm thay thế amino acid. Tiếp đó, trình tự gen này đã được đưa vào vector pET-22b(+) và biểu hiện trong tế bào *E. coli* BL21 (DE3) ở dạng dung hợp với đoạn pelB ở đầu N và đuôi ái lực (His)₆ ở đầu C. Các kết quả điện di protein SDS-PAGE và Western blot cho thấy protein tái tổ hợp Cry2A đã được tạo ra thành công với hiệu suất lớn trong tế bào *E. coli*. Kết quả thử nghiệm với ruồi nhà *M. domestica* cho thấy rCry2A có hoạt tính cao với côn trùng thử nghiệm (LC₅₀ = 264,7 µg).

Từ khóa: *Bacillus thuringiensis*, biểu hiện, diệt côn trùng, gen *cry2A*, ruồi nhà, *Musca domestica*.

MỞ ĐẦU

Các gen *cry2* mã hóa protein tinh thể khoảng 65 - 71kDa, hình thành dưới một số phân loài của *Bacillus thuringiensis* (*B. thuringiensis*) bao gồm: *kurstaki* (HD-1, HD-263, NRD-12 và 14 dòng khác), *thuringiensis*, *tolwarthi*, *israelensis*, *kenyae*... (Ohba *et al.*, 1986; Wu *et al.*, 1991). Các độc tố Cry2A do gen *cry2A* mã hóa là đặc biệt quan trọng vì chúng có hoạt tính với nhiều loại côn trùng khác nhau. Cry2Aa (Winder và Whiteley, 1989; McNeil và Dean, 2011) và Cry2Ag (Zheng *et al.*, 2010) độc với ấu trùng thuộc bộ Cánh vảy và Hai cánh, trong khi Cry2Ab (Winder và Whiteley, 1989; McNeil và Dean, 2011) và Cry2Ac (Wu *et al.*, 1991) chỉ độc đối với côn trùng thuộc bộ Cánh vảy. Ba gen *cry2* đã được công

bổ là: *cry2A*, *cry2B*, *cry2C* (Donovan, 1988; Yamamoto, 1981). Winder và Whiteley (1989) đã tách dòng hai gen liên quan đến *cry2A* và *cry2B* từ vi khuẩn *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1. Cả hai gen mã hóa protein chứa 633 amino acid với khối lượng phân tử khoảng 71 kDa. Mặc dù hai protein Cry tương đồng tới 87% amino acid, nhưng chúng khác nhau trong phổ diệt côn trùng. *Cry2A* là độc hại đối với loài cánh vảy (*M. sexta*) và hai cánh (*A. aegypti*), trong khi đó *Cry2B* là độc hại đối với loài cánh vảy. Độc tố *Cry2A* có tác dụng chống lại hoạt động của côn trùng, bên cạnh việc sử dụng nó như là một loại thuốc trừ sâu sinh học ở dạng thuốc xịt của hỗn hợp bào tử và tinh thể, nó đã được sử dụng trong cây chuyển gen để làm cho cây trồng kháng với các loại sâu bệnh. Maqbool *et al.*, (1998) đã tạo ra lúa

biến đổi gen, cho thấy gen *cry2A* là hiệu quả đối với sâu hại cây lúa tại khu vực Ấn Độ. Sau đó, Zaidi (2005) đã tạo biến đổi gen cây thuốc lá, chống lại loài sâu *Heliothis virescens*. Tuy nhiên, thông tin về gen *cry2* vẫn còn hạn chế và không bao gồm các khu vực địa lý khác biệt. Những công bố về cấu trúc và chức năng của gen *cry2A* trong những năm gần đây là không có.

Trong nghiên cứu này, chúng tôi nghiên cứu tạo dòng và biểu hiện protein Cry2A tái tổ hợp trong *E. coli* nhằm cung cấp cơ sở cho việc nghiên cứu tạo thuốc diệt côn trùng sinh học từ vi khuẩn *B. thuringiensis*.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Chủng vi sinh vật, chủng thử nghiệm

Chủng *E. coli* DH5 α [F⁻ Φ 80lacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17 (rK⁻, mK⁺) phoA supE44 λ - thi-1 gyrA96 relA1] (Thermoscientific) được sử dụng để nhân dòng gen. Chủng *E. coli* BL21 (DE3) [F⁻ ompT hsdSB (rBmB⁻) gal dcm (DE3)] (Thermoscientific) được sử dụng để biểu hiện. Ấu trùng ruồi nhà *M. domestica* tuổi 2 do Phòng Di truyền Vi sinh vật, Viện Công nghệ sinh học cung cấp.

DNA và hệ vector

Cặp môi sử dụng để khuếch đại gen *cry2A* được thiết kế dựa theo trình tự gen *cry2A* của vi khuẩn *Bt* có nguồn gốc từ Ấn Độ, mã hiệu Fj788388 và được tổng hợp bởi hãng IDT có trình tự như sau:

Cry2AF: 5'-TAAGGATCCATGAATAATGTATTGAATAGTGGAAGA-3'

Cry2AR: 5'-ATTCTCGAGATAAAGTGGTGAAGATTAGTTGG-3'

Vector tách dòng pCR2.1 (Thermoscientific) dùng để tách dòng gen. Vector pET 22b (+) (Novagen) được dùng để biểu hiện.

Tách dòng gen *cry2A*

Phản ứng PCR được thực hiện để tổng hợp gen *cry2A* với cặp môi đặc hiệu, phản ứng được tiến hành với tổng thể tích 50 μ l bao gồm 1X Dream Taq Buffer, 2 mM mỗi loại dNTP, 1 pM mỗi môi, 10 ng DNA khuôn và 1U Dream Taq polymerase. Chu trình nhiệt: biến tính ban đầu ở 94 $^{\circ}$ C – 3 phút; 30 chu kỳ tiếp theo: 94 $^{\circ}$ C – 30 giây, 56 $^{\circ}$ C – 1 phút 20 giây, 72 $^{\circ}$ C – 2 phút; hoàn thành kéo dài chuỗi 72 $^{\circ}$ C – 10 phút. Sản phẩm PCR được điện di kiểm tra trên

gel agarose 1% và được tinh sạch bằng bộ kit GeneJET PCR Purification (Thermoscientific)

Sản phẩm tổng hợp gen *cry2A* được gắn vào vector tách dòng pCR2.1 và biến nạp vào tế bào *E. coli* DH5 α . Sau đó chọn lọc trên môi trường có chứa ampicillin (100 μ g/ml). Các dòng tế bào sau đó được kiểm tra bằng phương pháp PCR trực tiếp từ khuẩn lạc với cặp môi đặc hiệu. Dòng tế bào mang gen sẽ được gửi đi đọc trình tự gen bằng máy đọc trình tự tự động (Macrogen, Hàn Quốc).

Biểu hiện gen

Gen *cry2A* trong vector tách dòng được cắt và gắn vào vector biểu hiện pET22b(+) bằng vị trí cắt của 2 enzyme *Bam*HI và *Xho*I. Sản phẩm nối được biến nạp vào tế bào *E. coli* BL21(DE3) và trải trên môi trường LB có chứa ampicilin (μ g/ml). Các dòng tế bào được kiểm tra bằng phương pháp PCR trực tiếp từ khuẩn lạc với cặp môi đặc hiệu.

Các tế bào *E. coli* BL21 mang vector biểu hiện pET22b(+)-*cry2A* được nuôi cấy trong môi trường LB có bổ sung Ampicillin nồng độ 100 μ g/ml qua đêm ở 37 $^{\circ}$ C, 200 vòng/phút rồi chuyển 1% sang môi trường LB mới. Tiếp tục nuôi cấy trong cùng điều kiện sao cho OD₆₀₀ = 0,4 - 0,6 thì bổ sung chất cảm ứng IPTG nồng độ cuối đạt 1 mM, nuôi tiếp ở 37 $^{\circ}$ C trong 4 giờ. Tế bào được thu lại bằng cách ly tâm 6000 v/p trong 10 phút. Rửa tế bào bằng nước khử ion 200 l, ly tâm 6000 v/p trong 5 phút, thu tế bào. Bổ sung 200 l nước khử ion, làm tan tế bào. Kết quả của sản phẩm protein tái tổ hợp được kiểm tra trên gel polyacryamide 12,6% (Hoefer, 1994).

Kiểm tra protein tái tổ hợp bằng Western blot

Protein sau khi tinh sạch qua cột sắc ký ái lực với Ni²⁺ được kiểm tra bằng SDS-PAGE trên gel acryamide 12% và chuyển lên màng PVDF nhờ hệ thống chuyển màng Trans blot semi dry (Bio-Rad). Màng chứa kháng nguyên được phủ bằng dung dịch khóa màng (Blocking) (5% sữa tách bơ trong dung dịch đệm TBST (0,1% Tween 20 trong đệm Tris-saline)) trong 1 giờ. Sau khi rửa màng 3 lần bằng đệm TBST, màng được ủ với kháng thể 1 (kháng thể kháng His - HyTest), độ pha loãng 5000 lần. Sau 1 giờ, màng được rửa lại bằng TBST 3 lần để loại bỏ hoàn toàn liên kết không đặc hiệu. Tiếp tục ủ màng với kháng thể 2 (kháng thể cộng hợp peroxidase kháng chuột - HyTest), độ pha loãng 10000 lần. Sau 2 giờ, màng được rửa lại 3 lần với đệm TBST và phát hiện bằng dung dịch chứa cơ chất cho peroxidase (Sigma). Màng trong dung dịch cơ chất

được ủ ở nhiệt độ phòng 5 - 10 phút, sau đó được dùng phản ứng bằng H₂O. Kết quả được xác định trên ánh sáng thường.

Thử hoạt tính diệt ruồi của các chủng Bt

Các chủng Bt được lên men trong bình tam giác 500 ml trong 72 h. Dịch lên men sau đó được ly tâm thu protein tổng số và pha loãng thử hoạt tính với 2 nồng độ protein tổng số là 88,9 ng/cm² và 44,45 ng/cm² diện tích mặt lá. Thử hoạt tính diệt sâu trên đối tượng ấu trùng ruồi nhà và các thí nghiệm được tiến hành lặp lại 3 lần trên ấu trùng ruồi nhà tuổi 2. Thí nghiệm được bố trí: Mỗi chủng 3 cốc, mỗi cốc 10 ấu trùng ruồi nhà. Tỷ lệ sâu chết được tính theo công thức Abbott (Abbott MS, 1925): $A = (C - T)/C \cdot 100$. Trong đó: A: % dòi chết, C: Số dòi sống ở mẫu đối chứng, T: Số dòi sống ở mẫu thí nghiệm.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Tách dòng gen *cry2A*

Nhóm gen mã hóa protein Cry2 là nhóm gen mới hiện được các nhà khoa học quan tâm. Protein tinh thể độc tố của nhóm gen này có tác dụng với nhiều loài côn trùng thuộc bộ hai cánh. Theo nhiều tài liệu đã công bố trên thế giới, gen *cry2A* được phát hiện thuộc dưới loài *Bt. kurstaki*, *sotto*, *israelensis*, *kenyae*... có hoạt tính diệt côn trùng bộ hai cánh. Để phát hiện các gen *cry2A*, phương pháp PCR được sử dụng để khuếch đại gen *cry2A* với cặp mồi đặc hiệu, khuôn là DNA được tách từ chủng vi khuẩn *B. thuringiensis* serovar *kurstaki*. Theo tính toán lý thuyết, đoạn gen *cry2A* sau khi tổng hợp với cặp mồi đặc hiệu thu được sản phẩm có chiều dài khoảng 1902 bp. Sản phẩm PCR cho thấy một băng đặc hiệu đúng kích thước mong muốn.

Gen *cry2A* được tách dòng trong vector pCR2.1, giải trình tự và so sánh với các trình tự gen thuộc phân nhóm *cry2Aa* trên Ngân hàng Gen Quốc tế. Kết quả cho thấy trình tự đoạn gen *cry2Aa* từ chủng MSS8.4 có chiều dài 1902 bp và có độ tương đồng là 99% với trình tự tương ứng đã công bố trước đây trên ngân hàng gen với 6 điểm sai khác: 305 (G-A), 500 (G-A), 783 (T-G), 1054 (T-G), 1303 (G-A), 1575 (C-T). Xây dựng cây phân loại cho trình tự gen này với các gen thuộc nhóm *cry2A* cũng cho thấy đây là trình tự gen thuộc phân nhóm *cry2Aa* (Hình 2). Kết quả so sánh trình tự amino acid mã hoá bởi gen *cry2Aa* thu được so với các trình tự mã hoá gene *cry2Aa* tham chiếu khác cho thấy có 5 sự sai khác về trình tự amino acid ở các vị trí 102 (S-N),

167 (R-Q), 261 (F-L), 352 (W-G), 435 (D-N). Đột biến nu ở vị trí 1575 (C-T) không làm thay thế amino acid. Điều này chứng tỏ rằng gen *cry2Aa* được nhân dòng từ chủng vi khuẩn MSS8.4 là gen mã hóa cho độc tố Cry2Aa. Như vậy, chúng tôi đã tách dòng thành công gen *cry2A*. Các nghiên cứu trước đây đã chỉ ra protein Cry2A có khả năng diệt ấu trùng ruồi nhà *Musca domestica*, một loài côn trùng phổ biến tại Việt Nam. Vì vậy, chúng tôi tiếp tục nghiên cứu biểu hiện gen *cry2A* nhằm thu protein Cry2A phục vụ cho nghiên cứu tiếp theo.

Thiết kế vector biểu hiện

Khi khảo sát vùng cắt đa điểm của vector pET22b(+), có 2 enzyme giới hạn nằm trong vùng cắt đa điểm không cắt trình tự gen *cry2A* đã tổng hợp là *BamHI* và *XhoI*. Do vậy, để đưa đoạn gen *cry2A* vào vector này tại 2 vị trí của 2 enzyme giới hạn nói trên, cặp mồi đặc hiệu đã thiết kế được đưa thêm trình tự nhận biết của 2 enzyme này. Sơ đồ thiết kế vector biểu hiện pET22b(+)-*cry2A* như hình 3. Như vậy, gen *cry2A* được gắn vào vector biểu hiện pET22 với đoạn pelB ở đầu N và đuôi ái lực (His)₆ ở đầu C. Nhiều nghiên cứu đã chỉ ra rằng trình tự pelB cho phép làm tăng tính tan của các protein tái tổ hợp và đưa chúng ra vùng periplasm. Đuôi ái lực (His)₆ cho phép tinh sạch protein tái tổ hợp bằng cách sử dụng sắc ký ái lực với Niken.

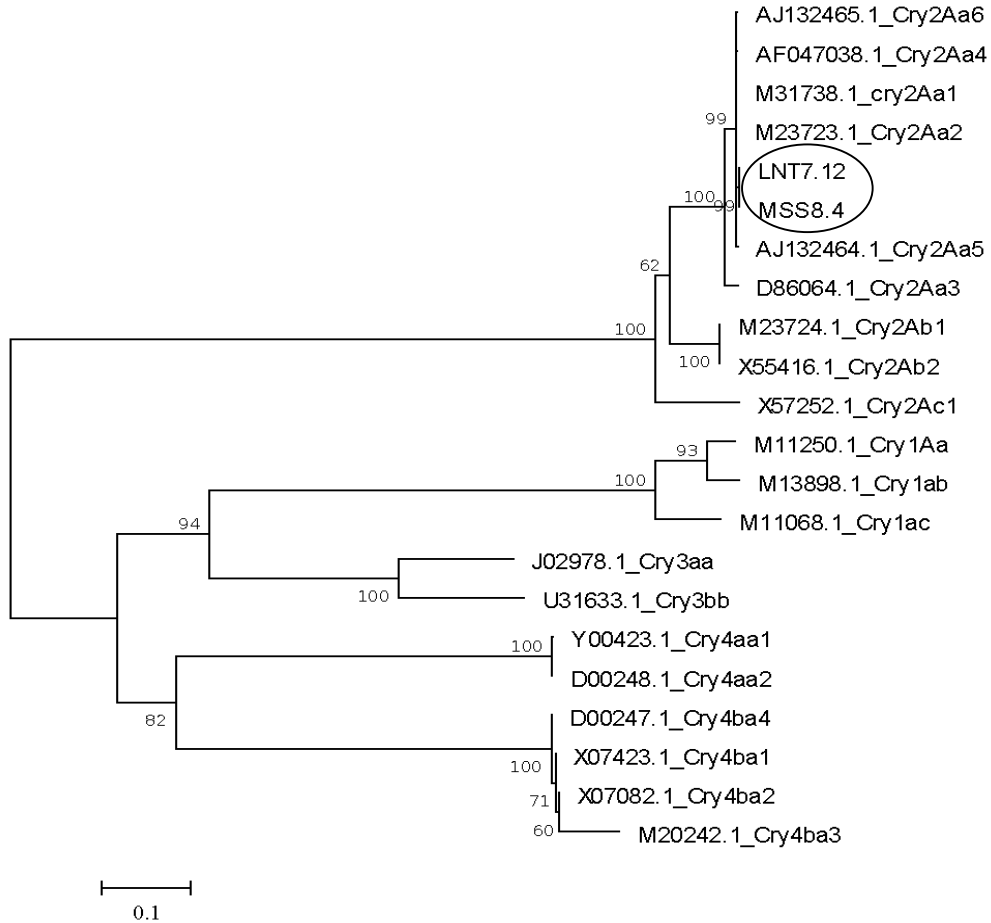
Biểu hiện gen *cry2A* trong chủng *E. coli* BL21 (DE3)

Đoạn gen *cry2A* nằm trong vector pET22b(+) được điều khiển bởi promotor T7, đây là một promotor cho khả năng biểu hiện protein tái tổ hợp mạnh, sử dụng phổ biến để biểu hiện trong tế bào *E. coli*. Mặt khác, promotor T7 được kiểm soát chặt chẽ bởi chất cảm ứng IPTG có trong môi trường. Ngoài ra, trong pET22b(+) có chứa gen kháng ampicillin nên nhân tố chọn lọc mà chúng tôi sử dụng là ampicillin nồng độ 100µg/ml.

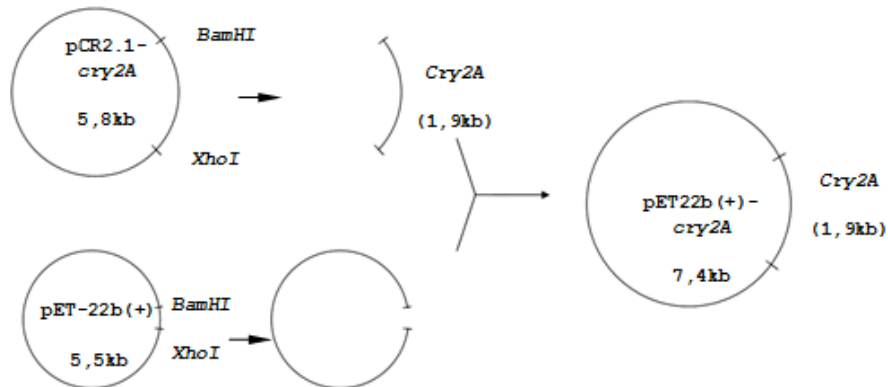
Để thu nhận protein độc tố Cry2A của vi khuẩn *B. thuringiensis*, nuôi dòng tế bào *E. coli* BL21 (DE3) mang vector tái tổ hợp pET-22b(+)-*cry2A* như đã trình bày trong phương pháp biểu hiện. Kết quả điện di protein tổng số trên gel SDS-PAGE (Hình 3) cho thấy, dòng tế bào *E. coli* BL21 (DE3) mang vector biểu hiện pET-22b(+)-*cry2A* khi được cảm ứng cho phép tạo một vạch protein đậm có kích thước khoảng 70 kDa, hoàn toàn trùng khớp với tính toán lý thuyết về kích thước của protein Cry2A ở dạng dung hợp. Như vậy có thể kết luận rằng quá

trình biểu hiện gen *cry2A* đã thành công dưới sự kiểm soát của promotor T7. Sử dụng phương pháp

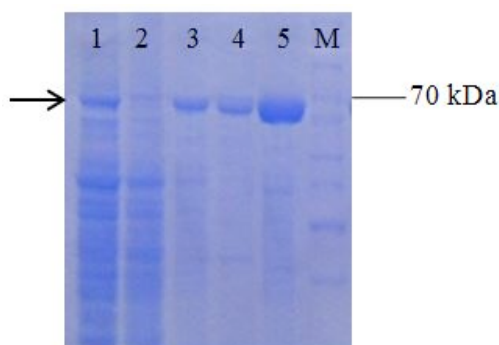
Bradford đã xác định được nồng độ protein là 54,5 $\mu\text{g/ml}$.



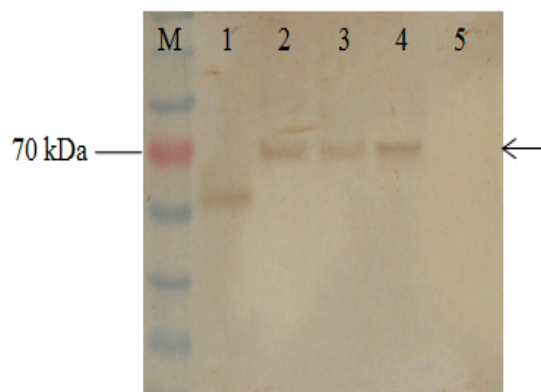
Hình 1. Phân nhóm quan hệ của trình tự DNA phân lập từ chủng MSS8.4 với các trình tự gen *cry*.



Hình 2. Sơ đồ thiết kế vector biểu hiện gen *cry2A*.



Hình 3. Sự biểu hiện của gen cry2A trên gel polyacrylamide 12.6%. 1: Mẫu không cảm ứng, 2: Mẫu trước cảm ứng; 3-5: Mẫu sau cảm ứng thu ở 1h, 2h và 5h; M: Thang chuẩn protein (Thermosciencetific).



Hình 4. Sự biểu hiện của protein Cry2A bằng kỹ thuật Western blot. M: Thang chuẩn protein (Biobasic); 1: Đối chứng dương (Sigma); 2-4: Mẫu sau cảm ứng thu ở 1h, 2h, 5h; 5: Mẫu không mang gen.

Kiểm tra Cry2A tái tổ hợp bằng Western blot

Trong quá trình biểu hiện protein tái tổ hợp, một điểm thiết yếu cần phải xác định là protein biểu hiện phải chính xác là protein mong muốn. Một trong những kỹ thuật đầy là Western blot.

Trong thí nghiệm này, dựa trên đặc tính của protein là sự dung hợp của protein đích với đuôi his-tag nên protein đích được xác định gián tiếp qua protein gắn kết đuôi his. Dựa vào sản phẩm kháng thể kháng protein gắn kết đuôi His (kháng thể 1) đã được thương mại, protein đích được nhận biết qua kỹ thuật Western blot. Kết quả hình 4 cho thấy, protein dung hợp được thể hiện qua 1 băng với kích thước đúng như tính toán (khoảng 70 kDa). Điều này có thể khẳng định, protein Cry2A đã được biểu hiện thành công trong hệ vector pET22b(+).

Để có thể tạo ra sản phẩm Cry2A có hoạt tính diệt côn trùng bộ Hai cánh, sản phẩm protein cần được tiếp tục xử lý và kiểm tra diệt côn trùng trên côn trùng thử nghiệm.

Thử hoạt tính diệt côn trùng của protein tái tổ hợp

Mẫu protein sau xử lý được thử nghiệm hoạt tính với ấu trùng ruồi *M. domestica* (Bảng 1). Kết quả thử nghiệm hoạt tính ghi nhận sau 72 giờ cho thấy, protein tái tổ hợp có hoạt tính cao với côn trùng thử nghiệm ($LC_{50} = 264,7 \mu\text{g}$). Đồng thời hoạt tính của protein Cry2A tự nhiên của chủng MSS8.4 ($LC_{50} = 283,5 \mu\text{g}$) cũng cao hơn của chủng chuẩn 4D4 ($LC_{50} = 442,5 \mu\text{g}$).

Như vậy, protein tái tổ hợp Cry2A đã được biểu hiện thành công trong *E. coli* và protein tái tổ hợp có hoạt tính diệt ấu trùng ruồi nhà cao hơn protein tự nhiên ($LC_{50}=264.7 \mu\text{g}$ so với $283.5 \mu\text{g}$). Kết quả này cao hơn rất nhiều so với nghiên cứu của Misra và cộng sự, các phân đoạn protein Cry2Aa4 sau tinh sạch bằng sắc ký ái lực có LC_{50} trong khoảng 100-500 mg (Misra *et al.*, 2002). So với kết quả nghiên cứu của Reyaz và Arulselvi (2016), protein tái tổ hợp sau tinh sạch Cry2A11 có hoạt tính đối với *Spodoptera litura* và *Helicoverpa armigera* ($LC_{50}=2,448 \mu\text{g/ml}$) và *Helicoverpa armigera* ($LC_{50}=3,374\mu\text{g/ml}$) thì hoạt tính của protein rCry2A thấp hơn khá nhiều.

Bảng 1. Thử hoạt tính sinh học của rCry2A và protein tinh thể từ *B. thuringiensis* với ấu trùng *M. Domestica*.

Côn trùng	Protein	LC50 (µg)	Giới hạn LC50 tin cậy	
			Thấp nhất	Cao nhất
<i>M. domestica</i>	4D4	442.5	11.3	56.5
	MSS8.4	283.5	17.6	100
	rCry2A	264.7	28.3	66.1

KẾT LUẬN

Với mục tiêu nhằm biểu hiện protein Cry2A tái tổ hợp trong *E. coli*, gen *cry2A* đã được tách dòng trong *E. coli*. Hơn nữa, đã biểu hiện thành công protein này trong tế bào *E. coli* và cho hoạt tính diệt ấu trùng ruồi nhà *M. domestica*. Kết quả này mở ra triển vọng trong việc sử dụng nguồn protein tái tổ hợp để tạo ra các chế phẩm diệt côn trùng có nguồn gốc sinh học.

Lời cảm ơn: Để hoàn thiện được bài báo với các nội dung như trên, nhóm tác giả xin chân thành cảm ơn Đề tài “Khai thác và phát triển nguồn gen diệt côn trùng của vi khuẩn *Bt* phục vụ cho sản xuất chế phẩm sinh học” của Phòng Di truyền Vi sinh vật-Viện Công nghệ sinh học đã cung cấp kinh phí, trang thiết bị máy móc để nhóm tác giả có thể thực hiện các thí nghiệm nghiên cứu cần thiết.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Reyaz AL, Indra Arulselvi (2016) Cloning, Characterization and Expression of a Novel Haplotype *cry2A*-type Gene from *Bacillus thuringiensis* strain SWK1, native to Himalayan valley Kashmir. *J Invertebr Pathol*. 136:1-6.
- McNeil BC, Dean DH (2011) *Bacillus thuringiensis* Cry2Ab is active on *Anopheles mosquitoes*: single D block exchanges reveal critical residues involved in activity. *FEMS Microbiol Lett* 325(1): 16-21.
- Donovan WP, Dankocsik CC, Gilbert MP, Gawron- Burke MC, Groat RG, Carlton BC. (1988). Amino acid sequence and entomocidal activity of the P2 crystal protein. *J Biol Chem* 263: 561-567
- Faiza Saleem, Abdul Rauf Shakoori (2010)

Characterization of *cry2A*-type Gene(s) from Pakistani Isolates of *Bacillus thuringiensis* Toxic to Lepidopteran and Dipteran Insects. *Pakistan J Zool* 4: 181-193.

Hari S Misra, Nivedita P, Khair nar, Manjula Mathur, N. Vijayalakshmi, Ramesh S. Hire, T. K. Dongre and S. K. Mahajan (2002) Cloning and characterization of an insecticidal crystal protein gene from *Bacillus thuringiensis* subspecies kenyae. *J Genet* 81(1): 5-11

Hoefer (1994) Protein electrophores, *User Manual*.

Ohba M, Aizawa K (1986) Distribution of *Bacillus thuringiensis* in soil of Japan. *J Invertebr Pathol* 47: 12-20.

Shahina Bano MaqboolPaul Christou (1999) Multiple traits of agronomic importance in transgenic indica rice plants: analysis of transgene integration patterns, expression levels and stability. *Mol Bree* 5(5): 471-480

Winder WR, Whiteley HR (1989) Two highly related insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis* subsp. kurstaki possess different host range specificities. *J Bacteriol* 171: 965-974

Wu D, Cao XL, Bai YY, Aronson AI (1991) Sequence of an operon containing a novel 8-endotoxin gene from *Bacillus thuringiensis*. *FEMS Microbiol Lett* 81: 31-36

Yamamoto T, McLaughlin RE (1981) Isolation of a protein from the parasporal crystal of *Bacillus thuringiensis* var. kurstaki toxic to the mosquito larva, *Aedes taeniorhynchus*. *Biochem Biophys Res Commun* 103: 414-421

Zaidi MA, Mohammadi M, Postel S, Masson L, Altosaar I. (2005) The Bt gene *cry2Aa2* driven by a tissue specific ST-LS1 promoter from potato effectively controls *Heliothis virescens*. *Transgenic Res* 200514(3): 289-98.

Zheng AP, Zhu J, Tan FR, Guan P, et al. (2010). Characterisation and expression of a novel haplotype *cry2A*-type gene from *Bacillus thuringiensis* strain JF19-2. *Ann Microbiol* 60: 129-134.

EXPRESSION OF CRY2A GENE ACITIVE ON HOUSE FLY LARVAL (*MUSCA DOMESTICA*) FROM A NOVEL *BACILLUS THURINGIENSIS* SEROVAR *KURSTAKY* MSS8.4

Phạm Thuỳ Dương¹, Ngô Đình Bình², Trịnh Thị Thu Hà², Lê Đức Khanh³

¹Phuong Dong University

²Institute of Biotechnology, Vietnam Academy of Science and Technology

³Plant Protection Research Institute

SUMMARY

Cry2A toxins, a family of pesticidal proteins encoded by *cry2A* genes is especially important for natural pesticides production, because of their toxicity against various insects, including Lepidopteran and Dipteran. The aim of this study is to express recombinant Cry2A protein in *Escherichia coli* which is the basis for the

research to produce insecticidal composition of Diptera insects from *Bacillus thuringiensis*. *B. thuringiensis* strain MSS8.4 was one of the isolates collected from soil samples in Soc Son district, Hanoi city. This strain produces bipyramidal and cuboidal crystals and has dual activities toward lepidopteran and dipteran insects. DNA fragment of around 1.9kb encoding for a Cry2A protein was amplified by specific primers, clone into vector pCR2.1 before sequencing. The raw sequences was assembled and compared to the reference sequences downloaded from Genbank. The sequence of *cry2A* gene from *B. thuringiensis* serovar *kurstaki* MSS8.4 (deposited in GenBank: KM588296) showed almost identity (99%) compared to that of GenBank: *cry2A* with six different positions (305 (G-A), 500 (G-A), 783 (T-G), 1054 (T-G), 1303 (G-A), 1575 (C-T)). Five of them change the amino acid sequence at four different positions ((102 (S-N), 167 (R-Q), 261 (F-L), 352 (W-G) and 435 (D-N)), whereas the mutation point at 1575 does not change the amino acid. The gene sequence was then introduced into pET-22b(+) vector and expressed in *E. coli* BL21 (DE3) in a fusion form with pelB fragment at N terminal and (His)₆ at C terminal. SDS-PAGE and Western blot analyses showed that the recombinant protein Cry2A was successfully produced with high yeild in *E. coli* cells. Trial experiment with house flies *M. domestica* showed that recombinant Cry2A had high activity against tested insects (LC₅₀ = 264,7 µg).

Keywords: *Bacillus thuringiensis*, *cry2A* gene, expression, insecticides, *Musca domestica*